

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5717178号  
(P5717178)

(45) 発行日 平成27年5月13日(2015.5.13)

(24) 登録日 平成27年3月27日(2015.3.27)

(51) Int.Cl.	F I
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02
<b>G O 1 N 33/68 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/68
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 D
<b>G O 1 N 33/15 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/15 Z
請求項の数 16 (全 45 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2010-515954 (P2010-515954)	(73) 特許権者 504209655 国立大学法人佐賀大学 佐賀県佐賀市本庄町1番地
(86) (22) 出願日 平成21年6月3日(2009.6.3)	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2009/060567	(73) 特許権者 599045903 学校法人 久留米大学 福岡県久留米市旭町67番地
(87) 国際公開番号 W02009/148184	
(87) 国際公開日 平成21年12月10日(2009.12.10)	(74) 代理人 100092783 弁理士 小林 浩
審査請求日 平成24年6月1日(2012.6.1)	(74) 代理人 100095360 弁理士 片山 英二
(31) 優先権主張番号 特願2008-147822 (P2008-147822)	(74) 代理人 100120134 弁理士 大森 規雄
(32) 優先日 平成20年6月5日(2008.6.5)	(74) 代理人 100149010 弁理士 星川 亮
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特発性間質性肺炎の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を測定することを含む、特発性間質性肺炎の検出を補助する方法。

【請求項2】

特発性間質性肺炎が、特発性肺線維症、または非特異性間質性肺炎である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

非特異性間質性肺炎が線維性非特異性間質性肺炎(fibrotic NSIP)である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

測定が免疫測定法によるものである、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

生体試料が肺組織および/または血液である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

(i)被験者由来の生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量と、(ii)正常者由来の生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量との比較を行うことを含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 7】

(i)被験者由来の生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量が(ii)正常者由来の生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量よりも高いときに、特発性間質性肺炎である、または特発性間質性肺炎が疑われると判断することを含む、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

ペリオスチンを産生する能力を有する細胞を候補物質の存在下で培養した場合におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を測定することを含む、特発性間質性肺炎の予防・治療剤のスクリーニング方法。

## 【請求項 9】

特発性間質性肺炎が、特発性肺線維症、または非特異性間質性肺炎である、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

非特異性間質性肺炎が線維性非特異性間質性肺炎 (fibrotic NSIP) である、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

測定が免疫測定法によるものである、請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 12】

(i)ペリオスチンを産生する能力を有する細胞を候補物質の存在下で培養した場合におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量と、(ii)ペリオスチンを産生する能力を有する細胞を候補物質の非存在下で培養した場合におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量との比較を行うことを含む、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 13】

(i)ペリオスチンを産生する能力を有する細胞を候補物質の存在下で培養した場合におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量が(ii)ペリオスチンを産生する能力を有する細胞を候補物質の非存在下で培養した場合におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量よりも低いときに、候補物質を選択することを含む、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

ペリオスチン遺伝子の塩基配列を含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも 21 塩基の長さを有するポリヌクレオチドを含む、特発性間質性肺炎の検出用キット。

## 【請求項 15】

ペリオスチンタンパク質のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体を含む、特発性間質性肺炎の検出用キット。

## 【請求項 16】

ペリオスチンを産生する能力を有する細胞を含む、特発性間質性肺炎の予防・治療剤のスクリーニング用キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、特発性間質性肺炎の検出方法、特発性間質性肺炎の予防・治療剤のスクリーニング方法、およびこれらの方法に使用するキットに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonia; IIP) は肺組織の線維化を特徴とする原因不明の疾患であり、その発症及び進行を予測することは非常に困難である。

特発性間質性肺炎は、組織学的分類により特発性肺線維症 (あるいは、通常型間質性肺

10

20

30

40

50

炎ともいう) (idiopathic pulmonary fibrosis; IPF / usual interstitial pneumonia; UIP)、および非特異性間質性肺炎 (nonspecific interstitial pneumonia; NSIP) などいくつかの病型に分類され、IPF / UIP患者とNSIP患者とで特異性間質性肺炎患者全体の80 - 90%以上を占める。NSIPは、さらに線維性 (fibrotic) NSIPとcellular NSIPとに分類される。特異性間質性肺炎には現在のところ有効な治療法が存在しない。特異性間質性肺炎は診断からの平均生存期間が2 - 4年と予後が悪く、一方、NSIPの予後はIPF / UIPに比べると良い。その中でもcellular NSIPはfibrotic NSIPに比べてさらに予後は良くなっている。このように病型によって患者の予後が異なるため、特異性間質性肺炎の病型を決定することは、患者の予後を予測する上で重要である。

10

特異性間質性肺炎の診断はX線写真やCTによる画像的診断方法や生理的肺機能検査などが中心であり、肺組織の生体検査による組織的診断方法により確定診断を行ってきた。しかし、画像的診断方法は、組織的診断方法ほど診断の正確性は高くなく、また高度でかつ専門的な診断技術を伴う。さらに、定量的に診断することが困難である。

したがって、画像的診断法の他に非侵襲的な診断法の開発が求められる。

ここで、文献1には、ペリオスチン遺伝子の発現レベルを指標として、アレルギー性疾患を検査することが記載されている。

また、文献2には、ペリオスチン (骨芽細胞特異因子2) が、IL - 4またはIL - 13による刺激にตอบสนองして線維芽細胞で産生され、気管支喘息患者の肺線維症に關与する可能性があることが示されている。

20

(文献)

1. WO2002/052006

2. G. Takayama et al., J Allergy Clin Immunol, vol. 118, 98 - 104, 2006

【発明の開示】

【0003】

このような状況の下、マーカーを利用した特異性間質性肺炎の検出方法などが求められていた。

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、特異性間質性肺炎患者由来の生体試料においてペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量が高いこと、ペリオスチンをマーカーとして利用することで特異性間質性肺炎を検出できること、等の知見に基づき本発明を完成させた。

30

すなわち、本発明は、以下の特異性間質性肺炎の検出方法または診断方法、特異性間質性肺炎の予防・治療剤のスクリーニング方法、およびこれらの方法に使用するキットを提供する。

(1) 生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を測定することを含む、特異性間質性肺炎の検出方法または診断方法。

(2) 特異性間質性肺炎が、特異性肺線維症、または非特異性間質性肺炎である、上記(1)に記載の方法。

40

(3) 非特異性間質性肺炎が線維性非特異性間質性肺炎 (fibrotic NSIP) である、上記(2)に記載の方法。

(4) 測定が免疫測定法によるものである、上記(1) ~ (3)のいずれか1項に記載の方法。

(5) 生体試料が肺組織および/または血液である、上記(1) ~ (4)のいずれか1項に記載の方法。

(6) (i) 被験者由来の生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量と、(ii) 正常細胞におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量との比較を行うことを含む、上記(1) ~ (5)のいずれか1項に記載の方法。

50

(7) (i) 被験者由来の生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量が(ii) 正常細胞におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量よりも高いときに、特発性間質性肺炎である、または特発性間質性肺炎が疑われると判断することを含む、上記(6)に記載の方法。

(8) ペリオスチンを産生する能力を有する細胞を候補物質の存在下で培養した場合におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を測定することを含む、特発性間質性肺炎の予防・治療剤のスクリーニング方法。

(9) 特発性間質性肺炎が、特発性肺線維症、または非特異性間質性肺炎である、上記(8)に記載の方法。

(10) 非特異性間質性肺炎が線維性非特異性間質性肺炎(fibrotic NSIP)である、上記(9)に記載の方法。 10

(11) 測定が免疫測定法によるものである、上記(8)~(10)のいずれか1項に記載の方法。

(12) 生体試料が肺組織および/または血液である、上記(8)~(11)のいずれか1項に記載の方法。

(13) (i) ペリオスチンを産生する能力を有する細胞を候補物質の存在下で培養した場合におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量と、(ii) ペリオスチンを産生する能力を有する細胞を候補物質の非存在下で培養した場合におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量との比較を行うことを含む、上記(8)~(12)のいずれか1項に記載の方法。 20

(14) (i) ペリオスチンを産生する能力を有する細胞を候補物質の存在下で培養した場合におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量が(ii) ペリオスチンを産生する能力を有する細胞を候補物質の非存在下で培養した場合におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量よりも低いときに、候補物質を選択することを含む、上記(13)に記載の方法。

(15) ペリオスチン遺伝子の塩基配列を含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも21塩基の長さを有するポリヌクレオチドを含む、特発性間質性肺炎の検出用キット。

(16) ペリオスチンタンパク質のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体を含む、特発性間質性肺炎の検出用キット。 30

(16a) 特発性間質性肺炎が、特発性肺線維症、または非特異性間質性肺炎である、上記(15)または(16)に記載のキット。

(16b) 非特異性間質性肺炎が線維性非特異性間質性肺炎(fibrotic NSIP)である、上記(16a)に記載のキット。

(17) ペリオスチンを産生する能力を有する細胞を含む、特発性間質性肺炎の予防・治療剤のスクリーニング用キット。

(17a) 特発性間質性肺炎が、特発性肺線維症、または非特異性間質性肺炎である、上記(17)に記載のキット。

(17b) 非特異性間質性肺炎が線維性非特異性間質性肺炎(fibrotic NSIP)である、上記(17a)に記載のキット。 40

本発明により、新規マーカーを利用した特発性間質性肺炎の検出方法などが提供される。本発明の好ましい態様によれば、検出結果を、特発性間質性肺炎の確定診断の補助にできる等の利点がある。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0004】

図1は、肺組織におけるペリオスチンの組織免疫染色の結果を示す写真である。(a) IPF/UIP、(b) fibrotic NSIP、(c) cellular NSIP、および(d) 正常。

図2は、血中ペリオスチンレベルのELISA測定の結果を示すグラフである。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

 50

## 【 0 0 0 5 】

以下、本発明を詳細に説明する。

なお、本明細書において引用された全ての刊行物、例えば先行技術文献、及び公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込まれる。また、本明細書は、本願の優先権主張の基礎となる日本国特許出願である特願 2 0 0 8 - 1 4 7 8 2 2 号の特許請求の範囲、明細書、および図面の開示内容を包含する。

## 1 . 本発明の概要

本発明は、生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を測定することを含む、特発性間質性肺炎の検出方法または診断方法である。

本発明者らは、特発性間質性肺炎の検出に利用できるマーカーを求めて鋭意検討を重ねた。その結果、特発性間質性肺炎患者は、肺組織および血液などにおいてペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量が高いことを見出した。

具体的には、特発性間質性肺炎患者由来の肺組織を用いて組織染色法によりペリオスチンタンパク質量を測定した。その結果、23人のIPF/UIP患者と23人のfibrotic NSIP患者全てにおいてペリオスチンタンパク質量が高かった(図1(a)および(b))。尚、4人のcellular NSIP患者ではペリオスチンタンパク質量がきわめて低かった(図1(c))。一方、対照群として用いた6人の正常肺組織においてはいずれもペリオスチンタンパク質量はきわめて低かった(図1(d))。

また、特発性間質性肺炎患者から採取した血液を用いて免疫測定法によりペリオスチンタンパク質量を測定した。13人のIPF/UIP患者と12人の正常者とで比較した結果、有意差を持ってIPF/UIP患者において血液中のペリオスチンタンパク質量が上昇していた(図2)。

以上のように、特発性間質性肺炎患者由来の組織においては、ペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量が高いことから、本発明者らは、ペリオスチンが、特発性間質性肺炎を検出するためのマーカーとして有用であることを見出した。

