

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4708510号

(P4708510)

(45) 発行日 平成23年6月22日(2011.6.22)

(24) 登録日 平成23年3月25日(2011.3.25)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 31/56 (2006.01)

A 6 1 K 31/56

A 6 1 K 31/70 (2006.01)

A 6 1 K 31/70

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

D

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

請求項の数 2 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-525764
 (86) (22) 出願日 平成6年5月16日(1994.5.16)
 (65) 公表番号 特表平9-500363
 (43) 公表日 平成9年1月14日(1997.1.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1994/005433
 (87) 国際公開番号 W01994/026307
 (87) 国際公開日 平成6年11月24日(1994.11.24)
 審査請求日 平成11年11月16日(1999.11.16)
 審判番号 不服2007-14590(P2007-14590/J1)
 審判請求日 平成19年5月21日(2007.5.21)
 (31) 優先権主張番号 063,399
 (32) 優先日 平成5年5月17日(1993.5.17)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 511005354
 サイトカイン ファーマサイエンシズ、インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 19406 ペンシルバニア州 キング オブ プルシア、スイート 420、サウス ワーナー ロード 150
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100122389
 弁理士 新井 栄一
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイトカイン媒介毒性に関係する疾患の治療における遊走阻止因子の抑制

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

M I F の生物活性を抑制することができ、M I F と結合してその生物活性を中和する、有効量の抗M I F 抗体を含んでなる、サイトカイン媒介毒性に関係する症状を治療するための医薬組成物であって、該抗M I F 抗体はM I F タンパク質に特異的であり、該M I F タンパク質は図4に示すヒトM I F 配列を有する該医薬組成物。

【請求項 2】

体液サンプル中のM I F レベルを病気の症状の指標として検出する方法であって、(a) 被験サンプルをM I F 結合相手と、M I F -結合相手複合体を形成するのに十分な条件下および時間で接触させ、そして(b) M I F -結合相手複合体を検出することを含んでなり、ここでM I F 結合相手は、抗M I F 抗体であり、M I F は図4に示すヒトM I F 配列を有する、該方法。

【発明の詳細な説明】

1. 序論

本発明は、遊走阻止因子(migration inhibitory factor: M I F)の放出および／または生物学的活性を抑制するための組成物ならびに方法に関する。特に、本発明は、ショック、炎症、移植片対宿主病および／または自己免疫疾患を含むがこれらに限らないサイトカイン媒介毒性に関係する様々な疾患を治療するための上記の組成物および方法の使用に関する。

2. 発明の背景

2.1. 敗血症性ショックにおけるサイトカイン

敗血症性ショックは、最も顕著には有毒な血行力学的変化と凝血異常により特徴づけられる多岐にわたる病理学的症状であり、多臓器不全へ導き、しばしば死に至らしめる。敗血症性ショック徴候の原因となる生理学的作用機序の変化と、こうした変化を誘導しかつ制御する細胞機関はいまだ詳細には解明されていない。しかし、大まかな点では、ここ数年間のうちに敗血症性ショックに至る現象の共通した見解が出てきている。とりわけ、今日では、敗血症性ショックは宿主由来の多数の内因性メディエーター分子の個々の、団結しかつ協力した作用を反映するものであることが一般的に受け入れられている。これらのメディエーターは宿主が侵害されたことを示す開始刺激に応答して産生され、一般的に白血球の産物として最初に認識されたクラスのパプチドメディエーターがサイトカインとして知られるようになった。宿主ホメオスタシス（恒常性）の病理学的変化および毒性作用のメディエーターとして、これらの内因性因子は可能性のある魅力的な治療ターゲットを提供する。そして、敗血症性ショックは依然としてサイトカインにより媒介される致死的な臨床上の合併症のままであり、これに対する有効な治療方法は存在していない。

伝統的に「敗血症性（septic：腐敗性）」ショックと呼ばれているが、細菌ばかりでなく、ウイルス、真菌、寄生体を含む様々な微生物による感染が敗血症性ショックを引き起こす。事実、ショック徴候はより厳密には感染そのものよりも侵入に対する宿主の応答と関連しており、例えば、癌や外傷も開始刺激となりうる。最も研究が進んでいる例の一つとして、グラム陰性細菌による感染の場合には、宿主血流中にリポ多糖（LPS）のような細胞内毒素が出現することにより、LPS（それ自体はほとんどの細胞に対して比較的無毒である）の毒性を直接および間接的にメディエートする各種宿主因子の内因的生産が生じる。こうした宿主由来のメディエーターとして、現在では十分に確認されている多くの炎症性サイトカイン、古典的な内分泌ホルモン、さらに多数の他の内因性因子、例えばロイコトリエン、血小板活性因子などが含まれる。しかしながら、一般的に認められていることだが、宿主応答に関与する配役全体およびそれらの相互に関係した役割はいまだ十分には解明されていない。

一般に、侵入された宿主において比較的早い時期に出現するメディエーターは、その後に出現する因子の放出を開始させると考えられている。また、多くの内因性メディエーターはそれらの標的組織で直接的なエフェクター機能を発揮するばかりか、他のメディエーターへのその後の応答のために限られた部位の組織または遠く離れた組織を活性化する。宿主因子のこの相互作用ネットワークは「サイトカインカスケード」と言われている。この用語の意味は、ただ1つのまたは2、3の開始刺激が多数の宿主メディエーターの終局的な放出および関与を誘導するような方法での宿主応答の急速な拡大および増幅を表している。宿主応答の多くは侵入物を撃退するのを助けると考えられているが、あまりに強くまたは弱くモジュレートされた内因的応答は、数時間以内に死に至るような細胞、組織または全身レベルでの宿主ホメオスタシスの重大な変化を急速に生じさせるように促進することがある。

一緒になってサイトカインカスケードを構成する相互作用因子のなかで、腫瘍壊死因子 α （TNF α ）として知られるサイトカインは、これまでに同定された最も重要なものである。TNF α はLPSチャレンジ後に循環系に現れる最初のサイトカインである。TNF α の実験的投与により生じる血行力学的および代謝的变化は、内毒素血症や敗血症性ショックで観察された変化によく似ている。モデル動物において、TNF α は細かな点で敗血症性ショックに類似した致死的徴候を開始させることができる唯一の宿主因子である。これに関して、TNF α は敗血症性ショックの十分なメディエーターであると見なすことができる。抗TNF α 抗体のような機能的に中和するTNF α アンタゴニストは、さもなければ致死的な細菌感染に対して防御的であり、この点でTNF α は敗血症性ショックの必要なメディエーターであると見なすことができる。

その他のサイトカインも宿主のLPS応答に関与するが、循環系には後で現れてくる。しかし、他のサイトカインはどれも敗血症性ショックの必要かつ十分なメディエーターではないことが分かっている。例えば、LPSチャレンジ後2時間以上を経過して血清中に出

10

20

30

40

50

現するある種のインターロイキン（IL-1、IL-6およびIL-8）および6時間後に現れてくるインターフェロン γ （IFN- γ ）は、敗血症性ショックにおいて重要な役割を果たしていると考えられ、ある種の疾病モデルまたは内毒素血症の実験条件下で致死率に寄与することが明らかである。特定のインターロイキンおよびインターフェロンの作用の拮抗作用はある種の条件下で顕著な防御効果を賦与することが判明した。それにもかかわらず、こうした他の因子はそれ自体では、さもない健康な個体において完全な敗血症性ショックに似た結果を引き出すことができず、これら他のサイトカインはどれも、敗血症性ショックにおいてTNF α と同程度に中心的かつ決定的な役割を果たしていないようである。

前述のことを考慮すると、TNF α は敗血症性ショックを治療するための理想的なターゲットの立場にある。残念ながら、内因性TNF α 応答は一時的であるという特徴のため、この可能性のある治療法は実際的にはかなりの制限を受けられる。急性疾患において最も早期に誘導されるメディエーターの一つであるTNF α はボラス内毒素チャレンジ後（30～90分）に速やかにピークに達し、そして直ちに消失する。敗血症性ショックでのTNF α の損傷作用の大半はこの初期の間に完了すると推測され、それゆえ、この時期に抗TNF α 抗体のようなTNF α アンタゴニストが存在することが理想的である。この治療期間は明らかに大変短く、しかも初期に起こるので、抗TNF α をベースとした治療薬のタイムリーな送達（デリバリー）を臨床的に実施することはきわめて困難であろう。

かくして、敗血症性ショックおよび他のサイトカイン媒介毒性反応を治療するためのターゲットとしてサイトカインを利用するために、サイトカインカスケードの必要な成分であって、しかも臨床治療中に治療拮抗作用が到達しうる内因的応答のある時期に出現する、別のターゲットを発見するという絶望的な必要性が存在している。

2.2. 防御サイトカインの供給源としての下垂体

最近の研究から、下垂体は内毒素により誘導されるTNF α およびIL-1の生産を阻止する因子を産生し、従ってショックおよび／または他の炎症反応の治療に使用し得る潜在的防御因子の供給源として役に立つことが示唆された（Suzukiら, 1986, Am. J. Physiol. 250: E470-E474; Sternbergら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2374-2378; Zuckermanら, 1989, Eur. J. Immunol. 19: 301-305; Edwards IIIら, 1991a, Endocrinol. 128: 989-996; Edwards IIIら, 1991b, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2274-2277; Silversteinら, 1991, J. Exp. Med. 173: 357-365）。これらの研究において、下垂体切除マウス（すなわち、下垂体を外科的に切除したマウス）は、擬似手術を行った対照マウスと比べて、LPS注射に対して著しく増加した感受性を示した。実際、対照マウスのLPS LD₁₀₀は、下垂体切除マウスについて測定した値よりも約1～2 log高く、このことは下垂体が内毒素チャレンジに抵抗する宿主動物の能力を高めるように作用する因子を1種以上産生していることを示唆する。これらの研究のいくつかはACTHおよびアドレノコルチコステロイドの関与を示している（例えば、Edwards IIIら, 1991aおよび1991b, 前掲）。しかし、他のデータは下垂体由来の他の防御因子の存在を暗示している。

ごく最近になって、マウスマクロファージ遊走阻止因子（MIF）がLPSにより誘導される下垂体タンパク質として同定された（Bernhagenら, 1993, J. Cell. Biochem. Supplement 17B, Abstract E306）。MIFは内毒素血症でのサイトカインの有毒作用を中和することができる防御因子の一つであると仮定しうるが、敗血症性ショックにおけるその役割は本発明以前には研究されることがなかった。

2.3. MIF: マクロファージ遊走阻止因子

MIFはモルモットマクロファージのランダム遊走を阻止するT細胞産物として25年以上も前に初めて記述された（Bloom & Bennett, 1966, Science 158: 80-82; David, 1966, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65: 72-77）が、局所または全身炎症反応におけるMIFの正確な役割は大部分が解明されないままであった。MIFは遅延型過敏反応と関係があり（Bloom & Bennett, 1966, 前掲; David, 1966, 前掲）、レクチン活性化T細胞によって産生され（Weiserら, 1981, J. Immunol. 126: 1958-1962）、そしてマクロファージの付

10

20

30

40

50

着、食作用および殺腫瘍活性を増強する (Nathanら, 1973, J. Exp. Med. 137: 275-288; Nathanら, 1971, J. Exp. Med. 133: 1356-1376; Churchillら, 1975, J. Immunol. 115: 781-785) と報じられている。残念ながら、これらの研究の多くは、やはり遊走阻止活性を有する I F N- γ や I L-4 のような他のサイトカイン類を含むことがあとで分かった混合培養上清を使用するものであった (McInnes & Rennick, 1988, J. Exp. Med. 167: 598-611; Thurmanら, 1985, J. Immunol. 134: 305-309)。

組換えヒト M I F は最初にヒト T 細胞からクローニングされ (Weiserら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7522-7526)、血液由来のマクロファージを活性化して、細胞内寄生体および腫瘍を *in vitro* で殺し、I L-1 β および T N F α の発現を刺激し、そして酸化窒素の合成を誘導することが明らかにされた (Weiserら, 1991, J. Immunol. 147: 2006-2011; Pozziら, 1992, Cellular Immunol. 145: 372-379; Weiserら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 8049-8052; Cunhaら, 1993, J. Immunol. 150: 1908-1912)。しかし、ごく最近まで、精製された M I F の信頼できる供給源が無かったことから、この分子の正確な生物学的プロファイルの研究は妨げられていた。

3. 発明の概要

本発明は、遊走阻止因子 (M I F) の放出および／または生物学的活性を抑制する組成物ならびに方法に関する。さらに、本発明は、ショック、炎症、移植片対宿主病および／または自己免疫疾患を含むがこれらに限らないサイトカイン媒介毒性に関係する様々な疾患を治療するための上記の組成物および方法の使用に関する。

本発明による M I F 活性の抑制は多くの方法で達成することができ、これらの方法として、M I F 結合相手 (すなわち、M I F に結合してその生物活性を中和する因子) の使用、例えば、中和抗 M I F 抗体、可溶性 M I F レセプター、M I F レセプター断片、M I F レセプター類似体; M I F レセプターのアンタゴニストの使用、例えば、抗 M I F レセプター抗体、M I F レセプターと結合するが該レセプターを活性化しない不活性 M I F 類似体、M I F 放出を抑制するか、または M I F の正常な立体配置を変更するか、または生産的 M I F / M I F レセプター結合を抑制する小さい分子; または M I F 遺伝子および／または M I F レセプター遺伝子から誘導されるヌクレオチド配列の使用、例えば、アンチセンス、リボザイムおよび／または三重らせんのアプローチにより M I F 発現を妨げるかまたは低下させるコード配列、非コード配列および／または調節配列; を挙げることができるが、これらに限らない。上記方法を別々に使用したり併用することにより、関連症状の治療において M I F の放出および／または活性を抑制することができる。さらに、こうした治療は、(a) サイトカイン媒介毒性のイニシエーターを阻止するかまたはそれに拮抗する (例: 抗 L P S 抗体); (b) 内因性サイトカイン応答への毒性関与物質を抑制するかまたはそれに拮抗する (例: 抗 T N F α 、抗 I L-1、抗 I F N- γ 、I L-1 R A); または (c) それ自体がサイトカイン媒介毒性を抑制するかまたはそれに拮抗する (例: ステロイド、グルココルチコイド、I L-10) 他の療法と組み合わせてもよい。

本発明は、第一に、M I F の *in vivo* 投与が内毒素チャレンジ後の動物の致死率を高めるという驚くべき発見と、第二に、M I F 活性の *in vivo* 抑制が内毒素または T N F α のいずれかによるチャレンジ (このチャレンジはさもないとショックによる死に至らしめるものである) 後の動物の長期生存をもたらすという驚くべき発見に部分的に基づくものである。本発明以前には、炎症／ショック反応における M I F の役割はなにも知られていなかった。さらに、既存の証拠ならびに観察は、せいぜい、M I F が内毒素誘導ショックの治療において有益な役割を果たしうることを示した。第一に、M I F は細胞内寄生体および腫瘍細胞のマクロファージ殺傷を増強することが示された。第二に、M I F は下垂体 (ショック徴候に関与する悪化因子ではなく防御因子の供給源として以前に提唱されていた器官) により発現される内毒素誘導タンパク質である。このような予想に反して、本発明者らは、M I F 活性が実際には内毒素誘導ショックを悪化させること、そして M I F 活性の抑制がサイトカイン媒介毒性の致死作用を成功裏に治療するために使用され得ることを見いだした。

本発明は、M I F が内毒素誘導ショックを悪化させ、抗 M I F がモデル動物において内毒

素誘導致死率を低下させることを立証する実施例により説明される。

【図面の簡単な説明】

図1：LPS誘導ショックに関与するTNF α およびMIF応答の概略的プロフィールを示すグラフ。

図2：MIFの可能なリボザイム開裂部位。マウス (mmif) とヒト (hmif) のヌクレオチド配列が比較してある。下線を引いた配列が可能なリボザイム開裂部位を示す。

図3：マウスMIFをコードするcDNAのヌクレオチド配列。

図4：マウス下垂体MIFとヒトジャーカットT細胞MIFとの推定アミノ酸配列相同。可能性のあるN結合グリコシル化部位に下線が引いてある。mu：マウスMIF；hu：ヒトMIF。

図5：組換えMIFによる単球遊走の阻止。ヒト末梢血単球遊走に及ぼす各種濃度 (0.0001~10 μ g/ml) のrmuMIFの効果を改良Boydenチャンバーにおいて定量した。バッファー対照に対する遊走阻止パーセントをMIF濃度の対数に対してプロットしてある。各点は独立に実施した2通りの測定の平均を示す。

図6A：MIFはBALB/cマウスにおけるLPS誘導致死率を増強する。結果は2回の実験から集めたデータを表す。

図6B：抗MIF抗血清はLPSチャレンジから防御する。結果は2回の実験から集めたデータを表す。

図7：抗MIF抗血清はグラム陽性ブドウ球菌外毒素チャレンジから防御する。

図8：下垂体細胞により放出されたMIFのウェスタンブロット分析。

図9Aおよび9B：下垂体細胞によるMIF放出の免疫細胞化学。図9AはLPSの不在下で培養した細胞；図9Bは25 μ g/mlのLPSの存在下で培養した細胞。

図10：BALB/cマウスにおける下垂体MIF mRNAのLPS誘導発現。

図11：LPS刺激BALB/cマウス由来の下垂体MIF mRNAの競合的PCR定量。

図12：マウス下垂体におけるMIFタンパク質の存在。

図13：LPSで処理したマウスの血清中のMIFレベルの一時性分析。

図14：BALB/c、BALB/c^{nu/nu}および下垂体切除BALB/cマウスにおける血清MIFのウェスタンブロットおよびデンシトメトリック分析。マウスにLPSを腹腔内注射し、ウェスタンブロット分析のために間隔をおいて採血した。血清アリコート (5 μ l) 中のMIFの含量は、電気泳動を行ったrMIF標準に対してレーザーデンシトメトリーで定量した。挿入図はBALB/cマウスのMIFブロットを示し、LPS投与後の血清MIFの時間依存的増加を表している。プロットしたそれぞれの点は2~5匹の動物から得られた個々の血清の平均 $\pm$ SEMである。

図15：刺激されていない単球/マクロファージ、Tリンパ球およびPMNのMIF含量のウェスタンブロット分析。10 μ lの細胞溶解産物 (5 $\times$ 10³個の細胞に等しい) を18%ゲルによる電気泳動にかけ、ニトロセルロース膜に移して、抗MIFポリクローナル抗体を用いて分析した。標準として30 ngのrMIFを電気泳動にかけ、移行させた。

図16A、16B、16C：RAW 264.7細胞 (図16A) によるMIF分泌、およびLPS (図16B) またはIFN γ + LPS (図16C) で刺激したチオグリコレート誘発腹腔内マクロファージによるMIF分泌のウェスタンブロット分析。マクロファージ (4 $\times$ 10⁶ RAW 264.7細胞または1 $\times$ 10⁷腹腔内マクロファージ) を表示した濃度のLPSまたはIFN γ + LPSとともに12時間インキュベートした。培地に分泌されたMIFの含量をウェスタンブロットで分析した。標準としてrMIF (パネルAでは30 ng、パネルBとCでは20 ng) を電気泳動にかけ、移行させた。

図17：LPS刺激RAW 264.7マクロファージによるMIF、TNF α および β -アクチン発現のRT-PCR分析。細胞 (4 $\times$ 10⁶) を表示した濃度のRPMI/10%FBSおよびLPSを含む培地で12時間インキュベートした。「材料および方法」に記載するように全細胞RNAを抽出し、cDNAを調製し、アガロースゲル電気泳動により遺伝子特異的PCR産物を分析した。

図18：LPS刺激後のマクロファージMIF mRNAの競合的PCR分析。RAW 264.7細

10

20

30

40

50

胞 (4×10^6) を、LPS (100 pg/ml) を添加したまたは無添加のRPMI / 1% FBS中で12時間インキュベートした。RNAを抽出し、「材料および方法」に記載するようにMIFのmRNAレベルを分析した。MIF競合鋳型DNAの量は示した反応につき0.25~15 pgの範囲とした。

図19: RAW 264.7マクロファージによるサイトカイン誘導MIF分泌のウェスタンブロット分析。細胞 (4×10^6) をTNF α 、IL-1 β 、IL-6 (10 または 1 ng/ml) またはIFN γ (1000 または 100 IU/ml) とともに12時間インキュベートした。標準として20 ngのrMIFを電気泳動にかけ、移行させた。

図20: rMIFで刺激したRAW 264.7マクロファージの細胞培養上清中のTNF α の濃度。細胞 (4×10^6) を表示した濃度のrMIFまたは培地のみ(対照)と12時間インキュベートした。その後、培地を分離し、TNF α の含量をL929細胞の細胞毒性により定量した。TNF α の濃度は、rMIF刺激細胞により産生されたレベルと対照(非刺激)細胞により産生されたレベルとの差として表される。データは3回の実験の平均 $\pm$ SDとして表してある。

図21: デキサメタゾンに対するRAWマクロファージのMIF応答の20 α -ジヒドロコルチゾルによる抑制のウェスタンブロット分析。

図22: マウスMIFタンパク質の臓器分布のウェスタンブロット分析。臓器は未処理のBALB/cマウスから摘出した。肝臓、脾臓、腎臓、副腎、脳および肺の溶解産物のアリコート(タンパク質 $60 \mu\text{g}$)を18%ゲルで電気泳動にかけ、エトロセルロース膜に移行させ、抗MIFポリクローナル抗体により分析した。標準として20 ngのrMIFを電気泳動にかけ、移行させた。肉眼では見ることができないが、かなり低い濃度のMIFバンドが副腎と肺にも検出された。

5. 発明の詳細な説明

本発明は、内毒素誘導敗血症性ショックおよび内毒素誘導毒性ショックを含むショック、炎症、移植片対宿主病、自己免疫疾患、急性呼吸窮迫症候群、肉芽腫症、慢性感染症、移植拒絶反応、悪液質、ウイルス感染、例えばマラリアを含む寄生体感染、および/または細菌感染を含むがこれらに限らないサイトカイン媒介毒性に関係する症状を治療するための、in vivoでのMIF放出および/または活性を抑制する組成物ならびに方法に関する。

本発明によるMIF活性の抑制は多くの方法で達成することができ、例えば、MIFと結合してその生物活性を中和する因子の使用: MIFレセプターアンタゴニストの使用: 生体において細胞供給源からのMIFの放出を抑制する化合物の使用: およびMIF発現を阻止または低下させるMIFコード配列、非コード配列および/または調節配列から誘導されるヌクレオチド配列の使用を挙げることができるが、これらに限らない。上記の方法は関連症状の治療においてMIF活性を抑制するために別々に使用することも、組み合わせて使用することもでき、さらに、他の抗サイトカイン療法(ステロイド療法を含む)、抗イニシエーター療法、抑制性サイトカインまたはこれらの任意の組合せと併用することもできる。

5. 1. MIFはショック症状の重要な媒介物質で、中枢および末梢の炎症応答を統合する。

本明細書においてMIFは神経内分泌媒介物質、ならびに感染および組織侵入に対する宿主炎症応答において重要な役割を果たすマクロファージサイトカイン、の両方として同定される。前炎症刺激の後で放出されると、マクロファージ由来のMIFはTNF α および他のサイトカインと共に作用して感染または組織侵入に対する局所的細胞応答を調整することができる。しかし下垂体由来のMIFは、いったん限局性炎症部位が侵入した作用物質を阻止し損なうと、全身性免疫応答を開始させるのに役立ちうる。または、その外にCNS由来ストレスシグナルとして作用して侵入に対して免疫系を活性化することができる。このように、MIFは副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)および副腎皮質軸と共同で作用して全身性炎症応答を変調することができる。

後出の実施例は、活性化Tリンパ球の産物であると歴史的に考えられていたMIFが、下

垂体およびマクロファージによっても作られること（後出の第11および12節参照）；MIFは内毒素によって誘導される敗血性ショック（グラム陰性微生物によって引き起こされる；後出の第7節参照）、内毒素によって誘導される毒性ショック症候群（グラム陽性微生物によって引き起こされる；後出の第8節参照）、寄生虫によって誘導される疾患応答（後出の第9節参照）および例えば細胞媒介免疫応答に関連する非感染性炎症疾患（後出の第10節参照）において重大な役割を果たすこと；および、MIFはグルコルチコイドと共同で作用して炎症および免疫を調節すること（後出の第13節参照）を示す。特に、実施例の結果はMIFが内毒血症の致死性を増強し、他方、MIFの抑制は致死的内毒血症に対する保護を与えることを示している。同様にMIFの抑制は毒性ショック症候群に対する保護をも与える。驚くべきことに、MIFは抗炎症作用物質であると考えられている

10

本明細書に記述する動物実験は、MIFの優勢な役割は前炎症媒介物質として働くというものであることを示している。MIFの前炎症作用スペクトルが、本明細書に記載のin vitro試験によって実証された。後出の第6節に示すように、組換え体（rMIF）はマクロファージによるTNF α 分泌を誘導することが判明し、これはMIFおよびTNF α が局所的に相互的な前炎症ループを成して作用しうる（すなわち、MIFとTNF α が免疫系の細胞によって相互の産生を刺激する）ことを示している。組換えMIFはまた他の前炎症刺激（例えばIFN- γ ）と共同でマウスマクロファージ酸化窒素（NO）の合成を促進する（後出の第6節参照）。

出願人らは、休止下垂体がまえもって形成されたMIFの大量の貯蔵物を含有することを見いだした。このMIFは、内毒素による視床下部一下垂体軸の活性化後に循環系に放出されるもので、前炎症応答に参加する他の数個のサイトカイン、例えばTNF α 、IL-1 β 、IL-6またはIFN- γ 等によって下垂体細胞から放出されるのではない。（後出の第11節参照）。MIFはまたマクロファージによっても低用量の内毒素に応答して、TNF α およびIFN- γ に応答して（後出の第12節参照）、寄生虫感染に応答して（後出の第9節参照）、およびステロイドに応答して（後出の第13節参照）放出される。このように、マクロファージはMIFの標的であるばかりでなく、in vivoにおけるMIFの重要な供給源でもある。

