

(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2008-530990

(P2008-530990A)

(43) 公表日 平成20年8月14日 (2008.8.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)	C 1 2 Q 1/26	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48	4 B O 6 3
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 80 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-555367 (P2007-555367)
 (86) (22) 出願日 平成18年2月14日 (2006.2.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年10月12日 (2007.10.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/005314
 (87) 国際公開番号 W02006/088951
 (87) 国際公開日 平成18年8月24日 (2006.8.24)
 (31) 優先権主張番号 11/058, 924
 (32) 優先日 平成17年2月15日 (2005.2.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 11/115, 964
 (32) 優先日 平成17年4月26日 (2005.4.26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507274722
 トリュデュ インスティテュート、インク
 .
 アメリカ合衆国 1 2 9 8 3 ニューヨー
 ク州、サラナク レイク、デューイ マウ
 ンテン ロード 8 9
 (71) 出願人 308006977
 ランド、フランス、イー.
 アメリカ合衆国 1 2 9 8 3 ニューヨー
 ク州、サラナク レイク、デューイ マウ
 ンテン ロード 8 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD38によりモジュレートされる走化性

(57) 【要約】

本発明は、それだけには限定されないが、炎症、虚血、喘息、自己免疫疾患、糖尿病、関節炎、アレルギー、寄生虫などの病原性生物の感染、および移植片拒絶を含む障害を治療するために、CD38を発現する細胞の遊走活性をモジュレートするための方法に関する。このような細胞には、例えば、好中球、リンパ球、好酸球、マクロファージ、および樹状細胞が含まれる。本発明は、CD38のADP-リボシルシクラーゼ活性をモジュレートする化合物を同定するために設計された薬物スクリーニングアッセイ、およびCD38がモジュレートした細胞遊走を伴う障害の治療におけるそのような化合物の使用にさらに関する。さらに、本発明は、寄生性の扁形動物であるマンソン住血吸虫からのCD38ホモログの単離、および特徴付けに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のステップ：

(i)CD38を発現する細胞を試験化合物および基質と接触させ、CD38活性のレベルを測定するステップ、(ii)別個の実験において、パート(i)と本質的に同じ条件で、CD38を発現する細胞と基質とを接触させ、CD38活性のレベルを測定するステップ、および、次いで(iii)パート(i)で測定したCD38活性のレベルを、パート(ii)におけるCD38活性のレベルと比較するステップ

を含み、該試験化合物の存在下におけるCD38活性のレベルの低下が、試験化合物がCD38阻害剤であることを示す、CD38酵素活性を阻害する化合物を同定するための方法。

10

【請求項 2】

ステップ(i)および(ii)において化学誘引物質の存在をさらに含み、かつ前記のCD38を発現する細胞が化学誘引物質受容体を発現する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

以下のステップ：

(i)精製されたCD38ポリペプチドを試験化合物および基質と接触させ、CD38活性のレベルを測定するステップ、

(ii)別個の実験において、パート(i)と本質的に同じ条件で、CD38を発現する細胞と基質とを接触させ、CD38活性のレベルを測定するステップ、ならびに

(iii)パート(i)で測定したCD38活性のレベルを、パート(ii)におけるCD38活性のレベルと比較するステップ

20

を含み、試験化合物の存在下でCD38活性のレベルの低下が観察された場合は、CD38がモジュレートした細胞遊走をその化合物が阻害することができるかどうかを決定するためにその化合物を試験する、CD38がモジュレートした細胞遊走を阻害する化合物を同定するための方法。

【請求項 4】

CD38活性が、NAD⁺グリコヒドロラーゼ、ADP-リボシルシクラーゼ、およびグリコシド交換活性からなる酵素活性の群から選択される、請求項 1、2、または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

CD38酵素を、ニコチンアミド、ADP-リボース(ADPR)、サイクリック-ADPR(cADPR)、またはニコチン酸アデニンジヌクレオチドリノ酸(NAADP)の形成速度をモニターすることにより測定する、請求項 1、2、または 3 に記載の方法。

30

【請求項 6】

CD38活性を、測定される細胞内カルシウムレベルにおける変化をモニターすることにより測定する、請求項 1 または 3 に記載の方法。

【請求項 7】

細胞内Ca²⁺レベルにおける変化を、Indo、Fluo-3、Fluo-4、Fluo-5F、Fluo-4FF、Fluo-5N、Fura-Red、カルシウムグリーン、カルシウムオレンジ、カルシウムクリムゾン、マグネシウムグリーン、オレゴングリーン、およびRhod-2からなる群から選択されるカルシウム指示色素を用いて検出する、請求項 2 4 に記載の方法。

40

【請求項 8】

以下のステップ：

(i)試験化合物をCD38タンパク質と接触させるステップ、

(ii)前記化合物がCD38タンパク質に結合するかどうかを決定するステップ、および

(iii)前記CD38タンパク質に結合する試験化合物を、CD38タンパク質の活性をモジュレートするのに用いることができる化合物であるとして選択するステップを含む、CD38の活性をモジュレートする化合物を同定するための方法。

【請求項 9】

ステップ(i)および(ii)において、試験化合物または対照ビヒクルと接触させるべき細胞またはCD38タンパク質を、一続きの位置で提供する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

50

【請求項 10】

以下のステップ：

(i) CD38を発現する細胞を $1,N^6$ -エテノ-NADの存在下で試験化合物と接触させ、 $1,N^6$ -エテノ-ADPRの形成を測定するステップ、

(ii) 対照として、パート(i)と本質的に同じ条件で、CD38タンパク質を発現する細胞を、 $1,N^6$ -エテノ-NADの存在下で対照ビヒクルと接触させ、 $1,N^6$ -エテノ-ADPRの形成を測定するステップ、および

(iii) パート(i)で測定した $1,N^6$ -エテノ-ADPRのレベルを、パート(ii)で測定した $1,N^6$ -エテノ-ADPRのレベルと比較するステップ

を含み、試験化合物の存在下で測定された $1,N^6$ -エテノ-ADPRのレベルにおける相違が、試験化合物がCD38モジュレーターであることを示す、CD38活性をモジュレートする化合物を同定するための方法。

10

【請求項 10】

以下のステップ：

(i) CD38タンパク質を $1,N^6$ -エテノ-NADの存在下で試験化合物と接触させ、 $1,N^6$ -エテノ-ADPRの形成を測定するステップ、

(ii) 対照実験として、パート(i)と本質的に同じ条件で、CD38タンパク質を、 $1,N^6$ -エテノ-NADの存在下で対照ビヒクルと接触させ、 $1,N^6$ -エテノ-ADPRの形成を測定するステップ、および

(iii) パート(i)で測定した $1,N^6$ -エテノ-ADPRのレベルを、パート(ii)で測定した $1,N^6$ -エテノ-ADPRのレベルと比較するステップ

を含み、試験化合物の存在下で測定された $1,N^6$ -エテノ-ADPRのレベルにおける相違が、試験化合物がCD38モジュレーターであることを示す、CD38活性をモジュレートする化合物を同定するための方法。

20

【請求項 11】

ステップ(i)および(ii)において、試験化合物または対照ビヒクルと接触させるべき細胞またはCD38タンパク質を、一続きの位置で提供する、請求項9または10に記載の方法。

【請求項 12】

一続きの位置がマルチウェルプレートにより提供される、請求項11に記載の方法。

30

【請求項 13】

抗ADPR特異抗体がウェルの内側表面に結合し、該抗体に結合している $1,N^6$ -エテノ-ADPRのレベルを測定する、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

マルチウェルプレートのウェルが、少なくとも1つのシステイン残基を含むアクセプタータンパク質でコーティングされており、該アクセプタータンパク質に結合している $1,N^6$ -エテノ-ADPRのレベルを測定する、請求項12に記載の方法。

【請求項 15】

アクセプタータンパク質がウシのリゾチームである、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

ステップ(i)およびステップ(ii)が完了した後に、細胞をマルチウェルプレートの底部へと遠心分離し、遠心分離された細胞に結合している $1,N^6$ -エテノ-ADPRのレベルを測定する、請求項11に記載の方法。

40

【請求項 17】

マルチウェルプレートのウェルが抗CD38抗体でコーティングされており、それによってSM38を固定化し、そしてステップ(i)およびステップ(ii)が完了した後にプレートのウェルを洗浄し、固定化したSM38に結合している $1,N^6$ -エテノ-ADPRのレベルを測定する、請求項12に記載の方法。

【請求項 18】

以下のステップ：

50

(i)CD38を発現する細胞を、放射標識した基質の存在下で試験化合物と接触させて、放射標識されたADPRの形成を測定するステップ、

(ii)対照として、パート(i)と本質的に同じ条件で、CD38タンパク質を発現する細胞を、放射標識した基質の存在下で対照ビヒクルと接触させ、放射標識されたADPRの形成を測定するステップ、および

(iii)パート(i)で測定した放射標識されたADPRのレベルを、パート(ii)で測定した放射標識されたADPRのレベルと比較するステップ

を含み、試験化合物の存在下で測定された放射標識されたADPRのレベルにおける相違が、試験化合物がCD38モジュレーターであることを示す、CD38活性をモジュレートする化合物を同定するための方法。

10

【請求項 19】

以下のステップ：

(i)CD38タンパク質を、放射標識した基質の存在下で試験化合物と接触させ、放射標識されたADPRの形成を測定するステップ、

(ii)対照として、パート(i)と本質的に同じ条件で、精製されたCD38タンパク質を、放射標識した基質の存在下で対照ビヒクルと接触させ、放射標識されたADPRの形成を測定するステップ、および

(iii)パート(i)で測定した放射標識されたADPRのレベルを、パート(ii)で測定した放射標識されたADPRのレベルと比較するステップ

を含み、試験化合物の存在下で測定した放射標識されたADPRのレベルにおける相違が、試験化合物がCD38モジュレーターであることを示す、CD38活性をモジュレートする化合物を同定するための方法。

20

【請求項 20】

放射標識した基質が、 $[^{14}\text{C}$ -アデノシン]-NAD、 $[^3\text{H}$ -アデノシン]-NAD、および $[^{32}\text{P}$ -アデノシン]-NADからなる群から選択される、請求項 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 21】

ステップ(i)および(ii)において、試験化合物または対照ビヒクルと接触させるべき細胞またはCD38タンパク質を、一続きの位置で提供する、請求項 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 22】

一続きの位置がマルチウェルプレートにより提供される、請求項 21 に記載の方法。

30

【請求項 23】

抗ADPR特異抗体がウェルの内側表面に結合し、該抗体に結合している放射標識されたADPRのレベルを測定する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

マルチウェルプレートのウェルが、少なくとも1つのシステイン残基を含むアクセプタータンパク質でコーティングされており、該アクセプタータンパク質に結合している放射標識したADPRのレベルを測定する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

アクセプタータンパク質がウシのリゾチームである、請求項 24 に記載の方法。

40

【請求項 26】

ステップ(i)およびステップ(ii)が完了した後に、細胞をマルチウェルプレートの底部へと遠心分離し、遠心分離された細胞に結合している放射標識したADPRのレベルを測定する、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 27】

マルチウェルプレートのウェルが抗CD38抗体でコーティングされており、それによってSM38を固定化し、そしてステップ(i)およびステップ(ii)が完了した後にプレートのウェルを洗浄し、固定化したCD38に結合している放射標識されたADPRのレベルを測定する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 28】

50

以下のステップ：

(i)CD38を発現する細胞を、NAD+基質の存在下で試験化合物と接触させ、ADPRの形成を測定するステップ、

(ii)対照として、パート(i)と本質的に同じ条件で、CD38タンパク質を発現する細胞を、NAD+基質の存在下で対照ビヒクルと接触させ、ADPRの形成を測定するステップ、および
(iii)パート(i)で測定したADPRのレベルを、パート(ii)で測定したADPRのレベルと比較するステップ

を含み、試験化合物の存在下で測定されたADPRのレベルにおける相違が、試験化合物がCD38モジュレーターであることを示す、CD38活性をモジュレートする化合物を同定するための方法。

10

【請求項 29】

以下のステップ：

(i)CD38タンパク質を、NAD+基質の存在下で試験化合物と接触させ、ADPRの形成を測定するステップ、

(ii)対照として、パート(i)と本質的に同じ条件で、CD38タンパク質を、NAD+基質の存在下で対照ビヒクルと接触させ、ADPRの形成を測定するステップ、および

(iii)パート(i)で測定したADPRのレベルを、パート(ii)で測定したADPRのレベルと比較するステップ

を含み、試験化合物の存在下で測定したADPRのレベルにおける相違が、試験化合物がCD38モジュレーターであることを示す、CD38活性をモジュレートする化合物を同定するための方法。

20

【請求項 30】

ステップ(i)および(ii)において、試験化合物または対照ビヒクルと接触させるべき細胞またはCD38タンパク質を、一続きの位置で提供する、請求項 28 または 29 に記載の方法。

【請求項 31】

一続きの位置がマルチウェルプレートにより提供される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

抗ADPR特異抗体がウェルの内側表面に結合し、該抗体に結合しているcADPRのレベルを測定する、請求項 12 に記載の方法。

30

【請求項 33】

ADPRのレベルを抗ADPR特異抗体を用いて測定する、請求項 28 または 29 に記載の方法。

【請求項 34】

抗体が蛍光で標識されている、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

マルチウェルプレートのウェルが、少なくとも1つのシステイン残基を含むアクセプタータンパク質でコーティングされており、該アクセプタータンパク質に結合しているcADPRのレベルを測定する、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 36】

アクセプタータンパク質がウシのリゾチームである、請求項 35 に記載の方法。

40

【請求項 37】

ステップ(i)およびステップ(ii)が完了した後に、細胞をマルチウェルプレートの底部へと遠心分離し、遠心分離された細胞に結合しているcADPRのレベルを測定する、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 38】

マルチウェルプレートのウェルが抗CD38抗体でコーティングされており、それによってSM38を固定化し、そしてステップ(i)およびステップ(ii)が完了した後にプレートのウェルを洗浄し、固定化したSM38に結合しているcADPRのレベルを測定する、請求項 31 に記載の方法。

50

【請求項 39】

ステップ(i)およびステップ(ii)が完了した後に、細胞をマルチウェルプレートの底部へと遠心分離し、遠心分離された細胞に結合しているADPRのレベルを測定する、請求項 37に記載の方法。

【請求項 40】

ステップ(i)および(ii)において化学誘引物質の存在をさらに含み、かつ前記のCD38を発現する細胞が化学誘引物質受容体を発現する、請求項 10、18、および28に記載の方法。

【請求項 41】

CD38を発現する細胞の遊走をモジュレートするための方法であって、前記細胞をCD38酵素活性のモジュレーターと接触させることを含む方法。

【請求項 42】

前記細胞が、好中球、樹状細胞、好酸球、単球、およびT細胞からなる群から選択される、請求項 40に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 序論

本発明は、それだけには限定されないが、炎症、虚血、喘息、自己免疫疾患、糖尿病、関節炎、アレルギー、寄生虫などの病原性生物での感染、および移植片拒絶を含む疾患を治療するための、CD38を発現する細胞の遊走活性をモジュレートするための方法に関する。このような細胞には、例えば、好中球、リンパ球、好酸球、マクロファージ、および樹状細胞が含まれる。本発明は、CD38のADP-リボシルシクラーゼ活性、NADグリコヒドラーゼ活性、およびグリコシド交換活性をモジュレートする化合物を同定するために設計された薬物スクリーニングアッセイ、ならびにCD38がモジュレートする細胞遊走を伴う障害の治療におけるこのような化合物の使用にさらに関する。本発明は、寄生性の扁形動物であるマンソン住血吸虫(*Schistosoma mansoni*)からのCD38ホモログの単離および特徴付けに関する。本明細書ではSM38またはSARCと呼ぶこのようなホモログを同定することにより、病原性生物における関連する酵素をスクリーニングするために設計された組成物およびアッセイ、ならびにSM38の活性および/または発現をモジュレートする化合物をスクリー

【背景技術】

【0002】

2. 発明の背景

好中球、単球、樹状細胞、好酸球、およびリンパ球などの細胞を含む、造血系由来細胞は、炎症反応の重要な細胞メディエータであり、新しく到着した細胞がそのエフェクター機能を行う組織の傷害または感染部位に遊走することにより可溶性の炎症性メディエータに応答する。

【0003】

循環する白血球数の40~50%に相当する好中球は、免疫および炎症の両方に特に重要である。好中球は、通常は静止状態の細胞であるが、刺激すると様々な異なる炎症活性を媒介することができる。多数の異なる物質が好中球を活性化することができ、この活性化は、通常、活性化物質が好中球の表面上に発現される特異的な受容体に結合することにより媒介される。いったん活性化されると、好中球は、内皮細胞に結合することができ、組織損傷、病原体、または異物の部位に遊走することができる。同様に、好酸球も強力な炎症性エフェクター細胞であるが、これらの細胞は、喘息などのアレルギー性疾患と非常に頻

繁に関連する。好中球同様、好酸球は、炎症反応を開始し維持することができる炎症誘発性分子の強力な武器庫を有する。

【0004】

ひとたび炎症部位にあると、好酸球および好中球など、リクルートされた細胞は、炎症性生成物を放出し、他の造血系由来細胞をその部位にリクルートすることによりさらなる炎症を誘発する。いくつかの場合では、特異的にリクルートされた造血系由来細胞により媒介された炎症反応が感染性物質を除去することにより、宿主は罹患または致死から守られる。他の場合(すなわち、自己免疫、虚血/再灌流、移植、アレルギー)では、炎症反応は組織をさらに損傷し、病理を引き起こす。したがって、細胞の炎症またはリクルートを変更する物質は、病理のコントロールに有用であり得る。

10

【0005】

CD38の発現は、最初、B細胞系列の細胞に限定され则认为られていたが、数々のグループが引き続き実験を行い、CD38は造血細胞および非造血系由来細胞の両方で広範に発現されることが実証されている。CD38のホモログは、哺乳動物の間質細胞(Bst-1)で、および無脊椎動物であるジャンボアメフラシ(*Aplysia californica*)から単離された細胞で発現されることも見出されている(ADP-リボシルシクラーゼ酵素)(Prasad GS、1996年、*Nature Structural Bio*、13巻、957~964頁)。

【0006】

より最近では、CD38は、NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性、グリコシド交換活性、およびADP-リボシルシクラーゼ活性を有する多機能性の外酵素であり、それが、その基質であるNAD⁺およびNADP⁺から、ニコチンアミド、ADPリボース(ADPR)、サイクリック-ADPR(cADPR)、およびニコチン酸アデニンジヌクレオチドリン酸(NAADP)を生成するのを可能にすることが示された(Howardら、1993年、*Science*、252巻、1056~1059頁;Leeら、1999年、*Biol.Chem.*、380巻、785~793頁)。サイクリックADPRは、リアノジン受容体依存性貯蔵を通じた細胞内カルシウムの放出を媒介し(Galioneら、1991年、*Science*、253巻、1143~1146頁;Lee、1993年、*J.Biol.Chem.*、268巻、293~299頁;Meszarosら、1993年、*Nature*、354巻、76~78頁)、一方ではADPRは原形質膜のイオンチャネルであるTRPM2を活性化することにより哺乳動物細胞におけるCa²⁺の流入を誘導する(Perraudら、2001年、*Nature*、411巻、595~599頁;Sanoら、2001年、*Science*、293巻、1327~1330頁;Haraら、2002年、*Mol.Cell*、9巻、163~173頁)。さらに、シクラーゼが基質としてやはり利用するNADP⁺は、ニコチン酸の存在下で、塩基交換反応においてニコチン酸アデニンジヌクレオチド(NAADP⁺)に変換され得る(Aarhusら、1995年、*J.Biol.Chem.*、270巻、30327~30333頁)。NAADP⁺は、IP₃RおよびRyRの両方に独立に依存する細胞内貯蔵からのCa²⁺放出を媒介する、非常に強力なCa²⁺動員性代謝物である(Leeら、1995年、*J.Biol.Chem.*、270巻、2152~2157頁)。このように、シクラーゼには、多数の別々のカルシウム源を動員する少なくとも3つの異なる二次メッセンジャーを生成する能力があり、これらの代謝物は、カルシウム応答の包括的な制御因子であり得ることも示唆されている(Leeら、1999年、*Biol.Chem.*、380巻、785~793頁)。これら3つの二次メッセンジャーは全て、やはりSM38により生成される。

20

30

【0007】

cADPRもNAADPも、IP₃受容体が制御するものとは異なるカルシウム貯蔵からのカルシウムの放出を誘導することが知られている(Clapper,DLら、1987年、*J.Biological Chem.*、262巻、9561~9568頁)。その代わりに、cADPRは、cADPR媒介性カルシウム放出を感作するリアノジン受容体のアゴニストとして、およびcADPR依存性カルシウム放出を阻止するリアノジン受容体のアンタゴニストとして、リアノジン受容体が制御する貯蔵からのカルシウム放出を制御すると考えられている(Galione Aら、1991年、*Science*、253巻、143~146頁)。したがって、cADPRは、リアノジン受容体が発現される筋肉および膵臓などの組織において、カルシウム応答を制御するのであろうことが提唱されている。興味深いことに、寄生性の扁形動物であるマンソン住血吸虫の筋線維はリアノジン受容体を発現し、カフェインなどのリアノジン受容体のアゴニストは、寄生虫における細胞内カルシウム放出および筋肉の収縮を誘導することができることが、最近示された(Dayら、2000年、*Parasitol*

40

50

、120巻、417～422頁;Silvaら、1998年、Biochem.Pharmacol.、156巻、997～1003頁)。哺乳動物の平滑筋細胞では、アセチルコリンに応答したカルシウムの放出は、リアノジン受容体アンタゴニストだけではなく、8-NH₂-cADPRまたは8-Br-cADPRなどの特異的なアンタゴニストでも阻止され得る(Guse,AH、1999年、Cell.Signal.、11巻、309～316頁)。

【0008】

これらおよび他の発見は、cADPRを含めたりアノジン受容体のアゴニスト/アンタゴニストは、蠕虫から哺乳動物までの多様な種から単離された細胞におけるカルシウム応答を制御することができることを示すが、CD38またはSM38などのADP-リボシルシクラーゼ酵素がin vivoでcADPRの生成に必要とされているかどうかは明らかではない。さらに、CD38酵素活性を、カルシウム放出、増殖、アポトーシス、遊走、または他のエフェクター機能などの下流の応答と結びつける直接的な証拠は存在していない。したがって、多くの細胞型で高レベルのCD38が発現されるにもかかわらず、免疫反応におけるCD38酵素活性が果たす明確な決定的な役割は確立されていなかった。

【発明の開示】

【0009】

3. 発明の要旨

本発明は、CD38酵素活性の、およびcADPRが媒介するシグナル伝達経路のアゴニストまたはアンタゴニスト（小分子、大分子、および抗体を包含する）を投与することを含む、CD38を発現する細胞の遊走活性をモジュレートするための方法に関する。本発明は、CD38遺伝子の発現をモジュレートするのに用いることができる化合物、およびヌクレオチド配列も提供する。

【0010】

本発明は、本明細書ではSM38と呼ぶ、寄生性の扁形動物であるマンソン住血吸虫(*Shistosoma mansoni*)からのCD38ホモログの単離および特徴付けにさらに関する。このようなホモログを同定することにより、病原性微生物(例えば、蠕虫)における関連酵素をスクリーニングするために設計された組成物およびアッセイ、ならびにSM38の活性をモジュレートする化合物をスクリーニングするための組成物およびアッセイが提供される。このような化合物は、このような病原性微生物の感染に起因する病理障害を治療するために用いることができる。

【0011】

本発明は、CD38および/またはSM38(CD38/SM38)の酵素活性をモジュレートする化合物、すなわちCD38酵素活性のアゴニストおよびアンタゴニストとして作用する化合物をスクリーニングするために設計されたアッセイに関する。蠕虫感染を治療するためのこのような化合物をスクリーニングする場合は、その化合物は、SM38を選択的に阻害し、CD38を阻害しないことが好ましい。さらに、本発明のスクリーニングを用いて、cADPR、ADPR、およびNAADPなどの、CD38/SM38により生成されたカルシウム動員性代謝物を伴うシグナル伝達経路のアンタゴニストまたはアゴニストに変換されるCD38/SM38の基質を同定することができる。本発明のスクリーニングを用いて、またcADPR、ADPR、およびNAADPを伴うシグナル伝達経路のアゴニストおよびアンタゴニストを直接同定することもできるかもしれない。

【0012】

本発明は、CD38/SM38遺伝子の発現をモジュレートする化合物をスクリーニングするために設計されたアッセイにも関する。例えば、細胞ベースのアッセイを用いて、CD38/SM38転写をモジュレートする化合物、例えば、CD38/SM38遺伝子の発現に関与する転写因子の発現、生成、または活性をモジュレートする化合物、CD38/SM38 mRNAの翻訳をモジュレートするアンチセンスおよびリボザイムのポリヌクレオチド、ならびにCD38/SM38の調節領域と3重らせん構造を形成しCD38/SM38遺伝子の転写を阻害するポリヌクレオチドをスクリーニングすることができる。

【0013】

同定された化合物を、造血系由来細胞などのCD38発現性細胞の遊走活性がそのような障

害の進行に寄与するような障害の治療に用いることができる。そのような障害には、それだけには限定されないが、例えばCD38アンタゴニストを用いて遊走活性を阻害するのが望ましいような、炎症、虚血、喘息、自己免疫疾患、糖尿病、関節炎、アレルギー、または移植片拒絶が含まれる。それとは対照的に、病原性微生物に感染している被験体、または免疫抑制された被験体では、例えばCD38のアゴニストを用いて、造血系由来細胞の遊走活性を誘導することが望ましい場合がある。さらに、同定された化合物を、SM38または構造的に関連する相同タンパク質を発現する病原性微生物による感染に起因する病理障害を治療するのに用いることができる。

【0014】

4. 図面の簡単な説明

(図面の簡単な説明については後述)

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

5. 発明の詳細な説明

本発明は、CD38のADP-リボシルシクラーゼ活性の制御を伴う細胞の遊走活性をモジュレートするための方法に関する。本発明は、CD38KOマウス由来の好中球、樹状細胞、好酸球、単球、およびT細胞などの細胞は、身体における炎症および感染の部位に効率的にリクルートされないという発見に基づくものである。本発明は、CD38のADP-リボシルシクラーゼ活性は好中球などの顆粒球の初期活性化には必須ではないが、*in vivo*および*in vitro*の両方において好中球の走化性を制御するのに決定的に重要であるという発見に基づくものである。特に、CD38のADP-リボシルシクラーゼ活性の生成物であるcADPRは、好中球内に存在するカルシウム貯蔵からのカルシウムの放出を誘導するのに必要とされている。この特殊化した貯蔵からのカルシウム放出は、原形質膜チャネルの活性化および開口に必要であり、それが、化学誘引物質および/または炎症生成物へ向けた好中球の直接の遊走をその後に媒介するカルシウムの容量性流入をもたらす。

【0016】

本発明は、CD38酵素活性の、アゴニストおよびアンタゴニストなどのモジュレーター、および/またはcADPR依存性カルシウム応答および走化性のモジュレーターを同定するために設計されたスクリーニングアッセイを包含する。本発明は、CD38が制御する、化学誘引物質および炎症生成物への細胞の遊走活性に基づく障害の治療におけるこのようなモジュレーターの使用にさらに関する。このような障害には、それだけには限定されないが、炎症、虚血、自己免疫疾患、喘息、糖尿病、関節炎、アレルギー、感染症、および臓器移植片拒絶が含まれる。

【0017】

本発明は、寄生虫であるマンソン住血吸虫由来のCD38ホモログであるSM38の同定、単離、および特徴付けにも関する。本発明は、蠕虫などの他の病原性微生物における関連酵素を同定するためのスクリーニングアッセイ、ならびにSM38の活性および発現をモジュレートする化合物をスクリーニングするための組成物およびアッセイを包含する。本発明は、SM38または構造的に関連する分子を発現している生物に感染した動物およびヒトにおける病理障害を治療するためのこのようなモジュレーターの使用にさらに関する。本発明は、マンソン住血吸虫に感染した宿主を同定するための診断アッセイ、およびSM38ベースの免疫化方法も提供する。

【0018】

本発明の様々な態様を、以下のサブセクションで、より詳しく記載する。

【0019】

5.1 SM38遺伝子

マンソン住血吸虫SM38のcDNA配列および推定アミノ酸配列を、図13Aに示す(ATCC寄託番号:PTA-3780(大腸菌(E.coli)SM38 5~18中のプラスミドpCR2.1-TOPO);PTA-3781(大腸菌:SM38 LC12中のプラスミドSK)。SM38 cDNAは、全ての読み枠において翻訳され、アミノ酸303個のオープンリーディングフレームが同定された。開始コドンはヌクレオチド71位に位

10

20

30

40

50

置し、終止コдонはヌクレオチド位981に見られる。

【0020】

本発明のSM38ヌクレオチド配列には、以下を包含する：(a)図13に示したDNA配列、(b)図13に示したアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、(c)(i)例えば、65℃で0.5M NaHPO₄、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1mM EDTA中でフィルターに結合したDNAに対してハイブリダイゼーションし、68℃で0.1×SSC/0.1%SDS中で洗浄する(Ausubel F.M.ら編集、1989年、Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、Green Publishing Associates, Inc.、およびJohn Wiley & sons, Inc.、ニューヨーク、p.2.10.3.)などのストリンジেন্টな条件下で(a)または(b)に記載のヌクレオチド配列にハイブリダイズし、かつ(ii)機能的に同等な遺伝子産物をコードする任意のヌクレオチド配列、および(d)中程度にストリンジেন্টな条件下、例えば、42℃で0.2×SSC/0.1%SDS中で洗浄する(Ausubelら、1989年、上述)などの、よりストリンジেন্টではない条件下で図13に示したアミノ酸配列をコードするDNA配列にハイブリダイズするが、なお機能的に同等なSM38遺伝子産物をコードする任意のヌクレオチド配列。SM38タンパク質の機能的同等物には、マンソン住血吸虫以外の種に存在する、天然に存在するSM38が含まれる。本発明には、(a)から(d)までの配列の縮重変異体も含まれる。本発明には、(SM38遺伝子の核酸配列の増幅反応におけるアンチセンスプライマーのための、および/またはそのアンチセンスプライマーとしての)例えばSM38遺伝子の制御に有用な、SM38アンチセンス分子をコードし、またはそのような分子として機能することができる核酸分子も含まれる。

【0021】

上記に記載したSM38ヌクレオチド配列の他に、他の種に存在するSM38遺伝子のホモログも、過度の実験なしに当技術分野ではよく知られている分子生物学の技術により、同定し、容易に単離することができる。例えば、目的の生物に由来するcDNAライブラリー、またはゲノムDNAライブラリーを、本明細書に記載したヌクレオチドをハイブリダイゼーションまたは増幅プローブとして用いて、ハイブリダイゼーションによりスクリーニングすることができる。

【0022】

本発明は、突然変異型SM38、SM38のペプチド断片、末端切断型SM38、およびSM38融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列も包含する。これらには、それだけには限定されないが、SM38のシクラーゼドメインまたはこのドメインの部分に対応するポリペプチドまたはペプチドをコードするヌクレオチド配列、ドメインが欠失した末端切断型SM38、例えばシクラーゼ領域の全体または一部分を欠く機能的なSM38が含まれる。これらの末端切断型または突然変異型SM38タンパク質のあるものは、天然のSM38タンパク質のドミナントネガティブな阻害剤として作用するであろう。融合タンパク質をコードするヌクレオチドとしては、それだけには限定されないが、マーカーとして用いることができる、酵素、蛍光タンパク質、発光タンパク質などの非関連タンパク質もしくはペプチドに融合させた、完全長SM38、末端切断型SM38、SM38のペプチド断片が含まれ得る。

【0023】

SM38のヌクレオチド配列は、当業者には公知の様々な異なる方法を用いて単離することができる。例えば、SM38を発現することが知られている細胞または組織からのRNAを用いて構築されたcDNAライブラリーを、標識されたSM38プローブを用いてスクリーニングすることができる。あるいは、ゲノムライブラリーをスクリーニングして、SM38タンパク質をコードする核酸分子を引き出すことができる。さらに、SM38核酸配列を、本明細書に開示したSM38ヌクレオチド配列に基づいて設計された2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCRを行うことにより引き出すことができる。反応のテンプレートは、SM38を発現することが知られている細胞系または組織から調製されたmRNAの逆転写により得られたcDNAであってよい。

【0024】

本発明は、(a)前述のSM38配列および/またはそれらの相補体(すなわちアンチセンス)の任意のものを含むDNAベクター、(b)SM38コード配列の発現を指令する調節エレメントと機

能しうるように連結された前述のSM38配列の任意のものを含むDNA発現ベクター、(c)宿主細胞においてSM38コード配列の発現を指令する調節エレメントに機能しうるように連結された前述のSM38配列の任意のものを含む遺伝子操作された宿主細胞、および(d)前述のSM38配列の任意のものを含むトランスジェニックマウスまたは他の生物も包含する。本明細書で用いる、調節エレメントには、それだけには限定されないが、誘導性および非誘導性プロモーター、エンハンサー、オペレーター、および発現を駆動し制御する当業者には公知の他のエレメントが含まれる。

【0025】

5.1.2 SM38タンパク質およびポリペプチド

SM38タンパク質、ポリペプチド、およびペプチド断片、SM38および/またはSM38融合タンパク質の、突然変異形態、末端切断形態、または欠失形態を、それだけには限定されないが、抗体の生成、SM38活性の制御に関与する他の細胞性遺伝子産物の同定、およびSM38の活性をモジュレートするのに用いることができる化合物のスクリーニングを含む、様々な使用のために調製することができる。

【0026】

図13は、SM38タンパク質の推定アミノ酸配列を示している。本発明のSM38アミノ酸配列には、図13に示したアミノ酸配列が含まれる。さらに、他の生物種のSM38も本発明に包含される。実際、上記に記載したSM38ヌクレオチド配列によってコードされるあらゆるSM38タンパク質が、本発明の範囲内である。

【0027】

本発明は、それだけには限定されないが、カルシウム動員性二次メッセンジャーであるcADPRの生成を触媒し、それによってカルシウム応答を制御する能力を始めとする多数の基準のいずれかにより判断して、セクション5.1に記載したヌクレオチド配列によりコードされる、SM38に機能的に同等であるタンパク質も包含する。このような機能的に同等なSM38タンパク質には、それだけには限定されないが、上記のセクション5.1に記載されたSM38ヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列内にアミノ酸残基の付加または置換を有するタンパク質であって、しかしそれがサイレント変化をもたらし、そして機能的に同等な遺伝子産物を生成するタンパク質が含まれる。

【0028】

SM38の1つまたは複数のドメインに対応するペプチド、および完全長SM38、SM38ペプチド、または末端切断型SM38が非関連タンパク質に融合している融合タンパク質も、本発明の範囲内であり、本明細書に開示したSM38ヌクレオチドおよびSM38アミノ酸配列に基づいて設計することができる。このような融合タンパク質には、マーカー機能を提供する酵素、蛍光タンパク質、または発光タンパク質への融合体が含まれる。