また、本発明は、ペリオスチンを産生する能力を有する細胞を候補物質の存在下で培養した場合におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を測定することを含む、特発性間質性肺炎の予防・治療剤のスクリーニング方法も提供する。

上記のようにペリオスチン遺伝子は、特発性間質性肺炎の患者由来の組織で発現レベルが増加し、患者由来の組織中のペリオスチンタンパク質レベルが高いので、患者に投与することにより組織でのペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を減少させる化合物またはその塩、例えば、発現を阻害する化合物またはその塩(ペプチド、タンパク質、合成化合物、もしくは抗ペリオスチン抗体、またはそれらの塩など)は、特発性間質性肺炎の予防・治療剤として使用し得る。

さらに、本発明は、上記特発性間質性肺炎の検出方法または診断方法、または特発性間質性肺炎の予防・治療剤のスクリーニング方法に使用するキットも提供する。

## 2 . ペリオスチン

ペリオスチン(periostin)は、骨芽細胞特異因子2とも呼ばれる、約90kDaのタンパク質である(OSF2os; Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Ozawa H, Toyama Y, Bonewald LF, Kudo A.; Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. J Bone Miner Res. 1999 Jul; 14(7): 1239-49.)。ペリオスチンには、alternative splicingによるC末側の長さの違いで区別できるいくつかの転写物が存在することが知られている。ここで、配列番号1に、ヒトのペリオスチン遺伝子の全てのエクソンによる転写産物のDNA配列を示す(Accession No. D136

10

20

30

40

50

66)。また、ヒトのペリオスチンのその他の *splicing variant* の DNA 配列の例を、配列番号 3、5 に示す（それぞれ、Accession Nos. AY918092、AY140646）。また、配列番号 2、4、6 に、それぞれ、配列番号 1、3、5 のポリヌクレオチドによってコードされるペリオスチンのアミノ酸配列を示す。

本発明の好ましい態様では、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列から派生する *variant*（例えば、配列番号 2、4 または 6 で表されるアミノ酸配列からなるペリオスチン）を含むペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を測定する。

### 3. 本発明の特発性間質性肺炎の検出方法または診断方法

ペリオスチン遺伝子またはペリオスチンタンパク質量は、特発性間質性肺炎の患者由来の組織で発現が増加しているため、被験者由来の生体試料におけるペリオスチンは、特発性間質性肺炎を検出または診断するためのマーカーとして利用し得る。すなわち、本発明は、生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を測定することを含む、特発性間質性肺炎の検出方法を提供する。より具体的には、例えば、(i) 被験者由来の生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量と、(ii) 正常細胞におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量との比較を行う。具体的には、ペリオスチンタンパク質量またはペリオスチンをコードする mRNA 量を測定して比較する。発現レベルまたはタンパク質量の測定に用いる生体試料としては、例えば、被験者由来の、肺組織、血液、喀痰、呼気凝縮液、肺胞洗浄液、または気管支鏡等を用いて採取した気道被覆液等を用いることができる。好ましくは、被験者由来の肺組織または血液を用いる。肺組織、血液、喀痰、呼気凝縮液、肺胞洗浄液、または気管支鏡等を用いて採取した気道被覆液等を採取する方法は、公知である。正常細胞は、例えば、特発性間質性肺炎を患っていない者由来の細胞である。生体試料が肺組織および喀痰等である場合には、発現レベルまたはタンパク質量の測定に利用するために、例えば、そのライセートを調製すること、または mRNA を抽出することが好ましい。ライセートの調製および mRNA の抽出は、公知の方法で行うことができ、例えば市販のキットを使用して行う。また、生体試料が、血液および肺胞洗浄液等の液状のものである場合には、例えば、緩衝液等で希釈してペリオスチンをコードする mRNA 量の測定などに利用するのが好ましい。ペリオスチンタンパク質量の測定は、例えば、免疫測定法などにより行うことができる。好ましくは、免疫測定法で行う。免疫測定法としては、放射免疫測定法 (RIA)、免疫蛍光測定法 (FIA)、免疫発光測定法、酵素免疫測定法（例えば、Enzyme Immunoassay (EIA)、Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA)）、または Western blot 法などが挙げられる。RIA で標識に用いる放射性物質としては、例えば、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、または  $^{32}\text{P}$  を利用することができる。FIA で標識に用いる蛍光物質としては、例えば、Eu (ユーロピウム)、FITC、TMRITC、Cy3、PE、または Texas-Red などの蛍光物質を利用することができる。免疫発光測定法で標識に用いる発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニン等を用いることができる。酵素免疫測定法で標識に用いる酵素としては、例えば西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホファターゼ (ALP)、グルコースオキシダーゼ (GO) 等を用いることができる。さらに、抗体または抗原と、これらの標識物質との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。mRNA 量の測定は、公知の方法、例えば、ペリオスチン遺伝子の塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチドを用いて行うことができる。より具体的には、例えば、配列番号 1、3、もしくは 5 またはその一部を含有するポリヌクレオチドを固定した DNA チップ、プローブとして配列番号 1、3、もしくは 5 またはその一部を含有するポリヌクレオチドを用いるノーザンハイブリダイゼーション、あるいはプライマーとして配列番号 1、3、もしくは 5 またはその一部を含有するポリヌクレオチドを用いる PCR 法を用いて行うことができる。そして、例えば、(i) の場合のペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量が、(ii) の場合のペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量と比較して高い場合、例えば、

10

20

30

40

50

約20%以上、約30%以上、約40%以上、約50%以上、約60%以上、約70%以上、約80%以上、約90%以上、約95%以上、または約100%以上高い場合に特発性間質性肺炎が疑われると判断できる。上記方法で検出できる特発性間質性肺炎の病型は、例えば、特発性肺線維症/通常型間質性肺炎(IPF/UIP)、または非特異性間質性肺炎(NSIP)であり、具体的には、IPF/UIP、またはfibrotic NSIPである。

また、免疫組織化学により、ペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を測定するようによっても良い。より具体的には、例えば、(i)被験者由来の生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量と、(ii)正常細胞におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量との比較を行う。具体的には、免疫組織化学によりペリオスチンまたはペリオスチンをコードするmRNAを可視化し、ペリオスチンタンパク質量またはmRNA量を比較する。生体試料としては、肺組織などが挙げられる。免疫組織化学としては、具体的には、酵素標識抗体法、または蛍光抗体法などが挙げられる。酵素標識抗体法としては、例えば、直接法、間接法、アビジン・ビオチン化ペルオキシダーゼ複合法(ABC法)、もしくはストレプトアビジン・ビオチン化抗体法(SAB)法などの標識抗体法、またはペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ法(PAP法)などの非標識抗体法が挙げられる。蛍光抗体法としては、直接法、または間接法が挙げられる。標識に用いる酵素または蛍光物質としては、前記と同様のものが挙げられる。そして、例えば、(i)の場合のペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量が、(ii)の場合のペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量と比較して高い場合、例えば、約20%以上、約30%以上、約40%以上、約50%以上、または約60%以上、約70%以上、約80%以上、約90%以上、約95%以上、または約100%以上高い場合に特発性間質性肺炎が疑われると判断できる。上記方法で検出できる特発性間質性肺炎の病型は、例えば、特発性肺線維症/通常型間質性肺炎(IPF/UIP)、または非特異性間質性肺炎(NSIP)であり、具体的には、IPF/UIP、またはfibrotic NSIPである。

ここで、(i)被験者由来の生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量と(ii)正常細胞におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量の差は、特発性間質性肺炎の検出または診断の臨界値となるものであり、例えば次のように設定しても良い。まず、2例以上の特発性間質性肺炎(例えば、IPF/UIP、またはfibrotic NSIP)患者由来の生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を測定し、その平均値(A)を求める。このとき、対象となる患者の例数は2例以上であり、例えば、5例以上、10例以上、50例以上、または100例以上である。一方、2例以上の健常者由来の細胞におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を測定し、その平均値(B)も求める。このとき、対象となる健常者の例数は2例以上であり、例えば、5例以上、10例以上、50例以上、または100例以上である。そして、求めた平均値AおよびBから $[(A - B) / B] \times 100 (\%)$ を計算して、特発性間質性肺炎患者由来の生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量の平均値が健常者由来の細胞におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量の平均値と比較して何%高いかを求める。このようにして求めた値を、(i)被験者由来の生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量と(ii)正常細胞におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量の差(臨界値)として設定する。すなわち、(i)の場合のペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量が、(ii)の場合のペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量と比較して求めた差以上に高い場合(例えば、統計的に有意に高い場合)に、特発性間質性肺炎である、または特発性間質性肺炎が疑われると判断できる。尚、本発明の特発性間質性肺炎の検出方法または診断方法では、生体試料におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオ

10

20

30

40

50

スチンタンパク質量を測定するので、測定値を平均値(A)および(B)に組み入れて、対象となる患者の例数および対象となる健常者の例数を増やすのが好ましい。例数を増やすことにより、特発性間質性肺炎の検出または診断の精度を高めることができる。また、求めた健常者由来の細胞におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量の平均値(B)を、「(i i)正常細胞におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量」としても良い。

上記特発性間質性肺炎の検出結果または診断結果は、例えば特発性間質性肺炎の確定診断を行う場合の補助とすることができる。特発性間質性肺炎の確定診断を行う場合には、上記検出結果に加えて、理学所見の結果、血清学的検査の結果(例えば、血清のKL-6、LDH、またはSC-A等)、呼吸機能検査の結果、胸部X線画像所見の結果、および胸部HRCT画像所見の結果の結果からなる群から選択される少なくとも1つと組み合わせ、総合的に判断するようにしても良い。

#### 4. 本発明の特発性間質性肺炎の検出用キットまたは診断用キット

本発明は、上記特発性間質性肺炎の検出方法または診断方法に使用することができるキットを提供する。

本発明の一つの態様によれば、前記キットは、ペリオスチン遺伝子の塩基配列(例えば、配列番号1、3もしくは5の塩基配列)またはその一部を含有するポリヌクレオチドを含む。好ましくは、前記キットは、ペリオスチン遺伝子の塩基配列を含むポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも21塩基の長さを有するポリヌクレオチドを含む。より好ましくは、前記キットは、DNAチップ上に固定された上記ポリヌクレオチドを含有し得る。

本発明の別の態様によれば、前記キットは、ペリオスチンタンパク質のアミノ酸配列(例えば、配列番号2、4もしくは6のアミノ酸配列)を含むペプチドを認識する抗体、より好ましくは、特異的に認識する抗体を含む。前記抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよく、限定されるものではない。抗体は、当分野において周知の方法により製造することができる。

抗体の製造法は、例えば、ポリクローナル抗体を作製する場合は、抗原をアジュバントとともにウサギ等の哺乳動物に投与して所定期間免疫を行い、抗血清を得る。抗体価の測定は、通常の、酵素免疫測定法(ELISA法、又はEIA法)等を採用することができる。

また、モノクローナル抗体を作製する場合は、抗原で免疫した動物から採取された免疫担当細胞(脾細胞など)とミエロマ細胞とを融合させ、HAT培地などの選択培地によりスクリーニングして目的とする抗体を産生するハイブリドーマを取得する。このハイブリドーマを培養することにより目的のモノクローナル抗体を得ることができる。

