(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2006 年11 月2 日 (02.11.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/115026 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 14/715 (2006.01) *C12N 1/15* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/307547

(22) 国際出願日: 2006 年4 月10 日 (10.04.2006)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2005-124394 2005 年4 月22 日 (22.04.2005) JP
特願2005-255972 2005 年9 月5 日 (05.09.2005) JP

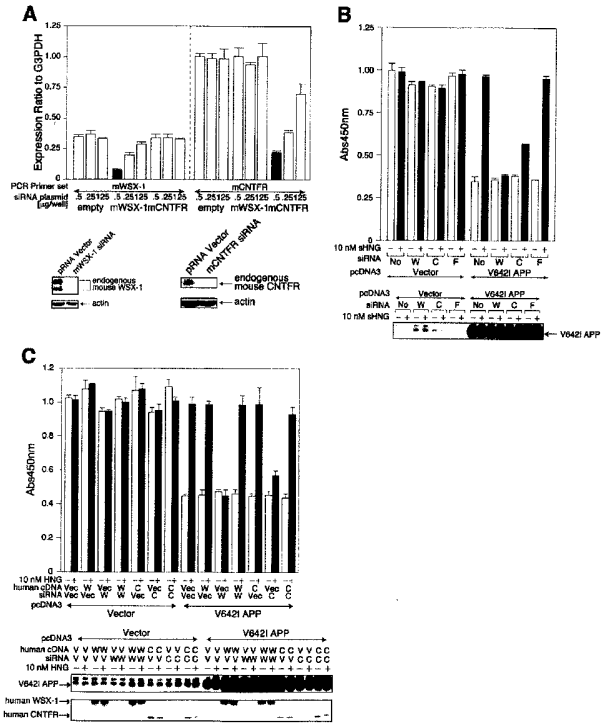
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目１番８号 Saitama (JP). 学校法人慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目１５番４５号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松岡 正明 (MATSUOKA, Masaaki) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町３５番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 西本 征央 (NISHIMOTO, Ikuo) [JP/JP]; 〒1608582 東京都

[続葉有]

(54) Title: HUMANIN RECEPTOR OR HUMANIN-LIKE POLYPEPTIDE RECEPTOR

(54) 発明の名称: ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体



(57) Abstract: It is aimed at searching for a receptor based on the dada in the HN signal pathway and finding out a humanin receptor or a humanin-like polypeptide receptor (HNR)to thereby clarify the mechanism of promoting or inhibiting the intracellular signaling exerting, for example, the nerve protecting activity of HN; specifying a compound relating thereto; establishing a method of screening an HNR agonist and an HNR antagonist; utilizing the thus screened compounds in developing a remedy for a neurodegenerative disease, in particular, Alzheimer's disease; providing an assay system for Alzheimer's disease nerve cell death; and providing a method of the forced expression of HNR gene and a method of knock-outing a gene in a cell. Namely, a humanin receptor or a humanin-like polypeptide receptor containing at least two proteins selected from the group consisting of gp130 or a partial peptide thereof, CNTF-R and WSX-1.

(57) 要約: 本発明の目的は、HNシグナル経路の情報に基づいてリセプターを探索し、ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体（HNR）を見いだすことによって、HNの神経保護作用などの活性を発揮する細胞内シグナル伝達を促進あるいは抑制するメカ

[続葉有]

WO 2006/115026 A1

新宿区信濃町３５番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 相磯 貞和 (AISO, Sadakazu) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町３５番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 阿部 正博 (ABE, Masahiro); 〒2740825 千葉県船橋市前原西二丁目１４番１号ダイアパレス津田沼１００１号 Chiba (JP).

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

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

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

ニズムを解明して、それにかかわる化合物を特定し、HNRアゴニスト及びHNRアンタゴニストのスクリーニング方法を確立すること、スクリーニングした化合物を神経変性疾患、特にアルツハイマー病の治療薬開発に役立てること、アルツハイマー病神経細胞死アッセイシステムを提供すること、及び、HNR遺伝子強制発現法や細胞内遺伝子ノックアウト法等を提供することである。従って、本発明は、ｇｐ１３０又はその部分ポリペプチド、CNTF-R及びＷＳＸ－１から成る群から選択される少なくとも２種の蛋白質を含むヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体（ＨＮＲ）に関する。

明 細 書

ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体

技術分野

[0001] 本発明は、ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体(以下、まとめて、「HNR」と標記する場合もある)、該受容体が強制発現された形質転換細胞、該受容体に結合する化合物のスクリーニング方法、該化合物を含む医薬組成物等に関する。尚、本願は、2005年4月22日出願の日本特許出願2005－124394及び2005年9月5日出願の日本特許出願2005－255972に基づき優先権を主張する出願であり、これらに記載された内容は本明細書に引用され、その開示内容の一部と見なされる。

背景技術

[0002] 神経脱落、それはアルツハイマー病(AD)の主な神経学的徴候あるいは症状発現と直接関連していると考えられ、その病理学的メカニズムは解明されていないが、AD治療の最も重要なターゲットである。In vitroでは種々のAD関連の傷害、すなわち家族性AD(FAD)遺伝子変異体の過剰発現やアミロイドベータ前駆体(APP)由来の毒性ベーターアミロイド(Aβs)の増加及び添加等は様々な経路で神経細胞死を誘導する。

[0003] 家族性AD(FAD)は3遺伝子、APP、プレセニリン1(PS1)、プレセニリン2(PS2)におけるミスセンス変異が原因となっておこることが見い出されている(Shastry and Ginlin, 1999)。これらの変異遺伝子がFAD脳においてin vivoでどのように神経脱落に寄与しているかは不明であるけれど、複数のグループが培養細胞において(Yamatsuji et al., 1996a,b; Wolozin et al., 1996; Zhao et al., 1997; Nishimura et al., 1998; Luo et al., 1999; Hashimoto et al., 2000)或いは初代培養皮質神経(PCN)において(Niikura et al., 2004)FAD関連のAPPとPS遺伝子変異体の発現が神経細胞死を引き起こすことを証明した。

[0004] さらに、AD病理に密接に関連すると考えられている(Hardy and Selkoe, 2002)、ベーターアミロイドの増加が生理的に高すぎる濃度ではあるがin vitroで神経細胞死を

引き起こすことが示された (Loo et al., 1994; Hashimoto et al., 2001; Hashimoto et al., 2004)。

[0005] 本発明者は、AD患者死亡後の剖検脳における後頭葉から作成したcDNAライブラリーを使用して細胞死を防ぐ化合物をバイアスをかけない機能的なスクリーニング方法、「デストラップスリーニング法」を実施することにより、ヒューマニン(HN)と名付けた24アミノ酸ペプチドMAPRGFSCLLLLTSEIDLPVKRRAをコードするcDNAを同定した(特許文献1)。HNは種々のFAD遺伝子や抗APP抗体、さらにベータアミロイドペプチド(Aβ)等のすべてのAD関連傷害により引き起こされる神経細胞死に対し拮抗作用をしめす。(Hashimoto et al., 2001a and b; Nishimoto et al., 2004)。その拮抗作用は10μMのHNで完全である。さらにHNはある種の神経細胞や非神経細胞死、例えば、無血清培地におけるPC12(Kariya et al., 2002)やリンパ球(Kariya et al., 2003)にたいする細胞死や, ADによるヒト脳血管性平滑筋細胞の毒性(Jung et al., 2003)、さらにはプリオン由来のペプチドによる神経毒性(Sponne et al., 2004)にも拮抗することが後続の研究で示された。

[0006] 我々はHNが細胞内から分泌され、細胞外から細胞表面のリセプターを介してAD関連傷害により起こる神経細胞死にたいして拮抗作用を発揮することを報告した(Hashimoto et al., 2001a; Nishimoto et al., 2004)。

[0007] 最近Ying等(2004)はHNがPC12細胞株においてPTX感受性Gタンパク結合受容体であるヒトフォルミルペプチドリセプター様-1(FPRL-1)をリセプターとして結合しAβ(1-42)による神経細胞死に拮抗していることを報告した。Ying等はHNがAβが誘導する神経毒性に拮抗作用をしめすのはFPRL-1にAβが結合するのを競争的に阻止するためであると示唆した。しかしながら、FPRL-1がHNを介したAD関連傷害にたいする神経保護作用に関与しているかを調べたところ、F11神経ハイブリッド細胞株あるいは初代培養皮質神経(PCN)においてはHNを介する神経保護作用にはFPRL-1は関与していないことがみいだされ、その系においてはFPRL-1以外のリセプターが存在しそのリセプターを介してHNが神経保護作用を発揮することが指摘された。

[0008] 更に、我々はSTAT3と或る種のチロシンキナーゼがHNを介する神経保護作用に関与することを示し、このことはサイトカインリセプター様のリセプターがそのシグナル経

路に存在することを示唆した。

[0009] gp130はインターロイキン6(IL-6)リセプターファミリーに共有のサイトカイン受容体サブユニットである。gp130を含む受容体はIL-6, IL-11, LIF, CNTF, オンコスタチンM(OSM), カルディオトロフィン-1やIL-27を含むタイプ1サイトカインにより刺激される。これらのサイトカインのリセプターへの結合はgp130のホモ二量体化あるいはgp130関連リセプター、たとえばLIFリセプター、OSMリセプター、WSX-1(IL27リセプター)とのヘテロ二量体化を誘導しサイトカインのシグナルをJAK/STAT又はRAS/MAPKシグナル経路を介した細胞内シグナル経路へと伝達する(Taga et al., 1997; Boulay et al., 2003; Boulanger et al., 2004)。ごく最近、IL-6./IL-12サイトカインファミリーに属するIL-27(IL-27p28/EBV誘導遺伝子3)がWSX-1/gp130(Pflanz et al.,2004)と結合することによりTh1とTh2免疫反応をコントロールすることが示された(Yoshida et al., 2004)。又、CNTF-R はその細胞内シグナルドメインを有しないgp130関連リセプターである。

特許文献1:特再WO01/021787 神経細胞死を抑制するポリペプチド、Humanin

特許文献2:WO03/097687 Neuroprotective Polypeptides and Methods of Use

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0010] 従って、本発明の目的は、HNシグナル経路の情報に基づいてリセプターを探索し、ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体(HNR)を見いだすことによって、HNの神経保護作用などの活性を発揮する細胞内シグナル伝達を促進あるいは抑制するメカニズムを解明して、それにかかわる化合物を特定し、HNRアゴニスト及びHNRアンタゴニストのスクリーニング方法を確立すること、スクリーニングした化合物を神経変性疾患、特にアルツハイマー病の治療薬開発に役立てること、アルツハイマー病神経細胞死アッセイシステムを提供すること、及び、HNR遺伝子強制発現法や細胞内遺伝子ノックアウト法等を提供すること等である。

課題を解決するための手段

[0011] 即ち、本発明は、以下の各態様に係る。

[1]gp130又はその部分ポリペプチド、CNTF受容体α鎖(CNTF-R)及びWSX

－1から成る群から選択される少なくとも2種の蛋白質を含むヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体（HNR）。

[2]gp130又はその部分ポリペプチド、CNTF－R及びWSX－1から構成されるヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体。

[3]gp130又はその部分ポリペプチド及びWSX－1から構成されるヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体。

[4]gp130の部分ポリペプチドが、少なくとも細胞内ドメインの1-133番目のアミノ酸配列を有する、上記1～3のいずれか一項に記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体。

[5]CNTF－R及びWSX－1から構成されるヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体。

[6]gp130、CNTF－R及びWSX－1がヒト由来の蛋白質である、上記1～5のいずれか一項に記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体。

[7]上記1～6のいずれか一項に記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物のスクリーニング方法。

[8]ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物が、該受容体の細胞外ドメインに結合する、上記7記載のスクリーニング方法。

[9]ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物が、該受容体の細胞内ドメインに結合する、上記7記載のスクリーニング方法。

[10]ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物が、該受容体アゴニストである、上記7記載のスクリーニング方法。

[11]ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物が、該受容体アンタゴニストである、上記7記載のスクリーニング方法。

[12]上記7～11のいずれか一項に記載のスクリーニング方法であって、

(a) ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体又はそれを構成する少なくとも1つのタンパク質に試験試料を接触させる工程、

(b)該受容体と該試験試料に含まれる化合物との結合特性を測定する工程、及び

(c)該受容体に結合する化合物を選択する工程、を含む前記方法。

[13]ヒューマニン又はヒューマニン様ポリペプチドの存在下で、ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体又はそれを構成する少なくとも1つのタンパク質に試験試料を接触させることを特徴とする、上記12記載のスクリーニング方法。

[14]ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体又はそれを構成する少なくとも1つのタンパク質が細胞で強制発現されているものである、上記12又は13に記載のスクリーニング方法。

[15]ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体が、該受容体を構成する少なくとも一つのタンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクターによって形質転換された細胞で強制発現されているものである、上記12又は13に記載のスクリーニング方法。

[16]該受容体と化合物との結合特性を、神経細胞死に対する拮抗作用又は抑制作用の変化を検出することにより測定する、上記12～15のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

[17]該受容体と化合物との結合特性を、SATAT3の706番目のチロシンのリン酸化の亢進又は抑制を検出することにより測定する、上記12～15のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

[18]無細胞系において実施する上記7～12のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

[19]gp130、CNTF－R及びWSX－1から成る群から選択されるヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体を構成する少なくとも一つのタンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクターによって形質転換された細胞。

[20]ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体が強制発現されている上記19記載の形質転換細胞。

[21]gp130、CNTF－R及びWSX－1から成る群から選択されるヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体を構成する少なくとも一つのタンパク質をコードする遺伝子がノックアウトされている細胞。

[22]ES細胞である、上記21記載の細胞。

[23]上記22記載のES細胞に由来するヒト以外のノックアウト動物。

[24]ホモ接合体である、上記23記載のノックアウト動物。

[25]齧歯類である、上記23又は24記載のノックアウト動物。

[26]上記1から6のいずれかに記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物を有効成分とする神経細胞死抑制剤である医薬組成物。

[27]上記1から6のいずれかに記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物を有効成分とする神経変性を伴う疾病の予防または治療に用いられる医薬組成物。

[28]上記1から6のいずれかに記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物を有効成分とするアルツハイマー病の予防または治療に用いられる医薬組成物。

[29]上記1から6のいずれかに記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物を有効成分とする筋萎縮性側索硬化症の予防または治療に用いられる医薬組成物。

[30]上記1から6のいずれかに記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物を有効成分とする狂牛病の予防または治療に用いられる医薬組成物。

[31]上記1から6のいずれかに記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物を有効成分とする血管性痴呆症の予防または治療に用いられる医薬組成物。

[32]上記1から6のいずれかに記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に特異的に結合する抗体。

発明の効果

[0012] 本発明によって、ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体(HNR)の構造が明らかとなり、該受容体に結合する化合物のスクリーニング方法、及び該化合物を含む医薬組成物等を提供することが可能となった。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]A)神経ハイブリッド株F11細胞に、pcDNA3ベクター又はpcDNA3-V642I-APP

ベクター(0.5 μg)と、pCAGベクター、pCAG-野生型マウスgp130(mgp130wt)又はpCAG-マウスgp130細胞外ドメイン(mgp130tr) (0.5 μg)をトランスフェクションした。導入後72時間でWST8アッセイより求めた細胞生存率を示すグラフである。下に、V642I-APPの発現とmgp130wt又はmgp130trの発現を免疫ブロット法で確認した結果(写真)を示す。B)リコンビナント可溶性ヒトgp130(図中、下段「+」)又はBSA(図中、下段「-」) (10μg)の存在下、初代培養皮質神経(PCN)をAβ (25μM) (図中、上段)と共にインキュベートした。Aβ処理開始72時間後に、WST-8アッセイ(上)及びカルセイン蛍光法(下)で求めた細胞生存率を示すグラフである。C)PCNを1μgの抗マウスgp130中和抗体(RX435)又はコントロールIgGの存在下で、25μMのAβ1-43と共にインキュベートした。Aβ処理開始72時間後に、カルセイン蛍光法で求めた細胞生存率(左)及びLDHアッセイで求めた細胞死亡率(右)を示すグラフである。D)F11細胞に、pcDNA3ベクター又はpcDNA3-V642I-APP(0.5 μg)と、pEFBosベクター又はpEFBos - 野生型ヒトgp130(0.5 μg)をトランスフェクションした。導入後24時間に、1μgの抗マウスgp130中和抗体を添加した。トランスフェクション72時間後に、トリパンブルー除外アッセイおよびWST-8アッセイにより求めた、夫々、細胞死亡率(左)及び細胞生存率(右)を示すグラフである。V642I-APPの発現とヒトgp130wtの発現を免疫ブロット法で確認した結果(写真)も示す。

[図2]A)F11細胞にpcDNA3ベクターまたはpcDNA3-APP(0.5μg)とpEFBosベクターまたはヒトGCSF受容体の細胞外ドメインを細胞膜ドメインと細胞内ドメインのC末端を短縮したgp130に融合したキメラ(G-CSFR/gp130として表わす)をコードするpEFBosベクター(0.5μg)をトランスフェクションした。48時間後、各々のキメラタンパク質の発現を免疫ブロット法で確認した結果(写真)を示す。B)F11細胞にpcDNA3ベクターまたはpcDNA3-APP(0.5μg)とpEFBosベクターまたはヒトGCSF受容体の細胞外ドメインを細胞膜ドメインと細胞内ドメインのC末端を短縮したgp130に融合したキメラ(G-CSFR/gp130として表わす)をコードするpEFBosベクター(0.5μg)をトランスフェクションした。G-CSFR/gp130 (277) は細胞内アミノ酸番号1-277 に相当するgp130の細胞内ドメインのすべてを含んでおり、一方、G-CSFR/gp130 (133), (68), (25) は夫々、細胞内の1-133, 1-68, 1-25アミノ酸を含むものである。トランスフェクション24時間後に、

夫々の量のヒトG－CSFを添加した。トランスフェクション72時間後に、トリパンブルー除外アッセイにより求めた細胞死亡率を示すグラフである。下に、V642I-APPの発現を免疫ブロット法で確認した結果（写真）も示す。C）pcDNA3- V642I-APPベクターの代わりに、pcDNA3- K595N/M596L-APP (NL-APP)、M146L-PS1、及びN141-I-PS2ベクターを用いて、図2Aと同様の実験を行って得られた結果を示すグラフである。下にNL-APP, M146L-PS1、及びN141-I-PS2の発現を免疫ブロット法で確認した結果（写真）も示す。D）F11細胞に、pEFBosベクター又はpEF-G85R-SOD1ベクター（0.5 μg）と、pEFBosベクター、又はG-CSFR/gp130 (277) 又はG-CSFR/gp130 (25) をコードするpEFBosベクター（0.5 μg）をトランスフェクションした。トランスフェクション24時間後に、夫々の量のヒトG－CSFを添加した。トランスフェクション72時間後に、トリパンブルー除外アッセイにより求めた細胞死亡率を示すグラフである。下にG85R-SOD1の発現を免疫ブロット法で確認した結果（写真）も示す。E）HN 処理により、gp130のチロシンリン酸化が増強される。PCNs (1.0 x 10^6 cells/well in 6-well plated) (DIV 3)に MOI 25でhuman gp130-encoding adenovirusesを感染させ、60時間後,1 μM HNG, 1 μM HNA, あるいは100 ng/ml ラット IL-6 と1 μg/ml sIL-6Rを加え、37° C で 15分間処理した。2 μg のgp130 抗体で免疫沈降した沈降物をphosphotyrosine 抗体で免疫ブロットした結果（写真）を示す。

