

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

W02002/057448

発行日 平成16年5月20日 (2004.5.20)

(43) 国際公開日 平成14年7月25日 (2002.7.25)

(51) Int.Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09
A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K 38/00
A 6 1 K 39/395
A 6 1 K 45/00

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 45/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 80 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2002-558500 (P2002-558500)	(71) 出願人	390010205
(21) 国際出願番号	PCT/JP2001/011529		第一ファインケミカル株式会社
(22) 国際出願日	平成13年12月27日 (2001.12.27)		富山県高岡市長慶寺530番地
(31) 優先権主張番号	特願2000-398817 (P2000-398817)	(74) 代理人	100097582
(32) 優先日	平成12年12月27日 (2000.12.27)		弁理士 水野 昭宣
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	佐藤 博
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, C H, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, P L, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW		石川県金沢市平和町3丁目18番15号 平和宿舍C57-11
		(72) 発明者	青木 隆則
			富山県高岡市長慶寺530番地 第一ファインケミカル株式会社内

(54) 【発明の名称】 新規ペプチド及びその活性

(57) 【要約】

MT1 - MMP, MT3 - MMPなどのMMPsの活性調節に関与する遺伝子を解明し、MMPsの関与する様々な生物活性・生理現象の研究開発を行う。N-Tesは、glycosaminoglycan attachment siteを欠くなどの特徴ある配列を有し、MT1 - MMP, MT3 - MMPなどの活性を抑制する機能を有し、有用な医薬の開発研究に役立つ。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(A) ヒト由来の N - T e s ポリペプチド若しくは
 (B) (i) 該 N - T e s のアミノ酸配列と少なくとも 60 % の相同性を有し且つ
 (ii) (a) G l y c o s a m i n o g l y c a n a t t a c h m e n t s i t e
 を欠いている、
 (b) T Y d o m a i n や C W C V d o m a i n を欠いている、
 (c) C 末端が特徴的な配列 G l y - L y s - A r g を有している、及び
 (d) N - T e s のアミノ酸配列のうちの少なくとも 5 ~ 313 個の連続したアミノ酸残
 基を有する
 から成る群から選ばれた特徴を有しているもの
 であることを特徴とするポリペプチド又はその塩。

10

【請求項 2】

配列表の配列番号：2 で表されるアミノ酸配列のうち、
 (i) 少なくとも連続した 5 ~ 70 個のアミノ酸残基を有するもの、
 (ii) 少なくとも連続した 71 ~ 150 個のアミノ酸残基を有するもの、
 (iii) 少なくとも連続した 151 ~ 313 個のアミノ酸残基を有するもの、
 (iv) 少なくとも第 22 番目 ~ 第 122 番目のアミノ酸配列を有するもの、
 (v) 第 22 番目 ~ 第 313 番目のアミノ酸配列を有するもの、
 (vi) 第 1 番目 ~ 第 313 番目のアミノ酸配列を有するもの、及び
 (vii) それらのいずれか一つと実質的に同等のアミノ酸配列を有するもの
 からなる群から選ばれたポリペプチドであることを特徴とする請求項 1 記載のポリペプチ
 ド又はその塩。

20

【請求項 3】

請求項 1 または 2 記載のポリペプチドの部分ペプチドまたはその塩。

【請求項 4】

下記の性質：

1) M T - M M P 類の M M P 類活性化能を抑制する機能を有し、且つ
 2) (i) 配列表の配列番号：2 で表されるアミノ酸配列において、A l a ^{2 2} ~ G l y
^{1 2 2} のアミノ酸配列のうち、少なくとも 5 ~ 101 個の連続したアミノ酸残基を有する
 もの、及び
 (ii) N - T e s のアミノ酸配列のうちの少なくとも 5 ~ 313 個の連続したアミノ酸
 残基を有するもの
 から成る群から選ばれたものである
 ことを特徴とするポリペプチド又はその塩。

30

【請求項 5】

(i) M T - M M P 類が M T 1 - M M P 又は M T 3 - M M P である及び/又は (ii) M
 M P 類が M M P - 2 であることを特徴とする請求項 4 記載のポリペプチド又はその塩。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有することを特徴
 とする核酸。

40

【請求項 7】

配列表の配列番号：1 で表される塩基配列のうち、オープンリーディングフレーム部分ま
 たはそれと実質的に同等な塩基配列を有することを特徴とする請求項 6 記載の核酸。

【請求項 8】

請求項 6 または 7 記載の核酸を含有することを特徴とするベクター。

【請求項 9】

請求項 6 又は 7 記載の核酸あるいは請求項 8 記載のベクターを含有することを特徴とする
 形質転換体。

【請求項 10】

50

宿主細胞が大腸菌、酵母、293T細胞、CHO細胞およびCOS細胞からなる群から選ばれたものであることを特徴とする請求項9記載の形質転換体。

【請求項11】

請求項10記載の形質転換体によって発現させて得たものであることを特徴とする請求項1～5のいずれか一記載のポリペプチド。

【請求項12】

配列表の配列番号：1で表される塩基配列のうち、オープンリーディングフレーム部分又はその一部あるいはそれと実質的に同等な塩基配列をPCR増幅するに有効なプライマー。

【請求項13】

次のものに対する抗体：

- (i) 請求項1記載のポリペプチドまたはその塩、
- (ii) 請求項2記載のポリペプチドまたはその塩、
- (iii) 請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩、
- (iv) 請求項4記載のポリペプチドまたはその塩、あるいは
- (v) 請求項5記載のポリペプチドまたはその塩。

【請求項14】

請求項1～5のいずれか一記載のポリペプチドまたはその塩と特異的に免疫反応する抗体を測定試薬として用いることを特徴とする請求項1～5のいずれか一記載のポリペプチドまたはその塩の免疫学的測定方法。

【請求項15】

請求項1～5のいずれか一記載のポリペプチドまたはその塩と特異的に免疫反応する抗体を含むことを特徴とする請求項1～5のいずれか一記載のポリペプチドまたはその塩の免疫学的測定試薬。

【請求項16】

請求項1～5のいずれか一記載のポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩；あるいは請求項6または7記載の核酸；あるいは請求項13記載の抗体を含有していることを特徴とする医薬。

【請求項17】

- (i) MT1-MMP又はMT3-MMP活性阻害剤、
- (ii) 癌の浸潤、転移抑制及び/又は阻害剤、
- (iii) 血管新生阻害剤、
- (iv) アルツハイマー治療剤、及び
- (v) 関節破壊治療剤

から成る群から選ばれたものであることを特徴とする請求項16記載の医薬。

【請求項18】

請求項1～5のいずれか一記載のポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩の生物学的活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有していることを特徴とする医薬。

【請求項19】

請求項1～5のいずれか一記載のポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩の生物学的活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法およびスクリーニングキット。

【請求項20】

MMPsから成る群から選ばれたものの発現プラスミドと検体遺伝子を宿主細胞に導入し、発現するMMPについての検出を指標とすることを特徴とするMMPsから成る群から選ばれたものの活性調節に関与する遺伝子のスクリーニング方法およびスクリーニングキット。

【請求項21】

MMP-2、MT1-MMP発現プラスミドと検体プラスミドを293T細胞などの宿主

10

20

30

40

50

細胞に導入し、例えば潜在型、中間体、活性化型MMP-2を検出にけることを特徴とする請求項20記載のスクリーニング方法およびスクリーニングキット。

【請求項22】

下記の指標：

- (a) N-Tesの発現量が正常部位に比べ低いこと、
- (b) N-Tesポリペプチド又はそれから誘導されたペプチド断片、
- (c) N-Tes遺伝子又はそれから誘導されたmRNAなどの核酸、及び
- (d) 抗N-Tes抗体

から成る群から選ばれたものを指標として使用することを特徴とするグリオーマの検出方法。

10

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、新規に同定されたポリヌクレオチド（あるいは核酸）及びポリペプチド（あるいはタンパク質）（又はその一部）あるいはその塩；該ポリヌクレオチド（あるいは核酸）及びポリペプチド（あるいはタンパク質）の変異体及び誘導體；該ポリヌクレオチド（あるいは核酸）及びポリペプチド（あるいはタンパク質）、並びにそれらの変異体及び誘導體の製造法；該ポリペプチド（あるいはタンパク質）（又はその一部）に対する抗体、該抗体を用いた免疫学的測定法及びそれに使用する試薬；該ポリペプチド（あるいはタンパク質）のアゴニスト及びアンタゴニスト、それらに関連したスクリーニング法及びスクリーニングキット；並びに該ポリヌクレオチド（あるいは核酸）、ポリペプチド（あるいはタンパク質）、変異体、誘導體、アゴニスト及びアンタゴニストの用途に関するものである。

20

背景技術

マトリックスメタロプロテアーゼ類（MMPs）は、細胞外マトリックスと基底膜成分のさまざまな構成タンパク質を分解する亜鉛依存性のエンドペプチダーゼのファミリーである。これらの酵素群は、正常な胚の発生、骨の成長あるいは創傷の治癒など、結合組織の再構成に関連している（Woessner, J. F., FASEB J., 5, 2145-2154 (1991); Matrisian, L. M., BioEssays, 14, 455-463 (1992); Birkedal-Hansen, H., Moore W. G. I., Boddien, M. K., Windsor, L. J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., and Engler, J. A., Crit. Rev. Oral Biol. Med., 4, 197-250 (1993)）。また、アテローム性動脈硬化症（Henney, A. M., Wakeley, P. R., Davies, M. J., Foster, K., Hembry, R., Murphy, G., and Humphries, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8154-8158 (1991)）、肺気腫（Hautamaki, R. D., Kobayashi, D. K., Senior, R. M., and Shapiro, S. D., Science, 277, 2002-2004 (1997)）、リウマチ性関節炎（Murphy, G., and Hembry, R. M., J. Rheumatol., 19, 61-64 (1992)）および癌の浸潤・転移（Stetler-Stevenson, W. G., Aznavoorian, S., and Liotta, L. A., Annu. Rev. Cell Biol., 9, 541-573 (1993)）などさまざまな病的な過程における関与が知られるようになってきた。

30

40

今日までに、アミノ酸レベルまで解析されたMMPs（MMP-1（collagenase）；MMP-2（gelatinase A）；MMP-3（stromelysin-1）；MMP-7（matrilysin）；MMP-8（neutrophil collagenase）；MMP-9（gelatinase B）；MMP-10（stromelysin-2）；MMP-11（stromelysin-3）；MMP-12（macrophage elastase）；MMP-13（collagenase-3）；MMP-14（MT1-MMP）；MMP-15（MT2-MMP）；M

50

MP - 16 (MT3 - MMP) ; MMP - 17 (MT4 - MMP) ; MMP - 18 (collagenase - 4) ; MMP - 19 ; MMP - 20 (enamelysin) ; MMP - 24 (MT5 - MMP) ; MMP - 25 (MT6 - MMP) など) が知られている (Woessner, J. F., FASEB J., 5, 2145 - 2154 (1991) ; Matrisian, L. M., BioEssays, 14, 455 - 463 (1992) ; Birkedal - Hansen, H., Moore W. G. I., Boddén, M. K., Windsor, L. J., Birkedal - Hansen, B., DeCarlo, A., and Engler, J. A., Crit. Rev. Oral Biol. Med., 4, 197 - 250 (1993) ; Gururajan, R., Grenet, J., Lahti, J. M., and Kidd, V. J., Genomics, 52, 101 - 106 (1998) ; Velasco, G., Pendas, A. M., Fueyo, A., Knauper, V., Murphy, G., and Lopez - Otín, C., J. Biol. Chem., 274, 4570 - 4576 (1999) ; Pei D., Cell Res., 9, 291 - 303 (1999))。1
次構造、基質特異性および細胞分布により、これらのMMPsは少なくとも4種のサブファミリー：コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロメライシンおよび膜型MMPs (MT - MMPs) に分類されている。

MT - MMPsサブファミリーは、最も新しくMMPsのサブクラスとして報告されたもので、MMPsに保存された領域に対するディジェネレートプライマーとRT - PCRによってこれまで5種を超えるメンバー (MT1 - MMP, MT2 - MMP, MT3 - MMP, MT4 - MMP, MT5 - MMPなど) が単離同定されている (Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., and Seiki, M., Nature, 370, 61 - 65 (1994) ; Will, H., and Hinzmann, B., Eur. J. Biochem., 231, 602 - 608 (1995) ; Takino, T., Sato, H., Shinagawa, A., and Seiki, M., J. Biol. Chem., 270, 23013 - 23020 (1995) ; Puente X. S., Pendas, A. M., Llano, E., Velasco G., and Lopez - Otín, C., Cancer Res., 56, 944 - 949 (1996) ; 特開2000 - 270874号 ; Pei, D., J. Biol. Chem., 274, 8925 - 8932, 1999 ; Kajita, M. et al., FEBS Lett., 457, 353 - 356, 1999)。

MT - MMPsは、多くのMMPsに特徴的なホモペキシンドメインの後方に、単一の膜貫通領域と短い細胞内テールを持つI型の膜タンパク質である。さらに、これらはプロペプチドと活性ドメインの間に塩基性アミノ酸の挿入が共通して存在し、フューリン (fuerin) あるいはフューリン様酵素による切断で、これらの膜タンパク質の活性化がおきる (Pei, D., and Weiss, S. J., J. Biol. Chem., 271, 9135 - 9140 (1996) ; Sato, H., Kinoshita, T., Takino, T., Nakayama, K., and Seiki, M., FEBS Lett., 393, 101 - 104 (1996) ; Cao, J., Rehemtulla, A., Bahou, W., and Zucker, S., J. Biol. Chem., 271, 30174 - 30180 (1996))。

Testicanは、精巣で最初に発見されたプロテオグリカンで、ヒト精巣プラズマよりコンドロイチン硫酸 / ヘパラン硫酸プロテオグリカンとして単離された (Biochem. J., 288, 565 - 569 (1992))。そのアミノ酸配列は、ヒト精巣cDNAより推論され (Eur. J. Biochem., 214: 347 - 350 (1993))、BM - 40 / secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC) / osteonectin protein family (Biochem. J., 288, 565 - 569 (1992) , FEBS Lett., 414, 557 - 561 (1997)) と類似のドメイン構造を持っている

ることが示されている。Testicanは、マルチドメイン構造を持っている。Testicanの局在は、脳の限定された領域であり、シナプス後部に存在する。このことは、Testicanが、レセプター活性、神経調節、シナプスの形成性、あるいは神経伝達などに関与することが考えられる。

Testican及びその関連物質としては、Testican-1 (Eur. J. Biochem, 214:347-350 (1993))、Testican-2 (Journal of Neurochemistry, Vol. 73:12-20 (1999))、Testican-3などのTestican類のほか、BM-40/SPARC/osteonectin, QR1, SC1/hevin, tsc36/Flikなどが知られ、それらのタンパク質のうちには、特徴的なドメイン構造、例えばextracellular Ca^{2+} -binding domain (EC domain), follistatin-like domain (FS domain)の存在が認められ、あるものには、thyroglobulin-like domain (TY domain)やGlycosaminoglycan attachment siteが存在している。特に、Testican-3は、436個のアミノ酸をコードしている遺伝子に由来し、マルチドメイン構造をもっている。その特徴的なドメインとしては、Kazal-type domain (アミノ酸配列の第148-183位)で、セリンプロテアーゼインヒビターとして働くfollistatin様ドメイン、そしてTY domain (Thyroglobulin type I repeats, アミノ酸配列の第317-380位, 特には第338-380位)で、システインプロテアーゼインヒビター、ヘパリンの結合パートナーとして働くドメインが挙げられる。Testican-3は、Glycosaminoglycan attachment siteを持っていることが認められる。

これと類似したアミノ酸配列を持つものに、HPTLG (WO99/23110 A1)がある。このHPTLGは、ヒト視床下部からのHPTLG遺伝子に由来するもので、細胞の粘着、移動、増殖等に関与すると考えられている。Testican様タンパク質であることから、脳において成長因子のレセプターとして働くことが推測される。HPTLGはマルチドメイン構造をもっており、その特徴的なドメインとしては、Kazal-type domain (アミノ酸配列の第136-182位)で、QR1、SC1やfollistatinのようなタンパク分解阻害活性が知られ、そして、CWCV domain (アミノ酸配列の第332-381位)で、これは、例えば、insulin-like growth factorsを結合することが知られている。HPTLGもGlycosaminoglycan attachment siteを持っていることが認められる。

これまでのMMP類及び/又は膜型MMP類と癌との関係については、例えば、プロゼラチナーゼAの活性化 (Okadaら, Eur. J. Biochem., 194, pp721-730, 1990)、MT1-MMPによるMMP-2の活性化 (Satoら, Nature, 370, pp61-65, 1994)などによる関係が示唆されているが、具体的な関与については未だ不明である。

こうした細胞外マトリックスや基底膜成分のさまざまな構成タンパク質に対して活性を有するMMPsは、その活性の亢進などにより様々な病的な症状や発症に影響を及ぼしているだけでなく、癌などの転移・浸潤、さらには癌組織周辺での血管新生などに関与していることが示唆されている。従って、MMPsの活性調節に関与している遺伝子やタンパク質として如何なるものが存在し、どのような機構でそれらがMMPsの活性の制御に関与しているなどを解明することが求められている。

発明の開示

発明者等は、MMPsの活性調節に関与している遺伝子のスクリーニング系を構築し、ヒト由来遺伝子につき、MMPsの活性調節に関与している遺伝子の探索をおこなった結果、Testicanと呼ばれる一群の遺伝子群と極めて類似してはいるが、MT1-MMPやMT3-MMPに対して阻害活性を有し、特徴ある構造を有する新規な遺伝子及びそ

れがコードする新規なポリペプチドを見出した。

すなわち、本発明は、

- 〔 1 〕 (A) ヒト由来の N - T e s ポリペプチド若しくは
- (B) (i) 該 N - T e s のアミノ酸配列と少なくとも 6 0 % の相同性を有し且つ
- (i i) (a) G l y c o s a m i n o g l y c a n a t t a c h m e n t s i t e を欠いている、
- (b) T Y d o m a i n や C W C V d o m a i n を欠いている、
- (c) C 末端が特徴的な配列 G l y - L y s - A r g を有している、及び
- (d) N - T e s のアミノ酸配列のうちの少なくとも 5 ~ 3 1 3 個の連続したアミノ酸残基を有する

10

から成る群から選ばれた特徴を有しているもの

であることを特徴とするポリペプチド又はその塩；

- 〔 2 〕 配列表の配列番号： 2 で表されるアミノ酸配列のうち、
- (i) 少なくとも連続した 5 ~ 7 0 個のアミノ酸残基を有するもの、
- (i i) 少なくとも連続した 7 1 ~ 1 5 0 個のアミノ酸残基を有するもの、
- (i i i) 少なくとも連続した 1 5 1 ~ 3 1 3 個のアミノ酸残基を有するもの、
- (i v) 少なくとも第 2 2 番目 ~ 第 1 2 2 番目のアミノ酸配列を有するもの、
- (v) 第 2 2 番目 ~ 第 8 1 3 番目のアミノ酸配列を有するもの、
- (v i) 第 1 番目 ~ 第 3 1 3 番目のアミノ酸配列を有するもの、及び
- (v i i) それらのいずれか一つと実質的に同等のアミノ酸配列を有するもの

20

からなる群から選ばれたポリペプチドであることを特徴とする上記〔 1 〕記載のポリペプチド又はその塩；

〔 3 〕 上記〔 1 〕または〔 2 〕記載のポリペプチドの部分ペプチドまたはその塩；

〔 4 〕 下記の性質：

- 1) M T - M M P 類の M M P 類活性化能を抑制する機能を有し、且つ
- 2) (i) 配列表の配列番号： 2 で表されるアミノ酸配列において、 A l a ^{2 2} ~ G l y ^{1 2 2} のアミノ酸配列のうち、少なくとも 5 ~ 1 0 1 個の連続したアミノ酸残基を有するもの、及び
- (i i) N - T e s のアミノ酸配列のうちの少なくとも 5 ~ 3 1 3 個の連続したアミノ酸残基を有するもの

30

から成る群から選ばれたものである

ことを特徴とするポリペプチド又はその塩。

- 〔 5 〕 (i) M T - M M P 類が M T 1 - M M P 又は M T 3 - M M P である及び / 又は (i i) M M P 類が M M P - 2 であることを特徴とする上記〔 4 〕のポリペプチド又はその塩；

〔 6 〕 上記〔 1 〕 ~ 〔 5 〕のいずれか一記載のポリペプチドをコードする塩基配列を有することを特徴とする核酸；

〔 7 〕 配列表の配列番号： 1 で表される塩基配列のうち、オープンリーディングフレーム部分またはそれと実質的に同等な塩基配列を有することを特徴とする上記〔 6 〕記載の核酸；

40

〔 8 〕 上記〔 6 〕または〔 7 〕記載の核酸を含有することを特徴とするベクター；

〔 9 〕 上記〔 6 〕または〔 7 〕記載の核酸あるいは上記〔 8 〕記載のベクターを含有することを特徴とする形質転換体；

〔 1 0 〕 宿主細胞が大腸菌、酵母、293T細胞、CHO細胞およびCOS細胞からなる群から選ばれたものであることを特徴とする上記〔 9 〕記載の形質転換体；

〔 1 1 〕 上記〔 1 0 〕記載の形質転換体によって発現させて得たものであることを特徴とする上記〔 1 〕 ~ 〔 5 〕のいずれか一記載のポリペプチド；

〔 1 2 〕 配列表の配列番号： 1 で表される塩基配列のうち、オープンリーディングフレーム部分又はその一部あるいはそれと実質的に同等な塩基配列を P C R 増幅するに有効なプライマー；

50

〔 1 3 〕 次のものに対する抗体：

- (i) 上記〔 1 〕記載のポリペプチドまたはその塩、
- (i i) 上記〔 2 〕記載のポリペプチドまたはその塩、
- (i i i) 上記〔 3 〕記載の部分ペプチドまたはその塩、
- (i v) 上記〔 4 〕記載のポリペプチドまたはその塩、あるいは
- (v) 上記〔 5 〕記載のポリペプチドまたはその塩；

〔 1 4 〕 上記〔 1 〕～〔 5 〕のいずれか一記載のポリペプチドまたはその塩と特異的に免疫反応する抗体を測定試薬として用いることを特徴とする上記〔 1 〕～〔 5 〕のいずれか一記載のポリペプチドまたはその塩の免疫学的測定方法；

〔 1 5 〕 上記〔 1 〕～〔 5 〕のいずれか一記載のポリペプチドまたはその塩と特異的に免疫反応する抗体を含むことを特徴とする上記〔 1 〕～〔 5 〕のいずれか一記載のポリペプチドまたはその塩の免疫学的測定試薬； 10

〔 1 6 〕 上記〔 1 〕～〔 5 〕のいずれか一記載のポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩；あるいは上記〔 6 〕または〔 7 〕記載の核酸；あるいは上記〔 1 3 〕記載の抗体を含有していることを特徴とする医薬；

〔 1 7 〕 (i) M T 1 - M M P 又は M T 3 - M M P 活性阻害剤、

(i i) 癌の浸潤、転移抑制及び / 又は阻害剤、

(i i i) 血管新生阻害剤、

(i v) アルツハイマー治療剤、及び

(v) 関節破壊治療剤 20

から成る群から選ばれたものであることを特徴とする上記〔 1 6 〕記載の医薬；

〔 1 8 〕 上記〔 1 〕～〔 5 〕のいずれか一記載のポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩の生物学的活性を促進または阻害する化合物またはその塩を含有していることを特徴とする医薬；

〔 1 9 〕 上記〔 1 〕～〔 5 〕のいずれか一記載のポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩の生物学的活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法およびスクリーニングキット；

〔 2 0 〕 M M P s から成る群から選ばれたものの発現プラスミドと検体遺伝子を宿主細胞に導入し、発現する M M P についての検出を指標とすることを特徴とする M M P s から成る群から選ばれたものの活性調節に関与する遺伝子のスクリーニング方法およびスクリー 30

〔 2 1 〕 M M P - 2、M T 1 - M M P 発現プラスミドと検体プラスミドを 2 9 3 T 細胞などの宿主細胞に導入し、例えば潜在型、中間体、活性化型 M M P - 2 を検出にけることを特徴とする上記〔 2 0 〕記載のスクリーニング方法およびスクリーニングキット； 1 及び

〔 2 2 〕 下記の指標：

(a) N - T e s の発現量が正常部位に比べ低いこと、

(b) N - T e s ポリペプチド又はそれから誘導されたペプチド断片、

(c) N - T e s 遺伝子又はそれから誘導された m R N A などの核酸、及び

(d) 抗 N - T e s 抗体 40

から成る群から選ばれたものを指標として使用することを特徴とするグリオーマの検出方法を提供する。

別の態様では、本発明は

〔 2 3 〕 M T 1 - M M P 及び / 又は M T 3 - M M P に対して阻害活性を有することを特徴とする上記〔 1 〕～〔 5 〕のいずれか一記載のポリペプチド又はその塩；

〔 2 4 〕 M T 1 - M M P 及び / 又は M T 3 - M M P に対して阻害活性を有するポリペプチド又はタンパク質を産生する機能を有する上記〔 6 〕又は〔 7 〕記載の核酸；

〔 2 5 〕 M T 1 - M M P 及び / 又は M T 3 - M M P に対して阻害活性を有するポリペプチド又はタンパク質を産生する機能を有する上記〔 8 〕記載のペクター；

〔 2 6 〕 M T 1 - M M P 及び / 又は M T 3 - M M P に対して阻害活性を有するポリペプ 50

チド又はタンパク質を産生する機能を有する上記〔 9 〕記載の形質転換体；

〔 27 〕 抗体が、T e s t i c a n - 3 及びH P T L G と実質的に交差反応はしないものであることを特徴とする上記〔 13 〕記載の抗体；

〔 28 〕 モノクローナル抗体であることを特徴とする上記〔 13 〕記載の抗体；

〔 29 〕 少なくとも二種の抗N - T e s モノクローナル抗体を使用することを特徴とする上記〔 14 〕記載の測定方法；

〔 30 〕 少なくとも二種の抗N - T e s モノクローナル抗体を含有することを特徴とする上記〔 15 〕記載の測定試薬；及び

〔 31 〕 本発明の活性成分を使用することを特徴とするグリオーマの検出用試薬及びその測定方法を提供する。

10

本発明のその他の目的、特徴、優秀性及びその有する観点は、以下の記載より当業者にとっては明白であろう。しかしながら、以下の記載及び具体的な実施例等の記載を含めた本件明細書の記載は本発明の好ましい態様を示すものであり、説明のためにのみ示されているものであることを理解されたい。本明細書に開示した本発明の意図及び範囲内で、種々の変化及び／又は改変（あるいは修飾）をなすことは、以下の記載及び本明細書のその他の部分からの知識により、当業者には容易に明らかであろう。本明細書で引用されている全ての特許文献及び参考文献は、説明の目的で引用されているもので、それらは本明細書の一部としてその内容はここに含めて解釈されるべきものである。

本明細書において、用語「及び／又は」とは、（ 1 ）併合的接続関係と（ 2 ）選択的接続関係の両方が存在することを意味しており、例えば「治療及び／又は予防」の場合では（ 1 ）治療及び予防並びに（ 2 ）治療又は予防の両方を包含する意味で使用されている。その他においても用語「及び／又は」は同様に（ 1 ）併合的接続関係と（ 2 ）選択的接続関係の両方を包含する意味で使用されている。

20

発明を実施するための最良の形態

本発明に従い、T e s t i c a n ファミリーの一つで、M M P 阻害活性を有するヒト由来のN - T e s ポリペプチド若しくは該N - T e s ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも60%の相同性を有し且つM M P 阻害活性あるいは同等の抗原性を有するものであるペプチドまたはその塩、そのポリペプチドの特徴的な部分ペプチドまたはその塩、それらをコードする遺伝子、例えばD N A、R N A など、その遺伝子を遺伝子組換え技術で操作することが可能なように含有しているベクターあるいはプラスミド、こうしたベクターなどで形質転換された宿主細胞、さらにはその遺伝子を発現するトランスジェニックマウス等のトランスジェニック動物、その遺伝子を特異的に不活性化したノックアウトマウス等のノックアウト動物、その形質転換細胞を、培養して該ポリペプチドまたはその塩を製造する方法、こうして得られた該ポリペプチドまたはその塩やそのポリペプチドの特徴的な部分ペプチドまたはその塩を用いて得られた抗体、特にモノクローナル抗体、その抗体を産生するハイブリドーマ細胞、該単離された遺伝子、例えばD N A、R N Aなどをプローブとして用いたり、あるいは該抗体を用いた測定・診断手段並びに試薬が提供される。さらには、本明細書で開示され説明されている活性成分の利用を提供し、例えば、該活性成分を含有する医薬あるいは試薬などが提供され、そうした活性成分を用いた疾患、疾病あるいは異常な状態の治療及び／又は予防方法、さらにはスクリーニング方法などが提供される。

30

40

本明細書において「N - T e s」とは、プロテオグリカンであるT e s t i c a n 類に関連したペプチドであって、本発明で開示されている新規なペプチドを指している。該N - T e s は、313個のアミノ酸残基からなるペプチドであり、そのC末端側には特徴的な配列G l y³¹¹ - L y s³¹² - A r g³¹³を有しており、T e s t i c a n - 3やH P T L Gに存在するT Y domainやC W C V domainを欠いたもので、さらにT e s t i c a n - 3やH P T L Gに存在しているG l y c o s a m i n o g l y c a n a t t a c h m e n t s i t eを欠いていることを特徴としている。該N - T e s は、M T - M M P s 阻害活性を有し、特に、M T 1 - M M P、M T 3 - M M P に対して強い阻害活性を有し、さらにM T 3 - M M P に対してより強い阻害活性を有する。この阻

50

害活性としては、例えば、MT-MMPsがMMP-2を活性化することを阻害することが挙げられる。このMT-MMPsに対する阻害活性は、配列表の配列番号：1の第22番目～第122番目のアミノ酸配列部分内にあると予測され、これらアミノ酸配列またはそれと実質的に同等なアミノ酸配列を有するポリペプチドは、MT-MMPsに対する阻害活性を有することを意味する。これは、また、例えば、HPTLGはMT-MMPsに対する阻害活性を有することを意味する。さらに、testican-3は、これら配列に3アミノ酸残基の挿入があるが、testican-3も同様にMT-MMPsに対する阻害活性を有するものと考えられる。