前記抗体は、放射性物質、蛍光物質、酵素等で標識されていてもよい。また、前記キットは、標識された二次抗体を含有していてもよい。

前記キットは、上記の他に、容器およびラベルを含んでいてもよい。容器上のまたは容器に伴うラベルには、キットが特発性間質性肺炎の検出または診断に使用されることが示されていてもよい。また、他のアイテム、例えば、使用説明書等がさらに含まれていてもよい。

#### 5. 本発明のスクリーニング方法

ペリオスチン遺伝子は、特発性間質性肺炎の患者由来の組織で発現が増加しているため、投与したときに患者の組織でペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を減少させる化合物またはその塩、例えば、発現を阻害する化合物またはその塩は、特発性間質性肺炎の予防・治療剤として使用し得る。すなわち、本発明は、ペリオスチンを産生する能力を有する細胞を候補物質の存在下で培養した場合におけるペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を測定することを含む、ペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を減少させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。より具体的には、例えば、(i)ペリオスチンを産生する能力を有する細胞を候補物質の存在下で培養した場合と、(i i)ペリオスチンを

10

20

30

40

50

産生する能力を有する細胞を候補物質の非存在下で培養した場合との間でペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量の比較を行う。比較は、例えば、(i)と(ii)の場合における、ペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を測定して、比較する。具体的には、(i)と(ii)の場合における、ペリオスチンタンパク質量またはペリオスチンをコードするmRNA量を測定して比較する。ペリオスチンを産生する能力を有する細胞としては、例えば、ペリオスチンをコードするDNAを含有するベクターで形質転換された細胞が挙げられる。形質転換する細胞としては、例えば、CHO細胞、HEK293細胞、および293細胞などが挙げられる。形質転換された細胞の培養は、公知の方法で行うことができる。候補物質としては、例えば、ペプチド、タンパク質、合成化合物、またはそれらの塩などが挙げられる。ペリオスチンタンパク質量の測定は、例えば、前記した免疫測定法またはプロテインチップ法により行うことができる。mRNA量の測定は、公知の方法、例えば、ペリオスチン遺伝子の塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチドを用いて行うことができる。より具体的には、例えば、配列番号1, 3, もしくは5またはその一部を含有するポリヌクレオチドを固定したDNAチップ、プローブとして配列番号1, 3, もしくは5またはその一部を含有するポリヌクレオチドを用いるノーザンハイブリダイゼーション、あるいはプライマーとして配列番号1, 3, もしくは5またはそれらの一部を含有するポリヌクレオチドを用いるPCR法を用いて行うことができる。そして、例えば、(i)の場合のペリオスチンの発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を、(ii)の場合のペリオスチンの発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量と比較して減少させる、例えば、約20%以上、約30%以上、約40%以上、約50%以上、約60%以上、約70%以上、約80%以上、約90%以上、約95%以上、または約100%以上減少させる候補物質を、ペリオスチン遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

10

20

#### 6. 本発明のスクリーニング用キット

本発明は、上記特発性間質性肺炎の予防・治療剤のスクリーニング方法に使用することができるキットを提供する。具体的には、前記キットは、ペリオスチンを産生する能力を有する細胞を含む。「ペリオスチンを産生する能力を有する細胞」は、前記本発明のスクリーニング方法で説明した通りである。前記キットは、さらに、細胞培養用培地、培地に添加する抗生物質、血清(ウシ胎児血清等)などを含んでも良い。

また、前記キットは、ペリオスチン遺伝子の発現レベルまたはペリオスチンタンパク質量を測定するための成分を含んでも良い。そのような成分として、例えば、ペリオスチン遺伝子の塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド、ペリオスチンタンパク質のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体などが挙げられる。これらのポリヌクレオチドおよび抗体は、前記と同様である。

30

前記キットは、上記の他に、容器およびラベルを含んでもよい。容器上のまたは容器に伴うラベルには、キットが特発性間質性肺炎の予防・治療剤のスクリーニングに使用されることが示されていてもよい。また、他のアイテム、例えば、使用説明書等がさらに含まれていてもよい。

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

40

#### 【実施例】

##### 【0006】

##### (1) ウサギポリクローナル抗ペリオスチン抗体の作製

ペリオスチン(ヌクレオチド配列: 配列番号1、Accession No. D13666; アミノ酸配列: 配列番号2、Accession No. BAA02837)にV5エピトープ/Hisタグを付加させたリコンビナントタンパク質を昆虫細胞であるS2細胞において発現させた上で精製した。

具体的には、S2細胞の形質転換体は次のように作製した。pMT/Bip/V5-HisAプラスミド(Invitrogen, Carlsbad, CA)にペリオスチンの上記部分をコードするcDNAを挿入して、これをpMT/Bip/V5-HisA-p

50

er i o s t i nとした。S 2細胞にpMT/Bip/V5-HisA-periostin及びハイグロマイシン耐性遺伝子を発現するプラスミドであるpCoHygro(Invitrogen)を公知の方法で共導入し、形質転換した。ハイグロマイシンにより形質転換体を選択し、安定形質転換体を得た。

そして、S 2細胞の形質転換体では、V5エピトープ/Hisタグの結合したペリオスチンを発現させた。

リコンビナントタンパク質の精製は次のように行った。ペリオスチン遺伝子安定形質転換体S 2細胞の培地に硫酸銅を加えることにより、リコンビナントタンパク質の発現を誘導した。これにより、リコンビナントタンパク質は培養上清中に発現分泌された。この培養上清をPBSに透析した後、ニッケルレジン(Ni-NTA Agarose, Qiagen, Hilden, Germany)と混合して、リコンビナントタンパク質をレジンに結合させた。レジンを洗浄して夾雑物を取り除き、イミダゾール含有緩衝液にてリコンビナントタンパク質を溶出した。溶出されたリコンビナントタンパク質をPBSに透析し、これを動物の免疫原とした。

10

次に、これらのリコンビナントタンパク質をCFA(完全フロイントアジュバント)(Sigma社製のFreund's Adjuvant, Complete)と混合してラビットに免疫し、その後血清を採取した。

具体的な手順は次の通りである。ラビットとして、New Zealand Whiteラビット、雌、体重1.5 - 2kg(ケビーティーオリエンタル、鳥栖)を用いた。

これらのラビットは、免疫原であるリコンビナントペリオスチンとCFAの混合物をラビット背部皮下数カ所に注射することにより免疫した。

20

免疫の5~7週後、免疫ラビットの耳静脈より注射針と注射器を用いて採血し、血清を得た。

最後に、血清からIgGを次のように精製した。すなわち、採取した血清に二倍量の50mM酢酸ナトリウム(pH4.0)を加えた後、塩酸でpHを4.0に調整した。血清を攪拌しながら、血清の1/15量のカプリル酸を加え、30分攪拌した後、9200gで10分間遠心した。上清をPBSに透析して、精製IgGとした。

#### (2) ラットモノクローナル抗ペリオスチン抗体の作製

KLH(スカシガイヘモシアニン)結合ヒトペリオスチンペプチド(20 - 50 µg/ラット)またはS 2リコンビナントペリオスチンタンパク(20 - 50 µg/ラット)をCFA(完全フロイントアジュバント)またはTiterMax Gold(化学合成アジュバント)と混合して一対の相互に結合したものを免疫原とした。

30

具体的な手順は次の通りである。Sigma社に依頼してFmoc法で作製したペリオスチンペプチド(CPVRKLQANKKVQGSRRRLR:配列番号7)にmaleimide基を持ったKLHを混合して結合させることによりKLH結合ヒトペリオスチンペプチドを作製した。

次に、S 2リコンビナントペリオスチンタンパクは、次のように作製した。まず、ペリオスチン遺伝子安定形質転換体S 2細胞の培地に硫酸銅を加えることにより、リコンビナントペリオスチンタンパク質の発現を誘導した。これにより、リコンビナントペリオスチンは培養上清中に発現分泌された。この培養上清をPBSに透析した後、ニッケルレジン(Ni-NTA Agarose, Qiagen, Hilden, Germany)と混合して、リコンビナントペリオスチンをレジンに結合させた。レジンを洗浄して夾雑物を取り除き、イミダゾール含有緩衝液にてS 2リコンビナントペリオスチンタンパクを溶出した。

40

CFAは、Sigma社製のFreund's Adjuvant, Completeを用いた。TiterMax Goldは、Funakoshi Co., Ltd.から購入した。そして、KLH結合ヒトペリオスチンペプチド溶液またはS 2リコンビナントペリオスチンタンパク溶液1容に対して、CFAまたはTiterMax Goldを1容の割合で混合した。

次に、雌ラットの足蹠に免疫原として20 - 50 µgのKLH結合ヒトペリオスチンペ

50

プチド溶液またはS2リコンビナントペリオスチンタンパク溶液とCFAまたはTiter Max Goldとの混合物を皮下注射し、10日～2週間後、再度ラットの足蹠に免疫原として20-50 $\mu$ gのKLH結合ヒトペリオスチンペプチド溶液またはS2リコンビナントペリオスチンタンパク溶液とCFAまたはTiter Max Goldとの混合物を皮下注射した。ここで、ラットは、Wistarラット、雌、6-8週齢（日本チャールズリバー、横浜）を用いた。

最終免疫より3-4日後、免疫したラットの膝窩・鼠径・腸骨リンパ節内の細胞と、ミエローム細胞を1対1から10対1の割合で混合し、一般的な方法でポリエチレングリコールを加えて細胞融合させ、ハイブリドーマコロニーを選別した。

具体的には、細胞融合は次のように行った。混合したリンパ節細胞とミエローム細胞を遠心して上清を除き、室温でポリエチレングリコール（PEG1500、Roche、Switzerland）1mlに1分間かけて懸濁した後、37度で1分間攪拌した。血清不含培地1mlを1分間かけて加え、その後血清不含培地10mlを1分間かけて加えた。細胞を数回洗浄した後、96穴プレートに分注して37度5%CO<sub>2</sub>存在下で培養した。

選別の方法としては、細胞融合から7-14日後、抗原に使用したペプチドまたはタンパクを固相化し、融合細胞培養上清を一次抗体としたELISAの系にて行った。ELISAは具体的には、次のように行った。1 $\mu$ g/mlのペプチドまたはタンパクを96穴プレートに分注し、数時間固相化させた。固相化溶液を洗浄した後、融合細胞培養上清を各ウェルに加え、1時間室温に静置した。融合細胞培養上清を洗浄して、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ラットIgG抗体（GE Healthcare、Little Chalfont、UK）を加え1時間室温に静置した。二次抗体を洗浄後、ABTSペルオキシダーゼ基質（KPL、Gaithersburg、Maryland）を加えて発色させ、405nmの吸光度を測定した。

そして、選別したハイブリドーマ細胞からIgGを次のように精製した。ハイブリドーマ細胞をICR-SCIDマウス、雌、6-8週齢（日本クレア、東京）の腹腔内に注射し、7-10日後に貯留した腹水を採取した。採取した腹水に二倍量の50mM酢酸ナトリウム（pH4.0）を加えた後、塩酸でpHを4.0に調整した。血清を攪拌しながら、血清の1/15量のカプリル酸を加え、30分攪拌した後、9200gで10分間遠心した。上清をPBSに透析して、精製IgGとした。

（3）血中ペリオスチンレベルのELISA測定

ラビットポリクローナル抗ペリオスチン抗体をプレート上で固相化し、標準物質、あるいは生体試料（サンプル）を添加した。

具体的には、固相化は次のように行った。10 $\mu$ g/mlの非標識ラビットポリクローナル抗ペリオスチン抗体を96穴プレートに分注し、4度で一晩固相化した。

標準物質としては、S2リコンビナントペリオスチンタンパク質を用い、0-1000ng/mlの濃度で50 $\mu$ l/wellの量で添加した。サンプルとしては、13人のIPF/UIP患者から採取した血液と、12人の正常者から採取した血液を用いた。血液は、真空採血管を用いて末梢静脈より

