

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-512292

(P2006-512292A)

(43) 公表日 平成18年4月13日(2006.4.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 6 3
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 1
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-536597 (P2004-536597)
 (86) (22) 出願日 平成15年9月15日 (2003. 9. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年5月12日 (2005. 5. 12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/029281
 (87) 国際公開番号 W02004/024893
 (87) 国際公開日 平成16年3月25日 (2004. 3. 25)
 (31) 優先権主張番号 60/410, 846
 (32) 優先日 平成14年9月13日 (2002. 9. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500027932
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国 9 4 6 0 7 - 5 2 0 0
 カリフォルニア州 オークランド トウェ
 ルフス フロア フランクリン ストリー
 ト 1 1 1 1
 (74) 代理人 100090033
 弁理士 荒船 博司
 (74) 代理人 100093045
 弁理士 荒船 良男
 (74) 代理人 100079049
 弁理士 中島 淳
 (74) 代理人 100084995
 弁理士 加藤 和詳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N E L L - 1 による骨石灰化の増進

(57) 【要約】

【課題】 ヒトの N E L L - 1 遺伝子により、骨の石灰化を誘発する、あるいは、アップレギュレーションする。

【解決手段】 本発明が開示する N E L L - 1 遺伝子または遺伝子産物は、スクリーニングによって、骨石灰化のモジュレータを得るための簡便な標的を提供する。該 N E L L - 1 は、骨折の修復を促進する目的に、かつ (あるいは)、一般に骨密度を増大する目的に使用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

頭蓋冠の造骨細胞の分化および石灰化を制御する方法であって、前記方法が、N e l l - 1 の発現または活性を改変する工程であって、N e l l - 1 の発現または活性の増大は、造骨細胞の分化または石灰化を増進させ、かつ、N e l l - 1 の発現または活性の低下は、造骨細胞の分化または石灰化を低下させる工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

N e l l - 1 発現または活性が、抗 N e l l - 1 アンチセンス分子、N e l l - 1 特異的リボザイム、N e l l - 1 特異的触媒 D N A、N e l l - 1 特異的 R N A i、抗 N e l l - 1 細胞内発現抗体、および、特定の標的細胞及び/又は組織内の N e l l - 1 をノックアウトする遺伝子治療法からなるグループから選択された方法によって阻害されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

N e l l - 1 発現または活性が、N e l l - 1 を発現している外来の核酸を細胞に形質移入すること、および、N e l l - 1 蛋白質を細胞に形質移入することからなるグループから選択された方法によって増大されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 N e l l - 1 発現または活性が、異常な頭蓋縫合の発達を経験しつつある哺乳類において、阻害されることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記異常な頭蓋縫合の発達が、頭蓋骨癒合症 (C S) を含むことを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 6】

哺乳類における潜在性の T G F - 1 活性化を促進する方法であって、前記方法が、外来の N e l l - 1 を哺乳類に投与する工程、あるいは、前記哺乳類における内在性の N e l l - 1 の発現活性を増大させる工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 7】

哺乳類における T G F - スーパーファミリーのメンバーを活性化する、あるいは、隔離する方法であって、前記方法が、外来の N e l l - 1 を前記哺乳類に投与する工程、あるいは、前記哺乳類における内在性の N e l l - 1 の発現活性を増大させる工程を含むことを特徴とする方法。

30

【請求項 8】

スクリーニングによって、造骨細胞の分化を制御する作用剤を得る方法であって、前記方法が、

N E L L - 1 遺伝子を含む試験細胞と試験作用剤とを接触させる工程と、

コントロール細胞における、該 N E L L - 1 遺伝子の発現または N e l l - 1 の活性と比較された場合の、前記試験細胞における、N E L L - 1 遺伝子の発現レベルまたは N e l l - 1 の活性の変化を検出する工程であって、該試験細胞と該コントロール細胞内の、N E L L - 1 の発現レベルまたは N e l l - 1 の活性の差は、前記作用剤が、骨の石灰化を調整することを示す工程と、を含むことを特徴とする方法。

40

【請求項 9】

前記コントロールが、前記試験細胞より低い濃度で前記試験作用剤と接触させた、ネガティブコントロール細胞であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記より低い濃度が、前記試験作用剤の不在であることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記コントロールが、前記試験細胞より高い濃度で前記試験作用剤と接触させた、ポジティブコントロール細胞であることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

50

【請求項 12】

さらに、NE LL - 1 核酸または NE LL - 1 蛋白質の発現を改変する試験作用剤を、NE LL - 1 活性のモジュレーターの前記データベース内に、あるいは、骨の石灰化のモジュレーターの前記データベース内に、記録する工程を含むことを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

前記細胞内の NE LL - 1 mRNA のレベルを測定することによって、Ne ll - 1 の発現レベルが測定されることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

NE LL - 1 mRNA の前記レベルが、前記 mRNA を、NE LL - 1 核酸に特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせることによって測定されることを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

10

【請求項 15】

前記ハイブリッドさせる工程が、ノーザンブロット、Ne ll - 1 RNA から誘導された DNA を用いるサザンブロット、アレイハイブリダイゼーション、アフィニティークロマトグラフィー、および in situ ハイブリダイゼーションからなるグループから選択された方法によるものであることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記プローブが、プローブのアレイを形成する複数のプローブのメンバーであることを特徴とする請求項 15 に記載の方法。

20

【請求項 17】

NE LL - 1 mRNA の前記レベルが、核酸増幅反応を用いて測定されることを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 18】

NE LL - 1 の前記レベルが、前記生体試料内の NE LL - 1 蛋白質の発現レベルを測定することによって検出されることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 19】

前記検出する工程が、キャピラリー電気泳動、ウェスタンブロット、質量分析、ELISA、免疫クロマトグラフィー、および免疫組織化学からなる群から選択される方法を介して行われることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

30

【請求項 20】

前記細胞が生体外で培養されることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 21】

前記試験作用剤が抗体ではないことを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 22】

前記試験作用剤が蛋白質ではないことを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 23】

哺乳類の細胞内の Ne ll - 1 発現を改変する方法であって、前記方法が、Ms x 2 及び / 又は C b f a 1 の発現または活性を改変する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 24】

C b f a 1 発現または活性をアップレギュレーションして、Ne ll - 1 発現または活性をアップレギュレーションする工程を含むことを特徴とする請求項 23 に記載の方法。

40

【請求項 25】

Ms x 2 発現または活性をアップレギュレーションして、Ne ll - 1 発現または活性をダウンレギュレーションすることを特徴とする請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

スクリーニングによって、Ne ll - 1 発現または活性を調整する作用剤を得る方法であって、前記方法が、

C b f a 1 及び / 又は Ms x 2 遺伝子を含む試験細胞と試験作用剤とを接触させる工程と、

50

コントロール細胞における、C b f a 1 及び / 又は M s x 2 遺伝子の発現または C b f a 1 及び / 又は M s x 2 の活性と比較された場合の、前記試験細胞における、C b f a 1 及び / 又は M s x 2 遺伝子の発現レベルまたは C b f a 1 及び / 又は M s x 2 の活性の変化を検出する工程であって、該試験細胞と該コントロール細胞内の、C b f a 1 及び / 又は M s x 2 の発現レベルまたは C b f a 1 及び / 又は M s x 2 の活性の差は、前記作用剤が、N e l l - 1 発現または活性を調整することを示す工程と、を含むことを特徴とする方法。

【請求項 27】

前記コントロールが、前記試験細胞より低い濃度で前記試験作用剤と接触させた、ネガティブコントロール細胞であることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

10

【請求項 28】

前記より低い濃度が、前記試験作用剤の不在であることを特徴とする請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記コントロールが、前記試験細胞より高い濃度で前記試験作用剤と接触させた、ポジティブコントロール細胞であることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

さらに、C b f a 1 及び / 又は M s x 2 遺伝子の発現を、N E L L - 1 活性のモジュレーターのデータベース内に、あるいは、骨の石灰化のモジュレーターのデータベース内に、改変する試験作用剤を記録する工程を含むことを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

20

【請求項 31】

N e l l - 1 の発現レベルが、前記細胞内の C b f a 1 及び / 又は M s x 2 m R N A のレベルを測定することによって検出されることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 32】

C b f a 1 及び / 又は M s x 2 m R N A の前記レベルが、前記 m R N A を、C b f a 1 及び / 又は M s x 2 核酸に特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせることによって測定されることを特徴とする請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記ハイブリッドさせる工程が、ノーザンブロット、C b f a 1 及び / 又は M s x 2 R N A から誘導された D N A を用いるサザンブロット、アレイハイブリダイゼーション、アフィニティークロマトグラフィー、および in situ ハイブリダイゼーションからなるグループから選択された方法によるものであることを特徴とする請求項 32 に記載の方法。

30

【請求項 34】

前記プローブが、プローブのアレイを形成する複数のプローブのメンバーであることを特徴とする請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

C b f a 1 及び / 又は M s x 2 m R N A の前記レベルが、核酸増幅反応を用いて測定されることを特徴とする請求項 31 に記載の方法。

【請求項 36】

C b f a 1 及び / 又は M s x 2 の前記レベルが、前記生体試料内の C b f a 1 及び / 又は M s x 2 蛋白質の発現レベルを測定することによって検出されることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

40

【請求項 37】

前記検出する工程が、キャピラリー電気泳動、ウェスタンブロット、質量分析、E L I S A、免疫クロマトグラフィー、および免疫組織化学からなる群から選択される方法を介して行われることを特徴とする請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記細胞が生体外で培養されることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 39】

前記試験作用剤が抗体ではないことを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

50

【請求項 40】

前記試験作用剤が蛋白質ではないことを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 41】

薬学的な製剤形態であって、前記製剤形態が、

N e l l - 1 蛋白質をコード化する核酸、N e l l - 1 蛋白質、および N e l l - 1 蛋白質の発現または活性を改変する作用剤からなる群から選択される、一つまたはそれ以上の活性な作用剤と、

薬学的に受容できる賦形剤と、

を含むことを特徴とする薬学的な製剤形態。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、N E L L - 1 のアップレギュレーションが、骨の石灰化を増進するという発見に関する。詳細には、本発明は、スクリーニングによって骨の石灰化のモジュレーターを求めるための良好な標的を提供する N E L L - 1 を提供する。また本発明は、骨形態形成蛋白質に類似したやり方で、骨の修復を促進する目的で使用可能な N E L L - 1 蛋白質を提供する。

【背景技術】

【0002】

頭蓋縫合の早期閉鎖である頭蓋骨癒合症 (C S) は、乳児の 3 , 0 0 0 人に 1 人に顕れ、従って、最も一般的なヒトの先天性の頭蓋顔面奇形の一つである (非特許文献 1) 。頭蓋異形症をもたらす早期の縫合閉鎖の由来は家族性または散発性のいずれでもあり得る (非特許文献 1) 。どの乳児に該症状が顕れるかについての予想には、性別も民族性も使用できない。C S 関連の症候群の遺伝連鎖分析により、縫合形成の分子調節に関して新しい情報が豊富に提供されたものの、特に、非症候群性の非家族性 C S における局所的縫合閉鎖の生物学は、いまだ、大部分が未知である。

【0003】

現在、各種の家族性 C S 症候群をもたらす、85 を超えるヒト突然変異が、F G F 受容体遺伝子 F G F R 1、F G F R 2、および F G F R 3 に局在化されている。すべて、受容体活性の増大をもたらす「機能獲得性」突然変異である (非特許文献 1) 。F G F 配位子に結び付けられた C S 症候群はない；しかしながら、C S のいくつかの動物モデルが、F G F の過剰発現に関連付けられてきた (非特許文献 2、3) 。C S に関連した、唯一の記述された M S X 2 突然変異 (非特許文献 4) も、M S X 2 活性の増大をもたらしている (非特許文献 5 ~ 7) 。これら候補遺伝子は、造骨細胞の増殖および分化において重要な役割を果たすことが知られているが、それらは、胚形成中に、より全般的な役割も有している。従って、これら遺伝子に突然変異を有するトランスジェニックマウスモデルが、C S を有する患者の大半において観察されない頭蓋外の異常を、しばしば顕在化させることは、驚くべきことではない (非特許文献 1、2、8) 。

【0004】

ヒト C S における早期の縫合閉鎖は、二つの、可能性としては相異なるプロセス、すなわち、頭蓋冠の肥大と骨の癒合とに分けることができる。頭蓋冠の肥大は、二つの対向する骨形成前端を近接させて骨の癒合を誘発するのに不可欠であり得るが、必ずしも、頭蓋冠の肥大または重複が、単独で、骨の癒合をもたらすことにはならない。従って、早期の縫合閉鎖の機序の研究は、異常な縫合の肥大 / 重複と骨の癒合の両方の研究を含んでいなければならない (非特許文献 6) 。

【0005】

最近、C B F A 1 仲介の経路を介した早期の頭蓋縫合癒合において、F G F 2 および F G F R 1 の関係が見出された (非特許文献 8) 。C B F A 1 のミスセンス突然変異は、縫合閉鎖の遅滞として顕在化された鎖骨頭蓋骨形成不全症に、結び付けられている (非特許文献 9) 。従って、C S における信号伝達カスケードを理解するには、骨形成に不可欠な

10

20

30

40

50

Fgfr1の下流の標的であるCbfa1(Runx2)の検討が、鍵であると思われる。さらに、発生において多面発現効果を有する、高度に保存されたMsxホメオボックス遺伝子ファミリーのメンバーであるMsx2が、CSの動物モデルにおいて関係付けられた(非特許文献5、6)。具体的には、縫合癒合のない縫合の肥大/重複を示す、Msx2を過剰発現しているトランスジェニックマウスにおける、早期の縫合閉鎖の機序として、造骨性細胞の増殖の増大が提唱された。

【非特許文献1】Cohen, M.M, Jr., and MacLean, R.E. 2000. Craniosynostosis: diagnosis, evaluation and management. 2nd edition. Oxford University Press. New York, New York, USA. 454 pp.

【非特許文献2】Coffin, J.D., et al. 1995. Abnormal bone growth and selective translational regulation in basic fibroblast growth factor (FGF-2) transgenic mice Mol. Biol. Cell. 6:1861-1873. 10

【非特許文献3】Carlton, M.B., Colledge, W.H., and Evans, M.J. 1998. Crouzon-like craniofacial dysmorphology in the mouse is caused by an insertional mutation at the Fgf3/Fgf4 locus. Dev. Dyn. 212:242-249.

【非特許文献4】Jabs, E.W., et al. 1993. A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis Cell. 75:443-450.

【非特許文献5】Liu, Y.H., et al. 1995. Premature suture closure and ectopic cranial bone in mice expressing Msx2 transgenes in the developing skull. Proc. Natl Acad Sci. USA. 92:6137-6141. 20

【非特許文献6】Liu, Y.H., et al. 1999. Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans Dev. Biol. 205:260-274.

【非特許文献7】Ma, L., Golden, S., Wu, L., and Maxson, R. 1996. The molecular basis of Boston-type craniosynostosis: the Pro148->His mutation in the N-terminal arm of the MSX2 homeodomain stabilizes DNA binding without altering nucleotide sequence preferences. Hum. Mol. Genet. 5:1915-1920.

【非特許文献8】Zhou, Y.X., et al. 2000. A Pro250Arg substitution in mouse Fgfr1 causes increased expression of Cbfa1 and premature fusion of calvarial sutures Hum. Mol. Genet. 9:2001-2008. 30

【非特許文献9】Otto, F., Kanegane, H., and Mundlos, S. 2002. Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. Hum. Mutat. 19:209-216.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は前記従来の問題に鑑みなされたものであり、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、スクリーニングによって骨石灰化のモジュレータを得るための簡便な標的として機能するNELL-1遺伝子または該遺伝子産物を提供する。NELL-1は、骨折の修復を促進する目的に、及び/又は、一般に骨密度を増大する目的にも使用可能である。 40

【課題を解決するための手段】

【0007】

縫合閉鎖の分子経路を解明するため、我々は、以前に、ディファレンシャルディスプレイを用いて、非家族性の非症候群性CSを有する患者において、異常に癒合した縫合内で特異的にアップレギュレーションされた(upregulated)遺伝子を同定した。我々は、Nell様の1型分子(EGF様ドメインをコード化する、神経組織内で強く発現される蛋白質)であるNELL-1を、単離し、かつ、特徴づけた(参考文献10~12)。Nell-1は、分泌される蛋白質である。構造的には、Nell-1は、分泌性シグナルペプ 50

チド配列、NH₂末端トロンボスポンジン-1様モジュール、6つのシステイン残基を有する5つの von Willebrand 因子様反復、および6つのEGF様ドメインをコード化する。Nell-1はまた、種を超えて高度に保存される。例えば、ラットNell-1とヒトNELL-1との間には、93%のアミノ酸配列の相同性が存在する。

【0008】

Nell-1は、90kDaの分子量を有するポリペプチドをコード化する。COS細胞内で過剰発現されると、グリコシル化された形態は、真核細胞内の50kDaの糖部分にN結合されて、細胞質内で見い出される140kDaの形態を生成する。この140kDaの蛋白質は、さらにプロセッシングされて、130kDaの蛋白質になる。Nell-1蛋白質は、高分子量(約400kDa)を有する三量体の形態として分泌される(参考文献13、14)。

10

【0009】

初期の研究は、NELL-1が、頭蓋冠組織の頭蓋顔面領域内で、優先的に発現されることを示唆した(参考文献12~14)。CS患者における早期の縫合閉鎖は、造骨性領域内の造骨細胞様細胞によるNELL-1の過剰発現の程度において、注目に値する(参考文献12)。Nell-1の過剰発現と早期の縫合閉鎖とは、偶然の発見であり得るが、我々のデータは、Nell-1が、頭蓋縫合閉鎖における局所的制御因子であり得ることを示唆している。この研究で、我々は、さらに、Nell-1が、CSにおいて一定の役割を有していることを検証した。我々は、全身性のNell-1過剰発現を示すトランスジェニックマウスモデルを、創出した。Nell-1トランスジェニック動物は、CSを有するヒトと同じ特徴を数多く共有している。それらは、頭蓋冠の肥大/重複および早期の縫合閉鎖を実証している。造骨細胞のNell-1アデノウイルス作成物による感染は、Nell-1が、造骨細胞系統の細胞における分化を促進し、かつ、加速することを示した。さらに、Nell-1のダウンレギュレーション(downregulation)は、造骨細胞の分化を阻害した。従って、Nell-1は、頭蓋縫合閉鎖をもたらす候補遺伝子を表し、かつ、CSおよび頭蓋顔面の発達の研究に、新しい見識を提供する。

20

【0010】

一実施形態では、本発明は、頭蓋冠の造骨細胞の分化および石灰化を制御(modulating)する方法を提供する。これら方法は、Nell-1の発現または活性を改変する工程であって、Nell-1の発現または活性の増大は造骨細胞の分化または石灰化を増進させ、かつ、Nell-1の発現または活性の低下は、造骨細胞の分化または石灰化を低下させる工程を含んでいる。Nell-1発現または活性は、任意の簡便な方法(例えば、抗Nell-1アンチセンス分子、Nell-1特異的リボザイム、Nell-1特異的触媒DNA、Nell-1特異的RNAi、抗Nell-1細胞内発現抗体、および、特定の標的細胞及び/又は組織内のNell-1をノックアウトする遺伝子治療法)によって、阻害することができる。同様に、Nell-1発現または活性は、任意の簡便な方法によって(例えば、Nell-1を発現している外来の核酸を細胞に形質移入すること、Nell-1蛋白質を細胞に形質移入すること、などによって)、増大させることができる。哺乳類は、異常な頭蓋縫合の発達(例えば、頭蓋骨癒合症(CS))を経験しつつある哺乳類(ヒトまたはヒト以外の哺乳類)であってよい。

30

40

【0011】

本発明は、哺乳類における潜在性のTGF- β 1活性化を促進する方法も提供する。この方法は、外来のNell-1を哺乳類に投与する工程、あるいは、前記哺乳類における内在性のNell-1の発現活性を増大させる工程を含んでよい。

【0012】

哺乳類におけるTGF- β スーパーファミリーのメンバーを活性化する、あるいは、隔離する方法も提供されている。この方法は、外来のNell-1を哺乳類に投与する工程、あるいは、該哺乳類における内在性のNell-1の発現活性を増大させる工程を含んでいる。

【0013】

50

さらに別の実施形態では、本発明は、スクリーニングによって、造骨細胞の分化を調整する作用剤を得る方法を提供する。これら方法は、NELL-1遺伝子を含む試験細胞と試験作用剤とを接触させる工程と、コントロール細胞における、NELL-1遺伝子の発現またはNELL-1の活性と比較された場合の、試験細胞における、NELL-1遺伝子の発現レベルまたはNELL-1の活性の変化を検出する工程であって、試験細胞とコントロール細胞内の、NELL-1の発現レベルまたはNELL-1の活性の差は、前記作用剤が、骨の石灰化を調整することを示す工程と、を含んでいる。ある種の実施形態では、コントロールは、試験細胞より低い濃度（例えば、半分の濃度、試験作用剤の不在など）で試験作用剤と接触させた、ネガティブコントロール細胞である。ある種の実施形態では、コントロールは、試験細胞より高い濃度で試験作用剤と接触させた、ポジティブコントロール細胞である。各種の実施形態では、NELL-1の発現レベルは、前記細胞内のNELL-1 mRNAのレベルを測定することによって検出され、かつ（あるいは）、NELL-1のレベルは、例えば、本文書で述べるように、生体細胞内のNELL-1蛋白質の発現レベルを測定することによって検出される。

10

【0014】

さらに別の実施形態では、本発明は、哺乳類の細胞内のNELL-1発現を改変する方法を提供する。これら方法は、Msx2及び/又はCbfa1の発現または活性を改変する工程を含んでいる。ある種の実施形態では、Cbfa1発現または活性をアップレギュレーションして、NELL-1発現または活性をアップレギュレーションする。ある種の実施形態では、Msx2発現または活性をアップレギュレーションして、NELL-1発現または活性をダウンレギュレーションする。

20

【0015】

同様に、スクリーニングによって、NELL-1発現または活性を調整する作用剤を得る方法であって、前記方法は、Cbfa1及び/又はMsx2遺伝子を含む試験細胞と試験作用剤とを接触させる工程と、コントロール細胞における、Cbfa1及び/又はMsx2遺伝子の発現またはCbfa1及び/又はMsx2の活性と比較された場合の、前記試験細胞における、Cbfa1及び/又はMsx2遺伝子の発現レベルまたはCbfa1及び/又はMsx2の活性の変化を検出する工程であって、試験細胞とコントロール細胞内の、Cbfa1及び/又はMsx2の発現レベルまたはCbfa1及び/又はMsx2の活性の差は、該作用剤が、NELL-1発現または活性を調整することを示す工程と、を含む方法が、提供されている。

30

【0016】

NELL-1蛋白質をコード化する核酸、NELL-1蛋白質、およびNELL-1蛋白質の発現または活性を改変する作用剤からなる群から選択される、一つまたはそれ以上の活性な作用剤と、薬学的に受容できる賦形剤と、を含む薬学的な製剤形態も提供されている。

【0017】

他の実施形態では、本発明は、ヒトNELL-1遺伝子によってコード化されたポリペプチドは、骨の石灰化を誘発し、従って、造骨性であるという発見に係る。NELL-1遺伝子および遺伝子産物（例えば、mRNA、cDNA、蛋白質など）は、スクリーニングによって、NELL-1発現及び/又は活性のモジュレーターを求め、従って、骨の石灰化のモジュレーターを求めるための良好な標的を提供する。さらに、NELL-1は、骨形態形成蛋白質（BMP）の使用に類似したやり方で、骨折の修復を早めるのに、かつ、骨移植片材料の構成要素として、用いることができる。

40

【0018】

すでに示したように、好適な一実施形態では、本発明は、スクリーニングによって、骨の石灰化を改変する作用剤を得る方法を提供する。これら方法は、NELL-1遺伝子を含む細胞と試験作用剤とを接触させる工程と、試験作用剤と接触させていない細胞におけるNELL-1遺伝子の発現と比較された場合の、NELL-1遺伝子の発現レベルの変化を検出する工程であって、接触させた細胞と接触させていない細胞内の、（例えば、ゲ

50

ノムDNAのコピー数、mRNAレベル、蛋白質レベル、蛋白質活性などによって表される)NELL-1の発現レベルの差は、前記作用剤が、骨の石灰化を調整することを示す工程と、を含んでいる。これら方法は、さらに、NELL-1核酸またはNELL-1蛋白質の発現を改変する試験作用剤を、NELL-1活性のモジュレーターのデータベース内に、あるいは、骨の石灰化のモジュレーターのデータベース内に、含んでよい。ある種の実施形態では、NELL-1の発現レベルは、細胞内のNELL-1 mRNAのレベルを測定することによって(例えば、前記mRNAを、NELL-1核酸に特異的にハイブリダイズするプローブと、ハイブリダイズさせることによって)、検出される。好適なハイブリダイゼーション法としては、ノーザンプロット、NELL-1 RNAから誘導されたDNAを用いるサザンプロット、アレイハイブリダイゼーション、アフィニティークロマトグラフィー、およびin situハイブリダイゼーションが挙げられるが、それらに限定されない。本発明の方法は、アレイベースの手法に適している。従って、いくつかの実施形態では、プローブは、プローブのアレイを形成する複数のプローブのメンバーである。NELL-1発現のレベルは、核酸増幅反応(例えば、PCR)を用いて測定することもできる。

10

【0019】

本発明のスクリーニングシステムの他の実施形態では、NELL-1発現は、生体試料内のNELL-1蛋白質の発現レベルを、(例えば、キャピラリー電気泳動、ウェスタンプロット、質量分析、ELISA、免疫クロマトグラフィー、免疫組織化学などを介して)測定することによって、検出される。細胞は、生体外で培養してもよく、あるいは、インビボ及び/又はin situで培養してもよい。ある種の実施形態では、試験作用剤は、抗体でなく、かつ(あるいは)、蛋白質でなく、かつ(あるいは)、核酸でない。好適な試験作用剤は、小型の有機分子である。

20

【0020】

本発明は、プレスクリーニングによって、NELL-1発現及び/又は活性の潜在的なモジュレーターを得る方法も提供する。これら方法は、NELL-1核酸またはNELL-1蛋白質と試験作用剤とを接触させる工程と、NELL-1蛋白質または核酸に対する、前記試験作用剤の特異的結合を検出する工程と、を含んでいる。この方法は、さらに、NELL-1核酸に、あるいは、前記NELL-1蛋白質に、特異的に結合する試験作用剤を、NELL-1活性の候補モジュレーターのデータベース内に、かつ(あるいは)、骨の石灰化の候補モジュレーターのデータベース内に、記録する工程を含んでよい。試験作用剤は、NELL-1核酸及び/又は蛋白質に直接的に、あるいは、該核酸及び/又は蛋白質を含む細胞及び/又は組織及び/又は生物(例えば、哺乳類)に、接触させてよい。細胞を接触させる場合、細胞は、初代培養であってもよく、あるいは、継代培養であってもよい。ある種の実施形態では、試験作用剤は、抗体でなく、かつ(あるいは)、蛋白質でなく、かつ(あるいは)、核酸でない。好適な試験作用剤は、小型の有機分子である。検定で、核酸に結合する試験作用剤の能力が測定される場合、好適な検定は、ノーザンプロット、DNAを用いたサザンプロット、アレイハイブリダイゼーション、アフィニティークロマトグラフィー、またはin situハイブリダイゼーションを利用する。検定で、NELL-1蛋白質に結合する試験作用剤の能力が測定される場合、好適な検定は、キャピラリー電気泳動、ウェスタンプロット、質量分析、ELISA、免疫クロマトグラフィー、または免疫組織化学を利用する。