【0029】

SM38ポリペプチドおよびペプチドは化学的に合成することができ(例えば、Creighton、1983年、Proteins: Structures and Molecular Principles、W.H.Freeman & Co.、ニューヨークを参照されたい)、一方ではSM38に由来する大型のポリペプチド、および完全長SM38それ自体は、SM38の遺伝子配列および/またはコード配列を含む核酸を発現するのに当技術分野ではよく知られている技術を用いて、組換えDNA技術により有利に生成することができる。このような方法を用いて、セクション5.1に記載したSM38ヌクレオチド配列、ならびに好適な転写および翻訳調節シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、例えば、in vitroの組換えDNA技術、合成技術、およびin vivoの遺伝子組換えが含まれる。(例えば、Sambrookら、1989年、上述、およびAusubelら、1989年、上述に記載された技術を参照されたい)。

【0030】

様々な宿主-発現ベクター系を利用して、本発明のSM38ヌクレオチド配列を発現することができる。SM38ペプチドまたはポリペプチドが、可溶性誘導体として発現され、分泌されない場合は、ペプチドまたはポリペプチドを宿主細胞から回収することができる。あるいは、SM38ペプチドまたはポリペプチドが分泌される場合、ペプチドまたはポリペプチド

を培地から回収することができる。このような発現系からのSM38の精製および濃縮は、好適な界面活性剤および脂質ミセル、ならびに当業者にはよく知られた方法を用いて遂行することができる。このような操作された宿主細胞自体を、SM38の構造的および機能的特徴を保持するだけではなく生物学的活性を評価するのに重要である状況、すなわち薬物のスクリーニングアッセイで用いることができる。

【0031】

本発明の目的で用いることができる発現系には、それだけには限定されないが、SM38ヌクレオチド配列を含む組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドのDNA発現ベクターで形質転換された細菌などの微生物、SM38ヌクレオチド配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母、または哺乳動物の細胞のゲノムもしくは哺乳動物のウィルスに由来するプロモーターを含む組換え発現構築物を内部に持つ哺乳動物の細胞系が含まれる。

10

【0032】

好適な発現系を選択して、SM38タンパク質の正確な修飾、プロセッシング、および細胞内局在が起こるのを確実にすることができる。この目的では、SM38タンパク質を適切に修飾し処理加工する能力を有する宿主細胞が好ましい。組換えSM38タンパク質を長期間、高収率で生成するためには、例えば、スクリーニングの目的で細胞系を開発するのに望ましいものなど、安定した発現が好ましい。複製開始点を含む発現ベクターを使用するよりも、好適な発現調節エレメントおよび選択可能なマーカー遺伝子、すなわち、少数を挙げればtk、hgprt、dhfr、neoおよびhygro遺伝子により制御されているDNAで宿主細胞を形質転換することができる。外来のDNAを導入した後は、操作した細胞を富化培地で1~2日間増殖させ、次いで選択培地に切り替えてもよい。このような操作された細胞系は、SM38遺伝子産物の内在性の活性をモジュレートする化合物をスクリーニングし、評価するのに特に有利であり得る。

20

【0033】

5.1.3 トランスジェニック動物

SM38遺伝子産物を、トランスジェニック動物で発現させることもできる。それだけには限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、ミニブタ(micro-pig)、ヤギ、ならびに非ヒト霊長動物、例えば、ヒヒ、サル、およびチンパンジーを含む、あらゆる種の動物を用いて、SM38トランスジェニック動物を作製することができる。

30

【0034】

当技術分野では周知のあらゆる技術を用いて、SM38導入遺伝子を動物中に導入して、トランスジェニック動物の創始者系統を作製することができる。このような技術には、それだけには限定されないが、前核へのマイクロインジェクション(Hoppe, P.C. およびWagner, T.E., 1989年、米国特許第4,873,191号)、レトロウィルスが媒介する生殖系列への遺伝子移入(Van der Puttenら、1985年、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、82巻、6148~6152頁)、胚幹細胞における遺伝子ターゲティング(Thompsonら、1989年、Cell、56巻、313~321頁)、胚のエレクトロポレーション(Lo、1983年、Mol Cell.Biol.、3巻、1803~1814頁)、および精子が媒介する遺伝子移入(Lavitranoら、1989年、Cell、57巻、717~723頁)などが含まれる。このような技術の総説には、その全文が本明細書に参照として組み入れられる、Gordon、1989年、Transgenic Animals、Intl.Rev.Cytol.、115巻、171~229頁を参照されたい。

40

【0035】

本発明は、その細胞中にSM38導入遺伝子を保有するトランスジェニック動物、およびその全ての細胞ではないがいくつかの細胞に導入遺伝子を保有する動物、すなわちモザイク動物を提供する。導入遺伝子は、例えば、Laskoらの教示に従って、特定の細胞型に選択的に導入し、そこで活性化させてもよい(Lasko, M.ら、1992年、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、89巻、6232~6236頁)。そのような細胞型特異的活性化に必要とされる調節配列は、目的の特定の細胞型に依存しており、また当業者には明らかである。SM38導入遺伝子が内在性のSM38遺伝子の染色体部位中に組み込まれるのが望ましい場合は、遺伝子ターゲティン

50

グが好ましい。簡潔に述べると、このような技術を利用しようとする場合は、染色体の配列との相同組換えにより、内在性SM38遺伝子のヌクレオチド配列中に組み込みその機能を破壊する目的で、内在性のSM38遺伝子に対して相同ヌクレオチド配列を含むベクターを設計する。

【0036】

いったんトランスジェニック動物を産生したら、標準の技術を利用して組換えSM38遺伝子の発現をアッセイすることができる。導入遺伝子の組み込みが行われたか否かをアッセイするために、サザンブロッティング分析またはPCR技術により最初のスクリーニングを行って動物組織を分析することができる。トランスジェニック動物の組織における導入遺伝子のmRNA発現のレベルを、それだけには限定されないが、動物から得られた組織サンプルのノーザンブロット分析、in situハイブリダイゼーション分析、およびRT-PCRを含む技術を用いて評価してもよい。SM38遺伝子発現性組織のサンプルを、SM38導入遺伝子産物に特異的な抗体を用いて免疫細胞化学的に評価してもよい。

【0037】

5.1.4 SM38タンパク質に対する抗体

本発明は、SM38の1つまたは複数のエピトープ、またはSM38の保存された変異体のエピトープ、またはSM38のペプチド断片を特異的に認識する抗体も包含する。これらの抗体には、それだけには限定されないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAbs)、ヒト化またはキメラ抗体、一本一本鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fab発現ライブラリーにより生成されたフラグメント、抗イディオタイプ(抗Id)抗体、および上記のいずれかのエピトープ結合性フラグメントが含まれる。

【0038】

本発明の抗体を、SM38遺伝子産物の発現および/または活性に対する試験化合物の効果を評価するために、例えば、下記に記載するような化合物スクリーニングスキームと組み合わせる用いることができる。

【0039】

抗体を生成するために、様々な宿主動物に、SM38タンパク質またはSM38ペプチドを注射することにより免疫化してもよい。このような宿主動物には、それだけには限定されないが、少数を挙げると、ウサギ、マウス、およびラットが含まれ得る。免疫学的応答を増大するために、宿主の種に応じて、それだけには限定されないが、フロイント(完全および不完全)アジュバント、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの界面活性物質、プルロニック多価アルコール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびにBCG(カルメットゲラン桿菌)およびコリネバクテリウム・パルブム(*corynebacterium parvum*)など潜在的に有用なヒトのアジュバントを含む様々なアジュバントを使用してもよい。

【0040】

抗体分子の不均一な集団を含むポリクローナル抗体は、免疫化した動物の血清由来であってもよい。モノクローナル抗体は、培養している連続細胞系により抗体分子の生成をもたらすあらゆる技術により得ることができる。これらには、それだけには限定されないが、KohlerおよびMilsteinのハイブリドーマ技術(1975年、Nature、256巻、495~497頁、および米国特許第4,376,110号)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosborら、1983年、Immunology Today、4巻、72頁;Coleら、1983年、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、80巻、2026~2030頁)、ならびにEBV-ハイブリドーマ技術(Coleら、1985年、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Alan R.Liss, Inc.、77~96頁)が含まれる。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDおよびこれらの任意のサブクラスを含む免疫グロブリンの任意のクラスのものであることができる。本発明のmAbを生成するハイブリドーマを、in vitroまたはin vivoで培養してもよい。in vivoにおける高力価のMabの生成により、これが現在好ましい生成方法となっている。

【0041】

さらに、好適な抗原特異性のマウス抗体分子からの遺伝子を好適な生物学的活性のヒト

抗体分子からの遺伝子と一緒にスプライスすることにより、「キメラ抗体」を生成するために開発された技術を用いることができる(Morrisonら、1984年、Proc Nat'l Acad Sci、81巻、6851～6855頁;Neubergerら、1984年、Nature、312巻、604～608頁;Takedaら、1985年、Nature、314巻、452～454頁)。あるいは、ヒト化抗体(米国特許第5,585,089号)または一本鎖抗体(米国特許第4,946,778号、Bird、1988年、Science、242巻、423～426頁;Hustonら、1988年、Proc Nat'l Acad Sci USA、85巻、5879～5883頁;およびWardら、1989年、Nature、334巻、544～546頁)を生成するために開発された技術を用いて、SM38の1つまたは複数のエピトープを特異的に認識する抗体を生成することができる。

【0042】

5.2 CD38/SM38の活性をモジュレートするのに有用な化合物に対するスクリーニングアッセイ

本発明は、CD38/SM38酵素活性、cADPRが媒介するシグナル伝達、もしくはCD38/SM38遺伝子発現をモジュレートする化合物または組成物、または細胞膜からSM38を切断する化合物もしくは組成物を同定するために設計されたスクリーニングアッセイ系に関し、したがって、本発明は、細胞の遊走のモジュレーションまたは感染の治療に有用であり得る。本明細書で用いられる「CD38/SM38」は、CD38および/またはSM38を特定する。

【0043】

5.2.1 CD38の組換え発現

CD38/SM38活性をモジュレートする化合物または組成物を同定するために設計されたスクリーニングアッセイを開発する目的では、CD38/SM38タンパク質を組換え法で発現することが必要であり得る。CD38のcDNA配列および推定アミノ酸配列は、本明細書に参照として組み入れられる、Jackson, D.G. ら、1990年、J. Immunol.、151巻、3111～3118頁;Koguma, T. ら、1994年、Biochem Biophys Acta、1224巻、160～162頁、およびHarada Nら、1993年、J Immunol、151巻、3111～3118頁に記載されているように、ヒト、海生動物、およびラットを含むいくつかの種から特徴付けられている。さらに、SM38 cDNA配列および推定アミノ酸配列を利用して、本明細書に記載するように、マンスン住血吸虫が発現するCD38ホモログであるSM38タンパク質を組換え法で発現させることができる。

【0044】

CD38/SM38ヌクレオチド配列を、当業者には周知の様々な異なる方法を用いて単離することができる。例えば、CD38/SM38を発現することが知られている組織からのRNAを用いて構築されたcDNAライブラリーを、標識されたCD38/SM38プローブを用いてスクリーニングすることができる。あるいは、ゲノムライブラリーをスクリーニングして、CD38/SM38タンパク質をコードする核酸分子を引き出すことができる。さらに、CD38/SM38核酸配列を、既知のCD38/SM38ヌクレオチド配列をもとに設計された2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことにより引き出すことができる。反応のためのテンプレートは、CD38/SM38を発現することが知られている細胞系または組織から調製されたmRNAの逆転写により得られたcDNAであってよい。

【0045】

CD38/SM38、および/またはCD38/SM38融合タンパク質の、CD38/SM38タンパク質、ポリペプチド、およびペプチド断片、突然変異形態、末端切断形態、もしくは欠失形態を、それだけには限定されないが、抗体の産生、CD38が媒介する細胞の遊走の制御に参与する他の細胞の遺伝子産物の同定、および細胞の遊走をモジュレートするのに用いることができる化合物に対するスクリーニングを含めて、様々な使用するために調製することができる。CD38/SM38融合タンパク質には、マーカー機能を提供する、酵素、蛍光タンパク質、ポリペプチドタグ、または発光タンパク質への融合物が含まれる。

【0046】

CD38/SM38ポリペプチドおよびペプチドは化学的に合成できるが(例えば、Creighton、1983年、Proteins: Structures and Molecular Principles、W.H.Freeman & Co.、ニューヨークを参照されたい)、一方、CD38/SM38に由来する大型のポリペプチド、および完全長CD38/SM38それ自体を、CD38/SM38遺伝子配列および/またはコード配列を含む核酸を発現

10

20

30

40

50

するための当技術分野ではよく知られている技術を用いて、組換えDNA技術により生成すると有利であり得る。このような方法を用いて、CD38/SM38ヌクレオチド配列、ならびに好適な転写および翻訳調節シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、例えば、*in vitro*の組換えDNA技術、合成技術、および*in vivo*の遺伝的組換えが含まれる。(例えば、Sambrookら、1989年、上述、およびAusubelら、1989年、上述に記載された技術を参照されたい)。

【0047】

様々な宿主-発現ベクター系を利用してCD38/SM38ヌクレオチド配列を発現することができる。CD38/SM38ペプチドまたはポリペプチドが可溶性のタンパク質または誘導体(例えば、細胞内または細胞外ドメインに対応するペプチド)として発現され、分泌されない場合、ペプチドまたはポリペプチドを宿主細胞から回収することができる。あるいは、CD38ペプチドまたはポリペプチドが分泌される場合、ペプチドまたはポリペプチドを培地から回収することができる。しかし、発現系は、細胞膜に固定された、CD38/SM38または機能的同等物を発現する操作された宿主細胞も含む。このような発現系からのCD38/SM38の精製または濃縮は、好適な界面活性剤および脂質ミセル、ならびに当業者にはよく知られている方法を用いて遂行することができる。このような操作された宿主細胞自体を、CD38/SM38の構造上および機能上の特徴を保持するのが重要であるだけでなく生物学的活性を評価するのが重要である場合に、すなわち薬物スクリーニングアッセイにおいて用いることができる。

【0048】

本発明の目的で用いることができる発現系には、それだけには限定されないが、CD38/SM38ヌクレオチド配列を含む、組換えバクテリオファージ、プラスミド、もしくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌などの微生物、CD38/SM38ヌクレオチド配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母、あるいは、哺乳類、蠕虫、もしくは昆虫細胞のゲノムに由来するか、または哺乳類もしくは昆虫のウィルスに由来するプロモーターを含む組換え発現構築物を内部に保持する、哺乳動物、蠕虫、もしくは昆虫の細胞系などの微生物が含まれる。

【0049】

CD38/SM38タンパク質の正確な修飾、プロセッシング、および細胞内局在が確実に起こるために、好適な発現系を選択することができる。この目的では、CD38/SM38タンパク質を適切に修飾し処理加工する能力を有する真核生物の宿主細胞が好ましい。スクリーニング目的で細胞系を開発するのが望まれるものなどの、組換えCD38/SM38タンパク質を、長期に高収率で生成するためには、安定した発現が好ましい。複製開始点を含む発現ベクターを用いる代わりに、宿主細胞を、好適な発現調節エレメントおよび選択可能なマーカー遺伝子、すなわち、少数を挙げればtk、hgp^rt、dhfr、neo、およびhygro遺伝子によりコントロールされたDNAで形質転換することができる。外来のDNAを導入した後、操作された細胞を、強化された培地で1~2日間増殖させ、次いで選択培地に切り替えてもよい。このような操作された細胞系は、CD38/SM38遺伝子産物の内在性の活性をモジュレートする化合物のスクリーニングおよび評価に特に有用であり得る。

【0050】

5.2.2 非細胞ベースのアッセイ

本発明に従って、非細胞ベースのアッセイ系を用いて、CD38/SM38と相互作用し、すなわちCD38/SM38に結合し、CD38/SM38の酵素活性を制御する化合物を同定することができる。このような化合物は、CD38酵素活性のアンタゴニストまたはアゴニストとして働くことができ、それだけには限定されないが、造血系由来細胞を含む細胞の遊走を制御するのに用いることができる。さらに、このような化合物を用いて、SM38または構造的に関連するホモログを発現する病原性微生物の増殖、筋収縮、分化、成熟、および生殖を制御することができる。様々な機能的ドメインに対応するペプチドまたはCD38/SM38融合タンパク質を含む、組換えCD38/SM38を発現させ、CD38/SM38と相互作用する化合物を同定するためのアッセイで用いることができる。

【0051】

この目的では、可溶性のCD38/SM38を組換えで発現させ、非細胞ベースのアッセイで利用してCD38/SM38に結合する化合物を同定することができる。組換え法で発現されたCD38/SM38ポリペプチド、またはCD38/SM38の機能的なドメインを1つまたは複数含む融合タンパク質を、上記に記載したように調製することができ、非細胞ベースのスクリーニングアッセイで用いることができる。例えば、全長のCD38/SM38、または可溶性の末端切断型CD38/SM38、例えば、その中でも1つまたは複数の細胞質および膜貫通のドメインが分子から欠失しているもの；細胞外ドメインに対応するペプチド、アッセイ系で利点をもたらす(例えば、標識、得られた複合体の単離など)タンパク質またはポリペプチドに融合しているCD38/SM38細胞外ドメインを含む融合タンパク質を利用することができる。細胞質のドメインと相互作用する化合物を同定しようとする場合、CD38の細胞質のドメインに対応するペプチド、およびCD38の細胞質のドメインを含む融合タンパク質を用いることができる。

【0052】

CD38/SM38タンパク質は、また、細胞膜から、または細胞の細胞質から、完全にまたは部分的に単離されたものであってもよく、あるいは粗製のまたは半ば精製の抽出物の一部として存在してもよい。非限定的な例として、CD38タンパク質は、細胞膜の調製物に存在することがあり、SM38タンパク質は、住血吸虫の外膜の外皮の調製物に存在することがある。本発明の特定の実施形態では、そのような細胞膜を、当業者には周知の方法を用いて調製することができる。さらに、SM38タンパク質が切断される場合には、タンパク質を、培養した細胞の上清から単離することができる。

【0053】

CD38/SM38に結合する化合物を同定するのに用いられるアッセイの原理は、CD38/SM38と試験化合物との反応混合物を、2つの成分を相互作用させ結合させるのに十分な条件および時間のもとで調製し、こうして反応混合物において、除去し、かつ/または検出することができる複合体を形成することを含む。次いで、結合した試験化合物の正体を決定する。本発明のさらなる一実施形態では、アッセイは、試験化合物が、それだけには限定されないが、造血系由来細胞を含む、細胞の遊走を制御する能力、およびSM38または構造的に関連するホモログを発現する病原性微生物の増殖、筋収縮、分化、成熟、および生殖を制御する能力を試験することをさらに含み得る。

【0054】

スクリーニングアッセイは、様々な一般的に知られている方法のあらゆるものにより遂行される。例えば、このようなアッセイを行うための一方法は、CD38/SM38タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、融合タンパク質、または試験物質を固相上に固定し、反応終了時に固相上に固定したCD38/試験化合物またはSM38/試験化合物複合体を検出することを含む。このような方法の実施形態では、CD38/SM38反応物を固体表面上に固定し、固定されていない試験化合物を直接的にまたは間接的に標識することができる。

【0055】

実際に、一続きの反応を用いて、ハイスループットのスクリーニングを行うことができる。固相としてマイクロタイタープレートを利用すると便利であり得る。固定した成分を非共有結合性の、または共有結合性の付着により固定化する。予め表面を調製し、貯蔵してもよい。アッセイを行うために、固定された成分を含むコーティングされた表面に、固定化していない成分を加える。反応が完了したら、形成されたあらゆる複合体が固体表面上に固定化されたままである条件下で、未反応の成分を除去する(例えば、洗浄により)。固体表面上に固定された複合体の検出を、数々の方法で遂行することができる。予め固定化されていない成分が予め標識されている場合は、表面上に固定化された標識が検出されることは、複合体が形成したことを示している。予め固定化されていない成分が予め標識されていない場合は、例えば、予め固定化されなかった成分に特異的な標識された抗体を用いて、固体表面上に固定された複合体を検出するために間接的な標識を用いることができる。

【0056】

あるいは、反応を、液相で、CD38/SM38タンパク質に特異的な固定化した抗体を用いて未反応の化合物から分離された反応生成物で、融合タンパク質または試験化合物で、および固定された複合体を検出するための可能な複合体の他の構成成分に特異的な標識された抗体を用いて検出された複合体で行う。

【0057】

本発明に従って、非細胞ベースのアッセイをやはり用いて、CD38/SM38に関連する酵素活性を直接阻害し、または活性化する化合物に対してスクリーニングすることができる。このような活性には、それだけには限定されないが、ADP-リボシルシクラーゼ活性、グリコシド交換活性、およびNAD⁺グリコヒドロラーゼ活性が含まれる。この目的では、CD38/SM38と試験化合物との反応混合物を基質の存在下で調製し、CD38/SM38の酵素活性を試験化合物の非存在下で観察される活性と比較する。CD38/SM38酵素活性を検出するためのアッセイで用いることができる基質には、それだけには限定されないが、NAD⁺、およびNADP、ならびにこれらの標識された形態が含まれる。さらに、ニコチンアミドグアニンジヌクレオチド(NGD)およびニコチンアミド1,N⁶-エテノ-アデニンジヌクレオチド(1,N⁶-エテノ-NA D)などのNADの誘導体を用いることができる。

【0058】

本発明の非限定的な実施形態では、CD38/SM38、試験化合物、および基質の反応混合物を調製し、CD38/SM38の活性を、試験化合物の非存在下で観察される活性と比較し、この場合、試験化合物の存在下でのCD38/SM38酵素活性のレベルの低下は、CD38/SM38アンタゴニストが同定されたことを示している。あるいは、CD38/SM38、試験化合物、および基質の反応混合物を調製し、CD38/SM38の活性を、試験化合物の非存在下で観察された活性と比較し、この場合、試験化合物の存在下におけるCD38/SM38酵素活性のレベルの増大は、CD38/SM38アゴニストが同定されたことを示している。

【0059】

CD38/SM38の酵素活性を、様々な異なる方法で検出することができる。例えば、サイクリックアデノシン二リン酸リボース(cADPR)、アデノシン二リン酸リボース(ADPR)、および/またはニコチン酸アデニンジヌクレオチドリノ酸(NAADP)のレベルを、NADまたはNADPまたはNAなどの放射標識した基質の使用と組み合わせて、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)または薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いて(Aarhus Rら、1995年、J.Biochem.Chem., 270巻、30327~30333頁;Muller-Steffner HM、J.Biol.Chem., 271巻、23967~23972頁;およびLund FEら、1999年、J.Immunology、162巻、2693~2702頁;Higashida,H.ら、1997年、J.Biol.Chem., 272巻、3127~3177頁)、測定することができる。さらにラジオイムノアッセイ(Takahashi Kら、1995年、FEBS Lett、371巻、204~208頁;Vu CQら、1997年、Biochem Biophys Res Commun、236巻、723~726頁;Vuら、Adv Exp Med Biol、419巻、381~388頁;およびGraeff RMら、1997年、Methods Enzymol、280巻、230~241頁)、バイオアッセイ(Aarhus Rら、1995年、J.Biol Chem., 270巻、30327~30333頁;Clapper DLら、J.Biol.Chem., 262巻、9561~9568頁;およびLeeら、J.Biol.Chem., 264巻、1608~1615頁)、および/または蛍光アッセイ(Graeff RMら、1996年、Biochem., 35巻、379~386頁;Graeffら、1994年、J.Biol.Chem., 269巻、30260~30267頁;およびGadangi Pら、1996年、J.Immunol., 156巻、1937~1941頁)を、cADPR、ADPR、またはNAADPレベルを測定するために用いることができる。

【0060】

本発明のさらに別の実施形態では、NGD(ニコチンアミドグアニンジヌクレオチド)、およびニコチンアミド1,N⁶-エテノ-アデニンジヌクレオチド(1,N⁶エテノ-NAD)などのNADの誘導体を用いて、CD38/SM38酵素活性を測定することができる。1,N⁶エテノ-NADをCD38/SM38により加水分解する場合は、得られた生成物の一方は蛍光を発する(Mullerら、1983年、Biochem.J., 212巻、459~464頁;およびCockayne Dら、1998年、Blood、92巻、1324~1333頁)。類似体のNGDが、CD38/SM38のADP-リボシル活性により環化される場合、生成物は蛍光光度計により検出することができる蛍光化合物を形成する(Graeffら、1996年、Biochem、35巻、379~386頁;およびGraeffら、1994年、J.Biol.Chem., 269巻、30260~30267頁

).

【0061】

本発明の特定の非限定的な一実施形態では、(i)CD38/SM38タンパク質を試験化合物と基質の存在下で接触させ、CD38/SM38NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性のレベルを測定するステップ、(ii)別個の実験において、パート(i)と本質的に同じ条件で、CD38/SM38タンパク質を、基質の存在下で対照ビヒクルと接触させ、CD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性のレベルを測定するステップ、および、次いで、(iii)パート(i)で測定したCD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性のレベルを、パート(ii)におけるCD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性のレベルと比較するステップ、を含み、ここで、試験化合物の存在下におけるCD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性のレベルにおける相違が、試験化合物がCD38/SM38モジュレーターであることを示す、CD38/SM38活性をモジュレートする、すなわち阻害または活性化する化合物を、同定するための方法を提供する。

10

【0062】

本発明の実施形態では、CD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性の活性化または抑制を、基質として1,N⁶-エテノ-NADを用いて測定することができる。1,N⁶-エテノ-NADがCD38/SM38によって加水分解される場合、得られる生成物の1つは蛍光を発する(Mullerら、1983年、Biochem.J.、212巻、459~464頁;およびCockayne Dら、1998年、Blood、92巻、1324~1333頁)。したがって、スクリーニングアッセイのステップ(i)および(ii)が完了した後に、蛍光性の1,N⁶-エテノ-ADPRのレベルを測定して、CD38/SM38活性のレベルを決定する。

20

【0063】

本発明のさらに別の実施形態では、[¹⁴C-アデノシン]-NAD、[³H-アデノシン]-NAD、および[³²P-アデノシン]-NADなどの放射標識した基質を用いて、放射標識したADPRのレベルを測定することができる。したがって、スクリーニングアッセイのステップ(i)および(ii)が完了した後に、放射活性のレベルを測定して、CD38/SM38活性のレベルを決定する。

【0064】

本発明の実施形態では、それだけには限定されないがマイクロタイタープレートを含む一続きの固相反応を用いて、このようなアッセイを行うことができる。マイクロタイタープレート、抗ADPRコーティングしたプレートに結合している1,N⁶-エテノ-ADPRのレベルを検出するための、市販の抗ADPR特異的抗体でコーティングすることができる。次いで、1,N⁶-エテノ-ADPRのレベルを、発光410nm(励起300nm)に設定した蛍光プレートリーダーを用いて検出することができる。あるいは、放射標識した基質を用いた場合は、市販の抗ADPR特異的抗体でコーティングしたマイクロタイタープレートを用いて、抗ADPRコーティングしたプレートに結合している放射標識したADPRのレベルを検出することができる。CD38/SM38のNAD⁺グリコヒドロラーゼ活性を阻害する試験化合物の存在下では、抗ADPR抗体でコーティングしたプレートに結合した1,N⁶-エテノ-ADPRまたは放射標識したADPRの量は低減し、その結果、より低値の相対蛍光または放射活性がもたらされる。

30

【0065】

本発明のさらに別の実施形態では、マイクロタイタープレートを「アクセプター」タンパク質で最初にコーティングしてもよい。本明細書で用いられる「アクセプター」タンパク質は、システイン残基に結合するタンパク質である。このようなアクセプタータンパク質には、それだけには限定されないが、ウシのリゾチームなどのリゾチームが含まれる。スクリーニングアッセイのステップ(i)およびステップ(ii)が完了した後に、マイクロタイタープレートを洗浄して、過剰の基質および試験化合物を除去する。次いで、アクセプタータンパク質でコーティングしたプレートに結合している1,N⁶-エテノ-ADPRのレベルを、発光410nm(励起300nm)に設定した蛍光プレートリーダーを用いて検出する。あるいは、アクセプタータンパク質でコーティングしたプレートに結合している放射標識したADPRのレベルを検出する。CD38/SM38のNAD⁺グリコヒドロラーゼ活性を阻害する試験化合物の存在下では、アクセプターでコーティングしたプレートに結合した1,N⁶-エテノ-ADPRまたは放射標識したADPの量は低減し、その結果、より低値の相対蛍光または放射活性がもたら

40

50

される。

【0066】

さらに、CD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性をマルチウェルプレートで測定することができ、この場合、スクリーニングアッセイのステップ(i)および(ii)が完了した後に、CD38/SM38タンパク質に結合している1,N⁶-エテノ-ADPRまたは放射標識したADPRのレベルを検出することができる。本発明の実施形態では、マイクロタイタープレートの表面を、抗CD38/SM抗体でコーティングし、それによってCD38/SM38を固定化してもよく、ステップ(i)およびステップ(ii)が完了した後に、プレートのウェルを洗浄し、固定化したCD38/SM38に結合している1,N⁶-エテノ-ADPRまたは放射標識したADPRのレベルを測定する。CD38/SM38のNAD⁺グリコヒドロラーゼ活性を阻害する試験化合物の存在下では、CD38/SM38に結合した1,N⁶-エテノ-ADPRまたは放射標識ADPRのレベルは低下し、その結果、より低値の相対蛍光または放射活性がもたらされる。

10

【0067】

本発明は、(i)CD38タンパク質を、NAD⁺基質の存在下で試験化合物と接触させ、ADPRの形成を測定するステップ、(ii)対照として、パート(i)と本質的に同じ条件で、CD38タンパク質を、NAD⁺基質の存在下で対照ビヒクルと接触させ、ADPRの形成を測定するステップ、および(iii)パート(i)で測定したADPRのレベルを、パート(ii)で測定したADPRのレベルと比較するステップを含み、ここで、試験化合物の存在下で測定したADPRのレベルにおける相違が、試験化合物がCD38モジュレーターであることを示す、CD38活性をモジュレートする化合物を同定するための方法をさらに提供する。

20

【0068】

本発明の実施形態では、このようなアッセイを、それだけには限定されないがマイクロタイタープレートを含む、一続きの固相反応を用いて行うことができる。マイクロタイタープレートを、市販の抗ADPR特異的抗体でコーティングして、抗ADPRコーティングしたプレートに結合しているADPRのレベルを検出することができる。本発明の特定の実施形態では、抗体を蛍光標識する。

【0069】

あるいは、マイクロタイタープレートを、少なくとも1つのシステイン残基を含む、リゾチームなどのアクセプタータンパク質でコーティングしてもよく、アクセプタータンパク質に結合しているcADPRのレベルを測定する。

30

【0070】

本発明の実施形態では、ステップ(i)およびステップ(ii)が完了した後に、細胞をマイクロタイタープレートの底部へと遠心分離し、遠心分離された細胞に結合しているcADPRのレベルを測定する。さらに、マイクロタイタープレートを抗CD38/SM抗体でコーティングしてもよく、それによってCD38/SM38を固定化し、ステップ(i)およびステップ(ii)が完了した後にプレートのウェルを洗浄し、固定化したCD38/SM38に結合しているcADPRのレベルを測定する。

【0071】

本発明は、(i)CD38/SM38タンパク質を、NAD⁺基質の存在下で試験化合物と接触させ、ADPRの形成を測定するステップ、(ii)対照として、パート(i)と本質的に同じ条件で、CD38/SM38タンパク質を、NAD⁺基質の存在下で対照ビヒクルと接触させ、ADPRの形成を測定するステップ、および(iii)パート(i)で測定したADPRのレベルを、パート(ii)で測定したADPRのレベルと比較するステップを含み、この場合、試験化合物の存在下で測定したADPRのレベルにおける相違は、試験化合物がCD38/SM38モジュレーターであることを示す、CD38/SM38活性をモジュレートする化合物を同定するための方法をさらに提供する。

40

【0072】

本発明の実施形態では、このようなアッセイを、それだけには限定されないがマイクロタイタープレートを含む、一続きの固相反応を用いて行うことができる。マイクロタイタープレートを市販の抗ADPR特異的抗体でコーティングして、抗ADPRコーティングしたプレートに結合しているADPRのレベルを検出することができる。本発明の特定の実施形態では

50

、抗体を蛍光標識する。

【0073】

あるいは、マイクロタイタープレートを、少なくとも1つのシステイン残基を含む、リゾチームなどのアクセプタータンパク質でコーティングしてもよく、アクセプタータンパク質に結合しているcADPRのレベルを測定する。

【0074】

さらに、マイクロタイタープレートを抗CD38/SM38抗体でコーティングし、それによってCD38/SM38を固定化してもよく、ステップ(i)およびステップ(ii)が完了した後に、プレートのウェルを洗浄し、固定化したCD38/SM38に結合しているcADPRのレベルを測定する。

【0075】

本発明の別の実施形態では、コンピュータのモデリングおよび検索技術により、CD38/SM38酵素活性の潜在的なモジュレーターの同定が可能になる。例えば、アメフラシ属(*Aplysia*)のシクラーゼ活性部位の知見(Munshi C.ら、1999年、*J.Biol.Chem.*274巻、30770~30777頁)、およびCD38活性部位の知見(Lund FEら、1999年、*J.Immunology*、162巻、2693~2702頁;Munshi,Cら、2000年、*J.Biol.Chem.*、275巻、21566~21571頁;Graeffら、2001年、*J.Biol.Chem.*、276巻、12169~12173頁)、およびCD38/SM38基質と基質類似体との間の複合体の研究に基づき、CD38/SM38活性の潜在的なモジュレーターを同定することができる。

【0076】

活性部位の3次元の幾何学的構造を、完全な分子構造を決定することができるエックス線結晶学を含む公知の方法を用いて決定してもよい(例えば、アメフラシ属のADPリボシルシクラーゼの結晶構造を記載した、Prasad GSら、*Nature Struc.Biol.*、3巻、957~964頁を参照されたい)。一方、固相または液相のNMRを用いて、所定の分子内距離を決定することができる。任意の他の実験的な構造決定法を用いて、CD38/SM38活性部位の部分的または完全な幾何学的構造を得ることができる。

【0077】

CD38/SM38活性部位の構造を決定したら、候補のモジュレート性化合物の分子構造に関する情報と一緒に、化合物を含むデータベースを検索することにより、候補のモジュレート性化合物を同定することができる。このような検索は、決定された活性部位の構造に適合する構造、および活性部位を規定する基と相互作用する構造を有する化合物を探索するものである。このような検索はマニュアル操作でもよいが、コンピュータで支援されているのが好ましい。この検索から見出されたこれらの化合物は、潜在的なCD38/SM38モジュレート性化合物である。

【0078】

あるいは、これらの方法を用いて、すでに知られているモジュレート性化合物から改良されたモジュレート性化合物を同定することができる。例えば、基質としてNADI/NADPを利用する他の酵素の酵素活性をモジュレートする数々の化合物(すなわち、PARPファミリーのホモログ)が、すでに同定されている。既知の化合物の組成物を修飾することができる、新規の組成物に適用された実験上の、およびコンピュータでのモデリング方法を用いて、修飾の構造上の効果を決定することができる。次いで、変更された構造を、化合物の活性部位の構造と比較して、適合または相互作用の改善が生じているか否かを決定することができる。このやり方では、例えば側鎖を変化させることによる、組成物における系統的な変異を迅速に評価して、修飾されたモジュレート性化合物、または特異性もしくは活性の改善した基質を得ることができる。