[図3]A）PCNを96穴プレートに2.5或いは5 x10^4／wellで播種し、Aβ（25μM）の存在又は非存在下、及び、各サイトカインの存在又は非存在下でインキュベーションした。72時間後にWST-8アッセイ及びカルセイン蛍光法で求めた細胞生存率を示すグラフである。B）上記Aと同様に、可溶性IL-6リセプターα（sIL-6R）或いは可溶性CNTF-R（100 ng/ml）を添加し、それぞれのリガンドIL-6およびCNTF（100 ng/ml）で刺激しAβによる神経細胞死に対する影響を調べた結果を示すグラフである。尚、左はカルセイン蛍光法で求めた細胞生存率、右はWST-8アッセイで求めた細胞生存率を示すグラフである。C）上記Aと同様に、マウスgp130、マウスLIFR、マウスIL-11R、及びラットCNTF-Rに対する中和抗体（1μg）を添加して、72時間後に細胞生存率をカルセイン蛍光法で求めた。D）F11細胞 に対して、図に記載された量のpRNA-U6.1/Shuttle vector (empty), pRNA-U6.1/Shuttle-IL-6R siRNA, あるいはpRNA-U6

.1/Shuttle-LIFR siRNAを導入した。72時間後,細胞よりtotal RNAを抽出し、IL-6RとLIFR mRNA 量をreal-time PCR法により定量した。内部コントロールとしてG3PDHのmRNA.量を定量し、補正した。また、免疫ブロット法により、各々のタンパク質の変化を定量した。E)F11細胞 に対して、図に記載された量のpRNA-U6.1/Shuttle vector (empty), pRNA-U6.1/Shuttle-IL-6R siRNA, あるいはpRNA-U6.1/Shuttle-LIFR siRNAを導入した。48時間後、細胞を100 ng/ml IL-6, 100 ng/ml CNTF, あるいは1 μM HNGで 37° C 15 分間処理し、ハーベストした。phosphoSTAT3 (Tyr^{705})抗体とSTAT3抗体で免疫ブロットを行った結果(写真)を示す。

[図4]A)F11細胞に、pEF-Bos, pEF--mycHis CREME9, pEF--mycHisヒトWSX-1又はpEF-V5-ヒトCNTF-R(0.5 μg)と、pCAG-ヒトgp130(0.5 μg)をトランスフェクションするか、pEF--mycHisヒトWSX-1、pEF-V5ヒトCNTF-R及びpCAGヒトgp130(0.5 μg)をトランスフェクションした。添加ベクターの全量を1.5μgに維持するために、pEF-Bosベクターを適当量添加した。ビオチン標識HNと各々トランスフェクションした細胞との結合量を免疫蛍光反応を検出することにより求めたアッセイの結果を示すグラフである。下に各々のタンパク質の発現は免疫ブロットにより示した(写真)。B)F11細胞に、pEF-mycHisヒトCREME9又は pEF-mycHisヒトWSX-1(0.5 μg)と、pCAG-ヒトgp130(0.5 μg)をトランスフェクションした。幾つかの実験では、競合させる目的で、10 μMの非標識HNG又はHNAを添加した。右側は、レーザースキャニング共焦点顕微鏡LSM(Carl Seiss, Germany)で検出した蛍光シグナルの写真である。C)HNあるいはHNAを共有結合させたセファロース4Bビーズによる In vitroプルダウンアッセイの結果を示す写真である。F11細胞中にCNTF-R, WSX-1, IL-6-Rを過剰発現させ、各々の4Bビーズによる In vitroプルダウンアッセイを行った。免疫ブロットはヒューマニンに対するPO4抗体を用いておこなった(下パネル)。上パネルでは用いたセファロース4Bビーズに含まれているHNあるいはHNAをHN合成ペプチド(50 pmol)を陽性コントロールとして比較した。

[図5]HNを介する神経保護作用シグナルにCNTF-RとWSX-1の関与を確認するために、プラスミドsiRNA法をもちいて、これらタンパクの発現をF11細胞株においてノックダウンした結果を示すグラフである。 A)F11細胞に、pRNAU6.1/Shuttleベクター(N

O)、pRNAU6.1/Shuttle-siWSX-1ベクター(W)、又はpRNAU6.1/Shuttle-siCNTF-Rベクター(C)をトランスフェクションし、その72時間後に細胞を溶解してRNAを抽出し、mRNA量をリアルタイムPCRで、タンパク質量を免疫ブロット法により測定した。 B)F11細胞に、pcDNA3ベクター又はpcDNA3-V642I-APP(0.5 μg)と、pRNAU6.1/Shuttleベクター(NO)、pRNAU6.1/Shuttle-siWSX-1(W)、pRNAU6.1/Shuttle-siCNTF-R(C)、又はpRNAU6.1/Shuttle-siFPR-2(F)をトランスフェクションし、その24時間後に、10nMのHNGを添加した。トランスフェクション72時間後に、WST－8アッセイを行った。 C)F11細胞に、pcDNA3ベクター又はpcDNA3-V642I-APP(0.5 μg)とpRNAU6.1/Shuttleベクター(Vec)又はpRNAU6.1/Shuttle-siWSX-1(W)又はpRNAU6.1/Shuttle-siCNTF-R(C)(0.5 μg)とpFEBosベクター又はpEF-V5-ヒトCNTF-R又はpEF1/mycHis-human WSX-1(1μg)からなる3種類のベクターをトランスフェクションし、その24時間後に、10nMのHNGを添加した。トランスフェクション72時間後に、WST－8アッセイを実施した。

[図6]A)pFEBosベクター或いはpEF-mycHis-ヒトWSX-1、又は／及びpEF-V5-ヒトCNTF-R(各0．5μg、全量1．0μg)をCOS7細胞にトランスフェクションし、72時間後に抗myc抗体(myc-WSX-1に対して)或いは抗マウス及びヒトCNTF-R抗体で共免疫沈降実験をおこなった。その免疫沈降物を免疫ブロットに処した結果を示す写真である。細胞溶解 B)F11細胞に10μMHNAあるいは10nMHNGを1、3、6時間処理した。ハーベスト前30分間、クロスリンカーである1 mM BS3処理を行った。Gp130あるいはCNTFRに対する抗体で免疫沈降し、WSX-1、gp130、CNTF-Rに対する抗体で免疫ブロットを行った。コントロールの免疫沈降として、一部にSOD1に対する抗体で免疫沈降を行った結果を示す写真である。Inputとして20分の1量の各々のライゼートを免疫ブロットを行った。

[図7]F11細胞に0.5 μg のpcDNA3 vector あるいは pcDNA3-V642I-APPを導入し5時間後10 nM HNG あるいは10μM HN あるいは 図に示した濃度のヒト IL-27を投与した。一部の実験では図に示した濃度のIL-27 あるいはIL-6を HNGと同時に投与した。投与後、72時間後、WST-8 アッセイを行った。数字で示された F11細胞は同時に V642I-APP発現をチェックした。下に、V642I-APPの発現を免疫ブロットで示す

(写真)。

[図8]A)F11細胞をpoly-L-lysineをコートした 96-well plates ($7x10^3$ cells/well)に播き、図で示された濃度のbiotin-HN あるいはbiotin-HNG を10 μMの標識していないHNG あるいはHNA 非存在下あるいは存在下に加え、免疫蛍光を基盤とした結合アッセイ(2)を行った(左サイドのパネル)。また、右サイドのパネルではF11細胞に対して0.5 μg の pcDNA3.1/GS-human CNTF-R, pEF1/MycHis-human WSX-1, と 1.0 μg のpCAG-human gp130で遺伝子導入し、24時間後、poly-L-lysineをコートした 96-well plates ($7x10^3$ cells/well)に播きなおし、36時間後、図に記載された濃度の biotin-HNあるいはbiotin-HNG を10 μMの標識していないHNG あるいはHNA 非存在下あるいは存在下に加え、免疫蛍光を基盤とした結合アッセイ(2)を行った。B)F11細胞に0.5 mg のpRNA-U6.1/Shuttle vector, pRNA-U6.1/Shuttle-WSX-1 siRNA、pRNA-U6.1/Shuttle-CNTF-RsiRNA, pRNA-U6.1/Shuttle-WSXとpRNA-U6.1/Shuttle-CNTFR siRNA -1 siRNA両者(0.5 μgずつ)、、pRNA-U6.1/Shuttle-FPR2 siRNA, あるいはpRNA-U6.1/Shuttle-LIFRを導入した。トランスフェクトする全体のベクター量はバックボーンベクターを加えて、1.0 μg とした。24時間後、図に記載した濃度のbiotin-HNG を100 nM の非標識 HNG存在下非存在下で処理し、トランスフェクション72時間後に、免疫蛍光を基盤とした結合アッセイ(2)を行った。

[図9]A)poly-L-lysineをコートした 96-well plates ($7x10^4$ cells/well)に処理後3日目のPCN細胞を図に示した濃度のbiotin-HNG あるいはbiotin-HN あるいはヒト IL-27を投与して、免疫蛍光を基盤とした結合アッセイ(2)を行った。一部の実験では10nM biotin-HNGに加えて、図に示した濃度の標識していないIL-27、CNTF,IL-6,あるいはHNGを同時に加えた。B)poly-L-lysineをコートした 96-well plates ($5.0 x 10^4$/well)に処理後3日目のPCN細胞に対して、図に示した濃度のヒト IL-27、10 nMHNGと図に記載した濃度のIL-27, IL-6, CNTFもしくは2μLのmWSX-1-N抗体あるいはpreimmune seraを投与した。投与後16時間で、10 μM のAb(1-43)処理を開始した。Ab(1-43)処理開始72 時間後, WST-8 アッセイを行った

[図10]A)F11細胞の抽出液を用いて、mWSX-1-C抗体による免疫ブロットを行った結果(レーン1)、同時に10倍量の抽出液を用いて、mWSX-1-C抗体による免疫沈降

-免疫ブロットを行った結果(レーン3)、及び、陰性コントロールとしてpreimmune serumによる疑似免疫沈降を行った結果(レーン2)を示す写真である。B)PCNs (DIV3)とF11細胞の抽出液を用いて、mWSX-1-C抗体による免疫ブロットを行った結果を示す写真である。

[図11]A)F11細胞を図に記載した濃度のHN、HNG、HNAを加えて、15分後にハーベストし、STAT3の706番目のリン酸化チロシンを認識する抗体とSTAT3を認識する抗体で免疫ブロットを行った結果を示す写真である。B)F11細胞に0.5 μg のpRNA-U6.1/Shuttle vector, pRNA-U6.1/Shuttle-WSX-1 siRNA、pRNA-U6.1/Shuttle-CNTF-RsiRNA, pRNA-U6.1/Shuttle-WSX-1とpRNA-U6.1/Shuttle-CNTFR siRNA -1 siRNA両者(0.5 μgずつ)、あるいはpRNA-U6.1/Shuttle-FPR2 siRNAを導入した。トランスフェクトする全体のベクター量はバックボーンベクターを加えて、1.0 μg とした。48時間後、HNG,CNTF,IL-27 を加え、15分後に、ハーベストし、STAT3の706番目のリン酸化チロシンを認識する抗体とSTAT3を認識する抗体で免疫ブロットを行った。

[図12]A)6穴プレート1ウエルあたり$7x10^4$個まかれたF11細胞にpRNA-U6.1/Shuttle vectorあるいはpRNA-U6.1/Shuttle-Baxを1 μgトランスフェクトし、72時間後のマウスBaxのmRNA発現をreal-time PCRで定量した。内部コントロールとしてG3PDHのmRNAを測定し補正した。B)6穴プレート1ウエルあたり$7x10^4$個まかれたF11細胞にpRNA-U6.1/Shuttle vectorあるいはpRNA-U6.1/Shuttle-Baxを0.5あるいは1 μgトランスフェクトし、72時間後のBax蛋白質発現を免疫ブロットで検証した。C)6穴プレート1ウエルあたり$7x10^4$個まかれたF11細胞にpRNA-U6.1/Shuttle vectorあるいはpRNA-U6.1/Shuttle-Baxを1 μgトランスフェクトし、72時間後、100nMのスタウロスポリンあるいはDMSOを加えて3、6、9時間培養し、生細胞量をWST-8アッセイで定量した。Vector/DMSO処理された細胞の値を100%として補正した数字を図に示した。D)6穴プレート1ウエルあたり$7x10^4$個まかれたF11細胞にpcDNA3ベクター又はpcDNA3-V642I-APP又はpcDNA3-M146L-PS1(0.5 μg)と1.0 μg のpRNA-U6.1/Shuttle vectorあるいは pRNA-U6.1/Shuttle-Bax siRNAあるいはpRNA-U6.1/Shuttle-WSX-1をトランスフェクトした。24時間後に10μMのHNを添加し,72時間後にWST-8アッセイ

を行った。一部の細胞ライセートは免疫ブロット法によりAPPとPS1の発現を確認した。E)6穴プレート1ウエルあたり$7x10^4$個まかれたF11細胞に1.0 μg のpRNA-U6.1/Shuttle vectorあるいは pRNA-U6.1/Shuttle-Bax siRNA、あるいはpRNA-U6.1/Shuttle-WSX-1および pRNA-U6.1/Shuttle-CNTFR(各々0.5 μg)をトランスフェクトした。72時間後に記載した濃度のbiotin-HNを一部の実験では標識していないHNあるいはHNA(100 μM)を同時に添加し,免疫蛍光HN結合アッセイを行った。

発明を実施するための最良の形態

[0014] 本発明に於いて、ヒューマニン様ポリペプチド受容体は、gp130又はその部分ポリペプチド、CNTF受容体α鎖(CNTF－R)及びWSX－1から成る群から選択される少なくとも2種の蛋白質を含むものである。従って、その具体例としては、例えば、gp130又はその部分ポリペプチド、CNTF－R及びWSX－1の3種類のタンパク質から構成される受容体、gp130又はその部分ポリペプチド及びWSX－1の2種類のタンパク質から構成され受容体、並びに、CNTF－R及びWSX－1の2種類のタンパク質から構成される受容体を挙げることが出来る。更に、本発明の受容体としての機能が損なわれない限り、これらのタンパク質に加えてその他のタンパク質を構成要素として含むことが出来る。

[0015] 尚、ヒューマニン様ポリペプチド受容体を構成するgp130又はその部分ポリペプチド、CNTF－R及びWSX－1等の各サブユニットは、HNRを構成するサブユニットとしての機能が実質的に影響を受けない限り、1または複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加したアミノ酸配列を含むよう改変されたものでも良い。これらは、当業者に公知の任意の方法で作製することが出来る。

[0016] 本明細書において、「ヒューマニン様ポリペプチド」とは、国際公開WO01/021787号パンフレットに開示された、上記の24アミノ酸から成るポリペプチド(ヒューマニン)と同等又はそれ以上のAD関連傷害により起こる神経細胞死に対して拮抗作用又は抑制作用を有するポリペプチド及びその誘導体を含むものである。尚、本明細書において、単に、「ヒューマニン様ポリペプチド(受容体)」と記載されている場合には、「ヒューマニン(受容体)」自体も含まれる。

[0017] 従って、ヒューマニン様ポリペプチドの具体的としては、例えば、国際公開WO01/0

21787号パンフレットに記載された式(I)

Pro－Xn_1－(Cys／bXaa)－(Leu／Arg)－Xn_2－Leu－Thr－(Gly／Ser)－Xn_3－Pro (I)

(式中、「Cys／bXaa」はCysまたは塩基性アミノ酸、「(Leu／Arg)」はLeuまたはArg、「(Gly／Ser)」はGlyまたはSerであり、Xn_1、Xn_2、およびXn_3はそれぞれ独立に10残基以下の任意のアミノ酸を表す)

で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

[0018] 更に、より具体的な例として、国際公開WO01/021787号パンフレットに記載された配列番号:5～8、10、12、13、21～24、26～29、32、33、37～40、46、48、54、および60からなる群より選択されるアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を含み、AD関連傷害により起こる神経細胞死に対して拮抗作用又は抑制作用を有するポリペプチドを挙げることが出来る。

[0019] 上記本発明のポリペプチドには各種誘導体も含まれる。ここで「誘導体」とは、本発明のポリペプチドの官能基を既知の方法により修飾、付加、変異、置換、または削除などにより改変された形態を持つ化合物を意味する。このような官能基の改変は、当業者に公知の任意の方法を用いて、例えば、ポリペプチドに存在する官能基の保護、ポリペプチドの安定性または組織移行性の制御、あるいはポリペプチドの活性の制御等を目的として行なうことが出来る。

[0020] 即ち、ポリペプチドは翻訳後修飾などにより天然に修飾されていてもよい。また人工的に修飾されていてもよい。修飾には、ペプチドのバックボーン、アミノ酸側鎖、アミノ末端、またはカルボキシル末端などの修飾が含まれる。また、ポリペプチドは分岐していてもよく、環状でもよい。修飾には、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、[フラビン(flavin)、ヌクレオチド、ヌクレオチド誘導体、脂質、脂質誘導体、またはホスファチジルイノシトール]等の共有結合、クロスリンク形成、環状化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、ピログルタミン酸化、カルボキシル化、グリコシル化、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、リン酸化、ユビキチン化などが含まれるが、これらに制限されない。更に、上記ポリペプチドは当業者に公知の任意の

塩及びエステル体とすることも可能である。本発明のポリペプチドは、公知のペプチド合成技術により製造することが可能であり、また、これらポリペプチドをコードするDNAを発現させることによっても製造することが可能である。

[0021] 尚、本発明において「AD関連傷害により起こる神経細胞死に対して拮抗作用又は抑制作用を有する」とは、上記のADに関連する神経細胞死の少なくとも1つを拮抗又は抑制することを指す。すなわち上記のヒューマニン様ポリペプチドには、これらのADに関連する神経細胞死の少なくともいずれかを抑制する活性を有しているものが含まれる。細胞死の抑制は、完全な抑制ではなくても、有意に抑制されればよい。神経細胞死の抑制活性は、以下の実施例に記載された方法または他に記載の方法(例えば国際公開番号 WO00／14204参照)に従って検定することができる。

[0022] 本発明のスクリーニング方法により、ヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物を同定することが出来る。該化合物は、ヒト等の生体内に元来含まれている物質、又は人工的に合成された物質でもよい。該化合物は、ヒューマニン様ポリペプチド受容体の任意の部分、例えば、細胞外ドメイン又は細胞内ドメインに結合するものであり得る。更に、該化合物は、該受容体アゴニスト又は該受容体アンタゴニストであり得る。