20

図1は、ショック応答中に検出される、内毒素によって誘導されるMIFおよびTNF α 血清濃度のプロフィール（profile）を示す。TNF α の検出可能血清濃度は急速にピークに達し、内毒素に暴露後1~2時間のうちに消える。対照的に、MIFの検出可能血清濃度は急性期（1~8時間）に徐々に上昇し、8時間でピークに達し、急性期後（>8時間）の間20時間まで存続する。いかなる作用論にも限定されないが、観察されたMIFの血清濃度については、後出の第11および12節のデータならびに図13および14に基づいて以下の細胞性供給源が提案される。すなわち、MIFは内毒素に誘導されたショックの前炎症段階の間におそらく活性化T細胞およびマクロファージにより、例えば感染に対する限局性の応答の一部として産生される。前炎症刺激によって（例えば低濃度のLPS、またはTNF α およびIFN- γ によって、ただしIL-1 β またはIFN- γ によってではない）いったん放出されると、マクロファージ由来MIFは内毒素ショックの急性期に産生されるMIFのありうる供給源である。感染がもはや限局性部位に限定されない場合は、LPSに（IFN- α 、IL-1 β 、IL-6またはIFN- γ にではない）応答してMIFを放出する下垂体、およびマクロファージの両方は、内毒素ショックの急性期後におけるMIFのありうる供給源である。

30

40

下垂体がMIFの供給源であるという出願人らの発見を考えると、下垂体切除はLPSの致死的效果に対して実験動物を感作するという説は、そもそもMIFが宿主の炎症応答をダウンモジュレーションするように作用する可能性があることを示唆していた。それゆえ、精製された、組換えによって調製されたMIF（rMIF）をマウスに注射すると内毒血症の可視的症状を生じ、またLPSと共に注射するとマウスにおける致死率を増強することを発見したのは驚くべきことであった。例えば、後出の第7節にある実施例に記載の結果を参照されたい。この結果は、MIFが動物の内毒素誘導死亡率を実質的に増大させ

50

ることを示している。したがって、予期されたものとは反対に、M I Fの増加は宿主系にとって有益ではなく、また事実、敗血性ショック等のサイトカイン媒介症状を悪化させるように思われることが本明細書に示される。実施例の結果はまた、M I Fが毒性ショック症候群トキシナー1 (T S S T-1)、ブドウ球菌外毒素(後出の第8節参照)、および特異的マラリア産物であるヘモゾイン(hemozoin)(後出の第9節参照)によって誘導されることを示している。

M I Fの抑制が致死性毒血症に対する保護を与えることを発見したのは、これもまた等しく驚くべきことであった。後出の第7節にある実施例に示されるように、M I F活性の抑制は、高用量の内毒素またはT N F α を用いてチャレンジした動物の累積生き残りに劇的な増加をもたらす。抗M I F抗血清もまた致死量のT S S T-1でチャレンジした実験動物の死亡率を著しく低下させた(後出の第8節参照)。これらのデータは、M I Fが致死率に有意に寄与すること、そしてこの意味でショック症候群の必要な、または本質的構成要素であると考え得ること、を立証する。

本発明によれば、M I F活性および/または放出の抑制は、炎症応答およびショックを治療するために使用することができる。ショック応答の早期および後期の両方の段階において介入によって有益な効果が達成されうる。

M I F抑制の保護効果に関与する何らの理論または作用機構に限定されるものではないが、予備的研究が抗M I F治療は循環血清T N F α レベルにおいて評価しうる(35~40%までの)減少を伴うことを示している。この減少はT N F α が誘導するマクロファージに対するin vitroでのM I F活性に一致する。また、この減少は、内毒素投与の1~2時間後にこの時点ではM I Fは循環系に検出されないという事実にもかかわらず起こる血清T N F α レベルにおける極めて高いピークに、M I Fは部分的に関与していることを示唆する。したがってM I F抑制療法は炎症応答の早期段階において有益であり得る。

M I Fはまたショック応答の急性期後においても重要な役割を果たし、したがって他の治療(例えば抗T N F α 治療)が効果をもたない後期段階で介入する機会を提供する。本明細書に記載の実施例は、M I Fがショックの急性期後に放出され、この時期にM I Fは循環系で検出可能であることを示す。使用した実験系においては、抗M I F治療は高用量の内毒素(下垂体M I Fの循環系への放出を誘導する用量)でチャレンジした動物およびT N F α でチャレンジした動物(ここでは抗M I Fを用いて達成した循環内因性T N F α 濃度の有益な減少を、外因性T N F α が無効にする)を致死性ショックから保護した。T N F α でチャレンジした動物を保護する抗M I F療法の能力は、敗血性ショックの後期、急性期後におけるM I Fの無効化が有効であることを示している。抗体の保護効果は、循環M I Fが容易に検出される敗血性ショックの急性期後に放出される下垂体M I FおよびマクロファージM I Fの無効化に部分的に起因しているかもしれない。M I Fはショック症候群にとって必要な構成要素であり、また血清M I F発現のピークはT N F α のその後で起こるため、M I F抑制剤はT N F α 抑制剤の投与がもはや効力を持たなくなった後でも、サイトカイン媒介症状を上首尾に治療するのに使用できる。

ステロイド類はサイトカイン産生の有効な抑制剤なので、マクロファージおよび下垂体細胞によるM I F分泌に及ぼすそれらの効果を調べた(後出の第13節参照)。驚くべきことに、ステロイド類は上記の細胞によるM I F分泌を抑制するのではなく誘導することが判明した。ステロイド類に応答するM I Fの分泌は、炎症を治療するために現在用いられているステロイド療法の効果を減じる可能性がある。それゆえ、M I F抑制療法はステロイド類と組み合わせてショックおよび他のサイトカイン媒介病理学的症状、特に慢性間接リウマチ等の慢性炎症症状を治療するのに使用できる。このような組み合わせ療法は、病原性または他の炎症応答の開始後でも有益でありうる。例えば、ステロイド単独の投与はL P Sチャレンジと同時に、またはその前に投与した場合にのみT N F α 応答を抑制する。臨床においては、敗血性ショック症状の開始後のステロイド投与は、殆ど効果がないことが立証された(Boneら, 1987, N. Engl. J. Med. 317:653-658; Springら, 1984, N. Engl. J. Med. 311:1137-1141)。組み合わせステロイド/M I F抑制療法はこの障害を克服するために使用できる。別の例では、慢性リウマチ等の症状を治療する時に、ステロイド単

10

20

30

40

50

独の投与はM I Fの誘導をもたらすことがあり、これは投与したステロイドの炎症応答に及ぼす抑制効果を無効にする可能性がある。このような場合、M I F抑制療法をステロイドによる治療と組み合わせて使用できる。療法は、M I Fの放出および／または活性を局所的および／または全身的に抑制するように設計できる。

最後に、本発明のまた別の側面において、新規に同定されたM I F抑制剤が記述される。例えば、出願人らは、一般に不活性であると考えられている、またはステロイドの抗炎症効果を阻止する（「抗ステロイド」）と考えられているあるステロイド誘導体が次のステロイドチャレンジに応答して実際にはM I F放出を抑制することを見いだした。このような「不活性」または「抗ステロイド」化合物は抗炎症ステロイドと組み合わせて炎症疾患、特に自己免疫疾患、慢性リウマチ、移植片対宿主病、等の非感染性炎症疾患の治療に使用できる。特に、本明細書に記載のデータ（後出の第13節参照）は、炎症の治療に通常用いられているデキサメタゾン等のステロイドが実際にはM I F放出を誘導することを示している。ステロイドに誘導されるM I Fの放出は、副作用（例えば重篤な水分停留、等）を避けるためにin vivoにおいて用いられている用量範囲で起こる（すなわち、深刻な副作用をもたらす高用量のステロイド、および炎症の治療に効果がない低用量のステロイドはM I F放出を誘導しないようである）。ステロイドチャレンジに応答するM I Fの放出は、M I F抑制用量の所謂「不活性」または「抗ステロイド」誘導体（例えば20 α -ジヒドロコルチゾールなど）を用いて前処理することにより抑制することができる。これらの誘導体は「不活性」なので、M I F放出を抑制する高用量が好都合に許容されるであろう。「不活性」化合物を先に投与することは副作用を誘発せず、M I F放出を抑制するであろう。したがって、次に投与される「活性」ステロイドの抗炎症活性を増強しうる。ステロイドに誘導される体の細胞性供給源からのM I F放出を抑制するのに使用しうる付加的化合物を同定するためのアッセイが本明細書に記述されている。以下の分節は、後出の第6～15節に示すデータを要約している。

5. 1. 1. 下垂体ホルモンとしてのM I Fの同定

新規な下垂体産物の産生および放出を研究するため、我々はマウス下垂体前葉細胞系A t T-20の分泌プロファイルを調べた。これらの副腎皮質刺激性細胞はA C T H放出の研究に広く用いられてきたもので、我々は中枢神経系（C N S）、視床下部および末梢の間の体液相互作用の研究を始めるにあたって、これらは可能性として有用な細胞であると考えた。後出の第9節に示すように、我々はA t T-20細胞をL P Sと共に種々の期間インキュベートし、培養上清をS D S-P A G Eによって調べた。これらの分析は、見掛け上新規な12.5kDaタンパク質の下垂体細胞による特異的放出を明らかにした。次に、この12.5kDaタンパク質を単離し、アミノ末端配列決定によって最近クローン化されたヒトM I F c D N A（Weiserら、1989、前出）から予測されるアミノ酸配列に非常に類似していることを確認した。我々はL P Sで刺激したA t T-20細胞のc D N A由来のこの下垂体タンパク質をクローン化し、これが実際にヒトM I Fのマウス相同体（115アミノ酸にわたって90%同一）であることを示した（後出の第6節参照）。100pg/mlほどの少量のL P Sが下垂体細胞のM I F分泌を誘導することが判明した。しかし、下垂体M I F分泌はT N F α 、I L-1 β 、I L-6またはI F N- γ によっては誘導されなかった（後出の第11節参照）。

免疫細胞化学分析は、休止中の、刺激されていない下垂体細胞が有意な量の前もって形成されたM I Fを含有することを明らかにした。したがって、L P Sに反応して下垂体細胞によって放出されるM I Fの大きな画分は、貯蔵された細胞内プールから来るのである。免疫金（immunogold）結合抗M I F抗体を用いて標識した全マウス下垂体の電子顕微鏡検査は、副腎皮質刺激性細胞内に存在する粒子にまでM I Fを所在を突き止めた。In vivoにおいては、M I F含有粒子は循環内毒素の直接作用によって、または特異的視床下部放出因子によって放出されるように思われる。

マウスを用いたin vivo試験は、L P Sチャレンジ後に下垂体M I F m R N Aレベルが上昇し、16～24時間後に平坦域に達することを示した。同じ時間経過にわたって、下垂体における前もって形成されたM I Fタンパク質含有量は殆ど検出不可能なレベルにまで減少

10

20

30

40

50

する。下垂体M I Fの放出は血清M I Fの付随的上昇を伴うかどうかを確かめるため、我々はL P Sを注射したマウス由来の血液試料を入手し、ウエスタンブロット法によりM I F含有量について血清を分析した。正常マウスではL P S投与の2時間後にM I Fが検出され、そのレベルは約20時間にわたって血清内で上昇した。血清M I Fの上昇におけるこの経時変化は、L P Sの注射後に起こった下垂体M I Fタンパク質の減少および下垂体M I F m R N Aの増加の両方に一致している。対照的に、下垂体切除マウスの血清中のM I Fは著しく異なったパターンの誘導を示した。L S Pで処理した下垂体切除マウスより得た血清標本は、正常マウスにおいて血清M I Fレベルが最高であったL P S注射の20時間後に、検出可能なM I Fを全く示さなかった。これらのデータは、下垂体は内毒血症の間に血清に現れるM I F応答にとって決定的である、そして下垂体細胞は血清のM I Fレベルに寄与する、という説と一致する。次に我々は下垂体に保存されている前もって形成されたM I Fの量、およびL P Sによる視床下部－下垂体軸の活性化後に血清に現れるM I Fの量を計算した。下垂体および血清に存在するM I Fの量は、A C T Hおよび他の下垂体前葉ホルモンについて観察された範囲内に十分おさまっていた（表 I 参照）。

10

表 I

下垂体のマクロファージ遊走抑制因子（M I F）含有量および血清M I Fレベルと、他の下垂体前葉ホルモンレベルとの比較

20

ホルモン	下垂体における含有量 ^a	血清レベル ^b
	（全タンパク質における％）	（ng ml ⁻¹ ）
M I F	0 . 0 5	8 0 － 3 4 0
A C T H	0 . 2	2 － 5 0 0
プロラクチン	0 . 0 8	2 0 0 － 3 0 0

30

^a 休止状態での下垂体のホルモン含有量。

^b 最大下垂体刺激条件下での血清ホルモンレベル。

5. 1. 2. マクロファージM I F産生

後出の第12節に示すように、下垂体切除マウスは対照マウスと比較して著しく異常な血清M I F応答をもつ。20時間にわたる血清M I Fのゆるやかな上昇は観察されない。そのかわり、より綿密に検討すると、血清M I Fのピークが内毒血症の急性期の早期（L P S注射後≤ 3時間）に観察される。下垂体切断マウスの下垂体欠如、および十分認められているT細胞のL P Sへの不応答を前提として、我々は注射の2時間後に循環系に存在するM I Fは、付加的なL S P感受性細胞集団によるこのサイトカインの放出を反映しているに違いないと考えた。血清M I F応答におけるこのような早期ピークはマクロファージT N F α応答を暗示するものであるという観察に基づいて、我々はM I Fが単球－マクロファージ由来の細胞によってもM I Fが産生される可能性を検討した。

40

有意な量の前もって形成されたM I Fタンパク質が休止中の刺激されていないマウス単球細胞系RAW 264.7、マウス腹膜マクロファージおよびヒト単球細胞系THP-1に見いだされた。ウエスタンブロット分析は、マウスまたはヒト単球－マクロファージのM I F含有量はマウスASL-1およびヒトジャークットT細胞系のそれに類似していることを明らかにした。対照的に、精製した多形核白血球より得た細胞溶解物は、検出可能なM I Fタンパク質

50

を含有していなかった。全組織分析は、有意な量のM I Fタンパク質およびM I F m R N Aの両方がマクロファージ含有量の高い臓器に存在することを示し（後出の第14節参照）、M I F m R N Aは脾臓、肝臓、腎臓等の組織に構造的に存在するという最近の観察（Lanahanら, 1992, Mol. Cell. Biol. 12:3919-3929）を補足した。

L P S、T N F α および I F N - γ 等の種々の前炎症刺激はマクロファージM I F放出の強力な誘導物質であることが観察された（後出の第12節参照）。有意な量のM I Fの分泌が、T N F α 放出を誘導するのに最適であると観察されたL P S濃度よりも一般的に低いL P S濃度（10～100pg ml⁻¹）で起こった。有意な量のM I F m R N Aが休止マクロファージにも存在しており、L P Sによる刺激はこれらのm R N Aレベルを約2倍に増大させた。ピークm R N A刺激がまたL P Sの非常に低い濃度（1pg ml⁻¹）で起こった。

10

5. 1. 3. M I Fのクローニング、発現および生化学的特徴付け

下垂体前葉細胞系由来のマウスM I F（m u M I F）のクローニング、およびマウス肝臓由来天然M I Fの精製が後出の第6節に記載されている。比較のため、ヒトM I F（h u M I F）をジャーカットT細胞系からクローン化した。マウス下垂体M I FおよびヒトT細胞M I Fのc D N Aの配列分析は、マウスおよびヒトタンパク質間の90%の相同性を示した。クローン化ジャーカットT細胞M I F c D N Aは最初に刊行されたヒトT細胞M I F c D N A（Weiserら, 1989）と1個のヌクレオチドだけが異なっているが、ヒト水晶体組織から誘導されたヒトM I F c D N A（Wistowら, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:1272-1275）およびT細胞グリコシル化抑制因子（G I F）c D N A（Mikayamaら, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:10056-10060）と一致している。上記のヌクレオチド1個の相違は推定されるアミノ酸配列に変化（Ser 106→Asn 106）をもたらし、その結果ヒトとマウスタンパク質の相同性を増大させる。

20

D N A相同性分析はヒトM I FおよびマウスM I Fの両方が通常のN末端リーダー配列を欠くことを示した。したがって、M I Fは細胞から非古典的タンパク質分泌経路によって放出されるI L - 1（Rubartelliら, 1990, EMBO J. 9:1503-1510）、塩基性繊維芽細胞増殖因子（b F G F；Jacksonら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10691-10695）および分泌形態のシクロフィリン（cyclophilin）（Sherryら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:3511-3515）等の増えつつあるサイトカイン類のリストに載せられる。

組換えマウスおよびヒトM I Fを大腸菌において発現させ、単純な2工程手順によって均一になるまで精製し、タンパク質を種々の生化学的および生物学的基準によって特徴付けた。マウス肝臓から得た天然M I Fは、エンドグリコシダーゼF処理とそれに続くS D S - P A G E / ウエスタンブロット法、および質量分光分析の両方によってアッセイしたすると、単量体で、有意な翻訳後修飾を含まないことが判明した。組換えおよび天然M I Fは単球 / マクロファージに対して多数の類似した効果を示した。組換えM I Fは、修正ボイデンチェンバーを用いてアッセイすると、単球の遊走を抑制することが判明した。M I FはまたT N F α 分泌を誘導し、I F N - γ によって開始されるマクロファージからの酸化窒素（N O）放出を促進した。円二色性（C D）分光分析は、生物的に活性な組換えM I Fが β プリーツシートおよび α ヘリックスの含有量が>55%である高度に秩序だった三次構造を示すことを明らかにした。熱力学安定性試験もまた、秩序だった二次構造要素の高い含有量にかかわらず、M I Fのコンホメーションは変性溶剤条件によって容易に乱されることを示した。これらの試験は組換えM I Fおよび精製された天然M I Fの生化学的および生物学的特性の多数を明らかにし、そしてこのタンパク質の三次構造に関する情報を初めて提供する。

30

40

5. 1. 4. M I FおよびM I Fレセプターの生体分布

後出の第14節の実施例は、体内のM I FおよびM I F結合部位（すなわちM I Fレセプター）の分布を例証する試験を示す。この試験はM I Fレセプターが例えば肝細胞に存在することを示す。さらに、このようなM I Fレセプターの2つが第13節に記載の実施例において初めて同定されている。このようなレセプターはM I F抑制剤として使用するため遺伝子工学的に作成することができる。

50

5. 2. M I F 活性の抑制剤

M I F アンタゴニストとして使用できる因子、すなわち M I F の生物活性を抑制する因子を以下に記述する。

5. 2. 1. M I F - 結合パートナー

M I F と結合し、その生物活性を中和する因子（以下、M I F 結合パートナーと称する）は、本発明によりサイトカイン媒介毒性に関係する症状の治療法として使用できる。内毒素チャレンジのゆえに M I F タンパク質のレベルは上昇するかもしれないが、抑制的な M I F - 結合パートナーと M I F タンパク質の相互作用は M I F 活性の付随的増加を阻止する。このような因子には、抗 M I F 抗体、抗体断片、M I F レセプターおよび M I F レセプター断片が含まれるが、これらだけに限定されない。

組換え産生（後出の組換え D N A 技法を用いる）M I F または精製した天然 M I F のエピトープに対する抗体作成のために、当分野の技術で公知の種々の手順が使用できる。活性中和抗体、すなわち M I F レセプターの結合部位と競合する、またはこれを立体的に妨げる抗体は診断剤および治療剤として特に好ましい。このような抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、F a b 断片および F a b 発現ライブラリーによって作成される断片が含まれるが、これらだけに限定されない。

抗体産生のために、M I F および／または M I F の一部を注射することによって種々の宿主動物を免疫感作することができる。これらの宿主動物には、2～3 名前を挙げればウサギ、マウス、およびラットが含まれるが、これらだけに限定されない。免疫応答を増大させるために宿主の種によって種々のアジュバントを使用できる。これらのアジュバントには、フロイント（完全および不完全）アジュバント、水酸化アルミニウム等の鉱物ゲル、リゾレシチン、プルロニックポリオール (pluronic polyol) 等の界面活性物質、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、スカシ貝ヘモシアニン、ジニトロフェノール、および B C G（カルメット・ゲラン桿菌）、コリネバクテリウム・パルバム (*Corynebacterium parvum*) 等の可能性として有用なヒトアジュバントが含まれるが、これらだけに限定されない。

M I F に対するモノクローナル抗体は、培養中の連続細胞系による抗体分子の産生をもたらす任意の技法を用いて調製することが出来る。これらの技法には以下のものが含まれるが、それらだけに限定されない。すなわち、Kohler および Milstein (*Nature*, 1975, 256: 495-497) によって最初に記述されたハイブリドーマ技法、ヒト B 細胞ハイブリドーマ技法 (Kosbor ら, 1983, *Immunology Today*, 4:72; Cote ら, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2026-2030) および EBV-ハイブリドーマ技法 (Cole ら, 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss 社, pp.77-96)。さらに、適切な抗原特異性を有するマウス抗体分子由来の遺伝子を適切な生物活性を有するヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングすることによって「キメラ抗体」を産生するために開発された技法 (Morrison ら, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855; Neuberger ら, 1984, *Nature*, 312:604-608; Takeda ら, 1985, *Nature*, 314:452-454) も使用できる。または、一本鎖抗体の産生のために記述された技法（米国特許第 4,946,778 号）を M I F 特異的一本鎖抗体を産生するように適合させることもできる。

特異的 M I F エピトープを認識する抗体断片は、公知の方法によって作成することができる。例えば、このような断片には抗体分子のペプシン消化によって作成することができる F (a b')₂ 断片、および F (a b')₂ 断片のジスルフィド結合を還元することにより作成することができる F a b 断片が含まれるが、これらだけに限定されない。または、M I F に対する所望の特異性を有するモノクローナル F a b 断片の迅速で容易な同定を可能とするために、F a b 発現ライブラリー (Huse ら, 1989, *Science*, 246:1275-1281) を構築することもできる。

M I F レセプター、M I F レセプター断片、および／または M I F レセプター類似体は、本発明により M I F 生物活性の抑制剤として使用できる。M I F タンパク質と結合することにより、これらのクラスの分子は M I F の細胞性 M I F レセプターへの結合を抑制し、このようにして M I F がその生物活性を発揮する作用機構を崩壊させる。このような分子

10

20

30

40

50

の活性に良く似た活性を有する小さい有機分子もまた本発明の範囲に含まれる。

M I Fレセプターは、アミノ酸配列特異的および／または構造特異的様式でM I Fと結合する任意の細胞表面分子を包含しうる。このようなM I Fレセプターには、以下のものが含まれるがそれらだけに限定されない。すなわち、部分アミノ酸列：

A K K G A V G G I

を有する72 kD M I Fレセプタークラス、および部分アミノ酸配列：

I - X - H N T V A T E I (S) (G) Y N (N / G) A (M)

を有する52 kD M I Fレセプターであり、両者は後出の第13節に記載の実施例に示されている。括弧内の残基は仮に指定したものである。

さらなるM I FレセプターおよびM I Fレセプターをコードする遺伝子が、当業者に周知の種々の技法を使用することによって同定され、単離され、クローン化されうる。例えば、M I Fレセプター分子は、M I Fタンパク質に対し配列および／または構造的結合特異性を示す分子を非M I F結合分子から分離する標準的アフィニティークロマトグラフィー技法を用いて同定および単離することができる。M I F結合タンパク質は標準技法を用いてさらに精製することができ、この時点でM I F抑制能力についてこのタンパク質を試験し、使用することができる。

または、精製タンパク質のアミノ酸配列を少なくとも部分的に決定することができる。そして、その配列を用いて、M I Fレセプターをコードする遺伝子をクローン化するためにc D N Aおよび／またはゲノムライブラリーをスクリーニングするのに用いるオリゴヌクレオチドを設計することができる。この技法は当業者に周知である。さらに、新しいM I Fレセプター遺伝子はp c D N A 1等のS V 4 0複製起点配列（これはC O S細胞に導入されると、プラスミドの多数コピー発現を可能とする）を含有する哺乳動物発現ベクター中にc D N Aライブラリーを構築することによりクローン化できる。トランスフェクトしたC O S細胞の表面におけるM I Fレセプターの発現は、放射性、蛍光または酵素的に標識したM I Fの使用を含む多数の方法で検出することができる。M I Fレセプターを発現する細胞は、トランスフェクトした細胞をF A C S（蛍光活性化細胞ソーター）にかけることによって富化することができる。使用できるクローニング方法の総説については、例えばManiatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press, N.Y.; およびAusubelら、1989, Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing AssociatesおよびWiley Interscience, NY) を参照されたい。

上に記述したM I Fレセプターの任意のものの断片も、M I F抑制剤として使用することができる。そして、M I F生物活性を抑制するようにM I Fと特異的に結合する、アミノ、カルボキシおよび／または内部欠失を有する任意のM I Fレセプター断片は本発明の範囲内に入ることが意図される。アミノおよび／またはカルボキシ欠失とは、アミノおよび／またはカルボキシ末端で少なくとも1個のアミノ酸残基が切断されている分子をいう。内部欠失とは、少なくとも1個のアミノ酸残基の1つまたはそれ以上の非末端欠失を有する分子をいう。これらのM I Fレセプター断片のなかには、細胞質または細胞質ドメインの一部が除去されている末端切断レセプター、およびM I Fレセプター細胞外ドメインの全部または一部を含有する可溶性M I Fレセプターを産生するために細胞質および膜貫通ドメインを除去した断片がある。

M I Fと特異的に結合するM I Fレセプター類似体もまたM I F活性を抑制するために使用できる。このようなM I Fレセプター類似体は、アミノ末端、カルボキシ末端、または任意の2個の隣接するM I Fレセプターアミノ酸残基の間に位置する1つまたはそれ以上の付加的アミノ酸をさらに有するM I Fレセプターまたはレセプター断片を含みうる。上記の付加的アミノ酸は、M I Fレセプタータンパク質のすべてまたは一部に機能的に結合してM I Fレセプター融合タンパク質を形成する異種ペプチドの一部でありうる。非限定的な例を挙げれば、M I Fレセプターまたは末端を切断されたその一部は、イムノグロブリンの所望のF c部分を用いて融合タンパク質として遺伝子工学的に作成することができる。M I Fレセプター類似体はまた、保存性または非保存性の1個またはそれ以上のアミノ酸置換をさらに有するM I FレセプターまたはM I Fレセプター断片を含みうる。