【0079】

5.2.3 細胞ベースのアッセイ

本発明に従って、細胞ベースのアッセイ系を用いて、CD38/SM38の活性をモジュレートする化合物をスクリーニングすることができる。本発明に従って、細胞ベースのアッセイ系を用いて、CD38/SM38の活性をモジュレートし、それによって、化学誘引物質が誘導するCa²⁺の流入および細胞遊走をモジュレートする化合物を、スクリーニングすることができる。さらに、細胞ベースのシステムを用いて、CD38/SM38の活性をモジュレートし、そ

れによって細胞内カルシウム放出および/または細胞における収縮性をモジュレートする化合物に対してスクリーニングすることができる。この目的では、CD38/SM38を内在性に発現する細胞を用いて、化合物をスクリーニングすることができる。これらの細胞には、例えば、好中球、リンパ球、好酸球、マクロファージ、および樹状細胞が含まれる。さらに、SM38を発現するマンスン住血吸虫の細胞を用いて、化合物をスクリーニングすることができる。収縮性をモジュレートする化合物をアッセイする場合は、解離した筋線維、および張力繊維を発現する線維芽細胞を利用することができる。あるいは、例えば、293細胞、COS細胞、CHO細胞、線維芽細胞など、CD38/SM38を発現するように遺伝子操作された細胞系を、スクリーニングの目的で用いることができる。機能的なCD38タンパク質を発現するように遺伝子操作された宿主細胞を利用するスクリーニングには、化学誘引物質または炎症刺激に応答することができる宿主細胞を用いることが好ましい。SM38を発現するように遺伝子操作された宿主細胞を利用するスクリーニングには、筋収縮を誘導するためにアセチルコリンまたは高濃度のK⁺などの様々な刺激に応答することができるマンスン住血吸虫起源の細胞を用いることが好ましい。さらに、CD38/SM38タンパク質を発現するように操作された卵母細胞またはリボソームを、CD38/SM38活性のモジュレーターを同定するために開発されたアッセイで用いることができる。

【0080】

本発明は、それだけには限定されないが、NADグリコヒドロラーゼ活性、ADP-リボシルシクラーゼ活性、および/またはグリコシド交換(塩基交換)活性を含む、CD38/SM38の酵素活性の1つまたは複数を変える化合物を同定するための方法を提供する。特に、CD38/SM38酵素活性を促進する化合物、すなわちアゴニスト、またはCD38/SM38酵素活性を阻害する化合物、すなわちアンタゴニストを同定することができる。CD38/SM38酵素活性を阻害する化合物は、化学誘引物質が誘導するカルシウム応答および細胞の遊走に対して阻害性である(図2)。CD38酵素活性を活性化する化合物は、化学誘引物質が誘導するカルシウム応答および細胞の遊走を増強する。SM38酵素活性を活性化または阻害する化合物は、SM38を発現する病原性生物の生存性または機能上の活性を変える。このような化合物は、CD38/SM38の活性部位と相互作用し、それによって酵素活性をモジュレートする化合物、または基質のCD38/SM38への結合を競合/促進し、もしくは基質の触媒作用を競合/阻害する化合物であることができる(図2)。あるいは、CD38/SM38タンパク質を修飾するタンパク質の活性をモジュレートし、すなわちリン酸化、リボシル化などして、それによって、CD38/SM38の活性を制御する化合物を同定することができる(図3)。このようなタンパク質には、例えば、CD38/SM38をリボシル化し、CD38/SM38を酵素的に不活性にする、ADP-リボシルトランスフェラーゼが含まれる。さらに、CD38/SM38発現を制御し、それによって細胞内の酵素活性のレベルを制御する化合物を同定することができる(図4)。

【0081】

本発明は、(i)CD38/SM38を発現する細胞、および化学誘引物質受容体を、基質の存在下で試験化合物と接触させ、CD38/SM38活性のレベルを測定するステップ、(ii)別個の実験で、パート(i)と本質的に同じ条件で、CD38/SM38タンパク質を発現する細胞、および化学誘引物質受容体を、基質の存在下で対照ビヒクルと接触させ、CD38/SM38活性のレベルを測定するステップ、および、次いで、(iii)パート(i)で測定したCD38/SM38活性のレベルを、パート(ii)におけるCD38/SM38活性のレベルと比較するステップ、を含み、ここで、試験化合物の存在下における、CD38/SM38活性のレベルの増大は、試験化合物がCD38/SM38活性化物質であることを示す、CD38/SM38酵素活性を活性化する化合物を同定するための方法を提供する。

【0082】

本発明は、(i)CD38/SM38を発現する細胞、および化学誘引物質受容体を、化学誘引物質および基質の存在下で試験化合物と接触させ、CD38/SM38活性のレベルを測定するステップ、(ii)別個の実験で、パート(i)と本質的に同じ条件で、CD38/SM38を発現する細胞、および化学誘引物質受容体を、化学誘引物質および基質と接触させ、CD38/SM38活性のレベルを測定するステップ、および、次いで、(iii)パート(i)で測定したCD38/SM38活性のレ

ベルを、パート(ii)におけるCD38/SM38活性のレベルと比較するステップを含み、ここで、試験化合物の存在下におけるCD38/SM38活性のレベルの低下は、試験化合物がCD38/SM38阻害剤であることを示す、CD38/SM38酵素活性を阻害する化合物を同定するための方法も提供する。

【0083】

CD38/SM38活性を検出するために用いるアッセイに応じて、上記に記載したCD38/SM38の活性化物質および阻害剤を同定するための方法には、ステップ(i)および(ii)における化学誘引物質の存在または非存在が含まれ得る。例えば、CD38/SM38のADP-リボシルシクラーゼ活性またはNADグリコヒドロラーゼ活性に対して直接アッセイする場合は、試験細胞上の化学誘引物質の存在または化学誘引物質受容体の発現は、必要とされないことがある。しかし、例えば、走化性または細胞内カルシウムレベルにおける変化が、CD38/SM38発現性細胞で測定される場合は、化学誘引物質を含むことが必要であり得る。あるいは、収縮性または細胞内カルシウムレベルの変化がSM38発現性細胞で測定される場合は、それだけには限定されないが、アセチルコリン、セロトニン(Dayら、1994年、Paristol.、108巻、425~432頁)、FMRF-アミド関連ペプチド(FaRP)(Dayら、1994年、Paristol.、109巻、455~459頁)、または培地における高K⁺濃度(Dayら、1993年、Paristol.、106巻、471~477頁)を含む、収縮および/またはカルシウム放出を活性化する刺激物質を含む必要があり得る。さらに、これらの実験を、利用される刺激物質に特異的な受容体を発現する宿主細胞で行うことが必要である。当業者であれば、日常的な実験を用いることにより、有効かつ最適なアッセイ条件を決定することができるであろう。

【0084】

本明細書で規定する「化学誘引物質」は、CD38によるcADPRの生成に依存するメカニズムにより、細胞の遊走を引き起こす化合物または分子複合体である。このような化学誘引物質の例には、それだけには限定されないが、fMet-leu-Phe(fMLP)が含まれる。用いることができる他の化学誘引物質には、エオタキシン、GRO-1、IP-10、SDF-1、BLC、Rantes、MIP-1A、MCP-3、MIP3a、IL-8、SLC、ELC、リンフォタクチン、PAF、Ltb4、補体c5a、MCP-1、アミロイドβペプチド、およびヒスタミンが含まれる。

【0085】

本明細書で規定する「刺激物質」は、例えば、SM38の活性に依存するメカニズムにより収縮を誘導する化合物または分子複合体である。このような刺激物質には、例えば、高K⁺濃度、アセチルコリン、およびエンドセリンが含まれる。

【0086】

上記に記載した細胞系を利用する上で、そのような細胞系、CD38/SM38タンパク質を発現する細胞を試験化合物または対照ビヒクル(例えば、プラセボ)に曝露する。曝露後、細胞をアッセイしてCD38/SM38の活性を測定することができ、またはCD38依存性シグナル伝達経路自体の活性をアッセイすることができる。

【0087】

試験分子が、CD38/SM38の活性をモジュレートする能力を、標準の生化学的および生理学的技術を用いて測定することができる。CD38/SM38 ADP-リボシルシクラーゼ活性の活性化または抑制、あるいはcADPRおよび/またはNAADPなどのCD38/SM38代謝物の生成などの応答を測定することができる。cADPR、ADPR、および/またはNAADPのレベルを、放射標識したNADまたはNADPまたはNAなどの基質の使用と組み合わせて、HPLCまたはTLCを用いて測定することができる。さらに、上述のセクション5.1.1で論じたものなどの、ラジオイムノアッセイ、バイオアッセイ、および/または蛍光アッセイを、cADPRまたはNAADPレベルを測定するために用いることができる。本発明のさらに別の実施形態では、NGD(ニコチンアミドグアニンジヌクレオチド)およびニコチンアミド1,N⁶-エテノ-アデニンジヌクレオチド(1,N⁶エテノ-NAD)などのNAD誘導体を用いて、CD38/SM38活性を測定することができる。

【0088】

実際には、一続きの反応を用いて、ハイスループットのスクリーニングを行うことができる。そのような一続きは、少なくとも1つの固相からなることがある。固相としてマイ

クロタイタープレートを利用すると便利であり得る。固定した成分を、非共有結合性の、または共有結合性の付着により固定化する。予め表面を調製し、貯蔵してもよい。アッセイを行うために、固定化していない成分を、固定した成分を含むコーティングした表面に加える。反応が完了したら、形成されたあらゆる複合体が固体表面上に固定化されたままであるような条件下で、未反応の成分を除去する(例えば、洗浄により)。固体表面上に固定された複合体の検出を、数々の方法で遂行することができる。予め固定化されていない成分が予め標識されている場合は、表面上に固定化した標識が検出されることは複合体が形成されたことを示している。予め固定化されていない成分が予め標識されていない場合は、例えば、予め固定化されなかった成分に特異的な標識した抗体を用いて、固体表面上に固定された複合体を検出するために間接的な標識を用いることができる。

10

【0089】

本発明は、(i)CD38/SM38を発現する細胞を試験化合物と、基質の存在下で接触させ、CD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性のレベルを測定するステップ、(ii)別個の実験において、パート(i)と本質的に同じ条件で、CD38/SM38タンパク質を発現する細胞を対照ビヒクルと、基質の存在下で接触させ、CD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性のレベルを測定するステップ、および、次いで(iii)パート(i)で測定したCD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性のレベルを、パート(ii)におけるCD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性のレベルと比較するステップを含み、ここで、試験化合物の存在下におけるCD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性のレベルにおける相違が、試験化合物がCD38/SM38モジュレーターであることを示す、CD38/SM38活性をモジュレートする、すなわち阻害または活性化する化合物を同定するための方法を提供する。

20

【0090】

本発明の特定の非限定的な一実施形態では、(i)CD38/SM38発現性の細胞を試験化合物と、基質の存在下で接触させ、CD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性のレベルを測定するステップ、(ii)別個の実験において、パート(i)と本質的に同じ条件で、CD38/SM38発現性の細胞を対照ビヒクルと、基質の存在下で接触させ、CD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性のレベルを測定するステップ、および、次いで(iii)パート(i)で測定したCD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性のレベルを、パート(ii)におけるCD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性のレベルと比較するステップを含み、この場合、試験化合物の存在下におけるCD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性のレベルにおける相違は試験化合物がCD38/SM38モジュレーターであることを示す、CD38/SM38活性をモジュレートする、すなわち阻害または活性化する化合物を同定するための方法を提供する。

30

【0091】

本発明の実施形態では、CD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性の活性化または抑制は、基質として1,N⁶-エテノ-NADを用いて測定することができる。1,N⁶-エテノ-NADがCD38/SM38によって加水分解される場合、得られる生成物の一方は蛍光を発する(Mullerら、1983年、Biochem.J.、212巻、459~464頁;およびCockayne Dら、1998年、Blood、92巻、1324~1333頁)。したがって、スクリーニングアッセイのステップ(i)および(ii)が完了した後に、蛍光性の1,N⁶-エテノ-ADPRのレベルを測定して、CD38/SM38活性のレベルを決定する。

40

【0092】

本発明のさらに別の実施形態では、[¹⁴C-アデノシン]-NAD、[³H-アデノシン]-NAD、および[³²P-アデノシン]-NADなどの放射標識した基質を用いて、放射標識したADPRの蓄積を測定することができる。したがって、スクリーニングアッセイのステップ(i)および(ii)が完了した後に、放射活性のレベルを測定して、CD38/SM38活性のレベルを決定する。

【0093】

一実施形態では、一続きの固相反応を用いて、このようなアッセイを行うことができる。本発明の実施形態では、マイクロタイタープレートを固相として利用することができる。マイクロタイタープレートを、抗ADPRコーティングしたプレートに結合している1,N⁶-エテノ-ADPRのレベルを検出するために、市販の抗ADPR特異的抗体でコーティングするこ

50

とができる。次いで、1,N⁶-エテノ-ADPRのレベルを、発光410nm(励起300nm)に設定した蛍光プレートリーダーを用いて検出することができる。CD38/SM38のNADグリコヒドロラーゼ活性を阻害する試験化合物の存在下では、抗ADPRコーティングしたプレートに結合している1,N⁶-エテノ-ADPRのレベルは低下し、より低値の相対的な蛍光値がもたらされる。あるいは、放射標識した基質を用いる場合は、マイクロタイタープレートを、抗ADPRコーティングしたプレートに結合している放射標識したADPRのレベルを検出するために、市販の抗ADPR特異的抗体でコーティングしてもよい。

【0094】

本発明のさらに別の実施形態では、マイクロタイタープレートを「アクセプター」タンパク質で最初にコーティングしてもよい。本明細書で用いられる「アクセプター」タンパク質は、システイン残基に結合するタンパク質である。このようなアクセプタータンパク質には、それだけには限定されないが、ウシのリゾチームなどのリゾチームが含まれる。スクリーニングアッセイのステップ(i)およびステップ(ii)が完了した後に、マイクロタイタープレートを洗浄して、細胞、過剰の基質および試験化合物を除去する。次いで、アクセプタータンパク質でコーティングしたプレートに結合している1,N⁶-エテノ-ADPRのレベルを、発光410nm(励起300nm)に設定した蛍光プレートリーダーを用いて検出する。あるいは、アクセプタータンパク質でコーティングしたプレートに結合している放射標識したADPRのレベルを検出する。CD38/SM38のNAD⁺グリコヒドロラーゼ活性を阻害する試験化合物の存在下では、アクセプターでコーティングしたプレートに結合している、1,N⁶-エテノ-ADPR、または放射標識したADPの量は低減し、より低値の相対的な蛍光または放射活性がもたらされる。

【0095】

さらに、CD38/SM38 NAD⁺グリコヒドロラーゼの活性をマルチウェルプレートで測定することができ、この場合、スクリーニングアッセイのステップ(i)および(ii)が完了した後に、CD38/SM38発現性細胞に結合している1,N⁶-エテノ-ADPRまたは放射標識したADPRのレベルを検出することができる。本発明の実施形態では、マイクロタイタープレートの表面を、抗CD38/SM38抗体でコーティングし、それによってCD38/SM38発現性細胞を固定化してもよく、そしてステップ(i)およびステップ(ii)が完了した後に、プレートのウェルを洗浄し、固定化したCD38/SM38発現性細胞に結合している1,N⁶-エテノ-ADPRまたは放射標識したADPRのレベルを測定する。CD38/SM38のNAD⁺グリコヒドロラーゼ活性を阻害する試験化合物の存在下では、CD38/SM38発現性細胞に結合している1,N⁶-エテノ-ADPRまたは放射標識したADPRのレベルは低減し、その結果、より低値の相対蛍光または放射活性がもたらされる。

【0096】

化学誘引物質が誘導するCD38依存性カルシウム応答および細胞遊走を阻害または活性化することができる化合物を同定するための、細胞ベースのカルシウムおよび/または遊走のアッセイを利用して、試験化合物をアッセイすることもできる。本発明の非限定的な実施形態では、細胞内Ca²⁺レベルにおける変化を、それだけには限定されないが、Indo、Fluo-3、Fluo-4、Fluo-5F、Fluo-4FF、Fluo-5N、Fura-Red、カルシウムグリーン、カルシウムオレンジ、カルシウムクリムゾン(calcium crimson)、マグネシウムグリーン、オレゴングリーン、およびRhod-2を含むカルシウム指示色素を用いることによりモニターすることができる。さらに、CD38/SM38酵素活性のモジュレートに起因する膜電位における変化を、電位固定法またはパッチ記録法を用いて測定することができる。細胞の定方向の遊走を、改変したボイデンチャンバーにおける、またはスライド上の、標準の走化性アッセイによりモニターすることもできる。このようなアッセイ系は、本明細書の実施例にさらに詳しく記載してある(実施例6を参照されたい)。筋収縮も、文献に詳しく記載されている標準のアッセイにより測定することができる(例えば、(Dayら、1994年、Parasitology、109巻、455~9頁)およびその中の参考文献)。

【0097】

試験化合物に曝露した後、または試験化合物の存在下で、細胞を、fMLPなどの化学誘引

物質、または、筋肉活性化物質もしくは筋肉収縮薬、例えば高K⁺濃度、アセチルコリン、エンドセリンなどで刺激することができ、細胞内カルシウムレベル、cADPRもしくはNAADPレベル、筋肉、収縮性、および/または細胞遊走を測定することができる。これらの測定値を、対照ビヒクルで処理した細胞と比較する。試験化合物の存在下での、細胞内Ca²⁺のレベルの増大、cADPRの生成の増大、筋収縮における増大、および/または化学誘引物質への細胞の遊走の増大は、化合物が、Ca²⁺応答の増大、筋収縮の増大、および化学誘引物質が誘導するCD38依存の細胞遊走の増大に対するアゴニストとして作用することを示している。試験化合物の存在下での、細胞内Ca²⁺のレベルの低下、cADPRの生成の低減、筋収縮の低減、および/または化学誘引物質への細胞遊走の低減は、化合物がアンタゴニストとして作用し、Ca²⁺応答を阻害し、筋収縮を低減し、および化学誘引物質が誘導するCD38依存の細胞遊走を阻害することを示している(例えば、図2および3を参照されたい)。

【0098】

さらに、本発明のアッセイを用いて、(i)CD38/SM38酵素活性の基質として機能し、cADPR依存Ca²⁺シグナル伝達経路のアゴニストまたはアンタゴニストに変換される化合物を同定することができる(図5)。これらの規格に適合する化合物を、本明細書の実施例にさらに詳しく記載する(実施例6、図11)。あるいは、本発明のアッセイを用いて(ii)cADPRが媒介するCa²⁺シグナル伝達経路を特異的に妨害する化合物を同定することができる(図6)。本発明の非限定的な実施形態では、試験化合物は、CD38/SM38の、あらゆる既知および未知の基質の化学誘導体を含むことができる(例えば、基質類似体8-Br-NADは、cADPRが媒介するCa²⁺シグナル伝達のアントゴニストとして作用する修飾された生成物8-Br-cADPRに変換される)。試験基質を、化学誘引物質または筋肉刺激物質の存在下で、CD38/SM38を発現する細胞、および好適な化学誘引物質受容体に投与することができる。修飾された試験基質の、cADPRの活性をモジュレートすることができる修飾された生成物への変換を、上記に記載した方法を利用して測定することができる。試験基質をやはりアッセイして、カルシウム流入、筋収縮、および/または細胞遊走に対するその効果を決定することができる。細胞内Ca²⁺蓄積および化学誘引物質への定方向の遊走を、試験基質および化学誘引物質で処理した細胞で測定することができ、非修飾の基質、すなわちNADおよび化学誘引物質を与えた細胞と比べることができる。修飾された生成物、すなわち8-Br-cADPRに変換され、cADPRが誘導するカルシウム応答、筋収縮、または定方向の遊走を競合的もしくは非競合的に阻害する化合物は、cADPRのCa²⁺シグナリング経路のアンタゴニストとして同定され、一方、cADPRのCa²⁺シグナリング経路の競合的または非競合的なアゴニストである修飾された生成物に変換される化合物は、アゴニストまたは活性化物質と定義される。

【0099】

本発明のさらに別の実施形態では、cADPRの活性を直接変える(すなわち、活性化または不活性化する)化合物、すなわちカルシウム放出および細胞遊走を誘導する化合物を、アッセイで試験することができる。このようなアゴニストまたはアンタゴニストは、細胞内へのCa²⁺の流入をモジュレートすると予想され、細胞の遊走活性または収縮能力における変化をもたらす。アンタゴニストは、化学誘引物質の存在下で、Ca²⁺応答を低減し、収縮を低減し、かつ/または遊走を低減する。アンタゴニストの例には、それだけには限定されないが、8-NH₂-cADPR、8-Br-cADPR、8-CH₃-cADPR、8-OCH₃-cADPR、および7-Deaza-8-Br-cADPRが含まれる。これらの規格に適合する化合物を、本明細書の実施例にさらに詳しく記載する(実施例6、図10)。アゴニストは、化学誘引物質の存在下で、Ca²⁺応答を増大し、収縮を増大し、かつ/または遊走を増大する。アゴニストの例には、それだけには限定されないが、2'-デオキシ-cADPR、3'-デオキシ-cADPR、および2'-ホスホ-cADPRが含まれる。cADPR活性を直接測定するためのアッセイには、Howardら(1995年、Science、262巻、1056頁)、Galioneら(1993年、Nature、365巻、456~459頁)、ならびにLeeおよびAarhus(1991年、Cell Regulation、2巻、203~209頁)によって記載されているものなどのバイオアッセイが含まれる。

【0100】

さらに、本発明のアッセイは、CD38/SM38酵素活性を活性化することができる化合物、

すなわちアゴニストを同定することができるが、アゴニストは細胞内カルシウム貯蔵を枯渇することによりカルシウム経路を脱感作する。このような脱感作は、ある場合には、カルシウム貯蔵の枯渇により細胞遊走または筋収縮の阻害をもたらす。このような化合物は、CD38/SM38酵素アッセイにおけるアゴニストとして機能するが、走化性または筋収縮のアッセイではアンタゴニストとして機能すると同定されることがある。そのようなアッセイおよび化合物は、本発明の範囲内である。

【0101】

5.2.4 CD38/SM38の発現を制御する化合物に対するアッセイ

本発明に従って、細胞ベースのアッセイ系を用いて、細胞内でCD38/SM38の発現をモジュレートする化合物をスクリーニングすることができる。本明細書に記載するデータは、SM38の発現はマンソン住血吸虫では発生的に制御されていることを示している。特に、SM38は、虫の交尾の際に発現され、このような発現は成虫で維持される。このような発現パターンは、SM38発現をモジュレートする化合物のための標的を提供する。転写レベルまたは翻訳レベルのいずれかでCD38/SM38発現を制御する化合物をスクリーニングするようにアッセイを設計することができる。一実施形態では、レポーター分子をコードするDNAをCD38/SM38遺伝子の調節エレメントに連結することができ、好適な完全な細胞、細胞抽出物、または溶解液で用いてCD38/SM38遺伝子の発現をモジュレートする化合物を同定することができる。このようなレポーター遺伝子には、それだけには限定されないが、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、ルシフェラーゼ、 β -グルクロニダーゼ(GUS)、成長ホルモン、または胎盤アルカリホスファターゼ(SEAP)が含まれ得る。このよう

【0102】

細胞を試験化合物に曝露した後、レポーター遺伝子発現のレベルを定量化して、試験化合物がCD38/SM38発現を制御する能力を決定することができる。アルカリホスファターゼアッセイは、この酵素が細胞から分泌されているので、本発明の実践に特に有用である。したがって、組織培養物の上清を、分泌されたアルカリホスファターゼに対してアッセイしてもよい。さらに、アルカリホスファターゼ活性を、Bronstein, I.ら(1994年、Biotechniques、17巻、172~177頁)に記載されているものなど、熱量測定、生物発光、または化学発光のアッセイにより測定することができる。このようなアッセイは、薬剤のスクリーニングに、単純で、感度が良く、容易に自動化可能な検出システムを提供する。

【0103】

CD38/SM38翻訳を制御する化合物を同定するために、CD38/SM38転写物を含む、細胞またはin vitroの細胞溶解物を、CD38/SM38のmRNA翻訳のモジュレートについて試験することができる。CD38/SM38翻訳の阻害剤に対してアッセイするために、試験化合物を、in vitroの翻訳抽出物におけるCD38/SM38 mRNAの翻訳をモジュレートするその能力に対してアッセイする。

【0104】

本発明の実施形態では、CD38/SM38の発現のレベルを、アンチセンス、リボザイム、またはCD38/SM38 mRNA転写物の翻訳を阻害もしくは防止するRNAi法、あるいはCD38/SM38遺伝子の転写を阻害する3重らせん法を用いて、モジュレートすることができる。このような方法を利用して炎症およびアレルギーなどの障害を治療することができ、この方法では、CD38発現の阻害が造血系由来細胞の遊走を防止するように設計され、またはSM38の阻害がマンソン住血吸虫の生理および病原性を変えるように設計される。

【0105】

アンチセンスおよびRNAi法は、CD38/SM38 mRNAに相補的であるオリゴヌクレオチド(DNAまたはRNAのいずれか)の設計を伴う。アンチセンスまたはRNAiオリゴヌクレオチドは、相補的なmRNA転写物を標的にし、翻訳を防止する。絶対的な相補性は、好ましいが必要とされない。当業者であれば、ハイブリダイズした複合体の融点を決定するための標準の手順を用いることにより、許容できる程度のミスマッチを確かめることができる。

【0106】

本発明のさらに別の実施形態では、CD38/SM38 mRNA転写物を触媒的に切断するように設計されたリボザイム分子を、同様に用いて、CD38/SM38 mRNAの翻訳、およびCD38/SM38の発現を防ぐこともできる。(例えば、1990年10月4日公開のPCT国際公開WO90/11364; Sarverら、1990年、Science、247巻、1222～1225頁を参照されたい)。あるいは、内在性のCD38/SM38遺伝子の発現を、CD38/SM38遺伝子の調節領域(すなわちCD38プロモーターおよびまたはエンハンサー)に相補的なデオキシリボヌクレオチド配列を標的にすることにより低減して、身体における標的にされた造血系由来細胞でCD38/SM38遺伝子の転写を防ぐ3重らせん構造を形成することができる。(一般的には、Helene, C.ら、1991年、Anticancer Drug Des.、6巻、569～584頁、およびMaher, LJ、1992年、Bioassays、14巻、807～815頁を参照されたい)。

10

【0107】

本発明のオリゴヌクレオチド、すなわちアンチセンス、リボザイム、および3重らせん形成性オリゴヌクレオチドを、当技術分野では周知の標準の方法により、例えば、自動DNA合成機(例えば、Biosearch、Applied Biosystemsなどから市販されているものなど)の使用により合成することができる。あるいは、組換え発現ベクターを、本発明のオリゴヌクレオチドの発現を指令するように構築することができる。このようなベクターは、当技術分野で標準的な組換えDNA技術の方法によって構築することができる。特定の実施形態では、ウィルスベクターなどのベクターを、遺伝子治療に適用するために設計することができ、この場合、目標は、標的細胞において阻害性オリゴヌクレオチドがin vivoで発現されることである。

20

【0108】

5.2.5 GPI固定されたSM38タンパク質を切断する化合物に対するアッセイ

本明細書に記載したデータ(実施例9を参照されたい)は、マンソン住血吸虫の成虫の外側の外皮上にGPI-固定されたタンパク質として発現されているSM38を示している。このように、マンソン住血吸虫の、外側の外皮、すなわち膜からSM38を切断する能力を有する化合物は、住血吸虫症の治療に特に有用であり得る。アッセイを、膜からSM38タンパク質を切断する化合物に対するスクリーニングのために設計することができ、このようなアッセイは、本発明に包含される。一実施形態では、細胞ベースのアッセイを用いて、膜からSM38タンパク質を切断する化合物を検出する。非限定的な例によると、SM38を発現する細胞を、試験化合物が膜結合したSM38を切断するのに十分な時間、試験化合物を含む上清でインキュベートしてもよい。次いで、上清を除去することができる。上清におけるSM38の存在を、それだけには限定されないが、免疫アッセイを含む数々の方法で検出することができ、上清にSM38が存在することは、試験化合物には細胞膜からSM38を切断する能力があることを示している。第2の実施形態では、SM38を発現する細胞を固体表面に固定し、試験化合物が膜結合したSM38を切断するのに十分な時間、試験化合物を適用する。次いで、試験化合物を、洗浄などにより除去する。次いで、膜結合したSM38の存在を、様々な方法で検出することができ、これは試験化合物が細胞膜からSM38を切断できないことを示している。SM38を認識する抗体を固定した細胞に接触させるような手段により、SM38を検出してもよい。容易に検出するために、抗体を標識してもよい。

30

40

【0109】

5.2.6 本発明に従ってスクリーニングすることができる化合物

上記に記載したアッセイにより、CD38/SM38活性をモジュレートする化合物を同定することができる。例えば、CD38/SM38活性に影響を及ぼす化合物には、それだけには限定されないが、CD38/SM38に結合する化合物、および酵素活性を活性化し(アゴニスト)または酵素活性を阻止する(アンタゴニスト)化合物が含まれる。あるいは、CD38/SM38に直接結合しないが、CD38/SM38酵素活性を制御するタンパク質の活性を変えることによりCD38/SM38酵素活性を変えることができる化合物を、同定することができる(図3を参照されたい)。cADPRCa2+シグナル伝達経路、ADPRCa2+シグナリング経路、またはNAADPシグナリング経路を活性化または阻害する修飾された生成物に変換されるCD38/SM38の基質である化合物

50

も、本発明のスクリーニングにより同定することができる。細胞においてcADPRCa²⁺シグナル伝達経路を直接活性化または阻害する化合物も、同定することができる。さらに、CD38/SM38酵素活性を活性化しカルシウム経路の脱感作をもたらす化合物を同定することができる。このような脱感作の化合物は、細胞の遊走を阻害すると予想される。さらに、CD38/SM38遺伝子の活性に影響を及ぼす化合物を(転写に影響を及ぼし、またはスプライシング事象に干渉し、したがってCD38/SM38の全長または末端切断形態の発現がモジュレートされ得る分子、例えばタンパク質または有機小分子を含む、CD38/SM38遺伝子の発現に影響を及ぼすことによる)、本発明のスクリーニングを用いて同定することができる。

【0110】

本発明に従ってスクリーニングすることができる化合物には、それだけには限定されないが、CD38/SM38に結合し、あらゆる既知もしくは未知のCD38/SM38の基質によって誘導される活性を模擬し(すなわち、アゴニスト)、またはあらゆる既知もしくは未知のCD38/SM38の基質によって誘導される活性を阻害する(すなわち、アンタゴニスト)有機もしくは無機の低分子化合物、ペプチド、抗体およびそのフラグメント、ならびに他の有機化合物(例えば、ペプチドミメティックス)が含まれる。CD38/SM38に結合し、およびCD38/SM38酵素の活性(すなわち、ADP-リボシルシクラーゼ活性、NADグリコヒドロラーゼ活性、グリコシド交換活性)を増強する化合物、すなわちアゴニスト、またはCD38/SM38酵素の活性を阻害する化合物、すなわちアンタゴニストを、化学誘引物質または筋肉刺激物質の存在下または非存在下で同定する。CD38/SM38の酵素活性を変える/モジュレートするタンパク質に結合する化合物を同定する。天然の基質、すなわちNAD(P)を模擬し、CD38/SM38酵素の活性によってcADPR誘導性のカルシウム放出経路のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用する生成物に変換される化合物を同定することができる。細胞においてcADPRのCa²⁺シグナル伝達経路を直接活性化または阻害する化合物を同定することができる。

【0111】

化合物には、例えば、それだけには限定されないが、ランダムペプチドのライブラリー(例えば、Lam, K.S.ら、1991年、Nature、354巻、82~84頁; Houghten, Rら、1991年、Nature、354巻、84~86頁); ならびにD-および/またはL-立体配置のアミノ酸、リンペプチド(それだけには限定されないが、ランダムの、または部分的に分解された定方向のリンペプチドライブラリーを含む)(例えば、Songyang, Z.ら、1993年、Cell、72巻、767~778頁)、抗体(それだけには限定されないが、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、抗イデオタイプ、キメラ、または一本鎖抗体、ならびにFab、F(ab')₂、およびFab発現ライブラリーフラグメント、ならびにそれらのエピトープ結合性フラグメント)、ならびに有機または無機の低分子で作成された、コンビナトリアル化学由来の分子ライブラリーを含む、可溶性ペプチドなどのペプチドが含まれ得るが、それだけに限定されない。

【0112】

本発明に従ってスクリーニングすることができる他の化合物には、それだけには限定されないが、CD38/SM38遺伝子または、CD38/SM38シグナル伝達経路に関わるいくつかの他の遺伝子の発現に影響を及ぼす(例えば、遺伝子発現に関わる調節領域もしくは転写因子と相互作用することにより)有機小分子、あるいはCD38/SM38の酵素活性またはCD38/SM38酵素活性のモジュレートに関わるいくつかの他の因子の活性に影響を及ぼすような化合物、例えば、CD38/SM38をリボシル化し、それによってCD38/SM38酵素活性を不活性化するタンパク質が含まれる。

【0113】

5.3 CD38/SM38のモジュレーターを含む組成物およびそれらの使用

本発明は、CD38を発現する細胞を、有効量のCD38モジュレート性化合物、例えば、上記セクション5.1で述べたアッセイを用いて同定したCD38のアゴニストまたはアンタゴニストと接触させることを含む、細胞の遊走をモジュレートする方法を提供する。さらに、本発明は、SM38を発現する細胞を、有効量のSM38モジュレート性化合物、例えば、上記セクション5.1で述べたアッセイを用いて同定されたSM38アゴニストまたはアンタゴニストと接触させることを含む、カルシウム応答および/または筋収縮をモジュレートする方法を

提供する。CD38/SM38阻害剤、すなわちアンタゴニストの「有効量」は、化学誘引物質が誘導する細胞の遊走を低減する量、細胞内カルシウムレベルを低減する量、筋収縮を低減する量、および/または上記のアッセイの1つにより測定してCD38/SM38酵素活性における検出可能な低減に関連する量である。CD38/SM38活性化物質、すなわちアゴニストの「有効量」は、化学誘引物質が誘導する細胞遊走を主観的に増大する量、細胞内カルシウムレベルを増大する量、筋収縮を増大する量、および/または上記のアッセイの1つにより測定してCD38/SM38酵素活性における検出可能な増大に関連する量である。本発明の組成物には、修飾されたCD38/SM38基質、CD38/SM38発現のモジュレーター、およびcADPRのアゴニスト/アンタゴニストも含まれる。

【0114】

10

本発明は、上記セクション5.1で述べたように同定されたCD38酵素活性をモジュレートする化合物を含む組成物を、被験体に投与することを含む、被験体における細胞の遊走をモジュレートする方法をさらに提供する。組成物は、ある量のCD38酵素活性化物質もしくは阻害剤、CD38発現のモジュレーター、修飾されたCD38基質、またはcADPRが制御するCa²⁺応答の直接のアゴニスト/アンタゴニストを含むことができる。したがって、本発明は、CD38活性化物質および阻害剤を含む組成物を提供する。