[0023] 本発明のスクリーニング方法は、当業者に公知の任意の方法・系で実施することが出来る。例えば、有細胞系又は無細胞系で実施することが出来る。有細胞系とは、ヒューマニン様ポリペプチド受容体を発現する細胞自体を用いて実施する系である。特に、本発明において初めてヒューマニン様ポリペプチド受容体を構成するタンパク質が解明されたので、その知見に基きヒューマニン様ポリペプチド受容体が強制発現されている細胞を当業者に公知の任意の方法で作製することが出来る。例えば、ヒューマニン様ポリペプチド受容体を構成する少なくとも一つのタンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクターによって適当な宿主細胞を形質転換することにより容易に得ることが出来る。このような細胞を使用した場合には、試験試料に含まれる化合物とヒューマニン様ポリペプチド受容体との結合特性が増強される可能性があるので、試験試料中に目的化合物が少量しか含まれていない場合、又は結合力(親和性)が比較的弱い化合物を有意に測定することが出来る。

[0024] 本発明のスクリーニング方法は、例えば、以下の工程で実施することが出来る。

(a) ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体又はそれを構成する少なくとも1つのタンパク質に試験試料を接触させる工程、

(b)該受容体と該試験試料に含まれる化合物との結合特性を測定する工程、及び

(c)該受容体に結合する化合物を選択する工程、を含む前記方法。

ここで、上記工程 (a)を適当量のヒューマニン又はヒューマニン様ポリペプチドの存在下で行うことによって、該化合物の結合特性をヒューマニン又はヒューマニン様ポリペプチドとの間の競合反応を利用して該化合物の結合特性を測定することが出来る。

[0025] 有細胞系で実施するスクリーニング方法においては、上記工程 (a)における受容体と試験試料との接触は、該受容体を発現する細胞の培養系に試験試料を添加すること等の当業者に公知の任意の手段によって、該細胞と試験試料を接触させることによって実施することが出来る。尚、このような有細胞系の場合には、該受容体と化合物との結合特性を、神経細胞死に対する拮抗作用又は抑制作用の変化(抑制作用の増強、減少及び阻害など)を検出することにより測定することが出来る。更に、以下の実施例に示されるように、ヒューマニン又はヒューマニン様ポリペプチドはSATAT3の706番目のチロシンのリン酸化を亢進させることが判明したので、該受容体と化合物との結合特性を、SATAT3の706番目のチロシンのリン酸化の亢進又は抑制を検出することにより測定することも可能である。

[0026] 尚、発現ベクターは当業者に公知の任意の方法で容易に調製することが出来る。ヒューマニン様ポリペプチド受容体を構成する少なくとも一つのタンパク質をコードする遺伝子は、国際公開WO01/021787号パンフレット及びその他の公知文献の記載に基き容易に調製することが出来る。該発現ベクターには、上記タンパク質のコード領域以外に、5'および3'に非コード配列(非転写配列、非翻訳配列、プロモーター、エンハンサー、サプレッサー、転写因子結合配列、スプライシング配列、ポリA付加配列、IRES、mRNA安定化・不安定化配列等を含む)を含んでもよい。

[0027] 本発明のスクリーニング方法に使用する宿主細胞に特に制限はなく、特に、ヒト及びサル等を含む哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞などの細胞または個体を用いることができる。宿主－ベクター系としては、例えば、バキュロウイルス－Sf細胞系(O

kamoto et al. , J. Biol. Chem. 270:4205－4208, 1995)、pcDNA－CHO細胞系(Takahashi et al. , J. Biol. Chem. 270:19041－19045, 1995)、およびCMVプロモータープラスミド－COS細胞系(Yamatsuji et al. , EMBO J. 15:498－509, 1996)などを挙げることが出来る。又、これらの細胞は当業者に公知の任意の条件で培養することが出来る。

[0028] このような宿主細胞自体が元々HNRを発現している必要はない。しかしながら、元来、該受容体を発現していると予想される組織または細胞、例えば脳皮質組織、神経細胞株、または神経芽細胞腫や奇形腫細胞などから調製することも可能である。神経細胞株としては、例えばF11細胞、PC12細胞(L. A. GreeneおよびA. S. Tischler, 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73:2424－2428)、NTERA2細胞(J. SkowronskiおよびM. F. Singer, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:6050－6054)、SH－SY5Y細胞(L. Odelstad et al. , 1981, Brain Res. , 224:69－82)等が挙げることができる。このような場合には、導入した発現ベクター由来の受容体の強制発現によって、元来の発現量よりも多量のヒューマニン様ポリペプチド受容体が発現される結果、測定感度が一層向上することが予想される。

[0029] 本発明のスクリーニング方法を無細胞系で実施することが出来る。かかる無細胞系のスクリーニング方法としては当業者に公知の任意の手段を用いることが出来る。例えば、本発明の受容体又はそれを構成する少なくとも1つのタンパク質を、スクリーニングの手法に応じて、可溶状態として、また担体に結合させた形態としてスクリーニングに用いることができる。本発明の受容体は標識されていてもよい。標識としては、放射性同位元素による標識、蛍光物質による標識、ビオチンやジゴキシゲニンによる標識、タグ配列の付加などが挙げられる。

[0030] 例えば、本発明のHNR又はそれを構成する少なくとも1つのタンパク質を固定したアフィニティーカラムに試験試料をのせ、カラムに特異的に結合する化合物を精製することにより、これらに結合する化合物のスクリーニングを実施することが可能である。また、固定化した本発明の受容体又はそれを構成する少なくとも1つのタンパク質に、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーなどを作用させ、結合する分子をスクリーニングすることも考えられる。また、表面

プラズモン共鳴現象を利用した結合の検出によるスクリーニングも可能である(例えばビアコア(BIAcore社製)など)。これらのスクリーニングは、コンビナトリアルケミストリー技術を用いたハイスループットスクリーニングにより行うことも可能である。

[0031] 本発明のスクリーニングに用いる試験試料としては、例えば、精製タンパク質(抗体を含む)、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清、合成低分子化合物のライブラリー、土壌などの天然材料、放線菌ブロースなどの細菌放出物質を含む溶液などを挙げることが出来る。尚、試験試料は、必要に応じて適宜、標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などで標識して用いることが出来る。

[0032] 本発明のHNRを構成する少なくとも一つのタンパク質、即ち、gp130、CNTF－R及びWSX－1から成る群から選択される少なくとも一つのタンパク質をコードする遺伝子がノックアウトされている細胞は、当業者に公知の相同組換えを利用した遺伝子ターゲッティングにより調製することが出来る。このようなノックアウト細胞としてはマウス、ヒト等の哺乳類細胞が好ましく、更に、こうして得られたノックアウト細胞を使用して当業者に公知の手段を用いて各種のノックアウト動物を作製することが出来る。かかるノックアウト動物はヘテロ接合体又はホモ接合体である。特に、マウス及びラット等の齧歯類であるノックアウト動物は、アルツハイマー病等の神経変性を伴う疾病の研究に有用な実験動物として利用することが出来る。

[0033] 本発明のHNRに結合する化合物は、ヒューマニンに対するアゴニスト又はアンタゴニストとしての活性を有しているために、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、狂牛病、及び血管性痴呆症等の神経変性を伴う疾病一般の予防または治療に用いることが出来る。

[0034] 即ち、既に述べたように、これまでの研究からアルツハイマー病において神経細胞の細胞死が起こることが明らかにされている。このため、本発明の医薬組成物は、アルツハイマー病における神経変性を保護する薬剤として用いられることが期待される。また、本発明の医薬組成物を用いて、アルツハイマー病以外にも、例えば脳虚血による神経細胞の細胞死に起因する疾患を予防することも可能である(T. Kirino, 1982, Brain Res., 239:57－69)。その他、痴呆を伴うパーキンソン病(M. H. Po

lymeropoulos et al. , 1997, Science, 276:2045－2047)、びまん性レービー小体(Lewy bodies)病(M. G. Spillantini et al. , 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:6469－6473)、ダウン症に伴う痴呆なども、治療や予防の対象となる。また、APPの類縁分子であるAPLP1が、先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子といわれている(Lenkkeri, U. et al. , 1998, Hum. Genet. 102:192－196)ことから、ネフローゼ症候群などの腎疾患も治療や予防の対象となる。

[0035] 従って、本発明の医薬組成物はHNRに結合する化合物を有効成分として含有し、該有効成分自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化することも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、徐放剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。本発明の医薬組成物は、水溶液、錠剤、カプセル、トローチ、バッカル錠、エリキシル、懸濁液、シロップ、点鼻液、または吸入液などの形態であり得る。本発明化合物の含有率は、治療目的、投与経路、治療対象等に応じて、当業者が適宜決定することが出来る。

[0036] 患者への投与は、有効成分の性質に応じて、例えば、経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、腹腔内、静脈内、脊髄腔内、脳室内、または経口的に行なうことができる。例えば、脳神経変性疾患の治療に用いる場合においては、本発明の医薬組成物は、静脈内、脊髄腔内、脳室内または硬膜内注射を含む任意の適当な経路で中枢神経系に導入するのが望ましい。当業者であれば、患者の年齢、体重、症状、投与方法等に応じて、適宜適当な投与量を選択することが可能である。投与量、投与方法は、本発明の医薬組成物の有効成分の組織移行性、治療目的、患者の体重や年齢、症状等に応じて、当業者であれば適宜選択することが可能である。例えば、アルツハイマー病治療などにおいて、脳神経細胞の変性保護を目的とした投与を行う場合には、上記化合物が標的とする細胞周囲において神経変性を有効に抑制する濃度となるように投与されることが好ましい。すなわち、ヒューマニンポリペプチドまたはこれと同等の神経細胞死保護作用を有するものであれば、少なくとも1nM以上、好ましくは10nM以上、より好ましくは100nM以上、より好ましくは1μM以上となるように投与されるべきである。

[0037] 本発明の抗体としては、等業者に公知の任意の形態及び種類を含む。例えば、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体、並びに、当業者に公知の遺伝子工学的手法により調製することが可能な各種ヒト化抗体などのキメラ抗体も含まれる。

実施例

[0038] 以下、実施例に則して本発明を更に詳しく説明する。尚、本発明の技術的範囲はこれらの記載によって何等制限されるものではない。

[0039] 実験材料と実験方法

細胞株と遺伝子

神経ハイブリッド株F11細胞及びV642I-APP、K595N/M596L-APP (NL-APP)、M146L-PS1、N141-I-PS2 cDNAをコードするpcDNA3ベクターについてはすでに記述された通りに調製した(Hashimoto et al., 2000, 2001a, 2003)。PCAG-human gp130とpCAG-human gp130 ED(細胞外ヒトgp130)については報告に従った(Kumanogoh et al., 1997)。gp130の細胞膜ドメインと種々の細胞内ドメイン部分にG-CSFリセプターの細胞外ドメインを融合したpcDNAベクターについては報告に従い調製した(Fukuda et al., 1996)。gp130の細胞内ドメインはC端から短縮された。G277と称するキメラタンパクはgp130の細胞内ドメイン全長277アミノ酸を含み、G-195、G-133、G-68、G-25は細胞内ドメインアミノ酸1-195、1-133、1-68、1-25を含む。C末端にmycHisタグをつけたヒトWSX-1、mycHisタグをつけたマウスCREME9はヒトおよびマウス胚cDNA(BioChain)よりセンス、アンチセンスプライマのセットをもちい、ヒトWSX-1には(5'-ACTAGTACCATGCGGGGAGGCAGGGG-3'と5'-GAATTCGGCCAGAACCTGTGGCCTGG-3')、マウスCREM9には(5'-GGATCCACCATGAAGGGCGCGATGGAGCC-3'と 5'-GAATTCAAATACCAGCACTTTCCATCCAGG-3')を用いてPCRにより増幅した。C端にV5タグをつけたヒトCNTF-R(V5-CNTF-R)とラットIL-6R(pUCM18-rat IL-6R) をコードするプラスミドはインヴィトロジェンとアメリカンタイプカルチャーコレクションから各々購入した。家族性ALS(FALS)遺伝子G85R-SOD1をpEFBosベクターにコードするプラスミドは辻省次博士より贈与されたものである(Hashimoto et al., 2001a, Kanekura et al, 2004)。ヒト野生型gp130のコスミドは全長gp130をpAxCAwt(TaKaRa)のSwaIサイトに挿入することにより構築した。

[0040] リコンビナントサイトカインと可溶性リセプター

マウスカルディオトロピン1(CT1),ラットIL-6、マウスLIF、マウスIL11、可溶性ラットIL-6R、可溶性ヒトCNTF-R,リコンビナントマウスgp130／Fcキメラとリコンビナントヒト可溶性CNTF-RはR&Dシステム(ミネアポリス、ミネソタ、USA)から得た。ヒトIL-6、ヒトオンコスタティンM、ラットCNTF、ヒトGCSFはペプロテックEC Ltd (ロンドン、UK)から得た。ヒトCNTFはR&Dシステム或いはペプロテックEC Ltd.から得た。ヒトIL-27はR＆D社から入手した。

[0041] 抗体

抗マウスAPP抗体(22C11)と抗マウスPS1抗体はケミコン(Ternecula, CA, USA)より、抗PS2抗体とphoshoSTAT3(Tyr^{705})抗体はセルシグナリングテクノロジー(Beverly, MA, USA)より購入した。HRP結合或いは非結合抗mycモノクローナル抗体はバイオモル(Plymouth Meeting, PA)より購入した。HRP結合或いは非結合抗V5抗体はインヴィトロジェンから購入した。ラビットポリクローナル抗HN抗体PO4は報告したように作成した(Tajimaet al., 2002)。抗G-CSFR, gp130, CNTF-R, LIFR, SOD1, STAT3, IL-6R抗体はサンタクルツバイオテクノロジー(サンタクルツ、USA)から購入した。抗リン酸化チロシンモノクローナル抗体、4G10はアップステートUSA(チャーロテスヴィレ、バージニア、USA)から購入した。ふたつのラビットポリクローナル抗体、抗マウスWSX-1抗体はWSX-1のN末16アミノ酸に相当する合成ペプチドMNRLRVARLTPLELLL(mWSX-1-N)とC末16アミノ酸に相当する合成ペプチドYSGYEKHFLPTPEELGLLV(mWSX-1-C)をキーホールリンペットヘモシアニン(Sigma)に共有結合した物を免疫して得た。また、同様にしてふたつのラビットポリクローナル抗ヒトWSX-1抗体はWSX-1のN末17アミノ酸に相当する合成ペプチドMRGGRGAPFWLWPLPKC(hWSX-1-N)とC末20アミノ酸に相当する合成ペプチドLPTPEELGLLGPPRPQVLAC(hWSX-1-C)をキーホールリンペットヘモシアニン(Sigma)に共有結合した物を免疫して得た。抗マウスgp130中和抗体、抗マウスLIFR中和抗体、抗マウスIL-11R中和抗体、抗ヒトCNTF-R中和抗体、抗ラットCNTF-R中和抗体はR＆Dシステムから購入した。他のモノクローナル抗体、抗マウスgp130、RX435は慶應義塾大学医学部、福田博士より贈呈された。Baxに対する抗体はサンタクルツバイオテクノロジーより購入した(P-19)。

[0042] ペプチド

合成HN、合成S14G-HN(HNG)、C8A-HN (HNA)、ヒトアミロイド-β (1－42)ペプチドはペプチド研(箕面、大坂)から購入した。Biotin-HN, Biotin-HNGは神戸天然物化学株式会社より購入した。

[0043] トランスフェクション、細胞死アッセイ、細胞生存率アッセイ

トランスフェクションの方法は以前報告した(Hashimoto et al., 200, 2001a, 2003)。F11細胞を$7x10^4$／wellで6wellディッシュにまき、指示されたベクターを導入した。導入効率はこのプロトコールで一定して約70%であった。導入後72時間で、トリパンブルー除外アッセイ及びLDHアッセイにより細胞死率をもとめ、WST-8アッセイにより細胞生存率を求めた(Hashimoto et al., 2000, 2001a, 2003)。通常トランスフェクション開始後5時間後よりHNを添加したが、HN効果はほぼ同様のため、一部の実験ではHNを添加する時間を24時間後にした。

[0044] 初代培養皮質神経と細胞生存率アッセイ

初代培養マウス皮質ニューロン(PCN)は以前報告した方法で準備した(Sudo et al., 2000)。簡単に述べると、初代培養皮質ニューロンはICRマウス14日胚(E14)より得、ポリLリジンを表面処理した96穴プレート(住友ベークライト)にニューロン培地を使い2.5或いは$5x10^4$／wellで播種した、或いは6穴プレートに$1.0x10^6$/wellで播種し、ニューロンメディア(住友ベークライト)を用いた。(Hashimoto et al., 2003, Niikura et al., 2004)。3日後、細胞培地をN2サプリメントを含むDMEMに交換した。4日目にヴィトロで25μMのAβ1-43を示した濃度のHN或いはサイトカインと加え、可溶性サイトカインリセプター、あるいは中和抗体の存在下、非存在下でその影響をみた。処理後72時間でWST-8又はカルセイン蛍光法で細胞生存率を、トリパンブルー排除アッセイ又はLDHアッセイにより細胞死亡率を求めた(Hashimoto et al., 2000, 2001a,b, 2003)。

[0045] 免疫蛍光を基盤とした結合アッセイ(1)

F11細胞(6穴プレートに$7x10^4$／well)に示された量のV5-CNTF-RかmycHis-WSX-1をコードする発現プラスミドを必要に応じてPCAG-human gp130と一緒に導入し、その24時間後に96穴プレート($7x10^3$／well)に播き直した。導入後36時間目で、1

00nMのビオチンを標識したHNG-FLAGを10μMのHNG(S14G-HN)あるいはHNA(C8A-HN)存在下あるいは非存在下で添加した(Hashimoto et al., 2001a)。6時間の反応後細胞を4%パラフォルムアルデヒド/PBSで30分間固定した。PBSで洗浄後細胞をFITCを結合させたアビディン(モレキュラープローブ、ユージン、オレゴン、USA)で染色した。免疫蛍光強度を(励起=485nm,放出=535nm)蛍光吸収測定器(Wallac 1420 ARVOsx Multi Label Counter)で測定して得た。免疫ヒストケミカル解析がレーザースキャニング共焦点顕微鏡LSM(Carl Seiss, Germany)によりなされた。

[0046] 免疫蛍光を基盤とした結合アッセイ(2)

F11細胞(6穴プレートに$7x10^4$/well)に示された量のV5-CNTF-RかmycHis-WSX-1をコードする発現プラスミドを必要に応じてPCAG-human gp130と一緒に導入し、その24時間後にpoly-L-lysineコートした96穴プレート($7x10^3$/well)に播き直した。導入後36時間目で、表示された濃度のビオチンを標識したHNあるいはHNGを表示された濃度のHNG(S14G-HN)あるいはHNA(C8A-HN)存在下あるいは非存在下で添加した(Hashimoto et al., 2001a)。6時間の反応後細胞をPBSで洗浄後FITCを結合させたアビディン(モレキュラープローブ、ユージン、オレゴン、USA)で染色した。免疫蛍光強度を(励起=485nm,放出=535nm)蛍光吸収測定器(Wallac1420 ARVO sx Multi Label Counter)で測定して得た。免疫ヒストケミカル解析がレーザースキャニング共焦点顕微鏡LSM(Carl Seiss, Germany)によりなされた。