保存性アミノ酸置換は、1個またはそれ以上のアミノ酸を類似の電荷、大きさ、および／または疎水特性をもつアミノ酸と置換することから成る。例えば、グルタミン酸（E）からアスパラギン酸（D）へのアミノ酸置換、等である。非保存性置換は、1個またはそれ以上のアミノ酸を非類似の電荷、大きさ、および／または疎水特性をもつアミノ酸と置換することから成る。例えば、グルタミン酸（E）からバリン（V）へのアミノ酸置換、等である。

M I Fレセプター、M I Fレセプター断片および／または類似体は、組換えDNA技法を用いて作成することができる。ここで、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列は、当業者に周知の技法によって合成および／またはクローン化し、発現させることができる。例えば、Ausubel F.M.ら編，1989，Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1および2，John Wiley and Sons, New York; Caruthersら，1980，Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 7:215-233; CreaおよびHorn，1980，Nuc. Acids Res. 9（10）:2331; MatteucciおよびCaruthers，1980，Tetrahedron Letters 21:719; およびChowおよびKempe，1981，Nuc. Acids Res. 9（12）:2807-2817を参照されたい。

または、アミノ酸配列の全部または一部を合成する化学的方法を用いて、タンパク質そのものを作成することが可能である。例えば、ペプチドを固相法により合成し、樹脂から分離し、分取高速液体クロマトグラフィーにより精製することができる。（例えば、Creighton，1983，Proteins Structures And Molecular Principles, W.H. Freeman and Co., N.Y. pp.50-60参照。）合成ペプチドの組成はアミノ酸分析または配列決定によって確認することができる（例えばエドマン分解法；Creighton，1983，Proteins, Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman and Co., N.Y. pp.34-49参照）。

これらの分子は、分子特性のあるもの（例えば安定性、バイオアベイラビリティおよびM I F抑制活性等）に有利な影響をあたえる別の手順を使用して合成することも可能である。例えば、M I Fレセプター、M I Fレセプター断片およびM I Fレセプター類似体は、ペプチドのアミノ酸残基をつなぐ結合の1つまたはそれ以上が非ペプチド結合であるように合成することができる。これらの非ペプチド結合は、当分野の技術で周知の反応を使用して形成することができる。これら非ペプチド結合は、2～3例を挙げればイミノ、エステル、ヒドラジド、セミカルバジドおよびアゾ結合を含みうるが、これらだけに限定されない。別の態様においては、タンパク質をそのアミノおよび／またはカルボキシ末端に存在する付加的な化学基と共に合成することができる。例えば、カルボベンズオキシル、ダンシル、またはt-ブチルオキシカルボニル基等の疎水基をペプチドのアミノ末端に付加することができる。さらに、ペプチドをその立体配置が変更されるように合成することが可能である。例えば、ペプチドの1個またはそれ以上のアミノ酸残基の、通常のL-異性体ではなく、D-異性体を使用することができる。

5.2.2. M I Fレセプターアンタゴニスト

M I Fレセプターに結合することによりM I F生物活性を抑制する分子はまたサイトカイン媒介毒性に関係する症状の治療に使用し得る。このような分子として、抗M I Fレセプター抗体及びM I F類似体が挙げられるが、これらに限定されない。

抗M I Fレセプター抗体は産生され、そしてM I Fレセプター機能を中和するのに使用し得る。M I Fレセプタータンパク質の全部または一部の抗体は、例えば、上記の第5.2.1.節に記載された技術に従って産生し得る。

M I F類似体は、M I Fレセプターを結合するが、生物活性を示さない分子を含んでいてもよい。このような類似体はM I Fレセプターへの結合につきM I Fと競合し、それ故、生体内で使用される場合に、サイトカイン媒介毒性の進行中にM I Fの作用を阻止するように作用し得る。当業者に公知の種々の技術がM I F類似体を設計するのに使用し得る。本明細書に記載されたヒトM I Fのコード配列は、公表された配列と異なり、アミノ酸残基番号106で遺伝子産物中のセリンからアスパラギンへの変化をもたらす。修正されたヒト配列およびマウスタンパク質の修正された配列の両方が下記の第6節に記載され、そして図2に示される。組換えDNA技術が、例えば、アミノ酸の挿入、欠失および／または置換（これらはレセプター結合能を有するが、生物活性を有しないM I F類似体を生じる）

を含む修飾M I Fタンパク質を産生するのに使用し得る。また、M I F類似体は、第5.2.1.節に記載された方法の如き化学的方法（例えば、Sambrookら、1989、分子クローニング、実験マニュアル、Cold Spring Harbor Press, N.Y.を参照のこと）を使用して合成し得る。

M I Fレセプターおよび／またはM I Fレセプターを発現する細胞系が、潜在的なM I Fアンタゴニストを同定し、かつ／または分析するのに使用し得る。例えば、このようなM I Fアンタゴニスト分子の同定を達成し得る一つの方法は、当業者に公知の技術を使用して、M I Fレセプター分子を固体マトリックス、例えば、アガロースまたはプラスチックビーズ、マイクロタイタウェル、またはペトリ皿に付着し、続いて付着されたM I Fレセプター分子を潜在的な一種以上のM I F類似体の存在下でインキュベートすることを含んで10
なるであろう。インキュベーション後に、未結合化合物が洗浄して除かれ、そしてM I Fレセプター結合化合物が回収される。この操作において、多数の型の分子がM I Fレセプター結合活性につき同時にスクリーニングし得る。結合分子は、例えば、過剰のM I Fの添加によりそれらをM I Fレセプター分子から競合して除き、緩衝液のpHもしくは浸透圧の強さを変化させ、またはカオトロピック剤を添加することによりM I Fレセプター分子から溶離し得る。結合／溶離工程は、関係する分子の部分精製をもたらす。

精製プロセスを続けるために、溶離分子は、関係する一種以上の分子が必要な程度にまで精製されるまで、一つ以上のクロマトグラフィー分離技術および／またはその他の分離技術により更に分別し得る。M I Fレセプター結合能を有する化合物が一旦同定されると、これらの化合物は、この節に記載されたような細胞系を使用して、または通常の実験動物20
モデルにより、または下記の第5.4節に記載されたようなトランスジェニック動物モデルを使用することにより、サイトカイン媒介毒性に対するそれらの効果につき分析し得る。また、組換えにより産生されたM I Fレセプターおよび／またはM I Fレセプターフラグメントによるペプチドライブラリーのスクリーニングが、潜在的なM I F類似体を同定するのに使用し得る。M I Fレセプターを結合するペプチドが、このスクリーニング技術を使用して一旦同定されると、サイトカイン媒介毒性に対するそれらの効果が、この節に記載されたような細胞系を使用して分析されてもよく、また通常の実験動物モデルまたは下記の第5.4節に記載されたようなトランスジェニック動物を使用して評価されてもよい。

このようなペプチドの活性を模擬する小さい有機分子がまた本発明の範囲内にある。ランダムペプチドライブラリーはアミノ酸の全ての可能な組み合わせからなり、このよう30
なライブラリーは好適な小さい粒状固相担体に付着され、そして所定のレセプター（Lam, K.S.ら、1991, Nature 354:82-84）に結合できるペプチドを同定するのに使用し得る。ペプチドライブラリーのスクリーニングは、所定のレセプターとのそれらの相互作用によりレセプターの生物活性を抑制するように作用する医薬物質の発見に治療上の価値を有し得る。

M I Fレセプターに結合できる分子の同定は、ペプチドライブラリーを組換え可溶性M I Fレセプタータンパク質でスクリーニングすることにより行い得る。M I Fレセプターの如き分子の発現方法および精製方法は当業者に公知である。スクリーニングにつき、M I Fレセプター分子を標識または“タグ”することが好ましい。タンパク質は、酵素、例えば、アルカリ性ホスファターゼもしくはホースラディッシュペルオキシダーゼまたはその40
他の試薬、例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、フィコエリスリン（PE）またはローダミンを含み得る蛍光ラベルに接合し得る。M I Fレセプターへの所定の標識の接合は、当業界で常套である技術を使用して行い得る。また、M I Fレセプター発現ベクターは、市販の抗体が存在するエピトープを含むキメラM I Fレセプタータンパク質を発現するように操作し得る。エピトープ特異性抗体は、酵素、蛍光色素または着色ビーズもしくは磁性ビーズによる標識を含む、当業界で公知の方法を使用して標識し得る。“標識”M I Fレセプターまたはレセプター／接合体は、M I Fレセプターとライブラリー内のペプチド種との間の複合体形成を可能にするために、ランダムペプチドライブラリーと共に22℃で30分～1時間インキュベートされる。次にライブラリーは洗浄されて未結合M I Fレセプタータンパク質を除去する。M I Fレセプターがアルカリ性ホスファター50

ゼまたはホースラディッシュペルオキシダーゼに接合された場合、全ライブラリーがアルカリ性ホスファターゼまたはペルオキシダーゼの基質、例えば、5-ブromo-4-クロロ-3-インドイルホスフェート (BCIP) または 3, 3', 4, 4'-ジアミノベンジジン (DAB) をそれぞれ含むペトリ皿に注入される。数分間インキュベートした後、ペプチド／固相 M I F レセプター複合体は変色し、そしてマイクロマニピュレータを備えた解剖顕微鏡のもとに容易に同定され、物理的に単離し得る。蛍光標識 M I F レセプター分子が使用された場合、複合体は蛍光活性化選別により単離し得る。異種エピトープを発現するキメラ M I F タンパク質が使用された場合、ペプチド／M I F レセプター複合体の検出は、標識エピトープ特異性抗体を使用することにより行い得る。一旦単離されると、M I F レセプター接合体は溶離されて除かれ、ペプチド担体が洗浄され、そして固相担体に付着されたペプチドの同一性がペプチド配列決定により測定し得る。

10

M I F 類似体はまた M I F レセプターを発現する細胞系を使用して同定し得る。このような細胞系はレセプターを自然に発現する細胞系、例えば、RAW 264.7細胞、または M I F レセプターを発現するように組換え技術を使用して操作された細胞系であってもよい。また、これらの細胞系は、上記のような M I F レセプター結合技術を使用して同定された潜在的な M I F 類似体を評価するのに使用し得る。

操作された細胞系に関して、種々の細胞が組換え M I F レセプターの発現のための宿主細胞として使用されてもよく、これらの細胞として、安定に増幅され（例えば、CHO/dhfr）、または D M 染色体中で不安定に増幅された（例えば、マウス細胞系）M I F レセプター DNA の多重コピーを含むように操作された細胞系を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、アデノウイルス、ワクシニアウイルス）で感染された動物細胞系が挙げられるが、これらに限定されない。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合、M I F レセプターコード配列がアデノウイルス転写-翻訳調節複合体、例えば、後期プロモーターおよび 3 分節系リーダー配列につながれてもよい。次にこのキメラ遺伝子は試験管内または生体内の組換えによりアデノウイルスゲノムに挿入し得る。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、領域 E 1 または E 3）中の挿入は、可変であり、かつ感染された宿主中で M I F レセプターを発現できる組換えウイルスをもたらし得る（例えば、Logan & Shen k, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:3655-3659を参照のこと）。また、ワクシニア 7.5Kプロモーターが使用し得る（例えば、Mackettら, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79:7415-7419; Mackettら, 1984, J. Virol. 49:857-864; Panicaliら, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. 79:4927-4931を参照のこと）。

20

30

また、特定の開始シグナルが、挿入された M I F レセプターコード配列の有効な翻訳に必要とされることがある。これらのシグナルは A T G 開始コドンおよび隣接配列を含む。それ自体の開始コドンおよび隣接配列を含む全 M I F レセプター遺伝子が適当な発現ベクターに挿入される場合、付加的な転写調節シグナルが必要とされないかもしれない。しかしながら、M I F レセプターコード配列の一部のみが挿入される場合、A T G 開始コドンを含む、外因性転写調節シグナルが用意される必要がある。更に、開始コドンは、全インサートの翻訳を確実にするために M I F レセプターコード配列の読み取り枠と同調している (in phase with) 必要がある。これらの外因性翻訳調節シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の両方の種々の起源のものであってもよい。発現の効力は、適当な転写エンハンサー要素、転写ターミネーター、等のとり込みにより増強し得る (Bittnerら, 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544を参照のこと）。

40

加えて、挿入配列の発現を調節し、または遺伝子産物を所望される特定の様式で修飾し、プロセッシングする宿主細胞株が選択し得る。タンパク質生産物のこのような修飾（例えば、グリコシル化）およびプロセッシング（例えば、開裂）がタンパク質の機能に重要であり得る。異なる宿主細胞はタンパク質の翻訳後のプロセッシングおよび修飾に特徴的かつ特異的な機構を有する。適当な細胞系または宿主系は、発現された外来タンパク質の正確な修飾およびプロセッシングを確実にするように選択し得る。この目的のために、一次転写産物の適当なプロセッシング、および正常なグリコシル化、および／または遺伝子産物のホスホリル化のための細胞機構を有する真核生物宿主細胞が使用し得る。このような

50

哺乳類宿主細胞として、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、WI38、等が挙げられるが、これらに限定されない。

細胞系は、M I F 類似体をスクリーニングし、同定するのに使用し得る。合成化合物、天然産物、および潜在的に生物活性の物質のその他の源が、幾つかの方法、例えば、M I F レセプターへのM I F の結合を抑制する化合物の能力を試験することによりスクリーニングし得る。通常のレセプター結合技術が、この目的に使用し得る。

M I F 生物活性を低下または抑制する抗M I F レセプター抗体および潜在的なM I F 類似体の能力は、M I F レセプターを発現する動物、例えば、正常な動物を使用することにより生体内で分析し得る。また、このような動物として、例えば、下記の第5.4節に記載されたようなトランスジェニック動物モデルが挙げられる。

10

5.2.3. M I F 活性のその他の抑制剤

上記の第5.1節に説明されたように、不活性または“抗ステロイド性”であると普通考えられる或る種のステロイド、例えば、20 α ジヒドロコルチゾールが実際にM I F の放出を抑制する。これらのステロイド、または前生成されたM I F の放出を抑制するその他の化合物が、抗炎症性ステロイドと組み合わせて治療に使用し得る。

M I F の放出を抑制する化合物は、例えば、下記の第13節に記載されたような細胞をベースとするアッセイにおいて同定し得る。一般に、チャレンジ量のステロイドに応答してM I F を放出する下垂体またはマクロファージ細胞系が使用し得る。そのアッセイは、培養中の細胞に試験化合物を添加し、次にこれらにM I F 放出を誘導することが知られているステロイドでチャレンジすることにより行い得る。試験化合物は、異なる段階でM I F 応答を抑制する、即ち、前生成されたM I F の放出を抑制したり、またde novo合成および放出を抑制したり、またその両方を抑制するのに有益である作用物質を同定するように、チャレンジと同時に、またはチャレンジの前後数時間までに投与し得る。

20

次に馴化培地が培養細胞から回収され、そしてM I F につき、例えば、ELISA、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、等を含むが、これらに限定されないイムノアッセイにより分析される。馴化培地中のM I F の減少した量は、試験化合物がM I F のステロイド誘導放出を抑制することを示す。このアッセイにおいてこうして同定された化合物は、炎症を治療するためのステロイドと組み合わせて治療に使用し得る。“生物不活性”化合物または無害の化合物、例えば、不活性ステロイド、または望ましくない副作用を生じない投与量で使用し得るステロイドが、治療用に好ましいかもしれない。しかしながら、良好な治療指数、例えば、低毒性および殆どないか、または全くない副作用を有する抑制性化合物が使用し得る。

30

5.2.4. 投与量および治療計画

M I F 生物活性の抑制剤、例えば、抗M I F 抗体、M I F レセプター、M I F レセプターフラグメント、M I F レセプター類似体、抗M I F レセプター抗体、M I F 類似体およびM I F 放出の抑制剤は、当業者に公知の技術を使用して投与し得る。作用物質が製剤化され、そして全身投与されることが好ましい。製剤化および投与に関する技術が、“Remington's Pharmaceutical Sciences”，第18編、1990、Mack Publishing Co., Easton, PAに見られる。好適な経路として、経口投与、直腸投与、経粘膜投与、または腸投与；筋肉内注射、皮下注射、髄内注射だけでなく、二三名を挙げただけでも、くも膜下注射、直接心室内注射、静脈内注射、腹腔内注射、鼻内注射、または眼内注射を含む非経口投与が挙げられる。投与は静脈内であることが最も好ましい。注射につき、本発明の作用物質は水溶液、好ましくは生理適合性緩衝液、例えば、ハンクス溶液、リンゲル溶液、または生理食塩緩衝液中で製剤化し得る。経粘膜投与につき、透過すべきバリアーに適した浸透剤が、製剤化に使用される。このような浸透剤が当業界で一般に知られている。

40

投与される本発明のM I F 抑制性化合物の有効濃度およびその投与の頻度は当業者に公知の操作により測定され、これらは生物半減期、生物利用能、および毒性の如きパラメーターに関係する。抗M I F 抗体の場合、好ましい投与濃度は体重1 kg当たり約0.1mgから体重1 kg当たり約20mgまでの範囲であってもよく、体重1 kg当たり約10mgが最も好ましい。抗体は典型的には循環系中で長い半減期を示すので、抗血清の1回投与が、必要とされる

50

循環濃度を維持するのに充分であるかもしれない。短い半減期を示す化合物の場合、多数回の投与が循環系中の必要な濃度を確立し、維持するのに必要であるかもしれない。

M I F 抑制剤は、単独で、またはその他の療法と組み合わせて患者に投与し得る。このような療法として、サイトカイン媒介毒性のイニシエーターの抑制剤またはアンタゴニスト（例えば、抗 L P S）、内因性サイトカイン応答の関与物質の抑制剤またはアンタゴニスト（例えば、抗 T N F α 、抗 I L - 1、抗 I F N - γ 、I L - 1 R A）；およびサイトカイン媒介毒性を直接に抑制するかまたはそれに拮抗する化合物（例えば、ステロイド、グルココルチコイドまたは I L - 10）の連続または同時の投与が挙げられる。M I F 抑制剤の投与濃度および頻度は、併用療法の一部として使用される場合に变化させてもよく、それ故、2 以上のクラスの抑制性化合物が投与される場合には最良の投与量を決めるために適当な試験を行う必要がある。

M I F 発現は T N F α より遅く内毒素チャレンジに応答してピークレベルに達するので、抗 M I F 化合物は、抗 T N F α 抑制剤が有効である期間後に投与されてもよい。下記の第 7 節に記載される実施例に示されるように、抗 M I F 抗体は動物において内毒素血症からの完全な防御を与えた。また、抗 M I F は本発明者らのパイロット研究において循環 T N F α レベルを減少することが示され、これは、抗 M I F が M I F の活性の前炎症スペクトルを抑制すること、そして抗 M I F が一般に炎症性サイトカインカスケードを抑制することを示す。生体内実験において、更に、抗 M I F は外因性 T N F α の投与により誘導される致死性ショックに対し保護することが示された（下記の第 7 節を参照のこと）。それ故、抗 M I F 抗体の有益な効果は、おそらく、前炎症刺激（例えば、L P S、または T N F α および I F N - γ ）に応答して急性期中に放出されたマクロファージ M I F、およびショック応答の後急性期中に下垂体およびマクロファージの両方により放出された M I F の両方の生物活性を中和するその能力にある。

5.3. M I F および／または M I F レセプター遺伝子発現の抑制剤

M I F および／または M I F レセプター遺伝子のコード配列、非コード配列、および／または調節配列から誘導されたヌクレオチド配列が、これらの遺伝子の発現を阻止または減少するのに使用され、M I F 活性の低下または抑制をもたらし得る。ヒト M I F タンパク質をコードするヌクレオチド配列が報告されている。加えて、下記の第 6 節の実施例に示されるように、ヒト M I F のヌクレオチド配列が修正され、そしてマウス M I F タンパク質をコードするヌクレオチド配列に相当する cDNA が今回同定された。更に、下記の第 15 節の実施例に示される M I F レセプターアミノ酸配列は、例えば、M I F レセプター遺伝子の調節のためのオリゴヌクレオチドを設計するのに使用し得る。遺伝子発現のこのような調節が行い得る技術の中に、下記のように、アンチセンス、三重らせん、およびリボザイムのアプローチがある。それ故、これらのヌクレオチド配列の投与は、サイトカイン媒介毒性に関係する症状の一つの治療方法として、M I F 遺伝子および／または M I F レセプター遺伝子の発現および／または転写を一時的に阻止するのに使用し得る。

遺伝子発現を標的とするこれらのアプローチは、単独で、互いに組み合わせて、または上記の抑制性 M I F 結合および／または M I F レセプターアンタゴニスト操作のいずれかと一緒に使用し得る。更に、これらの遺伝子調節アプローチは、抗 T N F α 、抗イニシエーターおよび／またはその他の抗サイトカイン療法と一緒に使用されてもよい。

5.3.1. アンチセンス RNA およびリボザイム

M I F および／または M I F レセプター mRNA の翻訳を抑制するように機能するアンチセンス RNA および DNA 分子並びにリボザイムを含むオリゴリボヌクレオチド配列が本発明の範囲内にある。アンチセンス RNA および DNA 分子は、標的 mRNA に結合し、そしてリボザイム結合および／またはトランスロケーションの抑制により、または mRNA 分子それ自体のヌクレアーゼ分解をもたらすことにより、タンパク質翻訳を阻止することにより、mRNA の翻訳を直接阻止するように作用する。

リボザイムは、RNA の特異的な開裂を触媒作用することができる酵素 RNA 分子である。リボザイム作用の機構は、相補的な標的 RNA へのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーション、続いてエンドヌクレオ分解的 (endonucleolytic) 開裂を伴う。M I F および

／またはMIFレセプターmRNA配列のエンドヌクレオ分解的開裂を特異的かつ有効に触媒作用する遺伝子操作されたハンマーヘッドモチーフリボザイム分子が、本発明の範囲内にある。潜在的なRNA標的内の特異的なリボザイム開裂部位は、最初に標的分子を下記の配列、GUA、GUUおよびGUCを含むリボザイム開裂部位につきスキャンすることにより同定される（マウスおよびヒトのMIF cDNAに関するこのような潜在的な部位の説明については、図2を参照のこと）。一旦同定されると、開裂部位を含む標的遺伝子の領域に相当する15～20リボヌクレオチドの短いRNA配列が、予測される構造上の特徴、例えば、オリゴヌクレオチド配列を不適にし得る二次構造について評価し得る。また、候補標的の適性は、リボヌクレアーゼ保護アッセイを使用して、相補的なオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションへのそれらのアクセシビリティを試験することにより評価し得る。

本発明のアンチセンスRNAおよびDNA分子並びにリボザイムの両方が、核酸分子の合成について当業界で知られている方法により調製し得る。これらとして、当業界で公知のオリゴデオキシリボヌクレオチドを化学合成する技術、例えば、固相ホスホルアミダイト化学合成が挙げられる。また、RNA分子はアンチセンスRNA分子をコードするDNA配列のin vitro およびin vivoの転写により生成し得る。このようなDNA配列は、適当なRNAポリメラーゼプロモーター、例えば、T7ポリメラーゼプロモーターまたはSP6ポリメラーゼプロモーターを組み込む多種のベクターに組み込まれてもよい。また、使用されるプロモーターに応じて、アンチセンスRNAを構成的または誘導的に合成するアンチセンスcDNA構築物が、細胞系に安定に導入し得る。

DNA分子の種々の修飾が、細胞内安定性および半減期を増大する手段として導入されてもよい。可能な修飾として、その分子の5'末端および／または3'末端へのリボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドの隣接配列の付加またはオリゴデオキシリボヌクレオチド主鎖内のホスホジエステラーゼ連結ではなくホスホロチオエートまたは2'-O-メチルの使用が挙げられるが、これらに限定されない。

5.3.2. 三重らせんDNA形成

オリゴデオキシリボヌクレオチドは、二重鎖DNA中の特定の相補配列への水素結合により配列特異的三重らせんを形成し得る。三重らせんへの関心は、これらの構造の潜在的な生物学的用途および治療用途に集中していた。特定の三重らせんの形成は、機能性トランス作用因子の特異的な結合を阻止することにより標的遺伝子の複製および／または遺伝子発現を選択的に抑制し得る。

三重らせん形成に使用されるオリゴヌクレオチドは一本鎖であり、かつデオキシヌクレオチドを含むべきである。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーグスティーン（Hoogsteen）型塩基対規則により三重らせん形成を促進するように設計される必要があり、この規則はプリンまたはピリミジンのかなり大きな伸長が二重鎖の一方のストランドに存在することを一般に要求する。オリゴヌクレオチド配列はピリミジンベースとしてもよく、これは得られる三重らせんの三つの関連するストランドを横切ってTATトリプレットおよびCGCトリプレットをもたらすであろう。ピリミジンに富むオリゴヌクレオチドは、二重鎖の単一ストランドのプリンに富む領域にそのストランドに平行な配向で塩基相補性を与える。さらに、プリンに富み、例えば、G残基の伸長を含むオリゴヌクレオチドが選択されてもよい。これらのオリゴヌクレオチドはGC対に富むDNA二重鎖を有する三重らせんを形成し、この場合、プリン残基の大半は標的二重鎖の単一ストランドに配置され、二重鎖中の三つのストランドを横切ってGGCトリプレットをもたらす。また、三重らせん形成のために標的とし得る潜在的な配列が、所謂“スイッチバック”オリゴヌクレオチドをつくることにより増加し得る。スイッチバックオリゴヌクレオチドは交互の5'-3'、3'-5'様式で合成され、その結果、それらは二重鎖の最初の一ストランドと塩基対合し、次に他方のストランドと塩基対合して、プリンまたはピリミジンのかなり大きな伸長が二重鎖の一つのストランドに存在することの必要性をなくす。

5.3.3. オリゴヌクレオチドの投与

抗MIF治療用途のために、抑制性オリゴヌクレオチドは製剤化され、そして全身投与、および局在化投与、または局所投与を含む種々の手段により投与し得る。製剤化および投

与に関する技術が“Remington's Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., E
aston, PA”最近版に見られる。投与の様式は、生体中の所望の標的臓器への送達を最大
にするように選択し得る。例えば、下記の第12節に詳述された ^{125}I -M I F結合研究は、
M I Fが肝臓および腎臓に優先的に分布していることを示す。それ故、M I Fレセプター
の発現を抑制するように設計されたオリゴヌクレオチドは、これらの臓器へのターゲッ
ティングのために製剤化し得る。これに関して、リボソーム封入オリゴヌクレオチドが有益
であろう。また、M I Fそれ自体はT細胞およびマクロファージ中で、そして、内毒素誘
導に応答して、下垂体中で産生される。それ故、M I Fの発現を抑制するように設計され
たオリゴヌクレオチドは、これらの臓器へのターゲッティングのために製剤化されるべき
である。