【0115】

20

本発明は、CD38の活性、CD38の発現、および/またはcADPRの活性をモジュレートすることができ、それによって細胞の遊走活性を制御する化合物の有効量、ならびに薬学的に許容できる担体を含む組成物を提供する。特定の実施形態では、「薬学的に許容できる」という語は、連邦政府もしくは州政府の監督機関によって認可され、または、動物、より詳しくはヒトで使用するために、米国薬局方、もしくは他の一般的に認められている薬局方に列挙されていることを意味する。「担体」という語は、それと一緒に治療薬が投与される希釈剤、佐剤、賦形剤、またはビヒクルを意味する。適切な薬剤の担体の例はE.W.Martinによる「Remington's Pharmaceutical sciences」に記載されている。

【0116】

30

本発明は、CD38の発現または活性を制御する化合物を投与することによる、細胞遊走に関連する様々な疾患および障害の治療または予防を提供する。このような化合物には、それだけには限定されないが、CD38抗体、CD38アンチセンス核酸、CD38アゴニストおよびアンタゴニスト(図2~3を参照されたい)、修飾されたCD38基質(図5を参照されたい)、およびcADPRアゴニストおよびアンタゴニスト(図6を参照されたい)が含まれる。本発明の非限定的な実施形態では、造血系由来細胞の遊走に関連する障害を、CD38活性を制御する化合物を投与することにより、治療し、または予防する。このような障害には、それだけには限定されないが、炎症、虚血、喘息、自己免疫疾患、糖尿病、アレルギー、感染症、関節炎、および臓器移植片拒絶が含まれる。

【0117】

40

本発明の化合物を、ヒトで使用する前に、望ましい治療上または予防上の活性に対して、in vitroで、次いでin vivoで試験することが好ましい。例えば、特定の治療薬の投与が指示されるか否かを決定するために用いることができるin vitroのアッセイでは、CD38を発現する細胞が曝露され、さもなければ治療用化合物を投与し、CD38活性に対するそのような治療薬の効果が観察される、in vitroの細胞培養アッセイが含まれる。本発明の特定の実施形態では、化合物が細胞の遊走を制御する、すなわち活性化または阻害する能力をアッセイすることができる。

【0118】

本発明は、蠕虫に感染した被験体に、上記セクション5.1で述べたように同定されたSM38酵素活性をモジュレートする化合物を含む組成物を投与することにより、マンソン住血吸虫などの蠕虫における筋収縮または他の生理学的パラメータをモジュレートする方法をさらに提供する。組成物は、ある量の、SM38酵素活性化物質または阻害剤、SM38発現のモジュレーター、修飾されたSM38基質、またはcADPR、ADPR、またはNAADPが制御するCa²⁺応答の直接のアゴニスト/アンタゴニストを含むことができる。したがって、本発明は、SM3

50

8 活性化物質および阻害剤を含む組成物を提供する。

【0119】

本発明は、SM38の活性、SM38の発現、および/またはcADPR、ADPR、もしくはNAADPの活性をモジュレートし、したがって、寄生虫の活性および生存能力を制御することができる化合物の有効量、ならびに薬学的に許容できる担体を含む組成物を提供する。特定の実施形態では、「薬学的に許容できる」という語は、連邦政府、または州政府の監督機関によって認可されている、あるいは動物、より詳しくはヒトで使用するために、米国薬局方または他の一般的に認められている薬局方に列挙されていることを意味する。「担体」という語は、それと一緒に治療薬が投与される希釈剤、佐剤、賦形剤、またはビヒクルを意味する。適切な薬剤の担体の例はE.W.Martinによる「Remington's Pharmaceutical science」に記載されている。

10

【0120】

本発明は、蠕虫の感染に関連する様々な疾患および障害の治療または予防を提供する。このような化合物には、それだけには限定されないが、SM38抗体、SM38アンチセンス核酸、SM38 RNAi分子、SM38アゴニストおよびアンタゴニスト(図2~3を参照されたい)、修飾されたSM38基質(図5を参照されたい)、ならびにcADPR、ADPR、またはNAADPアゴニストおよびアンタゴニスト(図6を参照されたい)が含まれる。本発明の非限定的な実施形態では、蠕虫の感染に関連する障害を、SM38活性を制御する化合物を投与することにより、治療し、または予防する。このような障害には、それだけには限定されないが、肝臓および肺における肉芽腫の形成および線維症が含まれる。

20

【0121】

本発明の化合物を、ヒトで使用する前に、望ましい治療上のまたは予防上の活性に対して、in vitroで、次いでin vivoで試験することが好ましい。例えば、特定の治療薬の投与が指示されるか否かを決定するために用いることができるin vitroのアッセイでは、SM38を発現する細胞が曝露され、さもなければ治療用化合物を投与し、SM38活性に対するそのような治療薬の効果が観察される、in vitroの細胞培養アッセイが含まれる。本発明の特定の実施形態では、化合物が筋収縮または細胞内のカルシウム蓄積を制御する、すなわち活性化または阻害する能力。さらに、本発明の化合物を、マンスン住血吸虫感染症に対するマウスモデルにおいて、マンスン住血吸虫の病原性、増殖、分化、および生殖に対する化合物の効果についてアッセイすることができる。このようなアッセイには、寄生虫の増殖、雌虫の成熟、肝臓および肺における肉芽腫の量、肝臓、肺、膀胱、および腸における卵の量、肺および肝臓における虫の量、ならびに尿および糞便で検出されるミラキディウムの量に対する効果について試験することが含まれる。

30

【0122】

さらに、本発明の化合物を、マンスン住血吸虫の病原性、増殖、分化、および生殖に対する化合物の効果に対してアッセイすることができる。このような化合物を、マンスン住血吸虫感染症に対するマウスモデルで試験することができる。このようなアッセイには、寄生虫の増殖、肝臓および肺における肉芽腫の量、肝臓、肺、膀胱、および腸における卵の量、ならびに尿および糞便で検出されるミラキディウムの量に対する効果について試験することが含まれる。

40

【0123】

本発明は、被験体に本発明の化合物の有効量を投与することによる、治療および/または予防の方法を提供する。好ましい一態様では、化合物は実質的に精製されている。被験体は好ましくは動物であり、好ましくは哺乳動物であり、最も好ましくはヒトである。

【0124】

リポソーム、微小粒子、マイクロカプセルにおけるカプセル化、化合物を発現することができる組換え細胞、受容体が媒介するエンドサイトーシスなど、様々な送達システムが知られており、CD38活性、cADPR、またはCD38発現を制御することができる化合物を投与するために用いることができる(例えば、WuおよびWu、1987年、J.Biol.Chem.、262巻、4429~4432頁を参照されたい)。導入の方法には、それだけには限定されないが、皮内、筋

50

肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口の経路が含まれる。化合物は、あらゆる便利な経路によって、例えば、注入またはボーラス注射によって、上皮または粘膜皮膚の裏打ち(例えば、口腔粘膜、直腸および結腸の粘膜など)による吸収によって投与することができ、他の生物学的に活性な物質と一緒に投与することができる。投与は全身的でも、または局所的でもよい。例えば、吸入器またはネブライザーの使用により、およびエアロゾル化剤と配合することにより、肺投与も使用することができる。

【0125】

特定の実施形態では、本発明の組成物を、身体の特定の領域に局所的に投与することが望ましいことがあり、これは、例えば、限定的なものではないが、手術中の局所注入、局所適用、例えば、手術後の傷の包帯と組み合わせて、注射により、カテーテルにより、座剤により、または埋め込みにより実現することができ、前記埋め込みは多孔性、非多孔性、またはゼラチン質の材料であり、シアラスティック(sialastic)膜などの膜、または繊維を含む。

【0126】

本発明は、医薬組成物も提供する。このような組成物は、CD38活性、cADPR活性、またはCD38発現を制御することができる化合物の治療有効量、および薬学的に許容できる担体を含む。特定の実施形態では、「薬学的に許容できる」という語は、連邦政府もしくは州政府の監督機関によって認可され、または、動物、より詳しくはヒトで使用するために、米国薬局方、もしくは他の一般的に認められている薬局方に列挙されていることを意味する。「担体」という語は、それと一緒に治療薬が投与される希釈剤、佐剤、賦形剤、またはビヒクルを意味する。このような薬剤担体は、例えば、石油、動物、植物、または合成起源のもの、例えば、ピーナツ油、ダイズ油、鉱物油、ゴマ油などを含む、水および油などの滅菌した液体であることができる。医薬組成物を静脈内投与する場合には、水が好ましい担体である。食塩水、ならびにデキストロースおよびグリセロールの水溶液も、液体の担体として、特に注射可能な溶液に用いることができる。組成物は、トリグリセリドなどの、伝統的な結合剤および担体と、座剤として配合することができる。経口の製剤には、製薬用グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準のカーバーズ(carvers)が含まれ得る。適切な薬剤上の担体の例は、E.W.Martinによる「Remington's Pharmaceutical sciences」に記載されている。このような組成物は、好ましくは精製された形態の、治療有効量の治療用化合物を、患者に適切に投与するための形態を提供するために適切な量の担体と一緒に含む。製剤は、投与方法に適合しなければならない。

【0127】

特定の障害または状態の治療に有効である本発明の化合物の量は、障害または状態の性質に依存し、標準の臨床技術により決定することができる。さらに、in vitroのアッセイを、任意選択で使用して、最適の投与量範囲を同定する手助けをすることができる。製剤で使用される正確な投与量は、投与経路、および疾患または障害の重症度にやはり依存し、開業医の判断および各患者の状況に従って決定すべきである。有効な投与量は、in vitroまたは動物モデルの試験システムに由来する用量反応曲線から外挿することができる。さらに、in vitroおよびin vivoの研究で、組み合わせて投与した場合に相乗的な、または相加的な治療効果を示す場合は、化合物の投与を、他の知られている有効な薬物と組み合わせることができる。

【0128】

本発明は、本発明の医薬組成物の1つまたは複数の成分で満たされた1つまたは複数の容器を含む薬剤の包装またはキットも提供し、場合により、医薬品または生物学的製品の製造、使用、または販売を取り締まる政府機関が規定した形式の通知は、このような容器に付随することができ、この通知は、ヒトに投与するための製造、使用、または販売の機関による認可を反映するものである。

【0129】

5.4 SM38に向けられたワクチン

10

20

30

40

50

SM38タンパク質、およびポリペプチド化合物を、マンソン住血吸虫に対するワクチン中で使用してもよい。さらに、SM38ポリペプチド断片を含む、SM38ポリペプチドをコードすることができる核酸分子を、ワクチン中で使用することができる。ワクチンは、免疫学的に有効な量の免疫原、すなわちSM38またはSM38をコードする核酸を、薬学的に許容できる担体を含む。組み合わせた免疫原および担体は、水溶液、エマルジョン、または懸濁液であってよい。免疫学的に有効な量は、本明細書に教示が含まれているので、過度の実験を行わないで当技術分野では周知の手段によって決定することができる。担体は、当業者には知られており、安定化剤、希釈剤、およびバッファーを含む。適切な安定化剤には、ソルビトール、ラクトース、マンニトール、デンプン、ショ糖、デキストラン、およびグルコースなどの炭水化物、ならびにアルブミンまたはカゼインなどのタンパク質が含まれる。適切な希釈剤には、食塩水、ハンクスの平衡塩類、およびリンゲル液が含まれる。適切なバッファーには、アルカリ金属のリン酸塩、アルカリ金属の炭酸塩、またはアルカリ土類金属の炭酸塩が含まれる。ワクチンは、免疫原性を改善するために、1つまたは複数のアジュバントを含むことができる。適切なアジュバントには、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、もしくは酸化アルミニウム、またはMarcol 52などの鉱物油、もしくは植物油、および1つまたは複数の乳化剤からなる組成物が含まれる。

10

【0130】

本発明のワクチンは、本明細書に教示が含まれているならば、当業者に周知の技術によって調製する。一般的には、免疫原を担体と混合して、溶液、懸濁液、またはエマルジョンを形成する。上記で論じた1つまたは複数の添加物は、担体中に含まれていてもよく、または後で添加してもよい。ワクチン製剤は、例えば、貯蔵目的で凍結乾燥することにより、乾燥することができる。そのような場合は、好適な液体の担体を加えることにより、それらを引き続き液体ワクチンに再構成することができる。

20

【0131】

ワクチンを、マンソン住血吸虫感染症、または関連する虫の感染症に感受性のヒト、または他の哺乳動物に投与する。ワクチンを、1回または複数回の投与量で投与することができる。ワクチンは、このタイプのワクチンに対して知られている投与経路により投与することができる。好ましい経路は、筋肉内、または皮下注射である。したがって、本発明は、哺乳動物をマンソン住血吸虫による感染に対して保護するために、哺乳動物においてSM38に対する免疫反応を誘導するための方法も含む。この方法は、免疫学的に有効な量の本発明の免疫原を、宿主に投与することを含み、好ましくは、本発明のワクチンを宿主に投与することを含む。

30

【0132】

5.5 住血吸虫の検出方法

該生物による感染を示すサンプル中での住血吸虫およびその関連する生物の存在を検出するためのプローブとして、本発明のSM38ポリヌクレオチドを用いることができる。本発明を実行するための核酸(すなわち、DNAまたはRNA)のサンプルを、あらゆる適切な供給源から得ることができる。典型的には、核酸のサンプルを、SM38配列を含むと評価を行うべき生体液または生物学的組織の臨床サンプルから得る。本発明により、非臨床サンプルにおけるSM38核酸配列の検出も可能になることは明らかである。適切な非臨床サンプルには、それだけには限定されないが、住血吸虫の中間宿主、すなわちカタツムリなどの、非ヒト宿主に由来するサンプルが含まれる。

40

【0133】

SM38をコードする核酸配列を有する単離されたポリヌクレオチドを、配列相同性を有する標的核酸配列の存在を検出するためのプローブとして用いることができる。本発明のオリゴヌクレオチドのプローブまたはプライマーは、使用する特定のアッセイ様式に応じて、任意の適切な長さであってよい。一般的には、オリゴヌクレオチドのプローブまたはプライマーは、少なくとも長さ15ヌクレオチドである。例えば、SM38を検出するために用いられるオリゴヌクレオチドのプローブまたはプライマーは、長さ約20ヌクレオチドであることが好ましい。オリゴヌクレオチドのプローブまたはプライマーを、選ばれた核酸増幅

50

システムに特に適するように適合させることができる。

【0134】

検出方法におけるプローブの使用には、ノーザンブロット(RNA検出)、サザンブロット(DNA検出)、およびドットまたはスロットブロット(DNA、RNA)が含まれる。他の検出方法には、ディップスティック構成など上のプローブを含むキットが含まれる。本発明の診断アッセイで用いられるハイブリダイゼーション条件の例は、Ausubel, F.M.ら、Current protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, ニューヨーク州(1989年)に見ることができる。本発明の非限定的な一実施形態では、ニトロセルロースのフィルターを、50%ホルムアミド、高塩濃度、 $5\times\text{SSC}$ [$20\times:3\text{M NaCl}/0.3\text{Mクエン酸三ナトリウム}$] または $5\times\text{SSPE}$ [$20\times:3.6\text{M NaCl}/0.2\text{M NaH}_2\text{PO}_4/0.02\text{M EDTA}$, pH7.7] のいずれか、 $5\times$ デンハート液、1%SDS、および変性したサケ精子のDNA $100\mu\text{g/ml}$ を含む溶液において、標識したプローブとともに 68°C で一晩インキュベートする。その後、望ましいストリンジェンシーに基づいて選択された温度: 室温(低いストリンジェンシー)、 42°C (中程度のストリンジェンシー)、または 68°C (高いストリンジェンシー)で、 $0.2\times\text{SSC}/0.1\%$ SDSで数回洗浄する。選択された温度は、DNAハイブリッドの融点(T_m)をもとに決定される。ストリンジェントな条件を用いるのが好ましい。

10

【0135】

本発明のSM38プローブを用いて形成したハイブリッドの分子を、プローブの1つに加えた検出可能マーカーを用いて検出することができる。例えば、プローブを放射標識しオートラジオグラフィーにより検出することができる。このような標識には、それだけには限定されないが、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、および ^{32}P が含まれる。検出可能なマーカーには、また、リガンド、フルオロフォア、化学発光物質、センサーによる電気化学、時間分解型蛍光、酵素、および抗体が含まれ得る。

20

【0136】

SMの核酸を検出するために増幅方法も用いることができる。適切な増幅技術の例には、それだけには限定されないが、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応、鎖置換増幅、転写ベースの増幅(Kwohら、1989年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86巻、1173~1177頁を参照されたい)、自律配列複製(Guatelliら、1990年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87巻、1874~1878頁を参照されたい)、Q β レプリカーゼシステム(Lizardiら、1988年、Bio Technology、6巻、1197~1202頁を参照されたい)、およびNASBA(Malekら、1994年、Methods. Mol. Biol.、28巻、253~260頁)が含まれる。好ましい実施形態では、増幅を、PCRを用いて行う。

30

【0137】

本発明は、サンプルにおけるSM38核酸の存在を検出するためのキットも提供する。このようなキットは、SM38核酸に特異的に結合することができる試薬を含む。SM38核酸に対する試薬の結合を直接検出することができない場合は、キットはそのような結合を検出することができる第2の試薬をさらに含むことができる。

【0138】

本発明に従って、被験体に由来するサンプルにおけるSM38タンパク質の検出を、マンソン住血吸虫感染の診断に用いることができる。被験体からのサンプルにおけるSM38タンパク質の検出は、多数の方法のいずれかにより遂行することができる。被験体の生物学的サンプルにおいてSM38タンパク質を検出するための好ましい診断方法には、例えば、SM38タンパク質がSM38特異的抗体との相互作用により検出される免疫アッセイが含まれ得る。本発明に有用な抗体を用いて、SM38またはその抗原断片の存在を定量的または定性的に検出することができる。さらに、例えばSM38タンパク質に特異的に結合するポリペプチドなどの、抗体以外の試薬を、SM38タンパク質発現のレベルを検出するためのアッセイで用いることができる。あるいは、SM38タンパク質の検出を、例えば、ADP-リボシルシクラーゼ活性、グリコシド交換活性、およびNAD $^+$ グリコヒドロラーゼ活性などのSM38酵素活性など、SM38タンパク質と関連する生物学的特性のレベルを検出し測定することにより達成することができる。本発明の実施に有用な免疫アッセイには、それだけには限定されないが、少

40

50

数を挙げると、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着検
定法)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降
反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、放射性免疫アッセイ、蛍光
イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイなどの技術を用いたアッセイ系が含まれる
。

【0139】

SM38タンパク質を含むと評価される生体液または生物学的組織の臨床サンプル、例えば、
血液、もしくは肝臓組織、または他の生物学的組織は、感染していると疑われる被験体
から得られる。全組織のアリコート、または細胞を、当業者には周知の様々な可溶化カク
テルの任意の1つを用いて可溶化する。例えば、蒸留した脱イオン水に(1リットルあたり)
尿素8M、ノニデットP-40界面活性剤20ml、両性電解質(pH3.5~10)20ml、2-メルカプトエ
タノール20ml、およびフッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)0.2mMを含む溶解バッファ
ーを加えることにより、組織を可溶化することができる。SM38タンパク質の発現を検出す
るための免疫アッセイは、生物学的サンプル、例えば、被験体に由来する血液または組織
サンプルを抗SM38抗体と、免疫特異的な抗原-抗体結合反応が起こることができるような
条件下で接触させ、抗体によるあらゆる免疫特異的な結合の量を検出し、または測定する
ことを典型的に含む。特定の一態様では、このような抗体の結合を、例えば、SM38タンパ
ク質の存在を検出するために用いることができ、この場合、SM38タンパク質の検出は、疾
患の状態の指標となる。

【0140】

本発明の実施形態では、組織抽出物などの生物学的サンプルを、サンプルに存在するあ
らゆるタンパク質を固定化する目的で、ニトロセルロースなどの固相支持体または担体に
接触させる。次いで、支持体を適切なバッファーで洗浄し、その後検出可能に標識したSM
38特異的抗体で処理する。次いで、固相支持体を、バッファーで2回洗浄して非結合の抗
体を除去する。次いで、固体支持体上に結合した抗体の量を、よく知られた方法に従って
決定する。当業者であれば、日常的な実験を使用することにより測定に最適のアッセイ条
件を決定することができる。

【0141】

SM38抗体を検出可能に標識することができる方法の1つは、エンザイムイムノアッセイ(
EIA)で用いるためのものなど、抗体を酵素に連結することによるものである(Voller,A.,
「The Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)」、1978年、Diagnostic Horizons、2
巻、1~7頁;Microbiological Associates Quarterly Publication、Walkersville、メリ
ーランド州;Voller,A.ら、1978年、J.Clin.Pathol.、31巻、507~520頁;Butler,J.E.、19
81年、Meth.Enzymol.、73巻、482~523頁)。抗体に結合している酵素は、例えば、分光光
度法により、蛍光定量的により、または肉眼的な手段により検出することができる化学成
分を生成するような様式で、好適な基質、好ましくは色素生産性の基質と反応する。抗体
を検出可能に標識するのに用いることができる酵素には、それだけには限定されないが、
西洋ワサビのペルオキシダーゼ、およびアルカリホスファターゼが含まれる。検出は、ま
た、酵素に対する色素生産性基質を使用する比色方法により、遂行することができる。

【0142】

SM38抗体の検出は、様々な他の方法を用いて遂行してもよい。例えば、抗体または抗体
フラグメントを放射活性で標識することにより、ラジオイムノアッセイ(RIA)の使用によ
りSM38タンパク質の発現を検出することが可能である(例えば、Weintraub,B.、Principle
s of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques
、The Endocrine Society、1986年3月を参照されたい)。放射性同位元素を、ガンマ線計
数機もしくはシンチレーションカウンターのよう手段の使用により、またはオートラジオ
グラフィにより検出することができる。抗体を蛍光化合物で標識することもできる。
最も一般的に用いられる蛍光標識化合物の中には、フルオレセインイソチオシアネート、
ローダミン、フィコエリスリン、およびフルオレスカミンがある。同様に、生物発光化合
物を用いて、SM38抗体を標識することができる。生物発光タンパク質の存在を、発光の存

在を検出することにより決定する。標識目的の重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリンである。

【0143】

本発明に従って、被験体に由来するサンプルにおける抗SM38抗体の検出を、住血吸虫感染の診断に用いることができる。本発明に従って、SM38タンパク質抗原に対して反応性の抗体の測定を、住血吸虫感染の診断に用いることができる。被験体からのサンプルにおける抗SM38抗体の検出を、多数の方法のいずれかによって実現することができる。そのような方法には、それだけには限定されないが、少数を挙げると、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、放射性免疫分析、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイなどの技術を用いる競合および非競合のアッセイ系を含むイムノアッセイが含まれる。

10

【0144】

そのようなイムノアッセイを、特異的な抗原-抗体の結合が起こることができるような条件下で、被験体に由来する血清サンプルを、SM38タンパク質抗原を含むサンプルと接触させ、SM38抗体によるあらゆる免疫特異的な結合の量を検出し、または測定することを含む方法により行う。特定の一態様では、サンプル、例えば血清サンプルによる抗体のこのような結合を用いて、抗SM38抗体の存在を検出することができ、この場合このような抗体の検出は疾患状態の指標である。

【0145】

本発明は、非臨床サンプル、すなわち非ヒト宿主組織における、住血吸虫の存在を検出するための方法も提供する。このような方法は、非ヒト宿主組織におけるSM38タンパク質の検出に基づき、SM38ベースの診断アッセイに関して上記に記載したこれらの方法を含むが、組織または血液サンプルは水サンプルで置き換えられる。

20

【0146】

本発明は、サンプル中のSM38タンパク質の存在を検出するためのキットも提供する。このようなキットは、それだけには限定されないが、SM38タンパク質に特異的に結合することができる抗SM38抗体を始めとする試薬を含む。SM38タンパク質への試薬の結合を直接検出することができない場合は、キットはこのような結合を検出することができる第2の試薬をさらに含むことができる。

30

【実施例】

【0147】

6. 実施例:好中球は、走化性、容量性のCa⁺侵入、および細菌の排除にCD38を必要とする

以下のサブセクションは、化学誘引物質によって活性化された好中球におけるカルシウムの侵入は、CD38酵素反応の生成物であるcADPRによってコントロールされることを示すデータを記載している。容量性のカルシウムの流入は、CD38が生成するcADPRによってコントロールされ、好中球が化学誘引物質へと効率的に遊走するのに必要とされている。

【0148】

6.1 材料と方法

6.1.1 マウス

C57BL/6J×129 CD38K0 F2動物(Cockayneら、1998年、Blood、92巻、1324~1333頁)を、C57BL/6Jに6世代(N6)戻し交配し、次いで、同系交配してホモ接合性の類遺伝子性(congenic)のC57BL/6J.129 CD38K0マウスを産生した。C57BL/6J.129(N6)CD38K0マウスをC57BL/6J.129(N8)Rag-2K0マウスと交配させることにより、CD38-Rag-2二重K0(dK0)マウスを産生し(Shin Kaiら、1992年、Cell、68巻、855~867頁)、次いでそれを子孫と交配させてホモ接合性の二重K0動物を得た。野生型(WT)またはCD38K0マウスから単離した全骨髓細胞1×10⁷個を、致死的な放射線照射をした(950ラド)WT宿主中に移植することにより、骨髓キメラマウスを作製した。マウスは全て、Trudeau Institute Animal Breeding Facilityで飼育し、維持した。

40

【0149】

50

6.1.2 cADPR含量測定

全身灌流したWTまたはCD38KOマウスからマウス組織を単離し、液体窒素中で急速凍結した。骨髄の骨髄細胞を、Rag-2KOまたはRag-2-CD38 dKOマウスの脛骨および大腿骨から流し出した。次いで、マウス組織および骨髄の骨髄細胞におけるcADPR含量を、以前に記載されているようにして測定した(Vuら、1997年、Biochem Biophys Res Commun、236巻、723～726頁)。

【0150】

肺炎連鎖球菌(*S.pneumoniae*)感染。マウスを、アメリカン・タイプ・ティッシュ・カルチャー(Rockville、メリーランド)からの肺炎連鎖球菌タイプ4(Klein株)の100または1000 CFUで気管内感染させた。血液、気管支肺胞洗浄液(BAL)、および肺組織を、感染させたマウスから回収した(Garvyら、1996年、Inflammation、20巻、499～512頁)。肺ホモジネートおよび血液における細菌の力価を、肺あたりの基準、または血液1mlあたりで計算した。BAL細胞を細胞の遠心調製物から計数した。

【0151】

6.1.3 in vitro走化性アッセイ

ビオチン化GR-1(PharMingen)およびMACSストレプトアビジンマイクロビーズ(Miltenyi Biotec、Auburn、カリフォルニア州)を用いて、ポジティブ選択により、骨髄の好中球を精製した(純度95%)。24ウェルのトランスウェルプレート(孔サイズ3 μ mのポリカーボネートフィルター(Costar、Cambridge、マサチューセッツ州))とともに用いて、走化性アッセイ(Falkら、1980年、J.Immuno.Methods、33巻、239～247頁)を行った。培地(HBSS+Ca²⁺+Mg²⁺)、fMLP(1 μ M、Sigma、St.Louis、ミズーリ州)、またはIL-8(100nM、Sigma)を、交差式の下部および/または上部チャンバーに配置した。1 $\times$ 10⁵個の好中球を上部チャンバーにロードし、プレートを37℃で45分間インキュベートした。遊出した細胞を下部チャンバーから回収し、固定し、フローサイトメーター(FACS Calibur、Becton Dickinson、San Jose、カリフォルニア州)上で計数した。各サンプルにおける細胞の絶対数を決定するために、標準数の20 μ Mサイズの蛍光微小球(Polysciences, Inc.、Warrington、ペンシルベニア州)を各チューブに加え、細胞と一緒に計数した。遊出した細胞の総数=計数された好中球の数 $\times$ ビーズの総数/計数されたビーズ。いくつかの実験では、好中球をEGTA(2 mM)中でインキュベートし、または8-Br-cADPR(25～100 μ M、Sigma)もしくはN(8-Br-A)D+(1.0mM)と20分間、前処理した。

【0152】

6.1.4. CD38の発現

骨髄、血液、または腹腔の細胞をWTまたはCD38KOマウスから単離し、抗マウスGR-1 FITC、抗マウスMAC-1 PE、および抗マウスCD38 APC(PharMingen、San Diego、カリフォルニア州)で染色した。ヒト末梢血好中球をフィコール勾配上で単離し、次いで抗hCD15-FITC(Becton Dickinson、San Jose、カリフォルニア州)、および抗hCD38-ビオチン(Caltag Laboratories、Burlingame、カリフォルニア州)で染色した。マウスおよびヒトの好中球を、マウス好中球についてはMAC-1⁺GR-1⁺に対して、ヒト好中球についてはCD15⁺に対してゲーティングしながら、フローサイトメトリーにより分析した。炎症反応を誘発するために、マウスに3%チオグリコール酸培地1mlを腹腔内注射した(Becton Dickinson、Cockeysville、メリーランド州)。注射12時間後にマウスを屠殺し、腹腔に浸潤する細胞を回収した。

【0153】

6.1.4 CD38シクラーゼ活性の測定

CD38シクラーゼ活性の測定。精製した骨髄好中球1 $\times$ 10⁶個を、96ウェルのマイクロプレートでHBSS 100 μ l中37℃で20分間インキュベートした。NGD(40 μ M)(Sigma)を加え、NGD⁺のcGDPRへの酵素的変換を、次の10分間にわたり蛍光定量法で測定した(Graeffら、1994年、J.biol.Chem.、269巻、30260～30267頁)(発光415nm、励起300nm)。

【0154】

6.1.5 好中球におけるRyR-3 mRNAの発現

精製した骨髄の好中球または脳組織から単離したRNAから、cDNAを調製した。0.03～2 μ

10

20

30

40

50

gの投入cDNAおよびRyR-3に特異的なプライマー(Guseら、1999年、Nature、398巻、70～73頁)を用いて、30サイクル(アニーリング温度61℃)のRT-PCRを行った。

【0155】

N(S-Br-A)D⁺の合成。N(8-Br-A)D⁺を、以前に記載されている(Abdallahら、1975年、Eur. J Biochem、50巻、475～481頁)ようにして合成した。

【0156】

6.1.6 細胞内カルシウムの測定

精製した骨髓好中球を、 1×10^7 細胞/mlで、細胞負荷培地(Ca²⁺およびMg²⁺+1%FBS+4mMプロベネシドを含むHBSS)に再懸濁した。細胞を、蛍光色素であるFluo-3 AM(4 μg/ml)およびFura Red AM(10 μg/ml)(Molecular Probes、Eugene、オレゴン州)と共に、37℃で30分間インキュベートし、次いで2回洗浄し、それを 1×10^6 細胞/mlで細胞負荷培地またはカルシウム不含培地に再懸濁した。いくつかの実験では、細胞を、5 μMジギトキシンを含むカルシウム不含培地で透過処理した。他の実験では、細胞をEGTA(2mM)、8-Br-cADPR(10～100 μM)、ルテニウムレッド(Sigma)、またはN(8-Br-A)D⁺ (1mM)とプレインキュベートし、次いで対照担体(DMSO 0.01%)、fMLP(1 μM)、IL-8(100nM)、リアノジン(1 μM)、cADPR(100 μM)、またはタプシガルジン(1 μM)で刺激した。個々の細胞における[Ca²⁺]_iの蓄積を、FL-1チャンネルではFluo-3、FL-3チャンネルではFura-Redの蛍光発光を測定するフローサイトメトリーにより評価した。データを、FlowJo3.2(Tree Star, Inc., San Carlos、カリフォルニア州)を用いて分析した。相対的な[Ca²⁺]_iは、Fluo-3とFura Redとの間の経時的平均蛍光強度の比で表した。

【0157】

6.2 結果

CD38は、リンパ組織で発現される主要なADP-リボシルシクラーゼである。in vivoにおけるカルシウム感受性の免疫応答において、CD38およびcADPRに対する要求性を直接試験するために、CD38ノックアウト(CD38KO)マウスを作製し(Cockkayneら、1998年、Blood、92巻、1324～1333頁)、CD38がマウスで発現される主要なシクラーゼであるかどうかを決定するために、CD38KOおよびC57BL/6J野生型(WT)マウスから単離した組織および細胞中のcADPR含量を比較した(表1)。

【表1】

表1. CD38KOおよびWT動物から単離した組織中のcADPR含量の比較

組織	WT組織におけるcADPR含量 (pmol/mgタンパク質)	CD38KO組織におけるcADPR含量 (pmol/mgタンパク質)
脾臓	2.108±0.334	(0.298±0.091*
胸腺	0.769±0.182	0.335±0.088**
BM骨髓細胞	0.633±0.111	0.257±0.032*
肺	0.847±0.213	0.480±0.069
腎臓	0.488±0.119	0.418±0.070
心臓	1.249±0.324	1.014±0.237
脳	3.865±0.866	3.127±0.316

抽出物は、8～12週齢のCD38KOもしくはWTマウスから単離した組織から、またはRag-2KOまたはRag-2-CD38二重KOマウスから単離した骨髓(BM)の骨髓細胞から調製し、cADPR含量について分析した。3つの別個の精製および分析を、1分析あたり3匹のマウスから単離した組織に対して行った。*P<0.01、**P=0.07;分散分析。検出限界は0.2pmol/mgタンパク質。

【0158】

主にリンパ球または骨髓細胞を含むWTの組織、例えば、脾臓、胸腺、およびリンパ球欠

損性骨髄(骨髄細胞)には、容易に検出できるレベルのcADPRが存在した。それとは対照的に、CD38KOマウスから単離したリンパ系組織または骨髄組織では、cADPRは検出されなかった。しかし、脳、腎臓、および心臓などのCD38KO組織のcADPR含量は、WTの同じ組織のcADPR含量にほぼ等しかった。したがって、他の未知のシクラーゼが脳および心臓などの器官におけるcADPR生成を担うにちがいないが、CD38は、骨髄細胞およびリンパ細胞により発現される優勢なADP-リボシルシクラーゼである。

【0159】

CD38欠損マウスは、細菌感染により罹り易い。生得的な炎症性免疫反応におけるCD38およびcADPRの要求性を試験するために、CD38KOおよびWTマウスを、肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)に感染させ、生存を評価した(図7A)。100コロニー形成単位(CFU)により感染2.5日以内にCD38KOマウスの50%が死滅したが、同期間にWT動物の50%を死滅させるには1000 CFUが必要とされたので、CD38KO動物に対するLD50は、WTマウスに対するよりも少なくとも10倍低いことが観察された。

【0160】

CD38は、免疫応答細胞および気管支上皮によって発現されるので(Fernandez JEら、*J. Biol. Reg. Homeost. Agents*, 12巻、81~91頁)、WTまたはCD38KOの骨髄を、照射したWT宿主中に移植して、肺および/または免疫系におけるCD38の発現は保護に必要であるかどうかを試験した。再構成したキメラ動物は、CD38+またはCD38欠損のいずれかの骨髄由来細胞を有し、一方では、気管支上皮を含む他の細胞型は全て、両動物群においてWT起源のものであった。次いで、再構成したマウスを、肺炎連鎖球菌に感染させ、生存をモニターした(図7B)。CD38KO骨髄を受容した再構成した動物は、WT骨髄を受容したマウスに比べて感染に対してずっと感受性が高く、このことは、肺炎連鎖球菌感染に対するCD38KOマウスの感受性の増大が、骨髄由来のリンパ細胞および/または骨髄細胞上のCD38の喪失によるものであることを示していた。