[0047] プルダウンアッセイ

F11細胞(6穴プレートで$7x10^4$/well)にmycHis-WSX-1、V5-CNTF-Rあるいはラット IL-6R(V6タグ)をコードするプラスミドを導入した。導入後48時間で細胞溶解液(セルライセート)をセファロース4B-HN或いはHNAでプルダウンアッセイをするために採取した。セファロース4BとHNあるいはHNAの結合反応は製造会社(Amersham Pharmacia Biotech, アプサラ、スエーデン)の指示どおり3mlのCNBr-活性化セファロース4Bと5mgのHN或いはHNAとをカップリングバッファー中(0.1M $NaHCO_3$ 0.5M NaCl, pH8.3)4℃で一晩反応させた。ビーズは非特異的結合を防ぐためブロッキングバッファー(0.2M グリシン、pH8.0)に2時間室温で反応させその後カップリングバッファーで洗浄し、プルダウンアッセイまで4℃で保存した。各プルダウンアッセイにおいて、1

00μlの細胞溶解液にたいして20μlの1:1セファローススラリーを用いた。

[0048] 免疫ブロット分析

セルライセート(10-20μg/lane)或いはプルダウン沈殿物をすでに報告したようにSDS-PAGEに処し、ゲル上で分画されたタンパクをPVDF膜に移した(Hashimoto et al., 2000)。免疫反応を起こしたタンパクバンドをECL法(Amsharm Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)により可視化した。

[0049] プラスミドを基盤とした小RNAi

マウスFPR2、マウスCNTF-R、マウスWSX-1、マウスIL-6R、及びマウスLIFRに対する小インターフェアリングRNA(sRNAi)をコードするプラスミドベクターを以下のように構築した。

マウスFPR2

センスDNA断片:

5'-AGGATCCCGTAACTACCACTAAGCAATGTCTTGATATCCGGACATTGCTTAGTGGTAGTTATTTTTTCCAAAAGCTTGCA-3'、

アンチセンスDNA断片:5'-TGCAAGCTTTTGGAAAAAATAACTTACCACTAAGCAATGTCCGGATATCAAGACATTGCTTAGTGGTAGTTACGGGATCCT-3。

マウスCNTF-R

センスDNA断片:5'-TTGGATCCCGTGTGTGCTGTGCCATCCGAGATTGATATCCGTCTCGGATGGCACAGCACACATTTTTTCCAAGGTACCTT-3'、

アンチセンスDNA断片:

5'-AAGGTACCTTGGAAAAAATGTGTGCTGTGCCATCCGAGACGGATATCAATCTCGGATGGCACAGCACACGGGATCCAA-3'。

マウスWSX-1

センスDNA断片:5'-TTGGATCCCATATCCACTTGAGAGAAGATCTTGATATCCGGATCTTCTCTCAAGGGATATTTTTTTCCAAGGTACCTT-3'、

アンチセンスDNA断片:5'-AAGGTACCTTGGAAAAAAATATCCACTTGAGGAAGATCCGGATATCAAGATCTTCTCTCAAGTGGATATGGGATCCAA-3'。

マウスIL-6R

センスDNA断片:5'-GCGGATCCCGTTTAAGCTGTGAAACGCTTCGTTGATATC
CGCGAAGCGTTTCACAGCTTAAATTTTTTCCAAAAGCTTGC-3'、
アンチセンスDNA断片:5'-GCAAGCTTTTGGAAAAAATTTAAGCTGTGAAACGC
TTCGCGGATATCAACGAAGCGTTTCACAGCTTAAACGGGATCCGC-3'。

マウスLIFR

センスDNA断片:5'-TTGGATCCCATATCCACTTGAGAGAAGATCTTGATATCC
GGATCTTCTCTCAAGGGATATTTTTTTCCAAGGTACCTT-3'、
アンチセンスDNA断片:5'-AAGGTACCTTGGAAAAAAATATCCACTTGAGGAAG
ATCCGGATATCAAGATCTTCTCTCAAGTGGATATGGGATCCAA-3'

マウスBax

センスDNA断片:5'- CGGGATCCCATGATCTGTTCAGAGCTGGTGTTGATATC
CGCACCAGCTCTGAACAGATCATTTTTTTCCAAGGTACCCC-3'
アンチセンスDNA断片:5'-GGGGTACCTTGGAAAAAAATGATCTGTTCAGAGCT
GGTGCGGATATCAACACCAGCTCTGAACAGATCATGGGATCCCG-3'。

これらのDNA断片は製造元の指示にしたがって加熱、加冷によりアニールさせた。これらアニールしたプライマーとpRNAU6.1/Shuttle空ベクター(GenScript, NJ, USA)をBamH1とKpnlを用い一晩37℃で消化反応させた。切られたDNA断片と空ベクターはGENE CLEAN IIキット(Q BIOgene, USA)で精製した。ライゲーションはLigation Convenience キット(NIPPON GENE, Tokyo, Japan)を用いてキットの指示にしたがって行った。これらのsiRNAベクター配列は直接配列を測定して確認し、siRNAプラスミドの効果は以下に述べるリアルタイムPCRによって確かめた。

[0050] リアルタイムPCR

内在性のmRNAを査定するためリアルタイムPCRを実施した。ISOGEN試薬(NIPPON Gene, Toyama, Japan)でRNAを抽出し、つづいて、リアルタイムPCRを行った。First strand cDNAをSensiscript逆転写酵素(QIAGEN, Germany)により0.5mgのトータルRNAから合成した。リアルタイムPCRはQuantiTect SYBR Green PCRキット(QIAGEN)を使って実施し、つづいてABI PRISM7700 (Applied Biosystems, Foster City CA)で分析した。センスプライマーとアンチセンスプライマーのセットを以下のように作成し

た。マウスCNTF-Rには5'-TTCCACCGTGACTCCTGCACCTG-3'、5'-GAGGGCTGGGTCCTTCTCACAGAC-3',マウスWSX-1には5'-CCGCAGAAAGCTCTCACCTGTCAG-3', 5'-CCATGGATATCCGTTCTCCACCTG-3'、マウスLIFRには5'-GTGGAAGATACGTCGGCAGACTCG-3', 5'-ACCCTGAAGGTCAGCAATCCTCAG-3'、マウス IL-6Rには(5'-CCCTGCCAGTATTCTCAGCAGCTG-3', 5'-CGGCCTTCCAGGTATGGCTGATAC-3')、マウス IL-6Rには5'-CCCTGCCAGTATTCTCAGCAGCTG-3', 5'-CGGCCTTCCAGGTATGGCTGATAC-3'、マウス Baxには5'- GGAATTCACCATGGACGGGTCCGGGGAGCAG-3', 5'-GGGGTACCGCCCATCTTCTTCCAGATGGTGAG-3',ヒト及びマウスG3PDHには5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'と5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'である。データ解析はSequence Detection System ver. 1.9.1(Applied Biosystem)でおこなった。各mRNA発現レベルを調整するためにG3PDH mRNAをコントロールとして用いた。

[0051] 統計解析

すべての細胞死実験、細胞生存実験、リアルタイムPCR、はn=3で行った。ヴィトロ実験の図におけるすべての値は平均値±SDである。Varianceの分析による統計処理がなされ、つづいてp<0.05で有意とされるpost hocテストがなされた。

[0052] 結果1:

ある種のタイロシンキナーゼやSTAT3がHNを介する神経保護作用シグナル経路に含まれている(Hashimoto et al., 2005)ということを考慮すると、HNリセプターがサイトカインリセプターファミリーに属すると考えられる。gp130はIL6Rリセプターファミリーに属するサイトカインリセプターに共通のサブユニットであるが、その細胞外ドメイン及び細胞膜ドメインを(gp130tr)を強制発現するか、あるいは、ヒトgp130の細胞外ドメイン(gp130ED)から成るリコンビナント可溶性ヒトgp130を添加すると、図1Aと図1Bに示すように、V642I-APPの過剰発現による毒性(A)及び25μMのAβによる毒性(B)にたいする、HNを介する神経保護作用を完全に抑制する。gp130EDとgp130trはドミナントネガティブ型として働くことが示されているので(Kumanogoh et al., 1997; Jostock et al., 1998)、この結果はHNを介する神経保護作用のシグナルはgp130を介していることを意味している。我々はさらにこの結果を確認するため、抗gp130中和

抗体を反応させてこのシグナルにどう影響するかを調べた。この抗マウスgp130抗体（RX435）はマウスgp130の機能を阻害し、ヒトgp130の機能は阻害しないことがすでに示されているが、この抗体はF11細胞においてHNを介する神経保護作用を抑制し（図1C）、一方、その抑制はこの抗体に対して感受性のないヒトgp130の同時発現により抑えられている（図1D）。この結果は明らかにこのHNシグナルにgp130が関与することを意味している。

[0053] 結果2:

さらにHNの神経保護作用シグナルにおけるgp130の介入を確認するために、種々のキメラタンパク、すなわち細胞外ドメインをG-CSF、細胞膜ドメインをgp130、細胞内ドメインを種々の長さにC端を短縮したヒトgp130を構築した（Fukuda et al., 1996）。G277と称するキメラタンパクはgp130の細胞内のすべてのドメインを、G-195、G-133, G-68, G-25、は各々、細胞内の1-195, 1-133, 1-68, 1-25番目のアミノ酸を含むものである（細胞内ドメインのN末端アミノ酸を1番目とする）。まず、最初にこれらのキメラタンパク質の発現を確認した（図2A）。G-277を発現させ100nM G-CSFで刺激するとV642I-APP発現により誘導される神経細胞死を抑制する。ところが、G-25あるいはG-68を発現させて同様に刺激してもその細胞死を抑制することはできなかった（図2B）。G-133が発現している場合は、同様の刺激は中間的にその細胞死を抑制した（図2B）。以前の研究でgp130の細胞内ドメインの3番目のチロシンが（これはG-133に含まれている）プロB細胞（proBcells）における抗アポプトーシス効果に必須であることが示されているので（Fukudaet al., 1996）、134-277に相当するドメインが介在する別のシグナルがAD関連の傷害による神経細胞死を100%保護するためには必要であることが推測された。同様に、G-277が発現されていると100nMのG-CSFによる刺激でNL-APP, M146L-PS1, N141I-PS2による神経細胞死を防御するが、一方、G-25が発現されたときは防御しなかった（図2C）。これらAD関連神経細胞死と対照的に100nMのG-CSFは家族性筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子として今までに示されたCu/Zn-SOD1変異体遺伝子が引き起こす神経細胞死を防御しなかった（図2D）。また、HN処理によりgp130のリン酸化レベルの増加が見られた（図2E）。

[0054] 結果3:

HNリセプターの分子的基盤を探究するため、今まで知られているIL-6ファミリーのサイトカインがHNを介する神経保護作用を模倣できるかどうか調べた。図3Aに示されるように、マウスカルディオトロピン－1（CT-1）、ラットIL-6、マウスIL-11、ヒトOSM、マウスLIF、マウスのCNTF-Rに結合可能であるヒトCNTFのどれもが生理的レベル（100ng/mlまで）でAβが誘導するF11の細胞死を抑制しなかった。このことはV642I-APP過剰発現による神経細胞死に対しても同様であった（データを示さず）。

[0055] IL-6リセプター、IL-11リセプター、LIFリセプター、あるいはCNTFリセプターとgp130がF11細胞及び初代培養脳皮質神経に発現しているので（YHとM.Mの未発表見解）これらリセプターのサブユニットと組み合わせられた機能的IL-6リセプター、IL-11リセプター、OSMリセプター、LIFリセプター、あるいはCNTFリセプターが生成されるはずである。従って、IL-6, IL-11,CT-1, OSM,LIF,そして、CNTFが誘導するgp130を介した経路はAD関連の傷害による細胞死には不十分であるという結論に達した。以上の知見から、HNがこれらのサイトカインリセプターと結合して神経保護作用を発揮しているという可能性は考えられない。

[0056] 結果4:

IL-6が介するシグナルを増大させるため、我々は可溶性IL-6リセプターα（sIL-6R）或いは可溶性CNTF-R（100 ng/ml）を添加し、それぞれのリガンドIL-6およびCNTF（100 ng/ml）で刺激しAβによる神経細胞死にたいする影響を調べた（図3B）。予想通りIL-6はsIL-6Rを発現させておくとgp130のホモ二量体化を誘導し、HNと同様の活性を示した。これに反してCNTFは可溶性CNTF-R(sCNTF-R)を過剰発現させてもHN様の活性を示すことはなかった。CNTFのCNTF-Rへの結合はgp130とLIF-Rとのヘテロ二量体化により細胞内シグナルを伝達することを考慮するとLIF-RはHNを介する神経保護作用には関与していないと推測される。

[0057] 結果5:

gp130結合受容体に対する中和抗体を用いて我々はさらに既知のgp130にカップルするリセプターがHNを介した神経保護作用に関与しているかどうかを調べた。その結果、抗ラットCNTF-R中和抗体はマウスCNTF-Rも認識すると考えられているが、このCNTF-Rに対する抗体がHN活性を消去することを見い出した（図3C）。図3Bにお

けるCNTF/可溶性CNTF-Rについての結果と合わせて考えると、CNTF-RがリガンドCNTFと会合しgp130とLIFRとのヘテロ二量体化を導く本来の形と全く違った形でHNシグナルに関与していると考えられる。さらに、IL-6RとLIF-Rに対する特異的なsiRNAをコードしたベクターを作成した(図3D)。これらベクターをF11細胞に発現させ内在性IL-6RあるいはLIF-R発現を低下させることで、HNを作用させたときのSTAT3のリン酸化を減弱させることはできなかった(図3E)。このことはHNがIL-6RやLIF-Rを介して細胞生存シグナルを伝えていないことを裏づけている。

[0058] 結果6:

更に、HNリセプター(HNR)分子基盤を探索するために、gp130とリセプター複合体を形成する(Pflanz et al., 2004)IL-27受容体であるWSX-1(Specher et al., 1998)、CNTF-R、及び、gp130と複合体を形成すると予測されるが未だあまり調べられていないリセプターCREME9(CRL4) (Boulay et al., 2003)をF11細胞株に過剰発現させることにより免疫蛍光HNとの結合アッセイを内在レベルのHNRとHNの結合が反映されない条件(免疫蛍光を基盤とした結合アッセイ(1))で行った。

[0059] F11細胞にヒトWSX-1或いはヒトCNTF-Rを発現させるとHN結合が増加したが、CREME9を同様に発現させてもHNの結合量は増えなかった(図4A)。同じアッセイにおいて、CNTF-RとWSX-1の同時過剰発現は HN結合量を相乗的に増加させた(図4A)。各々のタンパク質の発現は免疫ブロットにより確認した。この結果はCNTF-RとWSX-1がHNRの成分であることを示唆している。HNが特異的にWSX-1と結合するかを確認するために、HNの1000倍活性の誘導体HNG或いはネガティブコントロールとして活性のないHNAの多量存在下でHN結合実験をおこなった(図4B)。WSX-1とgp130を発現した細胞においてHNの結合をHNGは抑制したがHNAは抑制しなかった。このことは、HNがWSX-1に特異的に結合することを示している。HNあるいはHNAを共有結合させたセファロース4Bビーズによる In vitroプルダウンアッセイにおいて、HNはF11細胞中に過剰発現させたCNTF-R とWSX-1に結合するが、IL-6受容体に結合しないことを見いだした(図4C)。また、HNと異なり、HNA はこれら受容体と結合しないことを確認した(図4C)。

[0060] 結果7:

HNを介する神経保護作用シグナルにCNTF-RとWSX-1の関与を確認するために、プラスミドsiRNA法をもちいて、これらタンパクの発現をF11細胞株においてノックダウンした。この方法の効率はリアルタイムPCRによるmRNAとウェスタン法による蛋白定量により検討した(Sui et al., 2001, Kanekura et al., 2004)(図5A)。ネガティブコントロールとして、最近発表されたHN受容体であるマウスFPR-2(Ying et al., 2004)のsiRNAを用いた。図5Bに示すように、内在性WSX-1発現を阻止すると、V642I-APP過剰発現による神経細胞死に対するHN活性が完全に消滅した。CNTF-R発現を抑制すると、HN活性がコントロールにくらべ30%減少した。ところが、FPR-2発現を抑制してもHN活性は減少しなかった。更に、ヒトCNTF-RあるいはヒトWSX-1を各々発現させるとマウスのCNTF-RおよびWSX-1のsiRNAによって抑制されていたHN活性は完全に回復した(図5C)。以上の結果はCNTF-RとWSX-1がHNのリセプターの成分であることを強く支持するものである。CNTF-Rの中和抗体がHN活性を完全に阻害すること(図3C)、一方siRNAによるCNTF-Rの発現抑制がWSX-1の場合に比べて不完全であることを考えると(図5A)、CNTF-R発現の不完全な抑制の為に、図5BにおいてHN活性を完全に押さえられなかったと考えられた。

[0061] 結果8:

CNTF-RがWSX-1と複合体を形成し得るかを調べた。mycタグをヒトWSX-1に付け、V5タグをヒトCNTF-Rにつけてcos7細胞に過剰発現し、共免疫沈降実験により、解析した。図6Aに示されるように、WSX-1の免疫沈降はCNTF-Rを共沈させCNTF-Rの免疫沈降はWSX-1を共沈させた。このことはWSX-1がCNTF-Rと結合していることを示唆している。

[0062] 結果9:

HN処理によりCNTF-RとWSX-1、あるいはWSX-1とgp130の結合が誘導される。図6Bで示すように、F11細胞に10nMのHNGあるいはHNA処理をして、0、1、3、6時間後に細胞回収し、gp130抗体及びCNTF-R抗体で免疫沈降し、その沈降物をmWSX-1抗体で免疫ブロット解析を行った。その結果、HNG処理により特異的に内在レベルの発現において、CNTF-RとWSX-1、あるいはWSX-1とgp130の結合が誘導されることが明らかになった。

[0063] 結果10:

IL-27はWSX-1／gp130をその受容体とすることが報告されている。従って、IL-27はHNと同様な効果を示す可能性がある。予想通り、F11細胞に対して、IL-27を処理すると、高濃度領域(1-10μM)でHN様効果を示した。しかも同時に、100nM以下のIL-27処理は逆にHNの効果を抑制することが判明した(図7)。

[0064] 結果11:

さらに、より感度の高い免疫蛍光を基盤とした結合アッセイ(2)を開発し、内在レベルのHN受容体との結合を検出することに成功した。このアッセイ方法を用いて、HNあるいはHNGとHNRの結合の強さを内在レベルのHNRをもつF11細胞(図8、左の2パネル)とCNTF-R／WSX-1／gp130をトランスフェクッションにより高発現させたF11細胞(右の2パネル)を用いて結合アッセイを行った。上2パネルはHN、下2パネルはHNGの結合を検討した。その結果、HNとHNGは各々、10μMと10nMの濃度で飽和する濃度依存性の結合を示し、各々のKDは1-10μMと1-10nMの範囲にあることが判明した。結合の特異性はビオチンラベルのしていないHNとHNGを過剰量添加することで結合がほぼ完全に抑制されることで確認された。以上で得られたHNあるいはHNGとHNRの結合のパラメーターは以前の研究で報告した(Hashimoto et al., 2001 a, b) HNあるいはHNGの神経細胞死抑制活性のパラメーターとほぼ完全に合致した(図8A)。

[0065] 結果12:

また、HNあるいはHNGと内在レベルHNRの結合がCNTF-RとWSX-1発現に依存することをsiRNAの手法を用いて、内在性のCNTF-RとWSX-1発現を低下させたF11細胞で各々の活性が影響をうけるかどうかを検証することにより、確認した(図8B)。図8Bに示すように内在性のCNTF-RあるはWSX-1発現を低下させたF11細胞では著明に両者の結合が低下し、CNTF-RとWSX-1両者を同時に発現低下させるとほぼ完全にHNあるいはHNGとF11細胞との結合が阻止された。FPR2あるいはLIFRの発現低下により、結合は影響を受けなかった。これらの事実は、HNあるいはHNGとF11細胞との結合はCNTF-RとWSX-1発現に依存することを意味している。

[0066] 結果13:

さらに、より生理的な神経細胞であるPCNを用いて、F11細胞で既に観察した(図7)と同じく、高濃度IL-27,CNTF処理がHNとPCN細胞の結合を阻害するかどうか検討した。F11細胞での結果と同じように、100nM-1μMのIL-27処理はHNのPCNへの結合を抑制することが判明した(図9A)。また、同濃度のCNT-FもIL-27と同じくHNのPCNへの結合を抑制するが、IL-6にはそのような効果がないことが明らかになった。

[0067] 結果14:

結合阻害実験の結果に合致するように、F11細胞と同じパターンで、PCN細胞においても高濃度IL-27はHN様効果をもち、かつ、HNの機能を抑制することが示された(図9B)。また、CNT-FもIL-27と同様にHNの機能を抑制すること、さらに、HNの機能はWSX-1抗体(mWSX-1-N)処理で抑制されることも判明した。これらの結果はPCNにおいてもF11細胞と同じく、HNはCNTF-R/WSX-1/gp130を受容体として機能していることを支持している。

[0068] 結果15:

実際 PCNにはF11細胞と同じく、WSX-1の発現が確認された(図10A及びB)。

[0069] 結果16:

F11細胞においてCNT-FやIL-27処理はSTAT3の706番目のチロシンリン酸化を亢進させるが、HNやHNGもSTAT3をリン酸化することをみいだした(図11A)。さらに、siRNAを用いて内在性CNTF-RあるいはWSX-1発現を低下させるとHNGによるSTAT3の706番目のチロシンリン酸化はほぼ完全に抑制された(図11B)。この結果はHNあるいはHNGはCNTF-RあるいはWSX-1依存的にSTAT3の706番目のチロシンリン酸化を引き起こしていることを意味ししている。

[0070] 結果17:

マウスBaxに対する特異的なsiRNA(siRNA-Bax)を作成した。このsiRNAをF11細胞に発現させると内在性の Bax mRNA量と蛋白量が著明に減少した(図12A, B)。さらに、スタウロスポリン誘導性のF11細胞アポトーシスに対してsiRNA-Baxは著明な抑制効果示したため、このsiRNA-Bax は有効に機能していると判断された(図12C)。そこで、F11細胞の内在性Baxの発現をsiRNA-Baxで抑制し、HNによるV642I-APPやM146L-PS1高発現誘導性F11神経細胞死の抑制効果に如何なる変化が出るか調べ

た。陽性コントロールとしてWSX-1に対するsiRNAの効果を同時に検討した。まず、V642I-APPによる神経細胞死自体にsiRNA-Bax が抑制効果をもつことが判明したため、V642I-APPによる神経細胞死を検出する系ではHN作用に対するsiRNA-Bax の効果を検証することはできなかった。一方、M146L-PS1誘導性神経細胞死に対してはsiRNA-Bax が抑制効果をもつことはなく、従ってHN作用に対するsiRNA-Bax の効果を検証することが可能であった。図12Dで示すように、内在性のBax発現を抑制しても、HNのM146L-PS1誘導性神経細胞死に対する抑制効果は全く影響を受けなかった。従って、HNの細胞死抑制効果はBaxの機能を抑制することで発揮されているのではないことが結論された。また、図12Eで示すように内在性WSX-1とCNTFR、発現を同時に抑制した場合と異なり、内在性Bax発現を抑制しても、HNのF11細胞に対する結合活性は全く抑制できなかった。以上の2つの結果は少なくともF11細胞においてはHNのターゲットが細胞内のBaxではないことを支持している。

[0071] 以下に挙げる技術文献の内容は本明細書に引用され、その開示内容の一部と見なされる。

[0072] D. Artis, A. Villarino, M. Silverman, W. He, E. M. Thornton, S. Mu, S. Summer, T. M. Covey, E. Huang, H. Yoshida, G. Koretzky, M. Goldschmidt, G. D. Wu, F. de S auvage, H. R. P. Miller, C. J. M. Saris, P. Scott, and C. A. Hunter (2004)
The IL-27 Receptor (WSX-1) is an Inhibitor of Innate and Adaptive Elements of Typ e 2 Immunity. J. Immunol., 173, 5626 - 5634.

Dimitra Benaki, Christos Zikos, Alexandra Evangelou, Evangeli Livaniou, Metaxia Vl assi, Emmanuel Mikros, and Maria Pelecanou, (2005)
Solution structure of humanin, a peptide against Alzheimer's disease-related neurot oxicity Biochemical and Biophysical Research Communications
329, 152-160

Jean-Louis Boulay, John J. O'Shea and William E. Paul (2003) Molecular Phylogeny

within Type I Cytokines and Their Cognate Receptors. Immunity 19, 159-163

Martin J. Boulanger and K. Christopher Garcia (2004)
Shared Cytokine Signaling Receptors: Structural Insights from the Gp130 System
Advances in Protein Chemistry 68, 107-146

Chen, Q., N. Ghilardi, H. Wang, T. Baker, M. H. Xie, A. Gurney, I. S. Grewal, F. J . de Sauvage. (2000) Development of Th1-type immune responses requires type I cy tokine receptor TCCR. Nature 407:916.

Dar-chone Chow, Lena Brevnova, Xiao-lin He, Monika M. Martick, Alex Bankovich and K. Christopher Garcia, (2002) A structural template for gp130-cytokine signali ng assemblies Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1592 , 225-235

Covey, R. Faggoni, S. Mu, M. Xia, A. C. Wakeham, H. Nishina, J. Potter, et al (200 1). WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to L. major infection. Immunity 15:569

Fernandez-Madrid I., Levy E., Marder K., Frangione B., 1991. Codon 618 variant o f Alzheimer amyloid gene associated with inherited cerebral hemorrhage. Annals of Neurology 30(5), 730-733.

Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y, Takahashi-Tezuka M, Fujitani Y, Yamaguchi T, Na kajima K, Hirano T. 1996
Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp13 0: involvement of STAT3 in anti-apoptosis.
Immunity. ;5,449-60.

Hardy J., Selkoe D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progres s and problems on the road to therapeutics. Science, 297(5580), 353-356.

Guo, B., D. Zhai, E. Cabezas, K. Welsh, S. Nouraini, A.C. Satterthwait, and J.C. R eed 2003. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. Nature 423:456-461.

Hashimoto Y., Niikura T., Ito Y., Nishimoto I., 2000. Multiple mechanisms underlie neurotoxicity by different types of Alzheimer's disease mutations of amyloid precurs or protein. Journal of Biological Chemistry 275(44), 34541-34551.

Hashimoto Y., Niikura T., Tajima H., Yasukawa T., Sudo H., Ito Y., Kita Y., Kawas umi M., Kouyama K., Doyu M., Sobue G., Koide T., Tsuji S., Lang J., Kurokawa K., Nishimoto, I., 2001a. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spect rum of familial Alzheimer's disease genes and A β . Proceedings of the National Acad emy of Sciences of the United States of America 98(11), 6336-6341.

Hashimoto Y., Niikura T., Ito Y., Sudo H., Hata M., Arakawa E., Abe Y., Kita Y., N ishimoto I., 2001b. Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor Humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults. Journal of Neuroscien ce 21(23), 9235-9245.

Hashimoto Y., Ito Y., Arakawa E., Kita Y., Terashita K., Niikura T., Nishimoto I., 2 002. Neurotoxic mechanisms triggered by Alzheimer's disease-linked mutant M146L presenilin 1: involvement of NO synthase via a novel pertussis toxin target. Journal of Neurochemistry 80(3), 246-237.

Hashimoto Y., Niikura T., Chiba T., Tsukamoto E., Kadowaki H., Nishitoh H., Yam agishi Y., Ishizaka M., Yamada M., Nawa M., Terashita K., Aiso S., Ichijo H., Nishi moto I., 2003. The cytoplasmic domain of Alzheimer's amyloid precursor protein ca uses sustained ASK1/JNK-mediated neurotoxic signal via dimerization. Journal of P harmacology and Experimental Therapeutics 306(3), 889-902.

Hashimoto Y, Terashita K, Niikura T, Yamagishi Y, Ishizaka M, Kanekura K, Chiba T, Yamada M, Kita Y, Aiso S, Matsuoka M, Nishimoto I. (2004)
Humanin antagonists: mutants that interfere with dimerization inhibit neuroprotectio n by Humanin. Eur J Neurosci. 19:2356-64.

Hashimoto Y, Suzuki H, Aiso S, Niikura T, Nishimoto I, Matsuoka M. (2005)
Involvement of tyrosine kinases and STAT3 in Humanin-mediated neuroprotection. Life Sci. in press Jul 5

Ip NY, Yancopoulos GD. (1996) The neurotrophins and CNTF: two families of collab orative neurotrophic factors. Annu Rev Neurosci. 1996;19:491-515.

T. Jostock, J. Muellberg, S. oezbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M.F . Neurath and S. Rose-John, Eur. J. Biochem. 268 (2001), pp. 160-167.

Jung S.S., Van Nostrand W.E., 2003. Humanin rescues human cerebrovascular smoo th muscle cells from Aβ-induced toxicity. Journal of Neurochemistry 84(2), 266-27 2.

Kanekura, K., Hashimoto, Y., Niikura, T., Aiso, S., Matsuoka, M., Nishimoto, I. (20 04) J. Biol. Chem.. 279, 19247-56

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multh aup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease am yloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature 325: 733-736

Kariya S., Takahashi N., Ooba N., Kawahara M., Nakayama H., Ueno S., 2002. Hum anin inhibits cell death of serum-deprived PC12h cells. Neuroreport 13(6), 903-907.

Kariya S., Takahashi N., Hirano M., Ueno S., 2003. Humanin improves impaired met abolic activity and prolongs survival of serum-deprived human lymphocytes. Molecul ar and Cellular Biochemistry 254(1-2), 83-89.

Kawasumi M, Chiba T, Yamada M, Miyamae-Kaneko M, Matsuoka M, Nakahara J, T omita T, Iwatsubo T, Kato S, Aiso S, Nishimoto I, Kouyama K (2004a) Targeted intr oduction of V642I mutation in amyloid precursor protein gene causes functional abn ormality resembling early stage of Alzheimer's disease in aged mice. Eur J Neurisci 19: 2826-2838

Kumanogoh A, Marukawa S, Kumanogoh T, Hirota H, Yoshida K, Lee IS, Yasui T, Y oshida K, Taga T, Kishimoto T.1997
Impairment of antigen-specific antibody production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of gp130.
Proc Natl Acad Sci U S A. 94, 2478-82.

Le Y., Gong W., Tiffany H.L., Tumanov A., Nedospasov S., Shen W., Dunlop N.M., Gao J.-L., Murphy P.M., Oppenheim J.J., Wang J.M., 2001. Amyloid β_{42} activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. Journal of Neuroscien ce 21, RC123.

Loo D.T., Copani A., Pike C.J., Whittemore E.R., Walencewicz A.J., Cotman, C.W. , 1993. Apoptosis is induced by β-amyloid in cultured central nervous system neuro ns. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Ameri ca 90(17), 7951-7955.

Luo J.J., Wallace W., Riccioni T., Ingram D.K., Roth G.S., Kusiak J.W., 1999. Deat h of PC12 cells and hippocampal neurons induced by adenoviral-mediated FAD hum an amyloid precursor protein gene expression. Journal of Neuroscience Research 55(5), 629-642.

Mueller-Newen, G., Kuester, A., Hemmann, U., Keul, R., Horsten, U., Martens, A. , Graeve, L., Wijdenes, J. and Heinrich, P. C. (1998) Soluble interleukin-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on interleukin-6 responses. J. Immunol. 161, 6347-6355

Minami M, Inoue M, Wei S, Takeda K, Matsumoto M, Kishimoto T, Akira S. 1996 S TAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and gro wth arrest of a myeloid cell line. Proc Natl Acad Sci U S A. 93(9):3963-6.

Monsonego A., Weiner H.L., 2003. Immunotherapeutic Approaches to Alzheimer's Disease. Science 302(5646), 834-838.

Neve RL, McPhie DL, Chen Y (2000) Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyl oid precursor protein. Brain Res 886: 54-66.

Niikura T, Yamada M, Chiba T, Aiso S, Matsuoka M, Nishimoto I (2004) Characteri zation of V642I-AbPP-induced cytotoxicity in primary neurons. J Neurosci Res 77:

54-62

Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Takahashi S, Okamoto T, Murayama, Y, Ogat a E (1993) Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP binding p rotein Go. Nature 362: 75-79

Nishimoto I., Matsuoka M., Niikura T., 2004. Unravelling the role of Humanin. Tren ds in Molecular Medicine 10(3), 102-105.

Nishimura I., Uetsuki T., Dani S.U., Ohsawa Y., Saito I., Okamura H., Uchiyama Y. , Yoshikawa K., 1998. Degeneration in vivo of rat hippocampal neurons by wild-type Alzheimer Amyloid Precursor Protein overexpressed by adenovirus-mediated gene t ransfer. Journal of Neuroscience 18(7), 2387-2398.

Pelletier S., Duhamel F., Coulombe P., Popoff M.R., Meloche S., 2003. Rho Family GTPases Are Required for Activation of Jak/STAT Signaling by G Protein-Coupled Receptors. Molecular and Cellular Biology 23(4), 1316-1333.

Pflanz, S., J. C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kansler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Churakova, M. Travis, E. Vaisberg, et al 2002. IL-27, a heterodimeric cyokine c omposed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. Imm unity 16:779

Stefan Pflanz, Linda Hibbert, Jeanine Mattson, Rency Rosales, Elena Vaisberg, J. Fe rnando Bazan, Joseph H. Phillips, Terrill K. McClanahan, Rene de Waal Malefyt and Robert A. Kastelein (2004) WSX-1 and Glycoprotein 130 Constitute a Signal-Trans ducing Receptor for IL-27 The Journal of Immunology, 172: 2225-2231.

Rawlings J.S., Rosler K.M., Harrison D.A., 2004. The JAK/STAT signaling pathway. Journal of Cell Science 117(Pt 8), 1281-1283.

Rohn T.T., Ivins K.J., Bahr B.A., Cotman C.W., Cribbs D.H., 2000. A monoclonal antibody to amyloid precursor protein induces neuronal apoptosis. Journal of Neuroc hemistry 74(6), 2331-2342.

R. Salcedo, J. K. Stauffer, E. Lincoln, T. C. Back, J. A. Hixon, C. Hahn, K. Shafer-Weaver, A. Malyguine, R. Kastelein, and J. M. Wigginton (2004)
IL-27 Mediates Complete Regression of Orthotopic Primary and Metastatic Murine Neuroblastoma Tumors: Role for CD8+ T Cells J. Immunol. 173, 7170 - 7182.

Scheller J, Schuster B, Hoelscher C, Yoshimoto T, and Rose-John S. (2005), No inh ibition of IL-27 signaling by soluble gp130. Biochemical and Biophysical Research C ommunications 326, 724-728

Shastry B.S., Giblin F.J., 1999. Genes and susceptible loci of Alzheimer's disease. B rain Research Bulletin 48(2), 121-127.

Sponne I., Fifre A., Koziel V., Kriem B., Oster T., Pillot T., 2004. Humanin rescues cortical neurons from prion-peptide-induced apoptosis. Molecular and Cellular Neu roscience 25(1), 95-102.

Sprecher, C. A., F. Grant, J. W. Baumgartner, S. R. Presnell, S. K. Schrader, T. Ya magiwa, T. E. Whitmore, P. J. O'Hara, D. F. Foster. 1998. Cloning and characteriz ation of a novel class I cytokine receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 246:82

Sudo H., Hashimoto Y., Niikura T., Shao Z., Yasukawa T., Ito Y., Yamada M., Hata

M., Hiraki T., Kawasumi M., Kouyama K., Nishimoto I., 2001. Secreted Aβ does not mediate neurotoxicity by antibody-stimulated amyloid precursor protein. Biochemical Biophysical Research Communications 282(2), 548-556.

Sui G, Soohoo C, Affar EB, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y (2002) A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA 99: 5515-5520

Tajima H, Kawasumi M, Chiba T, Yamada M, Yamashita K, Nawa M, Kita Y, Kouyama K, Aiso S, Matsuoka M, Niikura T, Nishimoto I.(2005) A humanin derivative, S14G-HN, prevents amyloid-beta-induced memory impairment in mice.J Neurosci Res. 2005 79, 714-23.

Terashita K., Hashimoto Y., Niikura T., Tajima H., Yamagishi Y., Ishizaka M., Kawasumi M., Chiba T., Kanekura K., Yamada M., Nawa M., Kita Y., Aiso S., Nishimoto I., 2003. Two Ser residues distinctly regulate the rescue function of Humanin, an inhibiting factor of Alzheimer's disease-related neurotoxicity: functional potentiation by isomerization and dimerization. Journal of Neurochemistry 85(6), 1521-1538.

Tetsuya Taga (1997) gp130 AND THE INTERLEUKIN-6 FAMILY OF CYTOKINES Annual Review of Immunology 15: 797-819

Tsukamoto E., Hashimoto Y., Kanekura K., Niikura T., Aiso S., Nishimoto I., 2003. Characterization of the toxic mechanism triggered by Alzheimer's amyloid-β peptides via p75 neurotrophin receptor in neuronal hybrid cells. Journal of Neuroscience Research 73(5), 627-636.

Turkson J., Jove R. 2000 STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug di

scovery Oncogene 19(56), 6613-6626

Wolozin B., Iwasaki K., Vito P., Ganjei J.K., Lacana E., Sunderland T., Zhao B., Ku siak J.W., Wasco W., D'Adamio L., 1996. Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. Science 274(5293), 171 0-1713.

Yamagishi Y, Hashimoto Y, Niikura T, Nishimoto I. (2003) Identification of esse ntial amino acids in Humanin, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-r elevant insults. Peptides. 24, 585-95.

Yamatsuji T., Matsui T., Okamoto T., Komatsuzaki K., Takeda S., Fukumoto H., Iw atsubo T., Suzuki N., Asami-Odaka A., Ireland S., Kinane T.B., Giambarella U., Nis himoto I., 1996a. G protein-mediated neuronal DNA fragmentation induced by famili al Alzheimer's disease-associated mutants of APP. Science 272(5226), 1349-1352.

Yamatsuji T., Okamoto T., Takeda S., Murayama Y., Tanaka N., Nishimoto I., 1996 b. Expression of V642 APP mutant causes cellular apoptosis as Alzheimer trait-linke d phenotype. EMBO Journal 15(3), 498-509.