30

40

【0021】

別の実施形態では、本発明は、骨の石灰化を増進させる方法を提供する。好適な方法は、造骨性細胞(例えば、造骨細胞、間葉細胞、線維芽細胞、胎性胚細胞、幹細胞、骨髄細胞、硬膜細胞、軟骨細胞、軟骨芽細胞など)内の、あるいは、該細胞が見い出される環境内の、NELL-1遺伝子産物の濃度を増大させる工程を含んでいる。好適な一実施形態では、NELL-1遺伝子産物の濃度は、NELL-1遺伝子の発現をアップレギュレーションすることによって、増大される。これは、(例えば、内在性の制御領域(例えば、プロモーター)を修飾することによって)内在性のNELL-1遺伝子の発現をアップレ

50

ギュレーションする方法、あるいは、細胞に、N E L L - 1 蛋白質を発現するベクトルを形質移入する方法を含むが、それらに限定されない、多種多様な方法のうちのいずれによって実現することができる。ある種の好適なベクトルは、N E L L - 1 蛋白質を恒常的に発現するが、他の好適なベクトルは、誘発性である。さらに別の実施形態では、N E L L - 1 遺伝子産物の濃度は、N E L L - 1 ポリペプチドを有する骨によって増大される。

【0022】

本発明は、骨折の修復を促進する方法も提供する。これら方法は、骨折部位の、あるいは、その近くの、N E L L - 1 遺伝子産物の濃度を増大させる工程を含んでいる。好適な実施形態では、N E L L - 1 遺伝子産物は、骨折部位に、あるいは、その近くに存在する、造骨性細胞内または骨前駆細胞内で増大される。これら方法は、N E L L - 1 を過剰発現する造骨性細胞または骨前駆細胞を、骨折部位に導入する工程を含んでよい。別の実施形態では、本発明は、in situで、造骨性細胞内または前記骨前駆細胞内のN E L L - 1 遺伝子産物の濃度を増大させる工程を含んでよい。N E L L - 1 遺伝子産物のアップレギュレーションは、本文書で述べるように実現することができる。別の実施形態では、細胞及び/又は骨折部位とN E L L - 1 ポリペプチドとを接触させる。

10

【0023】

骨折の修復に対する別の手法では、骨折部位とN E L L - 1 蛋白質とを接触させる。該蛋白質は、(例えば、N E L L - 1 蛋白質を過剰発現している細胞の導入によって導入された)細胞によって、かつ(あるいは)、単独の、あるいは、薬理的賦形剤と組み合わせた、蛋白質の投与によって、かつ(あるいは)、N E L L - 1 を発現することができる「裸のDNA」ベクトルの投与によって、産生され得る。N E L L - 1 蛋白質は、骨修復/骨移植片材料の構成要素であってもよく、かつ(あるいは)、補綴装置の一部であってもよい。好適な移植片材料の一つは、N E L L - 1 蛋白質及び/又はN E L L - 1 蛋白質を発現している細胞に加えて、コラーゲン及び/又は骨断片を含んでいる。

20

【0024】

さらに別の実施形態では、本発明は、移植先の動物において、骨組織の形成を増強することができる骨移植片材料を提供する。好適な骨移植片材料は、本質的に、生体適合性基質およびN E L L - 1 蛋白質からなる。好適な移植片材料の一つは、再吸収可能/生分解性である。また、基質は、N E L L - 1 蛋白質及び/又はN E L L - 1 蛋白質を発現している細胞で含浸され得る。好適な骨移植片材料の一つは、その中で実質的に均一に分散した、(例えば、約65~約95重量%の)再構成されたコラーゲンと、(例えば、約35~約5重量%の)N E L L - 1 蛋白質及び/又はN E L L - 1 蛋白質を発現している細胞と、を含むコラーゲン接合体を含んでいる。

30

【発明の効果】

【0025】

本発明は、スクリーニングによって骨石灰化のモジュレータを得るための簡便な標的として機能するN E L L - 1 遺伝子または該遺伝子産物を提供する。N E L L - 1 は、骨折の修復を促進する目的に、及び/又は、一般に骨密度を増大する目的にも使用可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

40

【0026】

用語定義

本文書で、用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「蛋白質」は、アミノ酸残基の重合体を指すのに可換的に用いられる。これら用語は、それにおいて一つまたはそれ以上のアミノ酸残基が対応する自然発生のアミノ酸の人工の化学的類縁体であるアミノ酸重合体に、並びに、自然発生のアミノ酸重合体に、適用される。

【0027】

用語「N E L L - 1 cDNA」および「N E L L - 1」ゲノムDNAは、Watanabe et al. (1996) Genomics 38 (3): 273-276; Ting et al. (1999) J Bone Mineral Res, 14 : 80-89; および GenBank Accession Number U57523 によって開示されたcDNAおよび

50

ゲノムDNAを指す。

【0028】

NE LL - 1蛋白質は、NE LL - 1遺伝子またはcDNAによって発現される蛋白質である。NE LL - 1蛋白質は、骨の石灰化を誘発する能力を保持しているNE LL - 1蛋白質断片を含んでよい。

【0029】

本文書で用いられる用語「抗体」は、無傷の免疫グロブリン、軽鎖および重鎖可変領域のみを含むFv断片、ジスルフィド結合によって連結されたFv断片 (Brinkmann et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 547 - 551)、可変領域および定常領域の一部を含むFabまたは(Fab)'₂断片、単鎖抗体など (Bird et al. (1988) Science 242: 424 - 426; Huston et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 5879 - 5883)、各種の形態の、修飾され、あるいは、改変された抗体を含んでいる。抗体は、動物 (特に、マウスまたはラット) またはヒト由来のものであってよく、あるいは、キメラ型 (Morris on et al. (1984) Proc Nat. Acad. Sci. USA 81: 6851 - 6855) またはヒト化 (Jones et al. (1986) Nature 321: 522 - 525、および公開された英国特許出願第8707252号) の抗体であってよい。

【0030】

用語「結合相手」、または「捕獲作用剤」、あるいは、「結合対」のメンバーは、他の分子と特異的に結合して、抗体 - 抗原、レクチン - 炭水化物、核酸 - 核酸、ビオチン - アピジンなどの結合複合体を形成する分子を指す。

【0031】

本文書で用いられる用語「特異的に結合する」は、生体分子 (例えば、蛋白質、核酸、抗体など) を指す場合、分子の異質性個体群 (例えば、蛋白質および他の生物製剤) 内の生体分子の存在を決定する結合反応を指す。従って、指定の条件 (例えば、抗体の場合は免疫検定条件、あるいは、核酸の場合はストリンジェントなハイブリダイゼーション条件) の下では、指定された配位子または抗体は、その特定の「標的」分子に結合し、かつ、試料内に存在する他の分子には有意な量で結合しない。

【0032】

骨粗鬆症という用語は、骨質量の減少および骨折を特徴とする障害の異質性グループを指す。臨床的には、骨粗鬆症は、I型とII型に区別される。I型骨粗鬆症は、主に中年の女性に生じ、閉経時のエストロゲン欠乏に関連しており、一方、骨粗鬆症II型は、加齢に関連している。

【0033】

骨形成不全症 (OI) は、骨および軟部結合組織の脆弱性を特徴とする、遺伝性の結合組織疾患のグループを指す (Byers & Steiner (1992) Annu. Rev. Med. 43: 269 - 289; Prokop (1990) J. Biol. Chem. 265: 15349 - 15352)。男性と女性は、等しく影響を受け、全体的な発生率は、現在、出生者5,000 ~ 14,000人に1人と推定されている。聴力損失、象牙質形成不全症、呼吸不全、重度の脊柱側弯症および気腫は、一つまたはそれ以上の型のOIに関連している状態のうちの一部に過ぎない。医療費の正確な推定値は入手不能であるが、OIに関連した罹病率および死亡率は、間違いなく、極度の骨折性向 (I ~ IV型OI) および骨折修復後の異常な骨の変形 (II ~ IV型OI) の結果生じる。

【0034】

本文書で、用語「核酸」または「オリゴヌクレオチド」、あるいは、文法上の等価物は、共有結合で互いに連結された少なくとも二つのヌクレオチドを指す。本発明の核酸は、望ましくは、一本鎖または二本鎖であり、一般に、リン酸ジエステル結合を含むことになるが、場合によっては、以下に概説するように、例えば、ホスホルアミド (Beaucage et al. (1993) Tetrahedron 49(10): 1925 および同文書中の参照文献; Letsinger (1970) J. Org. Chem. 35:3800; Sprinzl et al. (1977) Eur. J. Biochem. 81: 579; Letsinger et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 3487; Sawai et al. (1984) Chem. Lett. 805, Le

tsinger et al. (1988) J. Am. Chem. Soc. 110: 4470; および Pauwels et al. (1986) *Chemica Scripta* 26: 141 9)、ホスホロチオエート (Mag et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437; および米国特許第 5, 6 4 4, 0 4 8 号)、ホスホロジチオエート (Bri u et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111 :2321)、O - メチルホスホロアミダイト結合 (Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Pressを参照)、およびペプチド核酸バックボーンおよび結合 (Egholm (1992) J. Am . Chem. Soc. 114:1895; Meier et al. (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31: 1008; Nielsen (1993) *Nature*, 365: 566; Carlsson et al. (1996) *Nature* 380: 207を参照) を含む、交互のバックボーンを有していると思われる核酸類縁体が含まれている。他の類縁体核酸としては、ポジティブバックボーン (Denpcy et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097; 非イオンバックボーン (米国特許第 5, 3 8 6, 0 2 3 号、第 5, 6 3 7, 6 8 4 号、第 5, 6 0 2, 2 4 0 号、第 5, 2 1 6, 1 4 1 号および第 4, 4 6 9, 8 6 3 号; *Angew. (1991) Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger et al. (1988) J . Am. Chem. Soc. 110:4470; Letsinger et al. (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:15 97; Chapters 2 and 3, *ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research"*, Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker et al. (1994), *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett* 4: 395; Jeffs et al. (1994) *J. Biomolecular NMR* 34: 17; *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996))、および、米国特許第 5, 2 3 5, 0 3 3 号および第 5, 0 3 4, 5 0 6 号、および Chapters 6 and 7, *ASC Symposium Series 58 0, Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook に記述されたものを含む、非リボースバックボーンを有するものが挙げられる。一つまたはそれ以上の炭素環の糖部を含む核酸も、核酸の定義に含まれている (Jenkins et al. (1995), *Chem. Soc. Rev.* pp169 - 176 を参照)。いくつかの核酸類縁体が、*Rawls, C & E News* June 2, 1997 page 35 に記述されている。リボース - リン酸バックボーンのこれら修飾は、標識などの追加的な部分の付加を促進するために、あるいは、生理学的環境におけるそのような分子の安定性および半減期を増大させるために行われてよい。

【 0 0 3 5 】

本文書で用いられる用語「に特異的にハイブリダイズする」および「特異的ハイブリダイゼーション」および「に選択的にハイブリダイズする」は、核酸分子を、ストリンジェントな条件下で、特定のヌクレオチド配列に対して、優先的に結合すること、二重化すること、またはハイブリダイズすることを指す。用語「ストリンジェントな条件」は、その下で、プローブが、その標的配列と優先的にハイブリダイズし、かつ、他の配列とは、より低い程度にしか、あるいは、まったく、ハイブリダイズしないような条件を指す。核酸ハイブリダイゼーションの状況でのストリンジェントなハイブリダイゼーションおよびストリンジェントなハイブリダイゼーション洗浄条件は、配列依存であり、異なる環境パラメータの下では、異なっている。核酸のハイブリダイゼーションに関するより詳細な手引きは、例えば、Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes* part 7, chapt 2, *Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays*, Elsevier, NY (Tijssen) に見い出される。一般に、きわめてストリンジェントなハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、定義されたイオン強度および pH において、特異的な配列の融解温度 (T_m) より約 5 低くなるよう選択される。 T_m は、標的配列の 50% が、(定義されたイオン強度および pH の下で) 完璧にマッチしたプローブにハイブリダイズする温度である。非常にストリンジェントな条件は、特定のプローブの T_m に等しくなるよう選択される。サザンプロットまたはノーザンプロットにおいて、アレイ上またはフィルター上に、100 を超える相補的残基を有する相補的核酸のハイブリダイゼーションに対するストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の一例は、標準のハイブリダイゼーション溶液 (例えば、Sambrook (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY、および下記の詳細な考察を参照) を用いて、42 で、ハイブリダイゼーションをオーバーナ

イトで行うものである。極めてストリンジェントな洗浄条件の一例は、72 で約15分間の0.15M NaClである。ストリンジェントな洗浄条件の一例は、65 で15分間の0.2xSSC洗浄である(SSC緩衝液の内容については、例えば、上記 Sambrook を参照)。高ストリンジェンシー洗浄は、まず低ストリンジェンシー洗浄を行って、バックグラウンドのプロブ信号を除去する場合が多い。100を超えるヌクレオチドの二重鎖に対する、中程度ストリンジェンシー洗浄の一例は、45 で15分間の1xSSCである。100を超えるヌクレオチドの二重鎖に対する、低ストリンジェンシー洗浄の一例は、40 で15分間の4x~6xSSCである。

【0036】

「造骨性細胞」は、石灰化することができる細胞である。造骨性細胞としては、造骨細胞、造骨細胞様細胞、間葉細胞、線維芽細胞、胎性胚細胞、幹細胞、骨髄細胞、硬膜細胞、軟骨細胞、および軟骨芽細胞が挙げられる。

10

【0037】

用語「試験作用剤」は、本文書で述べる検定のうちの一つまたはそれ以上においてスクリーニングすべき作用剤を指す。この作用剤は、事実上いかなる化合物であってもよい。それは、単一の単離された化合物として存在してよく、あるいは、ケミカル(例えば、コンビナトリアル)ライブラリーのメンバーであってもよい。特に好適な一実施形態では、試験作用剤は、小型の有機分子となる。

【0038】

用語「小型の有機分子」は、医薬品に一般に用いられる有機分子に相当する大きさの分子を指す。この用語は、生体高分子(例えば、蛋白質、核酸など)を含まない。好適な小型の有機分子は、大きさが、最大約5000Da、より望ましくは、最大2000Da、および、最も望ましくは、最大約1000Daの範囲にある。

20

【0039】

データベースという用語は、情報を記録し、かつ、検索するための手段を指す。好適な実施形態では、データベースは、記憶された情報をソートし、かつ(または)、検索するための手段も提供する。データベースは、紙システム、カードシステム、機械的システム、電子的システム、光学的システム、磁気システム、またはそれらの組合せを含むが、それらに限定されない、任意の簡便なメディアを含むことができる。好適なデータベースとしては、電子的(例えば、コンピュータベースの)データベースが挙げられる。データベースの記憶および操作で使用するためのコンピュータシステムは、当業者には周知であり、「パーソナルコンピュータシステム」、メインフレームシステム、インターネットまたはイントラネット上の分散型ノード、専用のハードウェアに(例えば、マイクロチップに)記憶されたデータまたはデータベースなどが挙げられるが、それらに限定されない。

30

【0040】

図1Aは、コントロールとして - ガラクトシダーゼを有する、アデノウイルスを用いたE-14ラット頭蓋冠の初代細胞培養物内のNELL-1の過剰発現を示している。図1Bは、それぞれ、NELL-1および - ガラクトシダーゼによる処置後の時間の関数としての、石灰化のプロットを示している。実験は、3回行われた。Studentのt検定が行われた。NELL-1による石灰化は、 - ガラクトシダーゼコントロールによる石灰化よりも統計的に高かった($P < 0.001$)。

40

【0041】

図2は、非トランスジェニック同腹仔と比較されたNell-1トランスジェニックマウスを示している。(図2A)導入遺伝子のコピー数。ファウンダー(FAおよびFB)およびそれらの子孫(TF₂A1、TF₂A2、およびTF₂B1)は、50~100のコピー数を有している。TF₂A1およびTF₂A2は、ファウンダーAラインからのものである。TF₂B1、TF₂B2、およびTF₂B3は、ファウンダーBラインからのものである。(図2B)両ファウンダーにおけるNell-1 RNA発現のRT-PCR分析。C、コントロールNell-1プラスミド; M、筋肉; H、心臓; B、骨; K、腎臓; L、肝臓。(図2C)新生仔子孫の全身(頭部なし)RNA。TF₂A1およびTF₂A

50

2は、異なるレベルのNe11-1を発現する。TF2B1は、Ne11-1を弱く発現し、一方、TF2B2およびTF2B3は、Ne11-1発現がない。(図2D)左のパネル、新生仔NF2の上皮、筋肉、および頭蓋冠骨におけるNe11-1蛋白質の免疫局在性。頭蓋冠骨における若干の染色を除いて、検出可能なNe11-1発現はない(茶色の染色は、Ne11-1の存在を示す)。右のパネル、TF2A2の上皮、筋肉、および頭蓋冠骨におけるNe11-1蛋白質の免疫局在性。全ての軟部組織層の全体にわたって、並びに骨において、豊富なNe11-1発現が存在する。バーは、50μmを表している。

【0042】

図3 Ne11-1トランスジェニックマウスの表現型評価。(aおよびb)左のパネルは、新生仔Ne11-1表現型陽性(TF2A1)マウスを示す。前頭頭頂領域における突出(矢印)に留意したい。右のパネルは、NF2同腹仔を示している。(c)左のパネル、頭皮を除去したTF2A2マウス。矢状(黄色の矢印)およびPF(黒色の矢印)縫合は、閉鎖している。右のパネル、開存している矢状(黄色の矢印)およびPF(黒色の矢印)縫合、および、開存している縫合の下に正常な脈管構造を有する、NF2同腹仔の頭蓋骨。(d)CSの重篤な一形態である頭蓋終脳形成異常を有する乳仔。(e)TF₂A1マウス(左)およびNF2同腹仔(右)の脳MRI。そのNF2同腹仔(矢印、右)に比べた、TF₂A1マウス(矢印、左)における、高い頭蓋内圧を示唆している、脳室の完全な不在に留意したい。(f)新生仔Ne11-1表現型陽性TF₂A1(左)およびNF2(右)同腹仔のMCT再構築された三次元の頭蓋骨の図。矢印は、矢状およびPF縫合部位を示している。TF₂A1マウスでは、矢状およびPF縫合は、おおむね閉鎖し、かつ、異常な隆線で置換されている。NF2同腹仔では、矢状縫合とPF縫合の両方が、開存している。完全な不透明は、50mg/ccを超える石灰化に対応する。バックグラウンドの垂直な棒は、(左から右に)50、100、150、および200mg/ccの石灰化密度に対応するファントム参照棒である。(g)fに示されているTF2A1(左)およびNF2同腹仔(右)の連続軸方向MCT断面である。黄色の矢印は、頭蓋の歪みを示している。緑色の矢印は、TF2Aマウス(矢印、右)における頭蓋冠の増大した石灰化を示している。

【0043】

図4 Ne11-1トランスジェニックマウスの組織学的および免疫組織学的評価。(パネルa)Ne11-1表現型陽性TF2A1マウスの矢状縫合のヘマトキシリンおよびエオシン染色。頭蓋冠端部の重複(黒色の矢印)および閉鎖しつつある骨形成前端(osteogenic fronts)(赤色の矢印)によって示された、縫合の閉鎖が存在する。左下のパネルは、von Kossa染色を示している。石灰化した頭蓋冠端部の密な近接に留意したい。(パネルb)NF2同腹仔からの矢状縫合のヘマトキシリンおよびエオシン染色。開存している縫合部位の二つの頭蓋冠端部(黒色の矢印)を隔てている大きな距離、並びに、前進している骨形成前端(赤色の矢印)に留意したい。左下のパネルは、von Kossa染色を示している。黒色は、石灰化を示している。(パネルc)TF2A1マウスにおけるアルカリ性フォスファターゼ(ALP)の免疫局在性。茶色の染色は、アルカリ性フォスファターゼ(矢印)の存在を示している。下のパネルは、より低い倍率でのオステオポンチンの免疫局在性を表している。(パネルd)上のパネルは、新生仔NF2の頭蓋縫合におけるアルカリ性フォスファターゼの免疫局在性を示している。下のパネルは、より低い倍率でのオステオポンチン(OP)の免疫局在性を表している。バーは、50μmを表している。(パネルe)TF2矢状縫合のBrdU染色。増殖細胞の核は、茶色で染色されている(黒色の矢印)。増殖細胞は、dにおいてNF2について示されたものと比べて、有意に減少している。(パネルf)新生仔NF₂マウスの矢状縫合のBrdU染色。多数の茶色に染色された細胞が、開存している縫合の頭蓋冠端部(黒色の矢印)に沿って、並びに、前進している骨形成前端(赤色の矢印)に沿って、増殖している。H&E、ヘマトキシリンおよびエオシン。(パネルg)フィールド当りの増殖細胞の数。

【0044】

10

20

30

40

50

図5 非トランスジェニック同腹仔と比較されたN e l l - 1トランスジェニックT F₂B 1マウス。(a)左、頭皮を除去した新生仔T F₂B 1マウス。後頭領域の異常な隆起および頭蓋の比較的狭い幅に留意したい。右、N F 2同腹仔。T F₂B 1トランスジェニック動物では、矢状縫合およびいくつかの他の縫合が、閉鎖している。(b)T F₂B 1矢状縫合のヘマトキシリンおよびエオシン染色。縫合の早期閉鎖は、頭蓋冠端部の重度の重複(赤色の矢印)において著明である。その下にある脳組織は、R N A分析のために除去されている。(c)T F₂B 1マウス(左)およびそのN F 2同腹仔(右)の三次元のM C T再構築。T F₂B 1マウスにおける早期正中線縫合閉鎖の領域(矢印、左)に留意したい。

【0045】

図6は、N e l l - 1過剰発現の、石灰化および骨マーカー発現に対する影響を示している。(図6A) von Kossa 染色で染色された、20 p f u /細胞のA d N e l l - 1を感染させたF R C C培養物。コントロール細胞培養物には、A d - G a lを感染させた。実験は、3回行われた。石灰化した小結節は、黒色に染色されている。(図6B)石灰化した領域の定量化および統計解析。A d N e l l - 1感染培養物は、A d - G a lコントロールよりも有意により大きな石灰化を実証した。(図6C)アスコルビン酸なしで育成されたA d N e l l - 1感染M C 3 T 3細胞。代表的な微小結節の外観が、示されている。右のパネルは、微小結節のアルカリ性フォスファターゼ染色を表している。(図6D~F)それぞれ、感染後6、9、および12日目のA d N e l l 感染M C 3 T 3細胞のマイクロアレイ。遺伝子発現強度は、標準化されたハウスキーピング遺伝子(H K G)を用いて基準化されている。A d N e l l - 1感染細胞のハイブリダイゼーション強度は、y軸上に表されている。A d - G a l感染細胞のハイブリダイゼーション強度は、x軸上に表されている。H K G s r 2は、これら二つの試料間のハウスキーピング遺伝子の相関関係(塗りつぶされた四角形)を表している。E C M s r 2は、これら二つの試料間の候補遺伝子発現の相関関係(白抜きの四角形)を表している。各ダイヤグラムの左上隅に、マイクロアレイ読取りの写真が添付されている。2倍またはそれ以上のアップレギュレーションは、赤色で表されており、一方、2倍またはそれ以上のダウンレギュレーションは、緑色で表されている。(g)A d N e l l - 1感染後に、2倍高い、あるいは、2倍低い発現の差を有する遺伝子を要約した表。比は、N e l l - 1 / - G a lとして計算されている。C o lはコラーゲン。

【0046】

図7は、N e l l - 1ダウンレギュレーションの、アルカリ性フォスファターゼ発現および骨マーカー発現に対する影響を示している。(図7A)20 p f u /細胞のA d A n t i N e l l - 1またはA d - G a lコントロールを感染させたラットF R C Cにおける、N e l l - 1蛋白質発現のウェスタンブロット分析。約60%のダウンレギュレーションが、観察される。(図7B)F R C Cのアルカリ性フォスファターゼ染色(赤色)。A d A n t i N e l l - 1感染細胞は、コントロールおよびA d N e l l - 1感染細胞よりも、有意により少ない染色を有している。(図7C)感染後3、6、9、および12日目のF R C Cのノーザン分析。A d A n t i N e l l - 1感染細胞は、有意により少ないオステオカルシンおよびオステオポンチン発現を有している。(図7D)PhosphorImagerによって測定され、かつ、G A P D Hによって基準化された、オステオカルシン(O C)およびオステオポンチン(O P)の発現。

【0047】

図8は、早期縫合閉鎖におけるN e l l - 1機能の仮説モデルを示している。破線は、潜在的な調整を表している。

【0048】

本発明は、N E L L - 1遺伝子産物は、組織(例えば、骨)の石灰化を増進するという発見を提供し、かつ、その発見に係る。特定の理論に拘束されることなしに、N E L L - 1蛋白質は、T G F スーパーファミリーのメンバーと相互作用することによって、その機能を実行し得ると考えられている。

10

20

30

40

50

【0049】

本明細書で述べるように、NELL-1が組織の石灰化を仲介することを認識したことから、NELL-1核酸及び/又はNELL-1蛋白質は、スクリーニングによって骨の石灰化のモジュレーターを求める場合に、簡便な標的を提供するといえる。従って、NELL-1発現及び/又は蛋白質活性及び/又は蛋白質-蛋白質相互作用を阻害する作用剤は、骨の石灰化を低下させることになる。逆に、NELL-1発現及び/又は蛋白質活性及び/又は蛋白質-蛋白質相互作用をアップレギュレーションする作用剤は、骨の石灰化を増進させると予想される。そのようなNELL-1「アゴニスト」は、骨粗鬆症の治療、骨折治癒、骨形成不全症の治療、骨の再構築などを含むが、それらに限定されない、多種多様な状況において、有用であると予想される。

10

【0050】

従って、一実施形態では、本発明は、NELL-1発現を調整する(例えば、アップレギュレーションする、あるいは、ダウンレギュレーションする)作用剤を同定する方法を提供する。そのような方法は、NELL-1核酸、及び/又はNELL-1核酸を含む細胞、及び/又はNELL-1核酸を含む細胞を含む組織または生物に接触する工程、並びに、NELL-1転写物(例えば、mRNA)及び/又はNELL-1蛋白質のレベルの変化を検出する工程を含んでいる。一実施形態では、そのような検定のための候補試験作用剤は、結合検定「プレスクリーン」において同定される。そのような結合検定は、NELL-1核酸及び/又はNELL-1蛋白質に特異的に結合する能力について、試験作用剤をプレスクリーニングする工程を含んでいる。NELL-1発現をアップレギュレーションする、これら検定によって同定される作用剤は、骨粗鬆症および骨折の治療において有用であると予想される。