【0161】

CD38KO動物の肺炎連鎖球菌に対する感受性の増大が、細菌増殖および全身部位への拡散を抑止することができないことによるものであったかどうかを決定するために、CD38KOマウスおよびWTマウスを1000 CFUの肺炎連鎖球菌に感染させ、感染12時間後に肺および血液中の細菌力価を評価した(図7C)。CD38KOマウスの肺における細菌力価は、WT対照に比べて5倍上昇した。しかし、CD38KOマウスの血液における細菌負荷量は、WTマウスにおけるよりも200~500倍多く、このことは、CD38KOマウスでは細菌は速やかに広がることを示していた。

【0162】

骨髄細胞またはリンパ細胞が細菌拡散の増大を担ったかどうかを決定するために、Rag-2 KOマウス(Shin Kaiら、1992年、*Cell*, 68巻、855~867頁)(これはリンパ球を欠損しているが、全ての骨髄細胞上でCD38を発現することができる)、およびCD38-Rag-2二重ノックアウトマウス(これはリンパ球を欠損しており、その骨髄細胞上にCD38を発現することができない)に1000 CFUの肺炎連鎖球菌を感染させ、次いで、12時間後に肺および血液中の細菌力価を測定した(図7C)。リンパ球欠損性CD38-Rag-2二重KOマウスの肺および血液における細菌力価は、CD38KOマウスに見られるのと同じくらい高く、Rag-2 KOまたはWTマウスに比べて有意に上昇した。このように、CD38欠損性骨髄細胞は、CD38KOマウスの肺炎連鎖球菌に対する感受性増大に関与する。

【0163】

CD38欠損性好中球は、感染および炎症の部位に蓄積しない。骨髄細胞が、肺炎連鎖球菌に感染したCD38KO動物の肺に好適にリクルートされたかどうかを試験するために、CD38KOマウスおよびWTマウスを感染させ、次いで、感染後に肺の気道にリクルートされた細胞を計数した。CD38KO動物およびWT動物の気道における細胞の総数は、感染の6時間後から18時間後まで均等に増大した(図8A)。しかし、好中球はWT動物の肺で感染の12~18時間後に見られる優勢な細胞型であり、一方、CD38KO動物の肺における細胞の浸潤は、主にマクロファージから構成されていた(図8B~C)。このように、CD38は、感染および炎症の部位へ

の好中球の持続的なリクルートに必要とされていると思われる。

【0164】

CD38欠損性好中球は、化学誘引物質であるfMLPに対する走化性応答不全を示す。好中球は、局所細胞によって、および侵入する病原体によって生成されるケモカインおよび化学誘引物質の勾配に応答して、感染部位へと遊走する(Hubら、1996年、Chemoattractant Ligands and Their Receptors(Horuk編)、301~325頁(CRC Press、Boca Raton、フロリダ州);Servant Gら、2000年、Science、287巻、1037~1040頁;Gao,J.L.、1999年、J.Exp.Med、189巻、657~662頁)。化学誘引物質は、好中球を速やかに活性化し、ランダムな遊走を誘導する(ケモキネシス)。走化性勾配が存在する場合は、活性化された好中球は、勾配の最高濃度に向けてその先端を極性化し、一方向に遊走する(走化性)。好中球は、ホルミル-メチオニル-ロイシル-フェニアラニン(fMLP)などの細菌由来のホルミル化されたものによるそれらのN-ホルミルペプチド受容体(FPR)が刺激されると、感染部位に帰巢することが、以前に示された。CD38KO好中球が、fMLPへの走化性を示すそれらの能力を欠いているかどうかを試験するために、トランスウェルの交差式アッセイ(checkerboard assay)においてケモキネシスおよび走化性により遊走するCD38KOおよびWT好中球の能力を測定した(Falkら、1980年、J. Immunol. Methods、33巻、239~247頁)(図8D)。fMLPが、上部および底部のチャンバーに存在しなかった場合、またはfMLPが上部のチャンバーのみに配置された場合は、わずか(<2300細胞)であるが同等の数のCD38KOおよびWTの好中球が底部チャンバーへと遊走した。上部および底部のチャンバーに同等濃度のfMLPが存在した場合は(ケモキネシス状態)、増大しているが同程度の数のWTおよびCD38KOの好中球が、底部チャンバーへと遊走し、このことは、活性化を誘導したfMLPに対するケモキネシスは、CD38KOとWT好中球との間で同等であったことを示していた。fMLPが底部チャンバーだけに存在した場合(走化性状態)は、WT好中球の底部チャンバーへの遊走がさらに増大した。しかし、CD38KOの好中球は、fMLP勾配が存在しない場合よりも走化性勾配が存在する場合の方がほんのわずか良好に遊走し、このことは、CD38KOの好中球は細菌性化学誘引物質により活性化されて遊走することができるが、走化性勾配には従うことができないことを示していた。これがCD38KOの好中球の一般的な性質であるのかどうかを判定するために、好中球の強力な活性化物質であるケモカインIL-8(Baggioliniら、1989年、J.Clin.Invest、84巻、1045~1049頁)を用いて、同じ実験を行った。fMLPを用いて観察されたことと対照的に、CD38KOおよびWT好中球の、IL-8により誘導された走化性は同等であった(図8D)。このように、これらのデータは、CD38KOの好中球では、全てではないがいくつかの化学誘引物質に対する走化性応答が欠損していることを示している。

【0165】

CD38は、好中球上で発現され、酵素的に活性である。CD38KOの好中球は、走化性において内因的な欠損を有すると思われるので、マウスおよびヒトの好中球上のCD38の発現および酵素活性を測定した。WTマウスの骨髄および血液から単離された好中球は、CD38を明らかに発現し(図9A)、同様にヒト末梢血の好中球もCD38を発現した(図9B)。興味深いことに、WTマウスに炎症物質であるチオグリコール酸を腹腔内注射した場合、血液および腹腔から単離した好中球上におけるCD38の発現は著しく増大した(図9D)。次に、CD38発現性好中球がシクラーゼ反応を触媒することができるかどうかを試験するために、WTおよびCD38KOの好中球をNAD+類似体であるニコチンアミドグアニンジヌクレオチド(NGD)と共にインキュベートし、次いで、蛍光化合物であるサイクリックGDP-リボース(Graeffら、1994年、J.Biol.Chem、269巻、30260~30267頁)(cGDP)へのNGDの環化を測定した。図9Cに示すように、CD38KOの好中球ではなく、WTの好中球が、NGDとインキュベートすると速やかにcGDPを生成するが、このことは、CD38発現性の好中球には環状のヌクレオチドを生成する能力があることを示していた。

【0166】

cADPRおよびリアノジンは、好中球における細胞内カルシウム放出を誘導する。cADPRはリアノジン受容体(RyR)依存性貯蔵を通じた細胞内カルシウム放出を誘導するので(Galioneら、1991年、Science、253巻、1143~1146頁)、RyR/cADPRカルシウムシグナリング経路

が好中球において機能的であるかどうかを試験した。RT-PCR分析により、好中球はRyR3のmRNAを発現するが(Sorrentino, V. ら、1993年、TIPS、14巻、98～103頁; Hakamata Y. ら、1992年、FEBS Lett、312巻、229～235頁)、脳で見られるよりもずっと低レベルであることが示された(図9D)。好中球によって発現されるRyRが機能的であるかどうかを試験するために、カルシウム不含バッファーで透過処理し、次いでリアノジンで刺激した好中球において、細胞内カルシウムレベル($[Ca^{2+}]_i$)を測定した(図9E)。リアノジン刺激した好中球において $[Ca^{2+}]_i$ の少しではあるが再現性のある増大が観察されたが、それはRyR阻害剤であるルテニウムレッドによって阻止することができた(Galione ら、1991年、Science、253巻、1143～1146頁)。次に、cADPRは、好中球における細胞内カルシウム放出を誘導することができるかどうかを試験するために、カルシウム不含バッファーで好中球を透過処理し、次いで精製したcADPRで細胞を刺激した(図9F)。細胞内の遊離のカルシウムの少しではあるが容易に検出可能な増加が観察された。熱不活性化によりcADPRをまず加水分解した場合(Lee ら、1989年、J. Biol. Chem.、264巻、1608～1615頁)、またはRyRへのcADPRの結合に対して競合的に拮抗するcADPRの不活性類似体である8-Br-cADPRで細胞を前処理した場合(Guse ら、1994年、Annu. Rev. Immunol、12巻、593～633頁)は、カルシウムの放出は観察されなかった。アンタゴニストである8-Br-cADPRの、cADPRが媒介するカルシウム放出に対する特異性は、タブシガルジンが媒介する細胞内遊離カルシウムの蓄積を8-Br-cADPRが阻止することができなかったことを示すことにより、さらに実証された(図9G)。合わせて、データは、好中球におけるRyRおよびcADPR媒介メカニズムにより細胞内カルシウムが放出され得ることを実証している。

10

20

【0167】

CD38により触媒されるcADPRは、fMLPにより活性化された好中球における細胞外カルシウム流入に必要である。ケモカイン/化学誘引物質のGタンパク質共役型受容体、例えばR受容体およびIL-8受容体を介したシグナリングは、細胞内カルシウムの放出と細胞外カルシウムの流入とが組み合わさることにより、 $[Ca^{2+}]_i$ の増大をもたらす(Murphy, P.M.、1994年、Annu. Rev. Immunol、12巻、593～633頁; Demaurex N. ら、1994年、Biochem J.、297巻、595～601頁; Schott W. ら、1999年、Eur. J. Immunol、29巻、897～904頁; Lew ら、1989年、Eur. J. Clin. Invest.、19巻、338～346頁)。CD38KOの好中球は、fMLPに対する走化性アッセイにおいて不全を示し、カルシウム動員性代謝物であるcADPRを生成する能力を欠いていたので、fMLPに応答したカルシウムの動員は、CD38KOの好中球で欠損しているであろうと仮定された。これを試験するために、CD38KOまたはWTの好中球を、カルシウム不含培地でfMLPまたはIT₂-8で刺激し、細胞内カルシウムの放出を測定した(図10A)。fMLP刺激したWT好中球では細胞内カルシウムの即時の急激な上昇が観察され、これは次の5分間にわたって徐々に低下した。これとは対照的に、fMLP刺激したCD38KO細胞では、fMLP刺激後に $[Ca^{2+}]_i$ のレベルが約20%低下し、 $[Ca^{2+}]_i$ は少なくとも2分早くベースラインまで低下した。fMLP刺激したCD38KOの好中球に見られた $[Ca^{2+}]_i$ の低下とは異なり、IL-8刺激したCD38KOおよびWT好中球の $[Ca^{2+}]_i$ は同じであった。このように、これらのデータは、CD38は、IL-8ではなくfMLPの刺激後の最適な細胞内カルシウム放出に必要であり得ることを示唆していた。

30

【0168】

次に、CD38が細胞外カルシウム流入に必要とされていたかどうかを評価するために、刺激したCD38KOまたはWT好中球を、カルシウム含有培地において、fMLPまたはIL-8で刺激した(図10B)。本発明者らがfMLPをWT好中球に加えた場合、細胞内カルシウム放出により、 $[Ca^{2+}]_i$ の急激な上昇が観察され、さらに細胞外カルシウム流入により $[Ca^{2+}]_i$ における第2の拡張された増大が観察された。これとは顕著な対照をなすように、その応答のカルシウム流入期は、fMLP刺激したCD38KOの好中球においては実質的に排除された。興味深いことに、カルシウム含有培地でWTおよびCD38KOの好中球をIL-8で刺激した場合、WTおよびCD38KOの好中球の両方において、IL-8は $[Ca^{2+}]_i$ における即時の同等な増大を誘導し、それは急速にベースラインレベルまで低下したことが見出されたが、このことは、IL-8がWTまたはCD38KOの好中球のいずれかでは細胞外カルシウム流入を誘導しなかったことを示してい

40

50

た。

【0169】

cADPRは、fMLPにより刺激された好中球においてカルシウムの動員を制御するかどうかを決定するために、CD38KOおよびWTの好中球を、漸増濃度のcADPRアンタゴニストである8-Br-cADPRとともにプレインキュベートし、次いでfMLPまたはIL-8で刺激した(図10C)。8-Br-cADPRで処理したWT細胞をfMLPで刺激した場合、細胞内カルシウムの放出、および細胞外カルシウムの流入は、用量依存的様式で、CD38KO細胞に見られるレベルまで低下した。これとは対照的に、IL-8で刺激した好中球に8-Br-cADPRを添加しても、WTまたはCD38KOのいずれの好中球の $[Ca^{2+}]_i$ に対しても全く効果がなかった。まとめると、これらのデータは、CD38が生成するcADPRは、fMLPに応答した細胞内カルシウムの放出および細胞外カルシウムの流入を制御することを示しており、またCD38もcADPRも、IL-8によって刺激された好中球におけるカルシウムの動員に必要ではないことを示している。

【0170】

CD38によって触媒されるcADPRは、好中球のfMLPへの走化性に必要であるが、IL-8への走化性には必要ではない。cADPRが媒介するカルシウム動員が、AMPへの走化性に必要であるかどうかを試験するために、WT好中球をEGTAまたは8-Br-cADPRのいずれかと共にプレインキュベートし、次いで、交差式走化性アッセイにおけるfMLPまたはIL-8への走化性を測定した(図10D)。WT好中球(前処理なし)を上部チャンバー中の培地および底部チャンバー中のfMLPまたはIL-8を用いてインキュベートした場合、細胞は底部チャンバーに効率よく遊走した。しかし、細胞外カルシウムをEGTAによってキレートした場合、または細胞をcADPRアンタゴニストである8-Br-cADPRを用いて前処理した場合は、WT好中球のfMLPへの走化性は、80%を超える低減を示した。重要なことに、EGTAまたは8-Br-cADPR処理は、好中球がIL-8へと走化する能力に全く影響を及ぼさなかった。このように、cADPRが媒介する細胞内カルシウム放出によって制御される細胞外カルシウム流入は、EMLPが誘導する好中球の走化性に必要である。

【0171】

NAD⁺の類似体は、好中球のfMLPへの走化性を、CD-38依存的様式で阻害するが、IL-8への走化性は阻害しない。CD38が触媒するcADPRは好中球のfMLPへの走化性に必要であると思われたことから、走化性は、CD38がcADPRシグナリング経路のアンタゴニストに変換され得るNAD⁺類似体で好中球を処理することにより阻害され得ることが予測された。この予測を試験するために、好中球を、CD38により、本発明者らの以前の実験で用いたcADPRアンタゴニストである8-Br-cADPRに変換され得る基質であるニコチンアミド8-プロモアデニンジヌクレオチド(N(S-Br-A)D⁺)で前処理した。N(8-Br-A)D⁺が、fMLPにより活性化された好中球における細胞外カルシウム流入を変化させるかどうかを最初に試験するために、WT好中球をN(8-Br-A)D⁺で前処理し、その細胞をAMPで刺激し、次いで $[Ca^{2+}]_i$ を測定した(図11A)。N(8-Br-A)D⁺での前処理は、fMLP処理した好中球における細胞外カルシウムの進入を阻害した。次に、WTおよびCD38KOの好中球をN(8-Br-A)D⁺で前処理し、または培地中に単独で残し、その後、fMLP(図11B)またはIL-8(図11C)へ走化するそれらの能力を試験した。非処理のWT好中球は、fMLPおよびIL-8の両方に走化し、一方、非処理のCD38KO好中球はfMLPへ走化することができなかったがIL-8へは走化することができた。興味深いことに、N(8-Br-A)D⁺でWT好中球を前処理すると、fMLPへの好中球の走化性を著しく低減するが、IL-8へ走化する能力には影響を及ぼさなかった。CD38KOの好中球をN(8-Br-A)D⁺で前処理しても、fMLPまたはIL-8のいずれかに対するCD38KO好中球の走化性に対して影響は及ぼさず、このことは、N(8-Br-A)D⁺が誘導する、fMLPが媒介する走化性の阻害は、CD38依存性であったことを示していた。まとめると、データは、NAD⁺類似体は好中球のカルシウム応答および走化性をCD38依存的様式で制御することができることを実証している。

【0172】

7. 実施例:アレルギー性肺疾患のマウスモデルおよびCD38の役割

以下のサブセクションは、CD38欠損性好酸球は、アレルゲンによって誘発される気道炎症の部位にリクルートされることができないことを実証するデータを記載している。

【0173】

7.1 材料と方法

OVAの抗原刺激および感作。C57BL/6 WTマウスに、ミョウバンに吸着させたニワトリアルブミン(OVA)20 μ gを腹腔内投与で免疫化した。免疫化したマウスを、免疫化30日後に屠殺し、OVAで抗原刺激したCD4 T細胞を、抗CD4と直接コンジュゲート化したMACS磁性ビーズを用いて、脾臓から精製した。ナイーブCD4 T細胞を、非免疫化C57BL/6 WTマウスから、抗CD4コンジュゲート化MACSビーズを用いて精製した。ナイーブT細胞またはOVAで抗原刺激したT細胞を、C57BL/6のWTまたはCD38KOのレシピエントのいずれかに、マウス1匹あたり 1×10^7 個のCD4 T細胞を静脈注射して、各々図11AおよびBに示した10匹のマウスからなるグループを4つ作製した。次いで、レシピエントのマウスを、T細胞移植の直後の連続した7日間の各日に、OVA 10 μ gのPBS溶液で気管内投与により感作した。T細胞移植後8日目にマウスを屠殺し、浸潤している細胞を気道および肺の肺胞から、上記、セクション6.2.2.に記載したようにして、気管支肺胞洗浄により除去した。次いで、全細胞を血球計算器上で計数することにより数え、そして細胞をスライドガラス上で遠心し、Diff-Quickで染色し、400倍でスライド1枚あたり少なくとも200個の細胞を同定することにより、分別細胞計数を行った。

【0174】

7.2 結果

CD38が、好中球以外の細胞の肺へのリクルートをコントロールするかどうかを決定するために、ヒトの喘息の多くの性質を模擬するアレルギー性肺疾患のマウスモデルを用いた(Lloyd CMら、2001年、Adv.Immunol.、77巻、263~295頁)。喘息の重要な構成要素は気道の炎症であり、これは肺にリクルートされた好酸球の活性によって誘発されるかまたは増悪されると考えられている。好酸球は、喘息の病理の主要な原因であるが(Broide,DHら、1991年、J.Allergy Clin.Immunol.、88巻、637~648頁)、そのリクルートおよび機能は、アレルギー性抗原に対して抗原刺激されたT細胞により制御されていると思われる(Gavettら、1994年、Respir.Cell Mol.Biol.、10巻、587~593頁)。このようなT細胞は、IL-4、IL-5、およびIL-13などのタイプ2のサイトカイン、ならびにエオタキシンなどのケモカインをしばしば生成する(Cohn,L.ら、1988年、J.Immunol.、161巻、3813~3816頁;Drazen JMら、1996年、J.Exper Med.、183巻、1~5頁)。T細胞の活性化に対してCD38が及ぼすあらゆる影響とは無関係に好酸球のリクルートを制御するCD38の能力を試験するために、WTマウスを抗原OVAで免疫化した。30日後、OVAで抗原刺激したこれらのマウスからのCD4 T細胞を、WTまたはCD38KOいずれかのレシピエントに導入した。対照として、ナイーブCD4 T細胞を、非免疫化WTマウスから、WTまたはCD38KOレシピエントのいずれかへと移植した。次いで、レシピエントのマウスを、T細胞移植直後の連続した8日間の各日に、OVA 10 μ gのPBS溶液を気管内投与して感作した。T細胞移植後の9日目にマウスを屠殺し肺の気道における細胞を数え上げた。

【0175】

図12Aに見られるように、ナイーブCD4 T細胞または抗原刺激したCD4 T細胞のどちらを受容したかにかかわらず、かなりの数の好中球がWTマウスの気道にリクルートされた。これとは対照的に、抗原刺激したT細胞を受容したCD38KOマウスは、ナイーブT細胞を受容したCD38KOマウスよりも気道において顕著に多い好中球を有しており、CD38KOマウスの気道にはWTマウスの気道に比べて比較的少数の好中球しかリクルートされなかった。このように、アレルギー性気道疾患のモデルにおける好中球の肺へのリクルートも、CD38の発現に依存している。

【0176】

顕著なことに、OVA感作したマウスの気道への好酸球のリクルートは、抗原刺激したCD4 T細胞とCD38の発現との両方の存在に依存していた。図12Bに見られるように、抗原刺激したCD4 T細胞を受容したCD38KOマウスの肺にリクルートされた好酸球の数は、抗原刺激したCD4 T細胞を受容したWTマウスにおける数に比べて30倍減少しており、ナイーブCD4 T細胞を受容したCD38KOマウスの気道にリクルートされた好酸球の数は、ナイーブCD4 T細胞

胞を受容したWTマウスにおける数に比べて10倍の減少していた。したがって、アレルギー性気道疾患のモデルにおける肺への好酸球のリクルートも、CD38に依存している。

【0177】

8. 実施例:マンソン住血吸虫(*S. mansoni*)CD38ホモログのクローニング

以下のサブセクションは、SM38と呼ばれるマンソン住血吸虫(*S. mansoni*)CD38ホモログのクローニングおよび配列決定を記載している。マンソン住血吸虫などの蠕虫は、殆どの無脊椎動物、脊椎動物、および植物種に感染し、病因を引き起こし得る寄生虫として広義に定義されている。住血吸虫属(*Schistosoma*)は、その最終生育環境が温血脊椎動物の血流である寄生性扁形動物群からなる。マンソン住血吸虫を含む住血吸虫属の4種は、1年あたり2~4億人のヒトに疾患を引き起こし、毎年最高100万人が死んでいる(WHO、1996年)。さらに、少なくとも2種の住血吸虫は、家畜化されたウシおよびヒツジに感染し、重大な経済上の損失をもたらしている。したがって、感染したヒトおよび/または動物を治療するのに用いることができる効果的な抗生物質薬を開発することは有益である。住血吸虫感染の病原性は、主に、成虫が、ヒトおよび動物の様々な組織および臓器中に卵を産みつけて、その組織および臓器において次いで肉芽腫が生じ、それが線維症および組織損傷をもたらすことにより引き起こされる。しかし、セルカリア(未成熟の虫体)および完全に成熟した虫体も、数々のタンパク質および脂質メディエータを放出し、これらは炎症性免疫反応をも誘導し得る(Fusco, ACら、1991年、J.Paristol.、77巻、649~657頁)。住血吸虫症における最適な治療は、虫体の外皮を横切るカルシウム流入を誘導しそれが即時の筋収縮および麻痺を引き起こすと思われる薬物であるプラジカンテルである(Kohn, ABら、2001年、J.Biol.Chem、276巻、36873~36876頁)。このように、住血吸虫の、特に筋肉内の、カルシウム応答をモジュレートする薬物は、この疾患の治療に有効であり得る。

【0178】

8.1 材料と方法

8.1.1 マンソン住血吸虫(*Shistosoma mansoni*)CD38ホモログのクローニング

Genbankアクセッション番号AW017229に見られるEST配列に対応するプライマーを作成した。(5'プライマー: acatctttgtggtactgaatggctcgg、および3'プライマー: tgagtaatgtctcgacgtttgacctcg)。マンソン住血吸虫のcDNAライブラリーを、Phillip Lo Verde博士(SUNY, Buffalo)から入手し、上記に示したプライマーを用いてPCRにかけた。ライブラリー(1~20 μ l)およびdH₂Oを10分間70°Cに加熱し、次いで、PCR試薬の残りを加えてサイクル反応にかけた。サイクルは、95°C5分を1サイクル、その後95°C1分、65°C1分、および72°C2分を35サイクル、その後72°C5分間を1サイクルであった。EST AW017229に対応する予測上330bpのバンドを単離し、TOPOクローニングし、次いでそれをプローブとして用いてマンソン住血吸虫のcDNAライブラリーからの250000個のプラークをスクリーニングした。陽性を5個単離し、次いで、プラークの純粋なクローンを生成するためにさらに3ラウンドのスクリーニングにかけた。全部で5個のクローンを、両鎖について完全に配列決定した。それらクローンのうち4個のヌクレオチド配列およびアミノ酸の翻訳は同一であった(それをSM38と称した)。終止コドンおよびポリアデニル化部位は、SM38クローンの全てで同一であったが、開始メチオニンはどのクローンにも存在しなかった。SM38遺伝子の5'末端を得るために、単一プライマー伸長法(NAR、1994年、22巻、16号、3427~3248頁)を用いた。PCRの最初のラウンドを、外部SM38プライマー(5'catcgaataaccctgatttcataacac)およびBluescriptに対するユニバーサルリバースプライマーを用いて行った。次いで、この反応物の2 μ Lを、内部ネステッドSM38プライマー(5'gataaagtaagaactcgtgcc)およびユニバーサルリバースプライマーを用いてPCRにかけた。200および300 bpバンドをこの反応物から同定し、直接配列決定した。得られた配列は、SM38クローンの5'末端と124 bpオーバーラップし、追加の153bpの配列を含んでいたが、終止コドンは検出されず、このことは本発明者らがその遺伝子の5'末端を未だ得ていないことを示していた。したがって、古典的な5' RACE(PNAS、85巻、8998頁~9002頁、1998年12月)を、マンソン住血吸虫の成虫から単離したRNAから調製したcDNAを用いて行った(RNAは、SUNY BuffaloのP.LoVerde博士から提供された)。10×Taqバッファー、dNTPs、cDNA、およびExpand High Fidelity TaqをdT-APブラ

イマーと混合し(詳しくは、参考文献を参照されたい)、95℃5分、その後50℃2分および72℃40分を繰り返した。この40分のインキュベート後、5'外部SM38プライマー(上記を参照されたい)およびAPプライマーを加え、95℃15秒、47℃30秒、72℃2分の条件下で35サイクル繰り返し、その後72℃で5分間伸長させた。反応物を、1.5%アガロースゲル上で泳動し、300bpバンドを、Qiagen Gel Kitを用いて単離した。5'RACE産物を、APおよび5'外部SM38プライマーを用いて直接配列決定した。2つの潜在的な開始メチオニンがその配列中に同定され、2つの終止コドンが、メチオニン残基の13~19アミノ酸上流で見出された。そのRACE産物を、次にクローニングした。SM38配列を含む3つのクローンは全て(PCRで産生したクローンが2つおよびマンソン住血吸虫cDNAライブラリーからのクローンが1つ)は、隣接しておりオーバーラップしていた。組立てると、SM38配列は、5'非翻訳配列、2つの潜在的な開始メチオニン、303個のアミノ酸からなるタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム、終止コドン、3'非翻訳配列、およびポリアデニル化部位を含む1049bpの配列を含んでいた。

10

【0179】

8.2 結果

住血吸虫の筋線維におけるカルシウム応答をモジュレートする薬物は、有効な抗蠕虫薬であると思われるため(Kohnら、2001年、J.Biol.Chem.、276巻、36873~36876頁)、本発明者らは、住血吸虫の、特異的なカルシウムモジュレート性標的の同定に着手した。住血吸虫は、その筋線維内でリアノジン受容体(RyR)を発現することが、最近示されている(Dayら、2000年、Parasitol.、120巻、417~420頁;Silvaら、1998年、Biochem.Pharmacol.、56巻、997~1003頁)。脊椎動物の平滑筋および骨格筋で発現されるRyRのアゴニストは、細胞内カルシウム放出、電位依存性カルシウム流入、および筋収縮を制御することが知られている。興味深いことに、カフェインなどのRyRアゴニストで処理したマンソン住血吸虫の筋線維は、細胞内カルシウムの放出を誘導し、筋線維の収縮を誘導した。カフェインなどの薬物は、RyR依存性カルシウム応答をモジュレートすることができるが、少なくとも脊椎動物の筋線維におけるRyRの生理学的モジュレーターはサイクリックADP-リボース(cADPR)である。cADPRは、哺乳動物のCD38タンパク質および無脊椎動物のアメフラシ属のシクラーゼ酵素などのADP-リボシルシクラーゼ酵素により生成される公知のカルシウム動員性代謝物である。住血吸虫は、カルシウム動員性の二次メッセンジャーであるcADPRを生成することができる酵素を発現するかどうかを決定するために、翻訳された場合に哺乳動物CD38およびアメフラシ属酵素に対して相同性を有する住血吸虫の配列を探索して、公的に利用可能なEST配列の検索を行った。隣接しオーバーラップする配列へと組み立てられ得る3つのEST配列(EST A1067047、EST AW017229、およびEST N20756)が同定された(図13)。この組み立てられた配列は、CD38およびアメフラシ属のシクラーゼ酵素の両方に対して、限定されているが有意な相同性を共有していた。

20

30

【0180】

組み立てられたESTが、実際に真正のcDNAを表しているかどうかを判定するために、EST AW017229の配列からプライマーを調製し、マンソン住血吸虫のcDNAライブラリーに対してPCRを行った。そのPCR反応から330塩基対の断片を単離し、配列決定した。予想通り、断片の配列は、ESTの配列に一致していた。次いで、断片をプローブとして用いて、マンソン住血吸虫のcDNAライブラリーから250,000個のプラークをスクリーニングした。ESTプローブにハイブリダイズした独立したプラーク5個を単離し、プラークを精製し、両方のDNA鎖について配列決定した。次いで、配列情報を用いてさらなるプライマーを設計して、cDNAの5'末端を単離した(方法を参照されたい)。次いで、マンソン住血吸虫ライブラリーから単離した完全cDNA配列を組み立てて、ESTと比較した。図13に示したアラインメントは、EST配列の隣接した組み立てが正確であり、そのクローニングしたcDNA(SM38と呼ぶ)は、いかなるESTにも見出されなかったさらなる421塩基対の配列をさらに含んでいたことを示している。DNA配列の翻訳により、シクラーゼ酵素に典型的な構造モチーフを含む299アミノ酸の配列(図13)を生じた(Prased,GS、1996年、Nature Struct.biol.、3巻、957~964頁)。特に、SM38タンパク質は、アメフラシ属シクラーゼ酵素(Munshi Cら、1999年、J.