Ying G., Iribarren P., Zhou Y., Gong W., Zhang N., Yu Z.X., Le Y., Cui Y., Wang J .M., 2004. Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the G protein-c oupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor. Journal of Immunolog y 172(11), 7078-7085.

Yoshida, H., S. Hamano, G. Senaldi, T. A. V. Villarino, E. Huang, and C. A. Hunter (2004) Understanding the Pro- and Anti-Inflammatory Properties of IL-27 J. Immun ol., 173, 715 - 720.

産業上の利用可能性

[0073] 本発明によって解明されたヒューマニン様ポリペプチド受容体(HNR)は、HNの神経保護作用などの活性を発揮する細胞内シグナル経路を促進あるいは抑制するメカニズムの解明に有用であると共に、神経変性疾患、特にアルツハイマー病の治療薬開発等の臨床応用に役立てることが出来る。

請求の範囲

[1] gp130又はその部分ポリペプチド、CNTF受容体α鎖(CNTF－R)及びWSX－1から成る群から選択される少なくとも2種の蛋白質を含むヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体(HNR)。

[2] gp130又はその部分ポリペプチド、CNTF－R及びWSX－1から構成されるヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体。

[3] gp130又はその部分ポリペプチド及びWSX－1から構成されるヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体。

[4] gp130の部分ポリペプチドが、少なくとも細胞内ドメインの1-133番目のアミノ酸配列を有する、請求項1～3のいずれか一項に記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体。

[5] CNTF－R及びWSX－1から構成されるヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体。

[6] gp130、CNTF－R及びWSX－1がヒト由来の蛋白質である、請求項1～5のいずれか一項に記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体。

[7] 請求項1～6のいずれか一項に記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物のスクリーニング方法。

[8] ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物が、該受容体の細胞外ドメインに結合する、請求項7記載のスクリーニング方法。

[9] ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物が、該受容体の細胞内ドメインに結合する、請求項7記載のスクリーニング方法。

[10] ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物が、該受容体アゴニストである、請求項7記載のスクリーニング方法。

[11] ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物が、該受容体アンタゴニストである、請求項7記載のスクリーニング方法。

[12] 請求項7～11のいずれか一項に記載のスクリーニング方法であって、

(a) ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体又はそれを構成する少なくとも1つのタンパク質に試験試料を接触させる工程、

(b)該受容体と該試験試料に含まれる化合物との結合特性を測定する工程、及び

(c)該受容体に結合する化合物を選択する工程、を含む前記方法。

[13] ヒューマニン又はヒューマニン様ポリペプチドの存在下で、ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体又はそれを構成する少なくとも1つのタンパク質に試験試料を接触させることを特徴とする、請求項12記載のスクリーニング方法。

[14] ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体又はそれを構成する少なくとも1つのタンパク質が細胞で強制発現されているものである、請求項12又は13に記載のスクリーニング方法。

[15] ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体が、該受容体を構成する少なくとも一つのタンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクターによって形質転換された細胞で強制発現されているものである、請求項12又は13に記載のスクリーニング方法。

[16] 該受容体と化合物との結合特性を、神経細胞死に対する拮抗作用又は抑制作用の変化を検出することにより測定する、請求項12～15のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

[17] 該受容体と化合物との結合特性を、SATAT3の706番目のチロシンのリン酸化の亢進又は抑制を検出することにより測定する、請求項12～15のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

[18] 無細胞系において実施する請求項7～12のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

[19] gp130、CNTF－R及びWSX－1から成る群から選択されるヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体を構成する少なくとも一つのタンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクターによって形質転換された細胞。

[20] ヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体が強制発現されている請求項19記載の形質転換細胞。

[21] gp130、CNTF－R及びWSX－1から成る群から選択されるヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体を構成する少なくとも一つのタンパク質をコードする遺伝子がノックアウトされている細胞。

[22] ES細胞である、請求項21記載の細胞。

[23] 請求項22記載のES細胞に由来するヒト以外のノックアウト動物。

[24] ホモ接合体である、請求項23記載のノックアウト動物。

[25] 齧歯類である、請求項23又は24記載のノックアウト動物。

[26] 請求項1から6のいずれかに記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物を有効成分とする神経細胞死抑制剤である医薬組成物。

[27] 請求項1から6のいずれかに記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物を有効成分とする神経変性を伴う疾病の予防または治療に用いられる医薬組成物。

[28] 請求項1から6のいずれかに記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物を有効成分とするアルツハイマー病の予防または治療に用いられる医薬組成物。

[29] 請求項1から6のいずれかに記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物を有効成分とする筋萎縮性側索硬化症の予防または治療に用いられる医薬組成物。

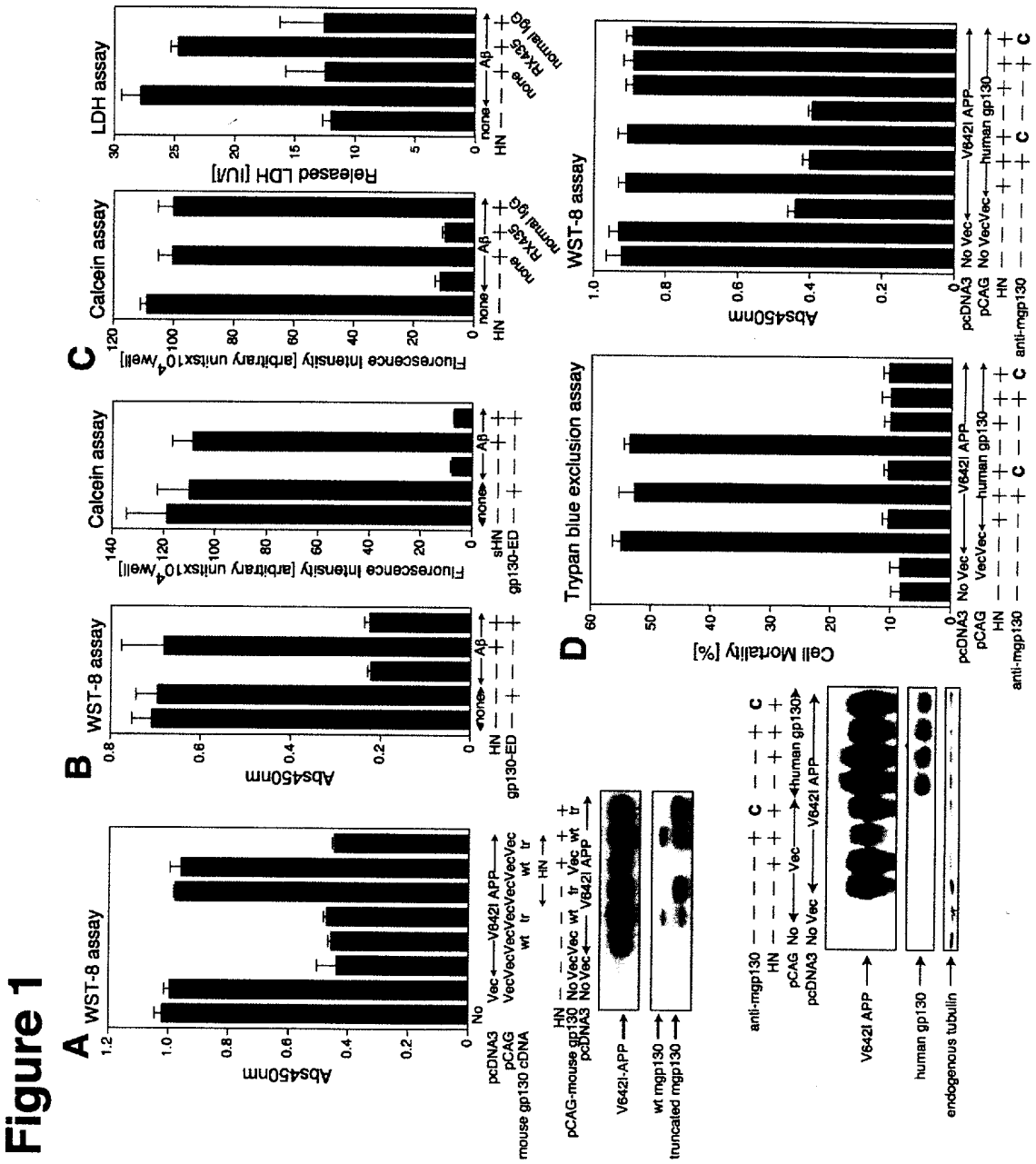
[30] 請求項1から6のいずれかに記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物を有効成分とする狂牛病の予防または治療に用いられる医薬組成物。

[31] 請求項1から6のいずれかに記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に結合する化合物を有効成分とする血管性痴呆症の予防または治療に用いられる医薬組成物。

[32] 請求項1から6のいずれかに記載のヒューマニン受容体又はヒューマニン様ポリペプチド受容体に特異的に結合する抗体。

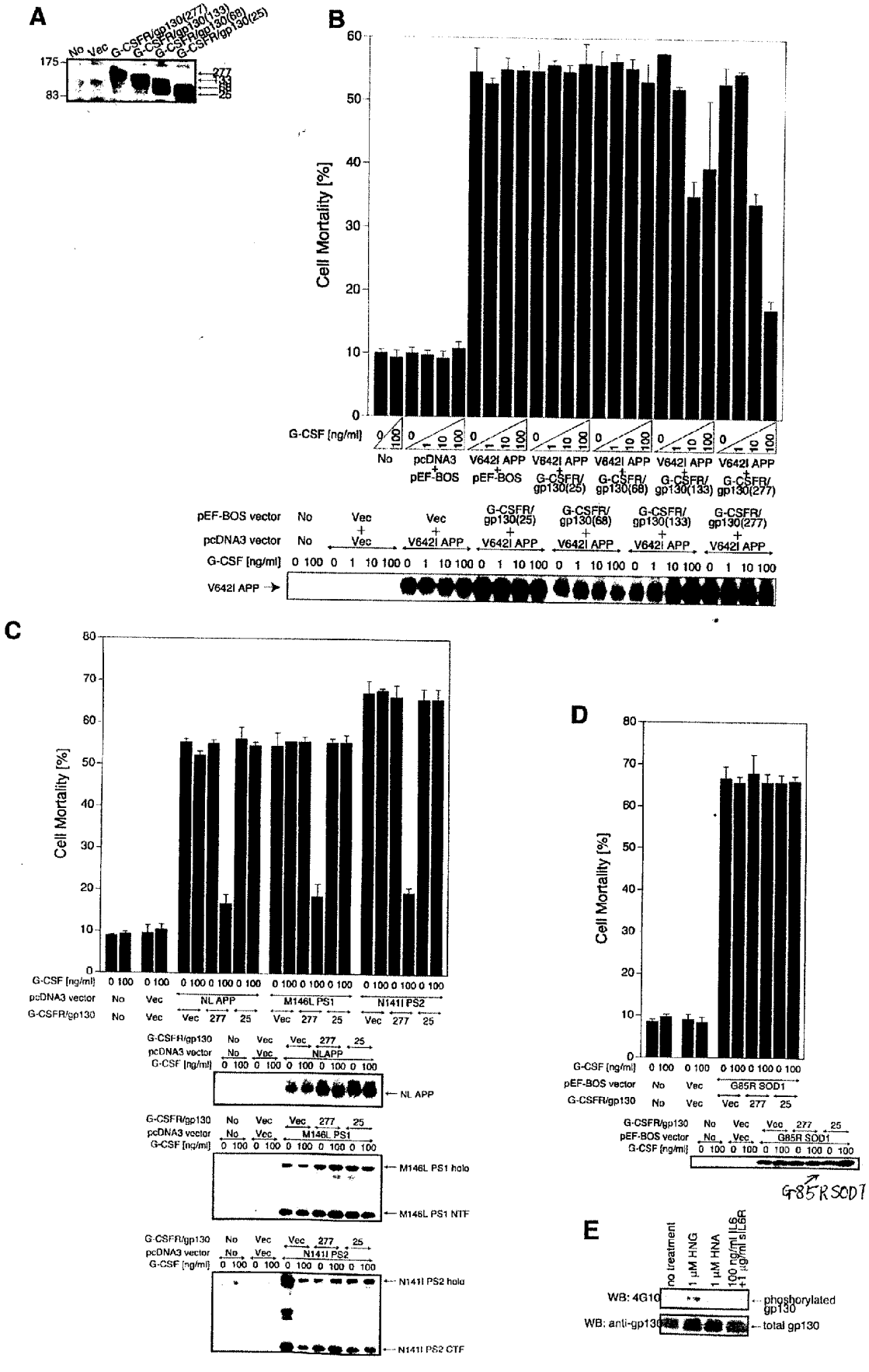
[図1]

Figure 1


A
WST-8 assay
Abs450nm
No
Vec
V642I APP
pcDNA3
pCAG
mouse gp130 cDNA
VecVecVecVecVecVecVec
wt tr
HN
pCAG-mouse gp130
pcDNA3
No Vec
V642I APP
V642I-APP
wt mgp130
truncated mgp130
B
WST-8 assay
Abs450nm
none
Aβ
HN
gp130-ED
Calcein assay
Fluorescence Intensity [arbitrary units x10^4/well]
sHN
C
Calcein assay
Fluorescence Intensity [arbitrary units x10^4/well]
RX435
normal IgG
LDH assay
Released LDH [IU/l]
anti-mgp130
pCAG
No Vec
Vec
human gp130
V642I APP
V642I APP
human gp130
endogenous tubulin
D
Trypan blue exclusion assay
Cell Mortality [%]
WST-8 assay
Abs450nm
No VecVec
anti-mgp130

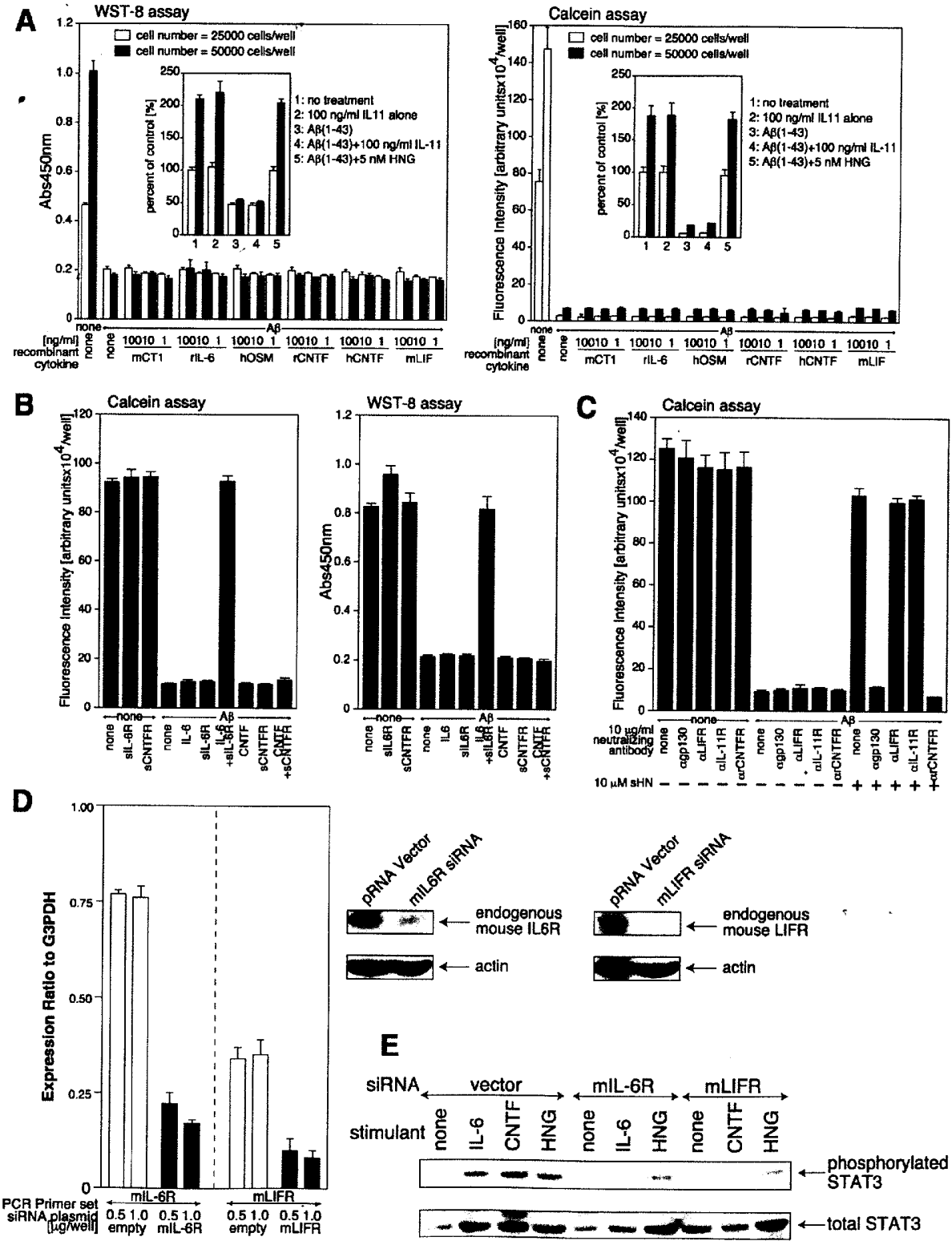
[図2]

Figure 2


A
No Vec G-CSFR/gp130(277) G-CSFR/gp130(133) G-CSFR/gp130(68) G-CSFR/gp130(25)
175
83
277
133
68
25
B
Cell Mortality [%]
G-CSF [ng/ml]
No
pcDNA3 + pEF-BOS
V642I APP + pEF-BOS
V642I APP + G-CSFR/gp130(25)
V642I APP + G-CSFR/gp130(68)
V642I APP + G-CSFR/gp130(133)
V642I APP + G-CSFR/gp130(277)
pEF-BOS vector
pcDNA3 vector
V642I APP
C
Cell Mortality [%]
G-CSF [ng/ml]
pcDNA3 vector
G-CSFR/gp130
NL APP
M146L PS1
N141I PS2
NL APP
M146L PS1 holo
M146L PS1 NTF
N141I PS2 holo
N141I PS2 CTF
D
Cell Mortality [%]
G85R SOD1
E
no treatment
1 μM HNG
1 μM HNA
100 ng/ml IL6 +1 μg/ml sIL6R
WB: 4G10
WB: anti-gp130
phosphorylated gp130
total gp130