ヘパリン添加なし（プレーン）で採取して、1mlずつ分注して-30 $\square$

で保管した。測定時に解凍し、遠心分離して血清を回収し、10倍希釈した後50 $\mu$ l/wellの量で添加した。

その上にビオチン標識ラビットポリクローナル抗ペリオスチン抗体（1 $\mu$ g/ml）を一次抗体として50 $\mu$ l/wellの量で添加し、50 $\mu$ l/wellのEu（ユーロピウム）標識ストレプトアビジン、あるいは50 $\mu$ l/wellのHRP標識ストレプトアビジンを添加した後、蛍光あるいは発色をプレートリーダー（ARVO MX、Perkin Elmer社製）にて測定し、標準物質の測定値より作製した標準曲線にサンプル測定値を当てはめて計算することにより、サンプル中のペリオスチン量（ng/ml）を求めた。

10

20

30

40

50

結果を図2に示す。図2に示すように、IPF/UIP患者由来の生体試料(IPF)では、正常者由来の生体試料(Healthy Control)と比較して、ペリオスチン量が多かった(有意差あり、 $p < 0.001$ )。さらに、平均値を比較すると、IPF/UIP患者由来の生体試料(IDF/UIP)の方が、正常者由来の生体試料(Healthy Control)よりも、ペリオスチンタンパク質量が約95% ( $[(IPF \text{ ペリオスチン量平均値} - \text{Healthy Control ペリオスチン量平均値}) \div \text{Healthy Control ペリオスチン量平均値}] \times 100 (\%) = [(491 - 252) / 252] \times 100 (\%)$ )多かった。

#### (4) ペリオスチンの組織免疫染色

一般的なABC法と呼ばれる組織免疫染色法により行った。

10

生体試料としてパラフィン包埋肺組織を用いた。パラフィン包埋肺組織は、23人のIPF/UIP患者、23人のfibrotic NSIP患者、4人のcellular NSIP患者、および6人の正常者から、それぞれ採取し、作製しておいたものである。これに、脱パラフィン、内因性ペルオキシダーゼ活性の阻害、ブロックといった処理を施した。具体的には、これらの操作は次のように行った。組織をメタノール+3%  $H_2O_2$  で15-30分間処理した後、Protein Block Serum-Free (DAKO、Glostrup、Denmark)で5-10分間処理した。

上記作成したラビットポリクローナル抗ペリオスチン抗血清、あるいはラットモノクローナル抗ペリオスチン抗体を、それぞれ1000倍希釈あるいは $10 \mu g/ml$ の濃度で一次抗体として加えた。その後、HRP標識された一次抗体に対する抗体(Envision、DAKO社から購入)を二次抗体として加え、DAB(diaminobenzidine)(Sigma社)にて発色させた。

20

さらに、核染色、脱水、封入などの操作を行った。具体的には、これらの操作は次のように行った。 $100 \mu l$ の一次抗体を組織上にのせ、室温で60分間静置した。一次抗体を洗浄した後、 $100 \mu l$ の二次抗体を組織上にのせ、室温で60分間静置した。二次抗体を洗浄した後、DAB基質溶液中に組織スライドを浸して、1-20分間発色させた。ヘマトキシリンで核染色した後、公知の方法で脱水、封入した。

この結果、23人のIPF/UIP患者と23人のfibrotic NSIP患者全てにおいてペリオスチン遺伝子の発現レベルが高かった(図1(a)および(b))。尚、4人のcellular NSIP患者ではペリオスチン遺伝子の発現レベルがきわめて低かった(図1(c))。一方、対照群として用いた6人の正常肺組織においてはいずれもペリオスチン遺伝子の発現レベルはきわめて低かった(図1(d))。

30

以上、実施例に示した通り、ペリオスチン遺伝子は、特発性間質性肺炎の患者由来の組織で発現が増加しているため、被験者由来の生体試料におけるペリオスチンは、特発性間質性肺炎を検出または診断するためのマーカーとして利用し得る。

また、ペリオスチン遺伝子は、特発性間質性肺炎の患者由来の組織で発現が増加しているため、ペリオスチン遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩は、特発性間質性肺炎の予防・治療剤として使用し得る。

#### 【配列表フリーテキスト】

【0007】

40

配列番号7：合成構築物

[配列表]



Asn Trp Tyr Lys Lys Ser Ile Cys Gly Gln Lys Thr Thr Val Leu Tyr		
65	70	75
gaa tgt tgc cct ggt tat atg aga atg gaa gga atg aaa ggc tgc cca	290	
Glu Cys Cys Pro Gly Tyr Met Arg Met Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro		
80	85	90
gca gtt ttg ccc att gac cat gtt tat ggc act ctg ggc atc gtg gga	338	
Ala Val Leu Pro Ile Asp His Val Tyr Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly		10
95	100	105
gcc acc aca acg cag cgc tat tct gac gcc tca aaa ctg agg gag gag	386	
Ala Thr Thr Thr Gln Arg Tyr Ser Asp Ala Ser Lys Leu Arg Glu Glu		
110	115	120
atc gag gga aag gga tcc ttc act tac ttt gca ccg agt aat gag gct	434	
Ile Glu Gly Lys Gly Ser Phe Thr Tyr Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala		
130	135	140
tgg gac aac ttg gat tct gat atc cgt aga ggt ttg gag agc aac gtg	482	
Trp Asp Asn Leu Asp Ser Asp Ile Arg Arg Gly Leu Glu Ser Asn Val		20
145	150	155
aat gtt gaa tta ctg aat gct tta cat agt cac atg att aat aag aga	530	
Asn Val Glu Leu Leu Asn Ala Leu His Ser His Met Ile Asn Lys Arg		
160	165	170
atg ttg acc aag gac tta aaa aat ggc atg att att cct tca atg tat	578	
Met Leu Thr Lys Asp Leu Lys Asn Gly Met Ile Ile Pro Ser Met Tyr		30
175	180	185
aac aat ttg ggg ctt ttc att aac cat tat cct aat ggg gtt gtc act	626	
Asn Asn Leu Gly Leu Phe Ile Asn His Tyr Pro Asn Gly Val Val Thr		
190	195	200
gtt aat tgt gct cga atc atc cat ggg aac cag att gca aca aat ggt	674	
Val Asn Cys Ala Arg Ile Ile His Gly Asn Gln Ile Ala Thr Asn Gly		
210	215	220
gtt gtc cat gtc att gac cgt gtg ctt aca caa att ggt acc tca att	722	
Val Val His Val Ile Asp Arg Val Leu Thr Gln Ile Gly Thr Ser Ile		40
225	230	235
caa gac ttc att gaa gca gaa gat gac ctt tca tct ttt aga gca gct	770	

Gln	Asp	Phe	Ile	Glu	Ala	Glu	Asp	Asp	Leu	Ser	Ser	Phe	Arg	Ala	Ala		
		240					245					250					
gcc	atc	aca	tcg	gac	ata	ttg	gag	gcc	ctt	gga	aga	gac	ggt	cac	ttc		818
Ala	Ile	Thr	Ser	Asp	Ile	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Asp	Gly	His	Phe		
		255				260				265							
aca	ctc	ttt	gct	ccc	acc	aat	gag	gct	ttt	gag	aaa	ctt	cca	cga	ggt		866
Thr	Leu	Phe	Ala	Pro	Thr	Asn	Glu	Ala	Phe	Glu	Lys	Leu	Pro	Arg	Gly		10
270					275					280					285		
gtc	cta	gaa	agg	ttc	atg	gga	gac	aaa	gtg	gct	tcc	gaa	gct	ctt	atg		914
Val	Leu	Glu	Arg	Phe	Met	Gly	Asp	Lys	Val	Ala	Ser	Glu	Ala	Leu	Met		
				290					295					300			
aag	tac	cac	atc	tta	aat	act	ctc	cag	tgt	tct	gag	tct	att	atg	gga		962
Lys	Tyr	His	Ile	Leu	Asn	Thr	Leu	Gln	Cys	Ser	Glu	Ser	Ile	Met	Gly		20
			305					310					315				
gga	gca	gtc	ttt	gag	acg	ctg	gaa	gga	aat	aca	att	gag	ata	gga	tgt		1010
Gly	Ala	Val	Phe	Glu	Thr	Leu	Glu	Gly	Asn	Thr	Ile	Glu	Ile	Gly	Cys		
		320					325					330					
gac	ggt	gac	agt	ata	aca	gta	aat	gga	atc	aaa	atg	gtg	aac	aaa	aag		1058
Asp	Gly	Asp	Ser	Ile	Thr	Val	Asn	Gly	Ile	Lys	Met	Val	Asn	Lys	Lys		
		335				340				345							
gat	att	gtg	aca	aat	aat	ggt	gtg	atc	cat	ttg	att	gat	cag	gtc	cta		1106
Asp	Ile	Val	Thr	Asn	Asn	Gly	Val	Ile	His	Leu	Ile	Asp	Gln	Val	Leu		30
350					355					360					365		
att	cct	gat	tct	gcc	aaa	caa	gtt	att	gag	ctg	gct	gga	aaa	cag	caa		1154
Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Lys	Gln	Val	Ile	Glu	Leu	Ala	Gly	Lys	Gln	Gln		
				370					375					380			
acc	acc	ttc	acg	gat	ctt	gtg	gcc	caa	tta	ggc	ttg	gca	tct	gct	ctg		1202
Thr	Thr	Phe	Thr	Asp	Leu	Val	Ala	Gln	Leu	Gly	Leu	Ala	Ser	Ala	Leu		40
			385					390					395				
agg	cca	gat	gga	gaa	tac	act	ttg	ctg	gca	cct	gtg	aat	aat	gca	ttt		1250
Arg	Pro	Asp	Gly	Glu	Tyr	Thr	Leu	Leu	Ala	Pro	Val	Asn	Asn	Ala	Phe		
		400					405					410					
tct	gat	gat	act	ctc	agc	atg	gtt	cag	cgc	ctc	ctt	aaa	tta	att	ctg		1298