20

【0051】

さらに、骨形態形成蛋白質(例えば、BMP-1~BMP-24)の使用に類似したやり方で、自然治癒が限られている、あるいは、存在しない状況下で、NELL-1ポリペプチドを用いて、骨折の修復を早める、あるいは、骨の修復または置換を誘発することができる。一般に、そのような方法は、骨の骨折部位の、あるいは、その近くの、NELL-1遺伝子産物の量を増大させる工程を含んでいる。NELL-1遺伝子産物の濃度は、いくつかの方法のうちの一つまたはそれ以上によって、増大させることができる。一つの手法では、骨折部位の、あるいは、その近くの、細胞が、高レベルのNELL-1を発現するよう誘発される。これは、例えば、NELL-1発現のモジュレーターの使用によって、あるいは、NELL-1プロモーターを改変することによって、あるいは、NELL-1を発現する作成物を細胞に形質移入することによって、実現される。これは、インビボで実現してよく、あるいは、別の実施形態では、そのような細胞を、生体外でNELL-1を過剰発現するよう修飾し、次いで、対象生物に(例えば、骨折部位に、あるいは、その近くに)再び導入することができる。

30

【0052】

NELL-1を発現している、あるいは、過剰発現している細胞を、骨移植片材料に組み込むことができ、かつ(または)、NELL-1ポリペプチドを、そのような骨移植片材料に組み込むことができる。これら移植片材料は、骨折の治療に、あるいは、補綴または骨移植片の置換/治癒を促進する目的に、使用され得る。

40

I. NELL-1発現を調整する作用剤のための検定

上に示したように、本発明の一態様は、NELL-1が、骨の石灰化を仲介し、それによって、骨の石灰化を調整する新規な作用剤のための良好な標的を提供する、という発見を前提としている。従って、一実施形態では、本発明は、NELL-1発現を制御し、それによって骨の石灰化を調整する作用剤を、スクリーニングする方法を提供する。該方法は、問題の該作用剤の存在下におけるNELL-1遺伝子または該遺伝子産物(例えば、NELL-1蛋白質)の発現レベル及び/又は活性レベルを検出する工程を含む。試験作用剤が存在しない、あるいは低減された濃度である、ネガティブコントロールと比較して、該作用剤の存在下においてNELL-1発現レベルまたは活性レベルが上昇しているこ

50

とは、該作用剤が N E L L - 1 活性または発現をアップレギュレーションすることを示す。逆に、試験作用剤が、存在しない、あるいは低減された濃度である、ネガティブコントロールと比較して、該作用剤の存在下において N E L L - 1 発現レベルまたは活性レベルが低下していることは、該作用剤が N E L L - 1 活性または発現をダウンレギュレーションすることを示す。

【 0 0 5 3 】

遺伝子の発現レベルは、遺伝子産物の転写（すなわち、m R N A の転写）の変化、遺伝子産物の翻訳（すなわち、蛋白質の翻訳）の変化によって、及び/又は、翻訳後の修飾（例えば、蛋白質の折りたたみ、グリコシル化など）によって、改変され得る。従って、本発明における検定の好適例は、転写された m R N A（あるいは、N E L L - 1 遺伝子から誘導された他の核酸）のレベル、翻訳された蛋白質のレベル、翻訳された蛋白質の活性などを検定する工程を含んでいる。そのような手法の例を、以下に記述する。

10

【 0 0 5 4 】

A) 核酸ベースの検定

1) 標的分子

発現レベルの変化は、m R N A、及び/又は m R N A から誘導された核酸（例えば、逆転写された c D N A など）の変化を測定することによって、検出され得る。N E L L - 1 発現レベルを測定するためには、そのような分析のための核酸試料を提供することが望ましい。好適な実施形態では、該核酸は、生体試料中より見い出されるか、又は生体試料から誘導される。本文書で用いられる用語「生体試料」は、生物から、あるいは、生物の構成要素（例えば、細胞）から、得られた試料を指す。該試料は、いかなる生体組織または液体のものであってもよい。生体試料としてはまた、器官、あるいは、組織学的な目的のために採取された凍結切片など、組織の切片が挙げられる。

20

【 0 0 5 5 】

核酸（例えば、m R N A から誘導された m R N A 核酸）は、ある種の好適な実施形態では、当業者には周知のいくつかの方法のうちいずれかによって、試料から単離される。m R N A を単離する方法は、当業者には周知である。例えば、核酸の単離および精製の方法は、Tijssen ed., (1993) Chapter 3 of Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part 1. Theory and Nucleic Acid Preparation, Elsevier, N.Y. and Tijssen ed. に詳細に記述されている。

30

【 0 0 5 6 】

好適な一実施形態では、例えば、酸グアニジニウム - フェノール - クロロホルム抽出法を用いて、与えられた試料から「全」核酸が単離され、かつ、オリゴ d T カラムクロマトグラフィーによって、あるいは、(d T) n 磁気ビーズを用いて、ポリ A + m R N A が単離される（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.), Vols. 1 - 3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)、または Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., ed. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987) を参照）。

【 0 0 5 7 】

発現レベルの検定は、まず核酸試料を増幅してから行うことが望ましい場合が多い。核酸を増幅する方法は、当業者には周知であり、該方法としては、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R、例えば、Innis, et al., (1990) PCR Protocols. A guide to Methods and Application. Academic Press, Inc. San Diego を参照）、リガーゼ連鎖反応（L C R）（Wu and Wallace (1989) Genomics 4: 560, Landegren et al. (1988) Science 241: 1077, and Barringer et al. (1990) Gene 89: 117 を参照）、転写増幅（Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173）、自己維持配列複製（Guatelli et al. (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87: 1874）、ドット P C R、およびリンカーアダプター P C R などが挙げられるが、それらに限定されない。

40

【 0 0 5 8 】

特に好適な一実施形態では、試料中の N E L L - 1 の転写レベルを（および、それによ

50

り発現を) 数量化することが望ましい場合において、NEL L - 1 mRNA 転写物の濃度、あるいは、NEL L - 1 mRNA 転写物から誘導された核酸の濃度が、該核酸試料の遺伝子の転写レベル(従って、発現レベル)に比例するものである。同様に、ハイブリダイゼーション信号強度は、ハイブリダイズされた核酸の量に比例することが望ましい。比例性は、比較的厳密である(例えば、転写速度の倍加は、試料核酸プール内のmRNA 転写物の倍加、およびハイブリダイゼーション信号の倍加をもたらす)ことが望ましいが、当業者なら、この比例性はより緩いものであってよく、また、非線形であってもよいことを、理解するであろう。従って、例えば、標的mRNAの濃度の5倍の差が、ハイブリダイゼーション強度の3~6倍の差をもたらす検定は、ほとんどの目的にとって十分である。

10

【0059】

より精確な数量化が必要である場合は、本文書で述べるように、適切なコントロールを実行して、試料の調製およびハイブリダイゼーションにおいて導入される変動を補正してよい。さらに、「標準の」標的核酸(例えば、mRNA)の系列希釈を用いて、当業者には周知の方法に従って、校正曲線を作成してよい。当然、転写物の存在または不在、あるいは、核酸濃度の変化の大きな差の単純な検出が望ましい場合は、精巧なコントロールまたは校正は必要ではない。

【0060】

最も単純な実施形態では、NEL L - 1を含む核酸試料は、生体試料から、単離され、かつ(あるいは、さもなければ)、誘導された全mRNAまたは全cDNAである。核酸は、上に示したように、当業者には周知のいくつかの方法のうちいずれかによって、試料から単離され得る。

20

【0061】**2) ハイブリダイゼーションベースの検定**

NEL L - 1の既知の配列(例えば、(配列番号: 1)を参照)を用いて、NEL L - 1 転写物を検出する、かつ(または)、数量化する工程は、核酸ハイブリダイゼーション技法(例えば、上記 Sambrook et al. を参照)を用いて日常的に実現することができる。例えば、NEL L - 1で逆転写されたcDNAの存在、不在、または数量を評価するための一つの方法は、「サザンプロット」を含んでいる。サザンプロットでは、一般に、電気泳動ゲル上で、断片化され、かつ、分離されたDNA(例えば、逆転写されたNEL L - 1 mRNA)を、NEL L - 1に対して特異的なプローブにハイブリダイズする。NEL L - 1プローブからのハイブリダイゼーション信号の強度と、「コントロール」プローブ(例えば、「ハウスキーピング遺伝子」に対するプローブ)との比較は、標的核酸の相対的な発現レベルの推定値を提供する。

30

【0062】

別法として、NEL L - 1 mRNAを、ノーザンプロットで直接的に数量化することができる。簡潔に言えば、例えば、酸グアニジニウム-フェノール-クロロホルム抽出法を用いて、mRNAを、与えられた細胞試料から単離する。mRNAを、次いで、電気泳動してmRNA種を分離し、かつ、mRNAを、ゲルからニトロセルロースメンブレンに写し取る。サザンプロットの場合と同様、標識化プローブを用いて、標的NEL L - 1 mRNAを同定し、かつ(または)、数量化する。適切なコントロール(例えば、ハウスキーピング遺伝子に対するプローブ)は、相対的な発現レベルを評価するための基準を提供する。

40

【0063】

NEL L - 1発現レベルを測定するための別の手段は、in situハイブリダイゼーションである。in situハイブリダイゼーション検定は、周知である(例えば、Angerer (1987) Meth. Enzymol 152: 649)。一般に、in situハイブリダイゼーションは、以下の主要なステップを含んでいる:(1)分析すべき組織または生物学的構造物の固定;(2)標的DNAの到達性を増大させるための、かつ、非特異的結合を低減させるための、生物学的構造物のプレハイブリダイゼーション処置;(3)核酸混合物の、生物学的構造物また

50

は組織内核酸に対するハイブリダイゼーション；(4)ハイブリダイゼーションにおいて結合されない核酸断片を除去するための、ポストハイブリダイゼーション洗浄；および(5)ハイブリダイズされた核酸断片の検出。これらステップのそれぞれにおいて用いられる試薬、および使用条件は、特定のアプリケーションによって異なる。

【0064】

いくつかのアプリケーションでは、反復配列のハイブリダイゼーション能力をブロックすることが必要である。従って、いくつかの実施形態では、tRNA、ヒトゲノムDNA、またはCot-1 DNAを用いて、非特異的ハイブリダイゼーションをブロックする。

【0065】

3) 増幅ベースの検定

別の実施形態では、NELL-1発現(転写)レベルを測定するのに、増幅ベースの検定を用いることができる。そのような増幅ベースの検定では、標的核酸配列(すなわち、NELL-1)は、増幅反応(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または逆転写PCR(RT-PCR))において、鋳型として作用する。定量的増幅では、増幅産物の量は、元の試料中の鋳型(例えば、NELL-1 mRNA)の量に比例することになる。適切な(例えば、試験作用剤に曝露されていない健康な組織または細胞)コントロールとの比較は、NELL-1転写物レベルの目安を提供する。

【0066】

「定量的」増幅の方法は、当業者には周知である。例えば、定量的PCRは、同じプライマーを用いて、既知の数量のコントロール配列を同時に共増幅する工程を含んでいる。これは、PCR反応の較正に使用可能な内部標準を提供する。定量的PCRの詳細なプロトコルは、Innis et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y. に提供されている。ある手法には、例えば、標的の増幅に用いられるのと同じプライマーを用いて、既知の数量のコントロール配列を同時に共増幅する工程が含まれる。これは、PCR反応の較正に使用可能な内部標準を提供する。

【0067】

好適な内部標準の一つとして合成AW106 cRNAが挙げられる。AW106 cRNAは、当業者には既知の標準的技法によって試料から単離されたRNAと、組み合わせられる。RNAは、次いで、逆転写酵素を用いて逆転写されて、コピーDNAを提供する。cDNA配列は、次いで、標識化プライマーを用いて(例えば、PCRによって)増幅される。増幅産物が、一般に電気泳動によって分離され、かつ標識化核酸の量(増幅された産物の量に比例する)が測定される。次いで、既知のAW106 RNA標準によって生成された信号との比較によって、試料中のmRNAの量が計算される。定量的PCRの詳細なプロトコルは、PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (1990) Academic Press, Inc. N.Y. に提供されている。NELL-1の既知の核酸配列は、当業者が、遺伝子の任意の部分を増幅するためのプライマーを、日常的に選択することを十分可能にする。

【0068】

4) ハイブリダイゼーションフォーマットおよびハイブリダイゼーションの最適化

a) アレイベースのハイブリダイゼーションフォーマット

一実施形態では、本発明の方法は、アレイベースのハイブリダイゼーションフォーマットで利用され得る。アレイは、一つまたはそれ以上の表面(例えば、固体、メンブレン、またはゲル)に付着させた多数の異なる「プローブ」または「標的」核酸(または他の化合物)である。好適な一実施形態では、この多数の核酸(または他の部分)を、単一の連続した表面に、あるいは、互いに並列した多数の表面に、付着させる。

【0069】

アレイフォーマットでは、多数の異なるハイブリダイゼーション反応が、本質的に「並行して」実行され得る。これは、単一の「実験」における、いくつかのハイブリダイゼーションの高速な(本質的には同時の)評価を提供する。アレイベースのフォーマットでハ

10

20

30

40

50

ハイブリダイゼーション反応を実行する方法は、当業者には周知である（例えば、Pastinen (1997) *Genome Res.* 7: 606 - 614; Jackson (1996) *Nature Biotechnology* 14:1685; Chee (1995) *Science* 274: 610; WO 96/17958, Pinkel et al. (1998) *Nature Genetics* 20: 207 - 211 を参照）。

【0070】

アレイ（特に、核酸アレイ）は、当業者には周知の多種多様な方法に従って生成され得る。例えば、単純な一実施形態では、固体の支持体（例えば、ガラス表面、メンブレンなど）の上の異なる場所の異なる核酸を、（例えば、ピペットを用いて手作業で）スポットティングすることによって、「低密度」アレイを簡単に生成することができる。

【0071】

この簡単なスポットティング法は、高密度のスポットティングされたアレイを生成するように自動化されている（例えば、米国特許第5,807,522号を参照）。この特許は、マイクロキャピラリーを表面に対して軽くたたいて少量の生体試料を沈着させる、自動化システムの使用を記述している。このプロセスを繰り返して高密度アレイを生成する。

【0072】

アレイは、オリゴヌクレオチド合成技術を用いて生成することもできる。従って、例えば、米国特許第5,143,854号およびPCT特許公開第WO 90/15070号および第92/10092号は、高密度オリゴヌクレオチドアレイの光誘導コンビナトリアル合成の使用を教示している。高密度アレイの合成は、米国特許第5,744,305号、第5,800,992号および第5,445,934号にも記述されている。

b) 他のハイブリダイゼーションフォーマット

上に示したように、各種の核酸ハイブリダイゼーションフォーマットが、当業者には既知である。例えば、一般的なフォーマットとしては、サンドイッチ検定、および競合的または置換検定が挙げられる。そのような検定フォーマットは、一般に、Hames and Higgins (1985) *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press; Gall and Pardue (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63: 378 - 383; および John et al. (1969) *Nature* 223: 582 - 587 に記述されている。

【0073】

サンドイッチ検定は、核酸配列を検出する、あるいは、単離するための、商業的に有用なハイブリダイゼーション検定である。そのような検定は、固体の支持体に共有結合で固定化された「捕捉」核酸、および溶液状の標識化「信号」核酸を利用する。試料は、標的核酸を提供することになる。「捕捉」核酸および「信号」核酸プローブは、標的核酸とハイブリダイズして、「サンドイッチ」ハイブリダイゼーション複合体を形成する。最も効果的であるためには、信号核酸は、捕捉核酸とハイブリダイズすべきでない。

【0074】

一般に、標識化信号核酸は、ハイブリダイゼーションを検出するのに用いられる。相補的核酸または信号核酸は、ハイブリダイズされたポリヌクレオチドの存在を検出するのに一般に用いられる、いくつかの方法のうちの一つによって、標識化され得る。最も一般的な検出方法は、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^{32}P 標識化プローブなどによるオートラジオグラフィーの使用である。他の標識としては、標識化抗体、フルオロフォア、化学発光剤、酵素、および標識化配位子の特異的な結合対メンバーとして働くことができる抗体に、結合する配位子が挙げられる。

【0075】

ハイブリダイゼーション複合体の検出には、信号生成複合体を、標的およびプローブポリヌクレオチドまたは核酸の二重鎖に結合する工程が必要と思われる。一般に、そのような結合は、配位子と接合したプローブと、信号と接合した抗配位子との間のように、配位子と抗配位子との相互作用を通して生じる。

【0076】

ハイブリダイゼーション検定の感度は、検出される標的核酸を増倍させる核酸増幅システムの使用を通して、増強され得る。そのようなシステムの例としては、ポリメラーゼ連

10

20

30

40

50

鎖反応 (PCR) システムおよびリガーゼ連鎖反応 (LCR) システムが挙げられる。この技術分野で最近、記述された他の方法は、核酸配列ベースの増幅 (NASBA0, Cangene, Mississauga, Ontario) および Q Beta Replicase システムである。

c) ハイブリダイゼーション条件の最適化

核酸ハイブリダイゼーションは、単に、プローブおよびその相補的標的が、相補的塩基対合を通して、安定なハイブリッド二重鎖を形成することができるような条件下で、変性したプローブおよび標的核酸を提供する工程を含んでいる。ハイブリッド二重鎖を形成しない核酸は、次いで、洗い流されて、一般に、付着した検出可能な標識の検出を通して、検出すべきハイブリダイズされた核酸が残る。核酸は、核酸を含む緩衝液の温度を上昇させること、塩濃度を低下させること、化学薬剤の添加、または pH の上昇により、変性されること、一般に認識されている。低ストリンジェンシー条件 (例えば、低い温度及び/又は高い塩濃度及び/又は高い標的濃度) の下では、アニーリングされた配列が、完璧に相補的ではない場合でも、ハイブリッド二重鎖 (例えば、DNA : DNA、RNA : RNA、または RNA : DNA) が形成されることになる。従って、より低いストリンジェンシーでは、ハイブリダイゼーションの特異性は低減される。逆に、より高いストリンジェンシー (例えば、より高い温度、あるいは、より低い塩濃度) では、ハイブリダイゼーションの成功には、ミスマッチの減少が必要となる。

10

【0077】

当業者であれば、ハイブリダイゼーション条件は、任意の程度のストリンジェンシーを提供するよう選択可能であることを理解するであろう。好適な一実施形態では、ハイブリダイゼーションを低ストリンジェンシーで行って、ハイブリダイゼーションを保証し、次いで、その後の洗浄をより高いストリンジェンシーで行って、ミスマッチしたハイブリッド二重鎖を排除する。洗浄は、所望のレベルのハイブリダイゼーションの特異性が得られるまで、次第に高いストリンジェンシーで (例えば、37 ~ 70 で、わずか 0.25 × SSPE まで)、連続的に行ってよい。ストリンジェンシーは、ホルムアミドなどの作用剤の添加によって増大させることもできる。ハイブリダイゼーションの特異性は、試験プローブとのハイブリダイゼーションを、存在することができる各種のコントロールとのハイブリダイゼーションと比較することによって、評価され得る。

20

【0078】

一般に、ハイブリダイゼーションの特異性 (ストリンジェンシー) と信号強度との間には、トレードオフの関係が存在する。従って、好適な一実施形態では、洗浄は、一貫した結果をもたらす、また、バックグラウンド強度の約 10% より大きな信号強度をもたらす、最も高いストリンジェンシーで行われる。従って、好適な一実施形態では、ハイブリダイズされたアレイを、連続的に高いストリンジェンシーの溶液で洗浄し、かつ、各洗浄間に読み取ることができる。このようにして生成されたデータセットの分析により、それより上では、ハイブリダイゼーションパターンが、認めうるほどには改変されず、かつ、関心のある特定のプローブに、適切な信号をもたらす、洗浄のストリンジェンシーが、明らかになるであろう。

30

【0079】

好適な一実施形態では、ハイブリダイゼーション中にブロッキング試薬 (例えば、tRNA、精子 DNA、cot-1 DNA など) を使用して、非特異的結合を低減することにより、バックグラウンド信号を低減する。ハイブリダイゼーションにおけるブロッキング試薬の使用は、当業者には周知である (例えば、上記 P. Tijssen の Chapter 8 を参照)。

40

【0080】

ハイブリダイゼーション条件を最適化する方法は、当業者には周知である (例えば、Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 2 4: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Elsevier, N.Y. を参照)。

【0081】

至適な条件は、基板の種類、蛍光色素、励起バンドおよび放出バンド、スポットの大き

50

さなどの異なる組合せに対する、標識（例えば、蛍光）検出の感度の関数でもある。蛍光バックグラウンドが低い表面を使用することができる（例えば、Chu (1992) *Electrophoresis* 13:105 - 114 を参照）。候補表面上の各種の直径のスポット（「標的エレメント」）の検出の感度は、例えば、蛍光的に末端標識されたDNA断片の希釈系列をスポットティングすることによって、容易に測定することができる。これらスポットは、次いで、従来の蛍光顕微鏡法を用いて撮像することができる。従って、蛍光色素と固体表面（例えば、ガラス、熔融シリカなど）との各種の組合せから実現可能な、感度、線形性、およびダイナミックレンジを、測定することができる。既知の相対比率における蛍光色素のペアの系列希釈を分析することもできる。これは、その上にプローブが固定されている基板の、検出器および蛍光によって許されたダイナミックレンジにわたって、蛍光比測定が実際の蛍光色素比を反映する精度を測定する。

10

d) 核酸の標識化および検出

本文書で、NELL-1 発現レベルの検出のために用いられるプローブは、NELL-1 mRNAの全長であってもよく、あるいは、全長より短くてもよい。より短いプローブは、特異性について実験的に試験される。好適なプローブは、ストリンジェントな条件下で、NELL-1 標的核酸と特異的にハイブリダイズするほど十分に長い。好適な大きさは、約20塩基からNELL-1 mRNAの長さの範囲にあり、より望ましくは、約30塩基からNELL-1 mRNAの長さであり、最も望ましくは、約40塩基からNELL-1 mRNAの長さである。

【0082】

プローブは、一般に、検出可能な標識で標識化される。本発明での使用に適した検出可能な標識としては、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段によって検出可能な、任意の組成物が挙げられる。本発明における有用な標識としては、標識化ストレプトアビジン接合体による染色のためのビオチン、磁気ビーズ（例えば、DynabeadsTM）、蛍光染料（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質などが挙げられる。例えば、(Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA を参照)、放射性標識（例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³²P）、酵素（例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性フォスファターゼ、およびELISAで一般に用いられるその他の酵素）、およびコロイド金（例えば、直径の大きさ40~80nmの範囲の金粒子は、高効率で緑色の光を散乱する）または着色されたガラスまたはプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）のビーズなどの比色定量標識が挙げられる。そのような標識の使用を教示している特許としては、米国特許第3,817,837号；第3,850,752号；第3,939,350号；第3,996,345号；第4,277,437号；第4,275,149号；および第4,366,241号が挙げられる。

20

30

【0083】

蛍光標識は、低いバックグラウンドで非常に強力な信号を提供するため、好適である。それは、また、高速なスキャン手順を通して、高い分解能および感度で、光学的に検出可能である。核酸試料は、全て、単一の標識（例えば、単一の蛍光標識）で標識化され得る。別法として、別の実施形態では、各核酸試料が異なる標識を有する場合に、異なる核酸試料を、同時にハイブリダイズすることができる。例えば、一つの標的は、緑色の蛍光標識を有することができ、また、二番目の標的は、赤色の蛍光標識を有することができる。スキャンングステップでは、赤色の標識の結合部位が、緑色の蛍光標識を結合している部位から識別されることになる。各核酸試料（標的核酸）は、互いに独立して分析され得る。

40

【0084】

利用することができる適当な色原体としては、ある色が観察され得るよう特有の波長帯の光を吸収する、あるいは、別法として、特定の波長または波長帯の放射線を照射されると光を放出する、分子および化合物（例えば、蛍光料）が挙げられる。

【0085】

50

望ましくは、蛍光標識は、約300nmを超える、望ましくは、約350nmを超える、より望ましくは、約400nmを超える光を吸収し、通常、吸収された光の波長より約10nm高い波長より大きな波長で放出すべきである。結合した染料の吸収および放出の特性は、結合していない染料とは異なっており、よいことに注目したい。従って、染料の各種の波長帯および特性を指す場合、利用された染料を示すことを意図しており、任意の溶媒内で、未接合であり、かつ、特性決定された染料を示すことは、意図していない。

【0086】

蛍光料は、光を蛍光料に照射することによって、複数の放出体を得ることができるため、一般に好適である。従って、単一の標識が、複数の測定可能な事象を提供し得る。

【0087】

検出可能な信号はまた、化学発光源および生物発光源によっても提供され得る。化学発光源としては、化学反応によって電子的に励起し、次いで、検出可能な信号として働く、あるいは、蛍光アクセプターにエネルギーを供与する、光を放出することができる化合物が挙げられる。別法として、ルシフェリンとルシフェラーゼまたはルシゲニンとを併用して、生物発光をもたらすことができる。

【0088】

スピン標識は、電子スピン共鳴(ESR)分光法によって検出され得る不対電子スピンを有するレポーター分子によって、もたらされる。代表的なスピン標識としては、有機フリーラジカル、遷移金属複合体(特に、バナジウム、銅、鉄、およびマンガン)などが挙げられる。代表的なスピン標識としては、窒素酸化物フリーラジカルが挙げられる。

【0089】

標識は、ハイブリダイゼーションに先立って、あるいは、その後、標的(試料)核酸に付加することができる。いわゆる「直接標識」は、ハイブリダイゼーションに先立って、標的(試料)核酸に、直接的に、付着させる、あるいは、取り込ませる、検出可能な標識である。対照的に、いわゆる「間接標識」は、ハイブリダイゼーション後に、ハイブリッド二重鎖につながられる。間接標識は、ハイブリダイゼーションに先立って標的核酸に付着された結合部分に、付着されることが多い。従って、例えば、標的核酸は、ハイブリダイゼーション前に、ピオチン化され得る。ハイブリダイゼーション後、アビジンと接合したフルオロフォアは、ピオチンを持つハイブリッド二重鎖と結合して、簡単に検出される標識を提供することになる。核酸を標識化し、かつ、標識化ハイブリダイズされた核酸を検出する方法の詳細なレビューについては、Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24: Hybridization With Nucleic Acid Probes, P. Tijssen, ed. Elsevier, N.Y., (1993)を参照する。

【0090】

蛍光標識は、インビトロでの転写反応中に、簡単に付加される。従って、例えば、フルオレセイン標識化UTPおよびCTPは、インビトロの転写において産生されたRNAに取り込まれ得る。

【0091】

標識は、直接的に、あるいは、リンカー部分を通して、付着させることができる。一般に、標識またはリンカー標識の付着の部位は、何らかの特異的な位置に限定されない。例えば、標識は、検出またはハイブリダイゼーションに干渉しない任意の位置のヌクレオシド、ヌクレオチド、またはそれらの類縁体に、必要に応じて、付着させることができる。例えば、Clontech(Palo Alto, CA)製のある種のLabel-ON Reagentは、オリゴヌクレオチドのリン酸バックボーンの全体にわたって分散された標識化、および、3'末端および5'末端における末端標識化を提供する。本文書で例示されているように、標識は、リボース環上の位置に付着させることができ、あるいは、リボースを、修飾することができる、必要なら、排除することすらできる。有用な標識化試薬の塩基部分としては、自然発生のもの、あるいは、それらが供される目的に干渉しないやり方で修飾されたものが挙げられる。修飾塩基としては、7-デアザAおよびG、7-デアザ-8-アザAおよびG、および、他の複素環式部分が挙げられるが、それらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0092】