10

全身投与のためには、筋肉内注射、静脈内注射、腹腔内注射、および皮下注射を含む注射
が好ましい。注射の場合は、関係するオリゴヌクレオチドは水溶液、好ましくは生理適合
性緩衝液、例えば、ハンクス溶液、リンゲル溶液、または生理食塩緩衝液中で製剤化され
る。加えて、オリゴヌクレオチドは固体形態または凍結乾燥形態で製剤化され、次に使用
の直前に再度溶解または懸濁されてもよい。また、全身投与は経粘膜手段、経皮膚手段、
または経口手段により行い得る。経粘膜投与または経皮膚投与のためには、透過すべきバ
リヤーに適した浸透剤が製剤化に使用される。このような浸透剤が一般に当業界で知られ
ている。経粘膜投与は鼻内噴霧または座薬によるものであってもよい。経口投与の場合は
、オリゴヌクレオチドはカプセル、錠剤、およびトニックに製剤化し得る。局所投与の場
合は、本発明のオリゴヌクレオチドは、当業界で一般に知られているように、外用薬、軟
膏、ゲル、またはクリームに製剤化される。

20

また、本発明のオリゴヌクレオチドは最初にリボソームに封入され、次に上記のように投
与し得る。リボソームは水性内部を含む球形の脂質二重層である。リボソーム形成の時点
で水溶液中に存在する全ての分子（この場合、オリゴヌクレオチド）が、この水性内部に
保持される。リボソーム内容物は外部の微小環境から保護され、そして、リボソームが細
胞膜と融合するので、細胞質に有効に送達され、オリゴヌクレオチドの負の電荷を中和す
る必要をなくす。

このような目的のための生物および細胞へのオリゴヌクレオチドの導入は、幾つかの手段
により行い得る。哺乳類投与のためには、治療オリゴヌクレオチド目的につき上記された
技術のそれぞれが使用し得る。加えて、エレクトロポレーション技術、マイクロインジェ
クション技術、およびカルシウム沈殿技術を含むが、これらに限定されない、細胞への核
酸の導入のためのその他の通常の技術が使用し得る。

30

5.4. トランスジェニック動物モデル

トランスジェニック動物は、当業者に公知の技術を使用して、操作されてもよく、その細
胞はそれらのゲノム中に修飾M I F遺伝子および／または付加的なM I F遺伝子および／
またはM I Fレセプター遺伝子を含んでいてもよい。例えば、不活性なM I F遺伝子およ
び／またはM I Fレセプター遺伝子を含む動物、または付加的なM I F遺伝子および／ま
たはM I Fレセプター遺伝子を含んでいてもよい動物が生産し得る。

このようなトランスジェニック動物は生体内のサイトカイン応答の評価のためのモデル系
として使用されてもよく、そして更にサイトカイン媒介毒性に関係する症状の治療用の新
規薬剤を同定し、試験する手段として利用し得る。

40

5.4.1. M I FおよびM I Fレセプタートランスジェン

M I F遺伝子の全部または一部のヌクレオチドコード配列を含むDNAが、トランスジェニ
ック動物を作出するのに使用し得る。また、M I Fレセプターをコードする遺伝子の全部
または一部が使用し得る。更に、M I F遺伝子および／またはM I Fレセプター遺伝子の
一個以上のヌクレオチドの挿入、置換、および／または欠失がまたトランスジェニック動
物の構築に使用し得る。遺伝子コードの縮重のために、実質的に同じM I FまたはM I F
レセプタータンパク質または機能均等物をコードするその他のDNA配列がまた使用し得る
。本発明のトランスジェニック動物を作出するのに使用されるヌクレオチドコード配列は
、既知のプロモーター調節ヌクレオチド配列により調節し得る。トランスジェンの発現が

50

一つ以上の特定の組織に制限されることが必要とされる場合、組織特異性エンハンサー調節配列がまた使用し得る。遺伝子または遺伝子構築物の多重コピーがトランスジェニック創始動物に安定に組込まれてもよい。

ここに記載された変異体のいずれかを生じるヌクレオチドコード配列および／または調節配列のいずれかが、当業者に公知である組換えDNA方法およびクローニング方法を使用して作製し得る。本発明に使用される遺伝子構築物を作製するために、当業者に公知である組換えDNA方法およびクローニング方法が使用し得る（Sambrookら，1989，分子クローニング、実験マニュアル、第2編、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー プレス、NYを参照のこと）。これに関して、適当なM I Fおよび／またはM I Fレセプターコード配列が、配列内の適当な位置に都合よく配置される制限酵素部位を使用してMIF cDNAまたはゲノムクローンから生成し得る。別途、または上記の方法と連係して、例えば、合成オリゴヌクレオチドおよび大腸菌の特定の株（Kunkel, T.A. ら，1987, Meth. Enzymol. 154:367-382）と一緒に、M13またはもファージミドの如きベクター（これらは一本鎖環状DNA分子を生産できる）の使用または合成オリゴヌクレオチドおよびPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）（Hoら，1989, Gene 77:51-59; Kamman, M. ら，1989, Nucl. Acids Res. 17: 5404）の使用を伴う部位特異的突然変異誘発技術が、必要なヌクレオチドコード配列を生成するのに使用し得る。次に適当なM I F配列および／またはM I Fレセプター配列が単離され、クローン化され、そしてトランスジェニック動物を作出するのに直接使用し得る。また、これらの配列は、ここに記載された技術を再度使用して、M I Fおよび／またはM I Fレセプタープロモーター以外の調節配列を使用するキメラ遺伝子構築物进行操作するのに使用し得る。次にこれらのキメラ遺伝子構築物はまたトランスジェニック動物の作出に使用されるであろう。

また、内因性M I F遺伝子および／またはM I Fレセプター遺伝子の機能が破壊されたトランスジェニック動物を作出し得る。これらの内因性遺伝子破壊を行うために、遺伝子ターゲティングによる部位特異的不活化の技術（Thomas, K.R. およびCapecchi, M.R., 1987, Cell 51:503-512）が使用し得る。簡単に言えば、関係する内因性遺伝子と相同的な幾つかのヌクレオチド配列を含むベクターが、染色体配列による相同的組換えにより、前記内因性遺伝子のヌクレオチド配列に組み込み、そのヌクレオチド配列の機能を破壊する目的で設計される。

5.4.2. トランスジェニック動物の作出

マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、ミニピッグ、および非ヒト霊長類、例えば、ヒヒ、リスザルおよびチンパンジーを含むが、これらに限定されないあらゆる種の動物が、本発明のトランスジェニック動物を作出するのに使用し得る。当業界で知られているあらゆる技術が、トランスジーンを動物に導入してトランスジェニック動物の創始系統を作出するのに使用し得る。このような技術として、前核マイクロインジェクション（Hoppe, P.C.およびWagner, T.E., 1989, 米国特許第4,873,191号）；生殖細胞系へのレトロウイルス介在性遺伝子移入（Van der Puttenら，1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-6152）；胚幹細胞中の遺伝子ターゲティング（Thompsonら，1989, Cell 56:313-321）；胚胎のエレクトロポレーション（Lo, 1983, Mol Cell. Biol. 3:1803-1814）；および精子介在性遺伝子移入（Lavitranoら，1989, Cell 57:717-723）；等が挙げられるが、これらに限定されない（このような技術の総説については、Gordon, 1989, トランスジェニック動物, Intl. Rev. Cytol. 115:171-229（参考として本明細書にそのまま組み入れる）を参照のこと）。

創始動物が一旦作られると、それらは育種され、同系育種され、異系育種され、または交雑育種されて所望される特別な遺伝子型のコロニーを生産し得る。このような育種戦略の例として、別の系統を樹立するための一つより多い組込み部位による創始動物の異系育種；それぞれのトランスジーンの累積的発現の効果のために高レベルでトランスジーンを発現するコンパウンドトランスジェニックスを生産するための別の系統の同系育種；発現を増強すると共にDNA分析による動物のスクリーニングの必要性をなくすために、所定の組込み部位に対しホモ接合性のマウスを生産するためのヘテロ接合性のトランスジェニック

マウスの交雑；ヘテロ接合性のコンパウンドまたはホモ接合性の系統を生産するための別のホモ接合性の系統の交雑；トランスジーンの発現に関する対立遺伝子を修飾することの効果調べるように、異なる同系育種された遺伝子バックグラウンドへの動物の育種が挙げられるが、これらに限定されない。

本発明は、全ての動物細胞中にトランスジーンを有するトランスジェニック動物を提供するだけでなく、幾つかであるが、全てではない動物細胞中にトランスジーンを有する動物、即ち、モザイク動物を提供する。トランスジーンは単一トランスジーンとして、またはコンカテマー、例えば、頭－頭タンデムまたは頭－尾タンデムで組込まれてもよい。

5.5. 診断用途

M I Fタンパク質および／またはmRNAレベルは、症状の有害な特徴の指標として、通常の技術を使用して、個体中で監視し得る。M I Fタンパク質濃度の測定のために、このような監視技術として、免疫アッセイ、例えば、ウェスタンブロット、イムノアッセイ、例えば、放射線免疫沈降、エンザイムイムノアッセイ、等が挙げられるが、これらに限定されない。MIF mRNA濃度の測定につき、このような技術として、例えば、ハイブリダイゼーション技術、例えば、ノーザンブロット分析、または、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (Mullis, K.B., 1987, 米国特許第4,683,202号に記載された実験実施態様)、リガーゼ連鎖反応 (Barany, F., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189-193)、自己持続性 (self-sustained) 配列複製 (Guatelli, J.C. ら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878)、転写増幅系 (Kwoh, D.Y. ら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 173-1177)、またはQ- β レプリカーゼ (Lizardi, P.M. ら, 1988, Bio/Technology 6:1197) を伴い得るあらゆるRNA増幅技術が挙げられる。

6. 実施例：M I Fの分子クローニング並びにマウスおよびヒトM I F間の構造比較

6. 1. 材料および方法

6. 1. 1. 材料

ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、逆転写 (R T) および他の分子生物学的手法のための試薬は、別記の他はGIBCO BRL (Grand Island, NY) より購入した。P C R緩衝液はPerkin Elmer Cetus (Norwalk, CT) より、リボヌクレアーゼ阻害剤 "rRNasin" はPromega (Madison, WI) より入手した。RNAzolTMBはTEL-TEST, INC. (Friendswood, TX) より、オリゴヌクレオチドはOLIGOS ETC., INC. (Wilsonville, OR) より購入した。手動D N A配列決定はSEQUENASE (登録商標) 2.0システム (United States Biochemical, Cleveland, OH, Taboer & Richardson, 1987) を使用して実施した。自動D N A配列決定のためには、Tag DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) を使用した。ウェスタンブロッティングはAndersonらによる方法 (1982, Electrophoresis 3:135) を改変して実施した。ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S－P A G E) およびウェスタンブロッティング試薬はPierce (Rockford, IL) より入手した。ポリクローナル抗rmuM I F抗血清は精製rmuM I Fを使用して免疫化したウサギから調製した。チオグリコレートブロス (Difco, Detroit, MI) を製造業者の指示にしたがって調製し、高圧滅菌し、室温で遮光して保存した。大腸菌0111:B4 L P SおよびポリミキシンBはSigma (St. Louis, MO) より購入した。L P Sは発熱物質を含まない水に再懸濁し、ボルテックス攪拌し、音波処理、アリコートに分け (5mg/ml)、-20℃で保存した。L P Sの連続希釈物を発熱物質を含まない水で調製し、使用前に10分間音波処理 (Branson 3210, Danbury, CT) した。

6. 1. 2. マウスおよびヒトM I Fの分子クローニング

マウス下垂体前葉細胞系AtT-20/D16v-F2 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) からマウスM I Fをクローン化した。細胞を、ゲンタマイシン (Gibco BRL) 50 μ g/mlを含有するD M E Mおよび10%熱不活性化ウシ胎児血清 (FBS) (HyClone, Logan, UT) 中、 1×10^6 cells/mlでプレートにまいた。5% CO₂を含有する加湿雰囲気中で37℃で3時間インキュベートした後、付着しなかった細胞を除去し、残留した付着細胞をD M E M/10% F B Sで2回洗浄した。その後L P S (50 μ g/ml) を添加し、細胞を16時間インキュベートした。この時間の終了時に、RNAzolTMBを使用し、製造業者の指示にしたがって、

細胞培養基を除去し、総RNAを単離した。オリゴ(dT)₁₂₋₁₈およびM-MLV逆転写酵素を使用して、RNA 1 µgを50 µL反応量で逆転写した。PCR (32サイクル; 94°Cで1分、55°Cで1分、72°Cで1分) により、MIFプライマーを使用して、cDNA 5 µLを増幅させた。所望のサイズの単一DNA増幅生成物が得られ、GENE CAN II (登録商標) Kit (BIO 101 INC., La Jolla, CA) を使用して精製した。その後cDNAをプラスミド pT7Blue中にクローン化し、pT7Blue T-Vector Kit (Novagen, Madison, WI) を使用して、Nova Blueコンピテント 大腸菌 中にトランスフォームした。Plasmid MagicTM Minipreps DNA Purification System (Promega) を使用して、多数の白色コロニーから組換えDNAを調製し、Sequi-Gen II Sequencing Cell (BIO-RAD, Hercules, CA) により手動で配列決定した。

10

ヒトMIFのクローニングについては、Jurkat H33HJ-JA1細胞 (American Type Culture Collection) を、ゲンタマイシン50 µg/mlを含有するRPMIおよび10%熱不活性化FBS中、 1×10^6 cells/mlでプレートにまいた。5% CO₂を含有する加湿雰囲気中で37°Cで3時間インキュベートした後、付着しなかった細胞を除去し、残留した付着細胞をRPMI/10% FBSで2回洗浄した。細胞をさらに1時間インキュベートし、総RNAを単離し、上記のようにRTに供した。huMIF cDNA配列からNdeI/MIF-およびBamHI/MIF-融合プライマー (5' -CCATATGCCGATGTTTCATCGTAAACAC-3' および3' -CGGATCCTGCGGCTCTTAGGCGAAGG-5') を設計し (Weiser et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 86:7522)、上記したようにヒトMIF cDNAを増幅するのに使用した。予測されたサイズの単一のPCR生成物が得られ、GENE CLEAN II (登録商標) Kitを使用して精製し、NdeI/BamHI-

20

6. 1. 3. 組換えMIFの発現および精製

muMIF cDNAを含有する組換えpT7Blueクローンを制限酵素NdeIおよびBamHIで切断し、そしてMIF挿入断片を単離して、NdeI/BamHI-切断pET11bベクター (Novagen) 中に連結させた。大腸菌DH5αを形質転換し、単一の組換え体コロニーを単離し、使用するまで20%グリセロール中-80°Cで保存した。次に、マウスまたはヒトMIF含有pET11bプラスミドDNAを調製し、大腸菌BL21 (DE3) 発現菌株 (Novagen) を形質転換するのに使用した。培養物1リットルを600nmにおける光学濃度が0.6~0.8に到達するまで37°Cにおいて増殖させた。イソプロピル 1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド (IPTG) を最終濃度1 mMまで添加し、37°Cにおいてさらに3時間インキュベーションを続けた。その後細菌を遠心分離によって回収し、使用時まで細胞ペレットを-20°Cに凍結させた。

30

タンパク質の精製のため、細菌のペレット (培養物50mlに相当する) を解凍し、Tris-緩衝化生理食塩水 (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7.5) 3.5ml中に再懸濁させた。同容積の洗浄ガラスビーズ (106ミクロン; Sigma, G-8893) を添加し、混合物を10分間激しくボルテックス攪拌することによって細菌を溶菌した。位相差顕微鏡下で検査することによって溶菌を確認した。1000gで10分間遠心分離することによってガラスビーズを除去し、その後細菌抽出物を38000gで30分間遠心分離した。清澄化細菌溶菌液に相当する上清を0.45 µmの、次に0.22 µmの膜フィルターを通して無菌濾過し、Fast Protein Liquid Chromatographyシステム (FPLC) (Pharmacia, Piscataway, NJ) を使用してMONO Qアニオン交換クロマトグラフィーに供した。Mono QカラムをTris-緩衝化生理食塩水で平衡化した。MIFは同じ緩衝液で最初の流出液 (3ml) 中に溶出され、これを集めて即座に氷上に置いた。その後、最初にメタノールで、次に水で洗浄しておいたC8-SepPak逆相 (RP) カラム (Waters, Division of MILLIPORE, Milford, MA) に、このMIF含有画分を入れた。この樹脂をそれぞれカラム容積の10倍の水および20%アセトニトリル/水で洗浄することによって、非結合物質を溶出させた。その後、MIFをカラム容積の6倍の60%アセトニトリル/水で溶出させ、-80°Cで凍結させ、凍結乾燥し、使用時まで-20°Cに保持した。再生のために、8M尿素および5mM DTTを含有する20mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) 中に、M

40

50

I Fを200~400 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように溶解し、5mM DTTを含有する20mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) に対し、次に20mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) のみに対し透析した。再生したM I Fを無菌濾過し、使用時まで4°Cに保持した。M I F調製物のL P S含有量を色素原Limulus amoebocyte検定 (Bio-Whittaker Inc., Walkersville, MD) によって測定した。S-ヘキシルーグルタチオン-アガロースビーズ (Sigma, H-7011) を使用したアフィニティークロマトグラフィーによる清澄化細菌溶菌液からrmuM I Fを精製する試みを、タンパク質/グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合構築物のシングルステップ精製方法 (Smith & Johnson, 1988, Gene 67:31) にしたがって実施した。

6. 1. 4. 天然M I Fの精製

マウス肝臓アセトンパウダー (Sigma, L-8254) 2 gをTris-緩衝化生理食塩水20mlに再懸濁させ、ボルテックス攪拌し、1000gで10分間遠心分離することによって不溶性物質を除去した。M I Fおよびその他の肝タンパク質を含有する上清を濾過し (0.45 μm の、続いて0.22 μm のフィルター)、上記したようにMONO Q/FPLCアニオン交換クロマトグラフィーに供した。最初の流出画分 (3ml) とともにM I Fが溶出し、これを集めて、Tris-緩衝化生理食塩水で平衡化したPro Sカチオン交換カラム (BIO-RAD) に入れた。M I FがTris-緩衝化生理食塩水とともに溶出し、M I F含有画分が流出液から再び回収された。その後M I F画分を集め、C8-SepPakカートリッジに入れた。M I Fを60%アセトニトリル/水で溶出させ、凍結乾燥し、上記のように保存した。S-ヘキシルーグルタチオン-アガロースビーズを使用したアフィニティークロマトグラフィーによるマウス肝臓上清から肝M I Fを精製する試みを上記のように実施した。

6. 1. 5. M I Fの生化学的特性決定

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を18%ゲル中、還元条件下で実施した (Laemmli, 1970, Nature 227 : 680)。ゲルを銀で染色するか、またはさらにウエスタンブロッティング用に処理した。銀染色については、ゲルを最初に50%メタノール/10%酢酸中で16時間定着させ、その後文献記載にしたがって (Poehling & Neuhoff, 1981, Electrophoresis 2 : 141) 分析した。ウエスタンブロッティングについては、CAPS-転移緩衝液 (10mM CAPS, 20%メタノール、pH11.0) を使用して50Vおよび150mAにおいて16時間エレクトロブロッティングすることによって、タンパク質をニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell, Keene, NH) に転移させた。次に、膜をブロッキング緩衝液 (50mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH7.5, 5%無脂肪乾燥乳、0.05%Tween-20) とともにインキュベートし、続いてポリクローナルウサギ抗rmuM I F抗血清の結合用緩衝液 (50mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH7.5, 1%BSA, 0.05%Tween-20) 中、1 : 1000の希釈物とともにインキュベートした。結合用緩衝液で十分に洗浄後、膜を西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合-ヤギ抗ウサギ抗体 (Pierce) の結合用緩衝液中、1 : 1000の希釈物とともにインキュベートし、結合用緩衝液で2回、150mM NaClを含む50mMのTris-Base (pH7.5) で2回洗浄し、クロロナフトール/ H_2O_2 基質で展開させた。前染色したタンパク質分子量 (M_r) マーカーは2.5~43kDa (Gibco BRL) の範囲であった。

N-末端M I F配列はEdman分解 (Allen, 1981 In: Sequencing of Proteins and Peptides, Elsevier, Amsterdam, New York) および製造者 (Applied Biosystems) の指示にしたがった自動気相配列決定法によって決定した。

N-グリコシル化分析については、精製肝由来M I F 0.1 μg を製造者 (New England Bio Labs, Beverly, MA) の指示にしたがってエンドグリコシダーゼ PNGase Fとともにインキュベートした。その後、試料をLaemmli電気泳動緩衝液に1 : 1で混合し、5分間沸騰させ、インキュベート混合物の1 / 4を上記のようにSDS-PAGE/ウエスタンブロッティングによって分析した。切断効率を調節するため、IgGの軽鎖および重鎖を平行して切断し、同一のゲル上で分離した。PNGase F 5000units/mlで3時間インキュベートすると切断が完了することが確認された。

分析用サイズ排除クロマトグラフィーのため、精製rmuM I FまたはrhuM I F 40 μg を7MのGdnHClを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液200 μl に溶解した。試料を同一の緩衝液で平衡化したSuperose 12 HR 10/30カラム (Pharmacia) 上で分離し、流速0.5ml/minで溶出さ

せた。サイズマーカーはBIO-RAD (1.35~670kDa) 製で、同一の条件でクロマトグラフィーにかけた。

M I F のマスマスペクトロメトリー分析 (M S) は、Shimadzu Kratos Kompact MALDI 3 V3 .0.2装置 (Hannover, Germany) を使用して、他に記載されているように (Hillenkamp & Karas, 1990, Meth. Enzymol. 193:280) マトリックスアシスト (matrix-assisted) レーザー脱離イオン化M Sによって実施した。各質量分析において、異なる20スペクトルが累積した。さらに、rmuM I Fを、API III三重四重極質量分析機とIonSprayTMインターフェイス (Sciex, Toronto) を使用したイオンスプレーマスマスペクトル分析 (I S - M S) によって分析した。

精製し、再生させたrmuM I F (20 μ g/ml) およびM I F含有細菌溶菌液 (予測M I F含有量: 50 μ g/ml) を、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (G S T) 活性に関して、Fjellstedtらの方法 (1973, J. Biol. Chem. 248:3702) によって、基質として1, 2-エポキシ-3-(p-ニトロフェノキシ) プロパン (EPNP)、陽性対照としてウシG S T (Sigma, G-8386) を使用して (Blocki et al., 1992, Nature 360:269) 光度測定分析をした。この検定システムにおいては、ウシG S T (400 μ g/ml) は基質E P N Pに対して0.014units/mlの酵素活性を有することがわかった。

6. 1. 6. 生物活性プロフィール

組換えM I Fのマクロファージ/単球遊走阻止活性を、改変Boydenチェンバー (Boyden, 1962, J. Exp. Med. 115:453) におけるヒト末梢血単球の遊走を調べることによって分析した。健康なドナーのヘパリン処理静脈血から単球を単離し、2%の脂肪酸非含有ウシ血清アルブミン (Sigma) および20mM Hepes (pH7.2) を含有するGeyの平衡塩類溶液 (Gibco BRL) 中、濃度 2.5×10^6 cells/mlになるように再懸濁させた。M I F含有 (0.0001~10 μ g/ml) 溶液または緩衝液対照をBoydenチェンバーの下部室に入れ、ポリビニルピロリドン非含有ポリカーボネートフィルター (孔径5- μ m, no.155845, Costar Corp., Cambridge, MA) で強く覆い、この室のフィルター上に単球 (1×10^5) を添加した。その後このチェンバーを5% CO₂を含有する加湿雰囲気中、37°Cで3時間インキュベートした。終了後、フィルターを取り除き、細胞を固定し、Giemsa試薬で染色した。その後すでに記載されているように (Sherry et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3511) 単球を計数した。

すでに記載されているように (Wolpe et al., 1988, J. Exp. Med. 167:570)、M I F馴化RAW 264.7マクロファージ上清中でのL929細胞毒性によって、TNF α 生成物を定量した。RAW 264.7マクロファージをRPMI/10% FBS中に再懸濁させ、 1×10^6 cells/mlとなるようにプレートにまき、5% CO₂を含有する加湿雰囲気中、37°Cで3時間インキュベートし、RPMI/1% FBSで2回洗浄した。RPMI/1% FBSで希釈した各種用量のM I Fとともに細胞を12~14時間インキュベートした。各実験終了時に、細胞培養液を集め、遠心分離 (800gで10分) し、1mM PMSFを補充した。この直後に、M I F誘導TNF α 活性を測定した。ポリクローナルウサギ抗組換えマウスTNF α 抗血清 (50 μ l/ml) はTNF α 活性を完全にブロックしたが、L929細胞にrTNF α とともにrmuM I F (10pg/ml~10 μ g/ml) または抗-rmuM I F抗体を添加したとき、組換えマウスTNF α (rTNF α) (5pg/ml~1 μ g/ml) の細胞毒性は未変化のままだったので、M I FはTNF α 活性に関与しなかった。

M I F馴化RAW 264.7およびチオグリコレート処理腹腔浸出マクロファージ上清中の酸化窒素生成物を、グリース試薬で亜硝酸および硝酸含量を測定することによって定量した。RAW 264.7は前記のように調製および馴化した。実験によっては、M I F添加の前に、細胞を組換えマウスインターフェロン- γ (IFN- γ) (100IU/ml) (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) とともに1時間インキュベートした。チオグリコレート処理腹腔浸出マクロファージは、3~4日前に腹腔内に無菌チオグリコレートブロス2mlを注射したBALB/cマウスから採取した。腹腔を氷冷した11.6%ショ糖溶液5mlで洗浄することによって、細胞を厳密に無菌下で回収した。遠心分離 (800gで10分) 後、細胞をRPMI/10% FBSに再懸濁し、 2×10^6 cells/ml濃度でプレートにまいた。3時間のインキュベート後、非付着細胞 (すなわちPMNs、リンパ球) をRPMI/1% FBSで除去し、残留する付着