40

50

Biol.Chem., 274巻、30770～30777頁)、および哺乳動物CD38(Munshi C,ら、2000年、J.Biol.Chem., 275巻、21566～21571頁;GraeffR、2001年、J.Biol.Chem., 276巻、12169～12173頁)に認められる重要な触媒および活性部位の残基にアラインする保存されたアミノ酸残基を含んでいる(図15A～B)。さらに、シクラーゼ酵素の三次構造の構築に重要なシステイン残基(Prasad GSら、1996年、Nature Struct.biol., 3巻、957～964頁)も、SM38では保存されている(図14A～B)。重要なことに、SM38のcDNA配列は、完全なシクラーゼ酵素ドメインをコードしている。

【0181】

これらの結果に基づいて、本発明者らは、マンソン住血吸虫などの住血吸虫は、カルシウム動員性の二次メッセンジャーであるcADPRの生成を触媒することができる酵素に対して構造レベルで高度に相同性であるタンパク質(SM38)をコードすることを示した。住血吸虫は、cADPRに応答して細胞内カルシウムを放出するRyRも発現するので、SM38は住血吸虫におけるカルシウム応答を制御することができることが予想される。さらに、特に住血吸虫の筋線維において、カルシウム流入を制御すると、虫体の麻痺および排除をもたらし得るので、本発明者らは、住血吸虫におけるSM38およびRyR経路のアゴニストまたはアンタゴニストは、抗蠕虫薬として有効であり得ると予想する。

【0182】

9. 実施例:SM38の特徴付け

以下のサブセクションは、住血吸虫のSM38が、他のシクラーゼファミリーメンバーの全てに構造的に類似しており、またそれがNAD⁺グリコヒドロラーゼ、ADP-リボシルシクラーゼ、cADPRヒドロラーゼ、およびグリコシル交換反応を触媒することができることを実証するものである。このサブセクションはまた、SM38が成虫の外側の外皮上にGPI固定タンパク質として発現され、したがって、理想的なワクチン標的候補であると同時に小分子の酵素アンタゴニストに対する潜在的な標的であることも実証するものである。

【0183】

9.1 材料と方法

9.1.1 SM38クローニング

シクラーゼファミリーメンバーに対するコンセンサスアミノ酸配列(Prasadら、1996年、Nature Struct.Biol., 3巻、957～964頁)を用いたブラスト(blast)検索を行い、マンソン住血吸虫から単離したEST(アクセッション番号AW017229)を同定した。ESTに特異的なプライマー(図13を参照されたい)を合成し(Sigma/Genosys)、330bpのcDNAを、成虫のペアから単離したpolyA⁺ mRNAから構築したラムダZAP II cDNAライブラリーからPCR増幅によりクローニングした(47)。cDNAクローンの配列を確認し、そのPCR産物をプローブとして用いて、cDNAライブラリーから多数の独立したオーバーラップするクローンを単離した。コード配列全体を含む完全長のクローンを同定した(SM38-天然、アクセッション番号AY826981)。マンソン住血吸虫のSM38に対するヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、BLAST検索に用いて日本住血吸虫(*S. japonicum*)のSM38オーソログを同定した(アクセッション番号AY222890; Huら、2003年、Nat Genet、35巻、139～147頁参照)。

【0184】

9.1.2 SM38配列比較および構造モデリング

マンソン住血吸虫のSM38のアミノ酸配列を、シクラーゼファミリーのメンバーに対して報告されている配列(アクセッション番号:NM_007646(マウスCD38)、NM_013127(ラットCD38)、AF272974(ウサギCD38)、NM_001775(ヒトCD38)、AF117714(イヌCD38)、NM_175798(ウシCD38)、NM_009763(マウスCD157)、NM_030848(ラットCD157)、NM_004334(ヒトCD157)、AY222890(日本住血吸虫SM38)、D38536(アメフラシ(*A. kurodai*)シクラーゼ)およびM85206(ジャンボアメフラシ(*A. californica*)シクラーゼ)と、CLUSTAL Wマルチプル配列アラインメントプログラム(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)(Higginsら、1996年、Methods Enzymol、266巻、383～402頁)を用いてアラインさせた。マンソン住血吸虫のSM38と、他の公知のシクラーゼファミリーメンバー全てとの関連性を比較する系統樹解析を、進化的関連性プログラム(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)を用いて行った。SM38の3次元構造を、M

odeller(Marti-Renomら、2000年、Annu Rev Biophys Biomol Struct、29巻、291～325頁)およびAMBER5を用いたエネルギー最小化を用いて、アメフラシ属ADP-リボシルシクラーゼ(PDB entry 1lbe)およびヒトBST1/CD157(PDB entry 1isf)の両方の結晶学的座標に基づくホモロジーモデリングにより得た。

【0185】

9.1.3 SM38構築物

マンソン住血吸虫SM38(SM38-天然)の一次ヌクレオチド配列を、哺乳動物のコドン使用に対して最適化し、再合成し(GENEART、Regensburg、ドイツ)、次いでそれを、哺乳動物発現ベクターであるpcDNA3.1中にクローニングした(SM38-optと呼ぶ)。SM38-optの免疫沈降および免疫蛍光分析を容易にするために、SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)(Bendtsenら、2004年、J Mol Biol、340巻、783～795頁)、およびPhobiusプログラム(<http://pobius.binf.ku.dk/>)(Kallら、2004年、J.Mol.Biol.、338巻、1027～1036頁)によって同定された、SM38-天然の5'リーダー配列(配列に関しては図15を参照されたい)を、哺乳動物のCD8αリーダー配列およびFLAGタグ(Howardら、1993年、Science、262巻、1056～1059頁を参考;構築物はCD8L/FLAG-SM38と呼ぶ)で置換した。組換え可溶性SM38をCOS-7細胞で作製するために、ω部位(GPI付着部位。配列については図15を参照されたい;Eisenhaberら、1998年、Protein Eng、11巻、1155～1161頁を参照されたい)に対するコンセンサス配列により同定されたGPIアンカー配列を、CD8L/FLAG-SM38から除去した(この構築物はCD8L/FLAG-SM38ΔGPIと呼ばれる)。酵母中で可溶性の組換えSM38を生成するために、その5'リーダー配列およびその3'GPI固定配列を、SM38-optから排除し、残存するコアの外ドメイン配列を、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)発現ベクターpPICZαA(Invitrogen)中にクローニングした(構築物はsolSM38-Yと呼ばれる)。構築物全てを配列決定して、挿入および末端切断が存在すること、クローニングプロセスの際に残りのSM38コード領域の残りの部分に人工産物が導入されていないことを確認した。

【0186】

9.1.4 SM38に対するポリクローナル抗血清の生産および精製

C57BL/6Jマウスを、Trudeau Institute Animal Breeding facilityで繁殖させ、維持した。動物を伴う手順は全て、Trudeau Institute Institutional Animal Care and Use Committeeにより認可されたものであり、National Research Councilにより概要が示された原則に従って行った。0、28、および56日目に、CD8L/FLAG-SM38ベクター(1弾丸あたり1μg)およびアジュバントベクターであるpBOOST-mIL-4/IL1β(1弾丸あたり0.25μg、Invivogen)でコーティングした直径2.1μmの金の弾丸を用い、Helios Gene Gun(Bio Rad)を使用してマウスにワクチン接種した。10～14日、32～38日、および60～70日の間に、ワクチン接種したマウスから血清を回収した。抗血清をプールし、IgGを含む画分を、Melon Gel IgG Spin Purification kit(Pierce)を用いて濃縮した。

【0187】

9.1.5 SM38発現

哺乳動物細胞でSM38を発現させるために、COS-7細胞に、リポフェクタミン2000(Gibco)を用いて、10cmプレート1枚あたり30μgの、SM38-天然、CD8L/FLAG-SM38、またはCD8L/FLAG-SM38ΔGPI DNAを一過性にトランスフェクトした。72時間の時点で、馴化培地および/または細胞をプレートから収集し、以下に記載するようにして分析した。組換え可溶性SM38を酵母中で発現させるために、ピキア・パストリスGS115株(Invitrogen)に対し、線状化したsolSM38-Y構築物を用いてエレクトロポレーションエレクトロポレーションし(1.8kV)、ゼオシン(200μg/ml)を含む培地中にプレーティングした。選択された形質転換体を、プロテアーゼ活性(54)を阻害するための1%Bactoカザミノ酸(Becton Dickinson)を含む、100ml BMGY(1%酵母抽出物、2%ペプトン、100mMリン酸カリウムバッファー(pH6.0)、アミノ酸不含の1.34%酵母窒素塩基、 4×10^{-5} %ビオチン、1%グリセロール)中で、振盪培養器中30℃で、培養物がOD₆₀₀=20に到達するまで増殖させた。細胞を、1500×gで5分間遠心することにより収集し、50mlの誘導培地BMMY(グリセロールが0.5%メタノールによって置き換えられたこと以外はBMGYと同じ組成である)に再懸濁した。誘導を、48時間、30℃で

維持した(24時間後、100%メタノールを加えて0.5%にした)。高発現性クローンを選択し、大規模生産用に用いた。

【0188】

9.1.5 可溶性の組換えSM38の精製

CD8L/FLAG-SM38 Δ GPIをトランスフェクトしたCOS-7細胞から可溶性の組換えSM38を精製するために、トランスフェクト72時間後に馴化培地を回収し、最終濃度の150mM NaClに調整し、次いで、0.45ミクロンのフィルターを通してろ過した。培地を、ANTI-FLAG M2-アガロースアフィニティーゲルカラム(Sigma、0.25mlの最終充填総容積)に通過させた。カラムを洗浄し、FLAGでタグ付けしたSM38を、250 μl画分中200 μg/mlのFLAGペプチド(Sigma)を用いて溶出した。画分をプールし、10K MWCOフィルター(Millipore)を用いて濃縮した。タンパク質濃度を、Nano Drop ND-1000分光光度計(Nano Drop Technologies、Wilming-

10

【0189】

メタノールで誘導したピキア・パストリスの上清中に可溶性タンパク質として分泌された組換えSM38を、1.2×4cm Blue Sepharose 6 Fast Flow CL-6Bカラム(Amersham Biosciences)上で1段階で精製した。10mMリン酸カリウムバッファー(pH7.4)に対して透析した後、培地を2ml/分でロードし、酵素を、同バッファー中NaClの0~1Mの線形勾配を用いて溶出した。この擬似アフィニティークロマトグラフィー工程を行って、正確にフォールディングした酵素が確実に得られるようにした。タンパク質濃度を、BSAを標準品として用いるBCAタンパク質アッセイ(Pierce)により決定した。

20

【0190】

9.1.6 銀染色およびウェスタンブロット分析

タンパク質を、還元条件下で、10%SDS-PAGEゲル上、4%スタッキングゲルで電気泳動することによって分離した。ゲルを、ウェスタンブロット分析用にPVDF-Plus(Osmonics)に転写し、またはそれを固定し、洗浄し、GelCode SilverSNAP Silver Stain Kit(Pierce)で染色した。ウェスタンブロット膜を、5%BSAでブロックし、ビオチン化した抗FLAG(Sigma、0.5 μg/ml)または抗SM38抗血清(1:2000希釈)と共に4℃で1.5時間インキュベートし、洗浄し、次いで、ストレプトアビジン-HRP(Southern Biotechnology)、または抗マウスIg(Jackson ImmunoResearch)のいずれかとともに1.5時間インキュベートした。ブロットを、高速または緩速発色性化学発光キット(Amersham)を用いて発色させた。

30

【0191】

9.1.7 免疫蛍光分析

COS-7細胞に、Lab Tek スライドチャンバー(Nunc)で、CD8L/FLAG-SM38または空のベクター対照を、一過性にトランスフェクトした。トランスフェクトの72時間後、細胞を4%パラホルムアルデヒドで5分間固定し、次いで洗浄し、5%BSAを含むdPBSでブロックした。マウス抗SM38抗血清を用いてSM38を検出するために、スライドを抗SM38(1:750希釈)または正常マウス血清(1:750)で染色し、洗浄し、次いでロバ抗マウスIgG-Alexa-594(Molecular Probes)で染色した。CD8L/FLAG-SM38のFLAGタグを検出するために、スライドをアビジン/ビオチンブロック(Vector)と共にインキュベートし、ビオチン化マウス抗FLAG抗体(Sigma)で染色し、洗浄し、次いでストレプトアビジン-Alexa-594(Molecular Probes)で発色させた。スライドは全て、DAPIマウント(Molecular Probes)で対比染色し、Zeiss Axioplan 2顕微鏡(Oberkochen、ドイツ)で明視野および蛍光の下で、Alexa-594を見るための560/40帯域フィルター、DAPIを見るための330/80帯域フィルターを用いて観察した。画像を、Zeiss AxioCamデジタルカメラでオリジナルの倍率の40倍でキャプチャーし、Zeiss専用ソフトウェアであるAxiovision3.0.6.0を用いて重ね合わせた。

40

【0192】

9.1.8 マンソン住血吸虫寄生体におけるSM38の局在

成虫の凍結切片を、抗SM38マウス血清(5 μg/ml)から単離したアフィニティー精製したIgG、または精製した正常マウスIgGで染色した。洗浄後、次いで、切片をビオチン化した二次抗マウスIgG(5 μg/ml、Jackson ImmunoResearch)を用いて染色し、洗浄し、次いで、

50

遠赤外フルオロフォアであるAlexaFluor 647-コンジュゲート化ストレプトアビジン(5 µg/ml、Molecular Probes)を用いて染色した。生存している寄生虫、およびアセトン固定した寄生虫(成虫および機械的に変態した幼住血吸虫、3時間齢)をホールマウントし、凍結切片について記載されているように抗SM38 IgGを用いて染色した。凍結切片およびホールマウントの寄生虫を、クリプトン-アルゴンレーザーならびに522nmおよび650nmフィルターを備えたBio-Rad MRC-1024共焦点顕微鏡を用いて調べた。最大波長647nmで発光するAlexaFluor647を用いてSM38を可視化したが、この場合、住血吸虫の切片におけるフェノール化合物によって生成される自己蛍光は、検出されない。ホールマウント成虫の蛍光の三次元構造は、ボクセルベースの三次元(3D)画像化プログラム(Voxx, v.2.55)を用いて、サブミクロンのレーザー切片から再構築した。

10

【0193】

9.1.9 蛍光分析酵素アッセイ

NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性を、先に記載したように、1,N⁶-エテノ-NAD⁺(ε-NAD⁺、Sigma)を用いて、蛍光分析法でアッセイした(Mullerら、1983年、Biochem.J.、212巻、459~464巻)。簡潔に述べると、細胞溶解物のアリコート、馴化培地、精製したSM38タンパク質(25~200ng)、セファロースビーズ上に免疫沈降したSM38(ビーズ25 µl)、または生存しているマンソン住血吸虫虫体(1アッセイあたり10匹)を、40~400 µMのε-NAD⁺の存在下、37°CでSpectraMAX GeminiXS蛍光プレートリーダー(Molecular Devices、Sunnyvale、カリフォルニア州)にて、96ウェル黒色マイクロプレート(Corning)内のHBSSに懸濁した(最終体積100 µl)。続いて次の30分間、蛍光生成物であるε-ADPRの、410nmでの蛍光発光(300nmで励起)が起こった。データを、時間ゼロでのブランク測定後の相対蛍光単位(RFU)で表した。GDP-リボシルシクラーゼ活性を、基質としてNGD⁺(Sigma、80~800 µM)を用いて同様にアッセイし(Graeffら、1994年、J.Biol.Chem.、269巻、30260~30267頁)、その後、蛍光生成物であるサイクリックGDP-リボース(発光410nm、励起310nm)の出現をアッセイした。

20

【0194】

ADP-リボシルシクラーゼ活性を、本質的に以前に記載されているようにして(Graeffら、2002年、Biochem J、361巻、379~384頁)、サイクリングアッセイ(cycling assay)を用いて測定した。該酵素を、反応が50%完了するまで、NAD⁺(200 µM)とともにバッファーA(最終体積1ml)中でインキュベートした。酵素を、限外ろ過ユニット(Vivaspin 2、Vivascience)で、5000×gで10分間、遠心することにより除去した。混在するヌクレオチドを除去し(ヌクレオチドピロホスファターゼ、アルカリホスファターゼ、およびNAD⁺グリコヒドロラーゼの存在下での37°Cでの一夜インキュベート後、限外ろ過ユニット上でのその3つの酵素を除去)、次いで、形成されたcADPRの量を、サイクリングアッセイを用いて算出した。簡潔に述べると、サンプル中に存在するcADPRのNAD⁺への変換は、サンプルをジャンボアメフラシのADP-リボシルシクラーゼ0.1 µg/mlおよび10mMニコチンアミドを含む100mMリン酸ナトリウムバッファー溶液(pH8.0)とともに室温で1時間インキュベートすることにより行った。次いで、0.8%エタノール、10mMニコチンアミド、40 µg/ml BSA、20 µg/mlジアフォラーゼ(活性炭で処理)、20 µg/mlアルコール脱水素酵素、10 µM FMNおよび20 µMレサズリンの存在下、同じバッファー中で、サイクル反応を進行させた。レソルフィン蛍光(励起544nm、および発光590nm)の増大を、蛍光プレートリーダー(BMG Labtechnologies IncからのFluoStar)を用いて、2時間の間毎分測定した。

30

40

【0195】

9.1.10 非蛍光分析酵素アッセイ

SM38の3つの活性全てを、ピキア・パストリスから精製した組換え酵素を用いて測定した。NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性を、先に記載されているように(Lundら、1999年、J.Immunol.、162巻、2693~2702頁)、[アデノシン-U-¹⁴C]NAD⁺ (2.5×10⁵dpm)の存在下で、飽和量(420 µM)または限定量(25 µM)のNAD⁺のもとで測定した。酵素を、10mMリン酸カリウムバッファー、pH7.4(バッファーA)に懸濁し、基質とともに37°Cでインキュベートした(最終体積200 µl)。選択された時間に、アリコート(50 µl)を取り出し、氷冷過塩素酸(最

50

終濃度2%)を加えることにより酵素活性を停止させた。3.5M K_2CO_3 による中和後、沈殿したタンパク質を遠心により除去した。次いで、生成物の形成を、以下に記載するようにHPLCによりモニターした。同じ実験条件をNGD⁺を用いて使用して、NGD⁺グリコヒドロラーゼおよびGDP-リボシルシクラーゼ活性の両方をアッセイした。次いで、生成物の形成を、以下に記載するようにHPLCによりC₁₈カラム上でモニターした。

【0196】

酵素存在下のバッファーA(反応体積200 μ l)中で、37°CでcADPR(20 μ M)をインキュベートすることにより、cADPRヒドロラーゼ活性を測定した。異なる時間点でアリコートを採取し、上記に記載したようにしてそれを処理し、HPLCによりC₁₈カラムで分析した。

【0197】

NADP⁺のグリコシド交換を、組換え可溶性SM38を、1mM NADP⁺および20~40mMのニコチン酸とともに10mMリン酸カリウムバッファー(pH6.0または7.4)中(最終体積500 μ l)で37°Cで20分間インキュベートすることにより測定した。反応混合液を、HPLCによりイオン交換カラムで分析した(以下を参照されたい)。反応生成物のHPLC分析を、アリコートについて、C₁₈カラムで行った(以下を参照されたい)。

【0198】

9.1.11 HPLCによる反応生成物の分析

生成物の分析を、HPLCにより、300×3.9 mm μ Bondapack C₁₈カラム(Waters Assoc., Milford, マサチューセッツ州)上で行った。その化合物を、0.8~1.2%(v/v)アセトニトリルを含む10mMリン酸アンモニウムバッファー、pH5.5によって流速1ml/分で定組成法で溶出させ、さらに、[¹⁴C]NAD⁺を用いた場合は放射性検出(Flo-one、Packard Radiometric Instruments、Meriden、コネチカット州)により、または260nmでの吸光度を記録することにより、検出した。NAADP⁺の形成を、Shimadzu HPLCシステムを用いて、150×4.6mm AG MP-1カラム(Interchrom)で分析することにより評価した。溶出を、100%溶媒A(水)で始めて、非線形勾配で、流速1ml/分で行った。溶媒B(1.5%TFA)のパーセンテージを、2分で1%、4分で2%、9分で4%、13分で8%、17分で16%、21分で32%、25分で100%へと線形的に増大させ、100%で10分間維持した。ピークを、真正のサンプルと比較することにより同定し、UV記録から得られた面積を、反応生成物のモル吸光係数を用いて標準化した。

【0199】

9.1.12 酵素反応速度論

アッセイを、異なる8つの基質濃度を用いて、可溶性組換え酵素の存在下、バッファーA中で37°Cで行った。反応の進行を、所与の時間に採取したアリコートのHPLC分析により、あるいはNGD⁺の場合には410nmでの蛍光(λ_{exc} =310nm)の変化をモニターすることにより、得た。反応速度論パラメータは、非線形回帰プログラム(GraphPad、Prism)を用いて、ミカエリス-メンテンの式に従って基質濃度の関数として初期速度のプロットから決定した。

【0200】

9.1.13 細胞および虫体溶解液の調製および膜ミクロソーム

COS-7細胞に、CD8L/FLAG-SM38、CD8L/FLAG-SM38 Δ GPI、または空のベクターを、72時間かけて、一過性に形質転換した。細胞を回収し、dPBSで洗浄し、使用するまで凍結した。マンソン住血吸虫の成虫のペアを、感染45日のゴールデンハムスターの門脈から回収し、dPBSで洗浄し、凍結した。COS-7細胞ペレットおよび虫体ペレットを、10mM Tris/HCl(pH7.3)、0.4mM EDTA、プロテアーゼ阻害剤、および1% Triton X-100(v/v)中に溶解し、界面活性剤に可溶性のタンパク質を回収した。いくつかの実験では、全体溶解液を用いてSM38酵素活性を分析し、一方、別の実験では、抗FLAGセファロースビーズ、または抗SM38抗血清でコーティングしたプロテインGビーズのいずれかを用いて、SM38を溶解液から免疫沈降した。

【0201】

マンソン住血吸虫の成虫から膜画分を調製するために、虫体2gを、1mM EDTAおよびプロテアーゼ阻害剤としての0.1mMフッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)を含む10mMリン酸

10

20

30

40

50

カリウムバッファー(pH7.4)中、ポター(potter)を用いて4℃で破壊した。ホモジネートを、10,000×gで15分間遠心し、ミトコンドリアを含まない上清を100,000×gで60分間遠心して、膜ミクロソーム画分を得た。膜画分を、10mMリン酸カリウムバッファー(pH7.4)2ml中に再懸濁した。

【0202】

9.1.14 ホスホリパーゼ処理

GPI固定されたタンパク質を一過性にトランスフェクトしたCOS-7細胞から切断するために、細胞をトランスフェクトの48時間後にHBSSで洗浄し、次いで、0.2Uホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼC(セレウス菌(*Bacillus cereus*)からのPI-PLC、Sigma)の存在下または非存在下のHBSSに、37℃で2時間にわたり再懸濁した。培地を取り出し、 ϵ -NAD⁺を基質として用いて、NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性についてアッセイした。マンソン住血吸虫の膜ミクロソーム画分からGPI固定されたタンパク質を切断するために、ミクロソーム200 μ lを、1UのPI-PLCの存在下または非存在下で、30℃で2時間、インキュベートした。次いで、画分を100000×gで60分間遠心し、その上清およびミクロソームを、上記に記載したようにNAD⁺グリコヒドロラーゼおよびNGD⁺シクラーゼ活性について試験した。マンソン住血吸虫の成虫からGPI固定されたタンパク質を切断するために、10匹の生存する虫体を0.4UのPI-PLCの存在下または非存在下で、37℃で2時間、HBSS 200 μ l中に懸濁した。培地を回収し、上記に記載したように、NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性、GDP-リボシルシクラーゼ活性、およびピロホスファターゼ活性についてアッセイした。あるいは、培地をSDS-PAGEゲル上で電気泳動し、銀染色または、上記に記載したように抗SM38抗体とのウェスタンブロットにより分析した。

【0203】

9.1.15 エンドグリコシダーゼ処理

CD8L/FLAG-SM38(70ng)を、0.05UのエンドグリコシダーゼF1(Sigma)の存在下または非存在下で、50mM NaH₂PO₄(pH5.5)で、1.5時間インキュベートした。次いで、処理または非処理のタンパク質サンプルを、SDS-PAGEおよび銀染色により分析した。

【0204】

9.1.16 SM38mRNA転写分析

様々な発生段階におけるSM38のmRNAレベルの分析を、以前に記載されているようにして(Osmanら、2004年、J.Biol.Chem、269巻、6474~6486頁)、半定量RT-PCRにより行った。簡潔に述べると、哺乳動物および軟体動物両方の宿主における成長を代表する様々な発生段階から、TRIzol試薬(Invitrogen)を用いて全RNAを抽出した。RNAサンプル全てを、ランダム十量体、およびSuperScript Reverse Transcriptase II(SSRTaseII、Invitrogen)を用いて、業者の推奨する条件に従って逆転写した。次いで、相補DNA(cDNA)サンプルを、SM38に特異的なプライマー(SM38DNAの塩基対536~562に対応するフォワードプライマー、SM38DNAの塩基対836~862の配列に相補的なリバースプライマー、これらは327bpのPCR産物を生じる)を用いたPCR反応においてテンプレートとして用いた。PCR反応物を、2%アガロースゲルで電気泳動することにより分離し、エチジウムブロマイド染色し、ゲル文書化システム(GelDoc1000、Bio-Rad)を用いて分析し、Quantity Oneソフトウェア(バージョン4.2.3、Bio-Rad)を用いて定量した。成虫ペアの全RNAの逆転写反応混合物からなるがSSRTaseIIを含まない陰性対照反応物(-RT対照)も含まれた。マンソン住血吸虫 α -チューブリン遺伝子に特異的なプライマー(GenBankアクセッション番号M80214、それぞれフォワードおよびリバースプライマーとして、塩基対424~444、および塩基対777~801に対する相補配列；これらは378bpのPCR産物を生じる)を、構成的に転写される対照として機能するPCR産物を増幅するために用い、様々な発生段階のPCR反応におけるcDNAのテンプレートの投入量を調整するために用いた。増幅産物を対数期に分析し、飽和限界(PCRプラトー)未満であることを確実にするために、PCRのサイクル数も様々とした。 α -チューブリンには24のサイクルを用い、一方、SM38のPCR産物を増幅するのに26のサイクルを用いた。データ分析では、全ての変数を考慮し、補正した。

【0205】

9.2 結果

9.2.1 扁形動物は、ADP-リボシルシクラーゼファミリーの新規なメンバーを発見する

哺乳動物のシクラーゼであるCD38は、様々な細胞型で、 Ca^{2+} シグナリングを制御する上で重要な機能的役割を果たす(Lee, H.C., 2004年、Curr. Mol. Med., 4巻、227~237頁)。シクラーゼファミリーの他のメンバーを同定するために、ADP-リボシルシクラーゼに対する公開されているコンセンサス配列(Prasadら、1996年、Nature Struc. Biol., 3巻、957~964頁)を用いて、公共のDNAおよびタンパク質データベースを検索した。コンセンサスシクラーゼ配列(Prasadら、1996年、Nature Struc. Biol., 3巻、957~964頁)に対してアミノ酸レベルにおいて27%の類似性を示した1つの330bpのEST(アクセッション番号AW0127229)が同定された。同定されたESTは、扁形動物門のメンバーである、マンソン住血吸虫から単離された。完全なcDNAを得るために、EST内にPCRプライマーを設計し、それを用いてマンソン住血吸虫のcDNAライブラリーからその配列を増幅した。次いで、そのPCR断片を用いて、マンソン住血吸虫のcDNAライブラリーをプローブし、予想分子量36kDaのタンパク質を生じるアミノ酸303個のオープンリーディングフレームを含む1034bpの全長のクローンを同定した(図13A)。図13Bに示すように、新規なマンソン住血吸虫遺伝子のオープンリーディングフレームは、ヒトシクラーゼCD38およびCD157に対して21%の同一性を示し(それぞれ37%および38%の類似性を示す)、かつジャンボアメフラシのシクラーゼに対して24%の同一性を示す(39%の類似性を示す)タンパク質をコードしていた。殆どのシクラーゼに見られる5個の保存されている内部ジスルフィド結合に必要な重要なシステイン残基(Prasadら、1996年、Nature Struc. Biol., 3巻、957~964頁)は、その新規なマンソン住血吸虫配列に存在する(図13B)。同様に、全ての公知のシクラーゼのニコチンアミド結合ポケット内部深くに見出される重要な触媒性グルタミン酸(E202)(Munshiら、2000年、J. Biol. Chem., 275巻、21566~21571頁)、およびシクラーゼのニコチンアミド結合性ポケットの辺縁を裏打ちする基質結合性トリプトファン残基(W165)(Munshiら、2000年、J. Biol. Chem., 275巻、21566~21571頁)は、両方とも新規なマンソン住血吸虫タンパク質において保存されている(図13B)。最後に、その新規なマンソン住血吸虫タンパク質は、活性部位ポケットに局在する残基を含む「TLEDシグナチャードメイン(signature domain)」(Munshiら、2000年、J. Biol. Chem., 275巻、21566~21571頁)内で、他のシクラーゼファミリーメンバーに対して高度の類似性(47%)を示す(図13B)。

【0206】

次いで、SM38からのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を用いて、あらゆる潜在的なSM38オーソログを同定するために公共データベースを検索した。本発明者らが2つのデータベースを検索する間の時間に、近縁の吸虫である日本住血吸虫に対するトランスクリプトソーム解析が公開され、SM38および哺乳動物シクラーゼであるCD38に有意な相同性を有するクローンが報告された(アクセッション番号AY222890、Huら、2003年、Nat Genet, 35巻、139~147頁を参照)。実際のところ、マンソン住血吸虫のSM38と日本住血吸虫のSM38のアミノ酸配列の間の同一性の程度は、56%を超え、その配列は74%類似していたが(図15)、そのことから、このタンパク質はおそらく日本住血吸虫のSM38オーソログであることが示された。次に、2つのSM38配列を、系統樹を作成するために、他のシクラーゼファミリーメンバー全てと比較した。図13Aに示すように、SM38はアメフラシ属シクラーゼに最も近縁であり、次いで哺乳動物シクラーゼであるCD157に近縁である。アメフラシ属シクラーゼおよびCD157の両方に対する三次元構造は以前に公開されているので(Prasadら、1996年、Nature Struc. Biol., 3巻、957~964頁、Yamamoto-Katayamaら、2002年、J. Mol. Biol., 316巻、711~723巻)、これらの構造を用いて、相同性により、SM38およびその推定上の活性部位の構造をモデリングした。図13Bに示すように、SM38に対するモデリング構造は、特に基質結合溝内で、CD157のそれに非常に類似していた。このモデルはまた、触媒性Glu²⁰²を含む全ての公知シクラーゼの活性部位内に見られる高度に保存されている残基、ヒドロラーゼ活性を制御する「シグナチャードメイン」のGlu¹²⁴(Graeffら、2001年、J. Biol. Chem., 276巻、12169~12173頁)、および基質の位置決めに影響を及ぼすTrp¹⁶⁵(Munshiら、2000年、J. Biol. Chem., 275巻、21566~21571頁)が、SM38の活性部位ポケット内

に位置することを実証する(図13C)。他のシクラーゼと合致しないが、マンソン住血吸虫のSM38は、103位にヒスチジン残基を有し、一方、他の全ての公知シクラーゼにおけるそれに等価の位置は、活性部位内で基質の結合に役割を果たす残基である、トリプトファンにより一定に占められている(Munshiら、2000年、J.Biol.Chem.、275巻、21566~21571頁)。興味深いことに、マンソン住血吸虫のSM38におけるヒスチジン残基はまた、本発明者らのモデルの活性部位溝内に位置し(図13C)、さらに日本住血吸虫のSM38で保存されている(図15)。まとめて考えると、データは、SM38が扁形動物門の少なくとも2つのメンバーに見られ、SM38のアミノ酸配列は、他のシクラーゼファミリーメンバーと有意な程度の相同性を共有し、SM38タンパク質の予想される構造は他のシクラーゼファミリーメンバーに著しく類似していることを示している。

10

【0207】

9.2.2 組換えSM38は、GPI固定された膜NAD⁺グリコヒドrolラーゼである

SM38が機能的な酵素であるかどうかを判定するために、SM38に対する異種の(哺乳動物の)in vitro発現系を開発した。扁形動物と哺乳動物との間の好ましいコドン使用は非常に異なるので、哺乳動物細胞において翻訳を促進するように、マンソン住血吸虫のSM38のcDNAを再合成した(SM38-opt)。次いで、SM38-optを、COS-7細胞中で一過性に発現させ、上清または細胞溶解物におけるNAD⁺グリコヒドrolラーゼ(NADase)活性を、1,N⁶-エテノ-NAD⁺(ϵ -NAD⁺)の加水分解を測定することにより決定した。シクラーゼファミリーメンバーによる ϵ -NAD⁺の加水分解により、蛍光光度計を用いて容易に検出することができる蛍光性の ϵ -ADPR(Mullerら、1983年、Biochem.J.、212巻、459~464頁)の産生がもたらされる。トランスフェクトした細胞の上清でNADase活性を測定したが、それは、様々なタンパク質構造予測プログラム(Bendtsenら、2004年、J.Mol.Biol.、340巻、783~795頁;Kallら、2004年、J.Mol.Biol.、338巻、1027~1036頁)を用いてSM38配列を分析することにより、SM38がシグナル配列を有する(図15)が明らかな膜貫通型ドメインを有さず、そのため分泌されるであろうことが示されたためである。しかし、トランスフェクトされた細胞の上清に、NADase活性は検出されなかった(図19A)。SM38が分泌されたか否かを決定するために、一過性にトランスフェクトした細胞を、1%Triton X-100中で細胞溶解させ、次いでその細胞溶解物におけるNADase活性を測定した。興味深いことに、SM38-optをトランスフェクトしたCOS-7細胞の溶解液中には豊富なNADase活性が検出されたが(図19A)、空の発現ベクターをトランスフェクトした細胞では活性は観察されなかった(データは示さず)。これらの結果は、SM38は、膜貫通型タンパク質または細胞質性タンパク質のいずれかとして発現されることを強力に示している。

20

30

【0208】

SM38の細胞内局在を決定するためには、細胞内でSM38を直接可視化することが必要であった。これを容易にするために、SM38-optの5'シグナル配列を、後ろにFLAGタグが続く哺乳動物のシグナル配列(CD8 α リーダー)とにより置き換えた(CD8L/FLAG-SM38)。FLAGでタグ付けした組換えタンパク質が検出され抗FLAG試薬で精製され得るか否かを評価するために、COS-7細胞にCD8L/FLAG-SM38構築物を一過性にトランスフェクトした。細胞を界面活性剤中で溶解させ、SM38を、抗FLAGアフィニティーカラム上で精製した。FLAGでタグ付けしたSM38を溶出し、精製したタンパク質をSDS-PAGE上で分離し、次いで、抗FLAG抗体を用いてウェスタンブロットを行った。約48kDのタンパク質が、トランスフェクトされた細胞溶解物中に検出された(図19B)。次に、SM38がトランスフェクトされた細胞のどこに局在するかを決定するために、COS-7細胞に、CD8L/FLAG-SM38構築物を一過性にトランスフェクトし、次いで、ビオチン化した抗FLAG抗体を用いて免疫蛍光分析を行った。図2Cに示すように、CD8L/FLAG-SM38をトランスフェクトされたCOS-7細胞の原形質膜は抗FLAG抗体で特異的に染色されたが、空の発現ベクターをトランスフェクトされた細胞では染色は観察されなかった(図19D)。したがって、これらのデータは、SM38が、少なくとも哺乳動物細胞で発現される場合、膜結合性であることを示している。

40

【0209】

SM38は、一般に用いられるタンパク質構造予測プログラムのいかなるものによっても、

50

膜貫通ドメインを有するとは予想されなかった。しかし、SM38に最も近縁な哺乳動物の類縁体であるCD157は、膜結合性のGPI固定化タンパク質である。したがって、GPI固定モチーフが同定できるか否かを見るために、SM38の3'アミノ酸配列を再検査した。SM38の3'配列は、哺乳動物のGPI固定について記載されている殆どのモチーフ(Eisenhaberら、2003年、Bioassays、25巻、367～385頁)と一致しなかったが、Eisenhaberらが記したアルゴリズム(Eisenhaberら、1998年、Protein Eng.、11巻、1155～1161頁)の助けで、潜在的なGPI固定部位が同定された(ω -部位、図15を参照されたい)。SM38がGPI固定されているか否かを決定するために、GPI固定(GIP-anchor)リパーゼであるホスホチジルイノシトールに特異的なホスホリパーゼC(PI-PLC)により、CD8L/FLAG-SM38でトランスフェクトされたCOS-7細胞の膜からSM38が切断され得るか否かを試験した。トランスフェクトされた、およびトランスフェクトされていないCOS-7細胞から培地を除去し、細胞を洗浄し、次いで、細胞をPI-PLCの存在下または非存在下でインキュベートした。上清を2時間後に回収し、 ϵ -NAD⁺を基質として用いてNADase活性を測定した。予想通り、NADase活性は、PI-PLCを加えたかどうかにかかわらず、空のベクターをトランスフェクトした細胞の上清には検出されなかった(図19E)。同様に、CD8L/FLAG-SM38をトランスフェクトし、培地単独でインキュベートした細胞の上清に活性は検出されなかった(図19E)。これとは対照的に、PI-PLCとインキュベートした、CD8L/FLAG-SM38をトランスフェクトした細胞から回収した上清では、豊富なNADase活性が観察された(図19E)。オリジナルの天然型のSM38をトランスフェクトしたCOS-7細胞を用いて実験を行った場合に、同一の結果が観察された。したがって、SM38は、CD157と同様に、哺乳動物の細胞では、GPI固定された膜結合性タンパク質として発現される。

【0210】

9.2.3 SM38は多機能性の酵素である

シクラーゼは、ADPRを生成するためのNAD⁺の加水分解(NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性)、NAD⁺のcADPRへの環化(ADP-リボシルシクラーゼ活性)、cADPRのADPRへの加水分解変換(cADPRヒドロラーゼ活性)、およびNADP⁺のグリコシド交換を含むいくつかの反応を触媒する多機能性の酵素である(Eisenhaberら、2003年、Bioassays、25巻、367～385頁)。SM38の酵素特性をよりよく特徴付けるために、GPI固定モチーフを欠失させることによる、分泌された可溶性形態のSM38外ドメインを、FLAGでタグ付けしたSM38構築物(CD8L/FLAG-SM38 Δ GPI)で生成した(図15を参照されたい)。COS-7細胞に、新しい構築物を一過性にトランスフェクトし、上清を72時間後に回収した。上清における、および細胞溶解物におけるNADase活性を、 ϵ -NAD⁺を基質として用いて測定した。予想通り、酵素活性は、今や上清画分に高度に濃縮され、細胞溶解物には非常に低レベルでのみ見出された(図20A)。次に、分泌されたSM38タンパク質を、上清から抗FLAGカラムで精製し、予想通り、SM38のアフィニティー精製により、NADase活性の著しい濃縮がもたらされた(図20A、挿入図)。次いで、アフィニティー精製した可溶性SM38を、SDS-PAGEおよび銀染色により分析し、43kDおよび46kDの2つのタンパク質種が観察された(図20B)。溶出されたタンパク質が両方とも真正のSM38であることを確かめるために、抗FLAG抗体を用いてウェスタンブロット分析を行った。図20Bに示すように、タンパク質種は両方とも抗FLAG抗体によって認識された。

【0211】

SM38に対する2つのタンパク質形態が同定され、両形態とも可溶性SM38の予想された分子量(約30kDa)よりもかなり大きかったので、特にSM38配列は4つの潜在的なN結合型グリコシル化部位を含んでいたので、SM38がグリコシル化されているかもしれない可能性が考えられた(図15)。したがって、精製された組換えSM38をエンドグリコシダーゼF1(Endo-F)で処理してN結合型糖を切断し、次いで、処理したタンパク質の分子量を決定した。Endo-FでのSM38の処理により、両形態のSM38のサイズは約2kD減少し、44kDおよび41kDとなった(図20B)。このように、可溶性組換えSM38は、2つのイソ型で発現され、その両方ともグリコシル化される。