蛍光標識は、単一の種の有機分子に限定されるものではなく、無機分子、有機及び/又は無機分子の多分子の混合物、結晶、ヘテロ重合体などを含んでいることが認識されるであろう。従って、例えば、シリカシェル内に封入されたCdSe-CdSコアシェルナノ結晶を、誘導体化して、生体分子に結合することが容易にできる (Bruchez et al. (1998) Science, 281: 2013 - 2016)。同様に、高蛍光性量子ドット (硫化亜鉛を被覆したセレン化カドミウム) が、超高感度の生物学的検出で使用するための生体分子に、共有結合で結合される (Warren and Nie (1998) Science, 281: 2016 - 2018)。

【0093】

B) ポリペプチドベースの検定

1) 検定フォーマット

NE LL - 1 核酸発現レベルの検出に加えて、あるいは、その別法として、翻訳された NE LL - 1 ポリペプチドの量及び/又は活性を検出し、かつ (または)、数量化することによって、NE LL - 1 の発現における変化を検出し、かつ (または)、数量化することができる。

【0094】

2) 発現された蛋白質の検出

NE LL - 1 によってコード化されたポリペプチドは、当業者には周知のいくつかの方法のうちいずれかによって、検出し、かつ、数量化することができる。これら方法としては、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、薄層クロマトグラフィー (TLC)、高拡散クロマトグラフィーなどの分析用の生化学的方法、あるいは、液体またはゲル沈降反応、免疫拡散法 (一元または二重)、免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)、免疫蛍光検定、ウエスタンブロッティングなどの各種の免疫学的方法が挙げられる。

【0095】

好適な一実施形態では、電気泳動による蛋白質分離 (例えば、一次元または二次元電気泳動) において、NE LL - 1 ポリペプチドが、検出/数量化される。電気泳動技法を用いて蛋白質を検出する手段は、当業者には周知である (一般に、R. Scopes (1982) Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher, (1990) Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc., N.Y. を参照)。

【0096】

別の好適な実施形態では、試料中の本発明のポリペプチドの存在を検出し、かつ、数量化するのに、ウエスタンブロット (免疫ブロット) 分析が用いられる。この技法は、一般に、分子量に基づいて、ゲル電気泳動によって、試料蛋白質を分離する工程、分離された蛋白質を、適当な固体の支持体 (ニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルター、または誘導体化されたナイロンフィルターなど) に移し取る工程、および、標的ポリペプチドと特異的に結合する抗体と共に、試料をインキュベーションする工程を含んでいる。

【0097】

抗体は、標的ポリペプチドに特異的に結合し、かつ、直接的に標識化され得る、あるいは、別法として、抗体のドメインに特異的に結合する標識化抗体 (例えば、標識化羊抗マウス抗体) を用いて、その後、検出され得る。

【0098】

好適な実施形態では、NE LL - 1 ポリペプチドは、免疫検定を用いて検出される。本文書で用いられるような免疫検定とは、抗体を利用して、分析物 (例えば、標的ポリペプチド) に特異的に結合する検定である。従って、免疫検定は、他の物理的または化学的性質を使用するのは反対に、抗体に対する本発明のポリペプチドの特異的結合を検出して、分析物を単離し、標的化し、かつ、数量化することを特徴とする。

【0099】

いくつかのよく知られている免疫学的結合検定 (例えば、米国特許第 4, 366, 241 号; 第 4, 376, 110 号; 第 4, 517, 288 号; および第 4, 837, 168

10

20

30

40

50

号を参照)のうちのいずれも、本文書で同定されるポリペプチドの検出または数量化にとって好適である。一般的な免疫検定のレビューについては、Asai (1993) *Methods in Cell Biology* Volume 37: *Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc. New York; Stites & Terr (1991) *Basic and Clinical Immunology* 7th Edition も参照する。

【0100】

免疫学的結合検定(または免疫検定)は、一般に、「捕獲作用剤(capture agent)」を利用して、分析物(NELL-1ポリペプチド)に特異的に結合し、かつ、それを固定化することが多い。好適な実施形態では、捕獲作用剤は、抗体である。

【0101】

免疫検定では、標識化作用剤を利用して、捕獲作用剤および分析物によって形成された結合複合体に特異的に結合し、かつ、それを標識化することも多い。標識化作用剤は、それ自体、抗体/分析物複合体を含む部分のうちの一つであってよい。従って、標識化作用剤は、すでに結合された標的ポリペプチドを特異的に認識する、標識化ポリペプチドまたは標識化抗体であってよい。別法として、標識化作用剤は、捕獲作用剤/ポリペプチド複合体に特異的に結合する、別の抗体など、三番目の部分であってよい。

【0102】

プロテインAまたはプロテインGなど、免疫グロブリン定常領域と特異的に結合することができる他の蛋白質を、標識作用剤として使用してもよい。これら蛋白質は、連鎖球菌の細胞壁の通常の構成要素である。それらは、各種の種からの免疫グロブリン定常領域と、強い非免疫原性の反応性を示す(一般に、Kronval, et al. (1973) *J. Immunol.*, 111: 1401 - 1406, and Akerstrom (1985) *J. Immunol.*, 135: 2589 - 2542 を参照)。

【0103】

標的ポリペプチドを検出するための好適な免疫検定は、競合的または非競合的である。非競合的免疫検定は、捕獲された分析物の量が、直接的に測定される検定である。好適な「サンドイッチ」検定の一つでは、例えば、捕獲作用剤(抗体)を、それらが固定化される固体の基板に、直接的に結合させることができる。これら固定化された抗体は、次いで、試験試料内に存在する標的ポリペプチドを捕獲する。このようにして固定化された標的ポリペプチドは、次いで、標識を持つ二番目の抗体などの標識化作用剤によって結合される。

【0104】

競合的検定では、試料内に存在する分析物によって、捕獲作用剤(抗体)から置換された(あるいは、競合により除去された)、添加された(外来の)分析物の量を測定することによって、試料内に存在する分析物(NELL-1ポリペプチド)の量が、間接的に測定される。競合的検定の一つでは、既知量の(この場合は)標識化ポリペプチドを、試料に添加し、この試料を、次いで、捕獲作用剤と接触させる。抗体に結合した標識化ポリペプチドの量は、試料内に存在する標的ポリペプチドの濃度に反比例する。

【0105】

特に好適な一実施形態では、抗体は、固体の基板上に固定化される。抗体に結合した標的ポリペプチドの量は、ポリペプチド/抗体複体内に存在する標的ポリペプチドの量を測定することによって、あるいは、別法として、残りの非複合化ポリペプチドの量を測定することによって、測定することができる。

【0106】

本発明の免疫検定方法としては、利用される特定のプロトコルに応じて、単独で、あるいは、組み合わせで、NELL-1ポリペプチドと結合する、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体または抗体断片、あるいは、単鎖抗体の、標識化されていない、あるいは、標識化(例えば、酵素で標識化された)誘導体を利用する、酵素免疫検定(EIA)が挙げられる。NELL-1ポリペプチドと結合する抗体が標識化されない場合は、異なる検出可能なマーカー(例えば、NELL-1ポリペプチドと結合するモノクローナル抗体に結合することができる、酵素で標識化された抗体)を、利用することができる。EIAの既知の変法(例えば、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA))のうちのいずれを利用

10

20

30

40

50

してもよい。上に示したように、酵素検出システムを利用した、ウエスタンブロッティングなどの、免疫ブロッティングによる免疫検定技法も、本発明によって企図されている。

【0107】

本発明の免疫検定方法は、他の既知の免疫検定方法（例えば、フルオレセインまたはローダミンなどの蛍光物質の抗体接合体または抗原接合体を用いた蛍光免疫検定、抗体で被覆した、あるいは、抗原で被覆したラテックス粒子を用いたラテックス凝集反応、抗体で被覆した、あるいは、抗原で被覆した赤血球を用いた赤血球凝集反応、および、アビジン-ビオチンまたはストレプトアビジン-ビオチン検出システムを利用した免疫検定など）であってもよい。

【0108】

本発明の免疫検定で利用される特定のパラメータは、試料中の抗原の濃度、試料の性質、利用される免疫検定の種類などの各種の要因によって、大幅に変化してよい。至適な条件は、当業者によって容易に確立され得る。ある種の実施形態では、NELL-1ポリペプチドと結合する抗体の量は、一般に、試料の不在下で、検出可能なマーカーの50%の結合をもたらすよう選択される。精製された抗体が抗体源として使用される場合は、検定当りに使用される抗体の量は、一般に、約1ng～約100ngの範囲であろう。代表的な検定条件としては、約4～約45、望ましくは、約25～約37、最も望ましくは、約25の温度範囲、約5～9、望ましくは、約7のpH値範囲、および、蒸留水のイオン強度から、約0.2M塩化ナトリウムのイオン強度、望ましくは、約0.15M塩化ナトリウムのイオン強度まで亘るイオン強度が挙げられる。時間は、検定の種類によって大幅に変わり、一般に、約0.1分間～約24時間の範囲であろう。多種多様な緩衝液（例えば、PBS）を利用することができ、かつ、イオン強度を増強するための塩などの他の試薬、血清アルブミンなどの蛋白質、安定剤、殺生物剤および非イオン性洗剤を含んでいてもよい。

【0109】

本発明の検定は、当業者には周知の標準的な方法に従って、（陽性または陰性、あるいは、標的ポリペプチドの量として）採点（score）される。特定の採点方法は、検定フォーマット、および標識の選択によって異なることになる。例えば、ウエスタンブロット検定は、酵素標識によって生成された、着色された生成物を描出することによって、採点することができる。正しい分子量での、はっきりと目に見える着色されたバンドまたはスポットは、陽性の結果として採点され、一方、はっきりと目に見えるスポットまたはバンドの不在は、陰性として採点される。バンドまたはスポットの強度は、標的ポリペプチドの濃度の定量的目安を提供することができる。

【0110】

本文書で述べる各種の免疫検定で使用するための抗体は、市販されているか、あるいは、以下に述べるように、生成することができる。

【0111】

3) NELL-1ポリペプチドに対する抗体

本文書で述べる本発明の免疫検定においては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれを使用してもよい。ポリクローナル抗体は、望ましくは、適当なヒト以外の哺乳類への、実質的に純粋なポリペプチドまたは抗原性ポリペプチドの、複数回注射（例えば、皮下または筋肉内注射）によって産生される。標的ペプチドの抗原性は、ペプチドで免疫化された動物の抗体反応の大きさを測定するための従来技法によって、測定され得る。一般に、本発明の方法で使用するための抗体を産生するのに用いられるペプチドは、一般に、NELL-1によってコード化された標的ポリペプチドに対して、比較的高い親和性を有する、高力価の抗体の産生を誘発するものであるべきである。

【0112】

必要なら、この技術分野において周知の技法を用いて、接合により、免疫ペプチドをキャリア蛋白質に結合してよい。ペプチドに化学的に結合される、そのような一般に用いられるキャリアとしては、キーホールリンベットヘモシニアン（KLH）、チログロブリン

10

20

30

40

50

、ウシ血清アルブミン (B S A)、および破傷風トキソイドが挙げられる。次いで、結合されたペプチドを用いて、動物 (例えば、マウスまたはウサギ) を免疫化する。

【 0 1 1 3 】

次いで、哺乳類から採取された血液試料から、抗体を得る。ポリクローナル抗体を作成するのに用いられる技法は、この技術分野において既知である (例えば、Methods of Enzymology, "Production of Antisera With Small Doses of Immunogen: Multiple Intradermal Injections", Langone, et al. eds. (Acad. Press, 1981) を参照)。動物によって産生されるポリクローナル抗体は、例えば、それに対して該抗体が産生されたペプチドが結合している基質への結合、および、該基質からの溶出によって、さらに精製することができる。当業者には、ポリクローナル抗体、並びに、モノクローナル抗体の精製及び / 又は濃縮のための、免疫学の技術で一般的な各種の技法は、既知であろう (例えば、Coligan, et al. (1991) Unit 9, Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience を参照)。

10

【 0 1 1 4 】

しかしながら、望ましくは、産生される抗体は、モノクローナル抗体 (「 m A b 」) である。モノクローナル抗体の調製のためには、マウスまたはラットの免疫化が望ましい。本発明で使用される用語「抗体」は、無傷の分子、並びに、F a b および F (a b ') ² 1 など、それらの断片、及び / 又は、抗原決定基と結合することができる単鎖抗体 (例えば、s c F v) を含んでいる。また、この状況において、用語「本発明の m a b 」は、N E L L - 1 ポリペプチドによってコード化されたポリペプチドに対して特異性を有するモノクローナル抗体を指す。

20

【 0 1 1 5 】

m A b を分泌するハイブリドーマの産生に用いられる一般的な方法は、周知である (Kohler and Milstein (1975) Nature, 256:495)。簡潔に言えば、Kohler および Milstein が述べているように、この技法は、黒色腫、奇形癌腫、あるいは、頸部、神経膠腫または肺の癌を有する 5 人の個別の癌患者の、領域性の流入領域リンパ節から、リンパ球を単離する工程 (ここで、試料は、外科検体から得られた)、細胞をプールする工程、および細胞を S H F P - 1 で融合する工程を含んでいた。ハイブリドーマをスクリーニングして、癌細胞ラインに結合される抗体を産生した。m A b 間の特異性の確認は、比較的日常的なスクリーニング技法 (酵素結合免疫吸着検定法、または「E L I S A」など) を用いて、関心のある m A b の素反応パターンを判定することにより、実現可能である。

30

【 0 1 1 6 】

抗体断片 (例えば、単鎖抗体 (s c F v など)) は、ファージディスプレイ技術を用いて、産生 / 選択することができる。細菌に感染するウイルス (バクテリオファージまたはファージ) の表面上で抗体断片を発現する能力は、例えば、 10^{10} を超える非結合クロンのライブラリーから、単一の結合抗体断片を単離することを可能にする。ファージの表面上で抗体断片を発現する (ファージディスプレイする) ためには、ファージ表面蛋白質 (例えば、p I I I) をコード化する遺伝子に、抗体断片遺伝子を挿入し、かつ、抗体断片 - p I I I 融合蛋白質を、ファージ表面上でディスプレイする (McCafferty et al. (1990) Nature, 348: 552 - 554; Hoogenboom et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4133 - 4137)。

40

【 0 1 1 7 】

ファージの表面上の抗体断片は機能的であるため、抗原親和性クロマトグラフィーによって、非結合ファージから、ファージを持つ抗原結合抗体断片を分離することができる (McCafferty et al. (1990) Nature, 348: 552 - 554)。抗体断片の親和性に応じて、ただ一回の親和性選択に対して、20 倍 ~ 1,000,000 倍の濃縮係数が得られる。しかしながら、溶出されたファージを細菌に感染させることによって、より多くのファージを育成し、かつ、別の回の選択の対象としてよい。このようにして、一回で 1000 倍の濃縮を、二回の選択で 1,000,000 倍にすることができる (McCafferty et al. (1990) Nature, 348: 552 - 554)。従って、濃縮度が低い場合でも (Marks et al. (1991) J.

50

Mol. Biol. 222: 581 - 597)、多数回の親和性選択は、希少なファージの単離をもたらすことができる。抗原に関するファージ抗体ライブラリーの選択は、濃縮をもたらすため、わずか3～4回の選択の後に、クローンの過半数が、抗原と結合する。従って、比較的少数のクローン(数百)のみを、抗原に対する結合について分析すればよい。

【0118】

ヒト抗体は、ファージ上に、非常に大きく、かつ、多様なV遺伝子レパートリーをディスプレイすることによって、事前の免疫化なしに産生することが出来る(Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581 - 597)。一実施形態では、ヒト末梢血リンパ球内に存在する天然のV_HおよびV_Lレパートリーを、PCRによって、免疫化されていないドナーから単離した。PCRを用いて、V遺伝子レパートリーをランダムに共にスプライシングして、scFv遺伝子レパートリーを創出し、該scFv遺伝子レパートリーをファージベクター内にクローニングして、3千万のファージ抗体からなるライブラリーを創出した(同著)。この単一の「ナープ」ファージ抗体ライブラリーから、ハプテン、多糖類および蛋白質を含む、17を超える異なる抗原に対して、結合抗体断片が単離されている(Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581 - 597; Marks et al. (1993). Bio/Technology. 10: 779 - 783; Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12: 725 - 734; Clackson et al. (1991) Nature. 352: 624 - 628)。ヒトチログロブリン、免疫グロブリン、腫瘍壊死因子およびCEAを含む、自己蛋白質に対して、抗体が産生されている(Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12: 725 - 734)。無傷の細胞に関して、直接的に選択することによって、細胞表面抗原に対する抗体を単離することも可能である。抗体断片は、選択に用いられる抗原に対してきわめて特異的であり、かつ、1: M ~ 100 nMの範囲の親和性を有している(Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222: 581 - 597; Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12: 725 - 734)。より大きなファージ抗体ライブラリーは、より大きな比率の抗原に対して、より高い結合親和性を持つより多くの抗体の単離をもたらす。

【0119】

抗体が、いくつかの商用サービス(例えば、Berkeley antibody laboratories, Bethyl Laboratories, Anawa, Eurogenetecなど)のうちのいずれによっても調製され得ることも、認識されるであろう。

【0120】

C) 検定の最適化

本発明の検定は、スクリーニングによって、細胞、組織または生物のNELL-1発現を調整する作用剤を求める場合に、即時の有用性を有している。本発明の検定は、例えば、生体試料及び/又は特定の試験作用剤の由来及び/又は性質、及び/又は、利用可能な分析設備に応じて、特定の状況での使用に向けて最適化することができる。従って、例えば、最適化は、結合検定のための至適な条件、最適な試料処置条件(例えば、好適なPCR条件)、信号対雑音比を最大化するハイブリダイゼーション条件、スループットを向上させるプロトコルなど、を決定する工程を含むことができる。さらに、検定フォーマットは、機器及び/又は試薬の利用可能性に従って、選択し、かつ(または)、最適化することができる。従って、例えば、市販の抗体またはELISAキットが利用可能な場合は、蛋白質濃度を検定することが望ましいと思われる。逆に、スクリーニングによって、転写NELL-1遺伝子を改変するモジュレーターを得ることが望ましい場合は、核酸ベースの検定が望ましい。

【0121】

検定フォーマットの日常的な選択および最適化は、当業者には周知である。

II. NELL-1と結合する作用剤のプレスクリーニング

ある種の実施形態では、NELL-1核酸またはポリペプチドと相互作用する(例えば、ポリペプチドに特異的に結合する)能力について、試験作用剤をプレスクリーニングすることが望ましい。特異的に結合する試験作用剤は、相互作用する可能性がより高く、かつ、それによって、NELL-1発現及び/又は活性を調整する可能性がより高い。従って、いくつかの好適な実施形態では、試験作用剤は、NELL-1核酸への、あるいは、

10

20

30

40

50

N E L L - 1 蛋白質への結合性についてプレスクリーニングしてから、上述のより複雑な検定を行う。

【 0 1 2 2 】

一実施形態では、そのようなプレスクリーニングは、単純な結合検定を用いて実現される。核酸に対する、あるいは、蛋白質に対する、特定の配位子の特異的結合または結合親和性を検定する手段は、当業者には周知である。好適な結合検定では、N E L L - 1 蛋白質または核酸が、(標識化され得る) 試験作用剤に固定化され、かつ、曝露され、あるいは、別法として、試験作用剤が、(標識化され得る) N E L L - 1 蛋白質に、あるいは、N E L L - 1 核酸に固定化され、かつ、曝露される。固定化された部分は、次いで、洗浄されて、未結合材料の全てが除去され、かつ、結合した試験作用剤または結合した N E L L - 1 核酸または蛋白質が、(例えば、結合した分子に付着させた標識の検出によって) 検出される。固定化された標識の量は、N E L L - 1 蛋白質または核酸と、試験作用剤との間の結合の程度に比例する。

10

20

30

40

50

I I I . スクリーニングのための作用剤

一実施形態では、上述した検定は、N E L L - 1 の存在または不在を検出する、あるいは、N E L L - 1 の発現を数量化する方法を提供したが、同じ検定が、スクリーニングによって、M T - S P 1 セリンプロテアーゼの発現及び / 又は活性を調整する作用剤を求める為に使用可能であることは、理解されるであろう。スクリーニングによって、潜在的なモジュレーターを求める場合、上述した検定は、一つまたはそれ以上の試験作用剤の存在下で行われ、あるいは、一つまたはそれ以上の試験作用剤に曝露された、細胞及び / 又は組織及び / 又は器官及び / 又は生物からの生体試料を用いて行われる。M T - S P 1 の活性及び / 又は発現レベルは、測定され、かつ、好適な一実施形態では、「コントロール」検定 (例えば、同じ検定で試験作用剤を欠いているもの) において観察された活性レベルと比較される。コントロール検定と比較された場合の、「試験」検定における M T - S P 1 の発現及び / 又は活性の差は、試験作用剤が、S P 1 の発現及び / 又は活性の「モジュレーター」であることを示している。

【 0 1 2 3 】

好適な一実施形態では、本発明レベルの検定は、測定された蛋白質または核酸レベル、あるいは、蛋白質活性が、コントロール試料について、測定された、あるいは、既知であるレベル (例えば、推定上のモジュレーター (試験作用剤) に曝露されていない同じ種の哺乳類の、通常健康な細胞、組織または器官について既知である、あるいは、測定されたレベル、あるいは、同じ個体について、異なる組織及び / 又は異なる時点で測定された「ベースライン / 参照」レベル) より大きい場合に、陽性の結果 (例えば、高発現及び / 又は M T - S P 1 活性、遺伝子) を示していると考えられる。特に好適な一実施形態では、検定は、試料と「コントロール」との間の差が統計的に有意 (例えば、85% またはそれ以上の、望ましくは、90% またはそれ以上の、より望ましくは、95% またはそれ以上の、最も望ましくは、98% またはそれ以上の信頼水準) である場合に、陽性の結果を示していると考えられる。

I V . ハイスループットスクリーニング

本発明の検定は、「ハイスループット」形式にも適している。従来、有用な性質 (例えば、N E L L - 1 発現または活性の調整) を有する新しい化学物質は、何らかの望ましい性質または活性を有する化合物 (「リード化合物」と呼ばれる) を同定し、リード化合物の変異体を創出し、かつ、それら変異化合物の性質および活性を評価することによって、生成される。しかしながら、現在の傾向は、創薬の全ての側面について時間尺度を短縮するものである。多数のものを高速かつ効率的に試験できるため、ハイスループットスクリーニング (H T S) 法が、従来のリード化合物同定法に取って代わりつつある。

【 0 1 2 4 】

好適な一実施形態では、ハイスループットスクリーニング法は、潜在的に所望の活性を有する多数の化合物 (候補化合物) を含むライブラリーを提供する工程を含んでいる。そのような「コンビナトリアルケミカルライブラリー」は、次いで、本文書で述べるように

、一つまたはそれ以上の検定でスクリーニングして、所望の特徴的な活性を示すライブラリーメンバー（特定の化学種または亜綱）を同定する。このようにして同定された化合物は、従来の「リード化合物」として働くことができ、あるいは、それ自体、潜在的な、あるいは、実際の治療薬として使用され得る。

【 0 1 2 5 】**A) コンビナトリアルケミカルライブラリー**

最近、新しい化合物リードの生成を支援するコンビナトリアルケミカルライブラリーの使用が、注目されている。コンビナトリアルケミカルライブラリーは、試薬など、いくつかの化学的「ビルディングブロック」を組み合わせることによる、化学合成または生物合成によって生成される、多様な化合物の集合体である。例えば、ポリペプチドライブラリーなどの線形のコンビナトリアルケミカルライブラリーは、与えられた化合物の長さ（すなわち、ポリペプチド化合物内のアミノ酸の数）について、あらゆる可能な方法で、アミノ酸と呼ばれる一組の化学的ビルディングブロックを組み合わせることによって形成される。化学的ビルディングブロックのそのようなコンビナトリアル混合を通して、数百万の化合物を合成することができる。例えば、ある評論家は、100の可換的な化学的ビルディングブロックの、体系的なコンビナトリアル混合は、1億の四量体化合物または100億の五量体化合物の理論上の合成をもたらす、と述べている（Gallop et al. (1994) 37(9): 1233 - 1250）。

10

【 0 1 2 6 】

コンビナトリアルケミカルライブラリーの作製およびスクリーニングは、当業者には周知である。そのようなコンビナトリアルケミカルライブラリーとしては、ペプチドライブラリー（例えば、米国特許第5,010,175号、Furka (1991) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37: 487 - 493, Houghton et al. (1991) *Nature*, 354: 84 - 88 を参照）が挙げられるが、それらに限定されない。ペプチド合成は、決して、本発明との使用について想定され、かつ、意図された、唯一の手法ではない。化学多様性ライブラリーを生成するための他の化学物質を使用することもできる。そのような化学物質としては、ペプチド（PCT公開第WO 91/19735号、1991年12月26日）、コード化ペプチド（PCT公開第WO 93/20242号、1993年10月14日）、ランダムパイオオリゴマー（PCT公開第WO 92/00091号、1992年1月9日）、ベンゾジアゼピン（米国特許第5,288,514号）、ヒダントイン、ベンゾジアゼピンおよびジペプチドなどのディバーゾマー（diversomer）（Hobbs et al., (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 6909 - 6913）、ピニロガスポリペプチド（Hagihara et al. (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 6568）、 β -D-グルコース骨格を有する非ペプチジルペプチド模倣薬（Hirschmann et al., (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 9217 - 9218）、小型化合物ライブラリーの類似有機合成物（Chen et al. (1994) *J. Amer. Chem. Soc.* 116: 2661）、オリゴカルバミン酸塩（Cho, et al., (1993) *Science* 261:1303）、及び/又はペプチジルホスホン酸塩（Campbell et al., (1994) *J. Org. Chem.* 59: 658）が挙げられるが、それらに限定されない。一般に、Gordon et al., (1994) *J. Med. Chem.* 37: 1385、核酸ライブラリー（例えば、Strategene, Corp. を参照）、ペプチド核酸ライブラリー（例えば、米国特許第5,539,083号を参照）、抗体ライブラリー（例えば、Vaughn et al. (1996) *Nature Biotechnology*, 14(3): 309 - 314、および PCT/US96/10287 を参照）、炭水化物ライブラリー（例えば、Liang et al. (1996) *Science*, 274: 1520 - 1522、および米国特許第5,593,853号を参照）、および小型有機分子ライブラリー（例えば、ベンゾジアゼピン、Baum (1993) *C&EN*, Jan 18, page 33、イソプレノイド、米国特許第5,569,588号、チアゾリジノンおよびメタチアザノン、米国特許第5,549,974号、ピロリジン、米国特許第5,525,735号および第5,519,134号、モルフォリーノ化合物、米国特許第5,506,337号、ベンゾジアゼピン、第5,288,514号などを参照）を参照する。

20

30

40

【 0 1 2 7 】

コンビナトリアルライブラリーの作製のための装置は、市販されている（例えば、357

50

MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Wobum, MA, 43 3A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA を参照)。

【0128】

溶液相化学物質について、いくつかの周知のロボットシステムも開発されている。これらシステムとしては、武田薬品工業（大阪、日本）によって開発された自動化合成装置のような自動化ワークステーション、および化学者によって行われる手作業の合成操作を模倣した、ロボットアームを利用した多くのロボットシステム（Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.）が挙げられる。上記の装置のうちのいずれも、本発明に使用するのに適している。これら装置を、本文書で述べるように動作できるようにする、これら装置への変更（もしあれば）の種類および実施は、関連技術に長けた人には明らかであろう。さらに、多数のコンビナトリアルライブラリーが、それ自体で、市販されている（例えば、ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscow, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, MO, ChemStar, Ltd, Moscow, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MDなどを参照）。