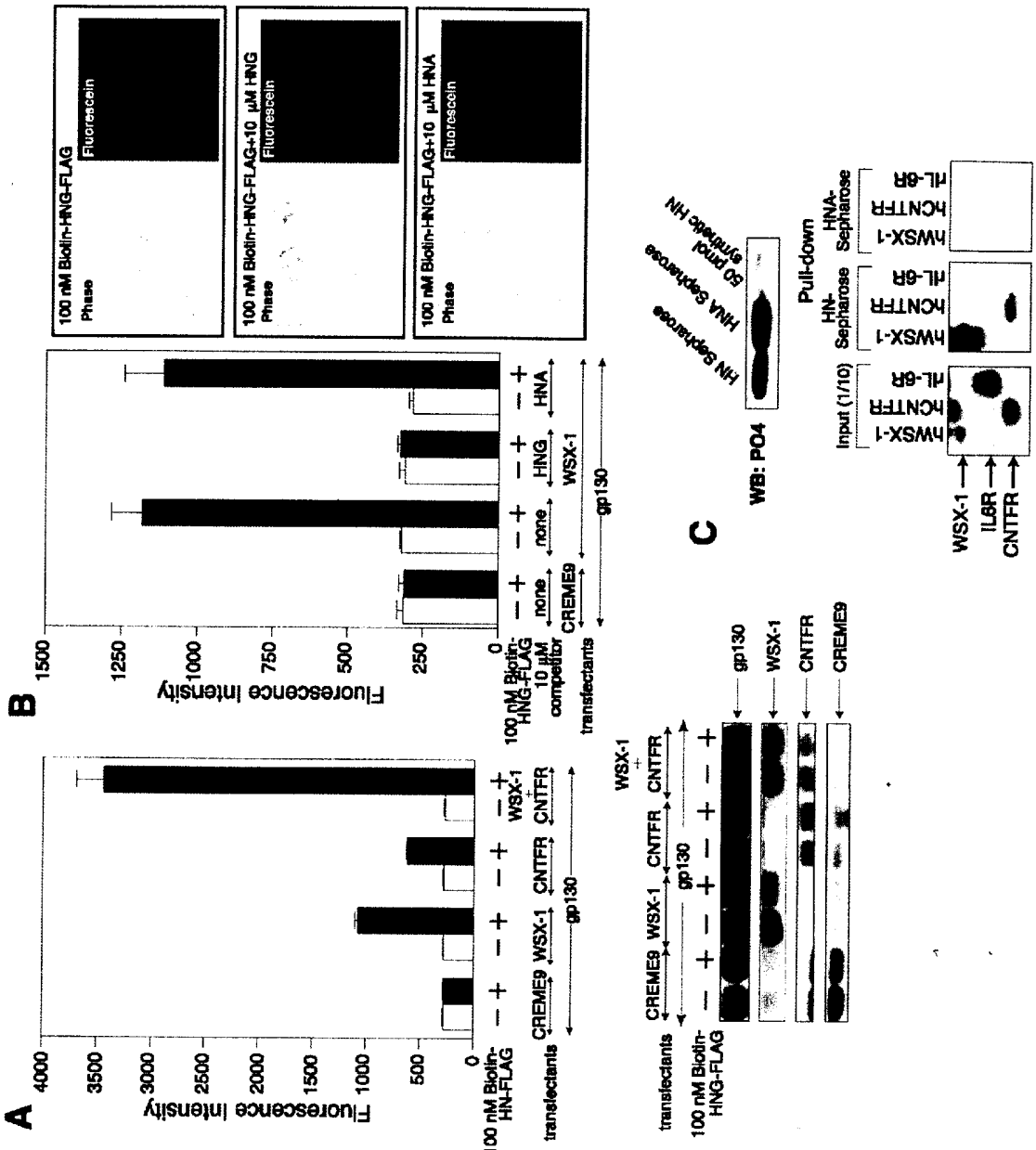
[図3]

Figure 3


A
WST-8 assay
cell number = 25000 cells/well
cell number = 50000 cells/well
Abs450nm
percent of control [%]
1: no treatment
2: 100 ng/ml IL11 alone
3: Aβ(1-43)
4: Aβ(1-43)+100 ng/ml IL-11
5: Aβ(1-43)+5 nM HNG
Calcein assay
Fluorescence Intensity [arbitrary units x10^4/well]
[ng/ml] recombinant cytokine
none
10010 1
mCT1
rIL-6
hOSM
rCNTF
hCNTF
mLIF
Aβ
B
Calcein assay
WST-8 assay
sIL-6R
sCNTFR
IL-6
CNTF
+sIL-6R
+sCNTFR
C
Calcein assay
10 ug/ml neutralizing antibody
gp130
αLIFR
αIL-11R
αrCNTFR
10 μM sHN
D
Expression Ratio to G3PDH
PCR Primer set
siRNA plasmid [μg/well]
0.5 1.0 0.5 1.0 0.5 1.0 0.5 1.0
empty
mIL-6R
mLIFR
pRNA Vector
mIL6R siRNA
mLIFR siRNA
endogenous mouse IL6R
endogenous mouse LIFR
actin
E
siRNA
vector
mIL-6R
mLIFR
stimulant
none
IL-6
CNTF
HNG
phosphorylated STAT3
total STAT3

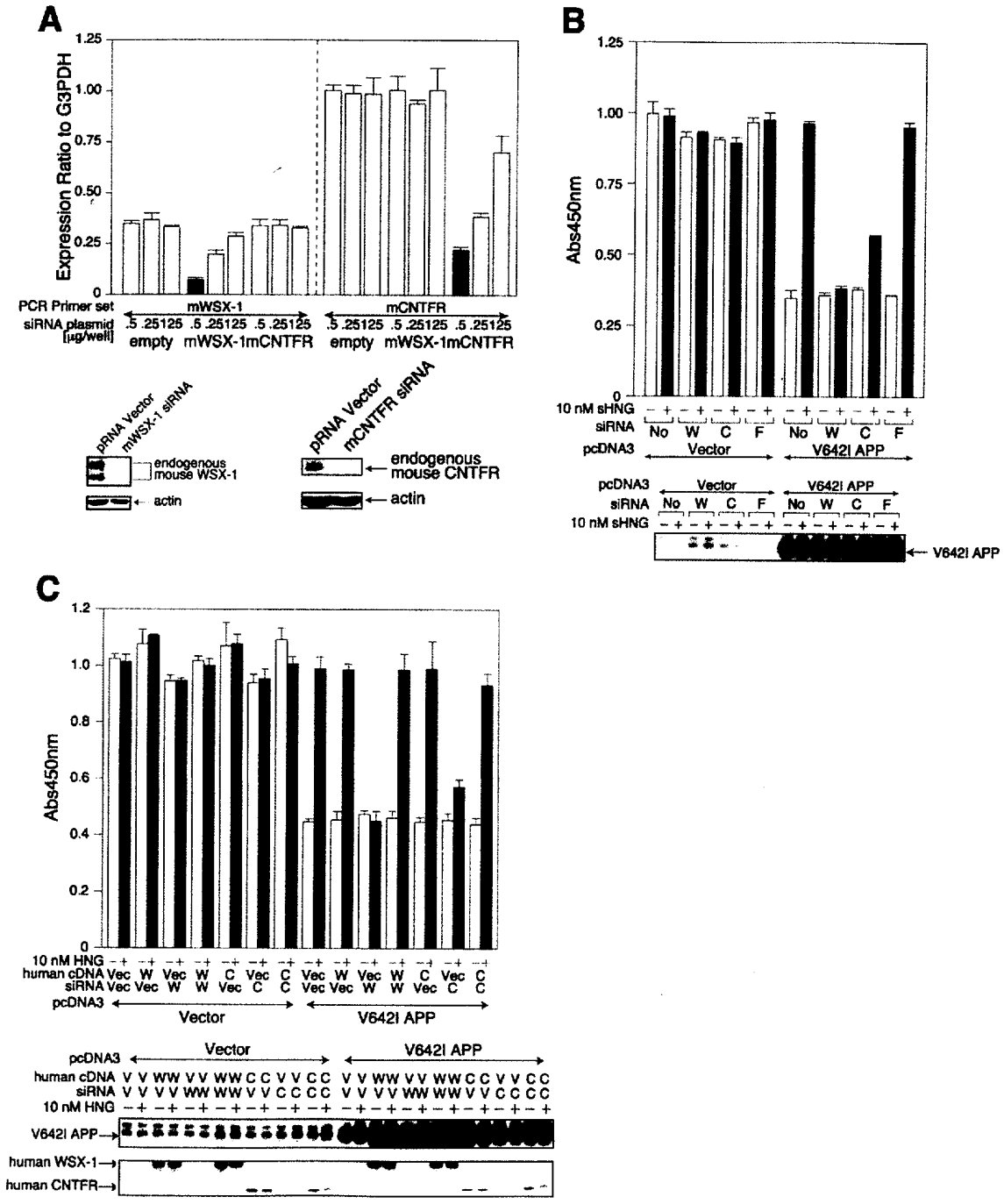
[図4]

Figure 4


A
Fluorescence Intensity
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
100 nM Biotin-HN-FLAG
transfectants
CREME9
WSX-1
CNTFR
gp130
B
Fluorescence Intensity
1500
1250
1000
750
500
250
0
100 nM Biotin-HNG-FLAG
10 μM competitor
transfectants
none
HNG
HNA
WSX-1
gp130
100 nM Biotin-HNG-FLAG
Fluorescein
Phase
100 nM Biotin-HNG-FLAG+10 μM HNG
Fluorescein
Phase
100 nM Biotin-HNG-FLAG+10 μM HNA
Fluorescein
Phase
C
WB: PO4
HN Sepharose
HNA Sepharose
50 pmol synthetic HN
Pull-down
HN-Sepharose
HNA-Sepharose
Input (1/10)
hWSX-1
hCNTFR
hIL-6R
WSX-1
IL6R
CNTFR
transfectants
100 nM Biotin-HNG-FLAG
CREME9
WSX-1
CNTFR
gp130
WSX-1
CNTFR
gp130
CNTFR
CREME9

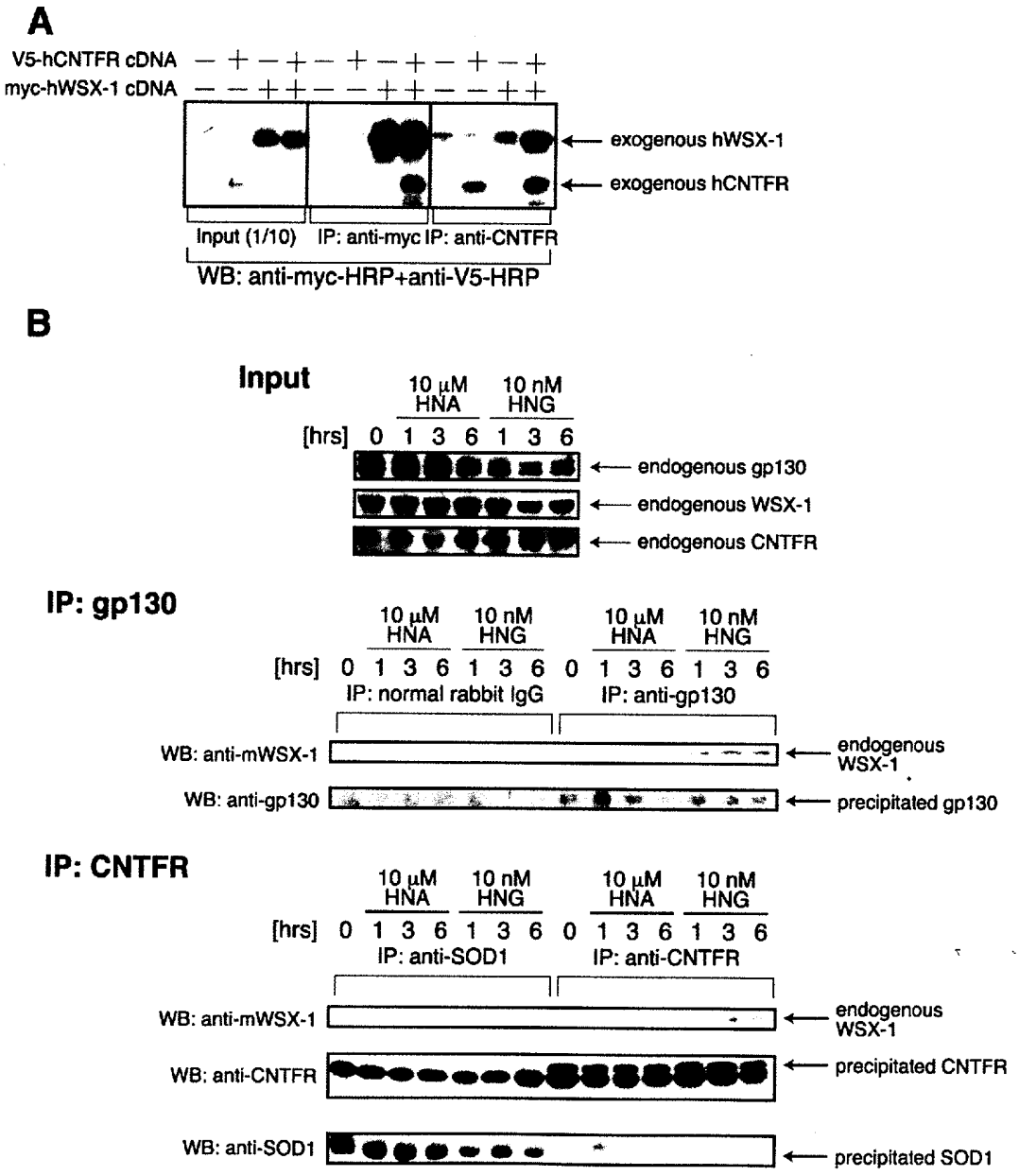
[図5]

Figure 5


A
Expression Ratio to G3PDH
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0
PCR Primer set
mWSX-1
mCNTFR
siRNA plasmid [μg/well]
.5 .25125 .5 .25125 .5 .25125
.5 .25125 .5 .25125 .5 .25125
empty mWSX-1mCNTFR
empty mWSX-1mCNTFR
pRNA Vector
mWSX-1 siRNA
endogenous mouse WSX-1
actin
pRNA Vector
mCNTFR siRNA
endogenous mouse CNTFR
actin
B
Abs450nm
10 nM sHNG
siRNA
No W C F No W C F
pcDNA3
Vector
V642I APP
pcDNA3
Vector
V642I APP
siRNA
No W C F No W C F
10 nM sHNG
V642I APP
C
Abs450nm
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
10 nM HNG
human cDNA Vec W Vec W C Vec C Vec W Vec W C Vec C
siRNA Vec Vec W W Vec C C Vec Vec W W Vec C C
pcDNA3
Vector
V642I APP
pcDNA3
Vector
V642I APP
human cDNA V V WW V V WW C C V V C C V V WW V V WW C C V V C C
siRNA V V V V WW WW V V C C C C V V V V WW WW V V C C C C
10 nM HNG
V642I APP
human WSX-1
human CNTFR

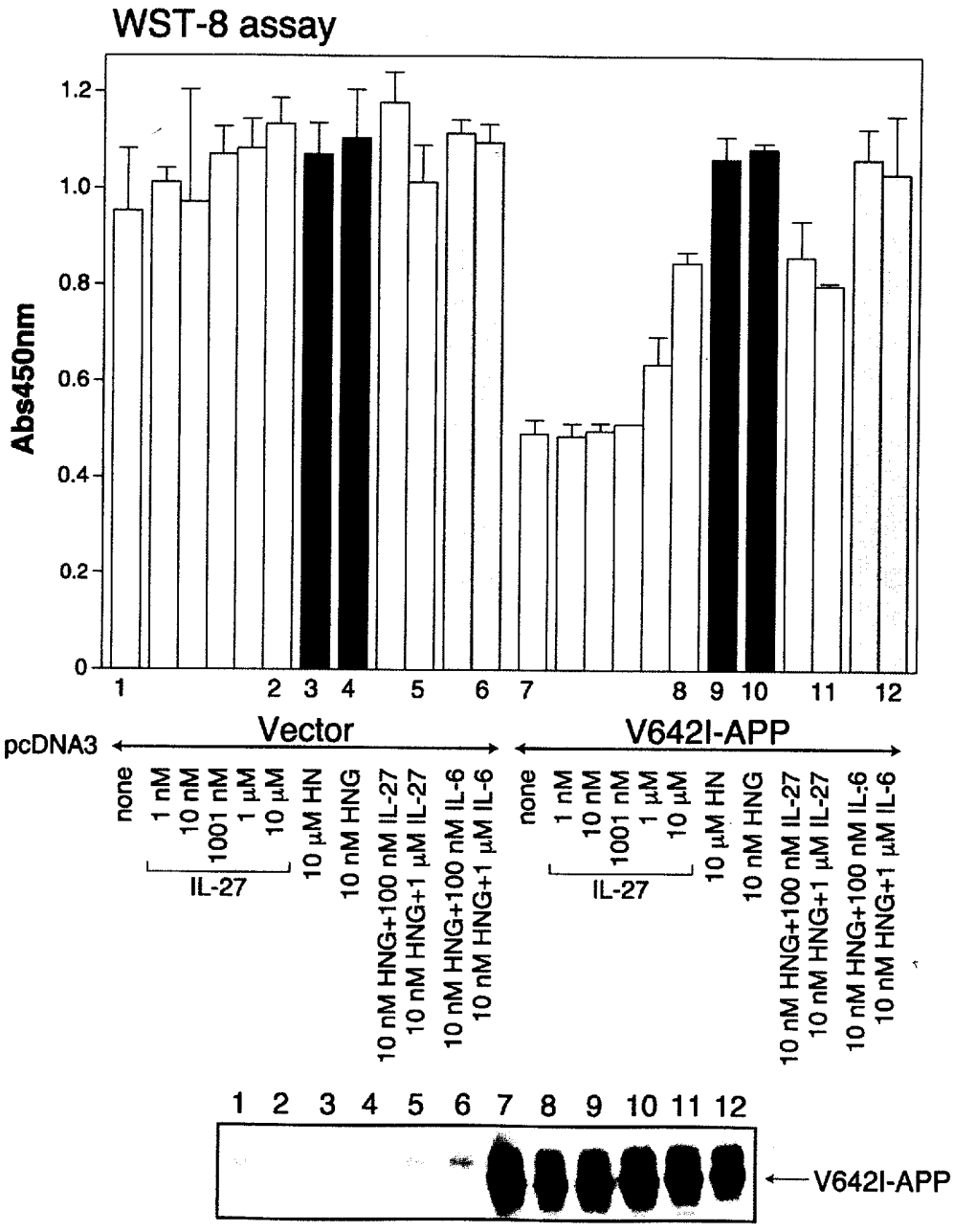
[図6]

Figure 6


A
V5-hCNTFR cDNA
myc-hWSX-1 cDNA
exogenous hWSX-1
exogenous hCNTFR
Input (1/10)
IP: anti-myc
IP: anti-CNTFR
WB: anti-myc-HRP+anti-V5-HRP
B
Input
10 μM HNA
10 nM HNG
[hrs] 0 1 3 6 1 3 6
endogenous gp130
endogenous WSX-1
endogenous CNTFR
IP: gp130
[hrs] 0 1 3 6 1 3 6 0 1 3 6 1 3 6
IP: normal rabbit IgG
IP: anti-gp130
WB: anti-mWSX-1
WB: anti-gp130
endogenous WSX-1
precipitated gp130
IP: CNTFR
[hrs] 0 1 3 6 1 3 6 0 1 3 6 1 3 6
IP: anti-SOD1
IP: anti-CNTFR
WB: anti-mWSX-1
WB: anti-CNTFR
WB: anti-SOD1
endogenous WSX-1
precipitated CNTFR
precipitated SOD1