Gly Ser Lys Ile Phe Leu Lys Glu Val Asn Asp Thr Leu Leu Val Asn 590 595 600 605	
gaa ttg aaa tca aaa gaa tct gac atc atg aca aca aat ggt gta att Glu Leu Lys Ser Lys Glu Ser Asp Ile Met Thr Thr Asn Gly Val Ile 610 615 620	1874
cat gtt gta gat aaa ctc ctc tat cca gca gac aca cct gtt gga aat His Val Val Asp Lys Leu Leu Tyr Pro Ala Asp Thr Pro Val Gly Asn 625 630 635	1922 10
gat caa ctg ctg gaa ata ctt aat aaa tta atc aaa tac atc caa att Asp Gln Leu Leu Glu Ile Leu Asn Lys Leu Ile Lys Tyr Ile Gln Ile 640 645 650	1970
aag ttt gtt cgt ggt agc acc ttc aaa gaa atc ccc gtg act gtc tat Lys Phe Val Arg Gly Ser Thr Phe Lys Glu Ile Pro Val Thr Val Tyr 655 660 665	2018 20
aca act aaa att ata acc aaa gtt gtg gaa cca aaa att aaa gtg att Thr Thr Lys Ile Ile Thr Lys Val Val Glu Pro Lys Ile Lys Val Ile 670 675 680 685	2066
gaa ggc agt ctt cag cct att atc aaa act gaa gga ccc aca cta aca Glu Gly Ser Leu Gln Pro Ile Ile Lys Thr Glu Gly Pro Thr Leu Thr 690 695 700	2114
aaa gtc aaa att gaa ggt gaa cct gaa ttc aga ctg att aaa gaa ggt Lys Val Lys Ile Glu Gly Glu Pro Glu Phe Arg Leu Ile Lys Glu Gly 705 710 715	2162 30
gaa aca ata act gaa gtg atc cat gga gag cca att att aaa aaa tac Glu Thr Ile Thr Glu Val Ile His Gly Glu Pro Ile Ile Lys Lys Tyr 720 725 730	2210
acc aaa atc att gat gga gtg cct gtg gaa ata act gaa aaa gag aca Thr Lys Ile Ile Asp Gly Val Pro Val Glu Ile Thr Glu Lys Glu Thr 735 740 745	2258 40
cga gaa gaa cga atc att aca ggt cct gaa ata aaa tac act agg att Arg Glu Glu Arg Ile Ile Thr Gly Pro Glu Ile Lys Tyr Thr Arg Ile 750 755 760 765	2306
tct act gga ggt gga gaa aca gaa gaa act ctg aag aaa ttg tta caa	2354

Ser Thr Gly Gly Gly Glu Thr Glu Glu Thr Leu Lys Lys Leu Leu Gln		
	770	775
		780
gaa gag gtc acc aag gtc acc aaa ttc att gaa ggt ggt gat ggt cat		2402
Glu Glu Val Thr Lys Val Thr Lys Phe Ile Glu Gly Gly Asp Gly His		
	785	790
		795
tta ttt gaa gat gaa gaa att aaa aga ctg ctt cag gga gac aca ccc		2450
Leu Phe Glu Asp Glu Glu Ile Lys Arg Leu Leu Gln Gly Asp Thr Pro		
	800	805
		810
gtg agg aag ttg caa gcc aac aaa aaa gtt caa ggt tct aga aga cga		2498
Val Arg Lys Leu Gln Ala Asn Lys Lys Val Gln Gly Ser Arg Arg Arg		
	815	820
		825
tta agg gaa ggt cgt tot cag tga aaatccaaaa accagaaaaa aatgtttata		2552
Leu Arg Glu Gly Arg Ser Gln		
830	835	
		20
caaccctaag tcaataacct gaccttagaa aattgtgaga gccaaagtga cttcaggaac		2612
tgaaacatca gcacaaagaa gcaatcatca aataattctg aacacaaatt taatattttt		2672
ttttctgaat gagaaacatg agggaaattg tggagttagc ctctgtggt aaaggaattg		2732
aagaaaatat aacaccttac accctttttc atcttgacat taaaagttct ggctaacttt		2792
ggaatccatt agagaaaaat ccttgtcacc agattcatta caattcaaat cgaagagttg		2852
		30
tgaactgtta tccattgaa aagaccgagc cttgtatgta tgttatggat acataaaatg		2912
cacgcaagcc attatctctc catgggaagc taagttataa aataggtgc ttggtgtaca		2972
aaacttttta tatcaaaagg ctttgcacat ttctatatga gtgggtttac tggtaaatta		3032
tgttattttt tacaactaat tttgtactct cagaatgttt gtcatatgct tcttgaatg		3092
catatttttt aatctcaaac gtttcaataa aaccattttt cagatataaa gagaattact		3152
		40
tcaaattgag taattcagaa aaactcaaga tttaagttaa aaagtggttt ggacttgga		3212
a		3213

<210> 2  
 <211> 836  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ile Pro Phe Leu Pro Met Phe Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ile Val  
 1 5 10 15 10

Asn Pro Ile Asn Ala Asn Asn His Tyr Asp Lys Ile Leu Ala His Ser  
 20 25 30

Arg Ile Arg Gly Arg Asp Gln Gly Pro Asn Val Cys Ala Leu Gln Gln  
 35 40 45

Ile Leu Gly Thr Lys Lys Lys Tyr Phe Ser Thr Cys Lys Asn Trp Tyr  
 50 55 60

Lys Lys Ser Ile Cys Gly Gln Lys Thr Thr Val Leu Tyr Glu Cys Cys  
 65 70 75 80

Pro Gly Tyr Met Arg Met Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro Ala Val Leu  
 85 90 95 30

Pro Ile Asp His Val Tyr Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly Ala Thr Thr  
 100 105 110

Thr Gln Arg Tyr Ser Asp Ala Ser Lys Leu Arg Glu Glu Ile Glu Gly  
 115 120 125

Lys Gly Ser Phe Thr Tyr Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala Trp Asp Asn  
 130 135 140

Leu Asp Ser Asp Ile Arg Arg Gly Leu Glu Ser Asn Val Asn Val Glu

10

20

30

40







675	680	685	
Leu Gln Pro Ile Ile Lys Thr Glu Gly Pro Thr Leu Thr Lys Val Lys			
690	695	700	
Ile Glu Gly Glu Pro Glu Phe Arg Leu Ile Lys Glu Gly Glu Thr Ile			10
705	710	715	720
Thr Glu Val Ile His Gly Glu Pro Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Lys Ile			
	725	730	735
Ile Asp Gly Val Pro Val Glu Ile Thr Glu Lys Glu Thr Arg Glu Glu			
	740	745	750
			20
Arg Ile Ile Thr Gly Pro Glu Ile Lys Tyr Thr Arg Ile Ser Thr Gly			
	755	760	765
Gly Gly Glu Thr Glu Glu Thr Leu Lys Lys Leu Leu Gln Glu Glu Val			
	770	775	780
Thr Lys Val Thr Lys Phe Ile Glu Gly Gly Asp Gly His Leu Phe Glu			30
	785	790	795
			800
Asp Glu Glu Ile Lys Arg Leu Leu Gln Gly Asp Thr Pro Val Arg Lys			
	805	810	815
Leu Gln Ala Asn Lys Lys Val Gln Gly Ser Arg Arg Arg Leu Arg Glu			
	820	825	830
			40
Gly Arg Ser Gln			
	835		

<210> 3

<211> 2958  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (12)..(2267)

10

<400> 3

agagactcaa g atg att ccc ttt tta ccc atg ttt tct cta cta ttg ctg 50  
 Met Ile Pro Phe Leu Pro Met Phe Ser Leu Leu Leu Leu  
 1 5 10

ctt att gtt aac cct ata aac gcc aac aat cat tat gac aag atc ttg 98  
 Leu Ile Val Asn Pro Ile Asn Ala Asn Asn His Tyr Asp Lys Ile Leu  
 15 20 25

gct cat agt cgt atc agg ggt cgg gac caa ggc cca aat gtc tgt gcc 146 20  
 Ala His Ser Arg Ile Arg Gly Arg Asp Gln Gly Pro Asn Val Cys Ala  
 30 35 40 45

ctt caa cag att ttg ggc acc aaa aag aaa tac ttc agc act tgt aag 194  
 Leu Gln Gln Ile Leu Gly Thr Lys Lys Lys Tyr Phe Ser Thr Cys Lys  
 50 55 60

aac tgg tat aaa aag tcc atc tgt gga cag aaa acg act gtt tta tat 242  
 Asn Trp Tyr Lys Lys Ser Ile Cys Gly Gln Lys Thr Thr Val Leu Tyr  
 65 70 75 30

gaa tgt tgc cct ggt tat atg aga atg gaa gga atg aaa ggc tgc cca 290  
 Glu Cys Cys Pro Gly Tyr Met Arg Met Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro  
 80 85 90

gca gtt ttg ccc att gac cat gtt tat ggc act ctg ggc atc gtg gga 338  
 Ala Val Leu Pro Ile Asp His Val Tyr Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly  
 95 100 105

40

gcc acc aca acg cag cgc tat tct gac gcc tca aaa ctg agg gag gag 386  
 Ala Thr Thr Thr Gln Arg Tyr Ser Asp Ala Ser Lys Leu Arg Glu Glu  
 110 115 120 125

atc gag gga aag gga tcc ttc act tac ttt gca ccg agt aat gag gct 434  
 Ile Glu Gly Lys Gly Ser Phe Thr Tyr Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala

130	135	140	
tgg gac aac ttg gat tct gat atc cgt aga ggt ttg gag agc aac gtg			482
Trp Asp Asn Leu Asp Ser Asp Ile Arg Arg Gly Leu Glu Ser Asn Val			
145	150	155	
aat gtt gaa tta ctg aat gct tta cat agt cac atg att aat aag aga			530
Asn Val Glu Leu Leu Asn Ala Leu His Ser His Met Ile Asn Lys Arg			
160	165	170	10
atg ttg acc aag gac tta aaa aat ggc atg att att cct tca atg tat			578
Met Leu Thr Lys Asp Leu Lys Asn Gly Met Ile Ile Pro Ser Met Tyr			
175	180	185	
aac aat ttg ggg ctt ttc att aac cat tat cct aat ggg gtt gtc act			626
Asn Asn Leu Gly Leu Phe Ile Asn His Tyr Pro Asn Gly Val Val Thr			
190	195	200	20
gtt aat tgt gct cga atc atc cat ggg aac cag att gca aca aat ggt			674
Val Asn Cys Ala Arg Ile Ile His Gly Asn Gln Ile Ala Thr Asn Gly			
210	215	220	
gtt gtc cat gtc att gac cgt gtg ctt aca caa att ggt acc tca att			722
Val Val His Val Ile Asp Arg Val Leu Thr Gln Ile Gly Thr Ser Ile			
225	230	235	
caa gac ttc att gaa gca gaa gat gac ctt tca tct ttt aga gca gct			770
Gln Asp Phe Ile Glu Ala Glu Asp Asp Leu Ser Ser Phe Arg Ala Ala			
240	245	250	30
gcc atc aca tcg gac ata ttg gag gcc ctt gga aga gac ggt cac ttc			818
Ala Ile Thr Ser Asp Ile Leu Glu Ala Leu Gly Arg Asp Gly His Phe			
255	260	265	
aca ctc ttt gct ccc acc aat gag gct ttt gag aaa ctt cca cga ggt			866
Thr Leu Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Leu Pro Arg Gly			
270	275	280	40
gtc cta gaa agg ttc atg gga gac aaa gtg gct tcc gaa gct ctt atg			914
Val Leu Glu Arg Phe Met Gly Asp Lys Val Ala Ser Glu Ala Leu Met			
290	295	300	
aag tac cac atc tta aat act ctc cag tgt tct gag tct att atg gga			962
Lys Tyr His Ile Leu Asn Thr Leu Gln Cys Ser Glu Ser Ile Met Gly			