本明細書で用いる用語「ポリペプチド」としては、以下に記載するような如何なるポリペプチドを指すものであってもよい。ポリペプチドの基本的な構造は周知であり、当該技術分野において非常に数多くの参考書及びその他の刊行物に記載がある。こうしたことに鑑み、本明細書で用いる用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合又は修飾したペプチド結合により互いに結合しているような2個又はそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチド又は任意のタンパク質を意味する。本明細書で用いる用語「ポリペプチド」としては、当該分野において通常、例えばペプチド、オリゴペプチドあるいはペプチドオリゴマーとも称せられる短い鎖のもの、及びタンパク質と一般的に言われ、多くの形態のものが知られている長い鎖のものの両方を意味してよい。ポリペプチドは、しばしば、通常、20種の天然型アミノ酸（天然に存在しているアミノ酸：あるいは遺伝子でコードされるアミノ酸）と称されるアミノ酸（20個存在している）以外のアミノ酸を含有していてもよい。ポリペプチドは、また末端アミノ酸残基を含めて、その多くのアミノ酸残基が翻訳された後にプロセッシング及びその他の改変（あるいは修飾）されるといった天然の工程によるのみならず、当業者に周知の化学的改変技術によっても、上記のポリペプチドはそれが改変（修飾）できることは理解されよう。該ポリペプチドに加えられる改変（修飾）については、多くの形態のものが知られており、それらは当該分野の基礎的な参考書及びさらに詳細な論文並びに多数の研究文献にも詳しく記載されており、これらは当業者に周知である。幾つかのとりわけ常套的な改変・修飾としては、例えばグリコシル化、脂質結合、硫酸化、グルタミン酸残基のγ-カルボキシル化、水酸化及びADP-リボシル化等が挙げられ、例えばT. E. Creighton, *Proteins - Structure and Molecular Properties*, Second Edition, W. H. Freeman and Company, New York, (1993); B. C. Johnson (Ed.), *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, Academic Press, New York, (1983) (Wold, F., "Posttranslational Protein Modifications: Perspective and Prospects", pp. 1-12); Seifter et al., "Analysis for Protein Modifications and nonprotein cofactors", *Meth. Enzymol.*, 182: 626-646 (1990); Rattan et al., "Protein Synthesis: Posttranslational Modification and Aging", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 663: p. 48-62 (1992)等の記載を参照できる。

本発明の「ポリペプチド」としては、特にN-Tes及びその関連ポリペプチドを包含する。該N-Tes及びその関連ポリペプチドとしては、ヒト由来のものが挙げられ、MMPs阻害活性、例えばMT1-MMP, MT3-MMPなどに対して阻害活性を有するものが挙げられ、代表的にはGlycosaminoglycan attachment siteを欠いている及び/又はTY domainやCWCV domainを欠いたものが挙げられ、より具体的には、配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列のうち、少なくとも第311位～第313位のアミノ酸配列を有するもの、第22位～第122位のアミノ酸配列を有するもの、同第22位～第313位のアミノ酸配列を有するもの、同第1位～第313位のアミノ酸配列を有するもの、及びそれらのいずれか一つと少

10

20

30

40

50

なくとも60%より高い相同性、好ましくは70%以上の相同性、さらに好ましくは80%以上の相同性、また好ましくは85%以上の相同性、もっと好ましくは90%以上の相同性、より好ましくは95%以上の相同性、特に好ましくは97%以上の相同性を有し且つMMP阻害活性あるいは同等の抗原性などといった実質的に同等の生物学的活性を有するアミノ酸配列を有するものがすべて挙げられる。

本発明のヒトN-Tesとしては、MT1-MMP, MT3-MMPなどの阻害活性を有し、Testican-3などのTesticanファミリーのバリエーションの一種であり、Glycosaminoglycan attachment siteを欠いたもので且つ新規なアミノ酸配列を有するものであればよい。より好ましくは、本発明のペプチドとしては、Testicanファミリーと少なくとも60%より高い相同性を持つアミノ酸配列を有するもののうち、glycosaminoglycan attachment siteを欠いたものが挙げられ、特に配列表の配列番号: 2で表されるアミノ酸配列のうち、少なくとも第311位~第313位のアミノ酸配列部位、第22位~第122位のアミノ酸配列部位あるいはその主要部位(例えば、該第311位~第313位を含む連続したアミノ酸残基、あるいは該第22位~第122位のうちの連続したアミノ酸残基5個以上、好ましくは10個以上、また好ましくは20個以上、さらに好ましくは30個以上、より好ましくは40個以上、また好ましくは50個以上、さらに好ましくは60個以上、もっと好ましくは70個以上、また好ましくは80個以上、さらに好ましくは90個以上、もっとも好ましくは100個以上、また好ましくは110個以上)を有するものが挙げられる。代表的には、本発明のペプチドは、配列表の配列番号: 2で表されるアミノ酸配列のうち、少なくとも第22位~第313位のアミノ酸配列を有するもの、及びそれらのいずれか一つと実質的に同等のアミノ酸配列を有するものからなる群から選ばれたものである。さらに本発明のペプチドとしては、配列表の配列番号: 2で表されるアミノ酸配列の一部または全部を有していてもよい。こうした配列を有するものはすべて包含されてよい。

本明細書中、「相同性」とは、ポリペプチド配列(あるいはアミノ酸配列)又はポリヌクレオチド配列(あるいは塩基配列)における2本の鎖の間で該鎖を構成している各アミノ酸残基同志又は各塩基同志の互いの適合関係において同一であると決定できるようなものの量(数)を意味し、二つのポリペプチド配列又は二つのポリヌクレオチド配列の間の配列相関性の程度を意味するものである。相同性は容易に算出できる。二つのポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列間の相同性を測定する方法は数多く知られており、「相同性」(「同一性」とも言われる)なる用語は、当業者には周知である(例えば、Lesk, A. M. (Ed.), Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, D. W. (Ed.), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Academic Press, New York, (1993); Griffin, A. M. & Griffin, H. G. (Ed.), Computer Analysis of Sequence Data: Part I, Human Press, New Jersey, (1994); von Heinje, G., Sequence Analysis in Molecular Biology, Academic Press, New York, (1987); Gribskov, M. & Devereux, J. (Ed.), Sequence Analysis Primer, M. Stockton Press, New York, (1991)等)。二つの配列の相同性を測定するのに用いる一般的な方法には、Martin, J. Bishop (Ed.), Guide to Huge Computers, Academic Press, San Diego, (1994); Carillo, H., & Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988)等)に開示されているものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。相同性を測定するための好ましい方法としては、試験する二つの配列間の最も大きな適合関係部分を得るように設計したものが挙げられる。このような方法は、コ

10

20

30

40

50

ンピュータープログラムとして組み立てられているものが挙げられる。二つの配列間の相同性を測定するための好ましいコンピュータプログラム法としては、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J. et al., Nucleic Acids Research, 12(1):387(1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403(1990))等が挙げられるが、これらに限定されるものでなく、当該分野で公知の方法を使用することができる。

本発明のN-Tesをコードする遺伝子は、代表的には配列表の配列番号:2で表されるペプチド及びその一部の連続したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有するもの、例えば、配列表の配列番号:1で表される塩基配列の少なくとも1038-1046位により構成される塩基配列を含有するもの、配列表の配列番号:1で表される塩基配列の少なくとも171-473位により構成される塩基配列を含有するもの、及び配列表の配列番号:1で表される塩基配列の108-110位のATGから1047-1049位のTGAより構成される塩基配列を含有するもの(1047-1049の終止コドンTGAは、TAAまたはTAGであってもよい)であることができるし、配列表の配列番号:1で表される塩基配列の171位から1049位の塩基配列を含有するもの、塩基配列に開始コドン、例えば、Metをコードするコドン(及び終止コドン)を付加したもの、また、該塩基配列がコードするタンパク質と少なくとも80%の相同性を有するアミノ酸配列を持ち且つMT1-MMP, MT3-MMPなどのMMPsの少なくとも一つに対し阻害活性を有するかあるいは同等の抗原性などのそれと実質的に同等の生物学的活性を有するペプチドをコードするといったそれと同効の塩基配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。該N-Tesをコードする遺伝子は、一本鎖DNA、二本鎖DNA、RNA、DNA:RNAハイブリッド、合成DNAなどの核酸であり、またヒトゲノムDNA、ヒトジェノミックDNAライブラリー、ヒト組織・細胞由来のcDNA、合成DNAのいずれであってもよい。該N-Tesをコードする遺伝子の塩基配列は、修飾(例えば、付加、除去、置換など)されることもでき、そうした修飾されたものも包含されてよい。さらには、以下説明するように、本発明の核酸は、本発明のペプチドあるいはその一部をコードするものであってよく、好ましいものとしてはDNAが挙げられる。また上記「同効の塩基配列」とは、例えばストリンジェントな条件で配列表の配列番号:1の塩基配列うちの連続した5個以上の塩基配列、好ましくは10個以上の塩基配列、より好ましくは15個以上の塩基配列、さらに好ましくは20個以上の塩基配列とハイブリダイズし、N-Tesと実質的に同等のアミノ酸配列をコードするものなどが挙げられる。

配列表の配列番号:1で表される塩基配列またはそれと同効の塩基配列を含有する本発明のDNAは、例えば以下に示す方法によって取得できる。

なお、遺伝子組換え技術は、例えばJ. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); 日本生化学会編、「続生化学実験講座I、遺伝子研究法II」、東京化学同人(1986); 日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸III(組換えDNA技術)」、東京化学同人(1992); R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 68 (Recombinant DNA), Academic Press, New York (1980); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100 (Recombinant DNA, Part B) & 101 (Recombinant DNA, Part C), Academic Press, New York (1983); R. Wu et al. ed., "Methods in Enzy

10

20

30

40

50

m o l o g y ” , V o l , 1 5 3 (R e c o m b i n a n t D N A , P a r t D) , 1 5 4 (R e c o m b i n a n t D N A , P a r t E) & 1 5 5 (R e c o m b i n a n t D N A , P a r t F) , A c a d e m i c P r e s s , N e w Y o r k (1 9 8 7) ; J . H . M i l l e r e d . , “ M e t h o d s i n E n z y m o l o g y ” , V o l . 2 0 4 , A c a d e m i c P r e s s , N e w Y o r k (1 9 9 1) ; R . W u e t a l . e d . , “ M e t h o d s i n E n z y m o l o g y ” , V o l . 2 1 8 , A c a d e m i c P r e s s , N e w Y o r k (1 9 9 3) などに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法あるいはそれらと実質的に同様な方法や改変法により行うことができる（それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる）。

クローニングされているヒト由来の c D N A ライブラリー、例えば種々のヒト由来の組織あるいは培養細胞（特にヒトの腎臓、脳、松果体、下垂体後葉、網膜、胸腺、精巣、卵巣、子宮、腸、心臓、肝臓、膵臓、小腸、大腸などの組織・細胞等）c D N A ライブラリーから得られた c D N A 挿入配列を持つプラスミドを、適当な検知系によって、M M P s のうちの少なくとも一つの活性を抑制していることを指標にして選別を行う。具体的には、例えば M M P - 9 , M M P - 2 及び M T 1 - M M P の全長の c D N A を発現するベクターと共に、試験されるべき該 c D N A ライブラリーから得られた c D N A 挿入配列を持つプラスミドを、適当な宿主細胞にトランスフェクトし、例えば潜在型、中間体、活性化型 M M P - 9 , M M P - 2 を検出にかけ、活性化型 M M P - 9 あるいは活性化型 M M P - 2 の産生を抑制する遺伝子プラスミド集団を検索する。

この検索手法は、繰り返し行なうことができる。こうして同定された遺伝子につき、その配列決定する。こうして同定された配列に基づいて適切なプライマーを設計・合成し、場合によっては、同定された配列のオリジンである動物由来の c D N A ライブラリーを用いるなどし、目的の配列をポリメラーゼ・チェイン・リアクション（p o l y m e r a s e c h a i n r e a c t i o n : P C R ）増幅する。得られた D N A 断片はそれをプローブに種々のヒト組織あるいは培養細胞等から構築されたヒトジェノミック D N A ライブラリーあるいはヒト由来 c D N A ライブラリーをスクリーニングし、プローブにハイブリダイズするクローンを選択し、該クローン中の D N A の挿入配列の塩基配列を決定し、新規な N - T e s 及びそれに関連する遺伝子配列を有する D N A 断片を決定・取得することもできる。必要に応じて該クローン中の D N A の挿入配列はサブクローニングすることができる。こうして解析された新規な遺伝子を有していると考えられる D N A 配列を基に、該 N - T e s 及びそれに関連する遺伝子配列をコードする遺伝子を取得することも可能である。また、解析された該新規な N - T e s 及びそれに関連する遺伝子配列（D N A 配列）を基にセンスプライマーとアンチセンスプライマーをデザインし、合成することができる。センスプライマーは、好ましくは解析された該所望のペプチドと推定される遺伝子の 5 ' 端側のエクソン部位から選んで合成することができ、アンチセンスプライマーは、好ましくは解析された該所望のペプチドと推定される遺伝子の 3 ' 端側のエクソン部位から選んで合成することができ、より好ましくは該センスプライマー合成に利用したエクソン部位以外から選ぶことができる。

遺伝子の c D N A は、その全長を一度に入手することを目指してもよいが、解析されたエクソン部位（複数のエクソン部位）を利用して、複数のプライマーをデザインして合成し、複数の P C R をデザインして行い（必要に応じて塩基配列決定された D N A 断片を解析して、当該遺伝子の c D N A の全塩基配列を決定し、それに基づいてクローニングし）、得られた D N A 断片から当該遺伝子の c D N A を得ることができる。プライマーは、好ましくは 5 個以上の塩基からなるオリゴヌクレオチド、より好ましくは 1 8 ~ 2 5 個の塩基からなるオリゴヌクレオチドが挙げられる。プライマーの作製は、当該分野で知られた方法で行うことができ、代表的にはフォスフォジエステル法、フォスフォトリエステル法、フォスフォアミダイト法などにより合成でき、例えば自動 D N A 合成装置、例えば、m o d e l 3 8 1 A D N A s y n t h e s i z e r (A p p l i e d B i o s y s t e m s) などを用いて合成できる。c D N A ライブラリーと前記のセンスプライマー及び

アンチセンスプライマーを用いてPCRを行い、cDNAを増幅することもできる。また、当該遺伝子の取得には、上記のようにして同定されたクローンから特異的なハイブリダイゼーションプローブを調製し、ヒト由来DNAライブラリーをスクリーニングし、プローブにハイブリダイズするクローンを選択することにより行うことができる。プローブなどを放射性同位体などによって標識するには、市販の標識キット、例えばランダムプライムドDNAラベリングキット(Boehringer Mannheim)などを使用し、random-primingキット(Pharmacia LKB, Uppsala)などを使用して、プローブ用DNAを $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Amersham)などで標識し、放射活性を持つプローブを得ることができる。さらに鋳型として用いるcDNAライブラリーは、市販の種々の組織由来cDNAライブラリーを直接使用することもでき、例えばStratagene, Invitrogen, Clontechなどから市販されたcDNAライブラリーを用いることができる。典型的な例では、該標識DNA断片とヒト組織・細胞から調製した遺伝子ライブラリー、例えばヒトP1 artificial chromosomeジェノミックライブラリー(Human Genome Mapping Resource Center)、ヒト脳cDNAライブラリー(例えば、Clontechなどから入手可能)を用い、ハイブリダイゼーションを行う。ヒト脳cDNAライブラリーは、例えば、 $\lambda\text{gt}10$ などのファージ中に構築することができ、それを大腸菌C600 hfl株などの宿主大腸菌に感染させ、ブランクを形成させて得ることができる。必要に応じて該クローン中のcDNAの挿入配列はサブクローニングすることができる。決定された塩基配列を基にして、目的とするDNAを単離することもできる。

塩基配列の決定は、ダイデオキシ法、例えばM13ダイデオキシ法など、Maxam-Gilbert法などを用いて行うことができるが、市販のシーケンシングキット、例えばTaqダイプライマーサイクルシーケンシングキット(Applied Biosystems)、Sequenase v 2.0 kitなどを用いたり、自動塩基配列決定装置、例えば蛍光DNAシーケンサー装置(例えば、Model 373A, Applied Biosystems)などを用いて行うことができる。ダイデオキシ法に用いられるポリメラーゼとしては、例えば、DNAポリメラーゼIのクレノー・フラグメント、AMV逆転写酵素、Taq DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、修飾T7 DNAポリメラーゼなどが挙げられる。

本明細書中、「ポリメラーゼ・チェイン・リアクション(Polymerase Chain Reaction)」又は「PCR」とは、一般的に、米国特許第4683195号明細書などに記載されたような方法を指し、例えば、所望のヌクレオチド配列をインビトロで酵素的に増幅するための方法を指している。一般に、PCR法は、鋳型核酸と優先的にハイブリダイズすることのできる2個のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、プライマー伸長合成を行うようなサイクルを繰り返し行うことを含むものである。典型的には、PCR法で用いられるプライマーは、鋳型内部の増幅されるべきヌクレオチド配列に対して相補的なプライマーを使用することができ、例えば、該増幅されるべきヌクレオチド配列とその両端において相補的であるか、あるいは該増幅されるべきヌクレオチド配列に隣接しているものを好ましく使用され得る。

PCR反応は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、例えばR. Saiki, et al., Science, 230: 1350, 1985; R. Saiki, et al., Science, 239: 487, 1988; H. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols: a guide to methods and applications", Academic Press, New York (1990);

M. J. McPherson, P. Quirke and G. R. Taylor (Ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991); M. A. Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988)などに記載された方法あるいはそれを修飾したり、改変した方法に従って行うことができる。また、PCR法は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。

代表的な場合には、例えば鋳型となる1st strand DNAとプライマーとを、10×反応緩衝液(Taq DNAポリメラーゼなどDNAポリメラーゼに添付されている)、dNTPs(デオキシヌクレオシド三リン酸dATP, dGTP, dCTP, dTTPの混合物)、Taq DNAポリメラーゼ及び脱イオン蒸留水と混合する。混合物を、例えば、GeneAmp 2400 PCR system, Perkin-Elmer/Cetusなどの自動サーマルサイクラーを用いて一般的なPCRサイクル条件下にそのサイクルを25~60回繰り返すが、増幅のためのサイクル数は適宜目的に応じて適当な回数とすることができる。PCRサイクル条件としては、例えば、変性90~95 5~100秒、アニーリング40~60 5~150秒、伸長65~75 30~300秒のサイクル、好ましくは変性94 15秒、アニーリング58 15秒、伸長72 45秒のサイクルが挙げられるが、アニーリングの反応温度及び時間は適宜実験によって適当な値を選択できるし、変性反応及び伸長反応の時間も、予想されるPCR産物の鎖長に応じて適当な値を選択できる。アニーリングの反応温度は、通常プライマーと鋳型DNAとのハイブリッドのTm値に応じて変えることが好ましい。伸長反応の時間は、通常1000bpの鎖長当たり1分程度がおおよその目安であるが、より短い時間を選択することも場合により可能である。

得られたPCR産物は、通常1~2%アガロースゲル電気泳動にかけて、特異なバンドとしてゲルから切り出し、例えば、gene clean kit (Bio 101)などの市販の抽出キットを用いてDNAを抽出する。抽出されたDNAは適当な制限酵素で切断し、必要に応じ精製処理したり、さらには必要に応じ5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼなどによりリン酸化した後、pUC18などのpUC系ベクターといった適当なプラスミドベクターにライゲーションし、適当なコンピュタント細胞を形質転換する。クローニングされたPCR産物はその塩基配列を解析される。

また、当該遺伝子のエクソン部位のうち解析した5'端側のエクソン部位の塩基配列に基づいてデザインされたプライマーを利用して、当該遺伝子のcDNAの5'端側のcDNAを取得し、一方当該遺伝子のエクソン部位のうち解析した3'端側のエクソン部位の塩基配列に基づいてデザインされたプライマーを利用して、当該遺伝子のcDNAの3'端側のcDNAを取得し、次に必要に応じてこれらプライマーや得られた当該遺伝子のcDNAの5'端側のcDNA並びに3'端側のcDNAの塩基配列の情報を利用してデザインしたプライマーを用い、ヒトの組織、特にヒト脳組織などから単離したmRNAから逆転写酵素により作製された1st strand cDNAを鋳型にしてPCRにより増幅して、当該遺伝子のcDNAを得ることもできる。

5'端側のプライマーとしては、少なくとも開始コドンを含むか、あるいは該開始コドンを含めて増幅できるように選択し、また3'端側のプライマーとしては、少なくともストップコドンを含むか、あるいは該ストップコドンを含めて増幅できるように選択することが好ましい。当該遺伝子の全長のcDNAを得るにあたり、PCRは上記したようにして行なうことができ、また好ましいPCRサイクル条件としては、例えば、変性92~95 10~20秒、アニーリング55~60 10~30秒、伸長65~75 150~300秒のサイクル、より好ましくは変性94 15秒、アニーリング58 15秒、伸長68 4分のサイクルが挙げられる。

得られたPCR産物は、上記と同様にしてクローニングしてその塩基配列を解析され決定される。

また決定されたDNAの塩基配列を基にプライマーをデザインし、これらプライマーと各

10

20

30

40

50

種の動物細胞由来の cDNA ライブラリー（例えば、各種のヒト、細胞由来の cDNA ライブラリー）を用いて、スクリーニングを行うことにより、同様に目的とするクローンを得ることができる。またこれらプライマーを用いて PCR 増幅を行い、目的とする遺伝子や、新規な遺伝子、それらの断片などを得ることができる。こうして N - T e s と相同性を有するが、配列が新規な PCR 産物を検索することもできる。

本明細書中、「オリゴヌクレオチド」とは、比較的短い一本鎖又は二本鎖のポリヌクレオチドで、好ましくはポリデオキシヌクレオチドが挙げられ、*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, Vol. 28, p. 716 - 734 (1989) に記載されているような既知の方法、例えば、トリエステル法、ホスファイト法、ホスホアミダイト法、ホスホネート法などの方法により化学合成されることができ、通常合成は、修飾された固体支持体上で合成を便利に行うことができることが知られており、例えば、自動化された合成装置を用いて行うことができ、該装置は市販されている。該オリゴヌクレオチドは、一つ又はそれ以上の修飾された塩基を含有してよく、例えば、イノシンなどの天然においては普通でない塩基あるいはトリチル化された塩基などを含有してよい。

得られた PCR 産物をクローニングし、得られた PCR 産物の塩基配列を決定し、新規な N - T e s 及びそれに関連した遺伝子配列を有する DNA 断片を取得することもできる。また、この DNA 断片をプローブに同様にして種々の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、目的とする DNA を単離することもできる。PCR 産物のクローニングには、例えば、p - Direct (Clontech), pCR - ScriptTM SK (+) (Stratagene), pGEM - T (Promega), pAmpTM (Gibco - BRL) などの市販のプラスミドベクターを用いることが出来る。

cDNA ライブラリーを構築するためには、cDNA を入手する必要があるが、これは、例えば次のようにして得られる。種々のヒトの組織あるいは培養細胞から mRNA を単離する。mRNA の単離は、当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、J. Sambrook et al., "Molecular Cloning", 2nd ed., Chapter 7, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); D.M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); L. Grossman et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 12, Part A & B, Academic Press, New York (1968); S.L. Berger et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 152, p. 33 & p. 215, Academic Press, New York (1987); Biochemistry, 18: 5294 - 5299, 1979 などに記載の方法、例えばグアニジン - 塩化セシウム法、チオシアン酸グアニジン法、フェノール法などの方法で行うことが出来る。mRNA の単離に用いられるキットとしては、例えば、Pharmacia, Stratagene, Gibco - BRL などから市販されているものが挙げられる。必要に応じ、得られた全 RNA はオリゴ(dT) - セルロースカラム、スピンカラム、オリゴ(dT) 結合磁性ビーズなどを使用して精製してポリ(A)⁺ mRNA を得ることが出来る。

この mRNA 及び逆転写酵素 (RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ) を用いて、cDNA を作製する。逆転写反応では、オリゴ(dT) プライマーを用いることができる。オリゴ(dT) プライマーは、好適には 12 ~ 18 個の T 残基を持つものが使用できる。指向性クローニングを行う場合には、12 ~ 18 個の T 残基の 5' 側に制限酵素部位を連結した合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いることも好ましい。こうしたプライマーの例としては、Xba I オリゴ(dT) プライマーアダプターなどが挙げられる。またランダムヘキサマープライマーを用いると、mRNA の 5' 末端側が得られる可能性が増大し、このランダムヘキサマープライマーは単独で、あるいはオリゴ(dT) プライマーと混合し

10

20

30

40

50

て使用できる。逆転写反応では、必要に応じてRNAse阻害剤、例えば、RNasin (Boehringer Mannheim)を加えることができる。mRNA及び逆転写酵素を用いてのcDNA合成は当該分野で公知の方法あるいはそれと実質的に同様な方法や改変法により行うことができるが、H. Land et al., Nucleic Acids Res., 9:2251, 1981; U. Gubler et al., Gene, 25:263-269, 1983; S. L. Berger et al. ed., "Methods in Enzymology", Vol. 152, p. 307, Academic Press, New York (1987)などに記載の方法が挙げられる。

得られたcDNAはそれを基にして、ファージベクター、プラスミドベクターを使用するなどしてcDNAライブラリーを構築できる。またファージベクターを使用する以外で、大腸菌などの宿主細胞の形質転換をするには、例えばカルシウム法、ルビジウム/カルシウム法、カルシウム/マンガン法、TFB高効率法、FSB凍結コンピテント細胞法、迅速コロニー法、エレクトロポレーションなど当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができる(D. Hanahan, J. Mol. Biol., 166:557, 1983など)。

目的とするDNAを単離するためには、逆転写PCR(polymerase chain reaction coupled reverse transcription; RT-PCR)、RACE(rapid amplification of cDNA ends)を適用することが出来る。RACEは、例えば、M. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols" (M. A. Frohman, "a guide to methods and applications"), pp. 28-38, Academic Press, New York (1990)などに記載された方法に従って行うことができる。RT-PCR産物はプラスミドベクターにクローニングすることができ、それを高効率のコンピテント細胞に導入できる。

更に、微量の細胞あるいは組織からmRNAを単離精製できる方法、例えば、REX kit, United States Biochemical; Glass MAXTM RNA spin cartridge system, Gibco-BRLなどの市販のキットを利用し、得られたmRNAをオリゴ(dT)プライマーを用いて逆転写して、1st strand DNAを合成し、ついで1st strand DNAの3'末端にホモポリマーテール(例えば、G残基)を付けた後、あるいは該DNAにアダプターを付けた後、オリゴ(dT)プライマーとオリゴ(dC)プライマーあるいはアダプタープライマーを用いてcDNAをPCR増幅することもできる。これに適した市販のキットとしては、SuperScriptTM pre-amplification system (Gibco-BRL); cDNA CycleTM kit (Invitrogen)などが挙げられる。

ハイブリダイゼーションは、所定の挿入DNAを保持するなどしている微生物により形成されたブランク(核酸自体でもよい)をナイロンフィルターなどの膜に転写せしめ、必要に応じ変成処理、固定化処理、洗浄処理などを施した後、その膜に転写せしめられたものを、必要に応じ変成させた標識プローブDNA断片と、ハイブリダイゼーション用バッファ中で反応させて行われる。ハイブリダイゼーション処理は、普通約35～約80、より好適には約50～約65で、約15分～約36時間、より好適には約1時間～約24時間行われるが、適宜最適な条件を選択して行うことができる。例えば、ハイブリダイゼーション処理は、約55で約18時間行われる。ハイブリダイゼーション用バッファとしては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができ、例えば、Rapid hybridization buffer (Amersham)などを用いることができる。転写した膜の変成処理としては、アルカリ変性液を使用する方法が挙げられ、その処理後中和液や緩衝液で処理するのが好ましい。また膜の固定化処理としては、普通約40～約100、より好適には約70～約90で、約15分～約24時間、より好適には約1時間～約4時間ベーキングすることにより行われるが、適宜好

ましい条件を選択して行うことができる。例えば、フィルターを約80で約2時間ベークンすることにより固定化が行われる。転写した膜の洗浄処理としては、当該分野で普通に使用される洗浄液、例えば1M NaCl, 1mM EDTAおよび0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 含有50mM Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0などで洗うことにより行うことができる。ナイロンフィルターなどの膜としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができ、例えば、ナイロンフィルター[ハイボンド(Hybond)-N、Amersham]などを挙げることができる。

上記アルカリ変性液、中和液、緩衝液としては、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いることができ、アルカリ変性液としては、例えば、0.5M NaOHおよび1.5M NaClを含有する液などを挙げることができる、中和液としては、例えば、1.5M NaCl含有0.5M Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0などを挙げることができる、緩衝液としては、例えば、2×SSPE (0.36M NaCl、20mM NaH₂PO₄ および2mM EDTA)などを挙げることができる。またハイブリダイゼーション処理に先立ち、非特異的なハイブリダイゼーション反応を防ぐために、必要に応じて転写した膜はプレハイブリダイゼーション処理することが好ましい。このプレハイブリダイゼーション処理は、例えば、プレハイブリダイゼーション溶液[50% formamide, 5×Denhardt's 溶液(0.2% ウシ血清アルブミン、0.2% polyvinyl pyrrolidone), 5×SSPE, 0.1% SDS, 100 μg/ml 熱変性サケ精子DNA]などに浸し、約35～約50、好ましくは約42で、約4～約24時間、好ましくは約6～約8時間反応させることにより行うことができるが、こうした条件は当業者であれば適宜実験を繰り返し、より好ましい条件を決めることができる。ハイブリダイゼーションに用いる標識プローブDNA断片の変成は、例えば、約70～約100、好ましくは約100で、約1分間～約60分間、好ましくは約5分間加熱するなどして行うことができる。なお、ハイブリダイゼーションは、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で行うことができるが、本明細書でストリンジェントな条件とは、例えばナトリウム濃度に関し、約15～約50mM、好ましくは約19～約40mM、より好ましくは約19～約20mMで、温度については約35～約85、好ましくは約50～約70、より好ましくは約60～約65の条件を示す。