10

【0129】

B) ケミカルライブラリーのハイスループット検定

NELL-1の発現を調整するもの、あるいは、NELL-1ポリペプチドの結合特異性及び/又は活性を改変するものについての検定のうちのいずれも、ハイスループットスクリーニングに適している。上述したように、NELL-1発現が骨の石灰化に関連していることが判定されたため、可能性の高いモジュレーターは、骨の石灰化を阻害するか、あるいは、増大させるか、のいずれかである。従って、好適な検定は、試験化合物による転写の阻害（すなわち、mRNA産生の阻害）、試験化合物による蛋白質発現の阻害、あるいは、試験化合物による遺伝子（例えば、gDNA、またはcDNA）または遺伝子産物（例えば、mRNAまたは発現された蛋白質）への結合を検出する。別法として、検定は、NELL-1ポリペプチドの特徴的な活性の阻害を検出することができる。

20

【0130】

特定の核酸または蛋白質産物の存在、不在についての、あるいは数量化のためのハイスループット検定は、当業者には周知である。同様に、結合検定も同様に周知である。従って、例えば、米国特許第5,559,410号は、蛋白質についてのハイスループットスクリーニング法を開示しており、米国特許第5,585,639号は、核酸結合（すなわち、アレイ内の）についてのハイスループットスクリーニング法を開示しており、一方、米国特許第5,576,220号および第5,541,061号は、配位子/抗体結合についてスクリーニングするハイスループット方法を開示している。

30

【0131】

さらに、ハイスループットスクリーニングシステムは、市販されている（例えば、Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MAなどを参照）。これらシステムは、一般に、全ての試料および試薬のピペティング、液体分注、定時インキュベーション、および検定にとって適切な検出器内のマイクロプレートの最終的な読取りを含む、手順全体を自動化する。これら構成可能なシステムは、ハイスループットおよび迅速な起動、並びに、高度な融通性およびカスタマイゼーションを提供する。そのようなシステムの製造業者は、各種のハイスループットのための詳細なプロトコルを提供している。従って、例えば、Zymark Corp. は、遺伝子転写、配位子結合などの調整を検出するためのスクリーニングシステムを記述した技術告示を提供している。

40

V. NELL-1核酸及び/又はポリペプチドを用いた骨の石灰化の増進

さらに別の実施形態では、本発明は、骨成長を増強するための方法および組成物を提供する。これは、外傷、癌手術または発生上の異常、骨形成不全症の治療、骨粗鬆症の治療、および、重い、または軽い骨折の治療の結果として生じる欠損を再構築するために使用されるような、骨の再構築を含むが、それらに限定されない、各種の状況で有用である。

50

【0132】

これら方法は、一般に、骨における、あるいは、その近傍の、あるいは、骨祖先細胞（bone progenitor cell）における、あるいは、その内部の、NELL-1蛋白質濃度を上昇させる工程、及び/又は、細胞（例えば、骨祖先細胞）と、NELL-1ポリペプチド、あるいは、NELL-1ポリペプチドをコード化するベクターとを接触させる工程を含んでいる。これは、骨前駆細胞が、高レベルの内在性のNELL-1を発現するよう、あるいは、骨前駆細胞が、外来の形質移入されたNELL-1核酸からのNELL-1を発現するよう、骨前駆細胞を形質転換することによって、あるいは、骨、骨折部位、または骨前駆細胞とNELL-1蛋白質とを接触させる工程、あるいは、NELL-1蛋白質の局所的または全身的投与によって、実現することができる。

10

【0133】

本文書で用いられる、用語「骨祖先細胞」は、新しい骨組織を最終的に形成する、あるいは、その形成に寄与する能力を有する細胞のうちのいずれか、または全てを指す。これは、例えば、幹細胞、マクロファージ、線維芽細胞、血管細胞、造骨細胞、軟造骨細胞、破骨細胞など、分化の異なる段階にある各種の細胞を含んでいる。骨祖先細胞としてはまた、単離され、かつ、インビトロで操作された（例えば、サイトカインまたは成長因子などの作用剤、あるいは、遺伝子操作された細胞によって、刺激を与えられた）細胞も挙げられる。細胞が、活性化され、かつ、インビボな実施形態の状況で、最終的に新しい骨組織を生じるような方法で刺激される限り、本発明の方法および組成物を用いて刺激される骨祖先細胞の特定の型は重要ではない。

20

【0134】

用語「骨祖先細胞」はまた、特に、骨祖先組織内に所在する、それと接触している、あるいは、それに向かって遊走（すなわち、「回帰」）し、かつ、成熟した骨の形成を直接的に、あるいは、間接的に刺激する細胞を指すのにも用いられる。そのようなものとして、祖先細胞は、それ自体、最終的に成熟した骨細胞へと分化する細胞、すなわち、新しい骨組織を「直接的に」形成する細胞であってよい。刺激を受けると、一層遠くの祖先細胞を引き寄せ、あるいは、近接する細胞が骨形成細胞へと（例えば、造骨細胞、骨細胞及び/又は破骨細胞へと）分化するのを促進する細胞も、それらの刺激が、「間接的に」骨の修復または再生をもたらすので、この開示の状況では、祖先細胞であると見なされる。骨形成に間接的に影響する細胞は、各種の成長因子またはサイトカインの生成によって、あるいは、他の細胞型との、それらの物理的相互作用によって、間接的に影響すると思われる。祖先細胞が骨修復を刺激する、直接的または間接的な機序は、必ずしも、本発明を実施する際の考慮事項ではない。骨祖先細胞および骨祖先組織は、それらの自然環境において、活発な骨の成長、修復または再生の領域に到達する細胞および組織であってよい。骨祖先細胞に関しては、これらは、そのような領域に引き寄せられる、あるいは、動員される細胞であってもよい。これらは、動物モデル内の人工的に創出された骨切断部位内に存在する細胞であってよい。骨祖先細胞は、動物またはヒトの組織から単離され、かつ、インビトロ環境で維持されてもよい。骨祖先細胞を得るべき適当な身体領域は、骨折または他の骨格の欠損部（これが、人工的に創出された部位か否かに関わらず）を取り囲んでいる骨組織および液体などの領域であり、あるいは、実際、骨髄からである。単離された細胞は、本文書で開示されている方法および組成物を用いて刺激され、かつ、必要なら、骨修復が刺激されるべき動物の適切な部位に、戻されてよい。そのような場合には、核酸を含む細胞は、それ自体、治療薬の一形態となるであろう。そのような生体外プロトコルは、当業者には周知である。本発明の好適な実施形態では、骨祖先細胞および組織は、治療したいと望む骨折または骨損傷の領域に到達する細胞および組織ということになる。従って、治療の実施形態では、本治療的な組成物を適用すべき適当な標的祖先細胞の同定に関連した困難はない。そのような場合には、本文書で開示されているような、適切な刺激性の組成物（例えば、NELL-1ポリペプチド）を得て、骨折または骨の欠損の部位と該組成物とを接触させることで、十分である。この生物学的環境の性質は、実施者による、さらなる標的化または細胞同定の不在下で、適切な細胞が活性化状態になるようなもので

30

40

50

ある。

【0135】

A) NELL-1 産生を増大させるための細胞の形質転換

より好適な一実施形態では、NELL-1 を発現している核酸（例えば、cDNA）は、インビトロ及び/又はインビボで、細胞（ヒトまたは他の哺乳類の細胞など）に形質移入する能力がある遺伝子治療ベクター内にクローニングされる。

【0136】

インビボ、生体外およびインビトロで、細胞内に核酸を導入するためのいくつかの手法が用いられてきた。これらは、脂質またはリポソームベースの遺伝子運搬（WO 96/18372; WO 93/24640; Mannino and Gould - Fogerite (1988) *BioTechniques* 6(7): 682 - 691; Rose 米国特許第 5, 279, 833 号; WO 91/06309; および Feigner et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413 - 7414)、およびレトロウイルスゲノムの一部として治療的なポリヌクレオチド配列を保持している、複製欠損レトロウイルスベクター（例えば、Miller et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:4239 (1990); Kolberg (1992) *J. NIH Res.* 4: 43, and Cometta et al. (1991) *Hum. Gene Ther.* 2: 215 を参照）を含んでいる。

【0137】

遺伝子治療手順のレビューについては、例えば、Anderson, *Science* (1992) 256: 808-813; Nabel and Feigner (1993) *TIBTECH* 11: 211-217; Mitani and Caskey (1993) *TIBTECH* 11: 162-166; Mulligan (1993) *Science*, 926-932; Dillon (1993) *TIBTECH* 11: 167-175; Miller (1992) *Nature* 357: 455 - 460; Van Brunt (1988) *Biotechnology* 6(10): 1149-1154; Vigne (1995) *Restorative Neurology and Neuroscience* 8: 35-36; Kremer and Perricaudet (1995) *British Medical Bulletin* 51(1) 31-44; Haddada et al. (1995) in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Doerfler and Bohm (eds) Springer-Verlag, Heidelberg Germany; および Yu et al., (1994) *Gene Therapy*, 1:13-26 を参照する。

【0138】

広く用いられているレトロウイルスベクターとしては、マウス白血病ウイルス (MuLV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、サル免疫不全ウイルス (SIV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、およびそれらの組合せに基づくものが挙げられる。例えば、Buchscher et al. (1992) *J. Virol.* 66(5) 2731-2739; Johann et al. (1992) *J. Virol.* 66 (5):1635-1640 (1992); Sommerfelt et al., (1990) *Virology* 176:58-59; Wilson et al. (1989) *J. Virol.* 63:2374-2378; Miller et al., *J. Virol.* 65:2220-2224 (1991); Wong - Staal et al., PCT/US94/05700, および Rosenberg and Fauci (1993) in *Fundamental Immunology*, Third Edition Paul (ed) Raven Press, Ltd., New York、およびこれら文書中の参照文献、および、上記 Yu et al., *Gene Therapy* (1994)) を参照する。これらベクターは、オプションとして、ベクターに対応するレトロウイルスによって感染されていない細胞に対して、ベクターの宿主域を伸長するようシュードタイプ化される。水疱性口内炎ウイルスのエンベロープ糖蛋白質 (VSV-G) は、造血幹細胞に感染することができる、VSV-G - シュードタイプ HIV ベクターを構築するのに用いられてきた (Naldini et al. (1996) *Science* 272:263, および Akkina et al. (1996) *J Virol* 70:2581)。

【0139】

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベースのベクターも、例えば、核酸およびペプチのインビトロ産生において、また、インビボおよび生体外の遺伝子治療手順において、細胞に標的核酸を形質導入するのに用いられる。AAV ベクターの概要については、West et al. (1987) *Virology* 160:38-47; Carter et al. (1989) 米国特許第 4, 797, 368 号; Carter et al. WO 93/24641 (1993); Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Muzyczka (1994) *J. Clin. Invest.* 94:1351 を参照する。組換え AAV ベクターの構築は、Lebkowski、米国特許第 5, 173, 414 号; Tratschin et al. (1985) *Mol. Cell. Bi*

10

20

30

40

50

ol. 5(11):3251-3260; Tratschin, et al. (1984) Mol. Cell. Biol., 4: 2072 - 2081; Hermonat and Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6466-6470; McLaughlin et al. (1988) および Samulski et al. (1989) J. Virol., 63:03822-3828 を含むいくつかの出版物に記述されている。r A A Vによって形質転換され得る細胞ラインとしては、Lebkowski et al. (1988) Mol. Cell. Biol., 8:3988-3996 に記述されたものが挙げられる。他の適当なウイルスベクターとしては、ヘルペスウイルスおよびワクシニアウイルスが挙げられる。

【0140】

米国特許第5,942,496号および第5,763,416号は、生体内原位置で骨細胞内に核酸を移す際に使用するための、かつ(または)、骨祖先細胞を刺激するための、方法、組成物、キットおよび装置を開示している(Evans and Robbins (1995) J. Bone and Joint Surgery, 77-A(7):1103-1114, Wolff et al. (1992) J. Cell Sci., 103:1249-1259 も参照)。

【0141】

B) 外来的に産生されたNELL-1の投与

1) 標的細胞へのNELL-1蛋白質の運搬

本発明のNELL-1蛋白質(または、その生物学的に活性な断片)は、静脈内、非経口、局所的、経口、または(例えば、エアロゾルによる、あるいは、経皮的な)局所投与に有用である。特に好適な投与様式としては、動脈内注射、骨折部位への注射、あるいは、生分解性の基質内での運搬が挙げられる。NELL-1蛋白質作用剤は、一般に、薬学的に受容できるキャリア(賦形剤)と組み合わせて、薬理的組成物を形成する。薬学的に受容できるキャリアは、例えば、組成物を安定化させるよう、あるいは、作用剤の吸収を増大させる、あるいは、低減させるよう作用する、生理学的に受容できる化合物を含むこともできる。生理学的に受容できる化合物としては、例えば、グルコース、ショ糖、またはデキストランなどの炭水化物、アスコルビン酸またはグルタチオンなどの抗酸化物、キレート化剤、低分子量蛋白質、抗有糸分裂剤のクリアランスまたは加水分解を低減させる組成物、あるいは、賦形剤または他の安定剤及び/又は緩衝液が挙げられる。

【0142】

他の生理学的に受容できる化合物としては、浸潤剤、乳化剤、分散剤、あるいは、微生物の増殖または作用を阻止するのに特に有用な保存剤が挙げられる。各種の保存剤が周知であり、保存剤としては、例えば、フェノールおよびアスコルビン酸が挙げられる。当業者なら、生理学的に受容できる化合物を含む、薬学的に受容できるキャリアの選択は、例えば、抗有糸分裂剤の投与経路、および、抗有糸分裂剤の特定の生理化学的特性に左右されることを理解しよう。骨形態形成蛋白質(BMP)の運搬のための好適な製剤形態は、米国特許第5,385,887号に詳細に記述されている。

【0143】

薬学的組成物は、投与方法に応じて各種の単位投与形態で投与されてよい。例えば、経口投与に適した単位投与形態としては、粉末、錠剤、丸剤、カプセルおよびロゼンジが挙げられる。NELL-1蛋白質は、経口投与される場合、消化に対して保護されなければならないことが認識されている。これは、一般に、該蛋白質を、酸性および酵素加水分解に対する耐性を該蛋白質に持たせるための組成物と複合体を形成させることによって、あるいは、該蛋白質を、リポソームなどの適切な耐性を有するキャリア内にパッケージングすることによって、実現される。化合物を消化に対して保護する手段は、この技術分野では周知である(例えば、治療薬の経口運搬のための脂質組成物を記述した、米国特許第5,391,377号を参照)。

【0144】

本発明の薬学的組成物は、例えば、治療すべき、あるいは、骨の再構築及び/又は修復を促進すべき、外科的創傷における、局所的投与に特に有用である。別の実施形態では、該組成物は、静脈内投与、あるいは、体腔または器官の内腔への投与など、非経口投与に有用である。投与のための組成物は、一般に、薬学的に受容できるキャリア内、望ましく

10

20

30

40

50

は、水溶性蛋白質のための水溶性キャリア内に、溶解されたNELL-1蛋白質の溶液を含むことになる。例えば、緩衝生理食塩水など、各種のキャリアを使用することができる。これら溶液は、無菌であり、かつ、一般に、望ましくない物質を含んでいない。これら組成物は、従来の周知の滅菌技法によって滅菌されてよい。これら組成物は、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなど、pH調整および緩衝剤、毒性調整剤などの、生理学的条件を近似させるための、薬学的に受容できる補助物質を、必要に応じて含んでよい。

【0145】

これら製剤形態内のNELL-1蛋白質の濃度は、大幅に変更可能であり、かつ、選択された特定の投与様式および患者の必要性に従って、主として、液量、粘度、体重などに基づいて、選択されることになる。一般にNELL-1蛋白質は、(凍結乾燥された形態からの再構成を含む)薬学的に受容できる溶液の形態で、利用される。過度な体積のキャリアを必要とすることなしに、薬学的に有効な量の蛋白質が運搬され得るよう、少なくとも約1mg/ml、望ましくは、約2~8mg/mlの濃度で、造骨性蛋白質を可溶化するのが最適である。いくつかのアプリケーションでは、2mg/mlより高い濃度が望ましいと思われる。

10

【0146】

上に示唆したように、投与計画は、対処されている臨床徴候によって、また、各種の患者変数(例えば、体重、年齢、性別)および臨床症状(例えば、傷害の程度、傷害の部位など)によって決まる。一般に、造骨性蛋白質の投与量は、1~約10000μg、望ましくは、約10~1000μg、より望ましくは、約10~100μgの範囲内であろう。

20

【0147】

2) 骨移植片材料

骨創傷、並びに、多くの他の創傷モデルは、創傷治癒プロセスにとって重大な生物学的に活性の作用剤の遊離を、惹起する。骨内で自然発生する骨形態形成蛋白質(BMP)は、創傷からひとたび遊離されると、骨誘発を刺激し、かつ、喪失した、あるいは、損傷した骨組織を再生する。精製された形態の、これら同じ蛋白質は、生分解性の基質への骨成長を刺激して、通常骨格の境界の内部および外部の両方で、骨の人工的創出を可能にするのに用いることができる。特定の理論に拘束されることなしに、NELL-1蛋白質は、骨形態形成蛋白質の使用に類似したやり方で、骨の再石灰化を刺激するのに用いることができると考えられている。

30

【0148】

NELL-1蛋白質は、上述したように、全身的に投与され得る。加えて、あるいは、別法として、NELL-1蛋白質は、骨または骨折部位に、直接的に適用され得る。これは、外科手術中(例えば、複雑骨折を接骨する時、骨を再構築する時、骨移植を行う時など)に実現することができ、あるいは、直接注射によって実現することができる。

【0149】

ある種の好適な実施形態では、特に、骨の再構築または修復が外科的に行われる場合は、持続性運搬「ビヒクル」を用いてNELL-1蛋白質を投与することが望ましい。持続性運搬ビヒクルとしては、生分解性の運搬ビヒクルが挙げられるが、それらに限定されない。好適な生分解性の運搬ビヒクルは、望ましくは、多孔性である。

40

【0150】

物質の放出制御を行いながら、細胞付着および組織再生誘導のための場所も提供するための、生分解性多孔性運搬ビヒクルを開発する点では、多くの研究がなされてきた。生分解性の材料は、1)親水性のもの、および2)疎水性のもの、という二つのカテゴリーに分けられることが多い。親水性材料(脱灰凍結乾燥骨、セラミック、フィブリン、ゼラチンなど)は、水に対して高い親和性を有しており、NELL-1蛋白質水溶液を、材料の内部孔内に、容易に取り込む。疎水性材料(L-ポリ乳酸、D,L-ポリ乳酸、ポリグリコール酸など)は、それらの多孔性、全体の大きさ、形状および機械的特性の範囲では潜

50

在的に限界がないが、水溶液で「浸潤する」のがより困難である。そのような材料の内表面への溶液の沈着を増大させるために、疎水性材料は、蛋白質または界面活性剤で含浸して、蛋白質（例えば、NELL-1）による含浸を促進することが多い。

【0151】

フィブリノゲン、ポリ乳酸、多孔性セラミックス、ゼラチン、寒天などの材料を含む、各種の生分解性の運搬材料の詳細な記述は、例えば、米国特許第5,736,160号、第4,181,983号、第4,186,448号、第3,902,497号、第4,442,655号、第4,563,489号、第4,596,574号、第4,609,551号、第4,620,327号、および第5,041,138号に見い出すことができる。

10

【0152】

他の運搬ビヒクルとしては、骨移植片材料が挙げられるが、それらに限定されない。骨移植片材料は、天然の材料（例えば、移植された骨または骨断片）、合成材料（例えば、各種の重合体及び/又はセラミックス）、あるいは、両方の組合せから誘導することができる。骨移植片材料は、一般に、空隙を埋める、あるいは、さもなければ、喪失した骨材料を置換するのに利用される。そのような移植片材料は、しばしば、補綴の生骨との緊密な結合/アニーリングを促進するため、補綴装置（例えば、骨代替物または支持体）の構成要素としても提供される。

【0153】

生体活性ガラスおよびリン酸カルシウム、コラーゲン、混合物などを用いた骨移植片は、良好な生体適合性を有しており、かつ、場合によっては、骨組織の形成および取込みを生ずる。いくつかの異なるガラス、ガラスセラミックス、および結晶相材料が、回復目的で、単独で、あるいは、アクリルの重合可能な種、および重合体の他のファミリーと組み合わせ、用いられてきた。これらとしては、ヒドロキシアパタイト、フッ素リン灰石、オキシアパタイト、ウォラストナイト、灰長石、フッ化カルシウム、アグレリ石、デビトライト、カナサイト、金雲母、モネタイト、ブラッシュ石、リン酸八カルシウム、ウィットロッカイト、リン酸四カルシウム、コーディエライト、およびベルリナイトが挙げられる。そのような用途を記述した代表的な特許としては、米国特許第3,981,736号、第4,652,534号、第4,643,982号、第4,775,646号、第5,236,458号、第2,920,971号、第5,336,642号、および第2,920,971号が挙げられる。追加的な参照文献としては、日本国特許第87-010939号および独国特許第OS 2,208,236号が挙げられる。他の参照文献は、W. F. Brown, "Solubilities of Phosphate & Other Sparingly Soluble Compounds," Environmental Phosphorous Handbook, Ch. 10 (1973) に見い出されるはずである。上記に加えて、サンゴおよび真珠貝を含む、ある種の動物由来の材料も、回復目的で、生体材料において、使用されてきた。

20

30

【0154】

他の骨移植片材料としては、1~10重量%の硝子体の鉱物繊維と共に15~75重量%の生体活性ガラスで強化された、可撓性の成形用アクリルベース骨セメント（米国特許第4,239,113号）、および、アミンを混合した過酸化ベンゾイルなどの過酸化システムの作用を通して重合可能な、ビスフェノール-A-ジグリシジルメタクリル酸塩（bis-GMA）への、リン酸三カルシウムおよびバイオセラミックA₂などの骨充填材（Vuillemin et al. (1987) Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 113: 836-840）が挙げられる。水酸化カルシウムセメント反応を通して硬化された、サリチル酸塩とアクリル酸塩の両方を含む二成分樹脂複合体が、米国特許第4,886,843号に記述されており、一方、米国特許第5,145,520号および第5,238,491号は、充填材およびセメントを開示している。上記の材料は、NELL-1蛋白質を取り込むよう製作され得る。

40

【0155】

さらに、骨形態形成蛋白質を含む移植片材料が、既知である。従って、例えば、米国特

50

許第4, 394, 370号は、再構成されたコラーゲンと脱灰した骨粒子との、あるいは、再構成されたコラーゲンと骨欠損におけるインビボ移植に適した海綿状に製作された可溶性骨形態発生蛋白質との、複合体を記述している。同様に、米国特許第5, 824, 084号は、望ましくは、帯電した表面を有する、生体適合性の移植可能な移植片材料から作成された基板を記述している。生体適合性の移植可能な移植片材料の例としては、リン酸カルシウムを含む合成セラミックス、いくつかの重合体、脱灰した骨基質、または石灰化した骨基質が挙げられる。これら材料は、追加的に、基板の表面に結合した細胞接着分子を含んでよい。用語「細胞接着分子」は、集合的に、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、血管細胞接着分子(V-CAM)および細胞間接着分子(I-CAM)、およびコラーゲンを指す。特に適当な移植片材料としては、例えば、単離された石灰化した海綿骨切片、石灰化した骨の粉末または顆粒、脱灰した海綿骨切片、脱灰した骨の粉末または顆粒、脱灰した骨基質から抽出されたグアニジン-HCl、焼結された皮質骨または海綿骨、Interpore 500という商品名でInterporeによって販売されているサンゴ状ヒドロキシアパタイト、およびZimmerによって販売されている骨移植片代用物Collagraft、あるいは、Orquestによってコラーゲンから作成されたものなどの線維状海綿に組み込まれたものなどの顆粒状セラミックスが挙げられる。NELL-1蛋白質は、これら移植片材料のうちのいずれにも組み込むことができ、あるいは、骨形態形成蛋白質の代わりに代用することができる。

10

VII. キット

さらに別の実施形態では、本発明は、本文書で述べる、検定の実施または組成物の使用のための、キットを提供する。好適な一実施形態では、キットは、NELL-1発現及び/又は活性レベルの検出に適した、抗体及び/又は核酸プローブを含む一つまたはそれ以上の容器、及び/又は基板を含んでいる。キットは、オプションとして、本文書で述べる検定の実施を促進するための、いかなる試薬及び/又は装置も含んでよい。そのような試薬としては、緩衝液、標識、標識化抗体、標識化核酸、蛍光標識の描出のためのフィルターセット、プロットングメンブレンなどが挙げられるが、それらに限定されない。

20

【0156】

別の実施形態では、キットは、NELL-1蛋白質、またはNELL-1蛋白質をコード化するベクター、及び/又はNELL-1蛋白質をコード化するベクターを含む細胞を含む容器を含んでよい。

30

【0157】

さらに、キットは、本発明の検定方法の実施、あるいは、禁忌と共に本文書で述べる組成物の投与のための、指示(すなわち、プロトコル)を含む指図資料を含んでよい。指図資料は、一般に、書面による、あるいは、印刷された材料を含むが、それらに限定されない。そのような指図を記憶し、かつ、それらを最終使用者に伝達することができる、いかなるメディアも、本発明によって企図されている。そのようなメディアとしては、電子的記憶メディア(例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ)、光学的メディア(例えば、CD-ROM)などが挙げられるが、それらに限定されない。そのようなメディアは、そのような指図資料を提供するインターネットサイトへのアドレスを含んでよい。

40

【実施例】

【0158】

以下の実施例は、請求項に記載の発明を限定する目的ではなく、例示する目的で提供されている。

実施例1

NELL-1は、胎仔の頭蓋冠造骨細胞における石灰化を増進する

本文書で述べるNELL-1遺伝子の全長cDNAのヌクレオチド配列は、ニワトリNell遺伝子に対して約61%の相同性を有しており、従って、ヒトNELL-1と命名された(Watanabe et al. (1996) Genomics. 38(3), 273-276)。NELL-1蛋白質は、シグナルペプチド、NH₂末端トロンボスポンジン(TSP)様モジュール(Francois an

50

d Bier (1995) Cell. 80(1): 19 - 20)、5つの von Willebrand 因子Cドメイン、および6つのEGF様ドメインを含んでいる。

【0159】

ヒトNELL-1遺伝子の発現は、主として、縫合近傍骨縁部に沿って、骨形成前間の間葉細胞内および造骨細胞内に、かつ、新しく形成された骨の凝縮している間葉細胞内に、局在化されていた。ヒト多臓器組織のmRNAプロットは、ヒトNELL-1が、胎仔の脳内では、特異的に発現されたが、胎仔の肺、腎臓または肝臓においては、特異的に発現されなかったことを示した。我々は、また、NELL-1が、ラット頭蓋冠の骨祖先細胞内では発現されたが、ラットの脛骨、ストローマ細胞、および線維芽細胞の培養物においては、おおむね不在であったことを実証した。我々のデータは、NELL-1遺伝子が、頭蓋の膜内骨および神経組織(神経冠由来)内で優先的に発現されることを示唆している。