305	310	315		
gga gca gtc ttt gag acg ctg gaa gga aat aca att gag ata gga tgt			1010	
Gly Ala Val Phe Glu Thr Leu Glu Gly Asn Thr Ile Glu Ile Gly Cys				
320	325	330		
gac ggt gac agt ata aca gta aat gga atc aaa atg gtg aac aaa aag			1058	
Asp Gly Asp Ser Ile Thr Val Asn Gly Ile Lys Met Val Asn Lys Lys				10
335	340	345		
gat att gtg aca aat aat ggt gtg atc cat ttg att gat cag gtc cta			1106	
Asp Ile Val Thr Asn Asn Gly Val Ile His Leu Ile Asp Gln Val Leu				
350	355	360	365	
att cct gat tct gcc aaa caa gtt att gag ctg gct gga aaa cag caa			1154	
Ile Pro Asp Ser Ala Lys Gln Val Ile Glu Leu Ala Gly Lys Gln Gln				
370	375	380		
acc acc ttc acg gat ctt gtg gcc caa tta ggc ttg gca tct gct ctg			1202	20
Thr Thr Phe Thr Asp Leu Val Ala Gln Leu Gly Leu Ala Ser Ala Leu				
385	390	395		
agg cca gat gga gaa tac act ttg ctg gca cct gtg aat aat gca ttt			1250	
Arg Pro Asp Gly Glu Tyr Thr Leu Leu Ala Pro Val Asn Asn Ala Phe				
400	405	410		
tct gat gat act ctc agc atg gtt cag cgc ctc ctt aaa tta att ctg			1298	
Ser Asp Asp Thr Leu Ser Met Val Gln Arg Leu Leu Lys Leu Ile Leu				30
415	420	425		
cag aat cac ata ttg aaa gta aaa gtt ggc ctt aat gag ctt tac aac			1346	
Gln Asn His Ile Leu Lys Val Lys Val Gly Leu Asn Glu Leu Tyr Asn				
430	435	440	445	
ggg caa ata ctg gaa acc atc gga ggc aaa cag ctc aga gtc ttc gta			1394	
Gly Gln Ile Leu Glu Thr Ile Gly Gly Lys Gln Leu Arg Val Phe Val				
450	455	460		
tat cgt aca gct gtc tgc att gaa aat tca tgc atg gag aaa ggg agt			1442	40
Tyr Arg Thr Ala Val Cys Ile Glu Asn Ser Cys Met Glu Lys Gly Ser				
465	470	475		
aag caa ggg aga aac ggt gcg att cac ata ttc cgc gag atc atc aag			1490	
Lys Gln Gly Arg Asn Gly Ala Ile His Ile Phe Arg Glu Ile Ile Lys				

480	485	490		
cca gca gag aaa tcc ctc cat gaa aag tta aaa caa gat aag cgc ttt			1538	
Pro Ala Glu Lys Ser Leu His Glu Lys Leu Lys Gln Asp Lys Arg Phe				
495	500	505		
agc acc ttc ctc agc cta ctt gaa gct gca gac ttg aaa gag ctc ctg			1586	
Ser Thr Phe Leu Ser Leu Leu Glu Ala Ala Asp Leu Lys Glu Leu Leu				10
510	515	520	525	
aca caa cct gga gac tgg aca tta ttt gtg cca acc aat gat gct ttt			1634	
Thr Gln Pro Gly Asp Trp Thr Leu Phe Val Pro Thr Asn Asp Ala Phe				
530	535	540		
aag gga atg act agt gaa gaa aaa gaa att ctg ata cgg gac aaa aat			1682	
Lys Gly Met Thr Ser Glu Glu Lys Glu Ile Leu Ile Arg Asp Lys Asn				
545	550	555		
gct ctt caa aac atc att ctt tat cac ctg aca cca gga gtt ttc att			1730	20
Ala Leu Gln Asn Ile Ile Leu Tyr His Leu Thr Pro Gly Val Phe Ile				
560	565	570		
gga aaa gga ttt gaa cct ggt gtt act aac att tta aag acc aca caa			1778	
Gly Lys Gly Phe Glu Pro Gly Val Thr Asn Ile Leu Lys Thr Thr Gln				
575	580	585		
gga agc aaa atc ttt ctg aaa gaa gta aat gat aca ctt ctg gtg aat			1826	
Gly Ser Lys Ile Phe Leu Lys Glu Val Asn Asp Thr Leu Leu Val Asn				30
590	595	600	605	
gaa ttg aaa tca aaa gaa tct gac atc atg aca aca aat ggt gta att			1874	
Glu Leu Lys Ser Lys Glu Ser Asp Ile Met Thr Thr Asn Gly Val Ile				
610	615	620		
cat gtt gta gat aaa ctc ctc tat cca gca gac aca cct gtt gga aat			1922	
His Val Val Asp Lys Leu Leu Tyr Pro Ala Asp Thr Pro Val Gly Asn				
625	630	635		
gat caa ctg ctg gaa ata ctt aat aaa tta atc aaa tac atc caa att			1970	40
Asp Gln Leu Leu Glu Ile Leu Asn Lys Leu Ile Lys Tyr Ile Gln Ile				
640	645	650		
aag ttt gtt cgt ggt agc acc ttc aaa gaa atc ccc gtg act gtc tat			2018	
Lys Phe Val Arg Gly Ser Thr Phe Lys Glu Ile Pro Val Thr Val Tyr				

655	660	665		
aag cca att att aaa aaa tac acc aaa atc att gat gga gtg cct gtg			2066	
Lys Pro Ile Ile Lys Lys Tyr Thr Lys Ile Ile Asp Gly Val Pro Val				
670	675	680	685	
gaa ata act gaa aaa gag aca cga gaa gaa cga atc att aca ggt cct			2114	
Glu Ile Thr Glu Lys Glu Thr Arg Glu Glu Arg Ile Ile Thr Gly Pro				
	690	695	700	10
gaa ata aaa tac act agg att tct act gga ggt gga gaa aca gaa gaa			2162	
Glu Ile Lys Tyr Thr Arg Ile Ser Thr Gly Gly Gly Glu Thr Glu Glu				
	705	710	715	
act ctg aag aaa ttg tta caa gaa gac aca ccc gtg agg aag ttg caa			2210	
Thr Leu Lys Lys Leu Leu Gln Glu Asp Thr Pro Val Arg Lys Leu Gln				
	720	725	730	
gcc aac aaa aaa gtt caa ggt tct aga aga cga tta agg gaa ggt cgt			2258	20
Ala Asn Lys Lys Val Gln Gly Ser Arg Arg Arg Leu Arg Glu Gly Arg				
	735	740	745	
tct cag tga aaatccaaaa accagaaaa aatgtttata caaccctaag			2307	
Ser Gln				
750				
tcaataacct gaccttagaa aattgtgaga gccaaagtga cttcaggaac tgaaacatca			2367	
gcacaaagaa gcaatcatca aataattctg aacacaaatt taatattttt tttctgaat			2427	30
gagaaacatg agggaaattg tggagttagc ctctgtggt aaaggaattg aagaaaatat			2487	
aacacottac accctttttc atcttgacat taaaagttct ggctaacttt ggaatccatt			2547	
agagaaaaat ccttgtcacc agattcatta caattcaaat cgaagagttg tgaactgtta			2607	
tccattgaa aagaccgagc cttgtatgta tgttatggat acataaaatg cacgcaagcc			2667	
attatctctc catgggaagc taagttataa aaataggtgc ttggtgtaca aaacttttta			2727	40
tatcaaaagg ctttgacat ttctatatga gtgggtttac tggtaaatta tgttattttt			2787	
tacaactaat tttgtactct cagaatgttt gtcatatgct tcttgcaatg catatttttt			2847	

aatctcaaac gtttcaataa aaccattttt cagatataaa gagaattact tcaaattgag 2907

taattcagaa aaactcaaga ttttaagttaa aaagtggttt ggacttggga a 2958

<210> 4

<211> 751

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 4

Met Ile Pro Phe Leu Pro Met Phe Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ile Val  
1 5 10 15

Asn Pro Ile Asn Ala Asn Asn His Tyr Asp Lys Ile Leu Ala His Ser  
20 25 30

20

Arg Ile Arg Gly Arg Asp Gln Gly Pro Asn Val Cys Ala Leu Gln Gln  
35 40 45

Ile Leu Gly Thr Lys Lys Lys Tyr Phe Ser Thr Cys Lys Asn Trp Tyr  
50 55 60

30

Lys Lys Ser Ile Cys Gly Gln Lys Thr Thr Val Leu Tyr Glu Cys Cys  
65 70 75 80

Pro Gly Tyr Met Arg Met Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro Ala Val Leu  
85 90 95

Pro Ile Asp His Val Tyr Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly Ala Thr Thr  
100 105 110

40

Thr Gln Arg Tyr Ser Asp Ala Ser Lys Leu Arg Glu Glu Ile Glu Gly  
115 120 125

Lys Gly Ser Phe Thr Tyr Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala Trp Asp Asn  
 130 135 140

Leu Asp Ser Asp Ile Arg Arg Gly Leu Glu Ser Asn Val Asn Val Glu  
 145 150 155 160

Leu Leu Asn Ala Leu His Ser His Met Ile Asn Lys Arg Met Leu Thr  
 165 170 175

10

Lys Asp Leu Lys Asn Gly Met Ile Ile Pro Ser Met Tyr Asn Asn Leu  
 180 185 190

Gly Leu Phe Ile Asn His Tyr Pro Asn Gly Val Val Thr Val Asn Cys  
 195 200 205

20

Ala Arg Ile Ile His Gly Asn Gln Ile Ala Thr Asn Gly Val Val His  
 210 215 220

Val Ile Asp Arg Val Leu Thr Gln Ile Gly Thr Ser Ile Gln Asp Phe  
 225 230 235 240

Ile Glu Ala Glu Asp Asp Leu Ser Ser Phe Arg Ala Ala Ala Ile Thr  
 245 250 255

30

Ser Asp Ile Leu Glu Ala Leu Gly Arg Asp Gly His Phe Thr Leu Phe  
 260 265 270

Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Leu Pro Arg Gly Val Leu Glu  
 275 280 285

40

Arg Phe Met Gly Asp Lys Val Ala Ser Glu Ala Leu Met Lys Tyr His  
 290 295 300

Ile Leu Asn Thr Leu Gln Cys Ser Glu Ser Ile Met Gly Gly Ala Val  
 305 310 315 320

Phe Glu Thr Leu Glu Gly Asn Thr Ile Glu Ile Gly Cys Asp Gly Asp  
 325 330 335

Ser Ile Thr Val Asn Gly Ile Lys Met Val Asn Lys Lys Asp Ile Val  
 340 345 350

10

Thr Asn Asn Gly Val Ile His Leu Ile Asp Gln Val Leu Ile Pro Asp  
 355 360 365

Ser Ala Lys Gln Val Ile Glu Leu Ala Gly Lys Gln Gln Thr Thr Phe  
 370 375 380

20

Thr Asp Leu Val Ala Gln Leu Gly Leu Ala Ser Ala Leu Arg Pro Asp  
 385 390 395 400

Gly Glu Tyr Thr Leu Leu Ala Pro Val Asn Asn Ala Phe Ser Asp Asp  
 405 410 415

Thr Leu Ser Met Val Gln Arg Leu Leu Lys Leu Ile Leu Gln Asn His  
 420 425 430

30

Ile Leu Lys Val Lys Val Gly Leu Asn Glu Leu Tyr Asn Gly Gln Ile  
 435 440 445

Leu Glu Thr Ile Gly Gly Lys Gln Leu Arg Val Phe Val Tyr Arg Thr  
 450 455 460

40

Ala Val Cys Ile Glu Asn Ser Cys Met Glu Lys Gly Ser Lys Gln Gly  
 465 470 475 480

Arg Asn Gly Ala Ile His Ile Phe Arg Glu Ile Ile Lys Pro Ala Glu  
 485 490 495

Lys Ser Leu His Glu Lys Leu Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ser Thr Phe  
 500 505 510