【0212】

SM38特異的NADase活性は、 ϵ -NAD⁺を基質として用い、生成物形成を蛍光分析で測定す

ることで容易に検出されるが(すなわち図20A)、SM38の触媒特性をよりよく特徴付けるには、より大量の可溶性SM38が必要であった。したがって、可溶性SM38の生成および精製は、ピキア・パストリスの発現系、および他のシクラーゼおよびNAD⁺グリコヒドロラーゼを精製するのに日常的に使用されるアフィニティゲル精製方式を用いて、スケールアップされた(Cakir-Keiferら、2000年、Biochem.J.、349巻、203～210頁)。哺乳動物発現系を用いて観察されたものと同様に(図20B)、可溶性SM38はピキア属(*Pichia*)において43kDおよび44kDの2つのイソ型で発現されることが見出された(図20C)。次いで、精製されたSM38のNAD⁺グリコヒドロラーゼ活性を、飽和量の放射標識したNAD⁺とともにその組換え酵素をインキュベートし、HPLCにより生成物形成を分析することにより決定した(図20D)。表IIに示すように、SM38の特異的活性は、13.2 $\mu\text{mol}/\text{分}/\text{SM38タンパク質}1\text{mg}$ であると計算されたが、この値はCD38などの哺乳動物シクラーゼについて報告されたもの(Howardら、1993年、Science、262巻、1056～1059頁;Cakir-Keiferら、2000年、Biochem.J.、349巻、203～210頁)と同じ範囲である。

【表 2】

表II

SM38^aによる基質の変換に対する反応速度論パラメータ

基質	K_m	V_{max}	k_{cat}	k_{cat}/K_m
	μM	$\mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$	s^{-1}	$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
NAD ⁺	38.5±6.8	13.2±2.6	6.51±1.28	1.69×10 ⁵
NGD ⁺	23.4±1.1	4.8±0.1	2.37±0.05	1.01×10 ⁵
NADP ⁺	13.7±2.9	39.2±1.6	19.34±0.79	14.12×10 ⁵

^a反応は全て、ピキア・パストリスにおいて生成された精製した組換えSM38の存在下で、10mMリン酸カリウムバッファ(pH7.4)中、37℃で行った。

【 0 2 1 3 】

興味深いことに、生成物形成を測定するためにHPLCを用いると、アッセイのpHが5.0～8.0の間で様々であったにもかかわらず(データは示さず)、ADPRは容易に可視化されたが、測定可能なcADPRは検出されなかった(図21D)。SM38により生成されたcADPRの量は、HPLCによる検出限界未満であったので(すなわち、放射標識した反応生成物の1%未満)、非常に感度の良いサイクリングアッセイ(Graeffら、2002年、Biochem.J.、361巻、379～38頁)を次に用いて、組換え可溶性SM38によるcADPR生成を測定した。この方法によりcADPRは検出されたが、定常状態で生成された量は非常に少量で、全反応生成物ADPRの0.016%にしか相当しなかった。

【 0 2 1 4 】

これらのデータは、SM38はADP-リボシルシクラーゼよりもはるかに効率的なNAD⁺グリコヒドロラーゼであるか、または生成されたcADPRがSM38によりADPRへと速やかに加水分解されること(cADPRヒドロラーゼ活性)を示している。これらの可能性を区別するために、SM38のcADPRヒドロラーゼ活性を測定した。SM38は、SM38のNAD⁺グリコヒドロラーゼ活性よりも3桁も低い6nmol/分/mgタンパク質を下回る活性を有する非常に弱いcADPRヒドロラーゼであることが見出された(表II)。したがって、SM38は、cADPRをそれが生成されるのと同じくらい速やかに分解したとは思われず、SM38は、定常条件下ではcADPRを殆ど生成しないと思われた。SM38はシクラーゼ反応を触媒する能力があるか否かを特異的に試験するために、その精製した酵素を、NAD⁺の類似体であるNGD⁺(これは、多くの哺乳動物シクラーゼファミリーメンバーによりサイクリックGDP-リボース(cGDPR)へと効率的に変換されて蛍光分析で容易に検出される)(Graeffら、1994年、J.Biol.Chem.、269巻、30260～30267頁)とともにインキュベートした。NGD⁺はSM38の優れた基質であることが証明され($K_m=23.4 \mu\text{M}$ 、表II)、図20Eに示すように、かなり効率的に環化された。環化/加水分解の比率は

約6.0(図20E)であり、定常状態下の比活性は $4.8 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$ タンパク質であった(図20F、表II)。これらは全て、CD38などの哺乳動物シクラーゼについて報告されたもの(Berthelietら、1998年、Biochem J.、330巻、1383~1390頁)に、十分匹敵するものである。したがって、これらのデータは、SM38は非常に非効率的なADP-リボシルシクラーゼである一方、この酵素はcGDPRなどの環状化合物の生成を、機構的に触媒することができることを示している。

【0215】

次に、SM38は、 NADP^+ を基質として用いることができ、ニコチン酸の存在下でグリコシド交換反応を触媒することができるか否かを試験した。表IIに示すように、 NADP^+ はSM38の優れた基質であることが証明され、触媒効率($K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$)に関して、 NADP^+ は NAD^+ よりもさらに良好な基質であった(8倍良好、表IIを参照されたい)。これは、 NAD^+ が好ましい基質であるヒトCD38とは異なる(Berthelietら、1998年、Biochem J.、330巻、1383~1390年)。HPLCにより示されるように(図20G)、ピリジン塩基交換反応は、pH6.0でSM38によって容易に触媒され、このことは、この酵素はCD38およびアメフラシ属シクラーゼと同様、 Ca^{2+} 動員性メッセンジャーであるNAADP⁺を合成することができることを示す。シクラーゼファミリーの他のメンバーについて以前に記されたように、NAADP⁺の形成は、より酸性のpH条件に比べて中性のpH条件下では、効率が劣った(pH6.0に比べてpH7.4では、NAADP⁺形成が3倍低減した。データは示さず)。

【0216】

SM38は、 NADP^+ を基質として用いる塩基交換反応を触媒することに加えて、イソニアジド(INH、示さず)の存在下で NAD^+ を基質として用いる塩基交換反応を触媒することも見出された。このピリジンは、哺乳動物の NAD^+ グリコヒドロラーゼ(表III)を、「INH-感受性」(例えば、ウシCD38)、または「INH-非感受性」(例えば、ヒトCD38)NADaseのいずれかに分類するのに広く用いられており(Zatmanら、1954年、J.Biol.Chem.、209巻、453~466頁)、SM38はNADaseの後者のカテゴリーのメンバーであると思われる。

【0217】

最後に、SM38は、シクラーゼファミリーの他のメンバー同様、 NAD^+ のメタノリシスを触媒し、 β -メチルADP-リボースの形成をもたらすことができる(表III)。モル濃度ベースでは、メタノールは、水よりも約5倍速やかに反応することが見出された(H.M-SおよびF.S.、非公開)。さらに、1~3Mメタノールが存在しても、 NAD^+ の加溶媒分解反応(加水分解、およびメタノリシス)の全体的代謝回転速度に影響を及ぼさなかった。これらのデータは、ニコチンアミド-リボース結合の切断が、SM38の反応速度論的メカニズムの律速段階であることと一致し、CD38などの他のシクラーゼファミリーメンバーについて以前に示されていたものと、さらに類似している(Schuberら、2004年、Curr.Mol.Med.、4巻、249~261頁;Cakir-Kieferら、2001年、Biochem J.、358巻、399~406頁;Muller-Steffnerら、1994年、Bioch-Biophys.Res.Comm.、204巻、1279~1285頁)。まとめると、このデータは、SM38の酵素特性がシクラーゼファミリーの他のメンバーと類似しており、SM38はADPR、NAADP⁺、およびより少ない程度ではcADPRの生成を触媒することができることを示している。

【表 3】

表III

シクラーゼファミリーメンバーとのSM38酵素特性の比較

特性	SM38	哺乳動物 シクラーゼ	アメフラシ属 シクラーゼ
NAD ⁺ の加水分解	有	有	非常に少ない
cADPRの形成	非常に少ない	少ない	有
cADPRの加水分解	非常に少ない	有	非常に少ない
cGDPRの形成	有	有	有
グリコシド交換	有	有	有
INHに対する感受性	無	有／無	検出せず
NAD ⁺ のメタノリシス	有	有	非常に少ない
araF-NAD ⁺ の阻害	弱い(IC ₅₀ >10μM)	K _i nM範囲	弱い(IC ₅₀ >10μM)

10

【0218】

9.2.4 SM38の発現は、マンソン住血吸虫において発生的に制御される

20

マンソン住血吸虫の生活環の間の、いつ、どこでSM38が発現されるのかを決定するために、SM38に特異的でマンソン住血吸虫α-チューブリンに特異的なプライマーを用いた半定量PCR法を用いて、住血吸虫の発生の際にいつSM38 mRNA転写物が発現されるかを決定した。SM38転写物は、マンソン住血吸虫の卵、または非感染のビオンファラリア・グラバラータ(*Biomphalaria glabrata*)カタツムリ(中間宿主)では検出可能ではなかったが、マンソン住血吸虫に感染したカタツムリでは容易に観察された(図21A)。次いで、マンソン住血吸虫のセルカリア、幼住血吸虫において、および未成熟な21日目の虫体ペアにおいてはSM38の発現は検出不能なレベルまで低減した(図21A~B)。これとは対照的に、28日目および35日目の虫体ペアではSM38の発現は劇的に増大し、これは雌雄の虫体の交尾と一致し、次いで、雄および雌両方の成熟した成虫ペアで維持された(図21A~B)。まとめると、これらのデータは、SM38は、中間宿主および最終宿主の両方で、マンソン住血吸虫において発生的に制御されるシグナリング機能を果たすことを示している。

30

【0219】

9.2.5 SM38は、マンソン住血吸虫成虫の外皮膜において構成的に活性な外酵素として発現される

SM38タンパク質が、マンソン住血吸虫の成虫の膜で発現され、機能的であるかどうかを評価するために、ホモジナイズした成虫からの細胞質画分を精製し、放射標識したNAD⁺を基質として用いてNAD⁺グリコヒドロラーゼ活性を評価した。異種性の哺乳動物発現系を用いた本発明者らの結果と一致して、NAD⁺グリコヒドロラーゼ活性は、マンソン住血吸虫成虫の膜ミクロソーム画分で排他的に観察された。さらに、放射標識したNAD⁺を基質として用いたにもかかわらず、ADPRの形成だけが検出され、cADPRは検出されなかったが(図22A)、このことは、天然の酵素は、組換えバージョンと同様、非常に非効率なADP-リボシルシクラーゼであることを示していた。天然SM38がシクラーゼ反応を触媒することができるかどうかを試験するために、膜ミクロソームをNGD⁺とともにインキュベートし、cGDPRの蓄積を蛍光分析で、およびHPLCにより測定した。予想通り、マンソン住血吸虫の膜画分は、cGDPR/GDPR比が12で、シクラーゼ反応を非常に効率的に触媒した(図22B)。次に、マンソン住血吸虫の成虫により発現された膜結合性NAD⁺グリコヒドロラーゼ/NGD⁺シクラーゼがGPI固定されているか否かを決定するために、ミクロソーム画分を、PI-PLCの存在下および非存在下でインキュベートし、次いで、上清中に放出されたNAD⁺グリコヒドロラーゼ活性を測定した。予想通り、住血吸虫のNAD⁺グリコヒドロラーゼはPI-PLCに感受性であっ

40

50

た(図22C)。まとめると、これらのデータは、住血吸虫のNAD⁺グリコヒドロラーゼは、膜結合性のGPI固定されたタンパク質であることを示している。

【0220】

住血吸虫は、全ての扁形動物同様、外皮と呼ばれる外側の膜を有する(66)。外皮は、細胞質性架橋によって外皮下細胞体につながっている9nmの細胞質によって分けられた7層頂端膜および基底膜を有する合胞体から構成されている。住血吸虫のNAD⁺グリコヒドロラーゼが成虫の外側の外皮膜に結合しているか否かを評価するために、生存している住血吸虫寄生虫を、膜不透過性基質である ϵ -NAD⁺とともに直接インキュベートし、蛍光性 ϵ -ADPRの蓄積を測定した。図22Dに示すように、10匹という少数の生存マンスン住血吸虫成虫が、NAD⁺グリコヒドロラーゼ反応を効率的に触媒することができ、これは、マンスン住血吸虫の成虫寄生虫は、外側の外皮上にSM38の性質を有する酵素を発現することを示していた。マンスン住血吸虫の成虫の外側の外皮に結合しているNADaseがGPI-固定されているかどうかを決定するために、10匹の生存する寄生虫を、PI-PLCの存在下または非存在下でインキュベートし、2時間後に上清を回収し、 ϵ -NAD⁺を基質として用いてNAD⁺グリコヒドロラーゼ活性を測定した(図22E)。PI-PLCなしでインキュベートした虫体からの培地は、NADase活性を欠いていたが、PI-PLCで処理した虫体からの培地でのNADase活性は容易に検出された(図22E)。最後に、外側の外皮上に真正のNAD⁺グリコヒドロラーゼが存在するが、ピロホスファターゼ(これはやはりNAD⁺を基質として利用することができる)が存在しないことを確かめるために、PI-PLC処理した上清を、ヌクレオチドピロホスファターゼによって蛍光性1,N⁶-エテノ-AMPに変換される基質である1,N⁶-エテノ-PyAD⁺とともにインキュベートしたが、シクラーゼファミリーのメンバーはそれを利用することができなかった(Mullerら、1984年、Biochem J、223巻、715~721頁)。ピロホスファターゼ活性は検出されず(データは示さず)、したがって成虫の外側の外皮上に存在する酵素は、真正のGPI-固定されたNAD⁺グリコヒドロラーゼである。

【0221】

データは、SM38またはSM38様酵素が、マンスン住血吸虫の成虫によって外側の外皮タンパク質として発現されることを示している。この仮説を直接試験するために、CD8LFLAG-SM38 Δ GPI発現構築物でマウスを免疫化および追加免疫することにより、SM38特異的抗体を産生した。免疫化マウスから血清を回収し、抗血清の特異性をウェスタンブロット、免疫蛍光、および免疫沈降により評価した。図23Aに示すように、SM38 cDNAワクチンに応答して産生された抗血清は、ウェスタンブロットにより可溶性の組換えSM38タンパク質を特異的に認識したが、オボアルブミンおよびBSAを含めた他の精製タンパク質とは反応しなかった(示さず)。次に、抗SM38抗血清は膜結合性SM38タンパク質を特異的に認識するか否かを決定するために、COS-7細胞に、CD8L/FLAG-SM38または空の発現ベクターを一過性にトランスフェクトし、次いで、その細胞を抗SM38抗血清で、その後に蛍光色素コンジュゲート化抗マウス免疫グロブリン抗体で染色した。予想通り、抗SM38抗血清は、空のベクターをトランスフェクトした細胞を染色しなかった(図23B)、正常マウスの血清もSM38をトランスフェクトした細胞を染色しなかった(図23C)。しかし、SM38をトランスフェクトした細胞が抗FLAG抗体で染色された場合に観察されたものと同じように(図19Cを参照されたい)、抗SM38抗血清は、CD8L/FLAG-SM38をトランスフェクトしたCOS-7細胞の原形質膜を染色した(図23D)。

【0222】

抗SM38抗血清を、酵素的に活性なSM38タンパク質を免疫沈降するのに用いることができることを実証するために、COS-7細胞にCD8L/FLAG-SM38または空の発現ベクターを一過性にトランスフェクトし、トランスフェクトした細胞をTriton X-100中で溶解させ、界面活性剤に可溶性のタンパク質を回収した。プロテインGビーズに結合させた抗SM38抗血清または正常マウス血清を用いて免疫沈降を行い、次いで、免疫沈降したタンパク質が ϵ -NAD⁺の加水分解を触媒することができるか否かを分析した。免疫沈降性抗体として正常マウス血清または抗SM38抗血清のいずれを用いたかに関わらず、対照トランスフェクト細胞からの免疫沈降では酵素活性は観察されなかった(図23E)。同様に、正常マウス血清、お

よびSM38をトランスフェクトした細胞からの溶解液を用いた免疫沈降では、酵素活性は検出されなかった(図23E)。しかし、SM38をトランスフェクトした細胞から抗SM38抗血清を用いて単離した免疫沈降されたタンパク質には、豊富なNAD⁺ヒドロラーゼ活性が検出された(図23E)。まとめると、これらのデータは、SM38 cDNAに対して産生された抗血清は、SM38に特異的であり、酵素的に活性な膜固定SM38、および変性したSM38を認識することを示している。

【0223】

酵素的に活性なSM38タンパク質が、マンソン住血吸虫の成虫によって発現されるか否かを決定するために、成虫をTriton X-100中で溶解させ、そのタンパク質を回収し、本発明者らの抗SM38抗血清、または対照として正常マウス血清を用いて、免疫沈降を行った。次いで、成虫から沈殿されたタンパク質がε-NAD⁺を加水分解することができるか否かを決定した。図23Fに示すように、抗SM38免疫沈降されたタンパク質は、NAD⁺グリコヒドロラーゼ反応を触媒し、正常マウス血清で免疫沈降されたタンパク質は、検出可能な酵素活性は示さなかった。最後に、マンソン住血吸虫の成虫によって発現される天然のSM38タンパク質を可視化するために、生存する虫体をPI-PLCの存在下、HBSS中でインキュベートした。培養培地中に放出されたタンパク質を回収し、濃縮し、次いでそのタンパク質を銀染色およびウェスタンブロットにより分析した。図23Gに示すように、多数のタンパク質が、PI-PLC処理した成虫によって分泌され、または排出された。しかし、本発明者らの抗SM38抗血清を用いたウェスタンブロット分析の際には、約43kDaの単一のタンパク質が検出された(図23G)。興味深いことに、マンソン住血吸虫の成虫によって発現された天然のSM38タンパク質は、トランスフェクトされたCOS-7細胞によって分泌された可溶性組換えSM38に非常に類似したサイズであった(図23G)。天然のSM38は、抗SM38抗体を用いて、表面結合したタンパク質を富化するためにNP-40を用いて処理した生存虫体から単離した抽出物のウェスタンブロットをプローブすることにより、2つの類似したサイズのタンパク質の形態でも検出された(図16)。まとめると、NAD⁺グリコヒドロラーゼ/ADPリボシルシクラーゼファミリーの酵素に有意な相同性を示すマンソン住血吸虫から単離されたcDNAによってコードされる新規なタンパク質であるSM38に対して産生された抗血清は、NAD⁺グリコヒドロラーゼおよびNGD⁺シクラーゼの反応を触媒することができるマンソン住血吸虫の成虫において表面結合されたGPI-固定タンパク質を特異的に認識することを、これらのデータは示している。

【0224】

抗SM38抗体を用いたRT-PCRデータおよびウェスタンブロット実験により、SM38は、マンソン住血吸虫の成虫寄生虫において、膜および外皮結合型タンパク質として発生的に発現されることが強く示された。これらの発見を確かめるために、抗SM38抗血清のIgG画分を用いて、成虫の凍結切片、ホールマウント虫体、および機械的に変態した幼住血吸虫(3時間齢)における天然SM38タンパク質を検出した。生存する、またはアセトン固定した3時間の幼住血吸虫において、SM38タンパク質は検出されなかった(データは示さず)。同様に、免疫前の正常マウスIgGでプローブした場合、成虫の凍結切片(図24C)、または虫体全体(図24G)において、特異的な蛍光は観察されなかった。これとは対照的に、雄の交接管に沿って強力な表面の染色が(図24F、矢印)、および腸管を取り囲む上皮組織の蛍光が(示さず)、抗SM38抗体でプローブした成虫の凍結切片に見ることができた。さらに、抗SM38抗体でプローブした、アセトン固定した(図24H)または生存する(図24I)虫体全体において、表面の蛍光が、やはり検出された。表面上(図24H、結節)、雄の交接管(図24H)、ならびに雄および雌の虫体の口吸盤および腹吸盤(図24H~I)に、特異的な染色が観察された。このように、これらのデータは、成虫の住血吸虫SM38は、寄生虫の外側表面に局在することを示している。潜在的なSM38ワクチン化についてのこれらの結果の意義、および小分子アンタゴニストについての試験が論じられる。

【0225】

10. 実施例:CD38欠損性T細胞は、アレルゲンチャレンジ後、肺の炎症を誘発しない

以下のサブセクションは、アレルゲン特異的T細胞(または自己免疫性T細胞)上のCD38の

10

20

30

40

50

発現が、分化したエフェクター細胞へのそれらの成熟、または炎症部位へのそれらの遊走のいずれかに必要とされることを実証するものである。このサブセクションはまた、アレルギーでチャレンジしたマウスの肺における炎症反応は、CD38発現性T細胞に依存することを実証するものである。

【0226】

10.1 材料と方法

オボアルブミン(OVA)に特異的な、ナイーブT細胞受容体(TCR)トランスジェニックT細胞を、正常トランスジェニックマウス(WT T細胞)およびCD38欠損トランスジェニックマウス(KO T細胞)の脾臓およびリンパ節から精製した。次いで、KOまたはWT OVA特異的T細胞(CD45.2⁺)のいずれかを、類遺伝子性正常宿主(CD45.1⁺)中に注射し、次いで、その宿主動物を、次の7日間、10 μgのNP-OVA(n=7匹のマウス/グループ)またはPBS(n=3匹のマウス/グループ)を1日1回鼻腔内投与して感作した。8日目に、排液性リンパ節、および肺気道(気管支肺胞洗浄、BAL)からの細胞を回収し、計数し、FACSによって分析した。

【0227】

10.2 結果

偽およびアレルギーでチャレンジした宿主のリンパ節およびBALに存在する、活性化表現型(CD45.2⁺CD4⁺CD62L¹⁰)を有するドナーのOVA特異的T細胞の数を、図25に示してある。マウスの肺に浸潤する炎症細胞の数を、図26に示してある。CD38欠損性OVA特異的T細胞は、炎症部位のリンパ節および肺の両方で、数が減少する。同様に、アレルギー誘導された炎症反応は、CD38欠損性T細胞を受容したマウスの肺で抑制された。CD38を欠くT細胞の成熟/遊走がこのように欠損することにより、アレルギーでチャレンジした動物の肺における炎症反応の低下がもたらされる。したがって、CD38阻害剤は、喘息における肺、および自己免疫疾患に罹患している患者の炎症を起こした組織/関節等などの炎症部位における、T細胞媒介性病理を低減することをデータは示している。

【0228】

11. 実施例:T細胞が正常動物由来の場合でも、炎症性アレルギー特異的T細胞の抗原刺激は、CD38欠損マウスにおいて低減する

以下のサブセクションは、抗原提示細胞上のCD38発現は、アレルギー特異的T細胞の増殖に必要とされることを実証するものである。このサブセクションは、抗原提示細胞上のCD38の発現は、アレルギーでチャレンジしたマウスの気道および肺組織における細胞性炎症を促進することを実証するものでもある。

【0229】

11.1 材料と方法

オボアルブミン(OVA)に特異的な、ナイーブT細胞受容体(TCR)トランスジェニックT細胞を、正常トランスジェニックマウスの脾臓およびリンパ節から精製した。次いで、正常のOVA特異的T細胞(CD45.1⁺)を、類遺伝子性正常宿主(WT CD45.2⁺)またはCD38欠損性宿主(KO、CD45.2⁺)中に注射した。次いで、宿主動物を、次の7日間、10 μgのNP-OVA(n=7匹のマウス/グループ)またはPBS(n=3匹のマウス/グループ)を1日1回鼻腔内投与して感作した。8日目に、排液性リンパ節、および肺気道(気管支肺胞洗浄、BAL)からの細胞を回収し、FACSにより計数し、分析した。

【0230】

11.2 結果

偽およびアレルギーでチャレンジした宿主のリンパ節およびBALに存在する、ドナーのOVAに特異的なT細胞(CD45.2⁺CD4⁺)の数を、図27に示す。リンパ節に存在する活性化CD62L¹⁰ドナーT細胞の数も、図27に示す。マウスの肺に浸潤する炎症細胞の数を、図28に示す。OVAでチャレンジしたWTまたはCD38KOマウスの肺の代表的なH&E切片も、図28に示す。抗原提示細胞上のCD38の発現は、効果的な抗原刺激、アレルギー特異的T細胞の増殖および分化に必要とされる(T細胞がCD38十分な場合でも)。CD38欠損マウスに観察されるT細胞抗原刺激の低減は、肺における炎症反応を誘発し得るアレルギー特異的なT細胞の数の低減をもたらす。したがって、CD38阻害剤は、アレルギー特異的な、または自己反応性のT細胞

の増殖を低減し、それにより、喘息における肺、および自己免疫疾患に罹患している患者の炎症を起こした組織/関節等などの炎症部位における、T細胞媒介性病理の低減をもたらすことを、データは示唆している。

【0231】

12. 実施例:CD38欠損マウスでは、肺におけるアレルゲン誘導性の炎症反応は低減する

以下のサブセクションは、CD38欠損マウスは、肺におけるアレルゲン誘導性の炎症に対してより抵抗性であることを実証するものである。

【0232】

12.1 材料と方法

CD38欠損(KO)または正常のC57BL/6(WT)マウスを、0日目にオボアルブミン(OVA)のミョウバン溶液で抗原刺激し(マウス1匹あたり10 μ gをi.p.投与)、またはPBSを接種した。免疫化後42日目に、動物は非処理のまま(抗原刺激のみ)か、または次の7日間1日1回10 μ gOVAを用いて鼻腔内投与でチャレンジした(抗原刺激+チャレンジグループおよびチャレンジのみのグループ)。OVAの最終投与の1日後、全グループのマウスから肺を単離し、組織学的検査用に調製した。各グループからの代表動物のH&E染色したパラフィン切片を示す。

【0233】

12.2 結果

抗原刺激し、次いでOVAでチャレンジしたCD38欠損マウスの肺において、炎症細胞の浸潤は、著しく低減する。造血細胞または常在性の肺細胞(上皮、間質、または線維芽細胞)いずれかにおけるCD38の発現は、抗原刺激され、次いで肺気道中に投与したアレルゲンで感作されたマウスの肺における炎症反応の誘導に必要である。したがって、これらのデータは、CD38阻害剤は、患者におけるアレルギー反応、および/またはアレルギー患者もしくは喘息患者の肺における慢性炎症の誘導を阻止することを示唆している。

【0234】

13. 実施例:CD38欠損マウスでは糖尿病の発症が遅延する

13.1 材料と方法

CD38欠損(KO)または正常のBALB/c(WT)マウスに、ストレプトゾトシン(STZ;50mg/kg/マウス)を1日1回、連続5日間注射した。血中グルコースレベルを、最終のSTZ注射の10および17日後に測定した。

【0235】

13.2 結果

多数回の低投与量のSTZ治療により、治療から10日以内に、WTおよびKO動物の両方で血中グルコースレベルの増大がもたらされた。しかし、WT動物では高血糖が有意に多かった。17日目までに、WTマウスの大多数は糖尿病であり(血中グルコースが350mg/dlを超える動物が7匹/11匹)、一方KOマウスのごく一部のみが糖尿病であった(3匹/11匹)。CD38発現性細胞は、STZ治療に応答して膵臓の破壊を促進するが、これは、CD38が、膵臓の β 細胞の破壊を引き起こす免疫媒介性免疫反応を制御することを示している。したがって、これらのデータは、CD38阻害剤を、自己免疫媒介性糖尿病の発症を予防または遅延させるのに用いることができたことを示唆している。

【0236】

本発明は、本明細書に記載した特定の実施形態によって、範囲において限定されるのではなく、本明細書は本発明の個々の態様の単なる説明を意図するものであり、機能上同等の方法および構成要素は本発明の範囲内である。実際、本発明の様々な変更態様は、本明細書に示し、記載したものの他に、前述の明細書および添付の図面から当業者には明らかになるであろう。このような修正は、特許請求の範囲の範囲内にあることが意図される。様々な出版物が本明細書に引用され、その内容は、その全文が参照として本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【0237】

【図1】化学誘引物質のシグナリングに対する正常な細胞応答。(1)化学誘引物質が受容

10

20

30

40

50

体に結合しシグナリングを開始する。(2)CD38はNADを加水分解し、cADPRを生成し、cADPRは内部貯蔵からCa²⁺の放出を促進する。(3)Ca²⁺はcADPRがコントロールする内部貯蔵から放出され、それが外部のCa²⁺チャンネルを活性化する。(4)細胞外Ca²⁺は細胞内に流入し、遊走させる。

【図2】CD38によるcADPR生成の阻害剤は、容量性のCa²⁺侵入および化学誘引物質誘発性遊走を妨げる(スクリーニングによりそのような化合物を同定する)。(1)化学誘引物質が受容体に結合し、シグナリングを開始する。(2)CD38の阻害剤は、NADの加水分解を妨げ(酵素は不活性であり生成物は生成されない)、またはcADPRの生成を特異的に抑制する(ADP-リボシルシクラーゼ活性を阻止するが、酵素は不活性でなくてよい)。(3)cADPRが欠損することにより、内部貯蔵からのcADPR媒介性Ca²⁺放出はもたらされない。(4)容量性のCa²⁺流入はなく、遊走はない。

10

【図3】CD38酵素活性を制御するタンパク質(スクリーニングによりこれらのタンパク質を活性化または不活性化する化合物を同定する)。(1)化学誘引物質が受容体に結合し、シグナリングを開始する。(2)タンパク質XはCD38を修飾し、CD38酵素活性を不活性化する。(3)cADPRが欠損することにより、内部貯蔵からのcADPR媒介性Ca²⁺放出はもたらされない。(4)容量性のCa²⁺流入はなく、遊走はない。

【図4】CD38の発現を制御するタンパク質(スクリーニングによりこれらのタンパク質を活性化または不活性化する化合物を同定する)。(1)化学誘引物質が受容体に結合し、シグナリングを開始する。(2)タンパク質XはCD38遺伝子の転写を阻止する。(3)CD38が欠損することにより、cADPRの非存在が生じ、これは内部貯蔵からのcADPR媒介性Ca²⁺放出を喪失させる。(4)容量性のCa²⁺流入はなく、遊走はない。

20

【図5】CD38に対する代替基質はcADPRの阻害剤を産生し、容量性のCa²⁺放出を抑制することができる(スクリーニングによりこのような化合物を同定する)。(1)化学誘引物質が受容体に結合し、シグナリングを開始する。(2)CD38は修飾された基質(例えば、8-BrNAD)を加水分解し、修飾された生成物(例えば、8-Br-cADPR)を生成する。(3)修飾された生成物は、競合的に、または非競合的に、cADPRが誘導する内部貯蔵からのCa²⁺放出を阻害する。(4)容量性のCa²⁺流入はなく、遊走はない。

【図6】cADPR結合の阻害剤は、容量性のCa²⁺流入を阻止する。(1)化学誘引物質が受容体に結合し、シグナリングを開始する(スクリーニングによりこのような化合物を同定する)。(2)CD38はNADを加水分解し、cADPRを生成する。(3)cADPRの阻害剤(8-Br-cADPR)は、競合的に、または非競合的に、cADPRが誘導する内部貯蔵からのCa²⁺放出を阻止する。(4)容量性のCa²⁺流入はなく、遊走はない。

30

【図7】CD38KOマウスは、肺炎連鎖球菌(*S.pneumoniae*)感染に、より感受性である。(a)C57BL/6 WT(白丸)およびCD38KO(黒丸)のマウスに、2種の投与量の肺炎連鎖球菌を気管内感染させた。感染させた動物の生存を、次の4日間にわたってモニターした。(b)放射線照射し、WTの骨髓(白四角)またはCD38KOの骨髓(黒四角)で再構成したWTマウスに、2種の投与量の肺炎連鎖球菌を感染させ、4日間モニターした。データは、少なくとも5つの独立した実験のうち代表的なものである。N=10匹のマウス/グループ。(c)WTまたはRag-2 KO(白バー)、およびCD38KOまたはCD38-Rag-2二重KO(黒バー)のマウスに、肺炎連鎖球菌を気管内感染させ、肺および末梢血における細菌力価を、感染12時間後に測定した。データは、3つの独立した実験のうち代表的なものである。N=10匹のマウス/グループ。*P<0.001; スチューデントt検定。

40

【図8(A)(C)】CD38KOの好中球は、感染部位にリクルートされず、細菌由来の化学誘引物質に向かって走化することができない。WTおよびCD38KOマウスに、肺炎連鎖球菌を気管内感染させ、感染後の複数の時点で、気道における細胞浸潤物を回収し計数した(パネルa: WT=白バー、およびCD38KO=黒バー)。(b)感染したWTおよびCD38KOマウスの肺における浸潤細胞の正体および頻度を、顕微鏡検査(倍率400倍)、およびDiff-Quick染色した細胞遠心分離調製物の計数により決定した。(c)WT(白バー)およびCD38KO(黒バー)マウスの肺洗浄液における分別細胞計数を、 $\times 10^6 \pm (\text{SE})$ の平均細胞数で表してある。5つの独立した実験で、類似した結果が得られた。n=5匹のマウス/グループ/時点、*P<0.01; **P=0.0

50

1、スチューデントt検定。(d)WT(白バー)およびCD38KOマウス(黒バー)からの精製した骨髓好中球を、従来のトランスウェル交差式ケモキネシス/走化性アッセイにおいて、媒体であるfMLPまたはIL-8に応答してそれらが遊走する能力について試験した。いかなる刺激も存在しない場合にトランスウェルの底部チャンバーに遊走した細胞の数は、CD38KOおよびWTの好中球の間に有意な差が無く、1500~2300細胞の範囲であった(示さず)。両チャンバーにおいて等濃度の刺激に応答して遊走する好中球の数(ケモキネシス)、および走化性勾配に応答して遊走する好中球の数(走化性)を示してある。示した値は、4つの異なる実験の平均値±S.E.である。 $*P<0.001$;スチューデントt検定。

【図8(B)】CD38KOの好中球は、感染部位にリクルートされず、細菌由来の化学誘引物質に向かって走化することができない。WTおよびCD38KOマウスに、肺炎連鎖球菌を気管内感染させ、感染後の複数の時点で、気道における細胞浸潤物を回収し計数した(パネルa: WT=白バー、およびCD38KO=黒バー)。(b)感染したWTおよびCD38KOマウスの肺における浸潤細胞の正体および頻度を、顕微鏡検査(倍率400倍)、およびDiff-Quick染色した細胞遠心分離調製物の計数により決定した。(c)WT(白バー)およびCD38KO(黒バー)マウスの肺洗浄液における分別細胞計数を、 $\times 10^6 \pm$ (SE)の平均細胞数で表してある。5つの独立した実験で、類似した結果が得られた。 $n=5$ 匹のマウス/グループ/時点、 $*P<0.01$; $**P=0.01$ 、スチューデントt検定。(d)WT(白バー)およびCD38KOマウス(黒バー)からの精製した骨髓好中球を、従来のトランスウェル交差式ケモキネシス/走化性アッセイにおいて、媒体であるfMLPまたはIL-8に応答してそれらが遊走する能力について試験した。いかなる刺激も存在しない場合にトランスウェルの底部チャンバーに遊走した細胞の数は、CD38KOおよびWTの好中球の間に有意な差が無く、1500~2300細胞の範囲であった(示さず)。両チャンバーにおいて等濃度の刺激に応答して遊走する好中球の数(ケモキネシス)、および走化性勾配に応答して遊走する好中球の数(走化性)を示してある。示した値は、4つの異なる実験の平均値±S.E.である。 $*P<0.001$;スチューデントt検定。