10

A) 材料および方法

胎仔の妊娠7、11、14、17日目からの全マウス胚RNA分析を行った。NELL-1 cDNAを担持するアデノウイルス(E1-AノックアウトおよびMCVプロモーターを有するAD5)を構築し、かつ、ラット胎仔の頭蓋冠の初代細胞培養物およびMC3T3細胞ラインに感染させた。ウイルスは、以下のプロトコルに従って構築した: 293細胞を、各10mgのpJM17(欠損アデノウイルスゲノムを含む)および(CaPO₄)を用いた、センスまたはアンチセンスラットNELL-1を含む)pAC-CMVベースのプラスミドで同時形質移入して、10~14日間でラットNELL-1を発現している組換えアデノウイルスベクターを生成した。ウイルスをブランク精製し、かつ、ザンプロットを行ってNELL-1遺伝子の取込みを保証した。 - ガラクトシダーゼ遺伝子を含むアデノウイルスを、コントロールとして使用し、かつ、異なる細胞型による感染の有効性について、検査した。MC3T3細胞とNIH3T3細胞の両方で、約80~90%の感染効率が観察された。

20

【0160】

感染後14、17、21日目に、von Kossa 染色を行った。ImagePro システムによって、石灰化の領域を定量化した。Studentの両側t検定によって、統計解析を行った。統計的P値^{*}p < 0.01を有意と見なした。NELL-1を過剰発現している細胞からのRNAを抽出し、かつ、マウスcDNAアレイ分析を行った。ホスフォイメジャーによって、ハイブリダイゼーション信号を定量化した。

30

B) 結果

NELL-1 mRNAは、妊娠の14日目からかすかに発現され、妊娠期間にわたって若干増大した。妊娠14日目は、胎仔の頭蓋冠が石灰化し始める時である。NELL-1を過剰発現している、ラット胎仔の頭蓋冠の初代細胞培養物とMC3T3細胞培養物の両方が、 - ガラクトシダーゼコントロールと比べた石灰化の増進を示した。NELL-1の過剰発現は、感染後17日目に、頭蓋冠の造骨性初代細胞培養物における石灰化を、コントロールと比較して、約30倍増進した。これらの結果は、von Kossa 染色に基づいており、かつ、ImagePro ソフトウェアによって定量化された。この相対的な増大は、感染後21日目までに、2倍にまで減少した。NELL-1を感染させたMC3T3細胞からのマウスcDNAアレイの結果は、コントロールと比較して、BMP-7遺伝子発現における20%のダウンレギュレーション、並びに、Split HandおよびFoot遺伝子の3倍のアップレギュレーションを示した。これら二つの遺伝子は、骨形成および頭蓋顔面の発生に密接に関連している。

40

C) 考察および結論

この研究で、我々は、NELL-1が、骨形成と密接に関連しており、それが、頭蓋冠造骨細胞様細胞の石灰化を増進したことを明らかに確認した。同定された下流のエフェクターのうちのいくつかは、明らかに、骨形成および胎生学的な発生において、重要な役割を果たしている。CSで見られるような早期の頭蓋縫合閉鎖は、頭蓋骨の過剰産生によるものであると思われ、従って、NELL-1分子の過剰発現に関連している可能性がある

50

。これらの結果およびNELL-1の予備的な蛋白質機能分析結果は、この蛋白質を、生物学的に関連する分子として分類する。NELL-1のあり得る役割として、これら蛋白質は、他の成長因子と相互作用する、モジュレーターとして作用すると思われる。最近、TSP-1は、TGF-1の主要な活性化剤であることが示された (Francois and Bier (1995) Cell. 80(1):19-20)。TGF-1は、細胞受容体と相互作用することができない、不活性な形態のほとんどの細胞によって分泌される。TGF-1の活性は、最初に、潜状関連蛋白質(LAP)と呼ばれる、そのNH₂末端プロペプチドの二量体との、その非共有結合的な関連性によってマスクされる。TGF-1を細胞外で活性化する際に、TSP-1は、LAPのNH₂末端領域と相互作用して、三分子複合体を形成する。この複体内で、TGF-1を受容体にとってアクセス可能にする立体配座的变化が生じる。4つのvWF Cドメイン(おそらく、ホモ三量体)を有する、コーディンのような高い相同性を有する分子が、原腸形成中に分泌され、かつ、アフリカツメガエルの背腹パターン形成において中心的な役割を果たしている (Crawford et al. (1998) Cell. 93(7): 1159-1170)。最近、コーディンは、腹側BMP-4(骨形態発生蛋白質4、TGFスーパーファミリーのうちの一つ)に直接的に結合し、かつ、BMP-4活性を中和することが示された (Piccolo et al. (1996) Cell, 86(4):589-598)。これらの結果は、NELL-1蛋白質が、TGFスーパーファミリーのメンバーのうちのいくつかと相互作用することによって、それらの未同定の機能を細胞外で実行し得ることを示唆している。TGF-1は、骨形成の制御因子として既知であるため、石灰化を増進するNELL-1の効果は、TGFスーパーファミリーとのその相互作用に関連していると思われる。

【0161】

実施例 2

NeII-1を過剰発現しているトランスジェニックマウスにおける頭蓋骨癒合症

以前、我々は、最も一般的な先天性の頭蓋顔面奇形のうちの一つ、頭蓋骨癒合症(CS)の患者において、早期の頭蓋縫合閉鎖中に過剰発現される新規の分子として、NeII-1を報告した。ここで、我々は、NeII-1を過剰発現しているトランスジェニックマウスの創出および分析を記述する。NeII-1トランスジェニック動物は、単純な骨癒合症から複合的な骨癒合症までに及ぶCS様表現型を示した。組織学的に、これら動物における異常に閉鎖しつつある/閉鎖した縫合の骨形成前端は、造骨細胞分化の増大および細胞増殖の減少と共に、頭蓋冠の肥大および重複を明らかにした。さらに、NeII-1の全身性の非組織特異的過剰発現にも関わらず、異形は、頭蓋冠骨に限定されていた。インビトロで、NeII-1過剰発現は、通常の培養条件下で、頭蓋冠の造骨細胞分化および石灰化を加速した。さらに、造骨細胞内のNeII-1過剰発現は、アルカリ性フォスファターゼ発現および微小結節形成を促進するのに十分であった。逆に、NeII-1のダウンレギュレーションは、インビトロで造骨細胞分化を阻害した。要約すると、NeII-1過剰発現は、齧歯類モデルにおける早期の縫合閉鎖をもたらす複雑な一連の事象の一部として、CSの発生において新規な役割を有している。細胞レベルでは、NeII-1発現は、造骨細胞分化を調整し、また、造骨細胞分化にとって十分かつ必要であると思われる。

方法

NeII-1を過剰発現しているトランスジェニックマウスの作製

pTM-70(13、14)から、CMVプロモーターおよびSV40ポリアダニル化部位を用いたpCDNA1.1(Invitrogen, Carlsbad, California, USA)に、ラットNeII-1 cDNAをサブクローニングした。先ず、組換えプラスミドをMC3T3細胞(マウス頭蓋冠の細胞ライン)に形質移入して、適正な蛋白質発現(データ示さず)を検証した。次いで、CMVプロモーター、NeII-1 cDNA、およびSV40ポリアダニル化部位を含む4.76 kbのDNA断片を、卵母細胞の微量注射に用いた。標準のプロトコル(参考文献15)により、B6C3マウスを用いて、トランスジェニック

マウスを生成した。ファウンダーを、それらの非トランスジェニック同腹仔と交配させて、トランスジェニックラインを確立した。

【0162】

導入遺伝子のコピー数の分析

PCRおよびサザンブロット分析によって、導入遺伝子のコピー数を推定した。導入遺伝子のコピー数を確立するPCRプロトコルは、<http://www.med.umich.edu/tamc/spike.html> (参考文献16)で得た。哺乳類ゲノムの半数体含有量は、 3×10^9 bpであり、かつ、それをスパイクするには10 gのDNAを要するという仮定に基づいて、5 gのゲノムDNA当りの導入遺伝子DNAの質量を、 $N \text{ bp 導入遺伝子DNA} / 3 \times 10^9 \text{ ゲノムDNA}$ として計算した。インサートの大きさは、4.76 kbであり、かつ、1コピーの標準は、10 gのゲノムDNA当り7.933 pgである。30サイクルのPCRを行い、かつ、生成物を、臭化エチジウムを用いて電気泳動ゲル上で分離した。強度は、Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, California, USA)を用いて計算した。

【0163】

免疫組織化学

Ne11-1抗体の詳細な調製は、Kuroda et al. (参考文献13、14)によって文書化されている。この抗体は、Ne11-1のCOOH末端領域(CSVDL ECIEN N)を認識する。抗体の特異性は、Ne11-1を形質移入したNIH3T3細胞から抽出された蛋白質を用いて、ウェスタンブロットによって確認した。標準のアビジンビオチン複合体/免疫ペルオキシダーゼプロトコル(Vector Elite Kit; Vector Laboratories Inc., Burlingame, California, USA)を、1:100のNe11-1抗体希釈により用いた。ジアミノベンジジンペルオキシダーゼ基板および3-アミノ-9-エチルカルバゾールを描出に用い、かつ、切片を、ヘマトキシリンで対比染色した。

【0164】

磁気共鳴映像法

マイクロイメージング勾配セットを備えた7.0 T、18 cmのクリアボア磁石、および、35 mm内径のバードケージ高周波コイルを有する、Bruker Biospec MRイメージャー(Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany)を用いて、ホルマリン保存した検体に対して、磁気共鳴映像法(MRI)を行った。以下のパラメータによる、グラジエントエコーフィルター化イメージング常態パルスシーケンスを用いて、脳および頭蓋冠の体軸横断および矢状画像を得た: TR/TE、229.3/64.1 ms; フリップアングル、30°; 視野、2.3 cm; 基質、256 × 256; 薄片厚さ、1 mm; および励起数、8。面内の空間分解能は、約90 μmであった。

【0165】

マイクロコンピュータ断層撮影スキャン

全てのデータは、30 kVpおよび750 mAで収集した。データは、MicroCat スキャナー(Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, USA)と共に供給されたコーンビームアルゴリズムを用いて、再構築した。マトリックスは、256 × 256 × 256で、140 μmの等方向分解能が得られた。定量的手順は、0、50、250、および750 mg/ccのヒドロキシアパタイトを含む、骨ファントム(画像中の長いロッド)の配置を含んでいる。データの描出は、MetaMorph(二次元)(Universal Imaging Corp., West Chester, Pennsylvania, USA)、およびAmira(三次元)(Indeed-Visual Concepts GmbH, Berlin, Germany)を用いて行った。

【0166】

インビボ増殖分析

新生仔マウスに、100 μg/gでBrdUを注射した。これら動物を、注射から2時間後に屠殺した。これら動物を固定し、かつ、BrdU抗体(Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)で免疫染色した。トランスジェニック動物およびそれらの正常な同腹仔からの、頭蓋冠縫合、脳、および脛骨を比較した。

【0167】

10

20

30

40

50

Ne11-1 (AdNe11-1) およびアンチセンスNe11-1 (AdAntiNe11-1) を保持している組換え欠損アデノウイルスベクター

ヒトCMV IE1プロモーターと、Ad5ウイルスのヌクレオチド配列1~454および3,334~6,231に隣接するSV40スプライス/ポリアデニル化部位との間に、ラットNe11-1 cDNAを、双方向的に挿入した。その結果生じたプラスミドpAdCMV-Ne11-1は、標準のAd5地図に対して左向きに、Ne11-1を転写する。293細胞に、pAdCMV-Ne11-1およびpJM17 (Microbix Biosystems Inc., Toronto, Canada) を同時形質移入し、E1-Aウイルス遺伝子に欠損のあるベクターをもたらすことによって、組換えアデノウイルス(Ad)(AdNe11-1)を単離した。組換えウイルスのクローンをプラーク精製し、かつ、サザンブロット分析によって確認した。AdNe11-1とAdLacZの両方を、高力価まで育成し、かつ、CsClクッションを通して1回、および、連続CsCl勾配上で再度、精製した。その結果生じたストックは、293細胞上のプラーク形成によって検定された場合、 5×10^9 pfu/mlであった。ノーザンブロットおよびウェスタンブロットを行って、Ne11-1遺伝子およびその蛋白質産物の取込みおよび発現を保証した。

【0168】

ラット頭蓋冠の初代細胞培養物(FRCC)

前述したように、胎生18日目(E18)のラット頭蓋冠からの造骨性細胞の単離を行った(参考文献12)。消化4、5、および6から収集された細胞をプールし、かつ、 2.5×10^4 / cm²でプレートした。継代2内の細胞を用いた。造骨細胞のアデノウイルス感染。Ne11-1を過剰発現する効果を観察するため、異なる系統からの造骨細胞を、6穴のプレート内で、80%コンフルエンス状態まで育成した。培地を吸引し、かつ、感染量(1mlの無血清培地内で20 pfu/細胞)を、培養物に添加した。AdNe11-1、AdAntiNe11-1、およびガラクトシダーゼを担持する「コントロール」Ad(Ad-Gal)を、5セット用いた。感染後12、15、および21日目に、von Kossa染色を行った。石灰化した領域の割合を、Image-Pro Plusシステム(Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA)を用いて分析した。マウス間の比較は、Studentのt検定を用いて行った。Ne11-1をダウンレギュレーションする効果を観察するため、上述したように、胎仔ラット頭蓋冠細胞(FRCC)培養物に、AdAntiNe11-1を添加した。

【0169】

マイクロアレイ分析

感染後6、9、および12日目に、AdNe11-1感染およびAd-Gal感染MC3T3細胞からのRNAを用いて、マイクロアレイを行った。I. Nishimura およびUniversity of California Los Angeles Microarrays Core Facilityのスタッフは、骨関連マイクロアレイを開発した。これらマイクロアレイは、10を超える内部コントロール遺伝子を有する、37を超える遺伝子を含んでいる。確認されたマーカーとしては、以下が挙げられる、すなわち、骨基質蛋白質(オステオポンチン、オステオネクチン、オステオカルシン、骨シアロ蛋白質); 受容体(2-インテグリン、ビタミンD受容体、副甲状腺受容体、エストロゲン受容体); 造骨細胞マーカー(アルカリ性フォスファターゼ、Cbfa1); 接着性蛋白質(フィブロネクチン、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン1、デコリン、テネイシン、シンデカン、ラミニン); メタロプロテイナーゼ(基質メタロプロテイナーゼ1および2); 成長因子(Bmp2、Bmp7); 原線維コラーゲン(コラーゲン1A1、1A2、3A1、5A2、および11A1); 他のコラーゲン(コラーゲン4A1、6A1、7A1、10A1、および15A1); および断続性の三重らせんを有する原線維関連コラーゲン(FACIT)(コラーゲン9A1、9A2、12、14、16、および19)。RNA(Cy3には30 μgの、および、Cy5には60 μgの、全RNA)を、六量体のランダムプライマーおよびCy3-dUTPまたはCy5-dUTPで標識化した。逆転写酵素で標識化されたプローブを、アレイにハイブリダイズした。418 Array Scanner (Affymetrix Inc., Santa Clara, California

、USA)を用いて、複数回のレーザースキャンを行い、平均表示値および標準偏差を得て、測定の実現性を検証した。全ての内部コントロールの平均を計算し、かつ、それを用いて、IPLab version 3.2 MicroArray スーツ (Scanalytics Inc., Fairfax, Virginia, USA)によりハイブリダイゼーション強度を基準化した。グループとしての全ての造骨細胞マーカーの相関関係を計算し、かつ、AdNe11-1感染細胞とAd-Gal感染「コントロール」細胞との間で、比較した。RT-PCR。DNase処置された全RNAを用いた。高サイクルのPCRを通した遺伝子断片発現の最初の検証の後、相対的な遺伝子発現を数量化するために、別の低サイクルのPCRを行った(参考文献12)。各候補分子について、我々は、サイクルの数(範囲、15~35サイクル)を連続的に低減することによって、線形増幅範囲内に収まる可能性が最も高いサイクル数を決定した。電気泳動を行い、かつ、P32で標識化された配列特異的プローブとハイブリダイズした。PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, California, USA)を用いて強度を測定した。各試料について、濃度測定値を、(20サイクルで行った)GAPDH値で除算し、かつ、基準化した。プライマー配列は、以下のとおりであった。Msx2: フォワード、5'-CCT CGG TCA AGT CGG AAA ATT C-3' (配列番号: 2); リバース、5'-TGG ACA GGT ACT GTT TCT GG C G-3' (配列番号: 3); プローブ、5'-GAG CAC CGT GGA TAC AGG AG-3' (配列番号: 4) (アニーリング温度、68)。Cbfa1: フォワード、5'-CTG TGT GGC TCC TAA CAA G TG TG-3' (配列番号: 5); リバース、5'-GGA TTC TGG C AA TCA CAA GCT GTC-3' (配列番号: 6); プローブ、5'-CCT ACT CAC TGT CCG GGG AGT CCT GC-3' (配列番号: 7) (アニーリング温度、66)。オステオカルシン: フォワード、5'-ATG AGG ACC CTC TCT CTG CTC-3' (配列番号: 8); リバース、5'-GTG GTG CCA TAG ATG CGC TTG-3' (配列番号: 9)、プローブ 5'-CAT GTC AAG CAG GGA GGG CA-3' (配列番号: 10)、(アニーリング温度、66)。オステオポンチン: フォワード、5'-AGC AGG AAT ACT AAC TGC-3' (配列番号: 11); リバース、5'-GAT TAT AGT GAC ACA GAC-3' (配列番号: 12) プローブ 5'-GCC CTG AGC TTA GTT CGT TG-3' (配列番号: 13)、(アニーリング温度、66)。Ne11-1: (参考文献12)。

【0170】

フローサイトメトリー分析

細胞を、5×10⁵細胞/プレートで60mmプレート上に播種した。AdNe11-1およびAd-Galによる感染から24、36、48、および72時間後に、細胞を収集した。100万個の細胞をフローサイトメトリーに用い、かつ、この手順を3回繰り返した。ヨウ化プロピジウムを含む低浸透圧性DNA染色緩衝液を、フローサイトメトリーのため、細胞に添加した。

結果

CMVプロモーター/Ne11-1トランスジェニックマウスの構築

インビボでの全身性のNe11-1過剰発現の影響を調査するために、CMVプロモーターの制御下でNe11-1が発現されるトランスジェニックマウスを生成した。サザンブロットおよびPCRによってコピー数を確認した(図2A)。RNA分析(図2B)および免疫組織化学(データ示さず)によって、ファウンダーにおけるNe11-1の発現をさらに確認した。Ne11-1を過剰発現しているファウンダーを、非トランスジェニック同腹仔と交雑し、かつ、F2子孫に対して包括的な分析を行った。ほとんどのヒトCS表現型は、新生仔において容易に分かるため、2つのラインからの6つの一腹仔を代表する42の新生仔マウスを、検査した。縫合閉鎖を含む発生異常について、これらマウスの形態を評価した。その後、マウスの遺伝子型を決定した。縫合の下目に見える血管の

不在（縫合閉鎖を示す）または存在（縫合開存性を示す）によって、縫合開存性を測定した。解剖顕微鏡下で、縫合閉鎖をさらに確認した。20の子孫を代表する、検査された6つの一腹仔のうちの2つは、明らかな頭蓋顔面の欠損を有する新生仔をまったく生じず、かつ、*Ne11-1* 導入遺伝子陰性であった。これらの一腹仔は、それ以上検査しなかった。4つの残りの一腹仔のそれぞれにおいて、頭蓋顔面の欠損を有する子孫を回収した。これら4つの一腹仔の子孫（アニーリング温度、66℃）。オステオカルシン： フォワード、5'-ATG AGG ACC CTC TCT CTG CTC-3'（配列番号：14）； リバース、5'-GTG GTG CCA TAG ATG CGC TTG-3'（配列番号：15）、プローブ 5'-CAT GTC AAG CAG GGA GGG CA-3'（配列番号：16）、（アニーリング温度、66℃）10。オステオポンチン： フォワード、5'-AGC AGG AAT ACT AAC TGC-3'（配列番号：17）； リバース、5'-GAT TAT AGT GAC ACA GAC-3'（配列番号：18） プローブ 5'-GCC CTG AGC TTA GTT CGT TG-3'（配列番号：19）、（アニーリング温度、66℃）。*Ne11-1*：（参考文献12）。（22の Maus）を、さらに分析した。この高速なスクリーニング法の限界は、縫合閉鎖の焦点のみを有する軽度のCSは、検出されない可能性があり、従って、*Ne11-1* 過剰発現が、より低い浸透度を有しているように見える可能性がある、ということである。

【0171】

これら22の新生仔子孫のうちの13（60%）は、ファウンダー*Ne11-1* Mausと同様の遺伝子コピー数を有する、トランスジェニック Mausであった（予測は50%である）。これら13の*Ne11-1* DNA陽性トランスジェニックF₂（TF₂）Mausの*Ne11-1* RNAレベルを検査した。8つ（62%）は、*Ne11-1* RNA発現について陽性であった。しかしながら、発現のレベルは、さまざまであった（図2C）。それらの高い導入遺伝子のコピー数にも関わらず、いくつかのTF₂ Mausにおいて*Ne11-1* 発現が低かった、あるいは、ほぼ不在であった理由は、明らかでないが、インサートの周辺の異質クロマチン形成などの後成的影響が、導入遺伝子発現の高い可変性において、有意な役割を果たしていると思われる（参考文献17）。RNAレベルは、同じ一腹仔から単離された異なる組織においても異なっていた。Liu et al. も、彼らがCMVプロモーターを用いてMsx2を過剰発現した時、この変動を観察した（参考文献5、6）30。従って、トランスジェニック*Ne11-1* 転写は、必ずしも遺伝子コピー数と相関していないと思われ、また、細胞型によって異なっていると思われる。我々のトランスジェニックモデルにおける*Ne11-1* 過剰発現が生理学的に関連しているかどうかを判定するため、我々は、軽度のCS表現型を有する3つのTF₂ 子孫の全頭部からの*Ne11-1* RNA発現レベルを、非トランスジェニックの正常な同腹仔（NF₂ Maus）におけるレベルと、比較した。TF₂ Mausは、最大4倍増大した*Ne11-1* 発現（データ示さず）を示した。これは、2～4倍の増大が観察されたヒトCS患者におけるNELL-1過剰発現のレベルに相当していた（参考文献12）。これは、我々のモデルにおける*Ne11-1* 過剰発現レベルが、超生理学的というよりむしろ臨床的に関連していることを示唆している。40

【0172】

Ne11-1 トランスジェニック Mausの表現型の分析

これら8つの*Ne11-1* RNA陽性TF₂ Mausのうちの3つは、重度の頭蓋顔面の異形を実証し、かつ、生後まもなく死亡した（図3A～3C、および図5を参照）。これら Mausは、また、それらの全身mRNAにおいて、検出可能な*Ne11-1* 導入遺伝子発現を実証した（図2C）が、この発現は、皮膚、肝臓、および頭蓋冠の*Ne11-1* 免疫染色（図2D）によって検証された。

【0173】

最も重篤に影響されたTF₂ Mausのうちの一つの形態学的検査では、完全に閉鎖した矢状および前頭後部（PF）縫合、並びに、部分的に閉鎖した冠状縫合を有する正中傍頭 50

頂領域における、大きな隆起が明らかになった(図3A~3C)。臨床的には、これは、二次的な前頭骨の瘤および正中傍脳ヘルニアを有する、早期の矢状、前頭、および冠状縫合閉鎖を有するヒトCSの一形態である、頭蓋終脳形成異常に類似している(図3D)(参考文献1)。このTF₂マウスの脳MRIは、有意に減少した脳室の大きさおよび増大した実質浮腫を明らかにし、それらの両方が、高い頭蓋内圧を示唆している(図3E)。早期の縫合閉鎖に直面しての継続した脳成長は、また、未治療のCSを有するヒトにおいて、高い頭蓋内圧をもたらす。マイクロコンピュータ断層撮影(MCT)スキャンおよびMRI分析も、このTF₂マウスの頭蓋における構造異常を実証した(図3Fおよび3G)。

【0174】

Ne11-1表現型陽性TF₂マウスの組織学的検査では、NF₂同腹仔との明確な差が明らかになった。ヒトCSの場合と同様、TF₂マウスは、閉鎖しつつある/重複しつつある骨形成前端を有する頭蓋冠隆線の肥厚した無秩序な隆線として、組織学的に見られた、早期に閉鎖しつつある縫合を示した(図4パネルaおよびb)。ホールマウント骨格染色は、観察可能な頭蓋外のいかなる骨格異形も示さなかった。口蓋および下顎骨中央の縫合、椎骨、並びに長骨の、ヘマトキシリンおよびエオシンおよび酒石酸耐性酸性ホスファターゼ染色は、異常な組織学または破骨細胞数のいかなる増大も示さなかった。従って、Ne11-1発現の影響は、頭蓋冠に限局されていると思われる。CMVプロモーターの使用による組織全体のNe11-1発現にも関わらず、TF₂マウスは、主として蓋冠縫合の開存性および閉鎖に影響した頭蓋の特異的異形を示した。免疫組織化学は、造骨細胞分化マーカーの増大したインビボ発現を示した(図4パネルcおよびd)。

【0175】

Ne11-1を発現しているTF₂マウスにおける、早期に閉鎖しつつある頭蓋縫合の*in situ* BrdU分析は、縫合端部に沿った造骨性領域内で、増殖細胞数が有意に減少することを実証した(図4パネルeおよびf)。これらデータは、Ne11-1過剰発現が、造骨細胞分化に関連していることを示唆している。TF₂およびNF₂マウスの縫合に沿ったフィールド当りの細胞総数には、統計的に有意な差は観察されなかった(図4パネルg)。増殖細胞における観察された減少は、分化した造骨細胞の低下した増殖能に対する二次的なものであるとも思われ、あるいは、造骨細胞増殖における一次的欠損を反映しているとも思われる。

【0176】

第二の重篤に影響されたTF₂動物の形態学的検査では、後頭(後部)領域に隆起を有する、主として正中線における有意な頭蓋縫合閉塞(すなわち、矢状縫合および前頭後部縫合)が示された。全体的には、頭蓋骨は、狭く、かつ、舟状頭蓋および早期矢状縫合癒合症を有するヒトの頭蓋骨に類似していた。MCTスキャンでは、完全なPF縫合および部分的な矢状および冠状縫合閉鎖が示された(図5B)。組織学的相関関係は、矢状縫合の閉鎖した領域における、顕著な頭蓋冠骨の肥大および重複を示した(図5B)。

【0177】

妊娠中のTF₂胎生学的な発生を検討するため、E15 TF₂子孫の2つの一腹仔を屠殺した。19の胎仔のうち2つにおいて、脳ヘルニア様表現型を有する生育不能な同腹仔を観察した。興味深いことに、Liu et al. は、Msx2を過剰発現しているマウスについて、脳ヘルニアの同様の発見を報告した(参考文献6)。この表現型の病因論は、明らかでない。この結果は、また、新生仔マウス間での、重篤に影響されたTF₂子孫の、観察された低い発生率を説明するのを助けられる。

【0178】

インビトロでのNEL1-1の過剰発現は、造骨細胞分化を加速する頭蓋冠の肥大/重複および早期の縫合閉鎖に対してあり得る機序として、骨形成調節不全が提唱されている(参考文献18)。異常な縫合部位骨形成は、早期の縫合閉鎖を示すNe11-1 TF₂マウスの主要な特徴であるため、我々は、Ne11-1過剰発現が、正常な頭蓋冠造骨細胞の細胞周期および分化経路を改変して、早期の骨形成を促進する