Leu Ser Leu Leu Glu Ala Ala Asp Leu Lys Glu Leu Leu Thr Gln Pro  
 515 520 525

10

Gly Asp Trp Thr Leu Phe Val Pro Thr Asn Asp Ala Phe Lys Gly Met  
 530 535 540

Thr Ser Glu Glu Lys Glu Ile Leu Ile Arg Asp Lys Asn Ala Leu Gln  
 545 550 555 560

20

Asn Ile Ile Leu Tyr His Leu Thr Pro Gly Val Phe Ile Gly Lys Gly  
 565 570 575

Phe Glu Pro Gly Val Thr Asn Ile Leu Lys Thr Thr Gln Gly Ser Lys  
 580 585 590

30

Ile Phe Leu Lys Glu Val Asn Asp Thr Leu Leu Val Asn Glu Leu Lys  
 595 600 605

Ser Lys Glu Ser Asp Ile Met Thr Thr Asn Gly Val Ile His Val Val  
 610 615 620

Asp Lys Leu Leu Tyr Pro Ala Asp Thr Pro Val Gly Asn Asp Gln Leu  
 625 630 635 640

40

Leu Glu Ile Leu Asn Lys Leu Ile Lys Tyr Ile Gln Ile Lys Phe Val  
 645 650 655

Arg Gly Ser Thr Phe Lys Glu Ile Pro Val Thr Val Tyr Lys Pro Ile  
 660 665 670

Ile Lys Lys Tyr Thr Lys Ile Ile Asp Gly Val Pro Val Glu Ile Thr  
 675 680 685

Glu Lys Glu Thr Arg Glu Glu Arg Ile Ile Thr Gly Pro Glu Ile Lys  
 690 695 700

10

Tyr Thr Arg Ile Ser Thr Gly Gly Gly Glu Thr Glu Glu Thr Leu Lys  
 705 710 715 720

Lys Leu Leu Gln Glu Asp Thr Pro Val Arg Lys Leu Gln Ala Asn Lys  
 725 730 735

20

Lys Val Gln Gly Ser Arg Arg Arg Leu Arg Glu Gly Arg Ser Gln  
 740 745 750

<210> 5  
 <211> 2360  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

30

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (12).. (2360)

<400> 5  
 agagactcaa g atg att ccc ttt tta ccc atg ttt tct cta cta ttg ctg 50  
 Met Ile Pro Phe Leu Pro Met Phe Ser Leu Leu Leu Leu  
 1 5 10 40

ctt att gtt aac cct ata aac gcc aac aat cat tat gac aag atc ttg 98  
 Leu Ile Val Asn Pro Ile Asn Ala Asn Asn His Tyr Asp Lys Ile Leu  
 15 20 25

gct cat agt cgt atc agg ggt cgg gac caa ggc cca aat gtc tgt gcc 146

Ala His Ser Arg Ile Arg Gly Arg Asp Gln Gly Pro Asn Val Cys Ala	
30	35 40 45
ctt caa cag att ttg ggc acc aaa aag aaa tac ttc agc act tgt aag	194
Leu Gln Gln Ile Leu Gly Thr Lys Lys Lys Tyr Phe Ser Thr Cys Lys	
50	55 60
aac tgg tat aaa aag tcc atc tgt gga cag aaa acg act gtg tta tat	242
Asn Trp Tyr Lys Lys Ser Ile Cys Gly Gln Lys Thr Thr Val Leu Tyr	10
65	70 75
gaa tgt tgc cct ggt tat atg aga atg gaa gga atg aaa ggc tgc cca	290
Glu Cys Cys Pro Gly Tyr Met Arg Met Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro	
80	85 90
gca gtt ttg ccc att gac cat gtt tat ggc act ctg ggc atc gtg gga	338
Ala Val Leu Pro Ile Asp His Val Tyr Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly	
95	100 105
gcc acc aca acg cag cgc tat tct gac gcc tca aaa ctg agg gag gag	386
Ala Thr Thr Thr Gln Arg Tyr Ser Asp Ala Ser Lys Leu Arg Glu Glu	
110	115 120 125
atc gag gga aag gga tcc ttc act tac ttt gca ccg agt aat gag gct	434
Ile Glu Gly Lys Gly Ser Phe Thr Tyr Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala	
130	135 140
tgg gac aac ttg gat tct gat atc cgt aga ggt ttg gag agc aac gtg	482
Trp Asp Asn Leu Asp Ser Asp Ile Arg Arg Gly Leu Glu Ser Asn Val	30
145	150 155
aat gtt gaa tta ctg aat gct tta cat agt cac atg att aat aag aga	530
Asn Val Glu Leu Leu Asn Ala Leu His Ser His Met Ile Asn Lys Arg	
160	165 170
atg ttg acc aag gac tta aaa aat ggc atg att att cct tca atg tat	578
Met Leu Thr Lys Asp Leu Lys Asn Gly Met Ile Ile Pro Ser Met Tyr	
175	180 185
aac aat ttg ggg ctt ttc att aac cat tat cct aat ggg gtt gtc act	626
Asn Asn Leu Gly Leu Phe Ile Asn His Tyr Pro Asn Gly Val Val Thr	
190	195 200 205
gtt aat tgt gct cga atc atc cat ggg aac cag att gca aca aat ggt	674

Val	Asn	Cys	Ala	Arg	Ile	Ile	His	Gly	Asn	Gln	Ile	Ala	Thr	Asn	Gly			
				210					215					220				
gtt	gtc	cat	gtc	att	gac	ogt	gtg	ctt	aca	caa	att	ggt	acc	tca	att			722
Val	Val	His	Val	Ile	Asp	Arg	Val	Leu	Thr	Gln	Ile	Gly	Thr	Ser	Ile			
			225					230					235					
caa	gac	ttc	att	gaa	gca	gaa	gat	gac	ctt	tca	tct	ttt	aga	gca	gct			770
Gln	Asp	Phe	Ile	Glu	Ala	Glu	Asp	Asp	Leu	Ser	Ser	Phe	Arg	Ala	Ala			10
		240					245						250					
gcc	atc	aca	tcg	gac	ata	ttg	gag	gcc	ctt	gga	aga	gac	ggt	cac	ttc			818
Ala	Ile	Thr	Ser	Asp	Ile	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Asp	Gly	His	Phe			
		255				260						265						
aca	ctc	ttt	gct	ccc	acc	aat	gag	gct	ttt	gag	aaa	ctt	cca	oga	ggt			866
Thr	Leu	Phe	Ala	Pro	Thr	Asn	Glu	Ala	Phe	Glu	Lys	Leu	Pro	Arg	Gly			
270					275					280					285			20
gtc	cta	gaa	agg	atc	atg	gga	gac	aaa	gtg	gct	tcc	gaa	gct	ctt	atg			914
Val	Leu	Glu	Arg	Ile	Met	Gly	Asp	Lys	Val	Ala	Ser	Glu	Ala	Leu	Met			
				290					295						300			
aag	tac	cac	atc	tta	aat	act	ctc	cag	tgt	tct	gag	tct	att	atg	gga			962
Lys	Tyr	His	Ile	Leu	Asn	Thr	Leu	Gln	Cys	Ser	Glu	Ser	Ile	Met	Gly			
			305					310						315				
gga	gca	gtc	ttt	gag	acg	ctg	gaa	gga	aat	aca	att	gag	ata	gga	tgt			1010
Gly	Ala	Val	Phe	Glu	Thr	Leu	Glu	Gly	Asn	Thr	Ile	Glu	Ile	Gly	Cys			30
		320					325						330					
gac	ggt	gac	agt	ata	aca	gta	aat	gga	atc	aaa	atg	gtg	aac	aaa	aag			1058
Asp	Gly	Asp	Ser	Ile	Thr	Val	Asn	Gly	Ile	Lys	Met	Val	Asn	Lys	Lys			
		335				340					345							
gat	att	gtg	aca	aat	aat	ggt	gtg	atc	cat	ttg	att	gat	cag	gtc	cta			1106
Asp	Ile	Val	Thr	Asn	Asn	Gly	Val	Ile	His	Leu	Ile	Asp	Gln	Val	Leu			
350					355					360					365			40
att	cct	gat	tct	gcc	aaa	caa	gtt	att	gag	ctg	gct	gga	aaa	cag	caa			1154
Ile	Pro	Asp	Ser	Ala	Lys	Gln	Val	Ile	Glu	Leu	Ala	Gly	Lys	Gln	Gln			
				370					375					380				
acc	acc	ttc	acg	gat	ctt	gtg	gcc	caa	tta	ggc	ttg	gca	tot	gct	ctg			1202

Thr Thr Phe Thr Asp Leu Val Ala Gln Leu Gly Leu Ala Ser Ala Leu	385	390	395	
agg cca gat gga gaa tac act ttg ctg gca cct gtg aat aat gca ttt				1250
Arg Pro Asp Gly Glu Tyr Thr Leu Leu Ala Pro Val Asn Asn Ala Phe	400	405	410	
tct gat gat act ctc agc atg gat cag cgc ctc ctt aaa tta att ctg				1298
Ser Asp Asp Thr Leu Ser Met Asp Gln Arg Leu Leu Lys Leu Ile Leu	415	420	425	10
cag aat cac ata ttg aaa gta aaa gtt ggc ctt aat gag ctt tac aac				1346
Gln Asn His Ile Leu Lys Val Lys Val Gly Leu Asn Glu Leu Tyr Asn	430	435	440	445
ggg caa ata ctg gaa acc atc gga ggc aaa cag ctc aga gtc ttc gta				1394
Gly Gln Ile Leu Glu Thr Ile Gly Gly Lys Gln Leu Arg Val Phe Val	450	455	460	20
tat cgt aca gct gtc tgc att gaa aat tca tgc atg gag aaa ggg agt				1442
Tyr Arg Thr Ala Val Cys Ile Glu Asn Ser Cys Met Glu Lys Gly Ser	465	470	475	
aag caa ggg aga aac ggt gcg att cac ata ttc cgc gag atc atc aag				1490
Lys Gln Gly Arg Asn Gly Ala Ile His Ile Phe Arg Glu Ile Ile Lys	480	485	490	
cca gca gag aaa tcc ctc cat gaa aag tta aaa caa gat aag cgc ttt				1538
Pro Ala Glu Lys Ser Leu His Glu Lys Leu Lys Gln Asp Lys Arg Phe	495	500	505	30
agc acc ttc ctc agc cta ctt gaa gct gca gac ttg aaa gag ctc ctg				1586
Ser Thr Phe Leu Ser Leu Leu Glu Ala Ala Asp Leu Lys Glu Leu Leu	510	515	520	525
aca caa cct gga gac tgg aca tta ttt gtg cca acc aat gat gct ttt				1634
Thr Gln Pro Gly Asp Trp Thr Leu Phe Val Pro Thr Asn Asp Ala Phe	530	535	540	40
aag gga atg act agt gaa gaa aaa gaa att ctg ata cgg gac aaa aat				1682
Lys Gly Met Thr Ser Glu Glu Lys Glu Ile Leu Ile Arg Asp Lys Asn	545	550	555	
gct ctt caa aac atc att ctt tat cac ctg aca cca gga gtt ttc att				1730