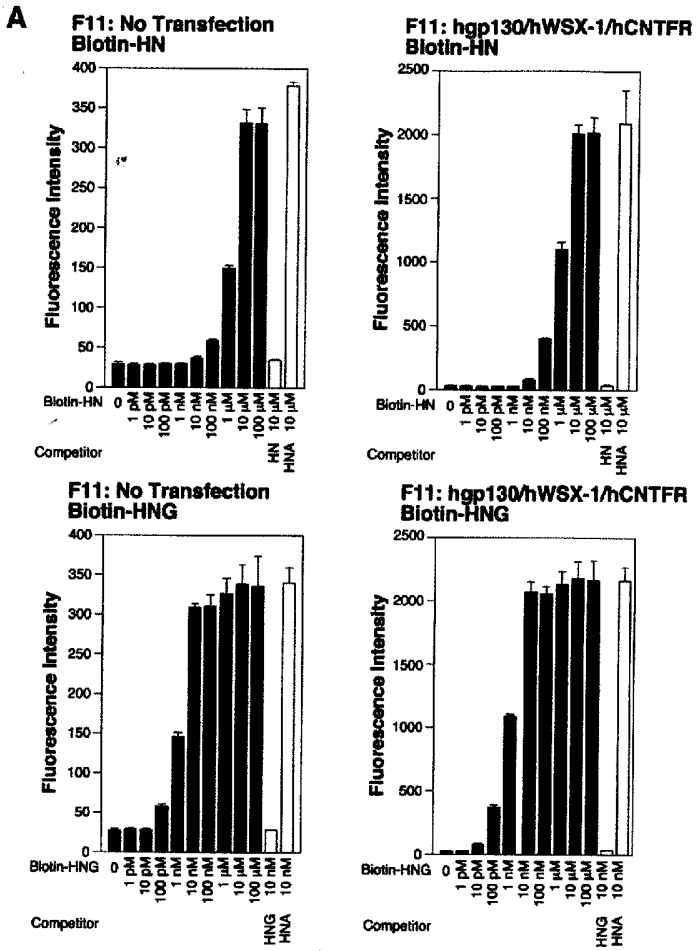
[図7]

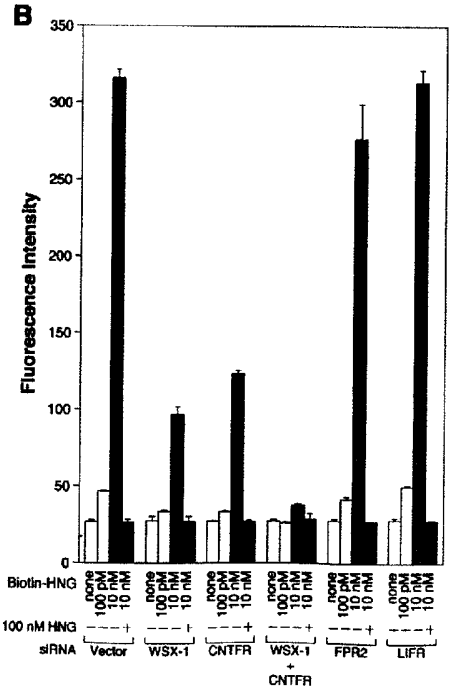
Figure 7


WST-8 assay
Abs450nm
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
pcDNA3
Vector
V642I-APP
none
1 nM
10 nM
1001 nM
1 μM
10 μM
IL-27
10 μM HN
10 nM HNG
10 nM HNG+100 nM IL-27
10 nM HNG+1 μM IL-27
10 nM HNG+100 nM IL-6
10 nM HNG+1 μM IL-6
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
V642I-APP

[図8]

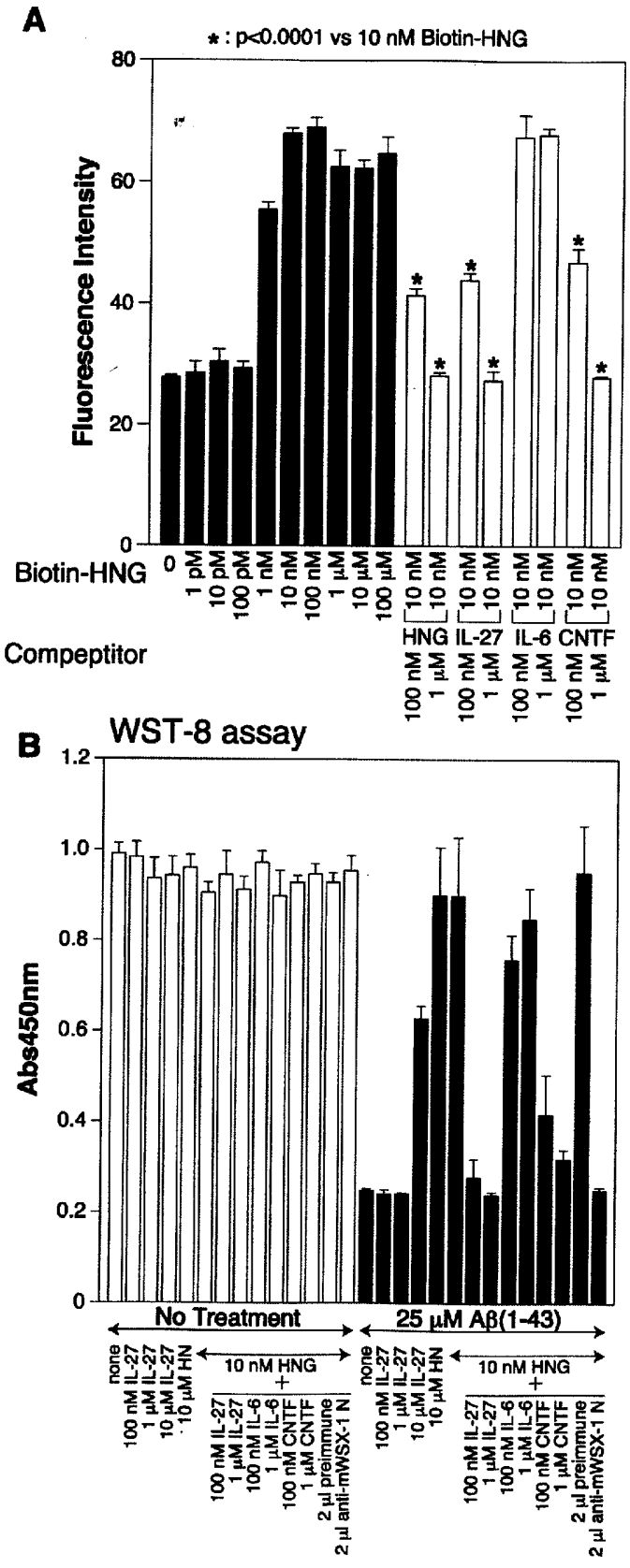
Figure 8


A
F11: No Transfection
Biotin-HN
F11: hgp130/hWSX-1/hCNTFR
Biotin-HN
Fluorescence Intensity
Biotin-HN
Competitor
HN
HNA
F11: No Transfection
Biotin-HNG
F11: hgp130/hWSX-1/hCNTFR
Biotin-HNG
Biotin-HNG
HNG
HNA


B
Fluorescence Intensity
Biotin-HNG
100 nM HNG
siRNA
Vector
WSX-1
CNTFR
WSX-1 + CNTFR
FPR2
LIFR

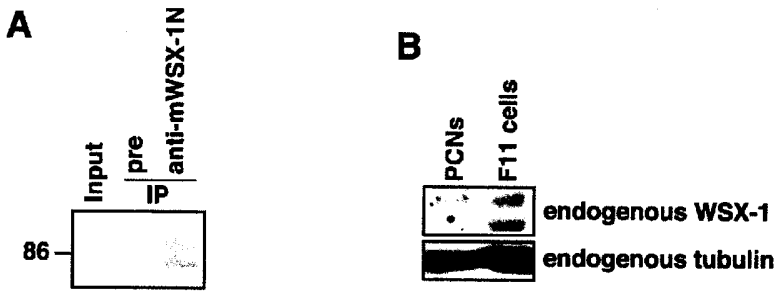
[図9]

Figure 9


A
* : p<0.0001 vs 10 nM Biotin-HNG
Fluorescence Intensity
Biotin-HNG
Competitor
HNG
IL-27
IL-6
CNTF
B
WST-8 assay
Abs450nm
No Treatment
25 μM Aβ(1-43)
10 nM HNG

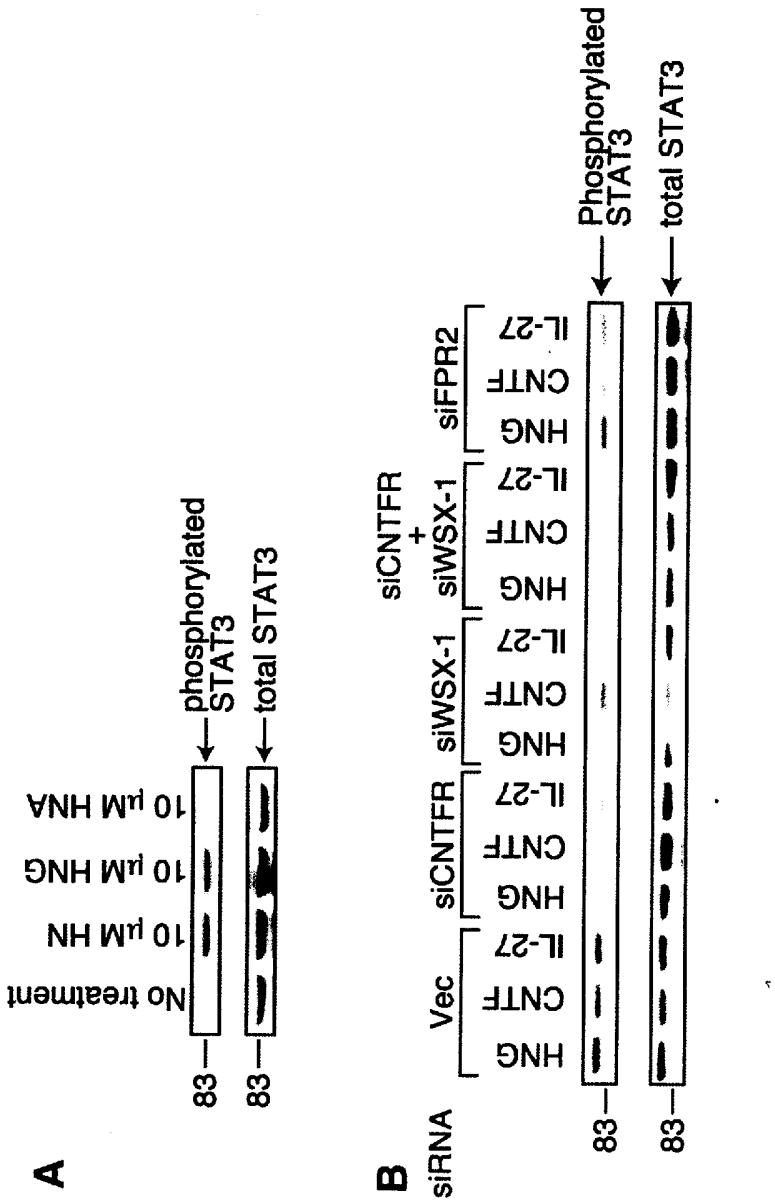
[図10]

Figure 10

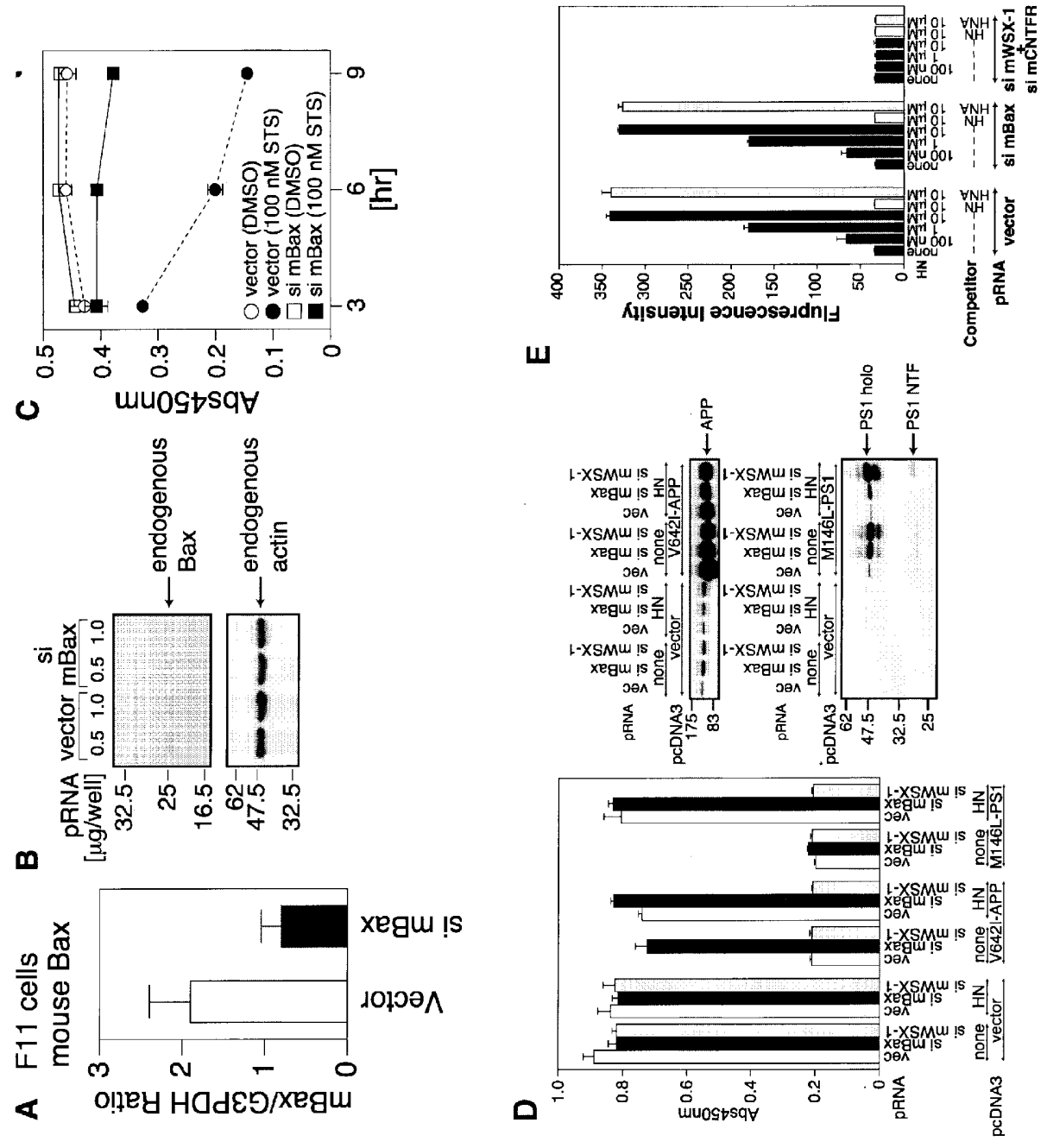


[図11]

Figure 11



[図12]


A
F11 cells
mouse Bax
mBax/G3PDH Ratio
Vector
si mBax
B
pRNA [μg/well]
si vector mBax
0.5 1.0 0.5 1.0
endogenous Bax
endogenous actin
32.5
25
16.5
62
47.5
32.5
C
Abs450nm
vector (DMSO)
vector (100 nM STS)
si mBax (DMSO)
si mBax (100 nM STS)
[hr]
D
Abs450nm
pRNA
pcDNA3
vector
none
HN
V642I-APP
M146L-PS1
vec
si mBax
si mWSX-1
APP
PS1 holo
PS1 NTF
E
Fluorescence Intensity
Competitor
pRNA
vector
si mBax
si mWSX-1
si mCNTFR
none
100 nM
1.0 μM
10.0 μM

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/307547

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K14/715(2006.01), ***A61K38/00***(2006.01), ***A61P21/00***(2006.01), ***A61P25/00***(2006.01), ***A61P25/28***(2006.01), ***A61P43/00***(2006.01), ***C07K16/28***(2006.01), ***C12N1/15***(2006.01), ***C12N1/19***(2006.01), ***C12N1/21***(2006.01),
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K38/00, A61P21/00, A61P25/00, A61P25/28, A61P43/00, C07K14/715, C07K16/28, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12Q1/02, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus(JDream2), CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2001/021787 A1 (Keio University), 29 March, 2001 (29.03.01), Full text & EP 1221480 A1	26-31 1-25
X	PFLANZ Stefan et al., WSX-1 and Glycoprotein 130 Constitute a Signal-Transducing Receptor for IL-27, The Journal of Immunology, 172, 2225-2231(2004)	1,3,6,32
X	VOLLMER Petra et al., A role for immunoglobulin-like domain of the human IL-6 receptor Intracellular protein transport and shedding, Eur.J.Biochem., 263, 438-446(1999)	1,6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 June, 2006 (23.06.06)	04 July, 2006 (04.07.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/307547

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	HASHIMOTO, Yuichi et al., Involvement of tyrosine kinases and STAT3 in Humanin-mediated neuroprotection, Life Sciences, 77(24), 3092-3104(2005)	1-32
A	FUKADA, Yoshiyuki et al., Two Signals Are Necessary for Cell Proliferation Induced by a Cytokine Receptor gp130: Involvment of STAT3 in Anti-Apoptosis, Immunity, 5, 449-460(1996)	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2006/307547

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12N15/09(2006.01), ***C12N5/10***(2006.01), ***C12Q1/02***(2006.01), ***G01N33/50***(2006.01)

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００６／３０７５４７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　*C07K14/715* (2006.01), *A61K38/00* (2006.01), *A61P21/00* (2006.01), *A61P25/00* (2006.01), *A61P25/28* (2006.01), *A61P43/00* (2006.01), *C07K16/28* (2006.01), *C12N1/15* (2006.01), *C12N1/19* (2006.01), *C12N1/21* (2006.01), *C12N15/09* (2006.01), *C12N5/10* (2006.01) *C12Q1/02* (2006.01), *G01N33/50* (2006.01)

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K 38/00, A61P 21/00, A61P 25/00, A61P 25/28, A61P 43/00, C07K 14/715, C07K 16/28, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 5/10, C12N 15/09, C12Q 1/02, G01N 33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus(JDream2),CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	WO 2001/021787 A1 (学校法人慶應義塾) 2001.03.29, 全文	26-31
A	& EP 1221480 A1	1-25
X	PFLANZ Stefan et al., WSX-1 and Glycoprotein 130 Constitute a Signal-Transducing Receptor for IL-27 The Journal of Immunology,172,2225-2231(2004)	1,3,6,32
X	VOLLMER Petra et al., A role for immunoglobulin-like domain of the human IL-6 receptor Intracellular protein transport and	1,6

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２３．０６．２００６	０４．０７．２００６

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｂ	９８４０
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	植原　克典 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８		

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
	shedding Eur. J. Biochem, 263, 438-446 (1999)	
P, A	HASHIMOTO Yuichi et al., Involvement of tyrosine kinases and STAT3 in Humanin-mediated neuroprotection Life Sciences, 77(24), 3092-3104 (2005)	1-32
A	FUKADA Toshiyuki et al., Two Signals Are Necessary for Cell Proliferation Induced by a Cytokine Receptor gp130:Involvement of STAT3 in Anti-Apoptosis Immunity, 5, 449-460 (1996)	1-4