ハイブリダイゼーション完了後、フィルターを十分に洗浄処理し、特異的なハイブリダイゼーション反応をした標識プローブDNA断片以外の標識プローブを取り除く。フィルターの洗浄処理は、当該分野で普通に使用されるものの中から選んで用いて行うことができ、例えば、0.1% SDS 含有0.5×SSC (0.15M NaCl、15mM クエン酸) 溶液などで洗うことにより実施できる。

ハイブリダイズしたプラーク(核酸)は、代表的にはオートラジオグラフィーにより検出することができるが、当該分野で用いられる方法の中から適宜選択してプラーク(核酸)検出に用いることもできる。検出したシグナルに相当するプラーク(核酸)を、適切な緩衝液、例えば、SM 溶液(100mM NaCl および10mM MgSO₄ 含有50mM Tris-HCl 緩衝液、pH 7.5)などに懸濁し、ついでこのファージ(核酸自体を含めてよい)懸濁液を適度に希釈して、大腸菌に感染させ、得られた大腸菌を培養して、その培養された大腸菌から目的組換え体ファージ(核酸)を得る。なお、必要に応じて上記プローブDNAを使用して、ハイブリダイゼーション処理により遺伝子ライブラリーやcDNAライブラリーから目的組換え体ファージ(核酸)をスクリーニングする処理は、繰り返して行うことができる。また目的組換え体ファージ(核酸)は、培養された大腸菌から抽出処理、遠心分離処理などを施して得ることができる。

得られたファージ粒子は、当該分野で普通に使用される方法で精製分離することができ、例えば、グリセロールグラジエント超遠心分離法(Molecular cloning, a laboratory manual, ed. T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed. 78, 1989)などにより精製することができる。ファージ粒子からは、当該分野で普通に使用される方

10

20

30

40

50

法でDNAを精製分離することができ、例えば、得られたファージをTM溶液(10 mM MgSO₄ 含有50 mM Tris-HCl緩衝液、pH 7.8)などに懸濁し、DNase IおよびRNase Aなどで処理後、20 mM EDTA、50 μg/ml Proteinase K及び0.5% SDS混合液などを加え、約65℃、約1時間保温した後、これをフェノール抽出ジエチルエーテル抽出後、エタノール沈殿によりDNAを沈殿させ、次に得られたDNAを70%エタノールで洗浄後乾燥し、TE溶液(10 mM EDTA 含有10 mM Tris-HCl緩衝液、pH 8.0)に溶解するなどして得られる。また、目的としているDNAは、サブクロニングなどにより大量に得ることも可能であり、例えばサブクロニングは、宿主として大腸菌を用いプラスミドベクターなどを用いて行うことができる。こうしたサブクロニングにより得られたDNAも、

10

上記と同様にして遠心分離、フェノール抽出、エタノール沈殿などの方法により精製分離できる。

こうして本発明に従って、目的とするDNAを含有するクローン(例えば、組換え体ファージなどとして)を得ることができる。例えば、このクローン化した組換え体ファージより単離されたDNAインサートの配列決定された塩基配列の全長は1510 bpであり、その配列は配列表の配列番号: 1で示されたものが得られていることが認められる。同定されたDNA配列中には、推定313個のアミノ酸をコードするオープンリーディングフレームの存在が認められ、その推定されるアミノ酸配列は、配列表の配列番号: 2で示されるようなものと認められる。GenBankTM/EMBL DNA Data Baseなどを使用したホモロジー検索の結果、Testican-1(GenBank Accession No. AF231124)、Testican-2(GenBank Accession No. AJ001453)、Testican-3(GenBank Accession No. AAJ001454)およびHPTLG(WO99/23110)のアミノ酸配列と高い相同性が認められたが、そのC末端側には特徴的な配列Gly³¹¹-Lys³¹²-Arg³¹³を有しており、さらにTestican-3やHPTLGに存在するTY domainやCWCV domainを欠いたものであって、またTestican-3やHPTLGに存在しているGlycosaminoglycan attachment siteを欠いているとの特徴が認められた。この推定されるタンパク質は、新規なヒトTestican類の一つであり、それを「N-Tes」と名付けた。そして、N-Tes遺伝子は、新規なTesticanファミリー

20

30

に属するポリペプチドをコードしていることは明白であり、N-Tes遺伝子を用いて作製した組換え体プラスミドは全て新規な組換え体であり、そのプラスミドで形質転換あるいはトランスフェクトされ得られた形質転換体あるいはトランスフェクタントも新規なものである。

配列表の配列番号: 1で示される塩基配列の全部あるいは一部を有する核酸は、化学合成によって得ることも可能である。その場合断片を化学合成し、それらを酵素により結合することによってもよい。また、化学合成断片を上記したようにして、プライマーあるいはプローブとして用いて目的とする配列を得ることも可能である。PCR法で用いるプライマーとしては、上記の部位を含むDNA断片を増幅できるものであれば、特に限定されない。代表的には、プライマーは(a)配列表の配列番号: 1に示された塩基配列のうちの

40

任意の領域に相当する塩基配列を有するオリゴヌクレオチド及び(b)配列表の配列番号: 1に示された塩基配列のうちの任意の領域に対する相補塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用することができ、より好ましくは(1)配列表の配列番号: 1に示された塩基配列のうちの5'端側の任意の領域に相当する塩基配列を有するオリゴヌクレオチド及び(2)配列表の配列番号: 1に示された塩基配列のうちの3'端側の任意の領域に対する相補塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用することができ、例えば、3~100個、好ましくは10~50個、さらに好ましくは15~35個のヌクレオチドを含有するものが挙げられる。また、PCR条件も特に限定されず、通常行われる公知の条件でよく、例えば、上記した文献の記載を参考に選択することができる。PCRにおいては、DNA鎖の熱変性、プライマーのアニールン及びポリメラーゼによる相補鎖の合成からなる

50

一つのサイクルが、例えば、10～50回、好ましくは20～35回、より好ましくは25～30回繰り返して行われる。

本発明で得られたDNA断片を、下記で詳しく説明するような適当なベクター、例えば、プラスミドpEX、pMAMneo、pKG5などのベクターに組み込み、下記で詳しく説明するような適当な宿主細胞、例えば、大腸菌、酵母、CHO細胞、COS細胞などで発現させることができる。また、該DNA断片は、そのままあるいは適当な制御配列を付加したDNA断片として、または適当なベクターに組み込み、そして動物に導入して、N-Tes遺伝子、例えば、N-Tesを発現するトランスジェニック動物を作成することができる。動物としては、哺乳動物が挙げられ、例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ウシなどが挙げられる。好ましくは、マウスなどの動物の受精卵に該DNA断片を導入して、トランスジェニック動物を作成することができる。

10

N-Tes遺伝子産物の確認を、N-Tes遺伝子をトランスフェクションした、293T細胞、COS-1細胞などのそれに適した動物細胞などを用いて行うことができる。この外来遺伝子を哺乳動物などの動物細胞に導入する方法としては当該分野で知られた方法あるいはそれと実質的に同様な方法で行うことができ、例えばリン酸カルシウム法（例えば、F.L.Graham et al., Virology, 52:456, 1973など）、DEAE-デキストラン法（例えば、D.Warden et al., J. Gen. Virol., 3:371, 1968など）、エレクトロポレーション法（例えば、E. Neumann et al., EMBO J, 1:841, 1982など）、マイクロインジェクション法、リボソーム法、ウイルス感染法、ファージ粒子法などが挙げられる。こうしてN-Tes遺伝子をトランスフェクションされた動物細胞の産生する遺伝子産物は、それを解析することもできる。

20

N-Tes遺伝子など（本発明で得られたDNAなど）を組み込むプラスミドとしては遺伝子工学的に常用される宿主細胞（例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母、CHO細胞、COS細胞等の真核細胞宿主、Sf21等の昆虫細胞宿主）中で該DNAが発現できるプラスミドであればどのようなプラスミドでもよい。こうした配列内には、例えば選択した宿主細胞で発現するのに好適に修飾されたコドンが含まれていることができるし、制限酵素部位が設けられていることもできるし、目的とする遺伝子の発現を容易にするための制御配列、促進配列など、目的とする遺伝子を結合するのに役立つリンカー、アダプターなど、さらには抗生物質耐性などを制御したり、代謝を制御したりし、選別などに

30

有用な配列（ハイブリドタンパク質や融合タンパク質をコードするものも含む）等を含んでいることができる。好ましくは、適当なプロモーター、例えば大腸菌を宿主とするプラスミドでは、トリプトファンプロモーター（trp）、ラクトースプロモーター（lac）、トリプトファン・ラクトースプロモーター（tac）、リボプロテインプロモーター（lpp）、λファージP_Lプロモーター等を、動物細胞を宿主とするプラスミドでは、SV40レイトプロモーター、MMTV LTRプロモーター、RSV LTRプロモーター、CMVプロモーター、SRαプロモーター等を、酵母を宿主とするプラスミドでは、GAL1、GAL10プロモーター等を使用し得る。

大腸菌を宿主とするプラスミドとしては、例えばpBR322、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、pSP64、pSP65、pTZ-18R/-18U、pTZ-19R/-19U、pGEM-3、pGEM-4、pGEM-3Z、pGEM-4Z、pGEM-5Zf(-)、pBluescript KSTM、(Stratagene)などが挙げられる。大腸菌での発現に適したプラスミドベクターとしては、pAS、pKK223 (Pharmacia)、pMC1403、pMC931、pKC30、pRSET-B (Invitrogen)なども挙げられる。動物細胞を宿主とするプラスミドとしては、SV40ベクター、ポリオーマ・ウイルスベクター、ワクシニア・ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられ、例えばpcD、pcD-SRα、CDM8、pCEV4、pME18S、pBC12BI、pSG5 (Stratagene)などが挙げられる。酵母を宿主とするプラスミドとしては、YIp型ベクター、

40

50

Y E p 型ベクター、Y R p 型ベクター、Y C p 型ベクターなどが挙げられ、例えば p G P D - 2 などが挙げられる。宿主細胞としては、宿主細胞が大腸菌の場合、例えば大腸菌 K 1 2 株に由来するものが挙げられ、例えば W 5 3 3、X L 1 - B l u e、C 6 0 0、D H 1、D H 5、D H 1 1 S、D H 1 2 S、D H 5 α、D H 1 0 B、H B 1 0 1、M C 1 0 6 1、J M 1 0 9、S T B L 2、B 8 3 4 株由来としては、B L 2 1 (D E 3) p L y s S などが挙げられる。宿主細胞が動物細胞の場合、例えばアフリカミドリザル線維芽細胞由来の C O S - 7 細胞、C O S - 1 細胞、C V - 1 細胞、マウス線維芽細胞由来の C O P 細胞、M O P 細胞、W O P 細胞、チャイニーズ・ハムスター細胞由来の C H O 細胞、C H O D H F R ⁺ 細胞、ヒト H e L a 細胞、マウス細胞由来 C 1 2 7 細胞、マウス細胞由来 N I H 3 T 3 細胞などが挙げられる。昆虫細胞としては、カイコ核多角体病ウイルス (B o m b y x m o r i n u c l e a r p o l y h e d r o s i s v i r u s) あるいはそれに由来するものをベクターとし、カイコ幼虫あるいはカイコ培養細胞、例えば B M - N 細胞などを用いることが挙げられる。植物細胞を宿主細胞として使用することも可能であり、それに適するベクターと共に、それらは当該分野で広く知られている。

本発明の遺伝子工学的手法においては、当該分野で知られたあるいは汎用されている制限酵素、逆転写酵素、DNA断片をクローン化するのに適した構造に修飾したりあるいは変換するための酵素であるDNA修飾・分解酵素、DNAポリメラーゼ、末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ、DNAリガーゼなどを用いることが出来る。制限酵素としては、例えば、R . J . R o b e r t s , N u c l e i c A c i d s R e s . , 1 3 : r 1 6 5 , 1 9 8 5 ; S . L i n n e t a l . e d . N u c l e a s e s , p . 1 0 9 , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b . , C o l d S p r i n g H a r b o r , N e w Y o r k , 1 9 8 2 ; R . J . R o b e r t s , D . M a c e l i s , N u c l e i c A c i d s R e s . , 1 9 : S u p p l . 2 0 7 7 , 1 9 9 1 などに記載のものが挙げられる。逆転写酵素としては、例えばマウスモロネイ白血病ウイルス (m o u s e M o l o n e y l e u k e m i a v i r u s ; M M L V) 由来の逆転写酵素 (r e v e r s e t r a n s c r i p t a s e)、ニワトリ骨髓芽球症ウイルス (a v i a n m y e l o b l a s t o s i s v i r u s ; A M V) 由来の逆転写酵素などが挙げられる。逆転写酵素は、R N a s e H 欠損体などは好ましく用いることができ、特に R N a s e H 活性を欠いた修飾 M M L V R T が好ましく使用でき、さらには熱安定性の高いものが好ましい。適した逆転写酵素としては、M M L V R T (G i b c o - B R L)、S u p e r s c r i p t R T p l u s (L i f e T e c h n o l o g i e s) などが挙げられる。

DNAポリメラーゼとしては、例えば大腸菌DNAポリメラーゼ、その誘導体であるクレノウ・フラグメント、大腸菌ファージ T 4 DNAポリメラーゼ、大腸菌ファージ T 7 DNAポリメラーゼ、耐熱菌DNAポリメラーゼなどが挙げられる。末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼとしては、例えば R . W u e t a l . e d . , " M e t h o d s i n E n z y m o l o g y " , V o l . 1 0 0 , p . 9 6 , A c a d e m i c P r e s s , N e w Y o r k (1 9 8 3) に記載の 3' - O H 末端にデオキシヌクレオチド (d N M P) を付加する T d T a s e などが挙げられる。DNA修飾・分解酵素としては、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼなどが挙げられ、例えばヘビ毒ホスホジエステラーゼ、脾臓ホスホジエステラーゼ、大腸菌DNAエキソヌクレアーゼ I、大腸菌DNAエキソヌクレアーゼ I I I、大腸菌DNAエキソヌクレアーゼ V I I、λエキソヌクレアーゼ、D N a s e I、ヌクレアーゼ S 1、ミクロコッカス (M i c r o c o c c u s) ヌクレアーゼなどが挙げられる。DNAリガーゼとしては、例えば大腸菌DNAリガーゼ、T 4 DNAリガーゼなどが挙げられる。

DNA遺伝子をクローニングしてDNAライブラリーを構築するのに適したベクターとしては、プラスミド、λファージ、コスミド、P 1 ファージ、F 因子、Y A C などが挙げられ、好ましくはλファージ由来のベクターが挙げられ、例えば C h a r o n 4 A、C h a r o n 2 1 A、λ g t 1 0、λ g t 1 1、λ D A S H I I、λ F I X I I、λ E M B L 3、λ Z A P I I ^{T M} (S t r a t a g e n e) などが挙げられる。

10

20

30

40

50

本発明のタンパク質をコードする核酸を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体は、必要に応じて適当な選択マーカーを用い、繰り返しクローニングを行うことにより、高い発現能を安定して有する細胞株を得ることができる。例えば、宿主細胞として動物細胞を用いた形質転換体において、*d h f r* 遺伝子を選択マーカーとして利用した場合、*M T X* 濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、本発明のタンパク質をコードするDNAを増幅させ、より高い発現を得られる細胞株を得ることができる。本発明の形質転換体は、本発明のタンパク質をコードする核酸が発現可能な条件下で培養し、目的物を生成、蓄積せしめることができる。該形質転換体は、当該分野で汎用されている培地中で培養することができる。例えば、大腸菌、枯草菌等の原核細胞宿主、酵母などを宿主としている形質転換体は、液体培地を好適に使用することができる。培地中には、該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、麦芽エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム、炭酸カルシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、カザミノ酸、生長促進因子などを添加してもよい。また、必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 3β -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。培地のpHは約5~8が望ましい。

培養は、例えば大腸菌では通常約15~約45で約3~約75時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5~約20%の胎児牛血清を含むMEM培地、PRMI1640培地、DMEM培地などが用いられる。pHは約6~約8であるのが好ましい。培養は通常約30~約40で約15~約72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。上記培養細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により粗抽出液を得る方法などを適宜用いることができる。緩衝液の中には尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白変性剤や、トリトンX-100(商品名)、ツウィーン-80(商品名)などの界面活性剤を加えてあってもよい。培養液中に目的生成物が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる目的生成物は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせてその精製を行なうことができ、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、例えばジエチルアミノエチル基あるいはカルボキシメチル基などを持つ担体などを用いたイオン交換クロマトグラフィー法、例えばブチル基、オクチル基、フェニル基など疎水性基を持つ担体などを用いた疎水性クロマトグラフィー法、色素ゲルクロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して得ることができる。好ましくは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、リガンドなどを固定化したアフィニティ・クロマトグラフィーなどで処理し精製分離処理できる。例えば、ゼラチン-アガロース・アフィニティ・クロマトグラフィー、ヘパリン-アガロース・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

さらに、本発明に係わるN-Tesの遺伝子塩基配列を基に遺伝子工学的に常用される方法を用いることにより、N-Tesのアミノ酸配列中に適宜、1個ないし複数個以上のアミノ酸の置換、欠失、挿入、転移あるいは付加したとき変異を導入した相当するタンパク質を製造することができる。こうした変異・変換・修飾法としては、日本生化学会編、「続生化学実験講座1、遺伝子研究法II」、p105(広瀬進)、東京化学同人(1986);日本生化学会編、「新生化学実験講座2、核酸III(組換えDNA技術)」、p233(広瀬進)、東京化学同人(1992);R.Wu, L.Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol.154, p.350

10

20

30

40

50

& p. 367, Academic Press, New York (1987); R. Wu, L. Grossman, ed., "Methods in Enzymology", Vol. 100, p. 457 & p. 468, Academic Press, New York (1983); J. A. Wells et al., Gene, 34: 315, 1985; T. Grundstroem et al., Nucleic Acids Res., 13: 3305, 1985; J. Taylor et al., Nucleic Acids Res., 13: 8765, 1985; R. Wu ed., "Methods in Enzymology", Vol. 155, p. 568, Academic Press, New York (1987); A. R. Oliphant et al., Gene, 44: 177, 1986などに記載の方法が挙げられる。例えば合成オリゴヌクレオチドなどを利用する位置指定変異導入法(部位特異的変異導入法)(Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10: 6487, 1987; Carter et al., Nucl. Acids Res., 13: 4331, 1986), カセット変異導入法(cassette mutagenesis: Wells et al., Gene, 34: 315, 1985), 制限部位選択変異導入法(restriction selection mutagenesis: Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A, 317: 415, 1986), アラニン・スキャンニング法(Cunningham & Wells, Science, 244: 1081-1085, 1989), PCR変異導入法, PCRメガプライマー法, Kunkel法, dNTP[αS]法(Eckstein), 亜硫酸や亜硝酸などを用いる領域指定変異導入法等の方法が挙げられる。さらに得られた本発明のタンパク質は、化学的な手法でその含有されるアミノ酸残基を修飾することもできるし、ペプチダーゼ、例えばペプシン、キモトリプシン、パパイン、ブロメライン、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼなどの酵素を用いて修飾したり、部分分解したりしてその誘導体などにすることができる。本発明のタンパク質は、C末端が通常カルボキシル基(-COOH)またはカルボキシレート(-COO⁻)であるが、C末端がアミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR)であってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁ - C₆ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃ - C₈ シクロアルキル基、例えば、フェニル、α-ナフチルなどのC₆ - C₁₂ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁ - C₂ アルキル基もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C₁ - C₂ アルキル基などのC₇ - C₁₄ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のタンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₁ - C₅ アルキル-カルボニル基などのC₁ - C₆ アシル基など)で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミル化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、-OH、-COOH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁ - C₆ アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。また遺伝子組換え法で製造する時に融合タンパク質として発現させ、生体内あるいは生体外で天然のN-Tesと実質的に同等の生物学的活性を有しているものに変換・加工してもよい。遺伝子工学的に常用される融合産生法を用いることができるが、こうした融合タンパク質はその融合部を利用してアフィニティークロマトグラフィーなどで精製することも可能である。こうした融合タンパク質としては、ヒスチジンタグに融合せしめられたもの、あるいは、β-ガラクトシダーゼ(β-gal)、マルトース

結合タンパク (MBP)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、チオレドキシン (TRX) 又は Cre Recombinase のアミノ酸配列に融合せしめられたものなどが挙げられる。同様に、ポリペプチドは、ヘテロジニアスなエピトープのタグを付加され、該エピトープに特異的に結合する抗体を用いてのイムノアフィニティ・クロマトグラフィーによる精製をなし得るようにすることもできる。より適した実施態様においては、該エピトープタグとしては、例えば AU5, c-Myc, CruzTag 09, CruzTag 22, CruzTag 41, Glu-Glu, HA, Ha.11, KT3, FLAG (registered trademark, Sigma-Aldrich), Omni-probe, S-probe, T7, Lex A, V5, VP16, GAL4, VSV-G などが挙げられる。(Field et al., Molecular and Cellular Biology, 8: pp. 2159-2165 (1988); Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5: pp. 3610-3616 (1985); Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6): pp. 547-553 (1990); Hopp et al., Biotechnology, 6: pp. 1204-1210 (1988); Martin et al., Science, 255: pp. 192-194 (1992); Skinner et al., J. Biol. Chem., 266: pp. 15163-15166 (1991); Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: pp. 6393-6397 (1990)) など。酵母を利用した two-hybrid 法も利用できる。さらに融合タンパク質としては、検出可能なタンパク質となるようなマーカーを付されたものであることもできる。より好適な実施態様においては、該検出可能なマーカーは、ビオチン/ストレプトアビジン系の Biotin Avi Tag、蛍光を発する物質などであってよい。該蛍光を発する物質としては、オワンクラゲ (Aequorea victoria) などの発光クラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; GFP)、それを改変した変異体 (GFP バリエーション)、例えば、EGFP (Enhanced-humanized GFP), rsGFP (red-shift GFP), 黄色蛍光タンパク質 (yellow fluorescent protein: YFP), 緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP), 藍色蛍光タンパク質 (cyan fluorescent protein: CFP), 青色蛍光タンパク質 (blue fluorescent protein: BFP), ウミシイタケ (Renilla reniformis) 由来の GFP などが挙げられる (宮脇敦史編、実験医学別冊ポストゲノム時代の実験講座3-GFPとバイオイージング、羊土社(2000年))。また、上記融合タグを特異的に認識する抗体 (モノクローナル抗体及びそのフラグメントを含む) を使用して検出を行うこともできる。

本発明の好ましい態様において、精製を好適に実施するのに役立つマーカー配列、例えばヘキサ-ヒスチジンペプチドを融合したものなどが使用できる。こうした融合タンパク質の発現及び精製は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。タンパク質の構造の修飾・改変などは、例えば日本生化学会編、「新生化学実験講座1、タンパク質VII、タンパク質工学」、東京化学同人(1993)を参考にし、そこに記載の方法あるいはそこで引用された文献記載の方法、さらにはそれらと実質的に同様な方法を行うことができる。また下記するようにその生物学的活性のうちには、免疫的に活性、例えば抗原性を有するということも含まれてよい。該修飾・改変のうちには、脱アミノ化、ヒドロキシル化、リン酸化、メチル化、アセチル化、開環、閉環、含有糖鎖の種類を違うものに変えること、含有糖鎖の数を増減すること、D-体アミノ酸残基への置換などであってもよい。それらの方法は、当該分野で知られている (例えば、T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, pp. 79-86 W. H. Freeman & Co.,

10

20

30

40

50

S a n F r a n c i s c o , U S A (1 9 8 3) , 等) 。

かくして本発明のヒト由来のタンパク質は、1個以上のアミノ酸残基が同一性の点で天然のものとは異なるもの、1個以上のアミノ酸残基の位置が天然のものとは異なるものであってよい。本発明のヒト由来のタンパク質は、N - T e s に特有なアミノ酸残基が1個以上（例えば、1～80個、好ましくは1～60個、さらに好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個、特には1～10個など）欠けている欠失類縁体、特有のアミノ酸残基の1個以上（例えば、1～80個、好ましくは1～60個、さらに好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個、特には1～10個など）が他の残基で置換されている置換類縁体、1個以上（例えば、1～80個、好ましくは1～60個、さらに好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個、特には1～10個など）のアミノ酸残基が付加されている付加類縁体も包含する。天然のN - T e s の特徴であるドメイン構造あるいは活性中心構造が維持されていれば、上記のごとき変異体は、全て本発明に包含される。また本発明のN - T e s は天然のN - T e s と実質的に同等の一次構造コンフォメーションあるいはその一部を有しているものも含まれてよいと考えられ、さらに天然のN - T e s と実質的に同等の生物学的活性を有しているものも含まれてよいと考えられる。さらに天然に生ずる変異体の一つであることもできる。本発明のヒト由来のタンパク質は、例えば、配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列のうち、第22位～第122位のアミノ酸配列を有するもの、同第22位～第313位のアミノ酸配列を有するもの、及び同第1位～第313位のアミノ酸配列を有するものからなる群から選ばれたアミノ酸配列に対し、60%、場合によっては70%より高い相同性を有しているものが挙げられ、より好ましくはそれに対し、80%あるいは90%以上の相同アミノ酸配列を有するものが挙げられ、特にはG l y c o s a m i n o g l y c a n a t t a c h m e n t s i t e を欠くものが挙げられる。本発明のヒト由来のタンパク質の一部のものと、該ヒト由来のタンパク質の一部のペプチド（すなわち、該タンパク質の部分ペプチド）であって、本発明のN - T e s と実質的に同等な活性を有するものであればいずれのものであってもよい。例えば、該本発明のタンパク質の部分ペプチドは、本発明のN - T e s の構成アミノ酸配列のうち少なくとも5個以上、好ましくは20個以上、さらに好ましくは50個以上、より好ましくは70個以上、もっと好ましくは100個以上、ある場合には200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられ、好ましくはそれらは連続したアミノ酸残基に対応するものであるか、あるいは、例えば、配列表の配列番号：2で示されるアミノ酸配列のうち対応する領域に対する相同性に関して、上記と同様の相同性を有するものが挙げられる。

本明細書において、「実質的に同等」とは蛋白質の活性、例えば、阻害活性、生理的な活性、生物学的な活性が実質的に同じであることを意味する。さらにまた、その用語の意味の中には、実質的に同質の活性を有する場合を包含してよく、該実質的に同質の活性としては、例えば、M M P s のいずれか一つに対する阻害活性、M M P s いずれか一つ用の合成基質に対する分解活性を抑制あるいは阻害する活性などを挙げることができる。該実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に同質であることを示し、例えば、生理的に、薬理的に、あるいは生物学的に同質であることを示す。例えば、M M P s のいずれか一つに対する阻害活性などの活性が、同等（例えば、約0.001～約1000倍、好ましくは約0.01～約100倍、より好ましくは約0.1～約20倍、さらに好ましくは約0.5～約2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的な要素は異なってもよい。次に、アミノ酸の置換、欠失、あるいは挿入は、しばしばポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化を生ぜしめないし、こうした場合、その置換、欠失、あるいは挿入を施されたポリペプチドは、そうした置換、欠失、あるいは挿入のされていないものと実質的に同一であるとされるであろう。該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換体としては、そのアミノ酸が属するところのクラスのうちの他のアミノ酸類から選ぶことができる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸としては、アラニン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられ、極性（中性）アミノ酸としては

、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられ、陽電荷をもつアミノ酸（塩基性アミノ酸）としては、アルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられ、陰電荷をもつアミノ酸（酸性アミノ酸）としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

本発明のタンパク質及びその一部のペプチドの合成には、当該ペプチド合成分野で知られた方法、例えば液相合成法、固相合成法などの化学合成法を使用することができる。こうした方法では、例えばタンパク質あるいはペプチド合成用樹脂を用い、適当に保護したアミノ酸を、それ自体公知の各種縮合方法により所望のアミノ酸配列に順次該樹脂上で結合させていく。縮合反応には、好ましくはそれ自体公知の各種活性化試薬を用いるが、そうした試薬としては、例えばジシクロヘキシルカルボジイミドなどカルボジイミド類を好ましく使用できる。生成物が保護基を有する場合には、適宜保護基を除去することにより目的のものを得ることができる。

本発明のタンパク質及びその一部のペプチドは、それが遊離型のものとして得られた場合には、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で塩に変換することができ、またそれらは塩として得られた場合には、それ自体公知の方法あるいはそれに準じた方法で遊離型のものあるいは他の塩に変換することができる。

本発明のタンパク質及びその一部のペプチドの塩としては、生理的に許容されるものあるいは医薬として許容されるものが好ましいが、これらに限定されない。こうした塩としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸との塩、例えば酢酸、ギ酸、マレイン酸、フマル酸、コハク酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、安息香酸、メタン

スルホン酸、p - トルエンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸などの有機酸との塩などが挙げられる。さらに該塩としては、アンモニウム塩、例えばエチルアミン、ジメチルアミン、トリメチルアミン、ヒドロキシエチルアミンなどの有機塩基との塩なども挙げられる。

こうした本発明の N - T e s 及びその変異体、修飾体、誘導体などは、上記で説明したような分離・精製処理を施すことができる。本発明では、「断片」、「誘導体」及び「類縁体」なる用語は、配列番号：2 のポリペプチド、配列番号：1 の配列から転写され且つスプライシングされていないか又は特異的にスプライシングされた h n R N A 又は m R N A によりコードされるポリペプチド、又はジェノミック D N A によりコードされるポリペプチドに関連して、その「断片」、「誘導体」又は「類縁体」と称した場合、このようなポリペプチドと本質的に同一の生物学的機能又は活性を有しているポリペプチドを意味する。従って、類似体にはプロタンパク質部分が切断されて活性成熟ポリペプチドを産生するような、活性化できるプロタンパク質等が包含される。本発明のポリペプチドは組換えポリペプチド、天然ポリペプチド又は合成ポリペプチドでよい。特定の好ましい態様では、これは組換えポリペプチドである。