10

20

30

40

50

細胞をRAW 264.7細胞に関して記載したように、MIFで馴化した。MIF（細胞培養液中1および10 $\mu\text{g/ml}$ ）をそれぞれ濃度10および100ng/mlのポリミキシンBとともに、無菌条件下で室温で30分インキュベートすることにより、微量濃度の混入LPSを中和した。混合物を遠心分離によって清澄化し、調製マクロファージ培養物に添加した。添加したポリミキシンB濃度は存在する混入LPSを中和するのに必要な量のおよそ1000倍高かった。MIF活性の抗体中和のため、rmuMIF（細胞培養液中1および10 $\mu\text{g/ml}$ ）を抗-rmuMIFまたは正常ウサギ対照血清20 $\mu\text{L/ml}$ で処理し、前記のようにマクロファージに添加した。

6. 1. 7. 高次および一次構造の安定性分析

Aviv Associates Model 62DS 分光偏光計でCDスペクトルを記録した。スペクトルは25 $^{\circ}\text{C}$ において190~250nmの範囲で記録し、0.25nm間隔でバンド幅1.5nmおよび時定数1.0秒で取得した3回走査の平均で示す。全CD測定において使用する石英セル（1および10mm）をエタノール中30% HClで洗浄し、水およびメタノールですすぎ、使用前に乾燥した。Bio-Radタンパク質検定（BIO-RAD）を使用して、20mMリン酸塩緩衝液（pH7.2）中に調製した原液からタンパク質濃度を測定した。この検定でアミノ酸定量分析によって得られた数値と一致することがわかった。CD分析の30分前に、他に述べる以外には、原液からタンパク質を20mMリン酸塩緩衝液中、最終濃度10 μM に希釈した。CDスペクトルは、波長に対し、残基当たりの平均モル楕円率（ $[\theta]$, deg $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ）をプロットして表す。

高次変性実験に関しては、20mMリン酸塩緩衝液（pH7.2）に溶解したMIF原液を、20mMリン酸塩緩衝液（pH7.2）中の8M GdnHCl（分子生物学用試薬級、Sigma）の次第に増加させた量と混合し、最終タンパク質濃度10 μM およびGdnHClの最終指示濃度に達するようにした。その後、CDスペクトルを記録する前に室温で30分、試料を平衡化させた。

6. 2 結果

6. 2. 1. マウスおよびヒトMIFのクローニング

LPS刺激下垂体前葉細胞から分泌されたタンパク質中のMIFのマウス相同体を同定するのに、N-末端タンパク質配列決定およびcDNAクローニングを使用した。LPS刺激下垂体前葉細胞（AtT-20）の総RNAからmuMIF cDNAを調製し、MIFプライマーで増幅させた。次にMIF cDNAをpT7Blue T-ベクター中にクローン化し、DNA配列分析に供した。6プラスミドクローンから得られたmuMIF cDNA配列を、すでに発表されているヒトT細胞MIF cDNA（Weiser et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7522）と比較した。マウスMIF cDNA（図3）は348ヌクレオチドのオープンリーディングフレームにわたってhuMIF配列と88.2%の配列相同性を示し、最近報告されたマウス3T3繊維芽細胞およびマウス胚水晶体のMIF cDNA（Lanahan et al., 1992, Mol. Cell. Biol. 12:3919 ; Wistow et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1272）と配列が同一であることがわかった。

休止Jurkat H33HJ-JA1 T細胞から単離したRNAのRT/PCRによってhuMIF cDNAを調製した。MIF cDNAを、NdeI/BamHI制限部位を産生するフランキングプライマーで増幅させ、続いてhuMIF増幅生成物をそのままNdeI/BamHI切断pET11b原核発現プラスミド中にクローン化できるようにした。次に、別々に誘導された8個の大腸菌クローンのDNA両鎖の配列決定から、ヒトMIF cDNAの配列が得られた。このJurkat T細胞MIF配列は、最近報告されたヒト胎児水晶体のMIF cDNA（Wistow et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1272）およびグリコシル化阻害因子（GIF）cDNA（Mikayama et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10056）と同一であるが、最初に報告された、T-CEMB細胞系から得られたヒトT細胞MIF配列（Weiser et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7522）とは318番目の塩基が1個変化している点で異なっていることがわかった。このG→Aの置換は推定アミノ酸配列にSer¹⁰⁶→Asn¹⁰⁶の変化をもたらし、ヒトタンパク質をマウスMIFにより相同性にさせる。マウス下垂体MIF cDNAおよびヒトJurkat細胞cDNAは348のヌクレオチドのオープンリーディングフレームにわたって88.5%の同一性を示し、マウ（AtT-20）およびヒト（Jurkat）MIFの推定アミノ酸配列は115個のアミノ酸の90%が同一であることがわかった（図

4)。マウスまたはヒトタンパク質を区別するN-末端シグナルは明白でなかった。したがって、M I Fは、インターロイキン-1 (I L-1) (Rubartelli et al., 1990, EMBO J. 9:1503)、塩基性繊維芽細胞成長因子 (b F G F) (Jackson et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10691)、およびシクロフィリンの分泌型 (Sherry et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3511) などの、細胞から非古典タンパク質分泌経路によって放出されるサイトカイン類の成長リストの中に加えられる。muM I F アミノ酸配列の75および110番目に2つのN-グリコシル化能がある部位が発見され、これらはヒトJurkat M I F 配列とほとんど同一の位置 (73および110番目) であった。3つのシステイン残基 (57, 60および81番目) もまたマウスおよびヒトM I Fにおいて予測されたアミノ酸配列の同一の位置であった。

10

6. 2. 2. 大腸菌からの組換えM I Fの発現および精製

マウスおよびヒトM I F c D N AをIPTG誘導pET発現プラスミド系にクローン化することによって、組換えmuM I FおよびhuM I Fを大腸菌中に発現させた。pET15bベクターからマウスM I Fを発現させ、N-末端オリゴヒスチジン融合タンパク質を生成させて、イオン金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C) によって簡単に組換えタンパク質を精製するという最初の試みは、オリゴヒスチジンリーダーを除去するのに必要なその後のトロンビン開裂に対してタンパク質が抵抗するため不成功だった。したがって、プラスミドpET11bにサブクローン化したmuM I F c D N Aによって一般的な方法でmuM I Fを発現させて、その後精製した。これによって、M I FのN-末端に接続した3アミノ酸 (Met-Asp-Ser) リーダー配列を生成する構築物が作製された。huM I FもまたpET11b

20

ベクターから発現されたが、D N A増幅によってオープンリーディングフレームの2番目のアミノ酸から開始し、NdeI制限部位によって得られるM I Fの開始がメチオニンとなるように工夫した。ゲル精製タンパク質 (muM I Fでは10アミノ酸) のN-末端配列決定、S D S-P A G E、および抗AtT-20M I F抗体を使用したウエスタンブロッティングによって、M I Fの正しい発現を確認した。このpET11b-誘導M I Fを以下の生物学的に活性なmuM I FおよびhuM I Fの精製に使用した。

組換えマウスまたはヒトM I Fは、大腸菌溶菌液の上清総タンパク質の40%を構成することがわかった。pH7.5におけるアニオン交換クロマトグラフィーの結果、およそ80%の精製度のマウスおよびヒトM I Fが得られた。続いてC 8 逆相カラムに通した結果、SDS-PAGE/銀染色、および質量分析による予想M_T (12.5kDa) の単一バンドの出現によって、下記のように確認されるように、マウスおよびヒト組換えタンパク質の両方の精製タンパク質が得られた。この簡単で迅速な2ステップ操作は大腸菌培養物50mlからマウスまたはヒトM I F 1mgを精製するのに使用された。再生後、培養物50mlから可溶性で生物学的に活性な組換えM I F 0.8~0.9mgが得られた。総細菌上清タンパク質からのM I Fタンパク質の全収率は20%と概算された。この2ステップ精製方法は、簡便性と迅速性、および非特異的沈殿によるタンパク質の損失を最小限にするという理由によって選択された。使い捨ての低容量プッシュカラムを使用したC 8クロマトグラフィーによる精製もまた、大腸菌宿主細胞からキャリーオーバーされるL P Sを除去するために採用した。これらの操作によって精製された組換えM I Fは微量のL P Sしか含有しなかった (M I F mgにつきL P S 4~8ng)。

30

40

6. 2. 3. 天然M I Fの精製

組換えM I Fの生物学的活性をより正確に評価するために、マウス組織からの天然M I Fをも精製した。下垂体細胞からは生化学的特性決定には不十分な量のM I Fしか取り出せなかったが、ウエスタンブロッティングによれば、肝臓はin vivoでのM I Fの豊富な供給源であることがわかった。組換えM I Fの精製に使用したものと同様の方法によって肝臓からM I Fを精製した。Mono Qアニオン交換クロマトグラフィーによって部分的に精製され、M I F含有比がおよそ25倍となった。続くC 8プッシュカラムへの通過によって、ほぼ純粋なM I Fが得られた。しかし、SDS-PAGE/銀染色分析では、5つの余分なバンドが検出され、これはR Pクロマトグラフィーの溶出条件を変えても除去することができなかった。このため、これらの混入物を除去するために、C 8ステップの前にPro Sカ

50

チオン交換クロマトグラフィーステップを加えた。肝臓M I Fの純度および等質性を、SDS-PAGE／銀染色、抗-rmuM I F抗体を使用したウエスタンブロッティング、および質量分析によって確定した。レーザー脱離M Sにより、 M_r 12,555の単一種のタンパク質であることが証明された。マウス肝臓アセトンパウダーのM I F含量は総タンパク質の0.1%未満と評価されるので、天然肝臓M I F 50 μ g相当量を精製するために、マウス肝臓パウダー2 gを使用した。

6. 2. 4. M I Fの生化学的特性決定

肝臓マウスM I F、rmuM I F、およびrhuM I Fの M_r は、還元SDS-PAGEによる評価では、それぞれ12000と13000の間であった。マウスおよびヒトM I Fの予測されたアミノ酸配列中に2つのN-連結グリコシル化能のある部位が検出されたので、天然muM I Fが翻訳後にin vivoでグリコシル化される可能性を調べた。精製肝臓M I FのエンドグリコシダーゼF (PNGase F) による分解およびそれに続く還元SDS-PAGE／ウエスタンブロッティング分析では、測定 M_r の変化は見られず、天然肝臓M I Fの有意なN-グリコシル化がないことが示された。

GdnHCl変性組換えM I Fのゲル排除クロマトグラフィーにより、マウスおよびヒトタンパク質それぞれについて、 M_r が14,256および13,803であり、M I Fが主としてモノマーとして溶出することが示された。

M I Fのグリコシル化および他の何らかの有意な翻訳後修飾をさらに評価するため、M I Fのレーザー脱離M Sを実施した。マウス肝臓から得られた天然M I Fは M_r 12,555と測定された（予測された酸化muM I Fの MH^+ 平均質量=12,503）。比較すると、rmuM I F（3アミノ酸のN-末端リーダー配列を担持）は M_r 12,814であることがわかった（予測された酸化muM I Fの MH^+ 平均質量=12,801）。rmuM I FのイオンスプレーM Sから、近似の質量（ M_r =12,804）が得られた。レーザー脱離M Sを使用して、rhuM I Fは M_r 12,521であることがわかった（予測された酸化muM I Fの MH^+ 平均質量=12,475）。実験上と理論上予測された質量との間に見られる差異はこれらの分析における実験誤差の限界内（0.1～1%）であった。これらのデータにより、天然または組換えM I Fタンパク質の有意な翻訳後修飾の存在は否定された。

ラット肝臓から精製され、huM I FとN-末端相同性を示す12kDaタンパク質は、グルタチオン親和性マトリックスに結合すること、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）活性を示すことが報告されている（Blocki et al., 1992, Nature 360 : 269）。肝臓M I FおよびrmuM I Fのいずれもグルタチオン-修飾マトリックスに特異的に吸着されることはなかった。

6. 2. 5. 生物学的活性プロフィール

精製rmuM I Fは、ヒト末梢血単球上で試験したところ、有意な遊走阻止活性を示した（図5）。最大活性が0.1 μ g/mlにあるベル型の用量応答曲線が観察された。M I F高濃度での阻止活性の減少についての明確な根拠はわからないが、走化性サイトカインについて同様な用量応答曲線プロフィールが観察されている（Sherry et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 3511）。

マウスRAW 264.7マクロファージ細胞系によるTNF α 放出の誘導のため、組換えM I Fを使用した。0.1～10 μ g/mlの濃度で添加したrmuM I FとrhuM I Fの両方が生物学的に活性なTNF α をng/ml範囲で放出させた（表II）。種特異的差異はあるが、1 μ g/mlのrhuM I Fはマウスマクロファージ上でrmuM I Fよりもわずかに活性が強いことがわかった。同濃度（1 μ g/ml）において、マウス肝臓から得られたM I FのTNF α 誘導活性は、rmuM I Fの活性よりも高いことがわかった。しかし、0.1 μ g/mlの濃度で試験した場合、マウス肝臓M I FのTNF α 誘導活性はrmuM I Fと等しかった。チオグリコレート処理マウス腹腔マクロファージをM I F誘導TNF α -放出実験に使用したときにも同様の知見が得られた。総合的に、精製天然M I Fの活性は組換えタンパク質で見られた範囲内にあった。

表II

マウスマクロファージによるM I F誘導T N F α 分泌^a

下記成分により誘導されたT N F α (ng/ml) の分泌			
MIF (μ g/ml)	rmuMIF	rhuMIF	Native MIF
10	ND	3.9 $\pm$ 2.8	ND
1	1.2 $\pm$ 0.1	3.4 $\pm$ 2.8	6.9 $\pm$ 3.4
0.1	0.2 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 2.4	0.2 $\pm$ 0.1
0.01	0	ND	0

a 第6. 1. 6. 節に記載したように、RAW 264.7マクロファージを調製し、M I Fとともに12~14時間インキュベートした。インキュベート後、マクロファージ培養上清を除去し、T N F α 活性についてL929細胞毒性検定によって分析した。T N F α 測定は2重で実施し、T N F α 活性は、M I F刺激細胞による数値と非刺激対照細胞による数値との差異で表現する。データは少なくとも3回の別の実験の平均 $\pm$ S E Mである。ND：測定しなかったもの。

天然および組換えM I Fはマクロファージ中でNO生成物をも誘導した（表III）。しかし、M I F刺激前にマクロファージをI F N- γ とともにインキュベートした場合にのみ、有意なM I F誘導NO生成が見られた。RAW 264.7マクロファージ中、1 μ g/mlでのrhuM I Fの活性はrmuM I Fよりもおよそ4倍高いことがわかった。マウス肝臓から得られた天然M I Fもまた、この検定においてはrmuM I Fよりも活性であった。RAW 264.7において見られたものに匹敵するレベルで、muM I Fは、I F N- γ で感作し、チオグリコレートで処理した腹腔浸出マクロファージからNO生成を刺激した。しかし、このマ

クロファージ細胞タイプに対しては、1 μ g/mlの肝臓M I FはrmuM I Fよりも活性であるということはない。マクロファージによるNOの合成は $\geq$ 10ng/mlのL P Sによって誘導され、この効果はI F N- γ による感作で可能となる（Ding et al., 1988, J. Immunol. 141: 2407）。組換えM I F調製物中に存在する微量のL P SがNO生成に寄与しているという可能性を排除するため、大過剰のポリミキシンBによるL P Sの中和後にM I Fで誘導されたNOの放出を試験した。NOの生成はポリミキシンB処理によって減少せず、M I Fによるマクロファージ刺激においてL P Sが関与する可能性を否定する論拠となった。さらに別の対照試験において、中和抗-rmuM I F抗血清の添加（20 μ g/ml）は、rmuM I F（1および10 μ g/ml）で誘導されたNOの生成を阻害し、組換えM I Fによるマクロファージ刺激特異性を

さらに確定的にした。

表 III

M I F のみ、または I F N - γ との組合せにより誘導される、
マウスマクロファージにおける N O 生成^a

下記成分により誘導された亜硝酸塩 (μ M) の形成				
	MIF (μ g/ml)	rmu MIF	rhuMIF	Native MIF
- IFN- γ	10 ^a	0.2 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 2.1	ND
	1 ^a	0.5 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 1.0	0
	0.1 ^a	0.3 $\pm$ 0.3	0	0
	0.01 ^a	0	ND	0
+ IFN- γ	10 ^a	12.3 $\pm$ 2.5	25.3 $\pm$ 7.5	ND
	1 ^a	5.7 $\pm$ 1.3	20.4 $\pm$ 5.7	9.8 $\pm$ 1.3
	0.1 ^a	1.7 $\pm$ 0.7	8.4 $\pm$ 2.6	3.1 $\pm$ 1.0
	0.01 ^a	1.9 $\pm$ 1.2	ND	0.5 $\pm$ 0.2
	1 ^b	12.5	ND	3.5

a R A W 264.7マクロファージを調製し、M I F とともに12~14時間インキュベートした。インキュベート後、培養上清 300 μ L を除去し、グリース試薬 600 μ L と混合し、亜硝酸塩濃度を測定した。亜硝酸塩測定は2重で実施し、亜硝酸塩の生成はM I F 刺激細胞による数値と、非刺激または I F N - γ で処理した対照細胞による数値との差異で表現する。データは少なくとも3回の別の実験の平均 $\pm$ S E M である。N D : 測定しなかったもの。

b R A W 264.7マクロファージの代わりにM I F で刺激したチオグリコレート処理腹腔マクロファージによるN O 生成。

6. 2. 6 コンホメーション安定性及び構造安定性の分析

遠紫外線 C D は、タンパク質の溶液コンホメーションを分析し未変性の及び復元されたタンパク質構造を検証するのに広く用いられている (Greenfield & Fasman, 1969, Biochemistry 8:4108)。遠紫外線 C D スペクトロスコピー及び G d n H C l - 誘発変性研究を組換え M I F について行い、このタンパク質の溶液環境に於ける二次構造及び構造安定性の評価を開始した。検討した範囲 (1.6-32 μ M MIF) 内では、M I F の C D スペクトルの濃度依存変化は観察されなかった。r m u M I F のスペクトルは、192 nm で著しい正の楕円率を示し、209 nm と 222 nm との間で幅広い負の楕円率を示し、210 nm 及び 222 nm で小さい明瞭な極小を示した。これらのデータは、主として β - 構造より成る

が α -ヘリックスコンホメーションも含む高度に定序された二次構造のものと一致する。
 r h u M I F のスペクトルは、197 nm で明らかな正の楕円率を示し、211 nm と 225 nm との間で強い負の楕円率が観察された。この C D スペクトルも高度に定序された二次構造のものと一致するが、r m u M I F よりは β -構造の含量が高く α -ヘリックス含量が低いことを示唆するものであった。次に両方のタンパク質の二次構造組成を、Brahams & Brahams (1980, J. Mol. Biol. 138:149) の方法を用いて、190-250 nm の範囲の C D スペクトルのコンピュータ適合率 (computational fits) から推定した。この方法は、 β -構造が多いタンパク質の分析に頻々用いられる。組換え m u M I F は、42.2% の β -構造、15.3% の α -ヘリックス、7.2% の β -ターン、残りの 35.3% がランダムコイルコンホメーションと推算された。組換え h u M I F は定序構造をいくらか多く含み、72.9% の β -構造、0% の α -ヘリックス、8.3% の β -ターン、17.3% のランダムコイルコンホメーションと推算された。Chou & Fasman の方法 (1978, Adv. Enzymol. 47:45) 及び Garnier 等の方法 (1978, J. Mol. Biol. 127:97) による二次構造の計算でも、m u M I F 及び h u M I F の両者とも高度に定序された二次構造であることを予知した。Chou/Fasman の計算から、次の二次構造組成が予知された。r m u M I F : 35.6% の β -構造、10.6% の α -ヘリックス、及び 21.2% の β -ターン；r h u M I F : 26.1% の β -構造、及び 30.4% の α -ヘリックス、17.4% の β -ターン。Garnier/Osguthorpe/Robson 分析によると次の二次構造組成が予知された。r m u M I F : 39% の β -構造、8.5% の α -ヘリックス、及び 20.3% の β -ターン；r h u M I F : 24.4% の β -構造、及び 19.1% の α -ヘリックス、25.2% の β -ターン。C D データと、Chou/Fasman による計算及び Garnier/Osguthorpe/Robson による二次構造予知とから、組換えマウス M I F 及び組換えヒト M I F の両者とも β -構造コンホメーションの割合が高い (24.4% ~ 72.9%) ことを示している。スペクトロスコピーのデータ及び一次配列予知は、r m u M I F について類似の α -ヘリックス含量 (8.5% ~ 15.3%) を示した。Chou/Fasman による計算及び Garnier/Osguthorpe/Robson による計算では、h u M I F にかんがりの α -ヘリックス含量を示唆したが、C D 分析では r h u M I F 中には検知できる α -ヘリックスエレメントは示されなかった。膜-水界面に誘導されるヘリックスコンホメーションは、リガンドと膜との相互作用に重要であり且つリガンドとレセプターとの結合に影響を及ぼすものとされている (Kaiser & Kezdy, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1137; Fry et al., 1992, Biopolymers 32:649; Erne et al., 1985, Biochemistry 24:4263)。2, 2, 2-トリフルオロエタノール (T F E) は、ヘリックスをつくる傾向があるタンパク質のヘリックスコンホメーションを誘導し安定化し、ポリペプチドコンホメーションに及ぼす膜の影響をシミュレートするのに用いられている (Sonnischsen et al., 1992, Biochemistry 31:8790)。マウス M I F か又はヒト M I F かのいずれかのヘリックス含量が膜環境で増加するかどうかの試験を開始するために、50% T F E 中で r m u M I F 及び r h u M I F の遠紫外線 C D 分析を行なった。T F E は r m u M I F の α -ヘリックス含量を著しく増加した。これは 192 nm でのより大きな正の楕円率及び 208 nm と 222 nm での著しい負の楕円率から実証された。 α -ヘリックスコンホメーションの計算した含量は、T F E の存在下で 15.3% から 34.7% に増加した。組換え h u M I F は、水溶液中では測定できる α -ヘリックスエレメントは観察できなかったが、T F E の存在下で相当な α -ヘリックス含量を示した。これは、正の楕円率が 197 nm から 192 nm にシフトしたこと及び 208 nm と 222 nm に於ける明確な負の楕円率から分かった。スペクトロスコピーのデータのコンピュータ解析では、 α -ヘリックスは 0% から 36.3% に増加した。これらのデータは、マウス M I F 及びヒト M I F の両者とも、膜環境で相当 α -ヘリックスコンホメーションを有するようであることを示している。

タンパク質の構造安定性は、変性 (unfolding) の自由エネルギー ΔG_{N-U} を測定することにより定量化できる。ここで、N は天然の状態のタンパク質の割合であり、U は変性した状態のものの割合である。タンパク質の安定性を評価するのに頻繁に用いられる方法の一つは、残基当りのタンパク質の平均モル楕円率を波長及び G d n H C l 濃度の関数として

測定することである (Pace, 1975, CRC Crit. Rev. Biochem. 3:1)。G d n H C l の濃度範囲での天然タンパク質に対する変性タンパク質の百分率として (即ち、222 nm に於ける楕円率の変化) 表した変性曲線は構造安定性について二つの尺度を与える。1) 変性曲線の線形部分から求められる変性の midpoint $[G d n H C l]_{0.5}$ 、及び 2) 変性剤濃度ゼロの変性自由エネルギー ΔG°_{N-U} [これは変性曲線から線形外挿法 (linear extrapolation method: LEM) により外挿して求められる (Santoro & Bolen, 1992, Biochem. 31:4901)]。どちらの尺度とも、変性は可逆的な二態メカニズムに従い、且つ変性自由エネルギーは変性剤濃度と線形関係にあるとの前提に基づいている (Greene & Pace, 1974, J. Biol. Chem. 249:5388)。

r m u M I F の C D スペクトルを、漸増濃度 (0 ~ 7 M) の G d n H C l の存在下で 210 nm ~ 250 nm の波長間で記録した。210 nm より短くなると散乱効果が強いので記録しなかった。G d n H C l が存在しない状態で測定した M I F スペクトルは、1.5 M 以上の G d n H C l が存在すると明らかに変化し、コンホメーションの完全性が相当失われたことを示した。7 M の G d n H C l の存在下での完全に変性した M I F の単調なスペクトルは、その他の完全に変性したタンパク質について観測されるもの (Greenfield & Fasman, 1969, Biochem. 8:4108) と類似のものであった。G d n H C l 誘導変性の定量については、M I F α -ヘリックス構造の変性を、G d n H C l の漸増濃度に対して、222 nm での $[\theta]$ の相対的变化 (変性%) で表してプロットした。変性の midpoint は 1.8 M の G d n H C l であった。次に、G d n H C l の濃度 ($[G d n H C l]$) に対して ΔG_{N-U} をプロットし、LEM を適用してその外挿から ΔG°_{N-U} を求めた。曲線の線形部分のデータのポイントは次式から再プロットすることができる。

$$\Delta G_{N-U} = \Delta G^{\circ}_{N-U} - m [G d n H C l]$$

上式で、m は曲線の勾配であり、線形回帰分析によって求められたものである。マウス M I F は、このように計算して 11.75 kJ/mol の ΔG°_{N-U} であった。これに対して、球状タンパク質の ΔG°_{N-U} 値は一般に、約 50 ± 15 kJ/mol である (Pace 1990, Trends Biochem. Sci. 15:14)。

7. 実施例：M I F の生体内投与は内毒素誘導致死率を高め、抗 M I F 処置は防御を賦与する

次の実験は、当初、動物における内毒素誘導致死性の防御因子としての精製 M I F の効能の試験のために行なった。驚くべきことに、M I F の生体内投与はマウスの L P S 致死率を助長し、内毒素チャレンジへの応答を悪化させた。更に、抗 M I F 抗血清で前処置したマウスは、内毒素誘導致死性に対して有意に防御された。抗 M I F 処置は T N F α 誘導致死性に対しても防御した。

7. 1. 材料及び方法

7. 1. 1. マウス

生後 9 週 of B A L B / c マウス (体重 19 ~ 21 g) をこの研究に用いた。以下に述べる実験に各カテゴリー (即ち、L P S、L P S プラス M I F、抗 M I F、免疫前血清、食塩液処理) に全体で 20 匹のマウスを用いた。

7. 1. 2. 内毒素及び M I F での生体内処置

15 mg/kg の大腸菌 0111:B4 L P S (リポ多糖) を食塩液としてマウスに腹腔内注射した。L P S 処置の 0 及び 12 時間後に、上述の第 6 節に記載のようにして調製した M I F を食塩液として 5 mg/kg でマウスに腹腔内注射した。対照用および処置マウス群を、動物実験コロニー室で標準条件に保ち、生存をモニターした。