Lys Tyr Thr Arg Ile Ser Thr Gly Gly Gly Glu Thr Glu Glu Thr Leu	
735	740 745
aag aaa ttg tta caa gaa gaa gac aca ccc gtg agg aag ttg caa gcc	2306
Lys Lys Leu Leu Gln Glu Glu Asp Thr Pro Val Arg Lys Leu Gln Ala	
750	755 760 765
aac aaa aaa gtt caa gga tct aga aga cga tta agg gaa ggt cgt tct	2354
Asn Lys Lys Val Gln Gly Ser Arg Arg Arg Leu Arg Glu Gly Arg Ser	10
	770 775 780
cag tga	2360
Gln	
<210> 6	
<211> 782	
<212> PRT	20
<213> Homo sapiens	
<400> 6	
Met Ile Pro Phe Leu Pro Met Phe Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ile Val	
1	5 10 15
Asn Pro Ile Asn Ala Asn Asn His Tyr Asp Lys Ile Leu Ala His Ser	30
	20 25 30
Arg Ile Arg Gly Arg Asp Gln Gly Pro Asn Val Cys Ala Leu Gln Gln	
	35 40 45
Ile Leu Gly Thr Lys Lys Lys Tyr Phe Ser Thr Cys Lys Asn Trp Tyr	
	50 55 60
Lys Lys Ser Ile Cys Gly Gln Lys Thr Thr Val Leu Tyr Glu Cys Cys	
65	70 75 80
Pro Gly Tyr Met Arg Met Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro Ala Val Leu	





435	440	445	
Leu Glu Thr Ile Gly Gly Lys Gln Leu Arg Val Phe Val Tyr Arg Thr			
450	455	460	
Ala Val Cys Ile Glu Asn Ser Cys Met Glu Lys Gly Ser Lys Gln Gly			10
465	470	475	480
Arg Asn Gly Ala Ile His Ile Phe Arg Glu Ile Ile Lys Pro Ala Glu			
485	490	495	
Lys Ser Leu His Glu Lys Leu Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ser Thr Phe			
500	505	510	20
Leu Ser Leu Leu Glu Ala Ala Asp Leu Lys Glu Leu Leu Thr Gln Pro			
515	520	525	
Gly Asp Trp Thr Leu Phe Val Pro Thr Asn Asp Ala Phe Lys Gly Met			
530	535	540	
Thr Ser Glu Glu Lys Glu Ile Leu Ile Arg Asp Lys Asn Ala Leu Gln			30
545	550	555	560
Asn Ile Ile Leu Tyr His Leu Thr Pro Gly Val Phe Ile Gly Lys Gly			
565	570	575	
Phe Glu Pro Gly Val Thr Asn Ile Leu Lys Thr Thr Gln Gly Ser Lys			
580	585	590	40
Ile Phe Leu Lys Glu Val Asn Asp Thr Leu Leu Val Asn Glu Leu Lys			
595	600	605	
Ser Lys Glu Ser Asp Ile Met Thr Thr Asn Gly Val Ile His Val Val			

610	615	620	
Asp Lys Leu Leu Tyr Pro Ala Asp Thr Pro Val Gly Asn Asp Gln Leu			
625	630	635	640
Leu Glu Ile Leu Asn Lys Leu Ile Lys Tyr Ile Gln Ile Lys Phe Val			10
	645	650	655
Arg Gly Ser Thr Phe Lys Glu Ile Pro Val Thr Val Tyr Arg Pro Thr			
	660	665	670
Leu Thr Lys Val Lys Ile Glu Gly Glu Pro Glu Phe Arg Leu Ile Lys			20
	675	680	685
Glu Gly Glu Thr Ile Thr Glu Val Ile His Gly Glu Pro Ile Ile Lys			
	690	695	700
Lys Tyr Thr Lys Ile Ile Asp Gly Val Pro Val Glu Ile Thr Glu Lys			
705	710	715	720
Glu Thr Arg Glu Glu Arg Ile Ile Thr Gly Pro Glu Ile Lys Tyr Thr			30
	725	730	735
Arg Ile Ser Thr Gly Gly Gly Glu Thr Glu Glu Thr Leu Lys Lys Leu			
	740	745	750
Leu Gln Glu Glu Asp Thr Pro Val Arg Lys Leu Gln Ala Asn Lys Lys			40
	755	760	765
Val Gln Gly Ser Arg Arg Arg Leu Arg Glu Gly Arg Ser Gln			
	770	775	780

<210> 7

<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Synthetic Construct

<400> 7

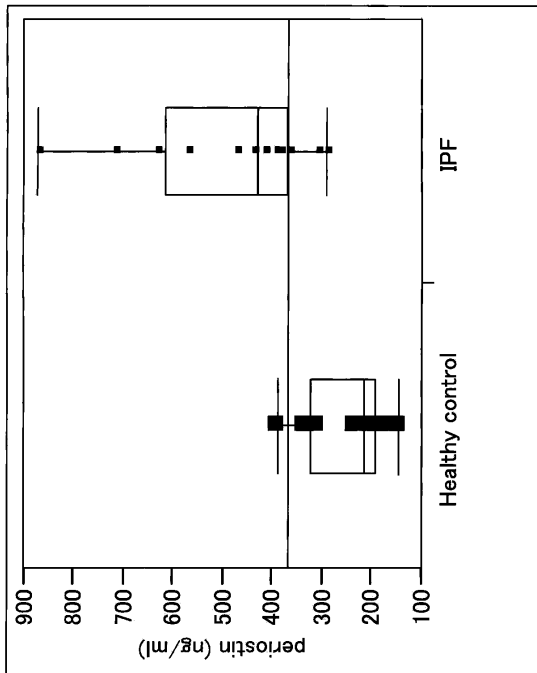
10

Cys Pro Val Arg Lys Leu Gln Ala Asn Lys Lys Val Gln Gly Ser Arg  
1 5 10 15

Arg Arg Leu Arg  
20

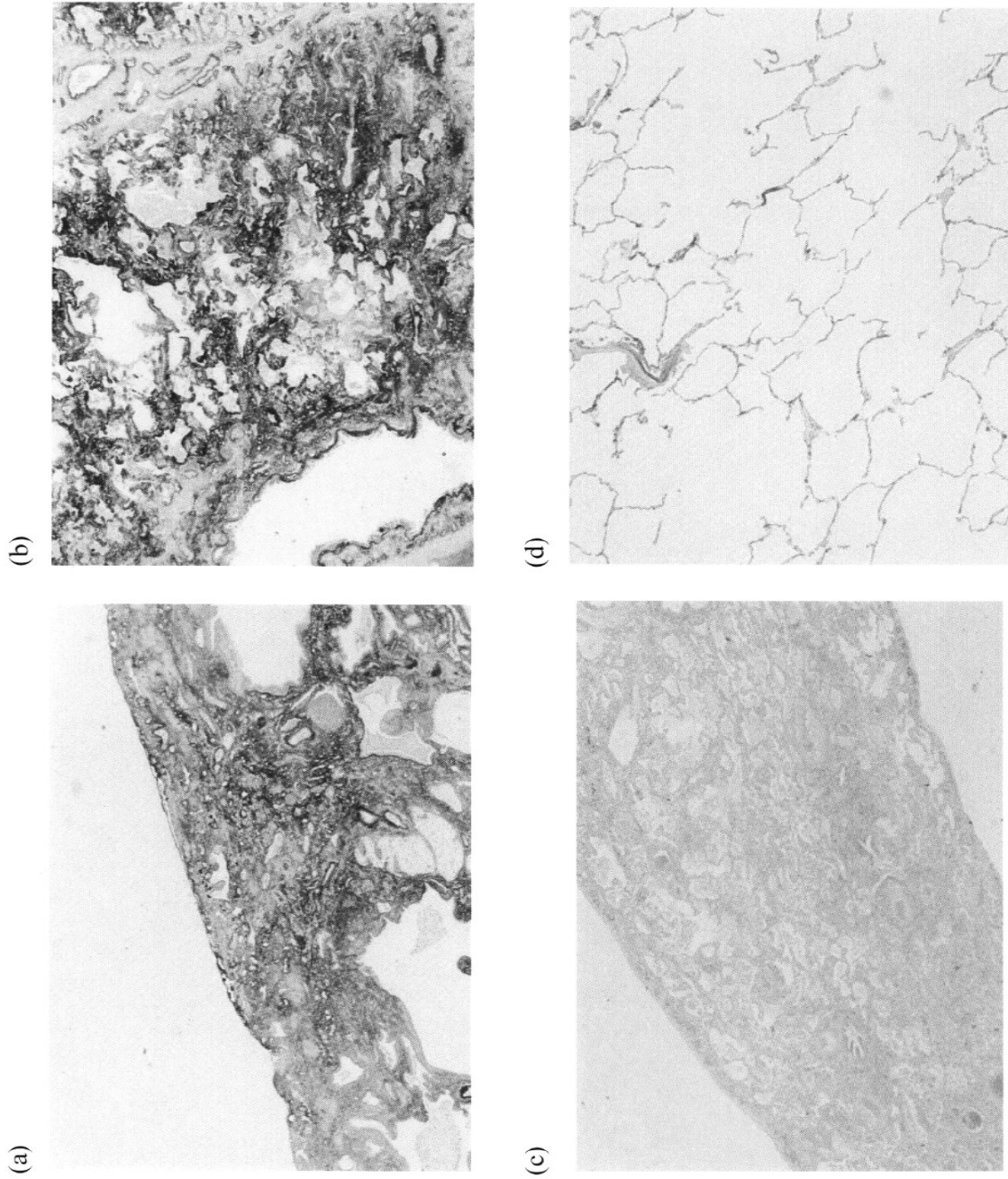
【 図 2 】

図2



【 図 1 】

図 1



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

- (74)代理人 100104282  
 弁理士 鈴木 康仁
- (72)発明者 出原 賢治  
 佐賀県佐賀市本庄町1番地 国立大学法人佐賀大学内
- (72)発明者 太田 昭一郎  
 佐賀県佐賀市本庄町1番地 国立大学法人佐賀大学内
- (72)発明者 白石 裕士  
 佐賀県佐賀市本庄町1番地 国立大学法人佐賀大学内
- (72)発明者 相澤 久道  
 福岡県久留米市旭町67番地 久留米大学内
- (72)発明者 星野 友昭  
 福岡県久留米市旭町67番地 久留米大学内
- (72)発明者 岡元 昌樹  
 福岡県久留米市旭町67番地 久留米大学内

審査官 北村 悠美子

- (56)参考文献 国際公開第2007/077934(WO, A1)  
 臨床病理, 2007年, Vol.55, No.4, p.369-374  
 Proc Natl Acad Sci USA, 2007年, Vol.104, No.37, p.14765-14770

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 C 1 2 Q 1 / 0 0 - 1 / 7 0  
 G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8  
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
 C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

专利名称(译)	检测特发性间质性肺炎的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5717178B2</a>	公开(公告)日	2015-05-13
申请号	JP2010515954	申请日	2009-06-03
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人佐贺大学 久留米大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人佐贺大学 学校法人 久留米大学		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人佐贺大学 学校法人 久留米大学		
[标]发明人	出原賢治 太田昭一郎 白石裕士 相澤久道 星野友昭 岡元昌樹		
发明人	出原 賢治 太田 昭一郎 白石 裕士 相澤 久道 星野 友昭 岡元 昌樹		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/15 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/6884 C07K16/28 C12Q1/6883 C12Q2600/136 G01N2333/51 G01N2500/00 G01N2500/10 G01N2800/12 G01N2800/26		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/02 G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/15.Z C12N15/00.A		
代理人(译)	小林 浩 片山英二 铃木康仁		
优先权	2008147822 2008-06-05 JP		
其他公开文献	JPWO2009148184A1 JPWO2009148184A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种检测特发性间质性肺炎的方法，该方法包括测量生物样品中骨膜素基因的表达水平或骨膜素蛋白的量。这提供了使用标记物检测特发性间质性肺炎的方法。

图 2