一方では、こうして本発明は上記したポリペプチドをコードする D N A 配列、そして天然の特性の全部あるいは一部を有する N - T e s のポリペプチド、さらにその類縁体あるいは誘導体をコードする D N A 配列も包含する。本発明のポリヌクレオチドは、アミノ末端に付加アミノ酸又はカルボキシル末端に付加アミノ酸を加えた成熟タンパク質、又は成熟タンパク質に内在するポリペプチド（例えば、成熟形態で一つ以上のポリペプチド鎖を有する場合）のアミノ酸をコードしているものであることができる。このような配列は、前駆体から成熟形態のタンパク質へのプロセッシングにおいても何らかの働きをなすものであってよく、例えば、タンパク質の移動や輸送を促進したり、タンパク質の半減期を延長もしくは短縮したり、又はタンパク質を操作してその検出もしくは産生を容易にすることができるものであってよい。一般的には、例えば、付加アミノ酸は、細胞酵素によりプロセッシングされ、成熟タンパク質から取り除かれる。1 又はそれ以上のプロ配列と融合した成熟形態ポリペプチドを有する前駆タンパク質は、不活性形態ポリペプチドであることができる。プロ配列が除去されると、このような不活性前駆体は、通常活性化される。プロ配列のいくつか又は全ては、活性化の前に除去できる。通常、このような前駆体はプロタンパク質と称される。本発明のポリペプチドは、成熟タンパク質、リーダー配列を付加

10

20

30

40

50

してある成熟タンパク質（プレタンパク質と称することができる）、プレタンパク質のリーダー配列ではない１又はそれ以上のプロ配列を有する成熟タンパク質の前駆体、又はリーダー配列及び１又はそれ以上のプロ配列を有するプロタンパク質の前駆体であるプレプロタンパク質であってよい。また、該プロ配列は通常活性形態ポリペプチド及び成熟形態ポリペプチドを産み出すようなプロセッシングの段階で除去され得る。

本発明のDNA配列は、これまで知られていなかった哺乳動物のタンパク質のアミノ酸配列に関する情報を提供しているから、こうした情報を利用することも本発明に包含される。こうした利用としては、例えばN-Tes及び関連タンパク質をコードする哺乳動物、特に好ましくはヒトの、ゲノムDNA及びcDNAの単離及び検知のためのプローブの設計などが挙げられる。

10

本発明のDNA配列は、例えばN-Tes及び関連タンパク質をコードする哺乳動物、特に好ましくはマウスやヒトの、ゲノムDNA及びcDNAの単離及び検知のためのプローブとして有用である。プローブは、必要に応じて、抗体に関連して挙げられている標識を付与しておくことができる。遺伝子の単離にあたっては、PCR法、さらには逆転写酵素(RT)を用いたPCR法(RT-PCR)を利用することが出来る。N-Tes cDNA及びその関連DNAは、クローニングされ、配列決定されたN-Tes cDNA配列から推定されるアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、DNAプライマーをデザインして化学合成し、得られたDNAプライマーを用いて、PCR法、RT-PCR、その他の方法を用いてN-Tes関連遺伝子の単離、検出などに利用することが出来る。

例えば、N-Tes mRNAのヒト組織中での発現を各種の組織由来poly(A)⁺

20

RNAに対するノーザンブロット分析により検討することができる。本発明のcDNAをプローブとして用いれば、例えばノーザン・ブロッティング、サザン・ブロッティング、in situハイブリダイゼーションなどによりヒト組織中でのN-Tes mRNAの発現やN-Tes遺伝子自体などを検出・測定でき、ヒト組織における細胞内タンパク質代謝、ホルモン前駆体の活性化、および骨の改変を含む、多くの正常な細胞のプロセスに関与するMMP阻害の役割、アルツハイマー病、肺気腫、リウマチ性関節炎、筋ジストロフィー、骨粗鬆症、神経変性疾患および癌の浸潤・転移の様な多くの疾患等の研究の発展に貢献できる。N-Tesに関連した疾患の遺伝子診断にも利用できる。そうした診断は、当該N-Tes及び関連タンパク質をコードする核酸の異常、例えば損傷、突然変異、発現低下、発現過多などを診断するものであることができる。

30

本明細書中で開示したN-Tes及びそれに関連したタンパク質、そのフラグメント、さらにはDNAを含めた核酸(mRNAやオリゴヌクレオチドを含む)は、それらを単独あるいは有機的に使用し、更には以下で説明する技術(アンチセンス法、モノクローナル抗体を含めた抗体、トランスジェニック動物など)とも適宜組合わせて、ゲノミックス及びプロテオミックス技術に応用できる。例えば、N-Tes変異体は、ドミナントネガティブ効果を利用した機能解析にも利用可能である。また、二本鎖RNA(dsRNA)を使用してのRNAi(RNA interference)技術への応用の途もある。かくして、一塩基多型(SNP; single nucleotide polymorphisms)を中心とした遺伝子多型解析、核酸アレイ、タンパク質アレイを使用した遺伝子発現解析、遺伝子機能解析、タンパク質間相互作用解析、関連疾患解析、疾患治療薬解析をすることが可能となる。例えば、核酸アレイ技術では、cDNAライブラリーを使用したり、PCR技術で得たDNAを基板上にスポットティング装置で高密度に配置して、ハイブリダイゼーションを利用して試料の解析が行われる。該アレイ化は、針あるいはピンを使用して、あるいはインクジェットプリンティング技術などでもって、スライドガラス、シリコン板、プラスチックプレートなどの基板のそれぞれ固有の位置にDNAが付着せしめられることによりそれを実施することができる。該核酸アレイ上でのハイブリダイゼーションの結果得られるシグナルを観察してデータを取得する。該シグナルは、蛍光色素などの標識(例えば、Cy3, Cy5, BODIPY, FITC, Alexa Fluor dyes(商品名), Texas red(商品名)など)より得られるものであってよい。検知にはレーザースキャナーなどを利用することもでき、得られたデータは適当なア

40

50

ルゴリズムに従ったプログラムを備えたコンピューターシステムで処理されてよい。また、タンパク質アレイ技術では、タグを付された組換え発現タンパク質産物を利用してよく、二次元電気泳動(2-DE)、酵素消化フラグメントを含めての質量分析(MS)(これにはエレクトロスプレーイオン化法(electrospray ionization:ESI),マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(matrix-assisted laser desorption/ionization:MALDI)などの技術が含まれ、MALDI-TOF分析計、ESI-3連四重極分析計、ESI-イオントラップ分析計などを使用してよい)、染色技術、同位体標識及び解析、画像処理技術などが利用されることができ。したがって、本発明には上記で得られるあるいは利用できるN-Tesに関連したソフトウェア、データベースなども含まれてよい。

10

本発明で得られたDNA(例えば、N-TesをコードするDNA)を対象動物に転移させるにあたっては、それをDNA断片としてあるいは該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合して用いるのが一般に有利である。たとえば、マウスにN-Tes DNAを導入する場合、これと相同性が高い動物由来のN-Tes DNAを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、対象動物の受精卵、たとえばマウス受精卵へマイクロインジェクションすることによってN-Tesを高産生する遺伝子導入(トランスジェニック)マウスを作出できる。マウスとしては、特に純系のマウスに限定されないが、例えば、C57BL/6, Balb/C, C3H, (C57BL/6×DBA/2)F₁ (BDF₁)などが挙げられる。このプロモーターとしては、例えばウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキタスな発現プロモーターなどが好ましく使用しうる。また該N-Tes DNAを導入する場合、組換えレトロウイルスに組み換えて、それを用いて行うこともできる。好適には対象DNAを導入されたマウス受精卵は、例えば、ICRのような仮親のマウスを使用して生育せしめることができる。

20

受精卵細胞段階における本発明で得られたDNA(例えば、N-TesをコードするDNA)の転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞においてN-TesをコードするDNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに該N-TesをコードするDNAを有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てにおいて、該N-Tesを発現できる可能性を有している。

30

該N-Tes DNA導入動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。該N-Tes DNAが導入された動物は、該N-Tesタンパク質が高発現させられているので、該N-Tesタンパク質に対する阻害剤(インヒビター)のスクリーニング用の動物などとして有用である。またN-Tes遺伝子の発現を阻害することのできるアンチセンス オリゴヌクレオチド、例えば、アンチセンスDNAなどのスクリーニング用の動物などとして有用である。

この遺伝子導入動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、遺伝子導入マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するかあるいは遺伝子により発現されたタンパク質組織を分析することにより、MT1-MMPやMT3-MMP活性阻害に関連したタンパク質について分析することができる。該N-Tesを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、たとえば脳、胸腺、精巣、脳、腸、腎臓やその他の組織由来の細胞についてその機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、たとえば各種組織の機能を高めるような医薬開発に資することも可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、N-Tesを単離精製することも可能である。トランスジェニック マウスなどに関連した技術は、例えば、Brinster, R. L., et al., ; Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 82:4438, 1985; Constantini, F. & Jaenisch,

40

50

R. (eds): Genetic manipulation of the early mammalian embryo, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985などの文献に記載の方法あるいはそこに引用された文献に記載の方法、さらにはそれらの改変法により行うことができる。

本発明で得られた遺伝子（例えば、N - T e sに相当するマウスN - T e sをコードするDNA）に変異をもち、マウスN - T e sを全く発現しない変異マウス（ノックアウトマウス）を作出することができる。たとえば、該遺伝子の翻訳開始コドンの前後4 kbを含むおよそ8 kbのゲノムDNAの中央近傍に位置し翻訳開始コドンに近いエクソンにneo耐性遺伝子 - poly A付加シグナルからなる遺伝子カセットを挿入した変異遺伝子を持つターゲティングベクターを構築することができる。挿入する遺伝子カセットはneo耐性遺伝子カセット以外にDT - Aカセット、tkカセット、lacZカセットなどが挙げられる。ターゲティングベクターを直鎖状に開き、樹立したマウス胚性幹細胞（embryonic stem cells: ES細胞）にエレクトロポレーションで導入、さらに培養してneo耐性を獲得したES細胞を選別する。ES細胞は129、C57BL/6、F1（C57BL/6 × CBA）マウスなどのマウス系統から選択して調製することができる。neo耐性を獲得したES細胞は、マウスN - T e s遺伝子領域において遺伝子カセットを挿入したターゲティングベクターと相同組換えを起こしていると想定され、少なくともマウスN - T e s遺伝子アレルのうち一つは破壊され、マウスN - T e sを正常に発現できなくなる。選別には挿入した遺伝子カセットによりそれぞれ適当な方法が選択され、また、変異の導入はPCR、サザンハイブリダイゼーションあるいはノーザン

10

20

ハイブリダイゼーションなどの方法を用いて確認することができる。変異を導入したES細胞は、C57BL/6、BALB/c、ICRマウスなどから取り出した8細胞期胚に注入、1日培養し胚盤胞に発生したものをICRのような仮親に移植することで個体まで生育させることができる。生まれる子マウスは変異をもつES細胞と正常な宿主胚に由来するキメラマウスで、ES細胞に由来する細胞がどの程度含まれるかは個体の毛色で判断する。従って、ES細胞と宿主胚は毛色の異なった系統の組合わせが望ましい。得られたキメラマウスの変異はヘテロであり、これらを適宜交配することでホモ変異マウスを得ることができる。このようにして得られたホモ変異マウスは生殖細胞および体細胞の全てにおいて、マウスN - T e s遺伝子のみが破壊され、マウスN - T e sを全く発現せず、繁殖継代される子孫もまた同様の表現系をもつ。

30

このノックアウトマウスは正常マウスとの比較において、発生、成長、生殖、老化および死など個体のライフサイクルにおけるN - T e sの役割や各臓器、組織におけるN - T e sの機能を解析するのに有用である。また、MMP阻害に関連した医薬品開発にも応用できる。ノックアウトマウスはこれらモデル動物としてだけではなく、組織培養のための細胞源として使用することもでき、細胞レベルでのN - T e sの機能解析などに供することができる。ノックアウトマウス等に関連した技術は、例えば、Mansour, S. L., et al., ; Nature, 336: 348 - 352, 1988; Joyner, A. L., ed.; Gene targeting, IRL Press, 1993; 相沢 慎一, ジーンターゲティングES細胞を用いた変異マウスの作成, 羊土社, 1995などの文献に記載の方法あるいはそこに引用された文献に記載の方法、さらにはそれらの改

40

変法により行うことができる。本発明に従えば、N - T e s遺伝子の発現を阻害することのできるアンチセンス・オリゴヌクレオチド（核酸）を、クローン化したあるいは決定されたN - T e sをコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたオリゴヌクレオチド（核酸）は、N - T e s遺伝子のmRNAとハイブリダイズすることができ、該mRNAの機能を阻害することができるか、あるいはN - T e s関連mRNAとの相互作用などを介してN - T e s遺伝子の発現を調節・制御することができる。N - T e s関連遺伝子の選択された配列に相補的なオリゴヌクレオチド、及びN - T e s関連遺伝子と特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドは、生体内及び生体外でN - T e s遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、またそれに関連した病気などの治療又は診断に有用

50

である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチド（タンパク質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド（タンパク質）のアミノ酸を通常指している。当該遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、及び3'端ヘアピンループは、好ましい対象領域として選択しうるが、当該遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なオリゴヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドとの関係を意味し、それは、「アンチセンス」であるといえることができる。アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又は特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド又は非修飾オリゴヌクレオチド、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、公知のプリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオシド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス核酸は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えばJ. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, 8:247, 1992; 8:395, 1992; S. T. Crooke et al., ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993などに開示がある。本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含

10

20

30

40

50

有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうした付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピッド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクラーゼ、RNaseなどのヌクラーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはN-Tesの生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸はそれ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

以上述べた、本発明者らの研究成果によりN-Tesの遺伝子及び組換えDNA分子を宿主に移入し、N-Tesを発現させ、目的とするN-Tesを得る方法が提供される。こうして本発明によれば、N-Tesの遺伝子を実質的に発現する組換え体あるいはトランスフェクタント及びその製造法、さらにはその用途も提供される。

別の面では、本発明はTesticanファミリーに属するMMP阻害活性を有し且つGlycosaminoglycan attachment siteを欠いている及び/又はTY domainやCWCV domainを欠いているポリペプチドの一種であり且つ天然のヒトN-Tesと実質的に同等な活性を有することを特徴とするタンパク質またはその塩、より好ましくはN-Tesまたはその塩と、実質的に同等な活性を有するか、あるいは実質的に同等の一次構造コンフォメーションを持つ該タンパク質の少なくとも一部あるいは全部を有するポリペプチドを、大腸菌などの原核生物あるいは哺乳動物細胞などの真核生物で発現させることを可能にするDNAやRNAなどの核酸に関することができる。またこうした核酸、特にDNAは、(a)配列表の配列番号：2で表されるアミノ酸配列をコードできる配列あるいはそれと相補的な配列、(b)該(a)のDNA配列またはその断片とハイブリダイズすることのできる配列、及び(c)該(a)又は(b)の配列にハイブリダイズすることのできる縮重コードを持った配列であることができる。ここでハイブリダイズの条件としては、ストリンジェントな条件であることができる。こうした核酸で形質転換され、本発明の該ポリペプチドを発現できる大腸菌などの原核生物あるいは哺乳動物細胞などの真核生物も本発明の特徴をなす。

こうして典型的には本発明の目的は、N-Tes遺伝子、それから誘導されたプローブを用い、あるいはさらに必要に応じ、N-Tesに対する阻害物質を用い、被検試料中のN-Tesあるいはその遺伝子、さらには産生細胞を検知・分別定量する優れた方法及びその為の試薬キットを提供することにある。本発明はこうしたN-Tesあるいはその遺伝子、さらには産生細胞を検知・分別定量することのできる試薬キットのうちの各試薬をすべてその実施態様のうちに含むと理解される。さらに本発明の目的は、上記方法を用いてN-Tesあるいはその遺伝子、さらには産生細胞を検知・分別定量することにより、細胞内タンパク質代謝、ホルモン前駆体の活性化、および骨の改変など、多くの正常な細胞のプロセスに関するMMPsの役割、アルツハイマー病、肺気腫、リウマチ性関節炎、筋ジストロフィー、骨粗鬆症、神経変性疾患および癌の浸潤・転移の様な多くの疾患などをモニターし得る方法並びに試薬あるいは診断剤を提供することにある。したがって、医学的・生理学的分野における上記試薬の各種利用、腫瘍・癌といったヒトなどの動物の細胞・組織の研究・解析・測定などの目的で上記試薬を使用することはすべて本発明のその実施態様のうちに含まれると理解される。

本発明のN-Tesあるいはその塩は、MMPs阻害活性を有し、例えば生体内でタンパ

10

20

30

40

50

ク質代謝、抗原提示、骨の改変、ホルモン前駆体の活性化などにおいて不可欠な因子であると考えられる。そして、該タンパク質はN - T e s無形成症、N - T e s発現不全症、N - T e s遺伝子欠損症など病状を呈するN - T e s関連機能不全疾患の治療に有用であると考えられる。すなわち、N - T e s、変異体、修飾体、誘導体を含む医薬を用いれば、N - T e sによる活性が不十分であることに起因する疾患患者を健常な状態にすることが可能である。本発明のポリペプチドは、プロテアーゼ阻害剤の一つであり、該タンパク質の発現量やプロテアーゼ阻害活性が減少している場合に生ずる種々の疾患の治療及び/又は予防剤などの医薬として有用である。また本発明のポリペプチドは、組織やタンパク質に対するMMP分解活性が亢進している場合に生ずる種々の疾患の治療及び/又は予防剤などの医薬として有用である。例えば、生体内においてN - T e sが減少あるいは欠損しているために、細胞における当該生物学的活性が十分に得られていないか、あるいは正常でない症状の患者の場合には、(A)本発明のタンパク質等を該患者に投与することによるか、(B)本発明のDNAなどの核酸を該患者に投与して、生体内で本発明のタンパク質等を発現させることによるか、(C)本発明のDNAなどの核酸を発現可能に導入した細胞を該患者に移植することによって、生体内に本発明のタンパク質等を補充する等して、該患者における当該症状を改善したりする。

本発明のN - T e sの生物学的活性などの機能(例えば、プロテアーゼ阻害活性など)を促進する化合物(アゴニスト、あるいは促進剤)又はその塩は、N - T e s機能不全症状、肺気腫、筋ジストロフィー、骨粗鬆症、アルツハイマー病、神経変性疾患、リウマチ性関節炎および癌の浸潤・転移などの各種の疾病の治療及び/又は予防剤として有用な医薬として使用できる。一方、本発明のN - T e sの生物学的活性などの機能(例えば、プロテアーゼ阻害活性など)を阻害する化合物(アンタゴニスト、あるいは阻害剤)又はその塩は、過N - T e s機能症、肺気腫、筋ジストロフィー、骨粗鬆症、アルツハイマー病、神経変性疾患、リウマチ性関節炎および癌の浸潤・転移などの各種の疾病の治療及び/又は予防剤などの医薬として使用できる。例えばN - T e sは、MT1 - MMPやMT3 - MMPなどのMMPsの活性発現に関与し、それらに対して阻害活性を有する。したがって、該N - T e sは、MT1 - MMPやMT3 - MMPなどのMMPsによる過剰分解に起因する疾患の治療用医薬として有用である。

かくして、本発明のN - T e sなどのポリペプチド等は、本発明のN - T e sなどのポリペプチド等の、生物学的活性などの機能(例えば、プロテアーゼ阻害活性など)を促進する化合物(アゴニスト)や阻害する化合物(アンタゴニスト)又はそれらの塩をスクリーニングするための試薬として有用である。かくして、本発明のN - T e sなどのポリペプチド、その一部のペプチド又はそれらの塩を用いた、本発明のN - T e sといったタンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩などの生物学的活性などの機能(例えば、プロテアーゼ阻害活性など)を促進する化合物(アゴニスト)や阻害する化合物(アンタゴニスト)又はそれらの塩のスクリーニング方法も提供される。

該スクリーニングでは、例えば(i)本発明のタンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩(該タンパク質を発現する形質転換体を含んでもよい、以下同様)などに基質を接触させた場合と、(ii)本発明のタンパク質、その一部のペプチド又はそれらの塩などに基質及び試験試料を接触させた場合との比較を行う。具体的には、上記スクリーニングでは、当該生物学的活性(例えば、プロテアーゼ活性など)を測定して、比較する。

基質としては、MMPs等の基質となることのできるものであれば何れのものであってよい。例えば、カゼイン、コラーゲン、合成オリゴペプチド類などのプロテアーゼ活性を測定する目的で使用されるものの中から選んで用いることができるが、好ましくはMMPs用の蛍光標識合成ペプチド基質などを使用できる。基質は、そのまま使用できるが、好ましくはフルオレッセインなどの蛍光、酵素や放射性物質で標識したものを使用できる。

試験試料としては、例えばタンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、植物抽出物、動物などの組織抽出物、細胞抽出物などが挙げられる。試験試料に使用される試験化合物の例には、好ましくはMMP阻害剤、MMPファミリーに対するインヒビター活性を有する化合物、特に合成化合物を含んでいてよい。これら化合物は

、新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。該スクリーニングは、通常のプロテアーゼ活性の測定法に準じて実施することができ、例えば *Biochemistry*, 32, pp. 4330 - 4337 (1993) に示されている方法などを参考にして行うことができる。また、各種標識、緩衝液系その他適当な試薬等を使用したり、そこで説明した操作等に準じて行うことができる。スクリーニングにあたっては、MMPs 等をアミノフェニル酢酸水銀などの活性化剤で処理したり、その前駆体あるいは潜在型のものを活性型のものに予め変換しておくこともできる。測定は通常トリス塩酸緩衝液、リン酸塩緩衝液などの反応に悪影響を与えないような緩衝液等の中で、例えば、pH 約 4 ~ 約 10 (好ましくは、pH 約 6 ~ 約 8) において行うことができる。

これら個々のスクリーニングにあたっては、それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて、本発明の N - T e s あるいはそれと実質的に同等な活性を有するポリペプチドあるいはペプチドに関連した測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、*Methods in Enzymology*, Vol. 1, 2, 5 & 6 (*Preparation and Assay of Enzymes*); 同書, Vol. 3 (*Preparation and Assay of Substrates*); 同書, Vol. 4 (*Special Techniques for the Enzymologist*); 同書, Vol. 19 (*Proteolytic Enzymes*); 同書, Vol. 45 (*Proteolytic Enzymes, Part B*); 同書, Vol. 80 (*Proteolytic Enzymes, Part C*) (以上、Academic Press 社 (USA) 発行) など参照〕。

本発明のスクリーニング方法又はスクリーニングキットを用いて得られる化合物又はその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等の機能を促進あるいは阻害する化合物である。該化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容される塩などが挙げられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。無機塩基との塩の好適な例としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、並びにアルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2, 6 - ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N' - ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えば、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などとの塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

本明細書中、「抗体」との用語は、広義の意味で使用されるものであってよく、所望の N - T e s ポリペプチド及び関連ペプチド断片に対するモノクローナル抗体の単一のものや各種エピトープに対する特異性を持つ抗体組成物であってよく、また 1 価抗体または多価抗体並びにポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を含むものであり、さらに天然型 (i n t a c t) 分子並びにそれらのフラグメント及び誘導体も表すものであり、F (a b ')₂, F a b ' 及び F a b といったフラグメントを包含し、さらに少なくとも二つの抗原又はエピトープ (e p i t o p e) 結合部位を有するキメラ抗体若しくは雑種抗体、又は、例えば、クワドローム (q u a d r o m e), トリオーム (t r i o m e) などの二重特異性組換え抗体、種間雑種抗体、抗イディオタイプ抗体、さらには化学的に修飾あるいは加工などされてこれらの誘導体と考えられるもの、公知の細胞融合又はハイブリド

ーマ技術や抗体工学を適用したり、合成あるいは半合成技術を使用して得られた抗体、抗体生成の観点から公知である従来技術を適用したり、DNA組換え技術を用いて調製される抗体、本明細書で記載し且つ定義する標的抗原物質あるいは標的エピトープに関して中和特性を有したりする抗体又は結合特性を有する抗体を包含してよい。本明細書中「抗体」との用語は、所望のN-Tesポリペプチド及び関連ペプチド断片に対する抗体と同様、抗MMP抗体についても同様な意味で解釈される。

抗原物質に対して作製されるモノクローナル抗体は、培養中の一連のセルラインにより抗体分子の産生を提供することのできる任意の方法を用いて産生される。修飾語「モノクローナル」とは、実質上均質な抗体の集団から得られているというその抗体の性格を示すものであって、何らかの特定の方法によりその抗体が産生される必要があるとみなしてはならない。個々のモノクローナル抗体は、自然に生ずるかもしれない変異体が僅かな量だけ存在しているかもしれないという以外は、同一であるような抗体の集団を含んでいるものである。モノクローナル抗体は、高い特異性を持ち、それは単一の抗原性をもつサイトに対して向けられているものである。異なった抗原決定基（エピトープ）に対して向けられた種々の抗体を典型的には含んでいる通常の（ポリクローナル）抗体調製物と対比すると、それぞれのモノクローナル抗体は当該抗原上の単一の抗原決定基に対して向けられているものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養により合成され、他のイムノグロブリン類の夾雑がないあるいは少ない点でも優れている。モノクローナル抗体は、ハイブリッド抗体及びリコンビナント抗体を含むものである。それらは、所望の生物活性を示す限り、その由来やイムノグロブリンクラスやサブクラスの種別に関わりなく、可変領域ドメインを定常領域ドメインで置き換えたり（例えば、ヒト化抗体）、あるいは軽鎖を重鎖で置き換えたり、ある種の鎖を別の種の鎖でもって置き換えたり、あるいはヘテロジニアスなタンパク質と融合せしめたりして得ることができる（例えば、米国特許第4816567号；Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 79-97, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987など）。

モノクローナル抗体を製造する好適な方法の例には、ハイブリドーマ法（G. Kohler and C. Milstein, Nature, 256, pp. 495-497 (1975)）；ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Kozbor et al., Immunology Today, 4, pp. 72-79 (1983)；Kozbor, J. Immunol., 133, pp. 3001 (1984)；Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987)；トリオーマ法；EBV-ハイブリドーマ法（Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)）（ヒトモノクローナル抗体を産生するための方法）；米国特許第4946778号（単鎖抗体の産生のための技術）が挙げられる他、抗体に関して以下の文献が挙げられる：S. Biocca et al., EMBO J, 9, pp. 101-108 (1990)；R. E. Bird et al., Science, 242, pp. 423-426 (1988)；M. A. Boss et al., Nucl. Acids Res., 12, pp. 3791-3806 (1984)；J. Bukovsky et al., Hybridoma, 6, pp. 219-228 (1987)；M. DAINO et al., Anal. Biochem., 166, pp. 223-229 (1987)；J. S. Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, pp. 5879-5883 (1988)；P. T. Jones et al., Nature, 321, pp. 522-525 (1986)；J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: H

10

20

30

40

50

ybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986); S. Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp. 6851 - 6855 (1984); V. T. Oi et al., Bio Techniques, 4, pp. 214 - 221 (1986); L. Riechmann et al., Nature, 332, pp. 823 - 327 (1988); A. Tramonano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, pp. 6736 - 6740 (1986); C. Wood et al., Nature, 314, pp. 446 - 449 (1985); Nature, 314, pp. 452 - 454 (1985)あるいはそこで引用された文献(それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる)。

本発明に係るモノクローナル抗体は、それらが所望の生物活性を示す限り、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の種から誘導される又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一又はホモローガスであるが、一方、鎖の残部は、別の種から誘導される又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一又はホモローガスである、「キメラ」抗体(免疫グロブリン)を特に包含する(米国特許第4816567号明細書; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp. 6851 - 6855 (1984))。

以下、モノクローナル抗体を例に挙げて、抗体の作製につき詳しく説明する。

本発明のモノクローナル抗体は、ミエローマ細胞を用いての細胞融合技術(G. Kohler and C. Milstein, Nature, 256, pp. 495 - 497 (1975)など)を利用して得られたモノクローナル抗体であってよく、例えば次のような工程で作製できる。

1. 免疫原性抗原の調製
2. 免疫原性抗原による動物の免疫
3. ミエローマ細胞(骨髄腫細胞)の調製
4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合
5. ハイブリドーマ(融合細胞)の選択及びモノクローン化
6. モノクローナル抗体の製造

1. 免疫原性抗原の調製

抗原としては、上記で記載してあるように、N-Tesポリペプチド又はそれから誘導された断片を単離したものをを用いることもできるが、決定されたN-Tesのアミノ酸配列情報を基に、適当なオリゴペプチドを化学合成しそれを抗原として利用することができる。代表的には配列表の配列番号: 2の

- (1) 少なくとも第311位~第313位のアミノ酸配列;
- (2) 第22位~第122位のアミノ酸配列;
- (3) 第22位~第313位のアミノ酸配列; 及び
- (4) 第1位~第313位のアミノ酸配列

から成る群から選ばれた領域に存在するアミノ酸残基のうちの連続した少なくとも5個のアミノ酸を有するペプチドが挙げられる。

抗原は、そのまま適当なアジュバントと混合して動物を免疫するのに使用できるが、免疫原性コンジュゲートなどにしてもよい。例えば、免疫原として用いる抗原は、N-Tesを断片化したもの、あるいはそのアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、ポリペプチドをデザインして化学合成して得られた合成ポリペプチド断片であってもよい。また、その断片を適当な縮合剤を介して種々の担体タンパク質類と結合させてハプテン-タンパク質の如き免疫原性コンジュゲートとし、これを用いて特定の配列のみと反応できる(あるいは特定の配列のみを認識できる)モノクローナル抗体をデザインするのに用いることもできる。デザインされるポリペプチドには予めシステイン残基などを付加し、免疫原性コンジュゲートの調製を容易にできるようにしておくことができる。担体タンパク質類と結合させるにあたっては、担体タンパク質類はまず活性化されることができる。こうし

た活性化にあたり活性化結合基を導入することが挙げられる。

活性化結合基としては、(1) 活性化エステルあるいは活性化カルボキシル基、例えばニトロフェニルエステル基、ペンタフルオロフェニルエステル基、1-ベンゾトリアゾールエステル基、N-スクシンイミドエステル基など、(2) 活性化ジチオ基、例えば2-ピリジルジチオ基などが挙げられる。担体タンパク質類としては、キーホール・リンペット・ヘモシアニン(KLH)、牛血清アルブミン(BSA)、卵白アルブミン、グロブリン、ポリリジンなどのポリペプチド、細菌菌体成分、例えばBCGなどが挙げられる。

2. 免疫原性抗原による動物の免疫

免疫は、当業者に知られた方法により行うことができ、例えば村松繁、他編、実験生物学講座14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和60年、日本生化学会編、続生化学実験講座5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年、日本生化学会編、新生化学実験講座12、分子免疫学III、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じて行うことができる。免疫化剤を(必要に応じアジュバントと共に)一回又はそれ以上の回数哺乳動物などに注射することにより免疫化される。代表的には、該免疫化剤及び/又はアジュバントを哺乳動物に複数回皮下注射あるいは腹腔内注射することによりなされる。免疫化剤は、上記抗原ペプチドあるいはその関連ペプチド断片を含むものが挙げられる。免疫化剤は、免疫処理される哺乳動物において免疫原性であることの知られているタンパク質(例えば上記担体タンパク質類など)とコンジュゲートを形成せしめて使用してもよい。アジュバントとしては、例えばフロイント完全アジュバント、リビ(Ribi)アジュバント、百日咳ワクチン、BCG、リピッドA、リポソーム、水酸化アルミニウム、シリカなどが挙げられる。免疫は、例えばBALB/cなどのマウス、ハムスター、その他の適当な動物を使用して行われる。抗原の投与量は、例えばマウスに対して約1~400 μ g/動物で、一般には宿主動物の腹腔内や皮下に注射し、以後1~4週間おきに、好ましくは1~2週間ごとに腹腔内、皮下、静脈内あるいは筋肉内に追加免疫を2~10回程度反復して行う。免疫用のマウスとしてはBALB/c系マウスの他、BALB/c系マウスと他系マウスとのF1マウスなどを用いることもできる。必要に応じ、抗体価測定系を調製し、抗体価を測定して動物免疫の程度を確認できる。本発明の抗体は、こうして得られ免疫された動物から得られたものであってよく、例えば、抗血清、ポリクローナル抗体等を包含する。

3. ミエローマ細胞(骨髄腫細胞)の調製

細胞融合に使用される無限増殖可能株(腫瘍細胞株)としては免疫グロブリンを産生しない細胞株から選ぶことができ、例えばP3-NS-1-Ag4-1(NS-1, Eur. J. Immunol., 6:511-519, 1976)、SP-2/0-Ag14(SP-2, Nature, 276:269~270, 1978)、マウスミエローマMOPC-21セルライン由来のP3-X63-Ag8-U1(P3U1, Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81:1-7, 1978)、P3-X63-Ag8(X63, Nature, 256:495-497, 1975)、P3-X63-Ag8-653(653, J. Immunol., 123:1548-1550, 1979)などを用いることができる。8-アザグアニン耐性のマウスミエローマ細胞株はダルベッコMEM培地(DMEM培地)、RPMI-1640培地などの細胞培地に、例えばペニシリン、アミカシンなどの抗生物質、牛胎児血清(FCS)などを加え、さらに8-アザグアニン(例えば5~45 μ g/ml)を加えた培地で継代されるが、細胞融合の2~5日前に正常培地で継代して所要数の細胞株を用意することができる。また使用細胞株は、凍結保存株を約37 $^{\circ}$ Cで完全に解凍したのちRPMI-1640培地などの正常培地で3回以上洗浄後、正常培地で培養して所要数の細胞株を用意したものであってもよい。

4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合

上記2.の工程に従い免疫された動物、例えばマウスは最終免疫後、2~5日後にその脾臓が摘出され、それから脾細胞懸濁液を得る。脾細胞の他、生体各所のリンパ節細胞を得て、それを細胞融合に使用することもできる。こうして得られた脾細胞懸濁液と上記3.