7. 1. 3. 抗 M I F 処置

発現ベクター内のコード配列でトランスフェクションした大腸菌から精製した 100 μ g の組換えマウス M I F でウサギを免疫化して、抗 M I F 抗血清を調製した。抗 M I F 血清及び正常ウサギ血清 (N R S) は、ウェスタンブロット分析及び L P S 特異的 E L I S A により評価して大腸菌 0111:84 L P S と交差反応性を示さなかった。

マウスを L P S チャレンジ (17.5 mg/ml の腹腔注射、この量は従来の用量範囲実験で食塩液注射の対照マウスについて $L D_{75}$ として確定した大腸菌 011:B L P S

10

20

30

40

50

の量である)の24時間及び2時間前に、抗MIF抗血清(LPS 0.2 ng/ml未満)、免疫前血清NRS(LPS 3 ng/ml未満)、又は食塩液対照で前処置した。前処置は、200 µlの血清又は対照用として200 µlの0.9% (w/v) NaClを腹腔注射して行なった。

TNFαチャレンジはトリス緩衝食塩液中の0.7 µgを18 mgのD-ガラクトサミンと共に腹腔注射して行なった。

7. 2. 結果

内毒素誘導致死性へのMIFの影響の試験は、投与した外因性組換えMIFの存在下又は不在下でチャレンジされたマウスの生存曲線を比較して行なった。簡単に述べると、各マウスに300 µgのLPSを腹腔注射した。半分のマウスに、LPSチャレンジの後0時間

10

間および12時間に更に100 µgのMIFを投与した。このような二つの実験の結果を示すプールしたデータを図6Aに掲げる。これらの実験から、MIFは試験したマウスのLPS致死率を助長したことが示される。第一に、LPS/MIF処理したマウスは、MIF投与による効果がLPSだけのマウスと較べるとLPSチャレンジ後約20時間で観察され始めたという点で死亡率が加速された。第二に、二つのカテゴリーのマウスの全体的な生存は、LPSに加えてMIFに曝されたマウスの累積死亡率が増加したことを示した。LPS/MIFマウスはLPSチャレンジ後84時間で15%しか生存しなかったのに対して、LPSのみで処置したマウスはこの時点で65%生存した。両側フィッシャー正確性検定(two-tailed Fisher's exact test)で全体を比較すると $P=0.003$ である。

20

内毒素誘導致死率およびTNFα誘導致死率に対するMIFの影響を、免疫前血清および食塩液対照で前処置したマウスと抗MIF抗血清で前処置した後にチャレンジされたマウスとの生存を比較することにより行なった。簡単に述べると、LPSかTNFαかのいずれかによるチャレンジの24時間及び2時間前に、抗MIF抗血清か、免疫前血清か、又は食塩液をマウスに腹腔注射した。

図6Bは、マウスをLPSでチャレンジした二つの実験の結果を表すプールされたデータを示す。図6Bから分かるように、抗MIF抗血清で前処置したマウスはLPS誘導致死から著しく防御され、チャレンジ後86時間の最後の記録時まで全部のマウスが生存した。これに対し、食塩液対照で前処置したマウスは25%しかLPSチャレンジ後86時間に生存せず、免疫前血清で前処置したマウスは50%しか生存しなかった。これらの結果を統計的に解析すると、帰無仮説(null hypothesis)のもとでこのような結果が生じるチャンスは、全体比較： $P<0.00001$ ； 抗MIF対食塩液： $P<0.00001$ ； 抗MIF対NRS： 0.0004 ； 及びNRS対食塩液： 0.19 である。

30

表IVは、TNFα及びガラクトサミンでマウスをチャレンジした三つの実験結果をプールしたデータを示す。LPSチャレンジの上述の実験で記録されたように、抗MIF抗血清で前処置したマウスは、TNFα誘導致死から著しく防御され、最後の記録時点まで全部のマウスが生存した。対照的に、食塩液対照で前処置したマウスの50%しかTNFαチャレンジの120時間後に生存してなく、免疫前血清で前処置したマウスの60%しか生存していなかった。これらの実験で免疫前対照血清による前処置でもたらされるメリットは、外因性γグロブリンの周知の但し小さなメリットによるもののようである。

40

表 IV

処置グループ	TNF α 及びガラクトサミン攻撃後の日数				
	1	2	3	4	5
食塩液	9/10 90%	9/10 90%	9/10 90%	5/10 50%	5/10 50%
免疫前血清	10/10 100%	10/10 100%	10/10 100%	6/10 60%	6/10 60%
抗MIF	10/10 100%	10/10 100%	10/10 100%	10/10 100%	10/10 100%

0 日目にTNF α + ガラクトサミンで処理した後に

生存する処置グループの割合

8. 実施例：外毒素投与はMIF分泌を誘導し、抗MIF処置は防御する

8. 1. 材料及び方法

8. 1. 1. 細胞調製及びMIF誘導

RAW 264.7 マウスマクロファージはAmerican Type Culture Collection (Rockville, MD) から入手した。RPMI 1640 培地 (Gibco, Grand Island, NY)、10% 熱不活性化ウシ胎児血清 (FBS) (HyClone, Logan, UT)、50 μ g/ml のカルベニシリン及びゲンタマイシン中で細胞を増殖させた。RAW 264.7 マウスマクロファージを新鮮培地で洗浄し、穏やかにかき集めて回集し、RPMI/10% FBS に再懸濁し、3.5 cm 組織培養プレート (Linbro, Flow, McLean, VA) で 3×10^6 細胞/ウェルでインキュベートした。5% CO₂ の湿潤雰囲気中で、37°C で3時間インキュベートした後、付着していない細胞を取り除き、ウェルをRPMI/1% FBS で二回洗浄した。次に、TSST-1 (100ng/ml ~ 100attog/ml の範囲の濃度で) と共に細胞を12-15時間インキュベートした。実験終了後細胞培養培地を回集し遠心分離 (800g で10分) した。細胞ならし培地を膜ろ過 (10kD カットオフ) (Centricon-10, Amicon, Beverly, NY) して10倍に濃縮した。3-4日事前に2ml の無菌チオグリコレートブrossを腹腔注射したBALB/c マウスからチオグリコレート処理の腹腔マクロファージを得た。5ml の氷冷した11.6% ショ糖溶液で腹腔を洗浄することにより、厳密な無菌状態で細胞を回集した。遠心分離 (800g で10分) の後、細胞をRPMI/10% FBS に再懸濁し、数え、 $3-4 \times 10^6$ 細胞/ウェルの密度でまいた。TSST-1 (100ng/ml ~ 100attog/ml の範囲の濃度で) と共に細胞を12-15時間インキュベートした。

マウスT細胞 (LBRM-33: Tリンパ腫細胞系) を、American Type Culture Collection (Rockville, MD) から入手した。RPMI 1640 培地 (Gibco, Grand Island, NY)、10% 熱不活性化ウシ胎児血清 (FBS) (HyClone, Logan, UT)、0.05 mM の2-メルカプトエタノール及び50 μ g/ml のゲンタマイシン中で、細胞を増殖させた。細胞を新鮮培地で洗浄し、穏やかにかき集めて回収し、再懸濁し、3.5 cm 組織培養プレート (Linbro, Flow, McLean, VA) で 1×10^6 細胞/ウェルでインキュベートした。5% CO₂ の湿潤雰囲気中で、37°C で3時間インキュベートした後、付着していない細胞を取り除き、ウェルをRPMI/1% FBS で二回洗浄した。次に、TSST-1 (100ng/ml ~ 100attog/ml の範囲の濃度で) と共に細胞を12-15時間インキュベートした。実験終了後、細胞培地を回集し遠心分離 (800g で10分) した。細胞ならし培地を膜ろ過 (10kD カットオフ) (Centricon-10, Amicon, Beverly, NY) して10倍に濃縮した。

サンプルを18% SDS ポリアクリルアミドゲルに溶解し、上述のようにしてウェスタン

10

20

30

40

50

ブロット分析を行なった。

8. 1. 2. 抗MIF処置

生後8～10週のメスのBALB/cをCharles River (Kingston, NY) から購入した。動物はケージ当たりマウス5匹又は10匹のグループにして収容し、飼料及び水は自由に摂食できるようにし、実験前5日間順応させた。BALB/cマウスに、200 μ l のポリクロナルのウサギ抗MIF血清又は正常ウサギ血清（対照）を腹腔注射し、2時間後に50 μ g のTSST-1及び20mgのD-ガラクトサミンを一緒にして致死的腹腔注射をした。7日間マウスを観察した。

8. 2. 結果

TSST-1は、マクロファージ（RAW264.7及び腹腔マクロファージの両者とも）及びT細胞によりin vitroでMIF分泌を極めて強く誘発することが分かった。TSST-1誘発MIF分泌の用量反応を検討すると、MIF分泌の二つのピークが示された。第一のピークはTSST-1が10 μ g/mlのところでは生じ、第二のピークは100 μ g/ml (= 10⁻⁴ μ g/ml) のところで生じた。抗MIF処置により死亡率は87.5%（対照）から33%に著しく減少した（P=0.05、両側フィッシャー精度検定）（図7）。

9. 実施例：MIFは寄生虫感染症の主要な炎症媒体である

9. 1. マラリア感染におけるMIF産生

マラリア感染中に、赤血球内のプラスモジウム属（Plasmodium）の形態による赤血球ヘモグロビンの異化作用により遊離したヘム分子が血管周囲細胞に特異的に重合してヘモゾインが産生され、この「マラリア色素」は感染者の細網内皮系内に蓄積する。ヘモゾインの構造は知られており、ヘム第2鉄を酢酸中で重合してヘモゾインを化学的に合成することができ、NaHCO₃緩衝液（pH9.2）及びエタノールでの連続抽出により未反応ヘムから分離することができる。上記の方法に従って調製した内毒素を含まない合成ヘモゾインを、マウス単球細胞系RAW264.7. に添加した。処置した細胞は、ウェスタンブロット法及びN末端配列分析によりMIFであることが明らかな12.5 kDaタンパク質を分泌した。従って、1nMのヘムに等量程の少量でも、ヘモゾインはin vitroでの強力なMIF誘導物質であった。さらに、ヘモゾインを10-100 U/mlでIFN- γ とともに共培養すると、MIF放出はさらに増加した。

マラリア感染におけるMIFの役割をさらに評価するために、軽度のPlasmodium bergheiによる慢性寄生虫血症（寄生赤血球10%）を発現しているC3H/HeNマウスから血液を採取した。5 μ lの血清アリコートに抗MIF抗体と反応させて、ウェスタンブロット法により分析した。この比較的低レベルの寄生虫血症のレベルは、容易に検知できる濃度の循環血清MIFを伴っていた。10%までの濃度の寄生虫血症のレベルは、28日間もの持続的なMIF産生を維持するに十分であった。

さらに、C3H/HeNマウスに内毒素を含まない合成ヘモゾインを腹腔内注射し、24時間後及び48時間後に血液を採取した。血清を分離してウェスタンブロット法によりMIFを定量し、L929細胞毒性定量法によりTNF α を定量した。本試験では循環TNF α 濃度は検知できなかった（<50 μ g/ml）が、24時間後及び48時間後にMIFは、血清中に容易に検知された。従って、低いレベルの寄生虫血症はin vivoで循環MIFと関係していた。TNF α が検知できない場合も、MIFは血清中に現れた。in vitroおよびin vivoでMIF産生を誘発するには、ヘモゾインのみで十分であることがわかった。これらの結果をまとめると、MIFはマラリア感染に対する宿主の応答において重要な初期媒体であることがわかる。さらに、この観察結果は、抗MIF療法が寄生虫に誘導されたサイトカイン放出の病理学的な結果を改善するのに効果的であることを示すものである。

10. 実施例：抗MIFは抗原特異的免疫応答を阻止する

本実施例は、抗MIF抗体が抗原特異的免疫応答の規模を実質的に低下させることができることを示す。この事は、MIFが免疫応答の重要な要素であり、従って、抗MIF療法が自己免疫及びアレルギー等の望ましくない免疫反応を実質的に低下させるうえで有用で

10

20

30

40

50

ある可能性があることを示す。

10. 1. 抗MIFは抗原特異的T細胞増殖を阻止する

1:1の比率で完全フロインドアジュバント中で乳化したRNase Aを用いて、10匹のBALB/cマウスをin vivoで感作させた。各マウスに0.2 ml中20 µgのRNase Aを腹腔内投与した。2-3週間後に、脾臓T細胞を単離してその増殖活性を測定した。マイクロタイタープレートで、1ウェル当たり 4×10^5 T細胞を 5×10^5 抗原提示細胞とともに培養した。RNase Aを加えると、 ^3H -チミジン取り込みにより測定して、in vivoで感作したT細胞の増殖が高まったが、抗MIF抗体も加えると、この増加は対照水準まで減少した。

10. 2. 抗MIFは抗原特異的炎症反応を阻止する

BALB/cマウスの左後足趾及び頸部筋に、注射当たり0.2 mlの完全フロインドアジュバントで感作した。10-14日後に、50 µlの抗MIF抗体を加えて、又は加えないで、50 µlの精製タンパク質誘導体（ツベルクリン誘導体；PPD）をマウスの右後足趾に追加免疫した。48時間後に遅延型過敏症反応の指標としてマウスの右後足肉趾の幅をカリパスで測定したところ、抗MIF処置により対照と比較して50%を上回る足趾腫脹の低下が生じたことが明らかになった。また光学顕微鏡観察による分析により、抗MIF処置したマウスの足趾炎症が低下したことを示す病理組織学的な証拠が明らかにされた。

11. 実施例：下垂体による遊走阻止因子産生

下記の実施例では、in vitro及びin vivoでの下垂体細胞によるMIF産生を説明する。

11. 1. 材料及び方法

11. 1. 1. 細胞

American Type Culture Collectionよりマウス下垂体前葉細胞系AtT-20を入手し、低血清培地で維持した。

11. 1. 2. MIFの誘発

AtT-20細胞を、種々の濃度のLPS (E.Coli LPS 0111:B4、Sigma製)を含み、血清を含まない培地（Gibco社の血清不含のJoklik培地で富化）で、0.5 µg/ml-50 µg/mlで24時間培養した。1. 5×10^5 細胞からならし培地2 mlを取り除き、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（18%）前に膜ろ過（10 Kカットオフ）によって100倍に濃縮した。ゲルの銀染色分析により、12.5 kDaタンパク質のバンドが示された。このタンパク質をポリビニリデンジフルオライド膜に移し、1次N末端アミノ酸配列を自動ガス相配列決定（Applied Biosystems）によって決定した。

11. 1. 3. ウェスタンブロット

下垂体（AtT-20）細胞からのMIF放出を、抗MIF抗体を用いたウェスタンブロット法により分析した（図8）。1. 5×10^5 脳下垂体細胞を血清を含まない培地で18時間、種々の濃度のLPSとともに培養した。移した後、ニトロセルロース膜をウサギ抗rMIF血清（1:1000に希釈）とともにインキュベートし、結合した抗原を西洋ワサビペルオキシダーゼが結合したヤギの抗ウサギ抗体で可視化した。対照として、100 ngのrMIFを同じゲルで電気泳動にかけた。対照の上清液（C）は、細胞除去後に加えたLPSを1 µg/ml含んでいた。免疫前血清は反応性を示さなかった。

11. 1. 4. 免疫細胞化学

細胞を25 µg/mlのLPS存在下（図9B）又は不在下（図9A）で16時間培養し、洗浄し、ホルムアルデヒドで固定し、免疫ペルオキシダーゼを結合したヤギ抗ウサギ抗体による染色の前に、抗rMIF血清（1:1000に希釈）と培養した。免疫前血清又はrMIFと予めインキュベーションした免疫血清で、染色は観察されなかった。

11. 1. 5. MIF mRNAの検出

2匹の代表マウスにおける脳下垂体mRNA分析を、各時間毎に示す（図10）。図に示すようにRT-PCR分析では、マウスMIFプライマー（22サイクル）、β-アクチンプライマー（25サイクル）又はCD2プライマー（脳下垂体cDNA:35サイクル、対照脾臓cDNA:25サイクル）を用いた。9週令のマウスに2.25 mg/kgの

10

20

30

40

50

LPSを腹腔内注射して、0、6、16、24、48時間後に殺した。各時間毎に合計4匹のマウスからRNAzol (Biotecx Laboratories, Inc.) を用いた抽出により、脳下垂体RNAを調製した。オリゴ-dTによる逆転写後に、DNA増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分析した。逆転写効率を評価してβ-アクチンmRNAに対して標準化した。マウスMIFプライマーは、5'-CCATGCTTATGTTCAATCGTG-3'及び3'-GA-ACAGCGGTGCAGGTAAAGTG-5'であり、マウスゲノムのDNAのサザンハイブリッド形成及び内部の制限酵素の分析により測定して、少なくとも1つのイントロンが介在する381bp配列を増幅するように設計された。マウスのイントロン介在CD2プライマーは5'-CCTGGTCTGCAGAGTTTAA-3'及び3'-TCTGTCTCTTGCAGAGACC-5'、β-アクチンプライマーは5'-GTGGGCGCTCTAGGCACCA-3'及び3'-TGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-5'であった。

11. 1. 6. ポリメラーゼ連鎖反応

273bp競合的MIF鋳型を用いて (Lira, 1991, J. Exp. Med, 174: 1259-1262) の方法に従って、LPS注射の0時間後及び24時間後に競合的PCRによりRNAを分析した (図11)。図11に示すように反応当たり0.1-5pgの競合的鋳型を加えて、上記セクション9. 1. 5. に記載したMIFプライマーによりcDNAで共増幅した。0時間後に、等量のcDNA及び競合的DNA増幅産物が0.35pgのMIF競合的鋳型を示すレーンにできる。24時間後に、等量のcDNA及び競合的DNA増幅産物が1.0pgのMIF競合的鋳型を示すレーンにできる。

11. 1. 7. インビボのMIFタンパク質発現

LPSでチャレンジしたBALB/c及びC3H/HeJマウスの脳下垂体MIFタンパク質含有量を測定した (図12)。BALB/cマウスの場合と類似した脳下垂体タンパク質含有量のLPS依存性減少が、C3H/HeN及びBALB/c^{NU/NU}マウスの両者に観察された。マウス (時点毎にN=2-5匹) に2.25mg/kgのLPSを腹腔内注射し、脳下垂体溶解物を間隔をおいて調製し、タンパク質をウェスタンブロット法により測定した。脳下垂体の1/4のアリコートで電気泳動させてニトロセルロース膜に移し、抗rMIF血清 (1:1000に希釈) とインキュベーションした。結合した抗体をホースラディッシュペルオキシダーゼを結合したヤギ抗ウサギ抗体及び基質と培養して視覚化した。

9週令のマウスに2.25mg/kgのLPSを腹腔内注射し、示した時間毎に採取した血清サンプル (各5µl) をウェスタンブロット法により分析した。MIFに対応する単一のバンドが観察され、レーザーデンシトメトリー (Shimadzu, FDU-3, CS-9000U) によって定量した。組換えMIF標準物を電気泳動させ、隣接するレーンに移した。走査インテグラル (Scanning Integral) は各膜の0時間のそれぞれのゾーンに対して標準化した相対MIF含有量として表す。プロットしたそれぞれの点は、複数のマウスの個々の血清より得られた平均値±標準平均誤差である (各時間毎にN=2-5匹)。

11. 2. 結果

マウス脳下垂体前葉細胞系AtT-20を、内毒素の量を増加させながら、その存在下で低血清培地で培養した。時間間隔をおいて、馴化培地を採取して濃縮し、分泌したタンパク質の量をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。12.5kDaタンパク質の時間特異性及び濃度依存性分泌が生じ、内毒素の刺激が観察された。上澄み乳酸デヒドロゲナーゼ活性のLPSに関連する増加は見られないことが測定されているように、分泌反応の特異性が、LPSに誘導される細胞変性の不在によって、確認された。血清を含まない条件 (0µg LPS:112.8±17.9IU/L, 50µg LPS:119.7±13.1IU/L; P=NS) で長時間インキュベーション (24時間) したにも関わらず、これらの測定値では酵素活性のLPS依存性増加は見られなかった。12.5kDaタンパク質を分離し、N末端マイクロシーケンシングを行い、ヒトMIFのマウス類似体として同定された (27アミノ酸について96%同一)。

特異的な細胞表面レセプターと相互作用するLPS結合タンパク質等の血清因子により、

L P Sによる細胞活性化が強力になることが知られている (Schumanら, 1990, Science 349:1429-1431 ;Wright et al.,1990,Science 249:1431-1433)。1 %ウシ胎児血清を培地に加えると、L P Sに刺激される脳下垂体細胞からのM I F分泌が有意に増加した。1 0 0 p g / m l と少量のL P Sによって、脳下垂体細胞のM I F分泌が誘導されることがわかった (図 8)。対照的に、炎症媒体である腫瘍壊死因子 α (1 - 1 0 0 n g / m l)、インターロイキン-1 β (1 - 1 0 0 n g / m l)、インターロイキン-6 (1 - 1 0 0 n g / m l)、又はインターフェロン- γ (1 - 1 0 0 n g / m l) とのインキュベーションでは、M I Fは放出されなかった。また、脳下垂体細胞溶解物をウェスタンブロット法により分析すると、休止期の刺激されない細胞に有意な量の前もって形成されたM I Fが含まれていることが明らかになった。免疫細胞化学的研究によりこれらの結果は確認されており、L P S刺激後1 6時間以内にかなり多量の免疫反応性細胞内M I Fが消滅することが明らかになった (図 9 A及び9 B)。

インビボの脳下垂体M I F発現を調べるために、準致死量のL P S (2 . 2 5 m g / k g) を注射したマウスにおいて、脳下垂体m R N A分析を行った。脳下垂体R N Aを経過時間毎に分離して、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) 分析を行った。脳下垂体m R N A濃度は時間の経過とともに増加し、内毒素感受性マウスでのL P Sチャレンジ後1 6 - 2 4時間で、プラトーに達した (図 1 0)。L P S刺激後に脳下垂体M I F m R N Aが3倍増加した代表的なc D N A調製物の競合的P C R分析により、この結果は確認された (図 1 1)。L P S処理後に採取した染色脳下垂体片においては浸潤単球は確認されなかったが、脳下垂体M I F m R N AにT細胞の関与の可能性を排除するために、T細胞特異性遺伝子産物であるC D 2に特異的なプライマーで、脳下垂体c D N Aを増幅した。意図的なオーバーサイクリングにも関わらず、C D 2のR T - P C R分析は一貫して陰性であり、浸潤T細胞が脳下垂体M I F m R N Aのソースである可能性は否定された (図 1 0)。遺伝学的内毒素耐性株C 3 H / H e Jでは、L P Sにより脳下垂体M I F m R N Aは誘導されなかったが、共通遺伝子性内毒素感受性C 3 H / H e Nマウスでは0時間から2 4時間後までの間に、B A L B / cマウスに観察された増加と類似した脳下垂体M I F m R N Aの増加が明らかになった。

インビボの脳下垂体M I Fタンパク質含有量を、脳下垂体溶解物のウェスタンブロット法分析により定量した。正常な刺激されていないマウスから採取した脳下垂体では、有意な量の前もって形成されたM I Fタンパク質が含まれていることが明らかになった (図 1 2)。内毒素感受性マウスではL P S注射後8 ~ 2 0時間で、脳下垂体M I F含有量の有意な減少が観察されたが、内毒素耐性マウス (C 3 H / H e J) では観察されなかった。長年の過去の研究で、M I Fはレクチンにより刺激されたT細胞の産物であると同定されている (Weiserら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7522-7526; Weiserら, 1981, J. Immunol. 126:1958-1962)。L P SはT細胞を直接的に活性化しないので、循環中に発現するM I Fは、脳下垂体細胞及び単球 / マクロファージを含むがこれに限定されない種々の細胞型のL P Sによる直接的な刺激の結果であるか、又はこれらの細胞、又は、たとえばT細胞を含むその他の細胞のL P S誘導媒体の間接的な活性化の結果であると推定される。内血毒症マウスの循環血清M I Fに種々の細胞型が関与していることをより確実に証明するために、対照B A L B / c、及びT細胞欠損B A L B / c^{NU/NU}マウスにL P Sを腹腔内注射して、血清サンプルをゲル電気泳動及びウェスタンブロット法により分析し、血清M I F濃度をレーザーデンストメトリーにより定量した (図 1 3)。野生型マウス (B A L B / c) において2時間後に血清M I Fが検知され、2 0時間にわたり時間依存的に増加した。対照的に、T細胞欠損 (ヌード) マウスは血清M I Fの発現において有意な遅延型反応を示した。M I F濃度は、L P S抗原誘発の8時間後に有意に増加するに留まった。

これらの知見によると、内血毒症の急性期後 (8時間以上経過後) に検知される循環血清M I Fに、脳下垂体M I Fは直接的に関与している。脳下垂体M I Fタンパク質の消滅、及びインビボで観察された脳下垂体m R N A濃度の誘導 (図 1 0及び1 1) に、この時間経過は一致するものである。ヌードマウスにおいて得られた結果によると、T細胞M I F

10

20

30

40

50

は主に、最初の8時間に発現する血清MIFに關与している。内毒素耐性C3H/HeJマウスへのLPS投与(2.25mg/kg)により、検知可能な血清MIFは產生されなかった。

12. 実施例：マクロファージによる遊走阻止因子の生産

12.1. 材料および方法

12.1.1. 試薬

大腸菌0111:B4 LPS、ポリミキシンB、カルベニシリン、PMSFおよびTween-20はSigma社(St. Louis, MO)から入手した。LPSは発熱物質を含まない水に再懸濁し、ボルテックス混合し、音波処理を行い、アリコート(5mg/ml)に分けて-20℃で保存した。LPSの連続希釈物は音波処理(Branson 3210, Danbury, CT)により発熱物質不含の水で調製した。ゲンタマイシンはGibco社(Grand Island, NY)から入手した。チオグリコレートブロス(Difco, Detroit, MI)は製造会社の説明書にしたがって調製し、オートクレーブ滅菌し、光線を遮断して室温で保存した。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ抗体はPierce社(Rockford, IL)から購入し、西洋ワサビペルオキシダーゼの安定化3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)基質および4-クロロ-1-ナフトールはPromega社(Madison, WI)から購入した。ポリクローナル抗MIF血清は、精製した組換えマウスMIFを用いてニュージーランド白ウサギ(Hare Marland, Hewitt, NJ)を免疫することにより調製した。1週および2週目に、完全フロインドアジュバントで希釈したrMIF 100μgをウサギの皮内に接種し、4週目に不完全フロインドアジュバントで希釈したrMIF 50μgを接種した。最後の接種の1週間後に免疫血清を採取した。