10

20

30

40

50

という仮説を立てた。

【0179】

我々の仮説を検証するため、我々は、先ず、インビトロでの造骨細胞分化の特徴である石灰化に対する、Ne11-1の影響を検査した。初代FRCCおよびMC3T3（マウス頭蓋冠造骨細胞様細胞ライン）培養物に、アスコルビン酸の存在下で、20pfu/細胞でAdNe11-1を感染させた。アスコルビン酸は、造骨細胞の誘発および末端分化/石灰化に不可欠である（参考文献19）。AdNe11-1感染FRCCおよびMC3T3培養物は、Ad-Gal感染コントロールよりも、高速かつ大量に（6倍を超えて）石灰化した（図6Aおよび6B）。対照的に、AdNe11-1感染は、NIH3T3、成体、または胎仔のラット初代線維芽細胞において、石灰化反応をまったく誘発しな

10

【0180】

我々の以前のインビボでのBrdU結果は、TF₂マウスにおいて、骨形成前端に沿った有意に減少した細胞増殖を実証した。インビトロでのNe11-1過剰発現も細胞周期に影響するかどうかを判定するため、AdNe11-1感染MC3T3細胞（並びに、アスコルビン酸処置を行った、および行っていない、並びに、24時間の血清欠乏を行った、および行っていない、Ad-Galコントロール）を、感染から24時間後および48時間後に、フローサイトメリーによって検査した。細胞周期の異なる位相における個体群において、統計的に有意な変化は観察されなかった（Studentの両側t検定

20

【0181】

通常のインビトロでの造骨細胞分化は、先ず小結節形成（造骨細胞の凝集体）が行われて、その後に石灰化が生じる。この分化プログラムは、アスコルビン酸を必要とする。興味深いことに、AdNe11-1感染MC3T3細胞は、アスコルビン酸なしで培養された時も、感染後3日目から、アルカリ性フォスファターゼを発現している小結節を形成したが、「コントロール」Ad-Gal感染細胞には、これは起こらなかった。しかしながら、アスコルビン酸の不在下でのNe11-1誘発の小結節は、より小さく（小結節

30

【0182】

Ne11-1が造骨細胞分化を増強することを証明するために、アスコルビン酸を用いて通常の条件下で培養されたAdNe11-1感染MC3T3細胞からのRNAに対して、感染後6、9、および12日目に、各種の骨特異的マーカーのマイクロアレイ分析を行った（図6D~6F）。マイクロアレイの目的は、回帰分析を用いて、全体的な造骨細胞分化マーカー発現パターンにおいて、AdNe11-1感染細胞および「コントロール」Ad-Gal感染細胞が、明確な差を実証するかどうかを判定することであった。12日目までに、造骨細胞分化マーカーの発現パターンは、AdNe11-1感染細胞とAd-Gal感染細胞との間で、明確に異なっていた（ $r^2 = 0.334$ ）。この実験に用いたマイクロアレイ分析は、個々の遺伝子の発現を定量化することを意図されていなかった。個々の遺伝子の発現パターンは、慎重に解釈されるべきであり、例えば、2倍またはそれ以上のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションを有する遺伝子が、次いで、分析されるべきである。結果はまた、RT-PCRまたはRNA分析により確認されるべきである。Bmp7、オステオポンチン、およびオステオカルシンなどの後期

40

50

分化マーカーは、AdNe11-1感染細胞において、2倍を超えてアップレギュレーションされ、一方、I型コラーゲンおよびオステオネクチンなど、より早期のマーカーは、2倍を超えてダウンレギュレーションされた(図6G)。これは、Ne11-1が造骨細胞分化を促進することを示唆している。オステオカルシンおよびオステオポンチンRNAアップレギュレーションを、RNA電気泳動によって検証した(図7Cおよび7Dを参照)。マイクロアレイまたは低減サイクルのRT-PCR分析のいずれも、AdNe11-1感染MC3T3細胞において、Cbfa1、Tgf-1、Tgf-2、およびTgf-3、またはTgf-I型、Tgf-II型、およびTgf-III型受容体、Fgfr1、またはFgfr2の発現にいかなる有意な変化も実証しなかった(データ示さず)。これは、Ne11-1が、これら候補遺伝子の下流で働く可能性があり、あるいは、明確に異なる経路に影響する可能性があることを示唆している。

10

【0183】

インビトロでのNe11-1のダウンレギュレーションは、造骨細胞分化を遅延させる造骨細胞分化におけるNe11-1の生理学的機能にさらに取り組むために、我々は、造骨細胞におけるアデノウイルスのアンチセンスNe11-1感染を通して、Ne11-1蛋白質をダウンレギュレーションする効果を試験した。FRC培養物に、アスコルビン酸の存在下で、20pfu/細胞でAdAntiNe11-1を感染させた。AdAntiNe11-1は、Ne11-1蛋白質発現を、その通常の発現レベルの40%までダウンレギュレーションした(図7A)。FRC培養物は、Ad-Gal感染コントロールまたはAdNe11-1感染細胞よりも、有意により少ないアルカリ性フォスファターゼを発現した(図7B)。オステオカルシンおよびオステオポンチンRNA発現も、AdAntiNe11-1細胞においてダウンレギュレーションされた(図7Cおよび7D)。AdAntiNe11-1感染細胞内のオステオカルシンと、Ad-Galコントロール内のオステオカルシンとの比は、ノーザン分析によって、9日目に1:4より小さく、かつ、12日目に1:2であった。AdAntiNe11-1感染細胞内のオステオポンチンと、Ad-Galコントロール内のオステオポンチンとの比は、6日目および9日目に1:5より小さく、かつ、12日目に2:5より小さかった。従って、ロックダウンデータは、過剰発現データを補完しており、かつ、Ne11-1が造骨細胞分化において重要な役割を果たしていることを示唆している。

20

考察

30

NE11-1は、以前は分からなかった機能を有する、比較的新しく発見された分子である。CS患者で早期の縫合閉鎖中に、NE11-1の一過性のアップレギュレーションが観察された(12)ため、我々は、マウスモデルでNE11-1過剰発現をシミュレートして、頭蓋顔面の発生および病理学におけるNe11-1の新規の潜在的な機能を調査した。我々は、Ne11-1トランスジェニックマウスにおいて、早期の縫合閉鎖および増大した造骨細胞分化を観察した。従って、Ne11-1は、局所的縫合閉鎖の制御の候補である可能性が高く、かつ、Ne11-1の過剰発現は、CSにおける早期の縫合閉鎖の機序において重要な役割を果たしていると思われる。我々の過剰発現およびロックダウンのインビトロデータによれば、Ne11-1は、造骨細胞分化に影響する可能性が最も高い。しかしながら、分子機序は未知である。

40

【0184】

Ne11-1は、配位子と結合し、次いで、それを隔離し、あるいは、活性化することによって、並びに、受容体仲介の信号伝達を引き起こすことによって、造骨細胞分化を誘発すると考えられる(参考文献20)。Ne11-1の、コーディン様システインリッチドメイン、NH₂末端トロンボスポンジン様モジュール、およびEGF様反復の組合せは、Ne11-1を、成長因子活性の、可能性の高いモジュレーターにする。我々は、この可能性を試験するための予備研究を行った。Ne11-1が既知のEGF様受容体に結合するかどうかを判定するため、我々は、Erbb1、Erbb2、Erbb3、またはErbb4を発現しているIL-3依存細胞に、Ne11-1を事前に添加した。Ne11-1の添加は、これら受容体のチロシンリン酸化をもたらさなかった。従って、Ne11

50

- 1 は、E G F 様反復を有する既知の分泌蛋白質ではあっても、N e l l - 1 は、これら受容体に対する配位子ではない（参考文献 1 3）。代わりに、N e l l - 1 は、ある種の細胞型によってのみ発現されると思われる、他の特異的受容体と、相互作用すると思われる。酵母 2 ハイブリッドシステム（参考文献 1 4）を用いて、我々は、潜在的な N e l l - 1 受容体を単離する過程にある。N e l l - 1 は、トロンボスポンジン - 1 およびコーディンと、多くのモチーフを共有しているため、N e l l - 1 は、仮説上は、T G F - スーパーファミリーのメンバーを活性化し、あるいは、隔離し、かつ、トロンボスポンジン - 1 様分子として機能して、潜在性の T G F - 1 活性化を促進すると思われる（2 1）。最近、Abreu et al. は、N e l l - 1 が、コーディン、kielin、crossveinless, twisted gastrulation（原腸形成）（T s g）、および結合 T G F を含む、「コーディン様システインリッチドメイン」ファミリーのメンバーであることを示唆した（参考文献 2 0）。コーディン様システインリッチドメインファミリーメンバーの共通の特徴は、それらの発現が、特に、パターン形成において、時間的かつ空間的に特異的であるということである。別の共通の特徴は、それらの、B m p ファミリーのメンバーとの相互作用、および、プロまたはアンチ B m p としてのその後の機能である。

10

20

30

40

50

【0185】

インビボでの N e l l - 1 の特異的な発現および機能

以前の研究において我々は、E 1 1 - E 1 4 マウスにおける、最も早期の検出可能な N e l l - 1 発現を報告した（参考文献 1 2）。N e l l - 1 は、成長および発生中に、出生前と出生後の両方で、頭蓋顔面の領域内で優先的に発現される。免疫組織化学は、N e l l - 1 が、主として、縫合および頭蓋冠の骨形成領域、並びに、下顎骨内の骨化しつつある膜性骨に、局在化することを示した（データ示さず）。頭蓋冠骨と下顎骨膜性骨の両方が、神経冠誘導体であると考えられている（参考文献 2 2）。神経冠誘導体による頭蓋顔面の領域における優先的な N e l l - 1 発現は、N e l l - 1 が、頭蓋顔面の骨格の成長および発達中に重要であり得ることを示唆している。驚くべきことに、全身性の遺伝子過剰発現を含む他の C S モデルとは異なり、N e l l - 1 トランスジェニックマウスは、全身性の非組織特異的 N e l l - 1 過剰発現にも関わらず、頭蓋冠骨に限定された異形を示した。これは、N e l l - 1 が、きわめて特異的な相互作用を行って、造骨細胞分化を誘発する、という我々の仮説を、さらに裏付けている。従って、N e l l - 1 過剰発現が、トロンボスポンジン - 1 などの相同的な分子の機能を非特異的に乱すことによって、縫合閉鎖を引き起こす可能性は低い。これは、インビトロでのノックダウン研究によって検証された。

【0186】

造骨細胞分化に対する N e l l - 1 の影響

アスコルビン酸なしで培養された正常な造骨細胞は、分化しない。一方、N e l l - 1 を過剰発現している造骨細胞は、アスコルビン酸の不在下で、微小結節を形成し、かつ、アルカリ性フォスファターゼを発現する。これは、N e l l - 1 が、単独で、ある程度の造骨細胞分化を誘発するのに十分であることを示唆している。

【0187】

さらに、通常の条件下で（すなわち、アスコルビン酸を用いて）培養された造骨細胞における N e l l - 1 過剰発現の R N A マイクロアレイ分析は、形質移入後 1 2 日目に、後期分化マーカーのアップレギュレーションを実証した。A d N e l l - 1 形質移入された造骨細胞はまた、形質移入後 1 2 日目に始まる、石灰化の増進を示した。これらデータは、N e l l - 1 が、頭蓋冠の造骨細胞分化および石灰化の速度を加速し得ることを示している。

【0188】

N e l l - 1 過剰発現は、N e l l - 1 の真の生理学的機能を反映しておらず、むしろ、他のトロンボスポンジン様分子に対する N e l l - 1 過剰発現の影響を反映していると思われる。N e l l - 1 のダウンレギュレーションは、明らかに、造骨細胞分化を阻害した。従って、N e l l - 1 は、インビトロでの造骨細胞分化にとって、十分であり、かつ

必要である可能性が高い。しかしながら、インビボでこの結論を正当化するためには、N e l l - 1ヌルマウスを作製する必要がある。

【0189】

N e l l - 1の、現在既知のC Sモデルとの関係

N e l l - 1過剰発現は、インビボでのM s x 2過剰発現の結果生じるものと同様の、頭蓋顔面の異常をもたらす。両方のマウスモデルが、縫合肥大、および脳ヘルニアの高い発生率を示している。しかしながら、これら二つの遺伝子の細胞機能は、明確に異なると思われる、すなわち、連続的M s x 2過剰発現は、増殖を誘発し、かつ、分化を阻害し、一方、N e l l - 1は、分化を増強する。P r o 2 5 0突然変異を有するマウスにおいては、頭蓋冠の癒合はるかに遅く生じ（出生後16～21日目）、かつ、全体の縫合重複が生じない（参考文献8）ため、C b f a 1過剰発現を誘発する、F g f r 1におけるP r o 2 5 0 A r g突然変異を有するマウスは、N e l l - 1を過剰発現しているマウスとは、明確に異なる表現型を有している。しかしながら、C b f a 1は、インビトロでN e l l - 1と同様の細胞機能を有している、すなわち、両方とも、骨マーカータンパク質のアップレギュレーションによる造骨細胞分化を誘発する。N e l l - 1発現は、M s x 2およびC b f a 1によって調整される。F R C CのC b f a 1形質移入は、24時間以内にN e l l - 1発現をアップレギュレーションし、一方、M s x 2形質移入およびC b f a 1 / M s x 2同時形質移入は、N e l l - 1発現をダウンレギュレーションした（未発表の観察）。これら候補遺伝子は全て、C Sの理解にとって重要であるが、M s x 2は、C Sのより早期の段階において重要であると考えられ（参考文献5、6）、一方、F g f r 1 / C b f a 1は、縫合閉鎖のより後期の段階において、一定の役割を果たしていると思われる。保存されたC b f a 1およびM s x結合配列を含むN e l l - 1プロモーターの今後の調査は、それらの相互作用のさらなる理解をもたらすと思われる（図8）。これら観察は、頭蓋顔面の成長および発達における、動的な遺伝的および環境的な相互作用の複雑性を強調している。

【0190】

結論として、我々は、N e l l - 1を過剰発現することによって、ヒト非症候群性C Sの動物モデルを創出した。F G F Rまたはホメオボックス遺伝子における突然変異を含む、他の利用可能なC Sモデル（参考文献1、2、8）とは異なり、我々の動物モデルは、頭蓋顔面の骨格に局在化された異形を示した。我々は、N e l l - 1が、頭蓋冠の造骨細胞分化および骨形成を促進し、かつ、加速するのに、十分であり、かつ、おそらくは必要であるとの仮説を立てる。機序的には、N e l l - 1過剰発現は、頭蓋縫合における膜内の骨形成を誘発し、かつ、頭蓋冠の肥大/重複およびその後の早期の縫合閉鎖をもたらすと思われる。N e l l - 1は、ヒト遺伝子研究においてC Sの一因としていまだ同定されていないが、データは、N e l l - 1が、早期の縫合閉鎖をもたらす、複雑な一連の事象の一部であることを、強く示唆している（参考文献1）。非症候群性C Sを有するヒトに対する、N e l l - 1トランスジェニックマウスの類似性、および、既知のC S候補遺伝子とのN e l l - 1の関連性は、C S研究に新しい見識を提供する。縫合閉鎖および骨形成における、N e l l - 1の制御および機序のさらなる調査は、C Sにおいて早期の縫合閉鎖をもたらす一連の事象について、我々の理解を潜在的に加速することができる。

【0191】

本文書で述べる例および実施形態は、もっぱら説明の目的にのみ記載されており、その説明に照らした各種の変形または変更は、当業者に示唆されており、かつ、本出願書の主旨および本文、かつ、添付のクレームの範囲内に含まれるべきであることが理解されよう。本文書で引用された全ての出版物、特許、および特許出願書は、本文書によって、全ての目的のために、その全部が引用により組み込まれている。

関連出願の記載、連邦政府より後援された研究開発の下で行われた発明に対する権利に関する陳述

本願は、2002年9月13日出願のU S S N 60 / 410, 846（引用により、すべての目的のためにその全部を本文書に組み込む）に対する優先権および該U S S N

60 / 410 , 846 の利益を主張する。

【0192】

この研究は、NIH/NIDR付与番号DE94001およびCRC/NIH付与番号RR00865により支援された。本発明においては、米国政府が一定の権利を有し得る。

参考文献

1. Cohen, M.M, Jr., and MacLean, R.E. 2000. Craniosynostosis: diagnosis, evaluation and management. 2nd edition. Oxford University Press. New York, New York, USA. 454 pp.
2. Coffin, J.D., et al. 1995. Abnormal bone growth and selective translational regulation in basic fibroblast growth factor (FGF-2) transgenic mice *Mol. Biol. Cell.* 6:1861-1873. 10
3. Carlton, M.B., Colledge, W.H., and Evans, M.J. 1998. Crouzon-like craniofacial dysmorphology in the mouse is caused by an insertional mutation at the *Fgf3/Fgf4* locus. *Dev. Dyn.* 212:242-249.
4. Jabs, E.W., et al. 1993. A mutation in the homeodomain of the human *MSX2* gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis *Cell.* 75:443-450.
5. Liu, Y.H., et al. 1995. Premature suture closure and ectopic cranial bone in mice expressing *Msx2* transgenes in the developing skull. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:6137-6141. 20
6. Liu, Y.H., et al. 1999. *Msx2* gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for *MSX2*-mediated craniosynostosis in humans *Dev. Biol.* 205:260-274.
7. Ma, L., Golden, S., Wu, L., and Maxson, R. 1996. The molecular basis of Boston-type craniosynostosis: the Pro148->His mutation in the N-terminal arm of the *MSX2* homeodomain stabilizes DNA binding without altering nucleotide sequence preferences. *Hum. Mol. Genet.* 5:1915-1920.
8. Zhou, Y.X., et al. 2000. A Pro250Arg substitution in mouse *Fgfr1* causes increased expression of *Cbfa1* and premature fusion of calvarial sutures *Hum. Mol. Genet.* 9:2001-2008. 30
9. Otto, F., Kanegane, H., and Mundlos, S. 2002. Mutations in the *RUNX2* gene in patients with cleidocranial dysplasia. *Hum. Mutat.* 19:209-216.
10. Matsushashi, S., et al. 1996. New gene, *nel*, encoding a Mr 91 K protein with EGF-like repeats is strongly expressed in neural tissues of early stage chick embryos [erratum 1996, 207:233-234]. *Dev. Dyn.* 203:212-222.
11. Watanabe, T.K., et al. 1996. Cloning and characterization of two novel human cDNAs (*NELL1* and *NELL2*) encoding proteins with six EGF-like repeats. *Genomics.* 38:273-276. 40
12. Ting, K., et al. 1999. Human *NELL-1* expressed in unilateral coronal synostosis *J. Bone Miner. Res.* 14:80-89.
13. Kuroda, S., and Tanizawa, K. 1999. Involvement of epidermal growth factor-like domain of *NELL* proteins in the novel protein-protein interaction with protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265:752-757.
14. Kuroda, S., et al. 1999. Biochemical characterization and expression analysis of neural thrombospondin-1-like proteins *NELL1* and *NELL2*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265:79-86.
15. Hogan, B.C., Beddington, R., Constantini, F., and Lacy, E. 1986. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Springs Harbor Laboratory Press. 50

Cold Springs Harbor, New York, USA. 332 pp.

16. Laird, P.W., et al. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure *Nucleic Acids Res.* 19:4293.

17. Palmiter, R.D., Wilkie, T.M., Chen, H.Y., and Brinster, R.L. 1984. Transmission distortion and mosaicism in an unusual transgenic mouse pedigree *Cell.* 36: 869-877.

18. Kim, H.J., Rice, D.P., Kettunen, P.J., and Thesleff, I. 1998. FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. *Development.* 125: 1241-1251.

19. Franceschi, R.T., Iyer, B.S., and Cui, Y. 1994. Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *J. Bone Miner. Res.* 9:843-854. 10

20. Garcia Abreu, J., Coffinier, C., Larrain, J., Oelgeschlager, M., and De Robertis, E.M. 2002. Chordin-like CR domains and the regulation of evolutionarily conserved extracellular signaling systems. *Gene.* 287:39-47.

21. Murphy-Ullrich, J.E., and Poczatek, M. 2000. Activation of latent TGF- β by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11:59-69.

22. Hall, K.B., and Horstadius, S. 1988. *The neural crest.* Oxford University Press Oxford, United Kingdom. 305 pp. 20

【産業上の利用可能性】

【0193】

本発明が開示するNELL-1遺伝子または遺伝子産物は、スクリーニングによって、骨石灰化のモジュレータを得るための簡便な標的を提供する。該NELL-1は、骨折の修復を促進する目的に、及び/又は、一般に骨密度を増大する目的に使用可能である。

【図面の簡単な説明】

【0194】

【図1A】コントロールとして - ガラクトシダーゼを有する、アデノウイルスを用いたE-14ラット頭蓋冠の初代細胞培養物内のNELL-1の過剰発現を示す。

【図1B】それぞれ、NELL-1および - ガラクトシダーゼによる処置後の時間の関数としての、石灰化のプロットを示す。 30

【図2A】非トランスジェニック同腹仔と比較されたNell-1トランスジェニックマウスにおける導入遺伝子のコピー数を示す。

【図2B】両ファウンダーにおけるNell-1 RNA発現のRT-PCR分析を示す。

【図2C】新生仔子孫の全身(頭部なし)RNAを示す。

【図2D】左のパネルは、新生仔NF2の上皮、筋肉、および頭蓋冠骨におけるNell-1蛋白質の免疫局在性を示し、右のパネルは、TF2A2の上皮、筋肉、および頭蓋冠骨におけるNell-1蛋白質の免疫局在性を示す。

【図3A】Nell-1トランスジェニックマウスの表現型評価であり、左のパネルは新生仔Nell-1表現型陽性(TF2A1)マウスを、右のパネルはNF2同腹仔をそれぞれ示す。 40

【図3B】Nell-1トランスジェニックマウスの表現型評価であり、左のパネルは新生仔Nell-1表現型陽性(TF2A1)マウスを、右のパネルはNF2同腹仔をそれぞれ示す。

【図3C】左のパネルは、頭皮を除去したTF2A2マウスを、右のパネルは、開存している矢状およびPF縫合、および、開存している縫合の下に正常な脈管構造を有する、NF2同腹仔の頭蓋骨をそれぞれ示す。

【図3D】CSの重篤な一形態である頭蓋終脳形成異常を有する乳仔を示す。

【図3E】TF₂A1マウス(左)およびNF2同腹仔(右)の脳MRIを示す。 50

【図3F】) 新生仔 *Nel1*-1 表現型陽性 TF_2A1 (左) および $NF2$ (右) 同腹仔の MCT 再構築された三次元の頭蓋骨の図を示す。

【図3G】図3Fに示される TF_2A1 (左) および $NF2$ 同腹仔 (右) の連続軸方向 MCT 断面を示す。

【図4】*Nel1*-1 トランスジェニックマウスの組織学的および免疫組織学的評価を示す。

【図5A】非トランスジェニック同腹仔と比較された *Nel1*-1 トランスジェニック TF_2B1 マウスであって、左は頭皮を除去した新生仔 TF_2B1 マウスを、右は $NF2$ 同腹仔をそれぞれ示す。

【図5B】 TF_2B1 矢状縫合のヘマトキシリンおよびエオシン染色を示す。 10

【図5C】 TF_2B1 マウス (左) およびその $NF2$ 同腹仔 (右) の三次元の MCT 再構築を示す。

【図6A】von Kossa 染色で染色された、 $20\text{ pfu}/\text{細胞}$ の *AdNel1*-1 を感染させた FRC 培養物を示す。

【図6B】石灰化した領域の定量化および統計解析を示す。

【図6C】アスコルビン酸なしで育成された *AdNel1*-1 感染 $MC3T3$ 細胞を示す。

【図6D】感染後 6、日目の *AdNel1* 感染 $MC3T3$ 細胞のマイクロアレイを示す。

【図6E】感染後 9 日目の *AdNel1* 感染 $MC3T3$ 細胞のマイクロアレイを示す。

【図6F】感染後 12 日目の *AdNel1* 感染 $MC3T3$ 細胞のマイクロアレイを示す。 20

【図6G】*AdNel1*-1 感染後に、2 倍高い、あるいは、2 倍低い発現の差を有する遺伝子を要約した表。

【図7A】 $20\text{ pfu}/\text{細胞}$ の *AdAntiNel1*-1 または *Ad* - *Gal* コントロールを感染させたラット FRC における、*Nel1*-1 蛋白質発現のウェスタンブロット分析を示す。

【図7B】 FRC のアルカリ性フォスファターゼ染色 (赤色) を示す。

【図7C】感染後 3、6、9、および 12 日目の FRC のノーザン分析を示す。

【図7D】PhosphorImager によって測定され、かつ、 $GAPDH$ によって基準化された、オステオカルシン (OC) およびオステオポンチン (OP) の発現を示す。