10

20

30

40

50

の工程に従い得られたミエローマ細胞株を、例えば最小必須培地（MEM培地）、DMEM培地、RPMI-1640培地などの細胞培地中に置き、細胞融合剤、例えばポリエチレングリコールを添加する。細胞融合剤としては、この他各種当該分野で知られたものを用いることができ、この様なものとしては不活性化したセンダイウイルス（HVJ：Hemagglutinating Virus of Japan）なども挙げられる。好ましくは、例えば30～60%のポリエチレングリコールを0.5～2ml加えることができ、分子量が1,000～8,000のポリエチレングリコールを用いることができ、さらに分子量が1,000～4,000のポリエチレングリコールがより好ましく使用できる。融合培地中でのポリエチレングリコールの濃度は、例えば30～60%となるようにすることが好ましい。必要に応じ、例えばジメチルスルホキシドなどを少量加え、融合を促進することもできる。融合に使用する脾細胞（リンパ球）：ミエローマ細胞株の割合は、例えば1：1～20：1とすることが挙げられるが、より好ましくは4：1～7：1とすることができ、

10

融合反応を1～10分間行い、次にRPMI-1640培地などの細胞培地を加える。融合反応処理は複数回行うこともできる。融合反応処理後、遠心などにより細胞を分離した後選択用培地に移す。

5. ハイブリドーマ（融合細胞）の選択及びモノクローン化

選択用培地としては、例えばヒポキサンチン（H）、アミノプテリン（A）及びチミジン（T）を含む、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地などの培地、所謂HAT培地が挙げられる。選択培地交換の方法は、一般的には培養プレートに分注した容量と等容量を翌日加え、その後1～3日ごとにHAT培地で半量ずつ交換するというように処理することができるが、適宜これに変更を加えて行うこともできる。また融合後8～16日目には、アミノプテリンを除いた、所謂HT培地で1～4日ごとに培地交換をすることができる。フィーダーとして、例えばマウス胸腺細胞を使用することもでき、それが好ましい場合がある。

20

ハイブリドーマの増殖のさかんな培養ウェルの培養上清を、例えば放射免疫分析（RIA）、酵素免疫分析（ELISA）、蛍光免疫分析（FIA）などの測定系、あるいは蛍光惹起細胞分離装置（FACS）などで、所定の断片ペプチドを抗原として用いたり、あるいは標識抗マウス抗体を用いて目的抗体を測定するなどして、スクリーニングしたりする。

30

目的抗体を産生しているハイブリドーマをクローニングする。クローニングは、寒天培地中でコロニーをピック・アップするか、あるいは限界希釈法によりなされうる。限界希釈法でより好ましく行うことができる。クローニングは複数回行うことが好ましい。

6. モノクローナル抗体の製造

得られたハイブリドーマ株は、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地などの適当な増殖用培地中で培養し、その培地上清から所望のモノクローナル抗体を得ることが出来る。大量の抗体を得るためには、ハイブリドーマを腹水化することが挙げられる。この場合ミエローマ細胞由来の動物と同系の組織適合性動物の腹腔内に各ハイブリドーマを移植し、増殖させるか、あるいは例えばヌード・マウスなどに各ハイブリドーマを移植し、増殖させ、該動物の腹水中に産生されたモノクローナル抗体を回収して得ることが出来る。動物はハイブリドーマの移植に先立ち、プリスタン（2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン）などの鉱物油を腹腔内投与しておくことができ、その処理後、ハイブリドーマを増殖させ、腹水を採取することもできる。腹水液はそのまま、あるいは従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティ・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製してモノクローナル抗体として用いることができる。好ましくは、モノクローナル抗体を含有する腹水は、硫酸分画した後、DEAE-セファロースの如き、陰イオン交換ゲル及びプロテインAカラムの如きアフィニティ・カラムなどで処理し精製分離処理できる。特に好ましくは抗原又は抗原断片（例えば合成ペプチド、組換え抗原タンパク質あるいはペプチド、抗体が特

40

50

異的に認識する部位など)を固定化したアフィニティ・クロマトグラフィー、プロテイン A を固定化したアフィニティ・クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイト・クロマトグラフィーなどが挙げられる。

また、トランスジェニックマウス又はその他の生物、例えば、その他の哺乳動物は、本発明の免疫原ポリペプチド産物に対するヒト化抗体等の抗体を発現するのに用いることができる。

またこうして大量に得られた抗体の配列を決定したり、ハイブリドーマ株から得られた抗体をコードする核酸配列を利用して、遺伝子組換え技術により抗体を作製することも可能である。当該モノクローナル抗体をコードする核酸は、例えばマウス抗体の重鎖や軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用するなどの慣用の手法で単離し配列決定することができる。一旦単離された DNA は、上記したようにして発現ベクターに入れ、CHO, COS などの宿主細胞に入れることができる。該 DNA は、例えばホモジニアスなマウスの配列に代えて、ヒトの重鎖や軽鎖の定常領域ドメインをコードする配列に置換するなどして修飾することが可能である (Morris et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6581, 1984)。かくして所望の結合特異性を有するキメラ抗体やハイブリッド抗体も調製することが可能である。また、抗体は、下記するような縮合剤を用いることを含めた化学的なタンパク合成技術を適用して、キメラ抗体やハイブリッド抗体を調製するなどの修飾をすることも可能である。

ヒト化抗体は、当該分野で知られた技術により行うことが可能である (例えば、Jones et al., Nature, 321: pp. 522 - 525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: pp. 323 - 327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: pp. 1534 - 1536 (1988))。ヒトモノクローナル抗体も、当該分野で知られた技術により行うことが可能で、ヒトモノクローナル抗体を生産するためのヒトミエローマ細胞やヒト・マウスヘテロミエローマ細胞は当該分野で知られている (Kozbor, J. Immunol., 133, pp. 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51 - 63, Marcel Dekker, Inc., New York (1987))。バイスペシフィックな抗体を製造する方法も当該分野で知られている (Millstein et al., Nature, 305: pp. 537 - 539 (1983); WO93/08829; Traunecker et al., EMBO J., 10: pp. 3655 - 3659 (1991); Suresh et al., "Methods in Enzymology", Vol. 121, pp. 210 (1986))。

さらにこれら抗体をトリプシン、パパイン、ペプシンなどの酵素により処理して、場合により還元して得られる Fab、Fab'、F(ab')₂ といった抗体フラグメントにして使用してもよい。

抗体は、既知の任意の検定法、例えば競合的結合検定、直接及び間接サンドイッチ検定、及び免疫沈降検定に使用することができる (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147 - 158 (CRC Press, Inc., 1987))。

抗体を検出可能な原子団にそれぞれコンジュゲートするには、当分野で知られる任意の方法を使用することができ、例えば、David et al., Biochemistry, 13 巻, 1014 - 1021 頁 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40: pp. 219 - 231 (1981); 及び "Methods in Enzymology", Vol. 184, pp. 138 - 163 (1990) により記載の方法が挙げられる。標識物を付与する抗体としては、IgG 画分、更にはペプシン消化後還元して得られる特異的結合部 Fab' を用いることができる。これらの場合の標識物の例としては、下記するように酵素 (ペルオキシダーゼ、アルカリホスファタ

10

20

30

40

50

ーゼあるいは β -D-ガラクトシダーゼなど)、化学物質、蛍光物質あるいは放射性同位元素などがある。

本発明での検知・測定は、イムノ染色、例えば組織あるいは細胞染色、イムノアッセイ、例えば競合型イムノアッセイまたは非競合型イムノアッセイで行うことができ、ラジオイムノアッセイ、ELISA、FIAなどを用いることができ、B-F分離を行ってもよいし、あるいは行わないでその測定を行うことができる。好ましくは放射免疫測定法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法であり、さらにサンドイッチ型アッセイが挙げられる。例えばサンドイッチ型アッセイでは、一方を本発明のN-Tes及びその関連ペプチド断片に対する抗体とし、他方をN-TesのC末端側残基に対する抗体とし、そして一方を検出可能に標識化する。同じ抗原を認識できる他の抗体を固相に固定化する。検体と標識化抗体及び固相化抗体を必要に応じ順次反応させるためインキュベーション処理し、ここで非結合抗体を分離後、標識物を測定する。測定された標識の量は抗原、すなわちN-Tesポリペプチド断片抗原の量と比例する。このアッセイでは、不溶化抗体や、標識化抗体の添加の順序に応じて同時サンドイッチ型アッセイ、フォワード(forward)サンドイッチ型アッセイあるいは逆サンドイッチ型アッセイなどと呼ばれる。例えば洗浄、攪拌、震盪、ろ過あるいは抗原の予備抽出等は、特定の状況のもとでそれら測定工程の中で適宜採用される。特定の試薬、緩衝液等の濃度、温度あるいはインキュベーション処理時間などのその他の測定条件は、検体中の抗原の濃度、検体試料の性質等の要素に従い変えることができる。当業者は通常の実験法を用いながら各測定に対して有効な最適の条件を適宜選定して測定を行うことが出来る。

10

20

抗原あるいは抗体を固相化できる多くの担体が知られており、本発明ではそれらから適宜選んで用いることができる。担体としては、抗原抗体反応などに使用されるものが種々知られており、本発明においても勿論これらの公知のものの中から選んで使用できる。特に好適に使用されるものとしては、例えばガラス、例えば活性化ガラス、多孔質ガラス、シリカゲル、シリカ-アルミナ、アルミナ、磁化鉄、磁化合金などの無機材料、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリメタクリレート、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、ポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド、スチレン-メタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイン-エチレングリコールジメタクリレート共重合体など、架橋化アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、デキストラン、アガロース、架橋アガロース、セルロース、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートなどの天然または変成セルロース、架橋デキストラン、ナイロンなどのポリアミド、ポリウレタン、ポリエポキシ樹脂などの有機高分子物質、さらにそれらを乳化重合して得られたもの、細胞、赤血球などで、必要に応じ、シランカップリング剤などで官能性を導入してあるものが挙げられる。

30

さらに、ろ紙、ビーズ、試験容器の内壁、例えば試験管、タイタープレート、タイターウェル、ガラスセル、合成樹脂製セルなどの合成材料からなるセル、ガラス棒、合成材料からなる棒、末端を太くしたりあるいは細くしたりした棒、末端に丸い突起をつけたりあるいは扁平な突起をつけた棒、薄板状にした棒などの固体物質(物体)の表面などが挙げられる。

40

これら担体へは、抗体を結合させることができ、好ましくは本発明で得られる抗原に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を結合させることができる。担体とこれら抗原抗体反応に関与するものとの結合は、吸着などの物理的な手法、あるいは縮合剤などを用いたり、活性化されたものなどを用いたりする化学的な方法、さらには相互の化学的な結合反応を利用した手法などにより行うことが出来る。

標識としては、酵素、酵素基質、酵素インヒビター、補欠分子類、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質、色素物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、発色物質、磁気物質、金属粒子、例えば金コロイドなど、放射性物質などを挙げることができる。酵素としては、脱水素酵素、還元酵素、酸化酵素などの酸化還元酵素、例えばアミノ基、カルボキシル基、メチル基、アシル基、リン酸基などを転移するのを触媒する転移酵素、例えば

50

エステル結合、グリコシド結合、エーテル結合、ペプチド結合などを加水分解する加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼなどを挙げることができる。酵素は複数の酵素を複合的に用いて検知に利用することもできる。例えば酵素的サイクリングを利用することもできる。

代表的な放射性物質の標識用同位体元素としては、 $[^3\ ^2\text{P}]$ 、 $[^1\ ^2\ ^5\text{I}]$ 、 $[^1\ ^3\ ^1\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^1\ ^4\text{C}]$ 、 $[^3\ ^5\text{S}]$ などが挙げられる。

代表的な酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ、大腸菌 β -D-ガラクトシダーゼなどのガラクトシダーゼ、マレーン・デヒドロゲナーゼ、グルコース-6-フォスフェート・デヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、カタラーゼ、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、大腸菌アルカリホスファターゼなどのアルカリフォスファターゼなどが挙げられる。アルカリホスファターゼを用いた場合、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどのウンベリフェロン誘導体、ニトロフェニルホスフェートなどのリン酸化フェノール誘導体、NADPを利用した酵素的サイクリング系、ルシフェリン誘導体、ジオキセタン誘導体などの基質を使用したりして、生ずる蛍光、発光などにより測定できる。ルシフェリン、ルシフェラーゼ系を利用したりすることもできる。カタラーゼを用いた場合、過酸化水素と反応して酸素を生成するので、その酸素を電極などで検知することもできる。電極としてはガラス電極、難溶性塩膜を用いるイオン電極、液膜型電極、高分子膜電極などであることもできる。

酵素標識は、ビオチン標識体と酵素標識アビジン(ストレプトアビジン)に置き換えることも可能である。標識は、複数の異なった種類の標識を使用することもできる。こうした場合、複数の測定を連続的に、あるいは非連続的に、そして同時にあるいは別々に行うことを可能にすることもできる。標識及び検知可能な信号を得るには、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコルに従って実施することもできる。

本発明においては、信号の形成に4-ヒドロキシフェニル酢酸、1,2-フェニレンジアミン、テトラメチルベンジジンなどと西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ、ウンベリフェリルガラクトシド、ニトロフェニルガラクトシドなどと β -D-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸・デヒドロゲナーゼなどの酵素試薬の組み合わせも利用でき、ヒドロキノン、ヒドロキシベンゾキノン、ヒドロキシアントラキノンなどのキノール化合物、リポ酸、グルタチオンなどのチオール化合物、フェノール誘導体、フェロセン誘導体などを酵素などの働きで形成しうるものが使用できる。

蛍光物質あるいは化学ルミネッセンス化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート、例えばローダミンBイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートなどのローダミン誘導体、ダンシルクロリド、ダンシルフルオリド、フルオレスカミン、フィコビリプロテイン、アクリジニウム塩、ルミフェリン、ルシフェラーゼ、エクロリンなどのルミノール、イミダゾール、シュウ酸エステル、希土類キレート化合物、クマリン誘導体などが挙げられる。

標識するには、チオール基とマレイミド基の反応、ピリジルジスルフィド基とチオール基の反応、アミノ基とアルデヒド基の反応などを利用して行うことができ、公知の方法あるいは当該分野の当業者が容易になしうる方法、さらにはそれらを修飾した方法の中から適宜選択して適用できる。また上記免疫原性複合体作製に使用されることのできる縮合剤、担体との結合に使用されることのできる縮合剤などを用いることができる。

縮合剤としては、例えばホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N,N'-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、N,N'-エチレンビスマレイミド、エチレングリコールビススクシニミジルスクシネート、ビスジアゾベンジジン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPD P)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、N-スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチ

10

20

30

40

50

ル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート、N-スクシンイミジル4-(1-マレイミドフェニル)ブチレート、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)コハク酸イミド(EMCS)、イミノチオラン、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物、メチル-3-(4'-ジチオピリジル)プロピオンイミデート、メチル-4-メルカプトブチリルイミデート、メチル-3-メルカプトプロピオンイミデート、N-スクシンイミジル-S-アセチルメルカプトアセテートなどが挙げられる。

本発明の測定法によれば、測定すべき物質を酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬と、担体に結合された抗体とを順次反応させることができるし、同時に反応させることもできる。試薬を加える順序は選ばれた担体系の型により異なる。感作されたプラスチックなどのビーズを用いた場合には、酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬を測定すべき物質を含む検体試料と共に最初適当な試験管中に一緒に入れ、その後該感作されたプラスチックなどのビーズを加えることにより測定を行うことができる。

本発明の定量法においては、免疫学的測定法が用いられるが、その際の固相担体としては、抗体などタンパク質を良く吸着するポリスチレン製、ポリカーボネイト製、ポリプロピレン製あるいはポリビニル製のボール、マイクロプレート、スティック、微粒子あるいは試験管などの種々の材料および形態を任意に選択し、使用することができる。

測定にあたっては至適pH、例えばpH約4~約9に保つように適当な緩衝液系中で行うことができる。特に適切な緩衝剤としては、例えばアセテート緩衝剤、クエン酸塩緩衝剤、フォスフェート緩衝剤、トリス緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ボレート緩衝剤、グリシン緩衝剤、炭酸塩緩衝剤、トリス-塩酸緩衝剤などが挙げられる。緩衝剤は互いに任意の割合で混合して用いることができる。抗原抗体反応は約0~約60の間の温度で行うことが好ましい。

酵素などで標識されたモノクローナル抗体などの抗体試薬及び担体に結合せしめられた抗体試薬、さらには測定すべき物質のインキュベーション処理は、平衡に達するまで行うことができるが、抗原抗体反応の平衡が達成されるよりもずっと早い時点で固相と液相とを分離して限定されたインキュベーション処理の後に反応を止めることができ、液相又は固相のいずれかにおける酵素などの標識の存在の程度を測ることができる。測定操作は、自動化された測定装置を用いて行うことが可能であり、ルミネセンス・ディテクター、ホット・ディテクターなどを使用して基質が酵素の作用で変換されて生ずる表示シグナルを検知して測定することもできる。

抗原抗体反応においては、それぞれ用いられる試薬、測定すべき物質、さらには酵素などの標識を安定化したり、抗原抗体反応自体を安定化するように適切な手段を講ずることができる。さらに、非特異的な反応を除去し、阻害的に働く影響を減らしたり、あるいは測定反応を活性化したりするため、タンパク質、安定化剤、界面活性化剤、キレート化剤などをインキュベーション溶液に加えることもできる。キレート化剤としては、エチレンジアミン四酢酸塩(BDTA)がより好ましい。

当該分野で普通に採用されていたりあるいは当業者に知られた非特異的結合反応を防ぐためのブロッキング処理を施してもよく、例えば、哺乳動物などの正常血清タンパク質、アルブミン、スキムミルク、乳発酵物質、コラーゲン、ゼラチンなどで処理することができる。非特異的結合反応を防ぐ目的である限り、それらの方法は特に限定されず用いることができる。

本発明の測定方法で測定される試料としては、あらゆる形態の溶液やコロイド溶液、非流体試料などが使用しうるが、好ましくは生物由来の試料、例えば胸腺、睾丸、腸、腎臓、脳、乳癌、卵巣癌、結腸・直腸癌、血液、血清、血漿、関節液、脳脊髄液、唾液、羊水、尿、その他の体液、細胞培養液、組織培養液、組織ホモジュネート、生検試料、組織、細胞などが挙げられる。

これら個々の免疫学的測定法を含めた各種の分析・定量法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通

10

20

30

40

50

常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて、本発明の当該対象物質あるいはそれと実質的に同等な活性を有する物質に関連した測定系を構築すればよい。

これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編、「ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和49年発行；入江 寛編、「続ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和54年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」、医学書院、昭和53年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」(第2版)、医学書院、昭和57年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」(第3版)、医学書院、昭和62年発行；H. V. Vunakis et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 70 (Immunochemical Techniques, Part A), Academic Press, New York (1980)；J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 73 (Immunochemical Techniques, Part B), Academic Press, New York (1981)；J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 74 (Immunochemical Techniques, Part C), Academic Press, New York (1981)；J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 84 (Immunochemical Techniques, Part D: Selected Immunoassays), Academic Press, New York (1982)；J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 92 (Immunochemical Techniques, Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods), Academic Press, New York (1983)；J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 121 (Immunochemical Techniques, Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies), Academic Press, New York (1986)；J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 178 (Antibodies, Antigens, and Molecular Mimicry), Academic Press, New York (1989)；M. Wilchek et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 184 (Avidin-Biotin Technology), Academic Press, New York (1990)；J. J. Langone et al. (ed.), "Methods in Enzymology", Vol. 203 (Molecular Design and Modeling: Concepts and Applications, Part B: Antibodies and Antigens, Nucleic Acids, Polysaccharides, and Drugs), Academic Press, New York (1991) などあるいはそこで引用された文献(それらの中にある記載はそれを参照することにより本明細書の開示に含められる)〕。

本発明の抗N-Tes抗体、特にモノクローナル抗体を用いて、エピトープマッピングを行うこともでき、各エピトープを認識する抗体を用いればN-Tes及びその関連ペプチド断片などの検知・測定を行うことができる。

N-Tes及びその関連ペプチド断片に対する抗体は、N-TesによるMT-MMP類の活性阻害などの現象の検出及び/又は測定、さらにはMMPs活性の過剰により生ずる各種の生理活性物質の検出及び/又は測定に有用である。該抗体、特にモノクローナル抗体は、(i) MMPsによる組織あるいはタンパク質の分解が関連する障害、異常及び/又は疾患を検出したり、(ii) MMPsによる組織あるいはタンパク質の分解が引き起こす細胞の腫瘍化、細胞の移動、浸潤、遊走及び/又は転移あるいはその可能性を検出し

10

20

30

40

50

たり、及び／又は（i i i）細胞の腫瘍化、腫瘍細胞、血液系細胞などの細胞の移動、浸潤、遊走及び／又は転移あるいはその可能性を検出するのに有用である。癌の移動性、浸潤性、走化性及び／又は転移性の程度を知るのに使用できると期待される。

本発明にしたがえば、N - T e s によるMT - MMP類の活性阻害を検出及び／又は測定し、抗癌剤、癌転移阻害剤、血管新生阻害剤、アルツハイマー治療剤、関節破壊治療剤、消炎剤及び／又は免疫抑制剤の効果判定モニターとして使用することが可能となる。

また、本発明では、MT 1 - MMP及び／又はMT 3 - MMPによる組織あるいはタンパク質の分解現象の検出及び／又は測定方法やそのための試薬が提供できる。

本発明で使用する抗体（モノクローナル抗体を含む）としては、公知のものあるいは公知の各種の該抗体の製造法を適用して得られるものを含む他、上記で説明した抗体の調製法に準じて得られるものも包含される。 10

本発明の活性成分〔例えば、（a）N - T e s ポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩、それに関連するペプチド等、（b）該N - T e s あるいはN - T e s ポリペプチドをコードするDNAなどの核酸等、（c）本発明の抗体、その一部断片（モノクローナル抗体を包含する）またはその誘導体、（d）N - T e s によるMT - MMP類の活性阻害などの現象あるいは組織あるいはタンパク質の分解現象といった生物学的活性を抑制及び／又は阻害する化合物またはその塩、（e）本発明のDNAなどの核酸に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドなど〕を医薬として用いる場合、例えばMMP阻害剤またはそれらの塩等は、通常単独或いは薬理的に許容される各種製剤補助剤と混合して、医薬組成物又は医薬調製物などとして投与することができる。好ましくは、経口投与、局所投与、または非経口投与等の使用に適した製剤調製物の形態で投与され、目的に応じてい 20

ずれの投与形態（吸入法、あるいは直腸投与も包含される）によってもよい。

また、本発明の活性成分は、抗腫瘍剤（抗癌剤）、腫瘍移転阻害剤、血管新生阻害剤、アルツハイマー治療剤、関節破壊治療剤、消炎剤及び／又は免疫抑制剤と配合して使用することもできる。抗腫瘍剤（抗癌剤）、腫瘍移転阻害剤、血管新生阻害剤、アルツハイマー治療剤、関節破壊治療剤、消炎剤や免疫抑制剤としては、有利な働きを持つものであれば制限なく使用でき、例えば当該分野で知られたものの中から選択することができる。

そして、非経口的な投与形態としては、局所、経皮、静脈内、筋肉内、皮下、皮内もしくは腹腔内投与を包含し得るが、患部への直接投与も可能であり、またある場合には好適でもある。好ましくはヒトを含む哺乳動物に経口的に、あるいは非経口的（例、細胞内、組織内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内、胸腔内、脊髓腔内、点滴法、注腸、経直腸、点耳、点眼や点鼻、歯、皮膚や粘膜への塗布など）に投与することができる。具体的な製剤調製物の形態としては、溶液製剤、分散製剤、半固形製剤、粉粒体制剤、成型製剤、浸出製剤などが挙げられ、例えば、錠剤、被覆錠剤、糖衣を施した剤、丸剤、トロース剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、マイクロカプセル剤、埋込剤、粉末剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、注射剤、液剤、エリキシル剤、エマルジョン剤、灌注剤、シロップ剤、水剤、乳剤、懸濁剤、リニメント剤、ローション剤、エアゾール剤、スプレー剤、吸入剤、噴霧剤、軟膏製剤、硬膏製剤、貼付剤、パスタ剤、パップ剤、クリーム剤、油剤、坐剤（例えば、直腸坐剤）、チンキ剤、皮膚用水剤、点眼剤、点鼻剤、点耳剤、塗布剤、輸液剤、注射用液剤などのための粉末剤、凍結乾燥製剤、ゲル調製品等が挙げられる。 30 40

医薬用の組成物は通常の方法に従って製剤化することができる。例えば、適宜必要に応じて、生理学的に認められる担体、医薬として許容される担体、アジュバント剤、賦形剤、補形剤、希釈剤、香味剤、香料、甘味剤、ベヒクル、防腐剤、安定化剤、結合剤、pH調節剤、緩衝剤、界面活性剤、基剤、溶剤、充填剤、増量剤、溶解補助剤、可溶化剤、等張化剤、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、増粘剤、ゲル化剤、硬化剤、吸収剤、粘着剤、弾性剤、可塑剤、崩壊剤、噴射剤、保存剤、抗酸化剤、遮光剤、保湿剤、緩和剤、帯電防止剤、無痛化剤などを単独もしくは組合わせて用い、それとともに本発明のタンパク質等を混和することによって、一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態にして製造することができる。

非経口的使用に適した製剤としては、活性成分と、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し 50

得る媒体との無菌性溶液、または懸濁液剤など、例えば注射剤等が挙げられる。一般的には、水、食塩水、デキストロース水溶液、その他関連した糖の溶液、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどのグリコール類が好ましい注射剤用液体担体として挙げられる。注射剤を調製する際は、蒸留水、リンゲル液、生理食塩液のような担体、適当な分散化剤または湿化剤及び懸濁化剤などを使用して当該分野で知られた方法で、溶液、懸濁液、エマルジョンのごとき注射しうる形に調製する。