12.1.2. サイトカイン

組換えマウスMIF(rMIF)は大腸菌BL21/DE3(Novagen, Madison, WI)に発現させ、アニオン交換(Mono Q; Pharmacia, Piscataway, NJ)と逆相クロマトグラフィー(C8-SepPak, Millipore, Milford, MA)により均質になるまで精製し、凍結乾燥し、実施例6の手順にしたがってリン酸ナトリウムバッファー(20mM, pH7.2)中に再調製した。MIFの生物活性は、マクロファージによるリーシュマニア・メジャー(Leishmania major)死滅の用量依存的MIF誘導増強を測定し、この活性を抗MIF抗体で中和することにより決定した。rMIFは色素産生リムルス(Limulus)変形細胞アッセイ(Bio-Whittaker Inc., Walkersville, MD)で測定したときタンパク質1μgあたり9pgの内毒素を含んでいた。組換えマウスIL-1βおよびIL-6(再調製後5μg/ml)はR&D社(Minneapolis, MN)から入手し、組換えマウスIFNγ(10⁵IU/ml)はBoehringer-Mannheim(Indianapolis, IN)から入手した。サイトカインは0.1%の非常に低濃度の内毒素BSA(Miles Inc., Kankakee, IL)を含む発熱物質不含の水中に再調製し、-80℃で保存した。再調製サイトカインの内毒素含量は、色素産生リムルス変形細胞アッセイで測定したとき、0.5ng/μg TNFα、2ng/μg IL-1β、1.1ng/μg IL-6および0.06pg/unit IFNγであった。

12.1.3. 動物および実験設計

8~10週齢(19~21g)の雌BALB/c(対照)、T細胞欠損BALB/c^{nu/nu}(ヌード)および下垂体切除BALB/cマウスはCharles River(Kingston, NY)から購入した。餌と水(下垂体切除マウスには5%グルコースを補給した)に自由に近づくケージに1群5匹または10匹のマウスを入れ、実験に先立って5日間順応させた。マウスに非致死量のLPS(BALB/cとT細胞欠損マウスには2.25mg/kg、下垂体切除マウスには50μg/kg)を腹腔内に注射し、LPSチャレンジの2、8および20時間後犠牲にして血清を採取した。LPSの用量は、内毒素に過敏な下垂体切除マウスに匹敵する程度の致死率を対照のBALB/c群に与えるように調整した。5μlの血清をウェスタンブロットで分析し、抗MIF抗体で視覚化した。

12.1.4. 細胞

RAW 264.7マウスマクロファージ、THP-1ヒト単球、ASL-1マウスおよびジャーカットヒトTリンパ球細胞系はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(Rockvi

10

20

30

40

50

lle, MD) から入手した。細胞は 2 mM グルタミン、10 % 熱不活性化ウシ胎児血清 (FBS) (HyClone, Logan, UT)、50 μ g/ml のカルベニシリンおよびゲンタマイシンを含む RPMI 1640 培地 (Gibco, Grand Island, NY) で増殖させた。ASL-1 細胞用の培地にはさらに 1 mM ピルビン酸ナトリウムを補給した。チオグリコレート誘発腹腔内マクロファージは、2 ml の無菌チオグリコレートブロスと 3 ~ 4 日前に腹腔内注射した BALB/c マウスから得られた。5 ml の氷冷 11.6 % ショ糖溶液で腹腔を洗浄することにより厳重な無菌条件下で細胞を収穫した。遠心分離 (800 g で 10 分) 後、細胞を RPMI / 10 % FBS 中に再懸濁し、計数し、 2×10^6 または 4×10^6 細胞/ウェルの密度でまいた。密度勾配遠心により末梢血からヒト多形核白血球を単離した (Vadas ら, J. Immunol. 122: 1228; Sherry ら, 1981, In: Methods for Studying Mononuclear Phagocytes, Academic Press, NY, p. 187)。

10

12.1.5. マクロファージおよび T リンパ球溶解産物の MIF 含量

それぞれのタイプの 1×10^6 細胞のアリコートと、1 % NP-40、0.5 % デオキシコール酸、0.1 % SDS および 2 mM EDTA を含むトリス緩衝化食塩水 (50 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, pH7.5) で溶解した。細胞破片をペレット化し、上清を等量の還元 SDS-PAGE サンプルバッファーで希釈した。10 μ l の溶解産物 (5×10^3 細胞に等しい) を 18 % ポリアクリルアミドゲルで電気泳動にかけ、ポリクローナルウサギ抗 MIF 血清を用いるウェスタンブロット分析のためにニトロセルロース膜に移行させた。

12.1.6. LPS および サイトカインによるマクロファージの刺激

RAW 264.7 マクロファージを新鮮な培地で洗い、やさしくこすり取って収穫し、3.5 cm 組織培養プレート (Linbro[▲]_R[▼], Flow, McLean, VA) において 2×10^6 または 4×10^6 細胞/ウェルでインキュベートした。5 % CO₂ の湿潤雰囲気下 37 °C で 3 時間インキュベーション後、非付着細胞を分離し、ウェルを RPMI / 1 % FBS で 2 回洗った。次に、細胞を RPMI / 1 % FBS で希釈したサイトカイン (TNF α 、IL-1 β および IL-6 については 1 または 10 ng/ml、IFN γ については 10、100 または 1000 IU/ml) または LPS (1 pg/ml から 1 μ g/ml までの範囲の濃度) とともに 12 時間インキュベートした。時間経過実験の場合は、LPS 刺激後 3、6、9、12 および 15 時間おきに並行培養物の馴化培地を取り出した。チオグリコレート誘発腹腔内マクロファージ (10^7 細胞/ウェル) を上記のように収穫し、RAW 264.7 細胞と同様に調製した。細胞を LPS または IFN γ + LPS とともに 12 時間インキュベートした。IFN γ と LPS で共刺激する場合は、初めに細胞を IFN γ (100 IU/ml) と 1 時間インキュベートし、その後に表示した濃度で LPS を加えた。各実験の終了時に、培地を集め、遠心し (800 g で 10 分)、PMSF (1 mM) を補給した。続いて、上清を膜濾過 (10 kDa カットオフ) (Centricon-10, Amicon, Beverly, NY) により 10 倍に濃縮した。細胞 RNA は付着細胞から抽出した。

20

30

12.1.7. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

全細胞 RNA を、RNAzol-B (Tel-Test Inc., Friendswood, TX) を用いて製造会社のプロトコールにしたがってマクロファージから抽出した。1 μ g の RNA を 50 μ l の反応容量でオリゴ (dT)₁₂₋₁₈ および M-MLV 逆転写酵素 (Gibco, Grand Island, NY) を使って逆転写した。5 μ l の cDNA を、Perkin-Elmer/Cetus 9600 サーマルサイクラーでマウス MIF プライマー (32 サイクル)、TNF α プライマー (22 サイクル) または β -アクチンプライマー (25 サイクル) を用いて PCR (94 °C で 1 分の変性、55 °C で 1 分のアニーリング、72 °C で 1 分の伸長) により増幅させた。イントロンにかかる TNF α プライマーは、5' - GCGGAGTCCGGGCAGGTCCTA - 3' および 3' - GGGGGGCTGGCTCTGTGAGG - 5' であった。DNA 増幅産物を 2 % アガロースゲルで分析し、ゲル負荷を β -アクチンの PCR 産物に基準化させた。LPS 刺激 RAW 264.7 マクロファージからの MIF mRNA の定量は競合的 PCR により行った (Gilliland ら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2275)。273 bp の競合 cDNA 鋳型を表示濃度で加え、MIF プライマーを用いて MIF cDNA とともに共増幅させた。

40

50

12.1.8. ウェスタンブロット

ウェスタンブロットのために、サンプルを18%SDSポリアクリルアミドゲルで還元条件下に分離し、ニトロセルロース膜 (Schleicher and Schuell, Keene, NH) に50V、150mAで16時間移行させた。膜を、5%脱脂粉乳および0.05%Tween-20を含む500mM NaCl、50mM Tris-Base、pH7.5バッファーでブロックし、初めにポリクローナルウサギ抗rMIF血清と、次に西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgG抗体 (それぞれ1%BSAおよび0.05%Tween-20を含む500mM NaCl、50mM Tris-Base、pH7.5バッファーで1:1000に希釈した) とインキュベートした。ポリクローナルウサギ抗マウスMIF血清は、天然および組換えのマウスおよびヒトMIFと反応することが実証された。インキュベーションはそれぞれ1時間行った。MIFをクロロナフトール/H₂O₂またはTMB基質で発色させて視覚化した。血清MIFバンドはレーザーデンスitrometry (Shimadzu FDU-3, CS-9000U, Braintree, MA) で定量した。LPS投与前 (0h) のほとんどの血清に、かすかなデンスitrometry クシグナルがMIF領域に検出された。それゆえ、スキャニングインテグラル (scanning integral) は各膜上の0hゾーン (すなわち、バックグラウンドまたは基底線染色) に基準化された相対血清MIF含量 (すなわち、倍増加) として表される。プロットされた各点は2~5匹のマウスから得られた個々の血清の平均±SEMである。

10

12.1.9. マクロファージによるTNFαのMIF誘導分泌

細胞 (4×10⁶/ウェル) を上記のように処理し、100pg/mlから1μg/mlまでの特定濃度のrMIFで12時間刺激した。1μg/mlのrMIFでは、LPS汚染はリムルスアッセイで検定して9pg/mlであった。この微量のLPSを中和するために、rMIFをポリミキシンB (1μg/ml) とともに37℃で1時間プレインキュベートした。細胞培養上清中のMIF誘導TNFα活性はL929細胞の細胞毒性により測定した (Wolpeら, 1988, J. Exp. Med. 167: 570)。MIF誘導TNFα活性は抗TNFα抗体により完全にブロックされた。組換えマウスTNFα (用量範囲: 5pg/ml~1μg/ml) の細胞毒性はrMIF (10pg/ml~10μg/ml) または抗MIFポリクローナル血清をrTNFαとともにL929細胞に加えたとき未変化のままであったので、rMIFはTNFα活性に寄与しなかった。

20

12.2. 結果

12.2.1. LPS注入マウスにおける血清MIFレベル

30

下垂体MIFは内毒素血症の血清中に見られるMIFに有意に寄与している。血清MIFは正常マウスでは20時間でピークレベルに達したが、下垂体切除マウスではこの時期に検出できず、このことは下垂体がLPS注入後に血清中に現れるMIFの主要な供給源であることを示している。

内毒素ショックにおいてMIFが果たす中心的役割は、LPSに対する下垂体切除マウスの過敏症が知られている事実と結びついて、内毒素血症ショックの急性期 (すなわち、2~8時間) に循環系に出現するMIFの速度論をより綿密に検討する実験へと導いた。比較のために、血清MIF速度論はMIFのT細胞供給源を欠くヌードマウスにおいても試験した。対照マウス、下垂体切除マウスおよびヌードマウスにLPSを注入し、血清を間隔をおいて調製し、ウェスタンブロットとレーザー走査デンスitrometryでMIF含量を測定した (図14)。対照マウスでは血清MIF濃度が20時間にわたって次第に増加したが、下垂体切除マウスはLPS注入の2時間後にピークに達した急激な上昇を示した後でMIFの急速な低下を示した。ヌードマウスでは、血清MIFの上昇が8~12時間遅れたが、対照マウスと類似した方法で増加した。下垂体切除マウスにはMIFの下垂体供給源が無いことを考慮すれば、循環系に2時間で出現するMIFは別のLPS感受性細胞集団によるMIFの放出を反映していた。このような血清MIF速度論はマクロファージのTNFα応答を想起させ (Beutlerら, 1985, J. Exp. Med. 161: 984; Beutlerら, 1985, J. Immunol. 135: 3972; Michieら, 1988, N. Eng. J. Med. 318: 1481)、かくして、MIFは単球/マクロファージ系統の細胞によって産生されるという可能性が検討された。

40

50

12.2.2. 休止マクロファージにおけるM I Fの発現

下垂体細胞系 (A t T - 2 0) と生体内の全下垂体はどちらもかなりの量の前生成M I Fを含んでいるので、各種の炎症性細胞および細胞系の細胞内M I F含量を分析した。休止している非刺激マウスRAW 264.7細胞、マウス腹腔内マクロファージおよびヒトT H P - 1単球から得られた細胞溶解産物には多量の前生成M I Fタンパク質が存在することが分かった (図15)。マクロファージあたり平均0.1~1 p gの免疫反応性の前生成M I Fタンパク質が存在すると見積もられた。マウスまたはヒト単球/マクロファージのM I F含量は2つのT細胞系、つまりヒトジャーカット (Jurkat) とマウスA S L - 1のそれと似ていた。対照的に、精製した多形核白血球 (PMN) から得られた細胞溶解産物は検出可能なM I Fタンパク質を全く示さなかった (図15)。

10

12.2.3. L P S刺激マクロファージによるM I Fの分泌

M I FはL P S刺激後にマクロファージによって培地中に分泌されることが観察された。RAW 264.7マクロファージでは、M I F分泌が10 p g / m lほどの少量のL P Sで誘導され、1 n g / m lで最大となり、1 μ g / m lより高いL P S濃度では検出できなかった (図16A)。誘発された腹腔内マクロファージでは、M I F分泌を引き出すのに1 n g / m lのL P Sを必要とし、10~100 n g / m lのL P Sで最大応答が観察された (図16B)。驚いたことに、I F N γ (100 I U / m l、L P Sより1時間前に投与) とL P Sの共刺激はL P S応答性の>1000倍増加をもたらした (図16C)。

次に、本発明者らは、1 n g / m lのL P Sで最大に刺激したRAW 264.7マクロファージの並行培養物においてM I F分泌の時間経過を観察した。ウェスタンブロットで評価したところ、L P S刺激の6~9時間後にM I Fが最初に検出された。L P S刺激の9~12時間後の培地中にM I Fの最大量が現れた。その後M I Fレベルは低下し、M I Fがマクロファージによる合成/放出速度を越える速度で除去または分解されることを示している。

20

12.2.4. L P S刺激マクロファージによるM I F m R N Aの発現

L P S刺激RAW 264.7マクロファージによるM I F m R N Aの発現を逆転写酵素とポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) により調べた。並行培養物を培地または漸増量のL P Sとともに12時間インキュベートし、M I F、T N F αおよびβ - アクチンの発現について分析した。M I F m R N Aは非刺激マウスRAW 264.7細胞 (図17) および誘発された腹腔内マクロファージにおいて構成的に発現された。予期されたように、T N F α m R N Aの発現はL P S濃度の範囲 (1 p g / m l ~ 1 μ g / m l) で増加した。これに対して、M I F m R N Aのレベルはこの用量範囲のL P S濃度と逆の相関を有していた。M I F m R N Aレベルは1 p g / m lのL P Sで誘発された細胞において最高になり、1 μ g / m lのL P Sで誘発された細胞で最低となった。

30

M I F m R N Aの誘導をより定量的に評価するために、対照およびRAW 264.7マクロファージのL P S刺激培養物からc D N Aを調製し、競合的P C Rにより分析した。等しいレベルのM I Fおよび競合D N A増幅産物を得るのに要した競合鋳型の量は、非刺激 (対照) マクロファージでは1.5 p gであり、L P S誘導 (100 p g / m l) RAW 264.7マクロファージでは3 p gであった (図18)。それゆえ、マクロファージM I F m R N AはL P S誘導後に約2倍増加し、この増加はin vivoで下垂体細胞において観察されたものの (45 μ gのL P Sをi p注射して誘導した後に3倍) に匹敵する。M I F m R N A誘導の時間経過は1 n g / m lのL P S (これらの細胞において最大M I F分泌を誘導したL P S濃度) とともにインキュベートしたRAW 264.7マクロファージを用いて調べた。M I F m R N AレベルはL P S誘導の6時間後に増加し、L P S誘導後12時間まで上昇したままだった。

40

12.2.5. M I Fと前炎症サイトカインとの相互作用

実験的内毒素血症でのM I Fの重要な役割が発見され、さらにL P S投与後の血中M I Fレベルの上昇が見いだされたために、M I Fと他の前炎症サイトカインとの相互作用を研究した。RAW 264.7マクロファージによるM I Fの放出を、組換えマウスT N F α、I L - 1 β、I L - 6またはI F N γによる刺激後に調べた。ウェスタンブロットにより、T

50

TNF α とIFN γ は用量依存的にMIF分泌を誘導することが分かった(図19)。これらの実験条件下で有効であったサイトカインの最低濃度は1 ng/mlのTNF α および10 IU/mlのIFN γ であった。TNF α とIFN γ の結果は、組換えサイトカイン調製物のLPS汚染(0.5 pg/ng TNF α および60 fg/unit IFN γ であることが明らかになった)に起因するものではない。LPSとIFN γ はMIF分泌に対して相加/相乗効果を有し、一方、TNF α およびIL-1 β はそうではなかった。最後に、MIF産生は1または10 ng/mlのIL-1 β またはIL-6のいずれによっても誘導されなかった。

RAW 264.7マクロファージによるTNF α およびIL-1 β の分泌はrMIFで刺激したあとに調べた。MIFサンプルを1 μ g/mlのポリミキシンBと1時間プレインキュベートして少量の汚染LPS(色素産生リムルスアッセイにより9 pg/ μ g MIF)を中和した。100 ng/ml以上の濃度のrMIFは、L929細胞毒性アッセイで測定したとき、生物活性TNF α の分泌を誘導することが見いだされた(図20)。MIF誘導TNF α 生物活性は抗TNF α 抗体により完全にブロックされ、rMIFはTNF α の細胞毒性に寄与しなかった。なぜならば、組換えマウスTNF α の細胞毒性は、rMIFまたは抗MIFポリクローナル血清をrTNF α とともにL929細胞に加えたとき、変化しなかったからである。IL-1 β の分泌は、対照的に、試験したrMIFの濃度範囲でウェスタンブロットにより検出できなかった。

13. 実施例：ステロイドはマクロファージによるMIF分泌を誘導する

13.1. 材料および方法

13.1.1. 細胞調製およびMIF誘導

RAW 264.7マウスマクロファージはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(Rockville, MD)から入手した。細胞はRPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY)、10%熱不活性化ウシ胎児血清(FBS) (HyClone, Logan, UT)、50 μ g/mlのカルベニシリンおよびゲンタマイシン中で増殖させた。RAW 264.7マクロファージを新鮮な培地で洗い、やさしくこすり取って収穫し、3.5 cm組織培養プレート(Linbro^{▲R▼}, Flow, McLean, VA)において3 $\times$ 10⁶細胞/ウェルでインキュベートした。5%CO₂の湿潤雰囲気下37℃で3時間インキュベーション後、非付着細胞を分離し、ウェルをRPMI/1%FBSで2回洗った。MIF放出の抑制を調べるために設計されたいくつかの実験では、その後培地に被験化合物を添加した。例えば、細胞を最終濃度10⁻⁶Mの20 α -ジヒドロコルチゾルで予備処理した。次いで、細胞を10⁻⁶Mから10⁻¹⁴Mの濃度範囲の各種ステロイド(例：デキサメタゾン)と、もしあれば、所望の被験化合物(例：20 α -ジヒドロコルチゾル)とともに12~15時間インキュベートした。実験の終わりに、培地を集めて遠心分離した(800 gで10分)。細胞馴化培地を膜濾過(10 kDaカットオフ)(Centricon-10, Amicon, Beverly, NY)により10倍に濃縮した。

チオグリコレート誘発腹腔内マクロファージは、2 mlの無菌チオグリコレートブロスを3~4日前に腹腔内注射したBALB/cマウスから得られた。5 mlの氷冷11.6%ショ糖溶液で腹腔を洗浄することにより厳重な無菌条件下で細胞を収穫した。遠心分離(800 gで10分)後、細胞をRPMI/10%FBS中に再懸濁し、計数し、3~4 $\times$ 10⁶細胞/ウェルの密度でまいた。細胞を種々のステロイド(10⁻⁶Mから10⁻¹⁴Mの濃度範囲)とともに12~15時間インキュベートした。

サンプルを18%SDSポリアクリルアミドゲルで還元条件下に分離し、ニトロセルロース膜(Schleicher and Schuell, Keene, NH)に50 V、150 mAで16時間移行させた。膜を、5%脱脂粉乳および0.05% Tween-20を含む500 mM NaCl、50 mM Tris-Base、pH 7.5バッファーでブロックし、初めにポリクローナル抗rMIF血清と、次に西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgG抗体(それぞれ1%BSAを含む500 mM NaCl、50 mM Tris-Base、pH 7.5バッファーで1:1000に希釈した)とインキュベートした。ポリクローナルウサギ抗マウスMIF血清は、天然および組換えのマウスおよびヒトMIFと反応することが実証された。インキュベーションはそれぞれ1時間行った。MIFをクロロナフトール/H₂O₂またはTMB基質

10

20

30

40

50

で発色させて視覚化した。

13.1.2. ステロイドの注入

カニューレ挿入Sprague-Dawley雌ラットをZivic-Millerから購入した。動物を餌と水に自由に近づけるケージに入れ、実験に先立って少なくとも2日間順応させた。ラットに頸静脈からデキサメタゾン（1、10または20 mg/kg）、またはRU38486（ミフェプリストン：mifepristone）（1または10 mg/kg）、または両方の薬剤（両方とも10 mg/kg、RU38486をデキサメタゾン注入の15分前に注入した）を注入した。ステロイド注入の3、6および9時間後に血清を採取し、抗MIF抗体を用いてウェスタンブロットにより分析した。

13.2. 結果

MIFは、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾル、5 β -pregnen-3 α , 11 β , 17 α , 21-tetrol-20-one（テトラヒドロコルチゾル）、4-pregnen-11 β , 17 α , 20 α , 21-tetrol-3-one（20 α -ジヒドロコルチゾル）、RU38486（ミフェプリストン）、アルドステロン、テストステロンおよびプロゲステロンで刺激した後のマウスマクロファージ（RAW 264.7マクロファージおよび/または誘発された腹腔内マクロファージ）により分泌されることが観察された（表V）。さらに、10 mg/kgのデキサメタゾン、10 mg/kgのRU38486または両薬剤の併用はin vivoでMIF分泌を誘導した。血清MIFはステロイド注入の3～6時間後に検出された。

図21に示すように、20 α -ジヒドロコルチゾルの予備処理および共投与はデキサメタゾンに対するMIF応答を弱めるか、または消滅させる。

10

20

表V. ステロイドはマウスマクロファージによるM I F分泌を誘導する

ステロイド	M I Fを誘導するステロイド濃度 (M) の範囲	
	RAW 264.7 マクロファージ	腹腔内マクロファージ
デキサメタゾン	$10^{-8} \sim 10^{-14}$	$10^{-8} \sim 10^{-12}$
ヒドロコルチゾン	$10^{-8} \sim 10^{-12}$	$10^{-8} \sim 10^{-16}$
5 β -プレグナン -3 α ,11 β ,17 α ,21- テトラオール-20-オン (テトラヒドロコルチゾル)	$10^{-8} \sim 10^{-14}$	試験せず
4-プレグネン -11 β ,17 α ,20 α ,21-テトラオール-オン (20 α dihydrocortisol)*	$10^{-10} \sim 10^{-14}$	$10^{-10} \sim 10^{-14}$
アルドステロン	$10^{-10} \sim 10^{-14}$	$10^{-8} \sim 10^{-14}$
テストステロン	$10^{-6} \sim 10^{-14}$	$10^{-8} \sim 10^{-14}$
RU-38486 (ミフェプリストン)*	$10^{-8} \sim 10^{-14}$	試験せず
プロゲステロン	$10^{-4} \sim 10^{-12}$	試験せず

* より高い濃度において、これらのステロイドはチャレンジ量（すなわち、通常はM I F放出を誘導する用量）のデキサメタゾンに比べてマクロファージによるM I F放出を抑制する。

14. 実施例： M I FおよびM I Fレセプターの臓器分布

以下の実施例では、マウスにおけるM I FおよびM I Fレセプターの臓器分布を記述する。

14.1. 材料および方法

14.1.1. 外因性M I Fの標識化

5 μ l の ^{125} I-M I F（比活性 2×10^4 c p m / n g）を5 μ l の ^{51} C r 標識した赤血球（RBC）とともに合計300 μ l の食塩水で静脈内に注入した。1つの調製物は競合物質として40 μ g の非標識M I Fをさらに含んでいた。注入10分前に、各マウスに10 m g のヨウ化ナトリウムを腹腔内投与した。注入10分後にマウスを犠牲にした。

10

20

30

40

50

14.1.2. 組織の調製

犠牲にした直後に各マウスから400 μ lの血液を採取した。さらに、各種の臓器を摘出し、PBSで洗い、濾紙にのせて乾かした。臓器の重さを量り、ガンマカウンターを使って2つの別個の窓（1つは ^{125} I用で、もう1つは ^{51} Cr用）で放射能を測定した。死体の残部についても重さを量り、カウントした。

14.1.3. 内因性MIFの臓器分布

CO₂窒息により犠牲にし、無菌条件下で検死した8～10週齢の雌BALB/cマウスを使ってMIFタンパク質の臓器分布を調べた。臓器（脳、肝臓、脾臓、腎臓、副腎および肺）を切除し、切開し、そして1%NP-40、0.5%デオキシコール酸、0.1%SDS、2mMEDTAおよび1mMPMSFを含むトリス緩衝化食塩水（50mM Tris-Base, 150mM NaCl, pH7.5）で4℃でホモジナイズした。細胞破片をペレット化し、臓器溶解産物上清のアリコート（タンパク質濃度を調整した）を等量の還元SDS-PAGEサンプルバッファーで希釈した。サンプル（60 μ gのタンパク質に等しい）を18%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動にかけ、ポリクローナル抗MIF血清を用いるウェスタンブロット分析のためにニトロセルロース膜に移行させた。

14.2. 結果

内因性MIFタンパク質の臓器分布を正常なマウスで調べた。マウス組織をホモジナイズし、総タンパク質のアリコートを電気泳動にかけてウェスタンブロットにより分析した。図22に示すように、前生成MIFはマウスの肝臓、脾臓、腎臓および脳において検出することができた。極少量が副腎と肺にも見られた。これらの臓器は相当量のマクロファージを含んでおり、こうした組織に存在するMIFタンパク質は少なくとも部分的にマクロファージと関連があることを示唆している。