【図8】早期縫合閉鎖における *Nel1*-1 機能の仮説モデル。 30

【配列表】

SEQUENCE LISTING

Sequence ID No: 1 NELL-1 cDNA
The full NELL-1 human sequence

```

5      1 tagcaagttt ggcggctcca agccaggcgc gcctcaggat ccaggctcat ttgcttccac
      61 ctagcttcgg tgccccctgc taggggggga ccctcgagag cgatgccgat ggatttgatt
     121 ttagttgtgt ggttctgtgt gtgcactgcc aggacagtgg tgggctttgg gatggaccct
     181 gaccttcaga tggatatcgt caccgagcct gaccttgtga acaccaccct tggagttgct
     241 caggtgtctg gaatgcacaa tgcagcaaaa gcatttttat tcaagacat agaagagag
10    301 atccatgcag ctctcatgt  gagtgcagaaa ttaattcagc tgttccagaa caagagttaa
     361 ttcaccattt tggccactgt acagcagaag ccatccactt caggagtgat actgtccatt
     421 cgagaactgg agcacagcta ttttgaaactg gagagcagtg gcctgagggg tgagattcgg
     481 tatcactaca tacacaatgg gaagccaagg acagaggcac ttcttaccg catggcagat
     541 ggaccaatgg acaaggttgc actgtcagtt agcgcctctc atctctgct ccatgtcgac
15    601 tgtaacagga tttatgagcg tgtgatagac cctccagata ccaaccttcc cccaggaatc
     661 aatttatggc ttggccagcg caacccaaaag catggcctat tcaaggggat catccaagat
     721 gggaagatca tctttatgcc gaatggatat ataacacagt gtccaaatct aaatcacact
     781 tgccaacact gcagtgattt ctttaagcctg gtgcaaggaa taatggattt acaagagcct
     841 ttggccaaga tgactgcaaa actaaattat gcagagacaa gacttagtca attggaaaac
20    901 tgtcatttgg agaagacttg tcaagtgagt ggaactgctt atcgagatca agactcttgg
     961 gtagatggtg accattgcag gaactgcact tgcaaaagtg gtgcccgtgga atgccgaagg
    1021 atgtccaact ccctctcaa ttgctcccca gactccctcc cagtacacat tgtggcgac
    1081 tgctgtaagg tctgccgacc aaaatgtatc tatggaggaa aagtcttctc agaagccag
    1141 cggattttaa ccaagagctg tcgggaatgc cgaggtggag ttttagtaaa aattacagaa
25    1201 atgtgtcctc ctttgaactg ctcaaaaaag gatcacatc ttctgagaaa tcagtgtctg
     1261 cgtgtctgta gaggcataa cttttgtgca gaaggaccta aatgtggtag aaactcagc
     1321 tgcaaaaaact ggaatacaaa agctacttgt gagtgcagaa gtggttacat ctctgtccag
     1381 ggagactctg cctactgtga agatattgat gagtgtgcag ctaagatgca ttactgtcat
     1441 gccaatactg tgtgtgtcaa ccttctctgg tbatatcgct gtgactgtgt cccaggatac
30    1501 attcgtgtgg atgacttctc ttgtacagaa cacgatgaat gtggcagcgg ccagcacac
     1561 tbtgatgaga atgccatctg caccaacact gtccaggagc acagctgcac ctgcaaacctg
     1621 ggctacgtgg ggaacgggac catctgcaga gcttctctgt aagagggctg cagatacggg
     1681 ggaacgtgtg tggctcccaa caaatgtgtc tgtccatctg gatccacagg aagccactgc
     1741 gagaaagata ttgatgaatg ttcagagggg atcattgagt gccacaacca ttcccgtctg
35    1801 gttaacctgc cagggtggtg cactgtgag tgcagaagcg gttccatga cgaatggacc
     1861 tattcactgt ccggggagtc ctgtattgac attgatgaat gtgccttaag aactcacacc
     1921 tbttggaacg attctgcctg catcaacctg gcaggggggt ttgactgtct ctgcccctct
     1981 gggccctcct gctctggtga ctgtcctcat gaaggggggc tgaagcacia tggccagggtg
     2041 tggaccttga aagaagacag gtgttctgtc tgcctctgca aggatggcaa gatattctgc
40    2101 cgacggacag cttgtgattg ccagaatcca agtgctgacc tattctgttg cccagaatgt
     2161 gacaccagag tcacaagtca atgttttagc caaaatggtc acaagctgta tcgaagtgga
     2221 gacaattgga cccatagctg tcagcagtgt cgggtgtctg aaggagaggt agattgctgg
     2281 ccaactcactt gcccacactt gagctgtgag tatacagcta tcttagaagg ggaatgttgt
     2341 ccccgctgtg tcagtgacct ctgctagct gataacatca cctatgacat cagaaaaact
45    2401 tgctggaca gctatggtgt ttcacggcct agtggctcag tgtggacgat ggttgatct
     2461 cctgcacaaa cctgtaaatg caagaatgga agagtctgtt gttctgtgga ttttgagtgt
     2521 cttaaaaata attgaagtat ttacagtgga ctcaacgcag aagaatggac gaaatgacca
     2581 tccaacgtga ttaaggatag gaatcggtag tttggttttt ttgtttgttt tgtttttta
     2641 accacagata attgccaag tttccacctg aggacggtgt ttcggagggt gccttttggg
50    2701 cctaccactt tgctcattct tgctaacctg gtctaggtga cctacagctc cgtgcattta
     2761 agtcaatggt tgttaaaaaga agtttcccgt gttgtaaatc atgtttccct taccagatca
     2821 tttgcaata catttaaatg atctcaggtt aaatggttga tgtatttttt ggttttattt
     2881 tgtgtactaa ccataataga gagagactca gctcctttta tttattttgt tgatttatgg
55    2941 atcaaatctt aaaataaagt tgctgttgt gactttt

```

Sequence ID No: 2

5 Genebank accession number U57523

```

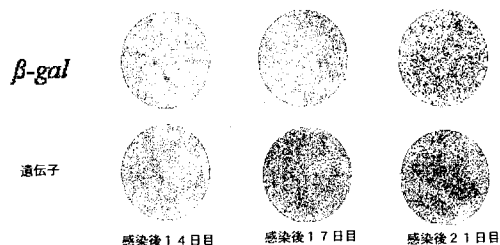
1 gatcagtgct gccgtgtctg tagagggtcat aacttttgtg cagaaggacc taaatgtggt
61 gaaaactcag agtgcaaaaa ctggaataca aaagctactt gtgagtgcaa gagtgggtac
121 atctctgtcc aggggagact ctgcctactg tgaagatatt gatgagtggt cagctaagat
181 gcattactgt catgccaaata ctgtgtgtgt caaccttcct gggttatata cctgtgactg
10 241 tgtcccagga tacattcgtg tggatgactt ctcttgtaca gaacacgatg aatgtggcag
301 cggccagcac aactgtgatg agaatgccat ctgcaccaac actgtccagg gacacagctg
361 caactgcaaa cggggctacg tggggaacgg gaccatctgc agagctttct gtgaagaggg
421 ctgcagatac ggtggaacgt gtgtggctcc caacaaatgt gtctgtccat ctggattcac
481 aggaagccac tggogaaaag atattgatga atgttcagag ggaatcattg agtgccacaa
15 541 ccattcccg ctcgttaacc tgcagggtg gcaccactgt gactgcagaa ggggtttcca
601 tgacgatggg acctattcac tgcctgggga gtccctgtatt gacattgatg aatgtgcctt
661 aagaactcac acctgttggg acgattctgc ctgcatcaac ctggcagggg gttttgactg
721 tctctgccc tgtgggcctt cctgctctgg tgactgtcct catgaagggg ggctgaagca
781 caatggccag gtgtggacct tgaagaaga cagggttctt gtctgtcctt gcaaggatgg
20 841 taagatattc tgcgcagcga cagcttgtga ttgccagaat ccaagtgtct acctattctg
901 ttgccagaaa tgtgacacca gactcacaag tcaatgttta gaccaaaatg gtcacaagct
961 gtatcgaagt ggagacaatt ggacccatag ctgtcagcag tctcgggtgc tggagggaga
1021 ggtagattgc tggccactca cttgccccaa cttgagctgt gactatacag ctatcctaga
1081 aggggaatgt tgtcccgcct gtgtcagtga ccctgccta gctgataaca tcacctatga
25 1141 cctccagaaa acttgcttgg acagtatggt gtttcacggc ttagtggctc agtgtggacg
1201 atggctggat ctccttcgac aacctgtaaa tgcaagaatg gaagagtctg ttgttctgtg
1261 gattttgagt gtcttcaaaa taattgaagt atttacagtg gactcaacgc agaagaatgg
1321 acgaaatgac catccaacgt gattaaggat aggaatcggg agtttgggtt ttttggttgt
1381 tttgtttttt taaccacaga taattgccaa agtttcacc tgaggacggg gtttggagg
30 1441 tgcttttgg acctaccact ttgctcattc ttgctaacct agtttaggtg acctacagtg
1501 ccgtgcattt aagtcagtgg ttgttaaaag aagtttccc cgttgtaaat catgtttccc
1561 ttatcagatc atttgcaaat acatttaaat gatntcatgg taaatgttgc tgtatttttt
1621 ggtttatatt ctgtactaac ataatagaga gagantnagc tccttttatt tattttgttg
1681 atttatggat caaatntaa aataaagttg cctgttgtgn aa

```

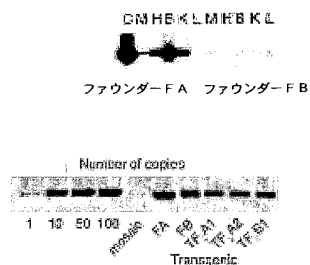
10

20

【 図 1 A 】



【 図 2 B 】



【 図 1 B 】

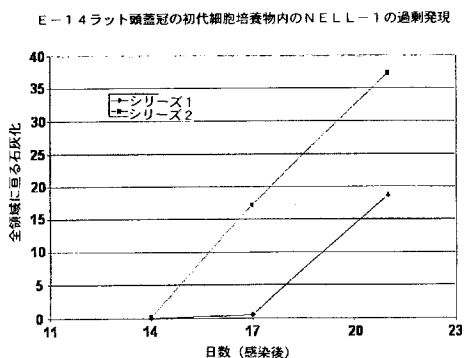


Fig. 2A

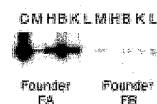


Fig. 2B

【 図 2 A 】

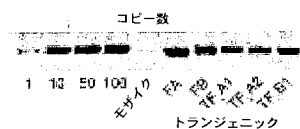
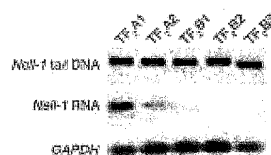


Fig. 2C



【 図 2 D 】

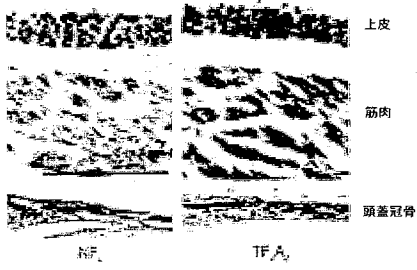


Fig. 3A



Fig. 3B

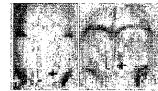


Fig. 3C



Fig. 3D



Fig. 3E



Fig. 3F

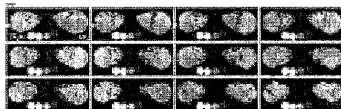


Fig. 3G

【 図 4 】

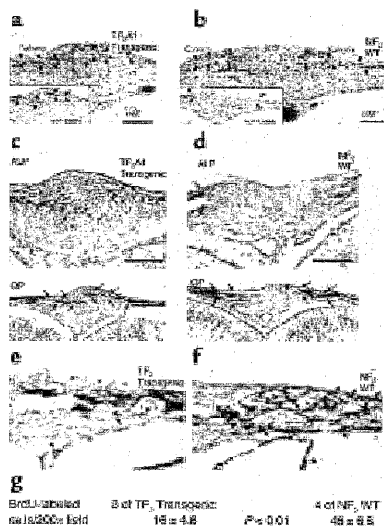


Fig. 4

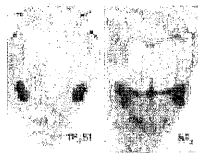


Fig. 5A

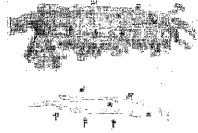


Fig. 5B

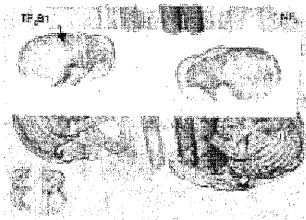
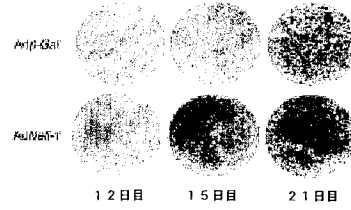
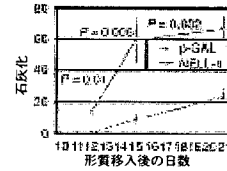


Fig. 5C

【 図 6 A 】



【 図 6 B 】



【 図 6 C 】



【 図 6 D - 6 G 】

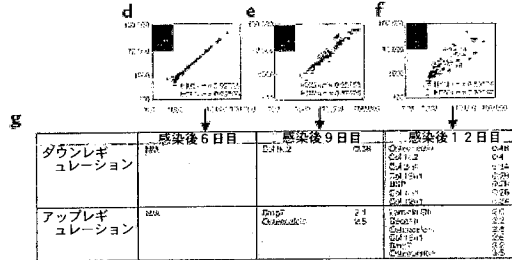


Fig. 7B

【 図 7 A 】

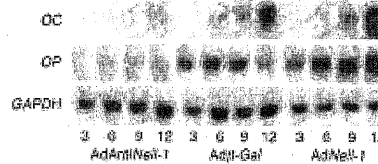
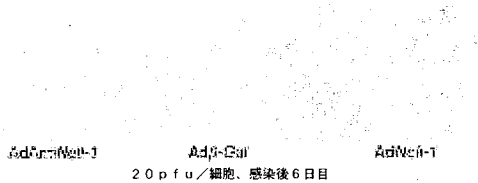
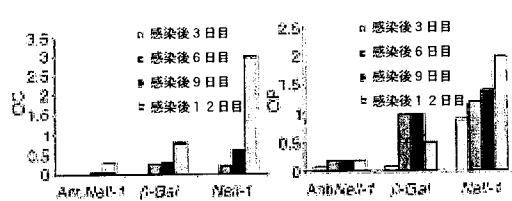


Fig. 7C

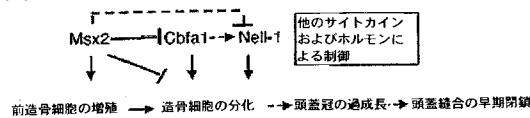
【 図 7 B 】



【 図 7 D 】



【図 8】



【手続補正書】

【提出日】平成17年5月16日(2005.5.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトにおいて、頭蓋冠の造骨細胞の分化および石灰化を制御する方法であって、

Nell-1の発現または活性の増大が、該ヒトにおいて、造骨細胞の分化または石灰化を増進させ、かつ、Nell-1の発現または活性の低下が、該ヒトにおいて、造骨細胞の分化または石灰化を低下させることを特徴とする、該ヒトにおけるNell-1の発現または活性を改変する工程を含むことを特徴とする該方法。

【請求項2】

抗Nell-1アンチセンス分子、Nell-1特異的リボザイム、Nell-1特異的触媒DNA、Nell-1特異的RNAi、抗Nell-1細胞内発現抗体、および、標的細胞及び/又は組織内のNell-1をロックアウトする遺伝子治療法からなる群から選択される方法によって、Nell-1の発現または活性が阻害されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

Nell-1を発現する外来の核酸を細胞に形質移入すること、及び、Nell-1タンパク質を細胞に形質移入することからなる群から選択される方法によって、Nell-1の発現または活性が増大されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記 *Nel1-1* の発現または活性が、該ヒトにおいて阻害されること、及び、
該ヒトが、異常な頭蓋縫合の発達を経験しつつあること
を特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記異常な頭蓋縫合の発達が、頭蓋骨癒合症 (CS) を含むことを特徴とする請求項 4 に
記載の方法。

【請求項 6】

ヒトにおいて潜在的 TGF- β 1 の活性化を促進する方法であって、外来の *Nel1-1*
を前記ヒトに投与する工程、又は、該ヒトにおける内在性の *Nel1-1* の発現活性を増
大させる工程を含むことを特徴とする該方法。

【請求項 7】

ヒトにおいて TGF- β スーパーファミリーのメンバーを活性化する、又は隔離する方
法であって、外来の *Nel1-1* を該ヒトに投与する工程、又は、該ヒトにおける内在性の
Nel1-1 の発現活性を増大させる工程を含むことを特徴とする該方法。

【請求項 8】

造骨細胞の分化を制御する作用剤をスクリーニングする方法であって、
Nel1-1 遺伝子を含むヒト細胞である試験細胞と試験作用剤とを接触させる工程；
及び

コントロール細胞における該 *Nel1-1* 遺伝子の発現または *Nel1-1* の活性と比
較しての、該試験細胞における *Nel1-1* 遺伝子の発現レベルまたは *Nel1-1* の活
性の変化を検出する工程であって、該試験細胞と該コントロール細胞内の、*Nel1-1*
の発現レベルまたは *Nel1-1* の活性の差が、前記作用剤が骨の石灰化を制御している
ことを示すことを特徴とする該工程
を含むことを特徴とする該方法。

【請求項 9】

前記コントロールが、前記試験細胞より低い濃度の前記試験作用剤と接触させたネガティ
ブコントロール細胞であることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記低い濃度が、前記試験作用剤が不在であることを示すことを特徴とする、請求項 9 に
記載の方法。

【請求項 11】

前記コントロールが、前記試験細胞より高い濃度の前記試験作用剤と接触させたポジティ
ブコントロール細胞であることを特徴とする、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

Nel1-1 核酸または *Nel1-1* タンパク質の発現を改変する試験作用剤を、*Nel1-1*
活性のモジュレーターの前記データベース内、あるいは、骨の石灰化のモジュレーター
のデータベース内に、記録する工程を、更に含むことを特徴とする請求項 8 に記載の方法
。

【請求項 13】

前記細胞内の *Nel1-1* mRNA のレベルを測定することによって、*Nel1-1* の
発現レベルが検出されることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

Nel1-1 mRNA の前記レベルが、前記 mRNA を、*Nel1-1* 核酸に特異的に
ハイブリダイズするプローブに、ハイブリダイズさせることによって測定されることを特
徴とする、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記ハイブリダイズ工程が、ノーザンブロット、*Nel1-1* RNA に由来する DNA
を用いるサザンブロット、アレイハイブリダイゼーション、アフィニティークロマトグラ
フィー、および *in situ* ハイブリダイゼーションからなる群から選択される方法によるも

のであることを特徴とする請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記プローブが、プローブのアレイを形成する複数のプローブのメンバーであることを特徴とする請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

N e l l - 1 m R N A の前記レベルが、核酸増幅反応を用いて測定されることを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 18】

N e l l - 1 の前記レベルが、前記生体試料内の N e l l - 1 タンパク質の発現レベルを測定することによって検出されることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 19】

前記検出工程が、キャピラリー電気泳動、ウェスタンブロット、質量分析、E L I S A、免疫クロマトグラフィー、および免疫組織化学からなる群から選択される方法を介して行われることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記細胞が生体外で培養されることを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 21】

前記試験作用剤が抗体でないことを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 22】

前記試験作用剤がタンパク質でないことを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 23】

ヒト細胞内における N e l l - 1 発現を改変する方法であって、該ヒト細胞における M s x 2 及び / 又は C a f a 1 の発現または活性を改変する工程を含むことを特徴とする該方法。

【請求項 24】

該ヒト細胞における C b f a 1 の発現または活性をアップレギュレーションして、N e l l - 1 の発現または活性をアップレギュレーションする工程を含むことを特徴とする、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

該ヒト細胞における M s x 2 の発現または活性をアップレギュレーションして、N e l l - 1 の発現または活性をダウンレギュレーションすることを特徴とする、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

ヒトにおける N e l l - 1 の発現または活性を制御する作用剤をスクリーニングする方法であって、

C b f a 1 及び / 又は M s x 2 遺伝子を含むヒト細胞である試験細胞と試験作用剤とを接触させる工程 ; 及び

コントロール細胞における、C b f a 1 及び / 又は M s x 2 遺伝子の発現または C b f a 1 及び / 又は M s x 2 の活性と比較しての、該試験細胞における、C b f a 1 及び / 又は M s x 2 遺伝子の発現レベルまたは C b f a 1 及び / 又は M s x 2 の活性の変化を検出する工程であって、該試験細胞と該コントロール細胞内の、C b f a 1 及び / 又は M s x 2 の発現レベルまたは C b f a 1 及び / 又は M s x 2 の活性の差が、前記作用剤が N e l l - 1 の発現または活性を制御していることを示すことを特徴とする該工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 27】

前記コントロールが、前記試験細胞より低い濃度の前記試験作用剤と接触させたネガティブコントロール細胞であることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記低い濃度が、前記試験作用剤が不在であることを示すことを特徴とする、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記コントロールが、前記試験細胞より高い濃度の前記試験作用剤と接触させたポジティブコントロール細胞であることを特徴とする、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

C b f a 1 及び / 又は M s x 2 遺伝子の発現を改変する試験作用剤を、N e l l - 1 活性のモジュレーターの前記データベース内、あるいは、骨の石灰化のモジュレーターの前記データベース内に、記録する工程を、更に含むことを特徴とする、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 31】

前記 N e l l - 1 の発現レベルが、前記細胞内の C b f a 1 及び / 又は M s x 2 m R N A のレベルを測定することによって検出されることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 32】

C b f a 1 及び / 又は M s x 2 m R N A の前記レベルが、前記 m R N A を、C b f a 1 及び / 又は M s x 2 核酸に特異的にハイブリダイズするプローブにハイブリダイズさせることによって測定されることを特徴とする、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記ハイブリダイズ工程が、ノーザンブロット、C b f a 1 及び / 又は M s x 2 R N A に由来する D N A を用いるサザンブロット、アレイハイブリダイゼーション、アフィニティークロマトグラフィー、および in situ ハイブリダイゼーションからなる群から選択される方法によるものであることを特徴とする請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記プローブが、プローブのアレイを形成する複数のプローブのメンバーであることを特徴とする請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

C b f a 1 及び / 又は M s x 2 m R N A の前記レベルが、核酸増幅反応を用いて測定されることを特徴とする請求項 31 に記載の方法。

【請求項 36】

C b f a 1 及び / 又は M s x 2 の前記レベルが、前記生体試料内の C b f a 1 及び / 又は M s x 2 タンパク質の発現レベルを測定することによって検出されることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 37】

前記検出工程が、キャピラリー電気泳動、ウェスタンブロット、質量分析、E L I S A、免疫クロマトグラフィー、および免疫組織化学からなる群から選択される方法を介して行われることを特徴とする請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記細胞が生体外で培養されることを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 39】

前記試験作用剤が抗体ではないことを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 40】

前記試験作用剤がタンパク質ではないことを特徴とする請求項 26 に記載の方法。

【請求項 41】

N e l l - 1 タンパク質をコード化する核酸、N e l l - 1 タンパク質、および N e l l - 1 タンパク質の発現または活性を改変する作用剤からなる群から選択される、一つまたはそれ以上の活性な作用剤であって、ヒトにおいて造骨細胞の分化または石灰化を増進させる目的に有効な量の、該作用剤；及び、

薬学的に受容可能な賦形剤を含むことを特徴とする薬学的な製剤形態。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/29281
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12N 15/63 US CL : 435/455 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) U.S. : 435/455 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) STN/WEST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Database WPIDS on STN, No 2001-300143, TING, K. 'Screening for an agent that alters bone mineralization, useful for facilitating bone calcification or repair, comprises contacting a cell containing NELL-1 gene with a test agent and detecting change in NELL-1 gene expression level,' abstract, WO 2001024821.	1-4
X	Database CAPLUS on STN, NO. 2000:15500, KIM D. et al, NELL-1 enhances mineralization in fetal calvarial osteoblastic cells, abstract, Surgical Forum, 1999.	1-4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 29 September 2004 (29.09.2004)		Date of mailing of the international search report 20 OCT 2004 DATE NOUVEAU PRIMARY EXAMINER
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Richard Schnizer, Ph.D. Telephone No. (571) 272-1600 <i>Valerie Bell-Hamilton</i>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/29281

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1,3,6 and 7

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/29281

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group 1, claim(s) 1,3,6, and 7, partially, drawn to methods of increasing the expression or activity of Nell-1 by transfecting a cell with an exogenous nucleic acid expressing Nell-1.

Group 2, claim(s) 1,3,6, and 7, partially, drawn to methods of increasing the activity of Nell-1 by delivering to a cell an exogenous Nell-1 protein.

Group 3, claim(s) 1,2,4, and 5, partially, drawn to methods of decreasing Nell-1 expression or activity by use of anti-Nell-1 antisense, ribozyme, or RNAi.

Group 4, claim(s) 1,2,4, and 5, partially, drawn to methods of decreasing Nell-1 expression or activity by use of Nell-1-specific catalytic DNA.

Group 5, claim(s) 1,2,4, and 5, partially, drawn to methods of decreasing Nell-1 expression or activity by use of anti-Nell-1 intrabodies.

Group 6, claim(s) 1,2,4, and 5, partially, drawn to methods of decreasing Nell-1 expression or activity by knocking out Nell-1 in target cells.

Group 7, claims 23-25, partially, drawn to methods of increasing Nell-1 expression by increasing expression or activity of Msx2.

Group 8, claims 23-25, partially, drawn to methods of increasing Nell-1 expression by increasing expression or activity of Cbfa1

Group 9, claims 23-25, partially, drawn to methods of decreasing Nell-1 expression by decreasing expression or activity of Msx2.

Group 101, claims 23-25, partially, drawn to methods of decreasing Nell-1 expression by decreasing expression or activity of Cbfa1

Group 112, claims 8-22 and 26-40, drawn to methods of screening for modulators of Nell-1 expression.

Group 12, claim 41, partially, drawn to a pharmaceutical composition comprising a nucleic acid encoding a Nell-1 protein.

Group 13, claim 41, partially, drawn to a pharmaceutical composition comprising a Nell-1 protein.

Group 14, claim 41, partially, drawn to a pharmaceutical composition comprising an agent that alters expression or activity of a Nell-1 protein.

The inventions listed as Groups 1-14 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Claim 1 is drawn to a method of modulating calvarial osteoblast differentiation and mineralization comprising altering expression or activity of Nell-1, wherein increased expression or activity of Nell-1 increases osteoblast differentiation or mineralization. However, Kim et al (Surgical Forum (1999) 50: 599-601) taught that causing overexpression of Nell-1 in either primary rat calvarial cells or MC3T3 cells resulted in an increase in mineralization. See abstract. Thus claim 1 is anticipated by the prior art, and the technical feature linking the inventions cannot be a special technical feature under PCT Rule 13.2. Also note that the expression vector of KIn also anticipates the first and third embodiments of claim 41, i.e. inventions 12 and 14. Further note that Zhang et al (Surgical Forum (2001) 52: 576-578) taught that Nell-1 overexpression in transgenic mice caused craniosynostosis in the calvarium. As such, the inventions have been restricted as shown above, and the special technical feature of each invention is deemed to be as stated above in the description of the various inventions.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	4 C 0 8 6
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00	G
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, CH, 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, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100085279

弁理士 西元 勝一

(72) 発明者 ティン、カン

アメリカ合衆国 9 0 2 1 1 カリフォルニア州 ビバリー ヒルズ ノース ドヒニー ドライブ 115

F ターム(参考) 2G045 AA40 CB01 DA13 DA14 DA36 FA11 FB02 FB03 FB05 FB07
 4B024 AA01 BA80 CA01 DA02 EA04 GA11 HA08 HA17
 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR42 QR50 QR55
 QR62 QR66 QR77 QR80 QR82 QS03 QS16 QS25 QS28 QS34
 QS36 QS39 QX01 QX07
 4C081 AB03 AB04 BA12 CD11
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA17 BA01 BA22 BA35 BA44 CA18
 CA53 DC50 MA17 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA65 MA66
 MA67 NA14 ZA962 ZA972 ZC412
 4C085 AA14 AA34 BB11 BB41 BB43 BB44 CC02 CC21 CC22 DD62
 DD63 EE01
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA96 ZA97 ZC41

专利名称(译)	NELL-1增强骨矿化作用		
公开(公告)号	JP2006512292A	公开(公告)日	2006-04-13
申请号	JP2004536597	申请日	2003-09-15
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
[标]发明人	テインカン		
发明人	テイン、カン		
IPC分类号	A61K45/00 A61K48/00 A61K31/7088 A61K38/00 A61P43/00 A61P19/00 A61P19/08 A61P19/10 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 A61K39/395 A61L27/00 C12N15/09 C07K14/47 C07K14/51		
CPC分类号	A61K38/1709 A61K48/00 A61K48/005 A61P19/00 A61P19/08 A61P19/10 C07K14/51 C12N15/86 C12N27/10/10343 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/6872 G01N2333/51 G01N2500/00		
FI分类号	A61K45/00 A61K48/00.ZNA A61K31/7088 A61K37/02 A61P43/00.111 A61P19/00 A61P19/08 A61P19/10 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D A61K39/395.D A61L27/00.G C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX07 4C081/AB03 4C081/AB04 4C081/BA12 4C081/CD11 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA35 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/MA17 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084/MA67 4C084/NA14 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZC412 4C085/AA14 4C085/AA34 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC02 4C085/CC21 4C085/CC22 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA96 4C086/ZA97 4C086/ZC41		
代理人(译)	中岛敦		
优先权	60/410846 2002-09-13 US		
其他公开文献	JP2006512292A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及人NELL-1基因诱导或上调骨矿化的发现。因此，HELL-1基因或基因产物为筛选骨矿化调节剂提供了方便的靶标。另外，HELL-1可用于促进骨折的修复和/或通常增加骨密度。

【 1 B 】

E-14ラット頭蓋冠の初代細胞培養物内のNELN-1の過剰発現