注射用の水性液としては、例えば生理食塩液、ブドウ糖やその他の補助薬（例えば、D - ソルビトール、D - マンニトール、塩化ナトリウムなど）を含む等張液などが挙げられ、薬理的に許容される適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノールなど）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート 80^{T M}、HCO - 50 など）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）又は浸透圧調節のための試薬、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、アスコルビン酸などの酸化防止剤、吸収促進剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

非経口投与には、界面活性剤及びその他の薬学的に許容される助剤を加えるか、あるいは加えずに、水、エタノール又は油のような無菌の薬学的に許容される液体中の溶液あるいは懸濁液の形態に製剤化される。製剤に使用される油性ベヒクルあるいは溶剤としては、天然あるいは合成あるいは半合成のモノあるいはジあるいはトリグリセリド類、天然、半合成あるいは合成の油脂類あるいは脂肪酸類が挙げられ、例えばピーナッツ油、トウモロコシ油、大豆油、ゴマ油などの植物油が挙げられる。例えば、この注射剤は、通常本発明化合物を 0.1 ~ 10 重量% 程度含有するように調製されることができる。

局所的、例えば口腔、又は直腸的使用に適した製剤としては、例えば洗口剤、歯磨き剤、口腔噴霧剤、吸入剤、軟膏剤、歯科充填剤、歯科コーティング剤、歯科ペースト剤、坐剤等が挙げられる。洗口剤、その他歯科用剤としては、薬理的に許容される担体を用いて慣用の方法により調製される。口腔噴霧剤、吸入剤としては、本発明化合物自体又は薬理的に許容される不活性担体とともにエアゾール又はネブライザー用の溶液に溶解させるかあるいは、吸入用微粉末として歯などへ投与できる。軟膏剤は、通常使用される基剤、例えば、軟膏基剤（白色ワセリン、パラフィン、オリーブ油、マクロゴール 400、マクロゴール軟膏など）等を添加し、慣用の方法により調製される。

歯、皮膚への局所塗布用の薬品は、適切に殺菌した水または非水賦形剤の溶液または懸濁液に調剤することができる。添加剤としては、例えば亜硫酸水素ナトリウムまたはエデト酸二ナトリウムのような緩衝剤；酢酸または硝酸フェニル水銀、塩化ベンザルコニウムまたはクロロヘキシジンのような殺菌および抗真菌剤を含む防腐剤およびヒプロメルローズのような濃厚剤が挙げられる。

坐剤は、当該分野において周知の担体、好ましくは非刺激性の適当な補形剤、例えばポリエチレングリコール類、ラノリン、カカオ脂、脂肪酸トリグリセライド等の、好ましくは常温では固体であるが腸管の温度では液体で直腸内で融解し薬物を放出するものなどを使用して、慣用の方法により調製されるが、通常本発明化合物を 0.1 ~ 95 重量% 程度含有するように調製される。使用する賦形剤および濃度によって薬品は、賦形剤に懸濁させるかまたは溶解させることができる。局部麻酔剤、防腐剤および緩衝剤のような補助薬は、賦形剤に溶解可能である。

経口的使用に適した製剤としては、例えば錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末剤、顆粒剤、トローチのような固形組成物や、液剤、シロップ剤、懸濁剤のような液状組成物等が挙げられる。製剤調製する際は、当該分野で知られた製剤補助剤などを用いる。錠剤及び丸剤はさらにエンテリックコーティングされて製造されることもできる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することがで

10

20

30

40

50

きる。

さらに、本発明のDNAなどの核酸を上記したような治療及び/又は予防剤として用いる場合、該核酸はそれを単独で用いることもできるし、あるいは上記したような遺伝子組換え技術で利用される適当なベクター、例えばレトロウイルス由来ベクターなどウイルス由来のベクターなどに結合させるなどして用いることができる。本発明のDNAなどの核酸は通常の知られた方法で投与でき、そのまま、あるいは、例えば細胞内への摂取が促進されるように、適当な補助剤あるいは生理的に許容される担体などと共に、製剤化されて用いることができ、上記したような、医薬組成物又は医薬調製物などとして投与することができる。また遺伝子治療として知られた方法を適用することもできる。

本発明の活性成分は、その投与量を広範囲にわたって選択して投与できるが、その投与量及び投与回数などは、処置患者の性別、年齢、体重、一般的健康状態、食事、投与時間、投与方法、排泄速度、薬物の組み合わせ、患者のその時に治療を行なっている病状の程度に依り、それらあるいはその他の要因を考慮して決められる。

医薬品製造にあたっては、その添加剤等や調製法などは、例えば日本薬局方解説書編集委員会編、第十四改正 日本薬局方解説書、平成13年6月27日発行、株式会社廣川書店；一番ヶ瀬 尚 他編 医薬品の開発12巻（製剤素剤〔I〕）、平成2年10月15日発行、株式会社廣川書店；同、医薬品の開発12巻（製剤素材〔II〕）平成2年10月28日発行、株式会社廣川書店などの記載を参考にしてそれらのうちから必要に応じて適宜選択して適用することができる。

本発明の活性成分は、MMPs、特にMT1-MMP、MT3-MMPの活性阻害あるいはMMPsの活性化阻害といった生物学的活性を抑制及び/又は阻害する作用をもつものであれば特に限定されないが、好ましくは有利な作用を持つものが挙げられる。本発明の活性成分は、例えば、(a) N-Tes、その変異体ポリペプチド、その一部のペプチドまたはそれらの塩等、(b) 該N-TesをコードするDNA、N-Tes変異体ポリペプチドをコードするDNAなどの核酸等、(c) 本発明の抗体、その一部断片（モノクローナル抗体を包含する）またはその誘導体、(d) N-TesによるMT-MMP類の活性阻害といった生物学的活性を抑制及び/又は阻害する化合物またはその塩などが包含される。本発明の活性成分には、抗MMP抗体、例えばモノクローナル抗MMP抗体も包含される。

本発明の活性成分は、MMPsによる各種組織あるいはタンパク質のプロセッシング、例えば少なくともMT1-MMPあるいはMT3-MMPによるタンパク質のプロセッシングを抑制あるいは阻害するのに有用と期待される。また、該活性成分は、MMPs、例えばMMP-9、MMP-2活性発現の抑制に有用であり、MT1-MMPあるいはMT3-MMP遺伝子発現細胞におけるMMPsによるタンパク質のプロセッシングに関連する障害、異常及び/又は疾患の予防あるいは治療に有用である。また、MMPsが関与する腫瘍細胞などの移動、浸潤、遊走及び/又は転移の制御、例えば抑制に有用であると期待される。

N-Tes及びその関連ペプチドは、悪性腫瘍、すなわち癌の移動、浸潤及び/又は転移の阻止及び/又は抑制するのに有用で、血管新生阻害剤、抗腫瘍剤及び/又は癌転移抑制剤として期待できる。また、血液系細胞の、MMPsによるプロセッシングに関連する障害、異常及び/又は疾患の予防あるいは治療にも有用で、消炎剤及び/又は免疫抑制剤としても期待できる。さらに、アルツハイマー治療剤、関節破壊治療剤などとしても期待できる。

さらに、本発明では、(a) N-Tesのアミノ酸配列中、第22番目のアミノ酸残基～第312番目のアミノ酸残基の範囲の配列：

(b) N-Tesのアミノ酸配列中、第1番目のアミノ酸残基～第312番目のアミノ酸残基の範囲の配列：及び

(c) N-Tesのアミノ酸配列中、第22番目のアミノ酸残基～第122番目のアミノ酸残基の範囲の配列

から成る群から選ばれたものに基づいて分子設計を施して、MMPsによる各種タンパク

質のプロセッシングを抑制あるいは阻害する活性を有する物質を得るのに使用できる。こうして得られる物質も本発明の思想の範囲内のものであるし、本発明の活性成分として扱うことができる。該配列から特定の特徴部分を選択し、(i)そのうちの薬理作用団をイソスターで置き換えることによりなされるか、(ii)構成アミノ酸残基の少なくとも1個をD体のアミノ酸残基に置き換えるか、(iii)アミノ酸残基の側鎖を修飾するか、(iv)該配列に存在するアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基を配置して連結するか、(v)立体構造を解析してmimic体をデザインすることなど、当該分野で採用される技術を駆使して行うことができる(例えば、首藤 紘一 編 医薬品の開発7巻(分子設計)、平成2年6月25日発行、株式会社廣川書店及びそこで引用している文献や論文など)。そうした技術の一部は、上記で説明したものを含んでいる。

10

明細書及び図面において、用語は、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるか、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。

実施例

以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されず、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。全ての実施例は、他に詳細に記載するもの以外は、標準的な技術を用いて実施したもの、又は実施することのできるものであり、これは当業者にとり周知で慣用的なものである。なお、以下の実施例において、特に指摘が無い場合には、具体的な操作並びに処理条件などは、DNAクローニングではJ. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, "Molecular Cloning", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)及びD. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1 to 4, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995); 特にPCR法ではH. A. Erlich ed., PCR Technology, Stockton Press, 1989; D. M. Glover et al. ed., "DNA Cloning", 2nd ed., Vol. 1, (The Practical Approach Series), IRL Press, Oxford University Press (1995)及びM. A. Innis et al. ed., "PCR Protocols", Academic Press, New York (1990)に記載の方法に準じて行っているし、また市販の試薬あるいはキットを用いている場合はそれらに添付の指示書(protocol)や添付の薬品等を使用している。

20

30

実施例1: N-Tesのクローニング

1) 一次スクリーニング

cDNA発現ライブラリーは、Edg Biosystems社のUnamplified cDNA Library(ヒト胎児腎臓由来)を使用した。Stratagen社のcDNA合成キット、発現プラスミド、コンピュタントセルを使用しても可能である。ヒト胎児腎臓由来cDNA発現ライブラリーの30クローンの大腸菌を1プールとしてTB培地にて37℃で16時間培養し、培養大腸菌1.5mlよりアルカリ-SDS法にてプラスミドを精製した。

40

96穴マイクロプレートに1穴あたりおよそ20,000個の293T細胞を5%牛胎児血清を含むDMEMで播き、24時間培養した。MMP-9、MMP-2、MT1-MMPの全長cDNAをpSG5(Stratagene)のクローニングサイトに挿入した発現ベクターを作成し、1穴あたりMMP-9発現プラスミド3ng、MMP-2発現プラスミド22ng、MT1-MMP発現プラスミド33ngを上記ライブラリーDNA200ngとともにリン酸カルシウム法にてトランスフェクションした。37℃で48時間培養後、培地を除き、細胞を1穴あたり50マイクロリットルのSDS-PAGEサンブルバッファー(10mM Tris-HCl緩衝液, pH6.8, 20% glycerol

50

0.1, 0.24 mg/ml B P B, 1% SDS) で可溶化した。37 で30分加温後、5マイクロリットルをゼラチンザイモグラフィーに供し、潜在型、中間体、活性化型 MMP - 9、MMP - 2を検出にかけた。一次スクリーニングにより、ライブラリーより活性化型 MMP - 2の産生を抑制する遺伝子プラスミドの集団を特定した。

2) 二次スクリーニング

一次スクリーニングで得られた候補遺伝子プラスミドの集団を大腸菌 X L - 1 B l u e (S t r a t a g e n e) に導入し、アンピシリン含有 LB プレート上で24時間培養した。大腸菌コロニー50個を1個ずつ分離し、TB培地にて37 で16時間培養し、培養大腸菌1.5 ml よりアルカリ - S D S 法にてプラスミドを精製した。前項記載の一次スクリーニングと同様に MMP - 9, MMP - 2, MT1 - MMP 発現プラスミドと精製プラスミドを293T細胞に導入し、ゼラチンザイモグラフィーにて潜在型、中間体、活性化型 MMP - 9、MMP - 2を検出にかけた。活性化型 MMP - 2の産生を抑制した単一プラスミドを同定した。

図1にマイクロプレート8穴のデーターを示す。レーン4では中間体及び活性化型 MMP - 2の産生が抑制されている。この活性化型 MMP - 2の産生が抑制されたウェルに添加された単一プラスミドについて、L I - C O R DNA シークエンサー M o d e l 4 2 0 0 を使用して挿入された DNA の塩基配列を決定した。決定した DNA の塩基配列を配列表の配列番号: 1 に記載した。

この遺伝子は、1510 ベースペアの長さを有し、313 アミノ酸残基からなるオープンリーディングフレームをコード (O R F) していた。該 O R F にコードされるアミノ酸配列を配列表の配列番号: 2 に記載した。ホモロジー検索の結果、T e s t i c a n - 1 (G e n B a n k A c c e s s i o n N o . A F 2 3 1 1 2 4), T e s t i c a n - 2 (G e n B a n k A c c e s s i o n N o . A J 0 0 1 4 5 3), T e s t i c a n - 3 (G e n B a n k A c c e s s i o n N o . A A J 0 0 1 4 5 4) および H P T L G (W O 9 9 / 2 3 1 1 0) のアミノ酸配列のN末端側およそ310残基と相同性が認められた (図2)。この遺伝子を N - T e s と命名した。

実施例2: N - T e s のN末端122アミノ酸残基からなる組換えタンパク質発現プラスミドの構築

1) N - T e s c D N A フラグメント (1 - 4 7 3) の P C R 増幅

N - T e s c D N A の 4 5 1 - 4 7 3 位に対応する相補鎖に制限酵素 B g l I I の認識配列および B g l I 切断効率向上のため2塩基を付加した P C R プライマー

GGAGATCTTCCTGCTTCCTTCATCCTGTGTG [配列番号: 3]

を設計した。c D N A 発現ライブラリー p E A K 8 プラスミド (E d g B i o S y s t e m s) 内の T 7 プロモーターに対応する T 7 プライマー

TAATACGACTCACTATAGG [配列番号: 4]

と本プライマーを用い、N - T e s c D N A 含む p E A K 8 を鋳型として P C R 増幅を行った。その結果、約500塩基の断片を得た。このDNA断片をE c o R I と B g l I I で消化後、E c o R I と B g l I I で消化した p S G - F L A G ベクターとDNAリガーゼを用いて連結した。p S G - F L A G は、p S G 5 のクローニングサイトの3'末端側にF L A G ペプチド (D Y K D D D K) をコードする塩基配列と終止コドン挿入したもので、リーディングフレームを合わせることにより、発現タンパク質のN末端側にF L A G ペプチドを付加することができる。これを大腸菌 X L - 1 B l u e に導入、増幅した後アルカリ - S D S 法、C s C l 超遠心精製法により、発現ベクター p S G - N - T e s - d e l - F L A G を得た。p S G - N - T e s - d e l - F L A G で発現するタンパク質は、N - T e s の M e t ¹ から G l y ¹²² に由来する122アミノ酸残基と B g l I I 認識配列および F L A G 配列に由来する12アミノ酸残基をあわせた134アミノ酸残基からなるタンパク質 (配列表の配列番号: 5) をコードする。うち、M e t ¹ から A l a ²¹ の21アミノ酸残基は、リーダー配列であり、細胞より分泌される際に切断除去され、113アミノ酸残基の組換えタンパク質が産生される。この発現プラスミドにより産生されるタンパク質を N - T e s - d e l - F L A G とする。N - T e s - d e l - F L

10

20

30

40

50

AGは、N-Tes (101アミノ酸残基、Ala²² から Gly¹²²) のC末端にFLAGペプチドタグを有する。

2) N-Tes-del-FLAGによるMT1-MMP、MT3-MMPを介したMMP-2活性化抑制

24穴プラスチックプレート(Nunc)に50,000個の293T細胞を5%牛胎児血清加DMEM 0.5mlで播き、24時間後にMMP-2(25ng)、MT1-MMP(50ng)あるいはMT3-MMP(50ng)発現ベクターと前項記載の250ngのpSG-N-Tes-del-FLAGを導入した。36時間後に牛胎児血清を含まないDMEM 100マイクロリットルと交換し、12時間後に10マイクロリットルを採取し、5マイクロリットルのSDS-PAGEサンプルバッファーを添加、37で30分加温後、ゼラチンザイモグラフィで分析した(図3)。図3中、レーン1: MMP-2: 25ng; pSG5: 475ng、レーン2: MMP-2: 25ng; MT1-MMP: 50ng; pSG5: 425ng、レーン3: MMP-2: 25ng; MT1-MMP: 50ng; pSG-N-Tes-del-FLAG: 425ng、レーン4: MMP-2: 25ng; pSG5: 475ng、レーン5: MMP-2: 25ng; MT3-MMP: 50ng; pSG5: 425ng、レーン6: MMP-2: 25ng; MT3-MMP: 50ng; pSG-N-Tes-del-FLAG: 425ngをそれぞれ示している。

図3中、レーン3および6ではそれぞれMT1-MMPおよびMT3-MMPを介したMMP-2の活性化が抑制された。このことは、N-Tes-del-FLAGがMT-MMPsの活性を阻害することを示している。さらに、N-Tes-del-FLAGと同じ塩基配列を含むN-Tes、Testican-3およびHPTLGもMT-MMPsの活性を阻害し、MMP-2の活性化を抑制することが容易に類推できる。

実施例3: グリオーマにおけるN-Tes発現

グリオーマ患者の腫瘍部位(レーンT)と腫瘍を含まない部位(レーンN)から抽出した全RNAから逆転写酵素SuperScript(GIBCO-BRL)とランダムプライマー(宝酒造)を用いてcDNAを合成し、このものを鋳型としてN-Tesに特異的なプライマー

Forward Primer:

GAGTGGTGCTACTGCTTCCA

[配列番号: 6]

Reverse Primer:

GTGCTTCTTGGTGGCTCATA

[配列番号: 7]

を用いてPCRを行った。配列番号: 6は、配列表の配列番号: 1の1008-1027位に対応するもので、配列番号: 7は、配列表の配列番号: 1の1308-1289位に相補的な配列に対応するものである。PCR反応は、例えばGeneAmp 2400 PCRシステム(Perkin-Elmer/Cetus)などを使用し、変性(94, 15秒)、アニーリング(60, 15秒)および伸長(72, 15秒)の40サイクルで実施した。PCR産物は、2.5%アガロースゲルで分析した。

結果を、図4に示す。6名のグリオーマ患者すべてで、N-Tes発現は、腫瘍を含まない部位(レーンN)に比べ腫瘍部位(レーンT)で有意に低かった(図4)。このことより、グリオーマ悪性度とN-Tes発現低下が関連するものと考えられる。

実施例4: MT-MMPとN-Tesの結合

直径60mmの培養プレートに293T細胞をおよそ50万個をまき、24時間後にpSG5、MT1-MMPを発現するpSGMT1-MMPおよびN-Tes-del-FLAGを発現するpSG-N-Tes-del-FLAGのそれぞれを、(1)4μg pSG5(lane 1), (2)2μg pSGMT1-MMP+2μg pSG5(lane 2), (3)2μg pSG-N-Tes-del-FLAG+2μg pSG5(lane 3), (4)2μg pSG-N-Tes-del-FLAG+2μg

pSGMT1-MMP plasmid (lane 4), (5) 4 μ g pSG5 (lane 5), (6) 2 μ g pSG-N-Tes-del-FLAG + 2 μ g pSG5 (lane 6), (7) 2 μ g pSGMT1-MMP + 2 μ g pSG5 (lane 7) 及び (8) 2 μ g pSG-N-Tes-del-FLAG + 2 μ g pSGMT1-MMP plasmid (lane 8) となるようにトランスフェクションし、24 時間後に 100 マイクロキューリー/ml の S-35 ラベルの methionine + cysteine を添加し 4 時間培養した。細胞は、1 ml の細胞溶解バッファー (150 mM NaCl、1% Triton X-100 (v/v)、1% sodium deoxycholate、0.1% SDS および protease inhibitor cocktail (Sigma) を含有した 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)) で可溶化し、15,000 rpm で 10 分間遠心して上清を回収した。この上清を anti-MT1-MMP 抗体 (113-5B7 (第一ファインケミカル)、レーン 1-4) および anti-FLAG 抗体 (M2 (Stratagene)、レーン 5-8) のそれぞれ 1 マイクログラムと共に 12 時間インキュベートした後、Protein A-Sepharose ゲル (20 マイクロリットル) と 1 時間混合した。ゲルを細胞溶解バッファーで 3 回洗った後、SDS-PAGE sample buffer を 10 マイクロリットル加えて、100 で 2 分煮沸した後、上清を 12% SDS-PAGE ゲルで展開し、S-35 のシグナルを Fuji BAS 1000 で検出した (図 5)。

レーン 4 では、免疫沈降した MT1-MMP と結合した N-Tes が共沈すること、レーン 8 では、免疫沈降した N-Tes と結合した MT1-MMP が共沈することが観察された (図 5)。このことより、N-Tes は、MT1-MMP と結合することにより、MT1-MMP の MMP-2 活性化能を抑制していると思われる。

実施例 5：モノクローナル抗体の作成

(a) 免疫源

免疫に用いる抗原は、実施例 2 など得られる融合組換え N-Tes をはじめ、配列表の配列番号：2 のアミノ酸配列を基にデザインされた合成ペプチドを使用することができる。さらに、免疫に用いる抗原は、実施例 1 で得られた cDNA を動物細胞発現ベクターに連結し、これを CHO 細胞、COS 細胞などで発現させて得られる組換え N-Tes を使用することも可能である。これらの抗原タンパク質は、イオン交換、ゲル濾過またはそれ以外の各種クロマトグラフィーによって精製できる。

精製した免疫用抗原を一般的な方法で免疫し、抗体産生細胞を誘導、細胞融合によりハイブリドーマとして抗体産生細胞を得ることができる。さらに精製した免疫用抗原に対する反応性に基づいてクローニング、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマとして株化できる。

また、N-Tes 特異的モノクローナル抗体を得るための免疫源としては、N-Tes に特徴的なアミノ酸配列を持つハプテン化合成ペプチドが使用できる。

例えば、C 末端には Gly-Lys-Arg (配列番号：10) を含むことが特に好ましく、具体的には Cys-Phe-Gln-Arg-Gln-Gln-Gly-Lys-Arg (配列番号：11) などが免疫源として好適である。

(b) 抗原ポリペプチドの調製

配列番号：2 に記載したヒト N-Tes のアミノ酸配列中より特徴的な配列を選択し、合成する。ペプチドはペプチド合成機 (ペプチドシンセサイザー 9600、Milligen/Bioscience) を使用して、Fmoc-bop 法で合成する。ポリペプチドの N 末端にはシステインを導入する。合成したペプチドは μ Bondasphere, C18 カラム (Waters) を用いた高速液体クロマトグラフィーなどにより精製する。

(c) ポリペプチドと BSA の複合体の調製

システイン残基を介してウシ血清アルブミン (BSA) と結合させ、抗原コンジュゲートとした。10.1 mg の BSA を 1 mL の 0.1 M リン酸緩衝液、pH 7.0 に溶解したものと 1.14 mg の EMCS (N-(ϵ -maleimidecaproyloxy)-succinimide) を 24.9 μ L のジメチルホルムアミドに溶解したものと混

合し、30、30分間反応させ、ついで、上記の混合液を0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.0で平衡化したSephadex G-25 (Pharmacia)ゲルカラム(直径13mm、長さ120mm)でゲルろ過する。前記(b)で合成したポリペプチドを0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.0に溶解し、マレイミド結合BSAに対しおおよそ50倍モル量を混合する。すなわち、ポリペプチドに対しマレイミド結合BSAを混合し、4、20時間インキュベートし、BSA-ポリペプチド複合体を調製する。得られるBSA-ポリペプチド複合体を0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.0で希釈した後、150μLずつに分注して-30で凍結保存する。

(d) 抗体産生細胞の調製

前記(c)で調製したBSA-ポリペプチド複合体を完全フロインドアジュバントと共に6週令Balb/c雌マウスに腹腔内投与し、初回免疫した。おおよそ18日目に0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.5に溶解したBSA-ポリペプチド複合体を初回免疫したマウスに腹腔内投与し、追加免疫する。さらにおおよそ52日目に0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.5に溶解したBSA-ポリペプチド複合体を静脈内投与し、最終免疫とする。その4日後に脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液を調製する。

(e) 細胞融合

細胞融合には、以下の材料および方法を用いる。RPMI-1640培地：RPMI-1640 (Flow Lab.)に重炭酸ナトリウム(24mM)、ピルビン酸ナトリウム(1mM)、ペニシリンGカリウム(50U/ml)、硫酸アミカシン(100μg/ml)を加え、ドライアイスでpHを7.2にし、0.2μm東洋メンブレンフィルターで除菌ろ過する。NS-1培地：上記RPMI-1640培地に除菌ろ過したウシ胎児血清(FCS, M.A. Bioproducts)を15%(v/v)の濃度になるように加える。PEG-4000溶液：RPMI-1640培地にポリエチレングリコール-4000 (PEG-4000, Merck & Co.)を50%(w/w)になるように加えた無血清培地を調製する。

8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞SP2 (SP2/0-Ag14)との融合は、Selected Method in culture immunology p351~372 (ed. B.B. Mishell and S.N. Shiegi), W.H. Freeman and Company (1980)に記載のOiraの方法を若干改変して行う。

前記(d)で調製した有核脾細胞(生細胞率100%)とミエローマ細胞(生細胞率100%)とをおおよそ5:1~10:1の比率で以下の手順で融合する。ポリペプチド免疫脾細胞懸濁液とミエローマ細胞をそれぞれRPMI 1640培地で洗浄する。次に同じ培地に懸濁し、融合させるために有核脾細胞とミエローマ細胞を混合する。すなわち、おおよそ 4.0×10^8 個の有核脾細胞に対しおおよそ 8.0×10^7 個のミエローマ細胞を混合する。

次に、それぞれの細胞混合液を遠心分離により細胞を沈殿させ、上清を完全に吸引除去する。沈殿した細胞に37に加温した50%PEG-4000含有RPMI-1640培地(ミエローマ細胞がおおよそ 3×10^7 個/mlとなるよう体積を決定する)を滴下し、攪拌し、細胞を再懸濁、分散させる。次に添加した50%PEG-4000含有RPMI-1640培地の2倍体積の37に加温したRPMI-1640培地を滴下する。さらに添加した50%PEG-4000含有RPMI-1640培地の7倍体積のRPMI-1640培地を常に攪拌しながら滴下し、細胞を分散させる。これを遠心分離し、上清を完全に吸引除去する。次に、ミエローマ細胞がおおよそ 3×10^6 個/mlとなるように37に加温したNS-1培地を沈殿した細胞に速やかに加え、大きい細胞塊を注意深くピペティングで分散する。さらに同培地を加えて希釈し、ポリスチレン製96穴マイクロウエルにウエル当りミエローマ細胞がおおよそ 6.0×10^5 個となるように接種する。それぞれの細胞を加えた上記マイクロウエルを7%炭酸ガス/93%空気中で温度37、湿度100%で培養する。

(f) 選択培地によるハイブリドーマの選択的増殖

(1) 使用した培地は以下の通りである。

HAT培地：前記(e)項で述べたNS-1培地に更にヒポキサンチン(100 μM)、アミノプテリン(0.4 μM)およびチミジン(16 μM)を加える。HT培地：アミノプテリンを除去した以外は上記HAT培地と同一組成のものである。

(2) 前記(e)項の培養開始後翌日(1日目)、細胞にパスツールピペットでHAT培地2滴(約0.1 ml)を加える。2、3、5、8日目に培地の半分(約0.1 ml)を新しいHAT培地で置き換え、10日目に培地の半分以上を新しいHT培地で置き換える。ハイブリドーマの生育が肉眼にて認められた全ウエルについて固相-抗体結合テスト法(ELISA)により陽性ウエルを調べる。まず、20 mM炭酸緩衝液(pH 9.6)で希釈した抗原ポリペプチドでポリスチレン製96穴プレートをコート(100 ng/ウエル)し、次に0.05% Tween 20含有PBSを用いて洗浄して未吸着のペプチドを除く。各ウエルにハイブリドーマの生育が確認されたウエルの培養上清0.1 mlを添加し、室温で約1時間静置する。洗浄後、2次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン(Cappel)を加え、さらに室温で約1時間静置する。洗浄後、基質である過酸化水素と3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を加え発色させる。各ウエルに2 N硫酸を加え発色反応を停止し、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機(MRP-A4、東ソー)を用いて492 nmの吸光度で測定する。

10

(g) ハイブリドーマのクローニング

上記(f)項で得られた抗原ペプチドに対する陽性ウエル中のハイブリドーマを、限界希釈法を用いてモノクローン化する。すなわち、NS-1培地1 ml当りフィーダーとしておおよそ 10^7 個のマウス胸腺細胞を含むクローニング培地を調製し、96穴マイクロウエルにハイブリドーマをウエル当り5個、1個、0.5個になるように希釈し、それぞれ36穴、36穴、24穴に加える。5日目、12日目に全ウエルに約0.1 mlのNS-1培地を追加する。クローニング開始後肉眼的に十分なハイブリドーマの生育を認めたもの、コロニー形成陰性ウエルが50%以上である群について(f)項に記載したELISAを行う。調べた全ウエルが陽性でない場合、抗体陽性ウエル中のコロニー数が1個のウエルを4~6個選択し、再クローニングを行う。最終的にそれぞれのポリペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。

20

(h) モノクローナル抗体のクラス、サブクラスの決定

30

前述したELISAに従い、それぞれのポリペプチドをコートしたポリスチレン製96穴プレートの、前記(g)項で得られたハイブリドーマの上清を加える。次にPBSで洗浄後、アイソタイプ特異的ウサギ抗マウスIgG抗体(Zymed Lab.)を加える。PBSにより洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG(H+L)を加え、基質として過酸化水素および2,2'-アジノ-ジ(3-エチルベンゾチアゾリン酸)を用いてクラス、サブクラスを決定する。

(i) ハイブリドーマの培養とモノクローナル抗体の精製

得られたハイブリドーマ細胞をNS-1培地で培養し、その上清からモノクローナル抗体を得ることができる。また、得られたハイブリドーマ 10^7 個を予め1週間前にプリスタン腹腔内投与したマウス(Balb/c系、雌、6週齢)に同じく腹腔内投与し、1~2週間後、腹水中からも4~7 mg/mlのモノクローナル抗体を含む腹水を得ることができる。得られた腹水を40%飽和硫酸アンモニウムで塩析後、IgGクラスの抗体をプロテインAアフィゲル(Bio-Rad)に吸着させ、0.1 Mクエン酸緩衝液、pH 5.0で溶出することにより精製する。