MIFレセプターの組織分布を調べるために ^{125} I-MIFをマウスに注入した。放射性標識MIFの組織特異的局在化の指数は、Beutlerら, 1985, J. Immunol. 135: 3972に記載されるようにして求めた。表VIに示すように、試験した臓器のうち、MIF結合の特に高いレベルが腎臓と肝臓において観察された。

表 VI

放射性標識MIFの	
臓器	組織特異的局在化の指数
肝臓	256
腎臓	2334
肺	52
副腎	47
脾臓	78
小腸	247
大腸	122
脳	17
皮膚	103

15. 実施例： MIFレセプターの同定

この実施例では、MIFに結合するレセプタータンパク質を同定し、これらMIFレセプ

ターのそれぞれの部分アミノ酸配列を提示する。

15.1. 材料および方法

15.1.1. 細胞溶解産物の調製

マウスRAW 264.7細胞（単球様の細胞系）の2つの大きな組織培養プレート（ 5×10^7 細胞）を2.5 mlの溶解バッファー（50mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, プロテアーゼ阻害剤を含む）を添加して可溶化した。プレートを氷上で穏やかに回転しながらインキュベートした。その後プレートをこすって内容物を集め、4本の微量遠心機（1.5 ml）チューブに入れ、10,000×g、4℃で10分遠心した。上清を回収し、氷上で保存した。

15.1.2. アフィニティークロマトグラフィー

MIF結合アフィニティークラムの調製のため、まず、1gのCNBr-セファロースを1mMのHClで洗った。細菌の組換えマウスMIF（3mg）を40%アセトニトリル/H₂Oに溶かした。次に、MIF溶液を活性化CNBr-セファロースと混合し、室温で3時間インキュベートした。未反応のCNBr-セファロースは0.2MグリシンpH8.0とともに一夜インキュベートしてクエンチした。カップリング前後のMIF溶液の吸光度を比較してカップリング効率を測定したところ、85%であった。その後樹脂を洗い、カラムに注入し、溶解バッファーで平衡化させた。

溶解したRAW細胞調製物の上清をMIF-セファロースに2ml/hrの流速で負荷し、続いて3カラム容量の溶解バッファーで洗った。残っている結合タンパク質は5倍容量の0.1MグリシンpH2.5中の0.05% Triton X-100を用いて溶出した。画分を集め、90μlの1M Tris baseで緩衝化した。

15.1.3. ゲル電気泳動

対象のタンパク質種を含む画分をCentricon-10メンブランに対して濃縮し、等容量の2×Laemmliサンプルバッファー中に再懸濁し、7.5% SDS-PAGEゲル上で電気泳動にかけた。10mM CAPS pH11/20%メタノール移行バッファーを用いてタンパク質をPVDFフィルターに移行させた。このフィルターをPonceau-Sで染色し、分子量52kDおよび72kDに対応するタンパク質バンドを確認し、切り出した。

15.1.4. マイクロシーケンシング分析

切り出したタンパク質バンドは自動気相シーケンシング法（Applied Biosystems）を使ってマイクロシーケンシング分析に付した。

15.2. 結果

第13.1.2節で上述したように、MIFアフィニティークラムでのRAW細胞溶解産物のMIFアフィニティークロマトグラフィーにより想定上のMIFレセプタータンパク質を単離した。

SDS-PAGEで分析したところ、3画分（6、7、8）が2種類のタンパク質（52kDおよび72kD）を含んでいることが分かった。膜への移行を行って、¹²⁵I標識MIFとインキュベートしたとき、52kDと72kDの両バンドが放射性標識MIFと結合することが実証された。リガンド結合は膜と過剰の非標識MIFとの同時インキュベーションにより阻害され、その結果、結合はMIF特異的であることが判明した。

52kD種からのタンパク質を単離し、アミノ酸マイクロシーケンシングに付した。この52kDの想定上のMIFレセプターから、ここに示すような部分アミノ酸配列が得られた。

Ile-X-His-Asn-Thr-Val-Ala-Thr-Glu-Ile- (Ser) - (Gly) -Tyr-Asn- (Asn/Gly) - (Ala) - (Met)

かっこ内の残基は不確かな表示である。

同様に、72kD種からのタンパク質を単離し、シーケンシングに付した。部分アミノ酸配列が決定され、ここにそれを示す。

Ala-Lys-Lys-Gly-Ala-Val-Gly-Gly-Ile

本発明は、本発明の一面を例示するものである実施例によってその範囲を制限されるものではない。実際、ここに記載したものに加えて本発明のさまざまな変更が上記の説明およ

10

20

30

40

50

び添付の図面から当業者には明らかとなろう。かかる変更も請求の範囲に含まれるものとする。

ここに引用した刊行物はすべてそのまま参考として組み入れられる。

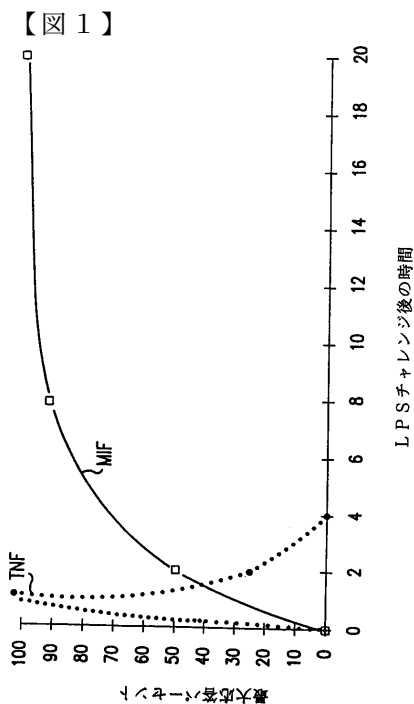


FIG.1

【図 2】

	10	20	30	40	50	60
mmif	ATGCCTATGTTTCATCGTGAACACCAATG	ITCCCCGCGCCTCCGTGCCAGAGGGTTTCTG				
>hmif.	ATGCCGATGTTTCATCGTAAACACCAACGT	TGCCCGCGCCTCCGTGCCAGAGGGTTTCTC				
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
mmif	ICGGAGCTCACCCAGCAGCTGGCGCAGGCCACCGCAAGCCCGCACAGTACATCGCAGTG					
>hmif.	TCGGAGCTCACCCAGCAGCTGGCGCAGGCCACCGCAAGCCCGCACAGTACATCGCAGTG					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
mmif	CACGTGGTCCCGGACCAGCTCATGACTTTTACCGGCACGAACGATCCCTGCCGCCCTCTGC					
>hmif.	CACGTGGTCCCGGACCAGCTCATGACTTTTACCGGCACGAACGATCCCTGCCGCCCTCTGC					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
mmif	AGCCTGCACAGCATCGGCAAGATCGGTGGTGGCCAGAACCGCAACTACAGTAAGCTGCTG					
>hmif.	AGCCTGCACAGCATCGGCAAGATCGGTGGTGGCCAGAACCGCTCCTACAGCAAGCTGCTG					
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
mmif	TGTGGCCTGCTGTCGGATCGCCTGCACATCAGCCCGACCGGGTCTACATCAACTATTAC					
>hmif.	TGGGCCCTGCTGGCCGAGCGCCTGGCATCAGCCCGACAGGGTCTACATCAACTATTAC					
	250	260	270	280	290	300
	310	320	330	340		
mmif	GACATGAACGCTGCCAAGCTGGGCTGGAACGGITCCACCTTCGCTTGA					
>hmif.	GACATGAACGCGGCCAGTGTGGGCTGGAACAACCTCCACCTTCGCTTAA					
	310	320	330	340		

FIG.2

【図 3】

開始
↓
CCATGCCTATGTTTCATCGTGAACACCAATGTTCCCGCGGCC
TCCGTGCCAGAGGGGTTTCTGTCGGAGCTCACCAGCAGCTGGCGCAGGCCACCGCAAG
CCCGCACAGTACATCGCAGTGCACGTGGTCCCGGACCAGCTCATGACTTTTAGCGGCACG
AACGATCCCTGGCCCTCTGCAGCCTGCACAGCATCGGCAAGATCGGTGGTGCCAGAAC
CGCAACTACAGTAAGCTGCTGTGTGGCCTGCTGCCATCGCCTGCACATCAGCCCGGAC
CGCTCCTACAGCAAGCTGCTGTGGCGCTGCTGGCCGAGCGCTGCCATCAGCCCGGAC
CGGGTCTACATCAACTATTACGACATGAACGCTGCCAAGTGGGCTGGAACGGTTCCACC
AGGGTCTACATCAACTATTACGACATGAACGCGGCCAGTGTGGGCTGGAACAACTCCACC
TTCGCTTGAGTCTGGCCCGCACTTACCTGCACCGCTGTTTC
↓
終止

FIG.3

【図 4】

60
50
40
30
20
10
mu
MPMF I VNTNPRASVPEGF LSEL TQQL AQTGKPAQY I AVHVPPDQLMTF SGTNDPCALC
hu
MPMF I VNTNPRASVPEGF LSEL TQQL AQTGKPPQY I AVHVPPDQLMAFGSSEPCALC
70
80
90
100
110
mu
SLHSTGKTGCAQNRNYSKLLCGLLSDRLHISPDVYINYYDMAANVGNWGSTFA
hu
SLHSTGKTGCAQNRNYSKLLCGLLAERLISPDVYINYYDMAANVGNWNSTFA

FIG.4

【図 5】

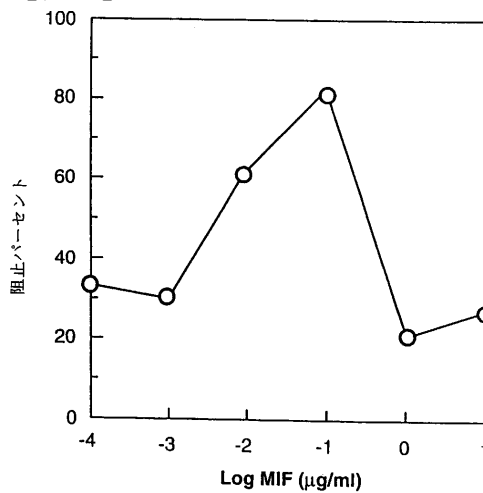


FIG. 5

【図 6 A】

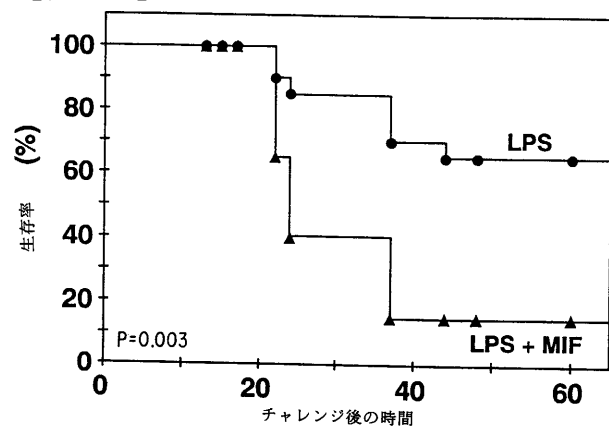


FIG. 6A

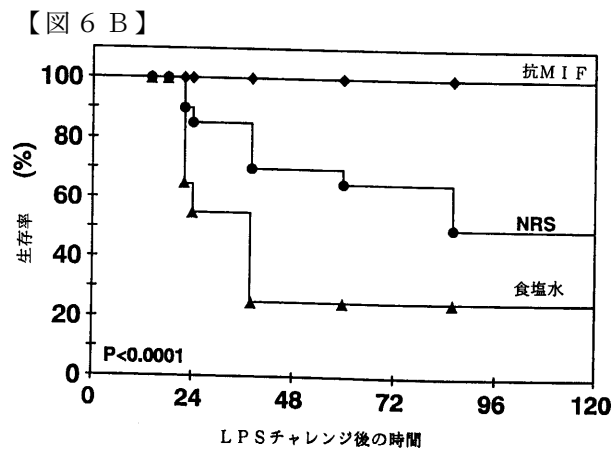


FIG. 6B

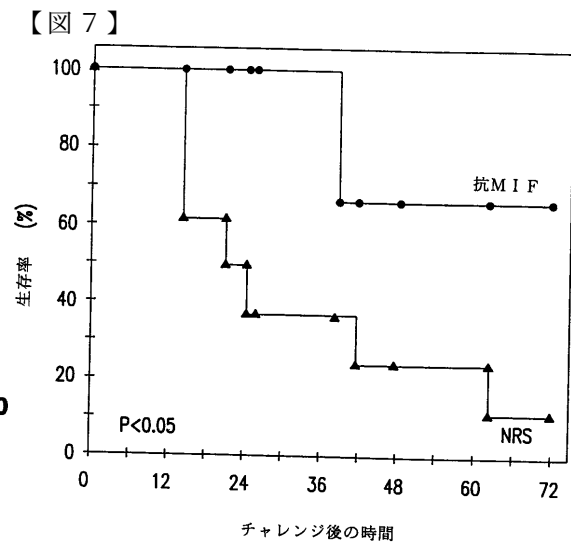


FIG. 7

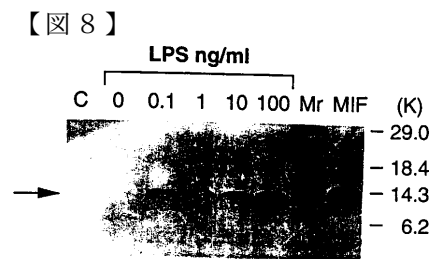
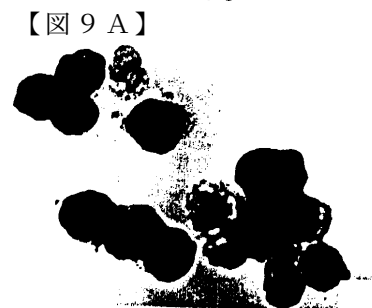
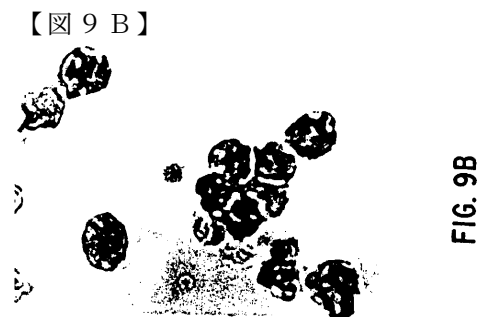
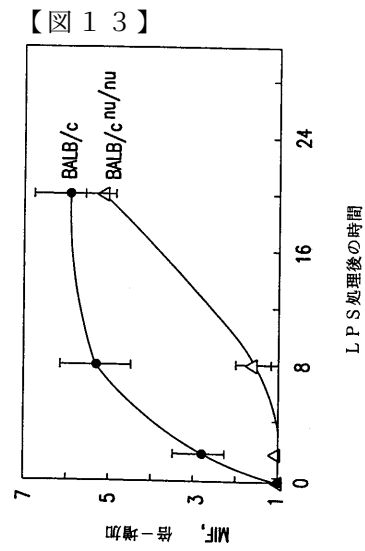
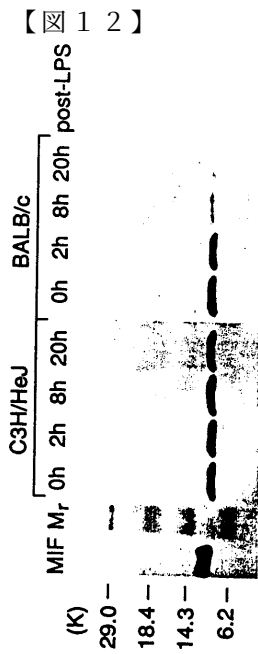
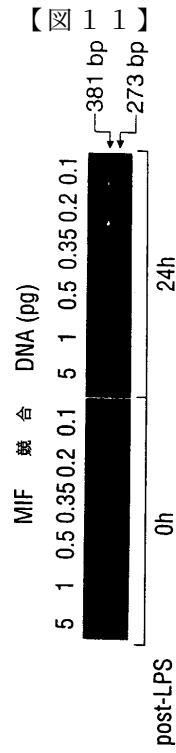
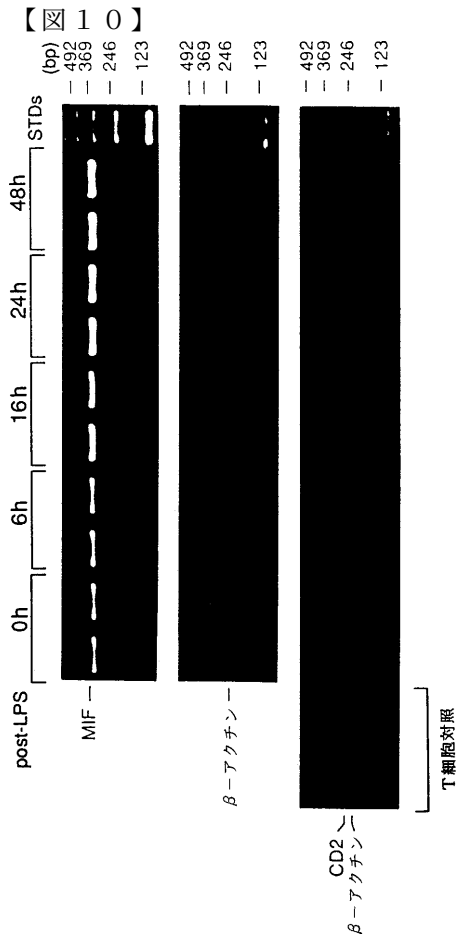


FIG. 8





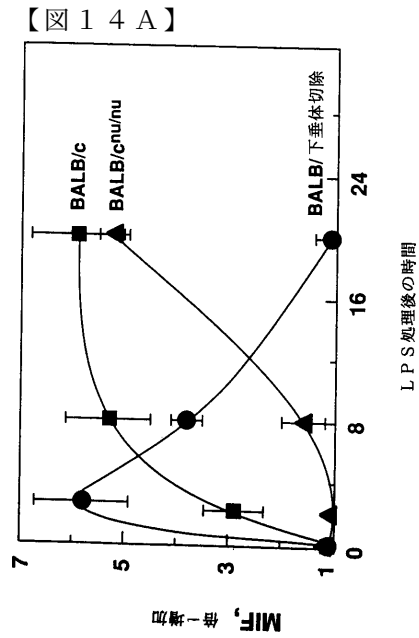


FIG. 14A

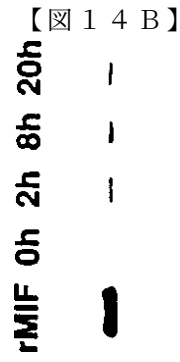


FIG. 14B

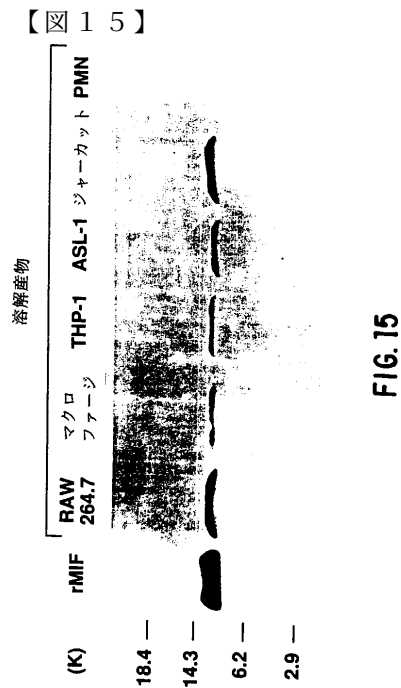


FIG. 15

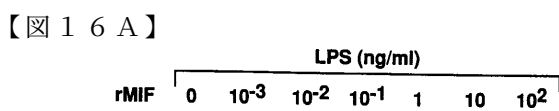


FIG. 16A

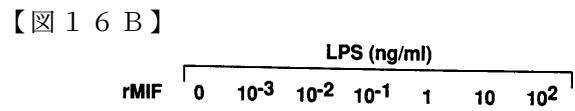


FIG. 16B

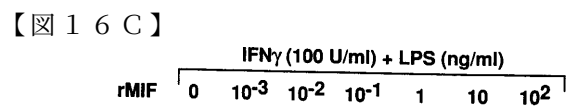


FIG. 16C

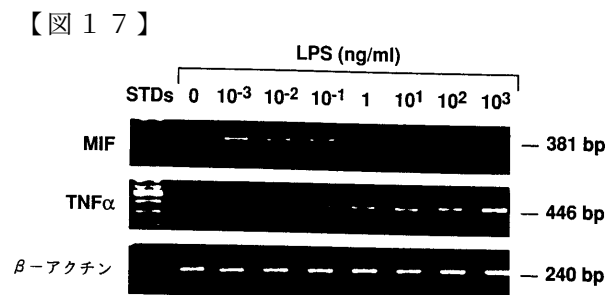


FIG. 17

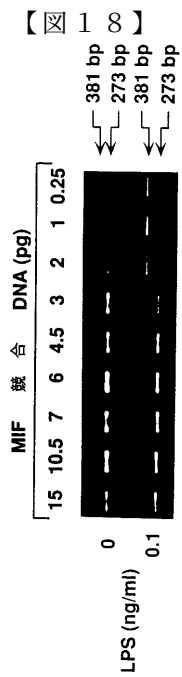


FIG. 18

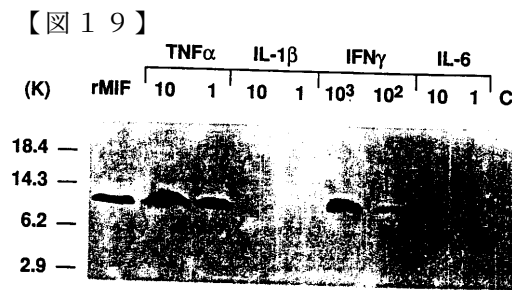


FIG. 19

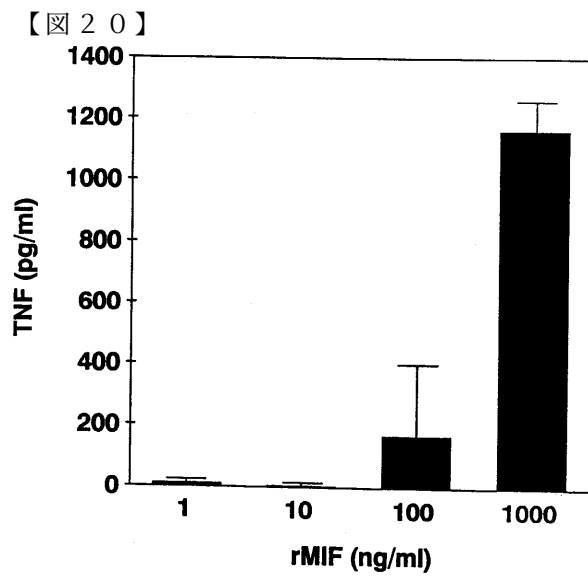


FIG. 20

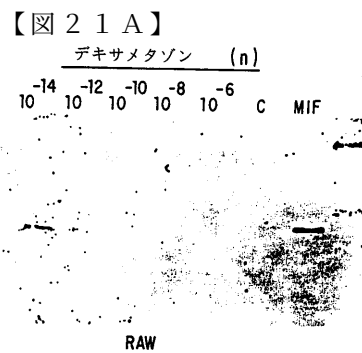


FIG. 21A

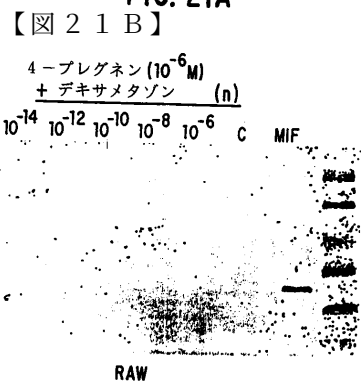


FIG. 21B

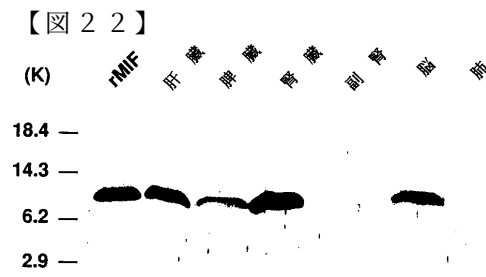


FIG. 22

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 H 21/04 (2006.01)	A 6 1 K 48/00		
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 H 21/04	Z	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 14/47		
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 0 7 K 16/18		
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/08		
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02		
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00		
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00		
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	A 6 1 P 43/00		
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 9/00		
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C	
	C 1 2 N 15/00	Z N A A	

(74)代理人 100077425

弁理士 大屋 憲一

(72)発明者 ブカラ, リチャード ジェイ.
アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 ニューヨーク州 ニューヨーク, # 3 3 ディー, イースト 6 3 アールディー ストリート 5 0 4 番地

(72)発明者 ミッチェル, ロバート エイ.
アメリカ合衆国 1 0 0 0 9 ニューヨーク州 ニューヨーク, # 6 シー, イースト 1 1 ティーエイチ ストリート 5 1 6 番地

(72)発明者 バーンハーゲン, ユルゲン
アメリカ合衆国 1 0 0 2 8 ニューヨーク州 ニューヨーク, # 7 エイチ, ファースト アベニュー 1 5 7 0 番地

(72)発明者 カランドラ, ティエリー エフ.
アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 ニューヨーク州 ニューヨーク, イースト 6 3 アールディー ストリート 5 0 0 番地

(72)発明者 セラミ, アンソニー
アメリカ合衆国 1 1 9 6 4 ニューヨーク州 シェルター アイランド, ラム アイランド ドライブ (番地なし)

合議体

審判長 星野 紹英

審判官 伊藤 幸司

審判官 川上 美秀

(56)参考文献 米国特許第4 7 0 8 9 3 7 (U S, A)
特開昭6 0 - 2 4 8 6 1 7 (J P, A)
特開昭6 3 - 1 5 7 9 9 7 (J P, A)
特表平4 - 5 0 4 1 1 1 (J P, A)
P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A, (1 9 8 9) 8 6 p. 7 5
2 2 - 7 5 2 6

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

A61K45/00,38/00,39/395

CAPlus(STN),BIOSIS(STN),MEDLINE(STN),EMBASE(STN),WPI