40

実施例6：サンドイッチEIA

下記の方法に従えば、実施例5で調製した抗N-Tes抗体から適当な2種の抗体の組み合わせによってヒトN-Tesを特異的に検出・測定するサンドイッチEIA系が構成できる。EIA系は1ステップ法、2ステップ法のいずれも可能であり、標識抗体はFab'-HRPに限定されない。各反応緩衝液の組成や反応条件は測定の目的に応じて、短縮、延長など調整できる。また、標準品となるヒトN-Tesは、組織培養上清、細胞培養

50

上清または実施例2記載あるいはそれ以外の方法で発現した組換え体から精製することができる。精製にはイオン交換、ゲルろ過、抗ヒトN-Tesモノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーまたそれ以外の各種アフィニティークロマトグラフィーの組み合わせによって達成される。

(a) 標識抗体の調製

抗ヒトN-Tesモノクローナル抗体を0.1M NaClを含む0.1M酢酸緩衝液、pH4.2に抗体量の2%(W/W)のペプシンを加え、37、24時間消化する。消化物に3M Tris-HCl、pH7.5を添加し、反応を停止する。0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0で平衡化したウルトロゲルAcA54カラムによるゲルろ過でF(ab')₂画分を分取する。このF(ab')₂画分に最終濃度0.01Mとなるようにシステアミン塩酸塩を添加し、37、1.5時間還元し、5mM EDTA含有0.1Mリン酸緩衝液、pH6.0で平衡化したウルトロゲルAcA54カラムによるゲルろ過でFab'画分を分取する。

10

上記の操作とは別にHRPを0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0に溶解、HRPの25倍モル量のEMCSをDMF溶液として加え、30、30分間反応させる。これを0.1Mリン酸緩衝液、pH6.0で平衡化したNICK-5カラム(Pharmacia)でゲルろ過しマレイミド標識HRP画分を分取する。

Fab'画分とマレイミド標識HRPを等モルとなるように両画分を混合し4、20時間反応させた後、Fab'の10倍モル量のN-エチルマレイミドで未反応のチオール基をブロックする。これを0.1Mリン酸緩衝液、pH6.5で平衡化したウルトロゲルAcA54カラムでゲルろ過し、Fab'-HRP標識抗体を分取する。これに0.1%BSAおよび0.001%クロルヘキシジン添加して4で保存する。

20

(b) モノクローナル抗体結合担体の調製

抗ヒトN-Tesモノクローナル抗体を0.1Mリン酸緩衝液、pH7.5に溶解し、50μg/mLの濃度に調製する。このモノクローナル抗体溶液を96穴マイクロプレートにウエルあたり100μLずつ加え、4、18時間静置する。モノクローナル抗体溶液を除去し、生理食塩液で1回、0.05%Tween20, 0.1M NaCl, 5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0で3回洗浄後、1%BSA, 0.1M NaCl, 5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0を加えブロッキングする。

30

(c) 1ステップサンドイッチEIA法

精製したヒトN-Tes画分を標準抗原としてヒトN-Tes定量用標準曲線を作成する。1%BSA, 0.05%Brij35, 0.05%Tween20, 0.1M NaCl, 5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0で段階希釈した標準ヒトN-Tesを60μLずつ分注、それぞれに1%BSA, 0.05%Brij35, 0.05%Tween20, 0.1M NaCl, 5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0で100ng/50μLに調製した標識抗体Fab'-HRPを60μLずつ添加し十分混和する。調製した抗体結合マイクロプレートを0.05%Tween20, 0.1M NaCl, 5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0で3回洗浄し、標準抗原と標識抗体混合液を100μL/ウエルずつ添加する。室温で1時間反応した後0.05%Tween20, 0.1M NaCl, 5mM CaCl₂含有Tris-HCl緩衝液、pH8.0で3回洗浄する。次に、6%ジメチルホルムアミド、0.005%過酸化水素含有0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)に溶解した0.01%3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(U)をウエルあたり100μL添加し、室温で20分間反応後、2N硫酸を100μL添加し反応を停止する。この反応混液の450nmをマイクロプレートリーダーを用いて測定し、標準曲線を求める。

40

測定検体は、ヒト血清、脊髄液、血漿、関節液、尿および唾液などヒトに由来する体液成分、各種ヒト組織の抽出液、ヒト由来あるいは組換え体など各種培養細胞の細胞抽出液、培養上清などから調製される。それぞれの測定検体は、標準ヒトN-Tesにかえて上記の1ステップサンドイッチEIAに供し、標準ヒトN-Tesと同時に反応を進行させる

50

。測定検体から得られた標準曲線にあてはめ、測定検体に含まれるヒトN - T e s の量を算出する。

実施例7：N - T e s のクローニング

(1) 一次スクリーニング

発現ベクターpEKA8で構築されたヒト胎児腎臓由来cDNA発現ライブラリーの30クローンの大腸菌を1プールとしてMMI培地(1M Tris-HCl, 1.25% tryptone, 2.5% yeast extract, 125mM NaCl, 0.4% glycerol; pH7.2)にて37℃で16時間培養し、培養大腸菌2mlよりポリエチレングリコールを用いたアルカリ法(変法)にてプラスミドを精製した。

96穴マイクロプレートに1穴あたりおよそ50,000個の293T細胞を5%牛胎児血清を含むDMEMで播き(0.1mL/穴)、24時間培養した。MMP-9, MMP-2, MT1-MMPの全長cDNAをpSG5(Stratagene)のクローニングサイトに挿入した発現ベクターを作成し、1穴あたりプロMMP-9発現プラスミド3ng, プロMMP-2発現プラスミド20ng, MT1-MMP発現プラスミド30ngを上記ライブラリーDNA 100ngとともにTransIT-LT1遺伝子導入試薬(Mirus)にてトランスフェクションした。37℃で48時間培養後、培地を除き、細胞を1穴あたり50マイクロリットルのSDS-PAGEサンプルバッファー(50mM Tris-HCl pH6.8, 10% glycerol, 0.1% BPPB, 2% SDS)で懸濁し穏やかな超音波破碎にて可溶化した。37℃で30分加温後、5マイクロリットルをゼラチンザイモグラフィーに供し、潜在型、中間体、活性化型MMP-9、MMP-2を検出した。一次スクリーニングによりライブラリーより活性化型MMP-2の産生を抑制する遺伝子プラスミドの集団を特定した。

任意の12検体について、ゼラチンザイモグラフィーで解析したところ、すべてから92kDaのプロMMP-9, 68kDaのプロMMP-2および64kDaの活性型中間体MMP-2が認められた。しかしながら、検体9において、プロMMP-2の切断が抑制され、活性型中間体MMP-2が比較的少ないことが観察された。

(2) 二次スクリーニング

一次スクリーニングの検体9で用いた候補遺伝子プラスミドの集団を大腸菌XL-1Blue(Stratagene)に導入しアンピシリン含有LBプレート上で24時間培養した。大腸菌コロニー50個を1個ずつ分離し、MMI培地にて37℃で16時間培養し、培養大腸菌2mlよりプラスミドを精製した。前項記載の一次スクリーニングと同様にプロMMP-9, プロMMP-2, MT1-MMP発現プラスミドと精製プラスミドを293T細胞に導入し、ゼラチンザイモグラフィーにて潜在型、中間体、活性化型MMP-9、MMP-2を検出した。活性化型MMP-2の産生を抑制した単一プラスミドを同定した。

任意の12検体について、ゼラチンザイモグラフィーで解析したところ、検体3、5および6で64kDaの活性型中間体MMP-2が全く見られなかった。これらのレーンに用いたプラスミドは1.4kbの挿入配列を有しており、LI-COR DNAシーケンサーModel 4200L(S)-2を使用して挿入されたDNAの塩基配列を決定した(Accession No. AB056866)。この配列において、最初の5'側の1038残基は、Testican 3塩基配列(Accession No. NM_016950)の311-319が欠損している以外ではTestican 3と同一であった。1039残基以降の配列はユニークであった。オープンリーディングフレームは108から1046残基で見出され、Testican 3のN-末端断片に相当する313アミノ酸残基をコードしていた。ただし、Testican 3の64から66残基部分を欠き、またC-末端に変化が見られた。この遺伝子が、Testican 3のN-末端側をコードするものであったことから、N-Tesと命名した。N-Tesの3'部分とTestican 3のcDNA塩基配列が、第4染色体ゲノムデータベース(BAC clone RP11-440L30, Accession No. AC020599)上に見出されたことからN-TesはTestican 3のスプライシングバリ

アントと考えられる。

N - Tes の N - 末端側 21 アミノ酸残基は、疎水性のシグナルペプチド、22 - 85 アミノ酸残基は、Testican 1、Testican 2 および Testican 3 以外では見られないユニークな配列であった。また、86 - 191 アミノ酸残基は、システインリッチな follistatin-like (FS) ドメイン、87 - 311 アミノ酸残基は、extracellular Ca^{2+} 結合 (EC) ドメインであった。Testican 3 は、C - 末端側に thyroglobulin (TY) 様ドメインと 2ヶ所の糖鎖修飾部位を持つ。

実施例 8：組換え Testican 1, Testican 2, Testican 3 および BM - 40 のクローニング

10

C - 末端側に FLAG エピトープを付加した Testican 1, Testican 2, Testican 3 および BM - 40 を発現するプラスミドを以下の様にして作製した。マルチクローニングサイトと FLAG エピトープ (Asp - Tyr - Lys - Asp - Asp - Asp - Asp - Lys [配列番号：12]) をコードした DNA 断片を pFLAG - CTC plasmid (IBI FLAG Biosystems, NY) からプライマー N26 と C24 (IBI FLAG Biosystems, NY) による PCR で調製した。この断片を HindIII と BglII で切断した pSG5 (Clontech) クローニングサイトに挿入し pSG - FLAG と称するプラスミドを作製した。cDNA は、ヒトあるいはマウス胎盤由来の total RNA より 8mer ランダムプライマーと ReverTra Ace reverse transcriptase (TOYOBO, Japan) で合成した。ヒト Testican 1、ヒト Testican 2、ヒト Testican 3 および マウス BM - 40 に対するプライマーを GeneBankTM accession numbers: CAA51999、CAA04774、NM_016950 および NM_009242 に記載の配列に基づいて作製した。

20

Testican 1-5' : GCAGATCTAGCTCGAGCAACTCGGACTAG [配列番号：13]

Testican 1-3' : GGAGATCTCCATATGTACCCGACCTCATC [配列番号：14]

Testican 2-5' : CAGGTCGAATTCAGACCACGATGCG [配列番号：15]

Testican 2-3' : GGAGATCTCCAGATGTAGCCCCGTCGTC [配列番号：16]

30

Testican 3-5' : AAAGCAGCGAGTTGGCAGAG [配列番号：17]

Testican 3-3' : CATGAATTCAATGTATACATCATGGTC [配列番号：18]

BM-40-5' : GACGGATCCCAGCATCATGAGGGC [配列番号：19]

BM-40-3' : GCAGGATCCGTGAACCTTAGATCAC [配列番号：20]

PCR にて増幅した各 cDNA 断片は、プライマー中の BamHI あるいは BglII サイトで切断し、pSG - FLAG の BglII サイトに挿入した。Testican 3 cDNA は、pSG - FLAG の SmaI および BglII サイトに挿入した。各 cDNA 断片は、LI - COR DNA シークエンサーでその塩基配列を確認した。それぞれの発現ベクターを pSG - Testican 1 - FLAG, pSG - Testican 2 - FLAG, pSG - Testican 3 - FLAG および pSG - BM - 40 - FLAG と称した。

40

pSG - N - Tes - FLAG と pSG - Testican 3 - FLAG を 293T 細胞に導入し、N - Tes と Testican 3 の分布を調べた。N - Tes と Testican 3 に付加した FLAG エピトープは、遺伝子導入した細胞のライゼートおよび培養上清に見出された。分子量はそれぞれ 37 kDa、60 kDa を示した。一方、Testican 3 - FLAG は、遺伝子導入した細胞の ECM から見出されたが、N - Tes - FLAG は検出されなかったことから、N - Tes は可溶性のタンパク質であると

50

判断された。

実施例 9：免疫沈降による N - T e s と M T 1 - M M P の結合

径 6 0 m m の培養ディッシュに 2 9 3 T 細胞を播き込み、1 μ g の p S G - N - T e s - F L A G および 3 μ g の p S G - M T 1 - M M P 発現プラスミドを導入し、4 8 時間後に 1 0 0 μ C i / m l の P r o - m i x L - (³⁵ S) i n v i t r o c e l l l a b e l i n g m i x (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) で 4 時間、標識した。細胞は、R I P A 緩衝液 (1 5 0 m M N a C l , 5 m M E D T A , 1 % T r i t o n - X 1 0 0 , 0 . 1 % S D S 含有 1 0 m M T r i s - H C l b u f f e r , p H 7 . 4) で溶解し、1 5 , 0 0 0 r p m 1 0 分間遠心して上清を得た。4 0 0 n g 抗 M T 1 - M M P 抗体 1 1 4 - 1 F 2 (第一ファインケミカル) あるいは抗 F L A G 抗体 M 2 (S i g m a) をこの上清に加え 4 で 1 6 時間インキュベートした。抗原 - 抗体の複合体は、2 0 μ L の P r o t e i n - G S e p h a r o s e 4 B (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) で回収し、1 2 % S D S - P A G E に供した。ゲルを乾燥し放射活性を B i o - i m a g e A n a l y z e r B A S 1 0 0 0 (F u j i F i l m) で検出した。

抗 M T 1 - M M P モノクローナル抗体は、M T 1 - M M P 遺伝子のみを導入した細胞から 5 0 k D a および 4 7 k D a の M T 1 - M M P を沈殿させた。N - T e s - F L A G と M T 1 - M M P 遺伝子を共導入した細胞から 3 7 k D a の N - T e s - F L A G が抗 M T 1 - M M P モノクローナル抗体によって M T 1 - M M P と共に沈殿したが、N - T e s - F L A G 遺伝子のみを導入した細胞から、この抗体によって N - T e s - F L A G は沈殿しなかった。

抗 F L A G 抗体は、N - T e s - F L A G 遺伝子を導入した細胞から 3 5 k D a の N - T e s - F L A G を沈殿させた。抗 F L A G 抗体は、M T 1 - M M P 遺伝子を導入した細胞から M T 1 - M M P を沈殿させなかったが、N - T e s - F L A G と M T 1 - M M P 遺伝子を共導入した細胞から M T 1 - M M P が共沈した。同様に、M T 3 - M M P もまた、N - T e s - F L A G と共沈が確認された。これらの結果から、M T 1 - M M P と M T 3 - M M P は、N - T e s - F L A G と安定な複合体を形成することが示された。

実施例 1 0：M T - M M P s の阻害活性を有する N - T e s ドメインの決定

(1) N - T e s 変異体の発現ベクターの作製

N - T e s の欠損変異体 8 5、9 7 および 1 2 2 の c D N A 断片を p E A K 8 の 5 ' プライマーと以下に記載したプライマーによる P C R で増幅した。

85-3' : TGAGATCTCTTAGCTGGATCTAAAGCCTG [配列番号: 21]

97-3' : TGAGATCTTCCTGCTTCTTTTCATCCTGTCTG [配列番号: 22]

得られた D N A 断片を B g l I I で切断し、p S G - F L A G に挿入した。

1 2 2 C / S 変異体 c D N A は、以下のプライマーによる連続的な P C R にて 4 ヶ所のシステイン残基をセリン残基に置換して作製した。下線は、変異を導入した塩基である。

C/S1-2: AAGGATCCAAGCTTAAAGATGAAAAGTAG [配列番号: 23]

C/S3: CGCCATAAAGTAAGCATTGCTCAAG [配列番号: 24]

C/S4: CAGACTGCAGTCAGCATTAGTCACC [配列番号: 25]

(2) N - T e s / T e s t i c a n 2 キメラの作製

N - T e s / T e s t i c a n 2 キメラ c D N A 断片を作製した。5 5 0 番から始まる T e s t i c a n 2 の C - 末端側 c D N A 断片を T e s t i c a n 2 - 3 ' プライマーおよび

AAGGATCCCTGCCAGAAGATGAAGTGCAGC [配列番号: 26]

を用いて増幅した。N - T e s c D N A の C - 末端側断片 (3 5 9 番 - 1 0 4 6 番) を B a m H I および B g l I I で切断除去し、増幅した断片を挿入した。

(3) T e s t i c a n 2 / N - T e s キメラの作製

Testican 2 / N - Tes キメラ cDNA 断片を作製した。Testican 2 の N - 末端側 cDNA (279 番 - 550 番) の cDNA 断片を Testican 2 - 5 ' プライマーおよび 550 番から始まる
 AGGGATCCTTGGTGGTATCCAGGGCTTCAT [配列番号: 27]

を用いて増幅した。増幅した断片は、N - Tes cDNA の N - 末端側 (1 番 - 550 番) と置換した。

(4) 結果

Testican 1 および Testican 3 の発現は、MT1 - MMP および MT3 - MMP によるプロ MMP - 2 活性化を阻害したが、Testican 2 および BM - 40 の発現では、阻害活性は認められなかった。N - Tes の MT1 - MMP および MT3 - MMP 阻害活性ドメインを決定するために欠損変異株を作製した。N - Tes の N - 末端側の 122 アミノ酸残基 (Δ122) は、野生型 N - Tes と同等のプロ MMP - 2 活性化阻害能を有していた。N - 末端側の 97、85 残基からなる欠損変異株 (Δ97、Δ85) は、野生型より低いレベルで MT1 - MMP および MT3 - MMP を阻害した。Δ122 の 4 つのシステイン残基をセリン残基に置換した変異体 (Δ122C / S) は、阻害活性を維持していた。しかしながら、N - Tes の 33 - 84 残基を欠損したものは、阻害活性を失った。

N - Tes のシグナルとユニークドメインを Testican 2 の FS、EC、TY および C - 末端ドメインから成るキメラ (N - Tes / Tes - 2) は、十分な阻害活性を示したが、Testican 2 のシグナルとユニークドメインで置き換えられた N - Tes (Tes - 2 / N - Tes) は、阻害活性を失った。これらのことから、N - Tes の N - 末端のユニークドメインが、MT1 - MMP および MT3 - MMP の阻害に必須であることが確認された。

実施例 11 : 半定量的 RT - PCR による N - Tes および Testican 3 mRNA の解析

(1) 臨床検体

ヒトグリオーマ組織は、10 人の患者より脳腫瘍除去手術に伴う正常脳組織と共に調製した。Total RNA 調製のため、検体は摘出後、液体窒素で急速冷凍し - 80 で保存した。また、組織検査のため 4 % パラホルムアルデヒド固定液で 18 から 24 時間 (4) で固定した。切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、検鏡した。脳腫瘍の分類は、Kleihues, P., Burger, P.C., Scheithauer, B.W., "Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System", Berlin, Springer - Verlag, 1993, pp11 - 20. 記載の判定基準で行った。すべての腫瘍組織に対して、切除前に化学療法、放射線治療は行われていない。

(2) 半定量的 RT - PCR による N - Tes および Testican 3 mRNA の解析

Nakada, M., Nakamura, H., Ikeda, E., Fujimoto, N., Yamashita, J., Sato, H., Seiki, M., and Okada, Y., "Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors.", Am J Pathol. 154: 417 - 28, 1999. 記載の方法に従って、半定量的 RT - PCR による N - Tes, Testican 3 および GAPDH の mRNA の解析を行った。プライマーは下記のものを用いた。

RT-N-Tes-5' :GAGTGGTGCTACTGCTTCCA [配列番号: 6]

RT-N-Tes-3' :GTGCTTCTTGGTGGCTCATA [配列番号: 7]

RT-Tes3-5' :TGCTATTGGACCAGTCAGAGCTC [配列番号: 28]

RT-Tes3-3' :TCCAACACTGCCATGACACTGTG [配列番号: 29]

(3) 結果

半定量的RT-PCRにより正常脳およびグリオーマ組織のN-TesおよびTestican 3のmRNA発現レベルを調べた。正常脳において、N-TesおよびTestican 3のいずれもが検出されたが、グリオーマ組織において低下が認められた。グリオーマ細胞株T98およびU87におけるN-Tes mRNA発現は正常脳と同等であったが、U251細胞では有為に低かった。一方、検出可能なレベルのTestican 3を発現するグリオーマ細胞株は存在しなかった。

図6に、NB(normal brain; 正常脳組織, n=18); LGA(Low-grade astrocytoma; 低度星細胞腫, n=9); AA(anaplastic astrocytoma; 未分化星細胞腫, n=8); GB(glioblastoma; グリア芽細胞腫, n=34); Meta(metastatic brain tumor; 脳へ転移した他臓器癌, n=9)及びGCL(glioma cell line; グリオーマ細胞株, n=4)のTestican 3とN-Tesの発現レベルを半定量的RT-PCRで解析した結果を示した。悪性度が高くなるにつれて、N-Tesの発現レベルの低下が認められた。

実施例12: N-TesあるいはTestican 3による癌の浸潤阻害

(1) 組換えTestican 3、N-TesおよびN-Tes-del発現細胞株の樹立

pSG-Testican 3-FLAG, pSG-N-Tes-FLAGおよびpSG-N-Tes-del-FLAGのそれぞれをXbaIで切断し、pSG5のearly SV40プロモーター、ラビットβ-グロブリンのイントロンII、T7バクテリオファージプロモーター、それぞれのcDNAおよびポリAデニレーションシグナルを含む断片を切り出し、予めXbaIで切断したpCEP4(Invitrogen)に挿入した。得られた発現ベクターをpCEP-Testican 3-FLAG、pCEP-N-Tes-FLAGおよびpCEP-N-Tes-del-FLAGと称した。

pCEP-Testican 3-FLAGおよびpCEP-N-Tes-FLAGをerbB2で癌化したMDCK細胞あるいはU251グリオーマ細胞に導入し、400μg/mLのハイグロマイシンB存在下で選択した。

(2) コラーゲンゲルにおける培養

I型コラーゲンゲル(Nitta Gelatin)を調製した。1mLのコラーゲンをゲル化した径35mmの培養ディッシュに3,000個のU251細胞を含む6μLのコラーゲンゲルを置き、さらに1mLのコラーゲンゲルでサンドイッチした。ゲルに2mLの培地を添加し、5日間培養した。MDCK-erbB2細胞の浸潤アッセイには、径35mmの培養ディッシュにおよそ3,000個の細胞を含むコラーゲンをゲル化し2mLの培地を添加し、7日間培養した。

(3) 結果

安定的にN-Tes-FLAGあるいはTestican 3-FLAG遺伝子を導入したU251で両遺伝子の発現を抗FLAG抗体によるウエスタンブロッティングで確認した。N-Tes-FLAGおよびTestican 3-FLAG融合タンパク質は、それぞれ37kDaおよび55kDaのバンドを示した。野生型U251, pCEP4, N-Tes-FLAGおよびTestican 3-FLAGを導入したU251のコラーゲンゲルに対する浸潤を比較した。N-Tes-FLAGあるいはTestican 3-FLAGの導入は、U251の浸潤能を明らかに低下させた。

MT1-MMPを発現し、コラーゲンゲル中で浸潤生育するerbB2で癌化したMDCK

K細胞(MDCK-erbB2)にN-Tes-FLAGあるいはTestican 3-FLAG発現プラスミドを導入し、導入後の性質を比較した。N-Tes-FLAGあるいはTestican 3-FLAG遺伝子の導入によって、形態学的変化は全く誘導されなかった。親細胞株あるいは空ベクター導入MDCK-erbB2細胞株は、コラーゲンゲル中で浸潤生育を示したが、注目すべきことに、N-Tes-FLAGあるいはTestican 3-FLAG遺伝子の導入後、浸潤生育能が低下した。

実施例13：組換えTestican 3、N-TesおよびN-Tes-delの精製

(1)組換えTestican 3、N-TesおよびN-Tes-delの発現系
pCEP-Testican 3-FLAG、pCEP-N-Tes-FLAGおよびpCEP-N-Tes-del-FLAGを293EBNA細胞に導入し、400μg/mLのハイグロマイシンB存在下で選択してTestican 3-FLAG、N-Tes-FLAGおよびN-Tes-del-FLAGを産生する細胞株を得た。 10

(2)組換えTestican 3、N-TesおよびN-Tes-delの発現
それぞれの発現株をローラーボトルに播き込み、10%FCS含有DMEMでコンフルエントまで培養した。培養液をFCS不含のDMEMに交換し2日間培養を継続した後、培養上清を回収した。培養上清0.5mLを濃縮し、抗FLAG抗体によるウエスタンブロッティングで発現を確認した。

(3)組換えTestican 3、N-TesおよびN-Tes-delの精製
培養上清を遠心し細胞残渣を除去した後、抗FLAG抗体アフィニティゲルに供し、精製した。抗FLAG抗体によるウエスタンブロッティングおよびCBB染色で発現と純度を検討した。 20

実施例14：ポリクローナル抗体の作製

(1)抗原ポリペプチドの調製

N-Tesのアミノ酸配列中より、N-Tesに特徴的な配列として次の配列を選択した。

CFQRQQGKR

(配列番号: 11)

このポリペプチドをFmoc-bop法で合成した。合成したペプチドは、逆相HPLCにより80~90%純度以上に精製した。

(2)ポリペプチドとBSAの複合体の調製 30

各ポリペプチドをペプチドN末端に付加したシステイン残基を介してウシ血清アルブミン(BSA)と結合させ、抗原コンジュゲートを調製した。

(3)ウサギ抗血清の調製

前項(2)で調製したBSA-ポリペプチドを完全フロイントアジュバントと共に日本白色種メス家兎2羽に皮下投与(0.15mg/羽)し、初回免疫した。これらのウサギに2週、4週、6週、8週、10週後に0.3mg/羽のBSA-ポリペプチド複合体を不完全フロイントアジュバントと共に内皮に追加免疫し、11週後に全採血を行なった。得られた血液を遠心分離し、抗BSA-ポリペプチド複合体ポリクローナル抗体を含むウサギ抗血清を得た。

免疫したBSA-ポリペプチド複合体を固相化した96穴プレートにてELISAを行い、全採血して得た抗血清の力価を測定して抗体の存在を確認した。 40

表1

希釈倍率	吸光度 (O.D)	
	免疫前採血	全採血
1,000	0.086	1.883
2,000	0.070	1.832
4,000	0.067	1.678
8,000	0.058	1.195
16,000	0.058	0.783
32,000	0.052	0.392
64,000	0.051	0.226
128,000	0.047	0.148

10

20

30

40

50

(4) ポリクローナル抗体の精製

前項(3)で得られたウサギ抗血清をそれぞれ40%飽和硫酸アンモニウムで塩析し、得られた沈殿を60mM NaCl含有40mM KH_2PO_4 - NaOH (pH8)で溶解後、同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephacel (Amersham Pharmacia Biotech)ゲルカラム(直径32mm、長さ35cm)に供した。素通り画分を50%飽和硫酸アンモニウムで塩析し、得られた沈殿を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で溶解、同緩衝液で透析しウサギポリクローナル抗体を得た。

実施例15: 抗N-Tesモノクローナル抗体の作製

(1) 免疫抗原の調製

N-TesのC-末端側にHisタグを付加した融合タンパク質を発現する発現ベクターpCTCN-TesHisを導入した大腸菌JM109を4mLの50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillinを含むLB培地に接種、37 $^{\circ}\text{C}$ で16時間培養し、1次カルチャーを調製した。これを400mLの50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillinを含むLB培地に再接種、37 $^{\circ}\text{C}$ でおよそ3時間、対数増殖期中期まで培養した。IPTG(最終濃度0.1mM)を添加し、さらに4時間培養を継続し、組換え融合タンパク質の発現を誘導した。培養液を直ちに氷冷し、遠心(5,000rpm、20min)で菌体を回収20mLの1mg/mL lysozyme含有20mM Tris-HCl(pH8.0)に懸濁し15分間、氷中に置いて細胞壁を破壊した。菌体懸濁液を氷冷下で超音波破碎(30秒、10回)、遠心(18,000rpm、10min)してinclusion bodyを回収した。Inclusion bodyを1mLの0.1M NaCl含有10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で再懸濁し洗浄、遠心(15,000rpm、10min)して沈殿を回収、これを1mLの8M urea, 0.1M NaCl含有10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した。

上記の組換え大腸菌(400mL培養)より調製した不溶性封入体を8M urea, 0.5M NaCl, 10mM imidazole含有50mMリン酸緩衝液(pH7.5)で可溶化し、 Ni^{++} Chelating Sepharoseゲルカラムに供した。洗浄後、8M urea, 0.5M NaCl, 0.5M imidazole含有50mMリン酸緩衝液(pH7.5)で溶出、得られた精製画分に1%SDS, 0.5%2-メルカプトエタノールを添加した。室温で30分間置いた後、2%DOCを添加してPBSで透析した。2日間、計7回の外液交換を行った。さらに組換えタンパク質画分をPBSで2.5mLに調製し、PBSで平衡化したPD-10にてバッファー交換した。精製画分より5 μL とり還元SDS-PAGEに供し、CBBにて染色し、タンパク質1.4mg、純度95%と見積もった。

(2) 抗体の作製と選択

▲1▼免疫は以下のスケジュール

免疫動物：6週齢 B a l b / C 雌、2匹

精製抗原：1 m g / m l N - T e s 0 . 1 M N a C l 含有 5 0 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 0)

初回免疫：4 5 . 5 μ g / 3 0 0 μ l / マウス (完全フロイントアジュバント) 腹腔内投与

追加免疫：2 0 日後 4 1 . 1 μ g / 1 8 5 μ l / マウス 腹腔内投与

最終免疫：5 5 日後 3 6 . 7 μ g / 2 2 0 μ l / マウス 静脈内投与

最終免疫の3日後 (5 8 日後) に細胞融合を行った。

▲ 2 ▼ スクリーニング (E L I S A 法によるハイブリドーマの検索)

E L I S A : 固相 1 0 0 n g / ウエルで免疫抗原をコート。

細胞融合の11日後にスクリーニングを実施。35株を選択。

▲ 3 ▼ クローニング (限界希釈)

限界希釈でクローニング、E L I S A で抗体産生ハイブリドーマを選択。9クローンを選択。

▲ 4 ▼ サブクラスアッセイ

9クローンについてサブクラスを決定した。

表2

クローンNo.	サブクラス
288- 9H3	γ 2b / κ
288-12H5	γ 2a / κ
288-14F8	γ 2b / κ
288-17B9	γ 2a / κ
288-21D11	γ 2a / κ
288-25D10	γ 2a / κ
288-27E11	μ / κ
288-28D11	γ 2a / κ
288-29B6	γ 1 / κ

▲ 5 ▼ イムノブロットティングによる選択

免疫抗原を12% SDS - P A G E で展開、ニトロセルロースメンブレンに転写、各ハイブリドーマ培養上清を1次抗体として添加、抗マウス I g (G + A + M) - H R P を2次抗体として使用、染色した。いずれの培養上清も免疫抗原と強く反応した。

実施例13に記載の p C E P - T e s t i c a n 3 - F L A G、p C E P - N - T e s - F L A G および p C E P - N - T e s - d e l - F L A G を導入した293EBNA細胞より調製した細胞抽出画分を12% SDS - P A G E で展開、ニトロセルロースメンブレンに転写、サブクラス毎に任意に選択した288-9H3 (γ 2b / κ)、288-12H5 (γ 2a / κ) および288-29B6 (γ 1 / κ) の各ハイブリドーマ培養上清を1次抗体として添加、抗マウス I g (G + A + M) - H R P を2次抗体として使用、染色した。いずれのクローンも組換え T e s t i c a n 3 - F L A G および N - T e s - F L A G と良く反応したが、検討した3種のクローンには N - T e s - d e l - F L A G と反応するものは含まれなかった。

実施例13に記載の p C E P - N - T e s - F L A G および p C E P - N - T e s - d e l - F L A G を導入した293EBNA細胞培養上清より精製した N - T e s - F L A G および N - T e s - d e l - F L A G を15% SDS - P A G E で展開、ニトロセルロースメンブレンに転写した。前項記載の各ハイブリドーマ培養上清を1次抗体として添加、抗マウス I g (G + A + M) - H R P を2次抗体として使用し染色した。いずれのクローンも組換え N - T e s - F L A G と反応することを確認した。また、検討した9種のクロー

10

20

30

40

50

ーンのうち288-21D11は、N-Tes-del-FLAGと反応した。

産業上の利用可能性

MT1-MMP及びMT3-MMPなどのMMPsに対して阻害作用を有するN-Tesは、癌の浸潤・転移、血管新生などを抑制に有効であると期待されるし、アミロイド前駆体分解抑制によるアルツハイマー病の進行抑制にも有効であると期待される。またそのN-Tesに対する抗体は、診断薬としても期待される。

本発明は、前述の説明及び実施例に特に記載した以外も、実行できることは明らかである。上述の教示に鑑みて、本発明の多くの改変及び変形が可能であり、従ってそれらも本件添付の請求の範囲の範囲内のものである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI FINE CHEMICAL CO., LTD.

<120> NOVEL PEPTIDES AND USE THEREOF

<130> FC-99PCT

<140>

<141>

<150> JP 2000-398817

<151> 2000-12-27

10

<160> 29

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1510

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ctcactcgag acggcggcgc gtgcagcagc tccagaaagc agcgagtgg cagagcaggg 60
ctgcatttcc agcaggagct gcgagcacag tgctggctca caacaagatg ctcaagggtg 120
cagccgtact gtgtgtgtgt gcagccgctt ggtgcagtca gtctctcgca gctgccgcgg 180
cgggtggctgc agccgggggg cggtcggacg gcggtaattt tctggatgat aaacaatggc 240
tcaccacaat ctctcagtat gacaaggaag tcggacagtg gaacaaattc cgagacgatg 300
attatttccg cacttggagt ccaggaaaac ccttcgatca ggcttttagat ccagctaagg 360
atccatgctt aaagatgaaa tgtagtcgcc ataaagtatg cattgctcaa gattctcaga 420
ctgcagtctg cattagtcac cggaggctta cacacaggat gaaagaagca ggagtagacc 480
ataggcagtg gaggggtccc atattatcca cctgcaagca gtgccagtg gtctatccca 540
gccctgtttg tggttcagat ggtcatacct actcttttca gtgcaaacta gaatatcagg 600
catgtgtctt aggaaaacag atctcagtca aatgtgaagg acattgcca tgctcttcag 660
ataagcccac cagtacaagc agaaatgta agagagcatg cagtacctg gagttcaggg 720
aagtggcaaa cagattgcgg gactggttca aggcccttca tgaaagtggg agtcaaaaca 780
agaagacaaa aacattgctg aggcctgaga gaagcagatt cgataccagc atcttgccaa 840
tttgcaagga ctcacttggc tggatgttta acagacttga tacaactat gacctgtat 900
tggaccagtc agagctcaga agcatttacc ttgataagaa tgaacagtgt accaaggcat 960
tcttcaattc ttgtgacaca tacaaggaca gtttaatatc taataatgag tgggtgctact 1020

20

30

40

gcttccagag acagcaaggt aaaagatgag acccttacag atgcaaatag ttgacctgca 1080
 tgtcaaatTT tacttatTTT ttaagaaaaat aaaacagtac actatgctca ttcattttgt 1140
 gtatgttttt gtaattcaag tgttgaataa aagagcaaata aagaagcatg ttgaacaaat 1200
 aactctgccca gagatacaac acatgctaaa taagatgaaa aatagtaatt aatattttgt 1260
 attaatgccca ctacattata gtttccatta tgagccacca agaagcacac agaaatatta 1320
 aggacttaga tactgaaagt aatcattaaa attaatttgc tatctgcttt gcccaaatg 1380
 taaaataaat ggatttttta tcactatact gtggagtttt aatgttctat tttgtgatct 1440
 tattaaatga gttgaatgaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1500
 aaaaaaaaaa 1510

10

<210> 2
 <211> 313
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Leu Lys Val Ser₅ Ala Val Leu Cys Val₁₀ Cys Ala Ala Ala Trp Cys
 1
 Ser Gln Ser Leu₂₀ Ala Ala Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Gly Gly Arg
 25 30
 Ser Asp Gly Gly Asn Phe Leu Asp₄₀ Asp Lys Gln Trp Leu₄₅ Thr Thr Ile
 35 40 45
 Ser Gln Tyr Asp Lys Glu Val₅₅ Gly Gln Trp Asn Lys₆₀ Phe Arg Asp Asp
 50 55 60
 Asp Tyr Phe Arg Thr Trp₇₀ Ser Pro Gly Lys Pro₇₅ Phe Asp Gln Ala Leu₈₀
 65 70 75 80
 Asp Pro Ala Lys Asp₈₅ Pro Cys Leu Lys Met₉₀ Lys Cys Ser Arg His Lys
 85 90 95
 Val Cys Ile Ala Gln Asp Ser Gln Thr₁₀₅ Ala Val Cys Ile Ser His Arg
 100 105 110
 Arg Leu Thr His Arg Met Lys Glu₁₂₀ Ala Gly Val Asp His Arg Gln Trp
 115 120 125
 Arg Gly Pro Ile Leu Ser Thr₁₃₅ Cys Lys Gln Cys Pro Val Val Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Pro Val Cys Gly Ser Asp Gly His Thr Tyr₁₅₅ Ser Phe Gln Cys Lys
 145 150 155 160
 Leu Glu Tyr Gln Ala Cys Val Leu Gly Lys₁₇₀ Gln Ile Ser Val Lys Cys
 165 170 175

20

30

40

Glu Gly His Cys Pro Cys Pro Ser Asp Lys Pro Thr Ser Thr Ser Arg
 180 185 190
 Asn Val Lys Arg Ala Cys Ser Asp Leu Glu Phe Arg Glu Val Ala Asn
 195 200 205
 Arg Leu Arg Asp Trp Phe Lys Ala Leu His Glu Ser Gly Ser Gln Asn
 210 215 220
 Lys Lys Thr Lys Thr Leu Leu Arg Pro Glu Arg Ser Arg Phe Asp Thr
 225 230 235 240
 Ser Ile Leu Pro Ile Cys Lys Asp Ser Leu Gly Trp Met Phe Asn Arg
 245 250 255
 Leu Asp Thr Asn Tyr Asp Leu Leu Leu Asp Gln Ser Glu Leu Arg Ser
 260 265 270
 Ile Tyr Leu Asp Lys Asn Glu Gln Cys Thr Lys Ala Phe Phe Asn Ser
 275 280 285
 Cys Asp Thr Tyr Lys Asp Ser Leu Ile Ser Asn Asn Glu Trp Cys Tyr
 290 295 300
 Cys Phe Gln Arg Gln Gln Gly Lys Arg
 305 310

10

20

<210> 3
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 3
 ggagatcttc ctgcttcttt catcctgtgt g

31

30

<210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 4
 taatacgact cactatagg

19

40

<210> 5
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
Fragment

<400> 5

Met Leu Lys Val Ser Ala Val Leu Cys Val Cys Ala Ala Ala Trp Cys
1 5 10 15Ser Gln Ser Leu Ala Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Gly Gly Arg
20 25 30Ser Asp Gly Gly Asn Phe Leu Asp Asp Lys Gln Trp Leu Thr Thr Ile
35 40 45

10

Ser Gln Tyr Asp Lys Glu Val Gly Gln Trp Asn Lys Phe Arg Asp Asp
50 55 60Asp Tyr Phe Arg Thr Trp Ser Pro Gly Lys Pro Phe Asp Gln Ala Leu
65 70 75 80Asp Pro Ala Lys Asp Pro Cys Leu Lys Met Lys Cys Ser Arg His Lys
85 90 95Val Cys Ile Ala Gln Asp Ser Gln Thr Ala Val Cys Ile Ser His Arg
100 105 110Arg Leu Thr His Arg Met Lys Glu Ala Gly Arg Ser Val Asp Tyr Lys
115 120 125

20

Asp Asp Asp Asp Lys
130

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to act as a primer for PCR

30

<400> 6

gagtggtgct actgcttcca

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to act as a primer for PCR

40

<400> 7

gtgcttcitg gtggctcata

20

<210> 8
 <211> 1510
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (108)..(1049)

<400> 8

ctcactcgag acggcggcgc gtgcagcagc tccagaaagc agcgagttgg cagagcaggg 60

ctgcatttcc agcaggagct gcgagcacag tgctggctca caacaag atg ctc aag 116
 Met Leu Lys
 1

10

gtg tca gcc gta ctg tgt gtg tgt gca gcc gct tgg tgc agt cag tct 164
 Val Ser Ala Val Leu Cys Val Cys Ala Ala Ala Trp Cys Ser Gln Ser
 5 10 15

ctc gca gct gcc gcg gcg gtg gct gca gcc ggg ggg cgg tgc gac ggc 212
 Leu Ala Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Gly Gly Arg Ser Asp Gly
 20 25 30 35

ggg aat ttt ctg gat gat aaa caa tgg ctc acc aca atc tct cag tat 260
 Gly Asn Phe Leu Asp Asp Lys Gln Trp Leu Thr Thr Ile Ser Gln Tyr
 40 45 50

20

gac aag gaa gtc gga cag tgg aac aaa ttc cga gac gat gat tat ttc 308
 Asp Lys Glu Val Gly Gln Trp Asn Lys Phe Arg Asp Asp Asp Tyr Phe
 55 60 65

cgc act tgg agt cca gga aaa ccc ttc gat cag gct tta gat cca gct 356
 Arg Thr Trp Ser Pro Gly Lys Pro Phe Asp Gln Ala Leu Asp Pro Ala
 70 75 80

aag gat cca tgc tta aag atg aaa tgt agt cgc cat aaa gta tgc att 404
 Lys Asp Pro Cys Leu Lys Met Lys Cys Ser Arg His Lys Val Cys Ile
 85 90 95

30

gct caa gat tct cag act gca gtc tgc att agt cac cgg agg ctt aca 452
 Ala Gln Asp Ser Gln Thr Ala Val Cys Ile Ser His Arg Arg Leu Thr
 100 105 110 115

cac agg atg aaa gaa gca gga gta gac cat agg cag tgg agg ggt ccc 500
 His Arg Met Lys Glu Ala Gly Val Asp His Arg Gln Trp Arg Gly Pro
 120 125 130

ata tta tcc acc tgc aag cag tgc cca gtg gtc tat ccc agc cct gtt 548
 Ile Leu Ser Thr Cys Lys Gln Cys Pro Val Val Tyr Pro Ser Pro Val
 135 140 145

tgt ggt tca gat ggt cat acc tac tct ttt cag tgc aaa cta gaa tat 596
 Cys Gly Ser Asp Gly His Thr Tyr Ser Phe Gln Cys Lys Leu Glu Tyr
 150 155 160

40

cag gca tgt gtc tta gga aaa cag atc tca gtc aaa tgt gaa gga cat 644
 Gln Ala Cys Val Leu Gly Lys Gln Ile Ser Val Lys Cys Glu Gly His
 165 170 175

tgc cca tgt cct tca gat aag ccc acc agt aca agc aga aat gtt aag 692
 Cys Pro Cys Pro Ser Asp Lys Pro Thr Ser Thr Ser Arg Asn Val Lys
 180 185 190 195

aga gca tgc agt gac ctg gag ttc agg gaa gtg gca aac aga ttg cgg 740
 Arg Ala Cys Ser Asp Leu Glu Phe Arg Glu Val Ala Asn Arg Leu Arg
 200 205 210

gac tgg ttc aag gcc ctt cat gaa agt gga agt caa aac aag aag aca 788
 Asp Trp Phe Lys Ala Leu His Glu Ser Gly Ser Gln Asn Lys Lys Thr
 215 220 225

aaa aca ttg ctg agg cct gag aga agc aga ttc gat acc agc atc ttg 836
 Lys Thr Leu Leu Arg Pro Glu Arg Ser Arg Phe Asp Thr Ser Ile Leu
 230 235 240

cca att tgc aag gac tca ctt ggc tgg atg ttt aac aga ctt gat aca 884
 Pro Ile Cys Lys Asp Ser Leu Gly Trp Met Phe Asn Arg Leu Asp Thr
 245 250 255

aac tat gac ctg cta ttg gac cag tca gag ctg aga agc att tac ctt 932
 Asn Tyr Asp Leu Leu Leu Asp Gln Ser Glu Leu Arg Ser Ile Tyr Leu
 260 265 270

gat aag aat gaa cag tgt acc aag gca ttc ttc aat tct tgt gac aca 980
 Asp Lys Asn Glu Gln Cys Thr Lys Ala Phe Phe Asn Ser Cys Asp Thr
 280 285 290

tac aag gac agt tta ata tct aat aat gag tgg tgc tac tgc ttc cag 1028
 Tyr Lys Asp Ser Leu Ile Ser Asn Asn Glu Trp Cys Tyr Cys Phe Gln
 295 300 305

aga cag caa ggt aaa aga tga gacccttaca gatgcaaata gttgacctgc 1079
 Arg Gln Gln Gly Lys Arg
 310

atgtcaaatt ttacttattt ttttaagaaaa taaaacagta cactatgctc attcatittg 1139
 tgtatgtttt tgtaattcaa gtgttgaata aaagagcaaa taagaagcat gttgaacaaa 1199
 taactctgcc agagatacaa cacatgctaa ataagatgaa aaatagtaat taatattttg 1259
 tattaatgcc actacattat agtttccatt atgagccacc aagaagcaca cagaaatatt 1319
 aaggacttag atactgaaag taatcattaa aattaatitg ctatctgctt tgcccacaat 1379
 gtaaaataaa tggatttttt atcactatac tgtggagttt taatgttcta ttttgtgatc 1439
 ttattaaatg agttgaatga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1499
 aaaaaaaaaa a 1510

10

20

30

40

<211> 313
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Met	Leu	Lys	Val	Ser	Ala	Val	Leu	Cys	Val	Cys	Ala	Ala	Ala	Trp	Cys	
1				5					10					15		
Ser	Gln	Ser	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Arg	
			20					25					30			
Ser	Asp	Gly	Gly	Asn	Phe	Leu	Asp	Asp	Lys	Gln	Trp	Leu	Thr	Thr	Ile	
		35					40					45				
Ser	Gln	Tyr	Asp	Lys	Glu	Val	Gly	Gln	Trp	Asn	Lys	Phe	Arg	Asp	Asp	
	50					55					60					
Asp	Tyr	Phe	Arg	Thr	Trp	Ser	Pro	Gly	Lys	Pro	Phe	Asp	Gln	Ala	Leu	
65					70					75					80	
Asp	Pro	Ala	Lys	Asp	Pro	Cys	Leu	Lys	Met	Lys	Cys	Ser	Arg	His	Lys	
				85					90					95		
Val	Cys	Ile	Ala	Gln	Asp	Ser	Gln	Thr	Ala	Val	Cys	Ile	Ser	His	Arg	
			100					105					110			
Arg	Leu	Thr	His	Arg	Met	Lys	Glu	Ala	Gly	Val	Asp	His	Arg	Gln	Trp	
		115					120					125				
Arg	Gly	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Cys	Lys	Gln	Cys	Pro	Val	Val	Tyr	Pro	
	130					135					140					
Ser	Pro	Val	Cys	Gly	Ser	Asp	Gly	His	Thr	Tyr	Ser	Phe	Gln	Cys	Lys	
145					150					155					160	
Leu	Glu	Tyr	Gln	Ala	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Gln	Ile	Ser	Val	Lys	Cys	
			165						170					175		
Glu	Gly	His	Cys	Pro	Cys	Pro	Ser	Asp	Lys	Pro	Thr	Ser	Thr	Ser	Arg	
			180					185					190			
Asn	Val	Lys	Arg	Ala	Cys	Ser	Asp	Leu	Glu	Phe	Arg	Glu	Val	Ala	Asn	
		195					200					205				
Arg	Leu	Arg	Asp	Trp	Phe	Lys	Ala	Leu	His	Glu	Ser	Gly	Ser	Gln	Asn	
	210					215					220					
Lys	Lys	Thr	Lys	Thr	Leu	Leu	Arg	Pro	Glu	Arg	Ser	Arg	Phe	Asp	Thr	
225					230					235					240	
Ser	Ile	Leu	Pro	Ile	Cys	Lys	Asp	Ser	Leu	Gly	Trp	Met	Phe	Asn	Arg	
				245					250					255		
Leu	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asp	Leu	Leu	Leu	Asp	Gln	Ser	Glu	Leu	Arg	Ser	
			260					265					270			
Ile	Tyr	Leu	Asp	Lys	Asn	Glu	Gln	Cys	Thr	Lys	Ala	Phe	Phe	Asn	Ser	
		275					280					285				

10

20

30

40

Cys Asp Thr Tyr Lys Asp Ser Leu Ile Ser Asn Asn Glu Trp Cys Tyr
 290 295 300

Cys Phe Gln Arg Gln Gln Gly Lys Arg
 305 310

<210> 10
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Designed
 peptide to act as an immunogen

10

<400> 10
 Gly Lys Arg
 1

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Designed
 peptide to act as an immunogen

<400> 11
 Cys Phe Gln Arg Gln Gln Gly Lys Arg
 1 5

<210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Aequorea victoria

30

<400> 12
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 13
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:
 Oligonucleotide to act as a primer for PCR

40

<400> 13
 gcagatctag ctogagcaac tcggactag

29

<210> 14
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 14
ggagatctcc atatgtaccc gacctcatc 29

10

<210> 15
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 15
caggtcgaat tcagaccacg atgcg 25

20

<210> 16
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 16
ggagatctcc agatgtagcc cccgtcgtc 29

30

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 17
aaagcagcga gttggcagag 20

40

<210> 18
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>		
<223>	Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR	
<400>	18 catgaattca atgtatacat catggtc	27
<210>	19	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	10
<220>		
<223>	Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR	
<400>	19 gagggatccc agcatcatga gggc	24
<210>	20	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	20
<220>		
<223>	Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR	
<400>	20 gcaggatccg tgaacttaga tcac	24
<210>	21	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	30
<220>		
<223>	Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR	
<400>	21 tgagatctct tagctggatc taaagcctg	29
<210>	22	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	40
<220>		
<223>	Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR	
<400>	22 tgagatcttc ctgcttcttt catcctgtgt g	31

<210> 23
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 23
aaggatccaa gcttaaagat gaaaagtag 29

<210> 24
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 24
cgccataaag taagcattgc tcaag 25

<210> 25
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 25
cagactgcag tcagcattag tcacc 25

<210> 26
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 26
aaggatccct gccagaagat gaagtgcagc 30

<210> 27
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10

20

30

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 27

agggatccctt ggtggtatcc agggttcat

30

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 28

tgctattgga ccagtcagag ctc

23

<210> 29

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400> 29

tccaacactg ccatgacact gtg

23

【図面の簡単な説明】

図 1 は、MMP - 9、MMP - 2、MT1 - MMP 発現プラスミドと試験検体プラスミドを 293T 細胞に導入し、ゼラチンザイモグラフィーにて潜在型、中間体、活性化型 MMP - 9、MMP - 2 を検出にかけた結果を示す。

30

図 2 は、Testican - 1、Testican - 2、Testican - 3 および HPTLG と、N - Tes とのアミノ酸配列に関するホモロジーを示す。

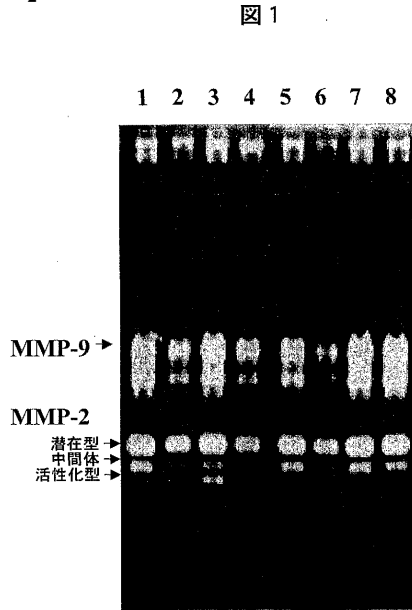
図 3 は、ゼラチンザイモグラフィー分析した、N - Tes - del - FLAG による MT1 - MMP、MT3 - MMP を介した MMP - 2 活性化抑制の結果を示す。

図 4 は、グリオーマにおける N - Tes 発現検索の結果を示す。

図 5 は、MT - MMP と N - Tes の結合性の調査結果を示す。

図 6 は、Testican 3 と N - Tes の発現レベルを半定量的 RT - PCR で解析した結果を示す。NB : 正常脳組織 ; LGA : 低度星細胞腫 ; AA : 未分化星細胞腫 ; GB : グリア芽細胞腫 ; Meta : 脳へ転移した他臓器癌及び GCL : グリオーマ細胞株

【 図 1 】



【 図 2 A 】



【 図 2 B 】

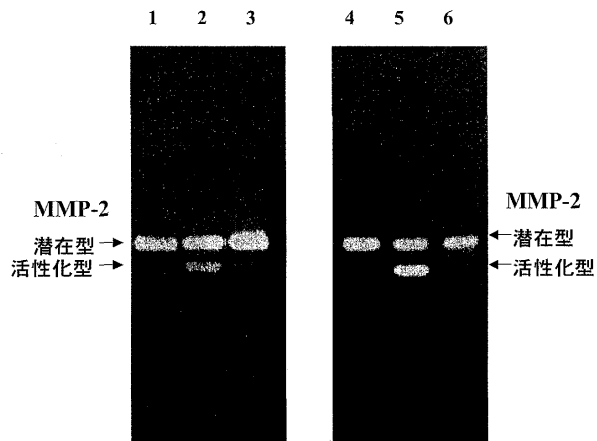


【 図 2 C 】



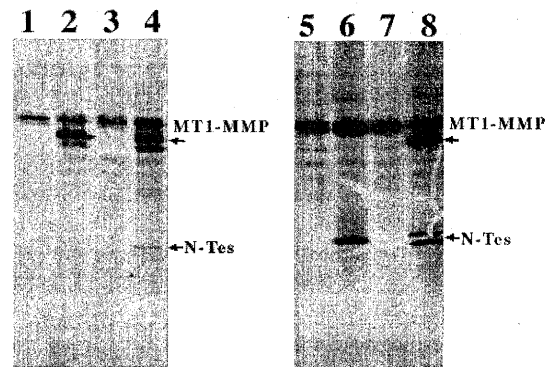
【 図 3 】

図 3



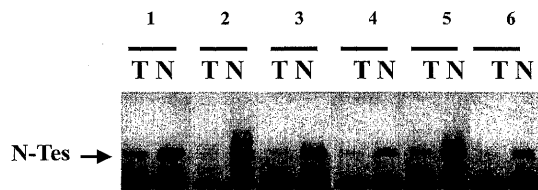
【 図 5 】

図 5

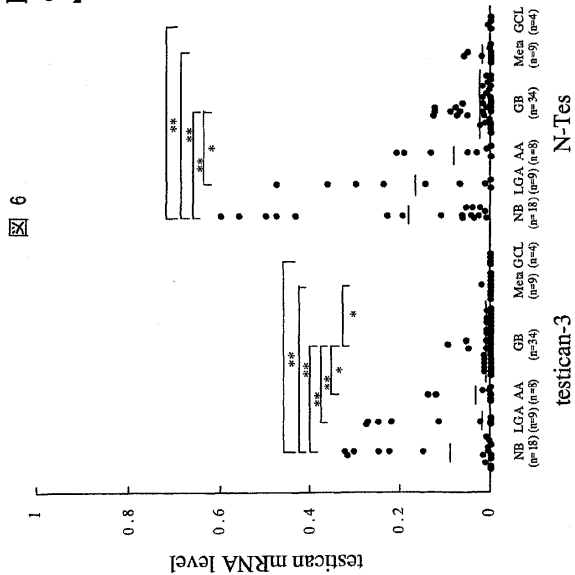


【 図 4 】

図 4



【 図 6 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP01/11529
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12N1/15, C12N1/19, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68		
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) Int.Cl ⁷ C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12N1/15, C12N1/19, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68		
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) SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/23110 A1 (Eli Lilly and Company), 14 May, 1999 (14.05.1999), & AU 9912882 A	3, 6, 8-12
X	WO 98/46757 A2 (Genetics Institute, Inc.), 22 October, 1998 (22.10.1998), & EP 977851 A2 & AU 9871424 A	3, 6, 8-12
X	WO 99/46281 A2 (Genentech, Inc.), 16 September, 1999 (16.09.1999), & US 5985842 A & AU 9930721 A & JP 11-352411 A	3, 6, 8-12
X	WO 00/53756 A2 (Genentech, Inc.), 14 September, 2000 (14.09.2000), (Family: none)	3, 6, 8-12
X	WO 00/32221 A2 (Genentech, Inc.), 08 June, 2000 (08.06.2000), (Family: none)	3, 6, 8-12
☒ 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 "B" earlier document 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 "I" 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 18 February, 2002 (18.02.02)		Date of mailing of the international search report 26 February, 2002 (26.02.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/11529

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAMANAKA, H. et al., "Expression and Tissue Localization of Membrane-Types 1,2, and 3 Matrix Metalloproteinases in Rheumatoid Synovium", Laboratory Investigation, May, 2000, Vol.80, No.5, pages 677 to 687	1-22
PX	NAKADA, M. et al., "Suppression of Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 Activation and Tumor Invasion by Testican 3 and Its Splicing Variant Gene Product, N-Tes", Cancer Research, 15 December, 2001 (15.12.2001), Vol.61, No.24, pages 8896 to 8902	1-22

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO1/11529	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12N1/15, C12N1/19, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68			
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 ⁷ C12N15/12, C12N5/10, C12N1/21, C12N1/15, C12N1/19, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68			
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			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)			
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 99/23110 A1 (ELI LILLY AND COMPANY), 1999.05.14, & AU 9912882 A	3, 6, 8-12	
X	WO 98/46757 A2 (GENETICS INSTITUTE, INC.), 1998.10.22, & EP 977851 A2 & AU 9871424 A	3, 6, 8-12	
X	WO 99/46281 A2 (GENENTECH, INC.), 1999.09.16, & US 5985842 A & AU 9930721 A & JP 11-352411 A	3, 6, 8-12	
☒ 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			
国際調査を完了した日 18.02.02		国際調査報告の発送日 26.02.02	
国際調査機関の名称及びあて先 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		特許庁審査官 (権限のある職員) 富永 みどり	
		4N	9152
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP01/11529
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
X	WO 00/53756 A2 (GENENTECH, INC.), 2000.09.14, (ファミリーなし)	3, 6, 8-12
X	WO 00/32221 A2 (GENENTECH, INC.), 2000.06.08, (ファミリーなし)	3, 6, 8-12
A	YAMANAKA H. et al., Expression and Tissue Localization of Membrane-Types 1, 2, and 3 Matrix Metalloproteinases in Rheumatoid Synovium, Laboratory Investigation, 2000 May, Vol. 80, No. 5, p. 677-687	1-22
PX	NAKADA M. et al., Suppression of Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 Activation and Tumor Invasion by Testican 3 and Its Splicing Variant Gene Product, N-Tes, Cancer Research, 2001.12.15, Vol. 61, No. 24, p. 8896-8902	1-22

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

F I

A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	新肽及其活性		
公开(公告)号	JPWO2002057448A1	公开(公告)日	2004-05-20
申请号	JP2002558500	申请日	2001-12-27
申请(专利权)人(译)	第一ファインケミカル株式会社		
[标]发明人	佐藤博 青木隆則		
发明人	佐藤 博 青木 隆則		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/00 A61P25/28 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/64 C12N15/12 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	A61P19/02 A61P19/10 A61P21/00 A61P25/28 A61P29/00 C12N9/6491		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/00 A61P25/28 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.B A61K37/02		
优先权	2000398817 2000-12-27 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

阐明参与MMP活性调节的基因，例如MT1-MMP和MT3-MMP，以及研究和开发参与MMP的各种生物活性和生理现象。N-Tes具有诸如缺乏糖胺聚糖附着位点的特征序列，具有抑制MT1-MMP，MT3-MMP等的活性的功能，并且对于有用药物的研究和开发是有用的。

【 图 6 】