【図8(D)】CD38KOの好中球は、感染部位にリクルートされず、細菌由来の化学誘引物質に向かって走化することができない。WTおよびCD38KOマウスに、肺炎連鎖球菌を気管内感染させ、感染後の複数の時点で、気道における細胞浸潤物を回収し計数した(パネルa: WT=白バー、およびCD38KO=黒バー)。(b)感染したWTおよびCD38KOマウスの肺における浸潤細胞の正体および頻度を、顕微鏡検査(倍率400倍)、およびDiff-Quick染色した細胞遠心分離調製物の計数により決定した。(c)WT(白バー)およびCD38KO(黒バー)マウスの肺洗浄液における分別細胞計数を、 $\times 10^6 \pm$ (SE)の平均細胞数で表してある。5つの独立した実験で、類似した結果が得られた。 $n=5$ 匹のマウス/グループ/時点、 $*P<0.01$; $**P=0.01$ 、スチューデントt検定。(d)WT(白バー)およびCD38KOマウス(黒バー)からの精製した骨髓好中球を、従来のトランスウェル交差式ケモキネシス/走化性アッセイにおいて、媒体であるfMLPまたはIL-8に応答してそれらが遊走する能力について試験した。いかなる刺激も存在しない場合にトランスウェルの底部チャンバーに遊走した細胞の数は、CD38KOおよびWTの好中球の間に有意な差が無く、1500~2300細胞の範囲であった(示さず)。両チャンバーにおいて等濃度の刺激に応答して遊走する好中球の数(ケモキネシス)、および走化性勾配に応答して遊走する好中球の数(走化性)を示してある。示した値は、4つの異なる実験の平均値±S.E.である。 $*P<0.001$;スチューデントt検定。

【図9(A)】CD38発現性の好中球はcADPRを生成し、cADPRおよびリアノジンに反応して細胞内カルシウムを放出する。(a)骨髓、末梢血、および腹腔細胞を、WTおよびCD38KOマウス、または12時間前にチオグリコレートの腹腔内注射を受容したWTおよびCD38KOマウスから単離した。Mac-1^{hi}GR 1^{hi}好中球上のCD38の発現を、フローサイトメトリーにより分析した。WT好中球上(ヒストグラムの実線)、およびCD38KO好中球上(ヒストグラムの点線)のCD38の発現を示す。(b)CD15+ヒト末梢血好中球を、抗CD38モノクローナル抗体(塗りつぶしたヒストグラム)またはイソ型の対照抗体(点線)で染色することにより、CD38発現について評価した。(c)WTおよびCD38KOの骨髓好中球で、シクラーゼ活性を測定した。WTまたはCD38KOの好中球を単独で(WT=丸、およびCD38KO=四角)、またはNGDの存在下で(WT=三角、およびCD38KO=ひし形)、10分間インキュベートした。生成物であるcGDPRの蓄積を蛍

光分析で測定した。(d)RyR3 mRNAの発現レベルを、RT-PCRにより決定した。cDNAを、精製したWTの骨髓好中球(PMN)または脳組織から単離した。投入cDNAの量を示してある。(e~g)Fluo-3/Fura Redを負荷した骨髓好中球において、FACSにより細胞内遊離カルシウムレベルを測定した。(e)好中球をジギトキシンで透過処理し、次いで、ルテニウムレッドの存在下(橙色線)または非存在下(青色線)にて、リアノジンで刺激した。(f)好中球をジギトキシンで透過処理し、次いで、cADPR(青色線)、熱不活性化したcADPR(緑色線)、または8-Br-cADPR+cADPR(赤色線)で刺激した。(g)好中球を、タブシガルジン(青色線)、またはタブシガルジン+8-Br-cADPR(赤色線)で刺激した。パネルe~gにおけるデータは全て、少なくとも3つの独立した実験のうち代表的なものである。

【図9(B)(C)(E)(F)(G)】CD38発現性の好中球はcADPRを生成し、cADPRおよびリアノジンに応答して細胞内カルシウムを放出する。(a)骨髓、末梢血、および腹腔細胞を、WTおよびCD38KOマウス、または12時間前にチオグリコレートの腹腔内注射を受容したWTおよびCD38KOマウスから単離した。Mac-1^{hi}GR 1^{hi}好中球上のCD38の発現を、フローサイトメトリーにより分析した。WT好中球上(ヒストグラムの実線)、およびCD38KO好中球上(ヒストグラムの点線)のCD38の発現を示す。(b)CD15+ヒト末梢血好中球を、抗CD38モノクローナル抗体(塗りつぶしたヒストグラム)またはイソ型の対照抗体(点線)で染色することにより、CD38発現について評価した。(c)WTおよびCD38KOの骨髓好中球で、シクラーゼ活性を測定した。WTまたはCD38KOの好中球を単独で(WT=丸、およびCD38KO=四角)、またはNGDの存在下で(WT=三角、およびCD38KO=ひし形)、10分間インキュベートした。生成物であるcGDPRの蓄積を蛍光分析で測定した。(d)RyR3 mRNAの発現レベルを、RT-PCRにより決定した。cDNAを、精製したWTの骨髓好中球(PMN)または脳組織から単離した。投入cDNAの量を示してある。(e~g)Fluo-3/Fura Redを負荷した骨髓好中球において、FACSにより細胞内遊離カルシウムレベルを測定した。(e)好中球をジギトキシンで透過処理し、次いで、ルテニウムレッドの存在下(橙色線)または非存在下(青色線)にて、リアノジンで刺激した。(f)好中球をジギトキシンで透過処理し、次いで、cADPR(青色線)、熱不活性化したcADPR(緑色線)、または8-Br-cADPR+cADPR(赤色線)で刺激した。(g)好中球を、タブシガルジン(青色線)、またはタブシガルジン+8-Br-cADPR(赤色線)で刺激した。パネルe~gにおけるデータは全て、少なくとも3つの独立した実験のうち代表的なものである。

【図9(D)】CD38発現性の好中球はcADPRを生成し、cADPRおよびリアノジンに応答して細胞内カルシウムを放出する。(a)骨髓、末梢血、および腹腔細胞を、WTおよびCD38KOマウス、または12時間前にチオグリコレートの腹腔内注射を受容したWTおよびCD38KOマウスから単離した。Mac-1^{hi}GR 1^{hi}好中球上のCD38の発現を、フローサイトメトリーにより分析した。WT好中球上(ヒストグラムの実線)、およびCD38KO好中球上(ヒストグラムの点線)のCD38の発現を示す。(b)CD15+ヒト末梢血好中球を、抗CD38モノクローナル抗体(塗りつぶしたヒストグラム)またはイソ型の対照抗体(点線)で染色することにより、CD38発現について評価した。(c)WTおよびCD38KOの骨髓好中球で、シクラーゼ活性を測定した。WTまたはCD38KOの好中球を単独で(WT=丸、およびCD38KO=四角)、またはNGDの存在下で(WT=三角、およびCD38KO=ひし形)、10分間インキュベートした。生成物であるcGDPRの蓄積を蛍光分析で測定した。(d)RyR3 mRNAの発現レベルを、RT-PCRにより決定した。cDNAを、精製したWTの骨髓好中球(PMN)または脳組織から単離した。投入cDNAの量を示してある。(e~g)Fluo-3/Fura Redを負荷した骨髓好中球において、FACSにより細胞内遊離カルシウムレベルを測定した。(e)好中球をジギトキシンで透過処理し、次いで、ルテニウムレッドの存在下(橙色線)または非存在下(青色線)にて、リアノジンで刺激した。(f)好中球をジギトキシンで透過処理し、次いで、cADPR(青色線)、熱不活性化したcADPR(緑色線)、または8-Br-cADPR+cADPR(赤色線)で刺激した。(g)好中球を、タブシガルジン(青色線)、またはタブシガルジン+8-Br-cADPR(赤色線)で刺激した。パネルe~gにおけるデータは全て、少なくとも3つの独立した実験のうち代表的なものである。

【図10(A)(B)】CD38によって触媒されるcADPRが、好中球における細胞内カルシウム放出、細胞外カルシウム流入、および走化性を制御する。(a~c)細胞内遊離カルシウムのレベルを、Fluo-3/Fura Redを負荷した骨髓好中球において、FACSにより測定した。(

a)CD38KO(赤色線)およびWT(青色線)の好中球を、カルシウム不含バッファー中で、fMLPまたはIL-8で刺激した。(b)CD38KO(赤色線)およびWT(青色線)の好中球を、カルシウム含有バッファー中で、fMLPまたはIL-8で刺激した。(c)CD38KO(赤色線)およびWT(青色線)の好中球を、カルシウム含有培地±8-Br-cADPR中でプレインキュベートし、次いで、fMLPまたはIL-8で刺激した。パネルa~cにおけるデータは全て、少なくとも5つの独立した実験のうち代表的なものである。(d)WT好中球を、培地、EGTA、または8-Br-cADPRでプレインキュベートし、次いで、底部チャンバーにfMLPまたはIL-8を含むトランスウェルの上部チャンバーに配置した。走化性勾配に応答して底部チャンバーに遊走した細胞を回収し、フローサイトメトリーにより計数した。示した値は、3つのウェル/実験条件での3つの別々の実験からの平均値±S.E.である。***P=0.008、マンホイットニーの順位和検定。

10

【図10(C)(D)】CD38によって触媒されるcADPRが、好中球における細胞内カルシウム放出、細胞外カルシウム流入、および走化性を制御する。(a~c)細胞内遊離カルシウムのレベルを、Fluo-3/Fura Redを負荷した骨髓好中球において、FACSにより測定した。(a)CD38KO(赤色線)およびWT(青色線)の好中球を、カルシウム不含バッファー中で、fMLPまたはIL-8で刺激した。(b)CD38KO(赤色線)およびWT(青色線)の好中球を、カルシウム含有バッファー中で、fMLPまたはIL-8で刺激した。(c)CD38KO(赤色線)およびWT(青色線)の好中球を、カルシウム含有培地±8-Br-cADPR中でプレインキュベートし、次いで、fMLPまたはIL-8で刺激した。パネルa~cにおけるデータは全て、少なくとも5つの独立した実験のうち代表的なものである。(d)WT好中球を、培地、EGTA、または8-Br-cADPRでプレインキュベートし、次いで、底部チャンバーにfMLPまたはIL-8を含むトランスウェルの上部チャンバーに配置した。走化性勾配に応答して底部チャンバーに遊走した細胞を回収し、フローサイトメトリーにより計数した。示した値は、3つのウェル/実験条件での3つの別々の実験からの平均値±S.E.である。***P=0.008、マンホイットニーの順位和検定。

20

【図11】NAD⁺類似体は、fMLPで活性化した好中球におけるカルシウム流入および走化性を制御する。(a)WTマウスからの、色素負荷した精製した骨髓好中球を、培地(青色線)または漸増濃度のN(8-Br-A)D⁺(赤色線)中でプレインキュベートし、次いで、fMLPで刺激した。細胞内カルシウムレベルの変化を、フローサイトメトリーにより測定した。データは、3つの独立した実験のうち代表的なものである。(b~c)WT(左パネル)およびCD38KO(右パネル)の好中球を、培地(黒バー)またはN(8-Br-A)D⁺(白抜きバー)中でプレインキュベートし、次いでそれを、底部チャンバーにfMLP(パネルb)またはIL-8(パネルc)を含むトランスウェルの上部チャンバーに入れた。走化性勾配に応答して底部チャンバーに遊走した細胞を回収し、フローサイトメトリーにより計数した。示した値は、3つのウェル/実験条件での3つの別々の実験からの平均値±S.E.である。***P<0.001、スチューデントt検定。

30

【図12】図12A-B。アレルギー性喘息のモデルにおける、肺への好中球および好酸球のリクルートは、CD38 KOマウスで損なわれる。WT C57BL/6マウスからのナイーブCD4 T細胞、またはWT C57BL/6マウスからのOVAで抗原刺激したCD4 T細胞を、示したようにしてWT C57BL/6マウスまたはCD38KO-C57BL/6マウスのいずれかに移植した。その後、連続7日間、10 µgのOVAを含むPBS溶液を気管内滴下注入することにより、レシピエントのマウスをチャレンジした。最初のチャレンジ後8日目の肺洗浄液中の好中球(A)および好酸球(B)を、Diff-Quick染色した細胞遠心分離調製物を顕微鏡検査(400倍)することにより計数した。

40

【図13】SARC cDNAの同定および単離。図13A。ADP-リボシルシクラーゼファミリーのコンセンサス配列を用いてブラスト検索で同定された、クローニングされたマンソン住血吸虫EST(アクセッション番号AW017229)を用いて、全長cDNAコード化物を、マンソン住血吸虫のcDNAライブラリーからクローニングした。推定開始メチオニンを緑色で示し、終止部位を赤で示してある。最初に同定されたESTをクローニングするのに用いられたプライマーを青色で示し、シクラーゼファミリー内で絶対的に保存されているEST内のアミノ酸を黄色で示してある。図13B。マンソン住血吸虫SM38のアミノ酸配列と、ADP-リボシルシクラーゼファミリーの代表的なメンバーとの比較。絶対的に保存されているアミノ酸を、*で示し、保存的置換のアミノ酸を(:)で示してある。同一性%、および類似性%を示してあ

50

る。内部ジスルフィド結合およびタンパク質のフォールディングに必要とされる、10個の保存されているシステイン残基を赤で示してある。シクラーゼファミリーメンバーの活性部位内の高度に保存された「シグナチャードメイン」を黄色で示し、重要な基質結合性トリプトファン残基を緑色で示し、重要な触媒性グルタミン酸残基を青色で示してある。

【図14】SM38は、アメフラシ属のADPリボシルシクラーゼおよびヒトCD38シクラーゼに相同である。SM38のタンパク質配列を、アメフラシ属のADPリボシルシクラーゼ(パートa)、およびヒトADPリボシルシクラーゼCD38(パートb)に対するタンパク質配列とアラインした。アメフラシ属のタンパク質とSM38との間には21%の同一性、ヒトCD38とSM38の間には23%の同一性を示す、高度の相同性(四角で囲んだ残基)が観察された。シクラーゼタンパク質ファミリーのメンバー全てに存在する、保存されている10個のシステイン残基は、SM38にも存在する(影付の四角)。CD38に見られるが(下線)アメフラシ属には見られない2個のさらなるシステインは、SM38にもない。しかし、SM38タンパク質は、独特で、かつCD38またはアメフラシ属のシクラーゼに見られない2個のさらなるシステイン残基を含んでいる(下線付き)。最も重要なのは、CD38およびアメフラシ属の酵素に対して同定された活性部位の触媒残基(星印の残基)が、SM38にも存在することである。

【図15】マンソン住血吸虫からクローニングしたSM38と、日本住血吸虫から同定された相同タンパク質(アクセッション番号AY222890)との間のアミノ酸配列の比較。保存されているアミノ酸を*で、保存的置換のアミノ酸を(:)で示してある。同一性%および類似性%を示してある。SignalP予測プログラム(Bendtsen, J.D.ら、2004年、J Mol Biol、340巻、783~795頁)により同定されたシグナル配列を緑色で示し、潜在的なGPI固定配列(Eisenhaberら、1998年、Protein Eng.、11巻、1155~1161頁)を赤紫色で示し、GPI付加のための可能性のある ω 部位を黄色で示してある。全てのシクラーゼファミリーのメンバーの間で保存されている10個のシステイン残基を赤色で示し、住血吸虫のタンパク質だけに見られる2個のさらなるシステイン残基を橙色で示してある。不変の触媒性グルタミン酸(E202)残基を青色で示し、4個の潜在的なN結合型グリコシル化部位を太字およびイタリックで示してある。

【図16】SM38のポリクローナル抗体の、住血吸虫の抽出物中の天然タンパク質との免疫反応性。アフィニティー精製したSM38ポリクローナル、および正常マウスIgGを用いて、12%アガロースゲル上で分離された住血吸虫抽出物をプローブした。パネルIは、マンソン住血吸虫の成虫全体(レーン1)、死骸(レーン2)、およびNP-40(レーン3)抽出物の、クーマシーブルー染色したSDSポリアクリルアミドゲル(分子量範囲33~45kDaの間)を示す。パネルIIは、正常マウスIgGの住血吸虫抽出物との反応性を示す。特異的な反応性は見出されなかった。パネルIIIは、抗SM38マウスIgGは、試験した全抽出物において見かけの分子量が約38kDaの特異的なタンパク質を検出したことを示している。

【図17】SM38の逆翻訳。SM38の303アミノ酸をコードする領域を逆翻訳して、SM38タンパク質をコードする縮重DNA配列を同定した。

【図18】SM38は、2つの住血吸虫種により発現される高度に保存されたタンパク質である。図18A。シクラーゼファミリーメンバーの系統学的比較。シクラーゼファミリーの以前に同定された11のメンバーのアミノ酸配列(各アクセッション番号に対する実験手順を参照されたい)を、2つの新規なSM38配列と比較し、系統樹を構築した。図18B。SM38の推定上の三次元構造。Modeller(50)およびAMBER5を用いたエネルギー最小化を用いて、アメフラシ属のADP-リボシルシクラーゼ(PDBエントリー1lbe)およびヒトCD157(PDBエントリー1isf)両方の結晶学的座標に基づいて、ホモロジーモデルを構築した。モノマーのSM38(緑色)のリボン状の図を、ヒトCD157(赤色)のその上に重ねた。CD157に結合しているニコチンアミド(PDBエントリー1ism)を空間充填モデルとして示す。炭素原子を白色に、酸素原子を赤色に、窒素原子を濃青色に、水素原子を青緑色に着色してある。図18C。SM38の推定上の活性部位のコノリー面。重要な4個のアミノ酸の表面を、Cと規定したカラーコードを用いて強調してある。示したアミノ酸残基には、推定上の触媒性Glu²⁰²、CD38のADP-リボシルシクラーゼ活性を制御するGlu¹²⁴、および基質結合性のTrp¹⁶⁵およびHis¹⁰³が含まれる。SYBYL(Tripes Inc.)を用いてレンダリングを行った。

【図19】マンソン住血吸虫のSM38は、哺乳動物細胞で異種性に発現される場合は、GPI固定されたNADaseである。図19A。天然のSM38は細胞結合性である。COS-7細胞に、全長SM38(SM38-opt)を一過性にトランスフェクトした。3日後、培地(丸)および細胞を、別々に回収した。細胞を溶解させ、界面活性剤に可溶性のタンパク質を回収した(四角)。細胞溶解物のアリコートおよび馴化組織培養培地を、 ϵ -NAD⁺とともにインキュベートし、 ϵ -NAD⁺の蛍光性 ϵ -ADPRへの変換をマイクロプレート蛍光光度計で経時測定した。データを、時間に対する相対的な蛍光単位(RFU)で表してある。トランスフェクトしていないCOS-7細胞、または空のベクターをトランスフェクトしたCOS-7細胞では、酵素活性は観察されなかった(データは示さず)。図19B。SM38は、COS-7細胞において約48kDのタンパク質として発現される。マンソン住血吸虫のSM38の天然シグナル配列を、哺乳動物のCD8シグナル配列およびFLAGタグ(CD8L/FLAG-SM38)で置き換えた。CD8L/FLAG-SM38構築物を一過性にトランスフェクトしたCOS-7細胞の細胞溶解物を、SM38を同定するための抗FLAG抗体を用いて、ウェスタンブロットにより分析した。図19C~D。SM38は、トランスフェクトされたCOS-7細胞において、原形質膜結合性のタンパク質として発現される。COS-7細胞に、スライド上で、CD8L/FLAG-SM38(パネルC)または空の発現ベクター(パネルD)を一過性にトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を固定し、ビオチン化した抗FLAG抗体で染色し、その後、蛍光色素を連結したストレプトアビジン(赤色)、およびその後の核の対比染色(DAPI、青色)によって染色した。細胞を、蛍光顕微鏡により分析した。図19E。SM38は、COS-7細胞においてGPI-固定されるタンパク質として発現される。COS-7細胞に、CD8L/FLAG-SM38(丸および三角)または対照の発現ベクター(四角およびひし形)のいずれかを一過性にトランスフェクトする。3日後、トランスフェクトした細胞を洗浄し、次いで、新鮮な培地(四角および丸)、またはPI-PLCを含む新鮮な培地(ひし形および三角)で培養した。2時間後に培地を回収し、 ϵ -NAD⁺の存在下でインキュベートした。 ϵ -NAD⁺の、蛍光性 ϵ -ADPRへの変換を、マイクロプレート蛍光光度計で測定し、時間に対するRFUとして示す。

【図20】組換え可溶性SM38は、NAD⁺グリコヒドロラーゼ、シクラーゼ、およびグリコシル交換反応を触媒する。図20A。組換え可溶性SM38が分泌される。COS-7細胞に、GPI固定配列を欠く構築物である、CD8L/FLAG-SM38 Δ GPIを一過性にトランスフェクトした。トランスフェクトしたCOS-7細胞を溶解させ、界面活性剤に可溶性のタンパク質を回収し、細胞溶解物(四角)および培地(丸)のアリコートを回収した。次いで、アリコートを ϵ -NAD⁺とインキュベートし、蛍光性 ϵ -ADPRの変換および蓄積を、マイクロプレート蛍光光度計で測定した。残存する培養培地を、抗FLAGカラム上で精製し、アリコートをNADase活性について、基質として ϵ -NAD⁺を用いて再び試験した(挿入図)。データは、時間に対するRFUとして示す。図20B。組換え可溶性SM38を哺乳動物細胞でグリコシル化する。組換え可溶性SM38を、CD8L/FLAG-SM38 Δ GPIを一過性にトランスフェクトしたCOS-7細胞から精製した。アフィニティー精製したSM38を、エンドグリコシダーゼ-F1(Endo-F)の存在下または非存在下でインキュベートし、タンパク質をSDS-PAGEにより分離し、銀染色(左パネル)、または抗FLAG抗体でのウェスタンブロット(右パネル)により分析した。可溶性の組換えSM38の分子量を示してある。図20C。組換え可溶性SM38がピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)で発現される。ピキア属(*Pichia*)を、SM38外ドメインを含む発現ベクターで形質転換した。安定なクローンを選択し、SM38の生成および分泌をメタノールで誘導した。分泌されたSM38を、クロマトグラフィーにより培地から精製し、SDS-PAGEおよびクーマシー染色により分析した。精製したタンパク質の分子量は、45.2(*)および43.6(**)kDaである。図20D。可溶性組換えSM38は、NAD⁺のADPRへの変換を触媒する。組換え可溶性SM38を、ピキア属から精製し、次いで放射標識したNAD⁺とともにインキュベートした。放射標識したADPRおよびcADPRの蓄積を、HPLCにより測定した。図20E~F。可溶性の組換えSM38は、NGD⁺のサイクリックGDP-リボースへの変換を触媒する。精製された組換え可溶性SM38を、漸増量のNGD⁺とともにインキュベートし、サイクリックGDPRおよびGDPRの蓄積を、様々な時点でHPLCおよびUV検出(260nm)により検出した。図20G。SM38は、NADP⁺のNAADP⁺へのグリコシル交換を触媒する。NADP⁺(1mM)を、ニコチン酸(NA)20mMの存在下、37℃で、組換え精製されたSM38とともにインキュベートした。アリコートをHPLCにより分析した。化合物を、

10

20

30

40

50

260nmでのUV吸収により検出した。ADPR(P)、アデノシンジホスホリボース2'-リン酸。

【図 2 1】SM38の発現は、マンソン住血吸虫では発生的に制御される。図21A。マンソン住血吸虫の多数の発生段階から単離したRNAから調製したcDNAを、SM38特異的プライマーを用いたRT-PCR反応のテンプレートとして用いた。住血吸虫に特異的な α -チューブリンのプライマーを用いて、構成的に転写される内部コントロール遺伝子を増幅した。試験した段階に、1から12までの番号をつけ、これらは、以下の通りである:それぞれ、非感染のビオンファラリア・グラブラータ(*B. glabrata*)、感染30日のビオンファラリア・グラブラータ、マンソン住血吸虫卵、マンソン住血吸虫セルカリア、マンソン住血吸虫の15日齢の幼住血吸虫、21日齢の幼住血吸虫、28日齢の虫体、35日齢の虫体、成虫(>42日齢)虫体ペア、雌成虫、雄成虫、および逆転写なし(-RT)の対照。図21B。 α -チューブリン内部コントロールのレベルのパーセント値として、寄生虫の生活環の、試験した各発生段階により示されたSM38の平均発現レベルの棒グラフ表示。示したデータは、3つの独立したPCR増幅から定量した値の平均である。バックグラウンド(-RT対照)を、分析した各サンプルから差し引いた。

【図 2 2】マンソン住血吸虫成虫は、外側膜上に、GPI-固定されたNADaseを発現する。図22A~C。マンソン住血吸虫成虫は、GPI-固定されたNAD⁺グリコヒドロラーゼおよびNGD⁺シクラーゼを発現する。膜ミクロソームを、マンソン住血吸虫の凍結成虫2gから調製した。ミクロソームをバッファーに再懸濁し、¹⁴C標識したNAD⁺(A)または非標識のNGD⁺(B)とともにインキュベートした。生成物の形成を、図20に記載したように、HPLCにより測定した。パネルCでは、膜ミクロソームを、PI-PLCの存在下または非存在下で2時間インキュベートした。上清および膜の画分を別々に回収し、次いで、¹⁴C標識したNAD⁺とともにインキュベートした。ADPRの生成をHPLCにより測定し、結果を非処理の膜の画分と比較した活性%として表してある。非処理の膜ミクロソームの比活性は、36mmol/分/mgタンパク質であった。図22D。マンソン住血吸虫成虫は、外膜のNAD⁺グリコヒドロラーゼを発現する。10匹の生存するマンソン住血吸虫成虫を、96ウェルプレートの単一のウェルに配置し、培地(丸)または ϵ -NAD⁺を含む培地(四角)中でインキュベートし、 ϵ -NAD⁺の蛍光性 ϵ -ADPRへの変換を、マイクロプレート蛍光光度計で測定し、時間に対するRFUとして示す。図22E。マンソン住血吸虫成虫は、GPI-固定された外側外皮のNADaseを発現する。10匹の生存するマンソン住血吸虫成虫を96ウェルプレートの1個のウェルに配置し、次いで、PI-PLCの存在下(ひし形および三角)または非存在下(四角および丸)で2時間インキュベートした。各ウェルからのバッファーを除去し、次いで、 ϵ -NAD⁺の存在下(丸および三角)、または非存在下(四角およびひし形)でインキュベートした。蛍光性 ϵ -ADPRの生成を、マイクロプレート蛍光光度計で測定し、時間に対するRFUとして示す。

【図 2 3】SM38 cDNAに対して産生された抗血清は、マンソン住血吸虫成虫から酵素的に活性なSM38を免疫沈降させる。図23A。SM38 cDNA免疫化に応答して産生された抗体は、組換え可溶性SM38を認識する。対照血清(IgG)、およびCD8L/FLAG-SM38 Δ GPI構築物をワクチン接種したマウスから回収した抗血清(抗SM38)を用いて、組換え可溶性SM38または無関係のタンパク質(オボアルブミン、OVA)を含むウェスタンブロットをプローブした。図23B~D。SM38 cDNAでの免疫化に応答して産生された抗血清は、原形質膜に結合したSM38を特異的に認識する。COS-7細胞に、スライド上で、CD8L/FLAG-SM38(C~D)または空の発現ベクター(B)を用いて、一過性にトランスフェクトした。3日後、細胞を、抗SM38抗血清(B、D)または正常マウス血清(C)で染色し、その後、蛍光色素を連結した抗マウスIgG(赤色)、および核の対比染色(DAPI、青色)で染色した。図23E。抗SM38抗体は、トランスフェクトしたCOS-7細胞から機能的なSM38タンパク質を免疫沈降する。COS-7細胞に、CD8L/FLAG-SM38(四角および丸)または空の発現ベクター(ひし形および三角)を用いて、一過性にトランスフェクトした。3日後、細胞を溶解させて、その溶解液を、正常マウスIgGプロテインGビーズ(ひし形および四角)、または抗SM38プロテインGビーズ(三角および丸)のいずれかと、インキュベートした。免疫沈降したタンパク質/ビーズ複合体を、 ϵ -NAD⁺の存在下でインキュベートし、蛍光性 ϵ -ADPRの蓄積をマイクロプレート蛍光光度計を用いて測定した。データは時間に対するRFUとして示す。図23F。SM38 cDNAの免疫化に応答して産生され

た抗体は、マンソン住血吸虫成虫の溶解液から酵素的に活性なSM38を免疫沈降する。マンソン住血吸虫成虫を界面活性剤中で溶解させて、その溶解液を、正常マウスIgGプロテインGビーズ(三角)、または抗SM38プロテインGビーズ(ひし形)のいずれかとともにインキュベートした。免疫沈降したタンパク質/ビーズ複合体を、 ϵ -NAD⁺の存在下でインキュベートし、蛍光性 ϵ -ADPRの蓄積をマイクロプレート蛍光光度計を用いて測定した。データは、時間に対するRFUとして示す。図23G。SM38 cDNAの免疫化に応答して産生された抗体は、マンソン住血吸虫成虫により発現されるGPI-固定されたタンパク質を認識する。生存する成虫を、PI-PLCの存在下で2時間、HBSS中でインキュベートした。上清を回収し、濃縮し、次いでSDS-PAGEゲル上で電気泳動した。全タンパク質の15%を、銀染色、および抗SM38抗血清を用いたウェスタンブロットにより分析した。対照のレーンは、PI-PLC単独、および漸増濃度の組換え可溶性SM38を含んでいる。

10

【図24】マンソン住血吸虫成虫における、SM38の免疫組織学的局在。住血吸虫成虫の凍結切片(A~F)、および生存しているかまたはアセトン固定した、ホールマウント成虫(G~I)を調製した。パネルAおよびDは、位相差視野を示している。緑色の蛍光フィルターを用いて可視化したサンプル(パネルBおよびE)は、雌虫の卵黄線を含む自己蛍光性構造物を示している(パネルB)。SM38を局在化するために、切片およびホールマウントを、抗SM38抗血清から精製したIgG画分で(パネルF、H、I)、または正常マウスIgGで(パネルC、G)染色し、その後、抗マウスIgGおよびAlexaFluor 647コンジュゲート化ストレプトアビジンで染色した。SM38を、遠赤外蛍光フィルターを用いて可視化した。正常マウスIgGで染色したスライドは、いかなる特異的反応性も示さなかったが(パネルC、G)、一方、抗SM38抗体で染色したスライドは、雄虫体交接管の外皮層に特異的な染色を示していた(矢印、パネルF)。抗SM38マウスIgGで染色した、アセトン固定した成虫全体(雄虫体を示す)は、強力な全体蛍光を示し(パネルH)、一方、生存する虫体全体(雌を示す、パネルI)では、蛍光は、口吸盤(Os)、腹吸盤(Vs)、および結節(Tu)に、より局在していた。Vは卵黄線(vitellaria)を意味し、Gは腸、Tは外皮、およびGCは雄の交接管である。切片および虫体全体を、それぞれ、倍率200倍、および100倍で写真撮影した。

20

【図25】アレルゲン特異的T細胞(または自己免疫性T細胞)上のCD38発現は、これらが、分化したエフェクター細胞に成熟するのに、または炎症部位へ遊走するのに必要である。CD38欠損であるOVA特異的T細胞は、10 μ g NP-OVA(n=7匹のマウス/グループ)またはPBS投与(n=3匹のマウス/グループ)で感作したマウスのリンパ節および肺における炎症部位の両方において数が減少する。同様に、アレルゲン誘発性の炎症反応は、CD38欠損性T細胞を受容するマウスの肺において抑制される。偽およびアレルゲンでチャレンジした宿主のリンパ節およびBALに存在する、活性化表現型(CD45.2⁺CD4⁺CD62L^{lo})を有するドナーOVA特異的T細胞の数を、図25に示してある。

30

【図26】アレルゲン特異的T細胞(または自己免疫性T細胞)上のCD38発現は、これらが、分化したエフェクター細胞に成熟するのに、または炎症部位へ遊走するのに必要である。CD38欠損であるOVA特異的T細胞は、10 μ g NP-OVA(n=7匹のマウス/グループ)またはPBS投与(n=3匹のマウス/グループ)で感作したマウスのリンパ節および肺における炎症部位の両方において数が減少する。同様に、アレルゲン誘発性の炎症反応は、CD38欠損性T細胞を受容するマウスの肺において抑制される。マウスの肺に浸潤する炎症細胞の数を、図26に示してある。

40

【図27】炎症性アレルゲン特異的T細胞の抗原刺激は、T細胞が正常動物由来である場合でも、CD38欠損マウスで低減する。偽およびアレルゲンでチャレンジした宿主のリンパ節およびBALに存在する、ドナーOVA特異的T細胞(CD45.2⁺CD4⁺)の数を、図27に示してある。リンパ節に存在する活性化したCD62L^{lo}ドナーT細胞の数も、図27に示してある。

【図28】炎症性アレルゲン特異的T細胞の抗原刺激は、T細胞が正常動物由来である場合でも、CD38欠損マウスで低減する。マウスの肺に浸潤する炎症細胞の数を、図28に示してある。OVAでチャレンジしたWTまたはCD38KOマウスの肺の代表的なH&E切片も、図28に示してある。

【図29】肺においてアレルゲンで誘発される炎症反応は、CD38欠損マウスにおいて低減

50

する。CD38欠損(KO)または正常C57BL/6(WT)マウスに、0日目にオボアルブミン(OVA)で抗原刺激し、またはPBSを接種した。免疫化後42日目に、動物は非処理のままとするか(抗原刺激のみ)、または次の7日間1日1回OVA 10 μ gを鼻腔内投与してチャレンジした(抗原刺激+チャレンジグループ、およびチャレンジだけのグループ)。OVAの最終投与の1日後に全グループのマウスから肺を単離し、組織学的検査用に調製した。各グループからの代表的な動物のH&E染色したパラフィン切片を示してある。

【図30】CD38欠損マウスでは、糖尿病の発症が遅延することを示す図である。CD38欠損(KO)または正常BALB/c(WT)マウスに、ストレプトゾトシンを注射した。最終のSTZ注射の10日後および17日後に、血中グルコースレベルを測定した。

【図1】

化学誘引物質のシグナリングに対する正常な細胞応答

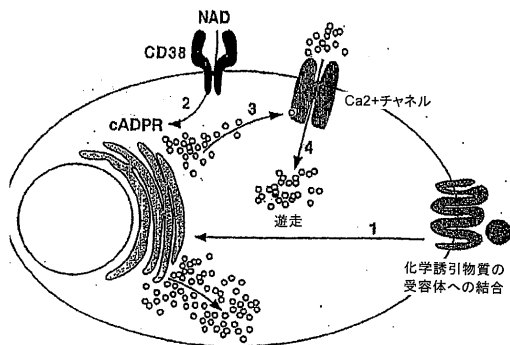


Figure 1

【図2】

CD38によるcADPR生成の阻害剤は、容量性Ca2+侵入および化学誘引物質誘発性遊走を妨げる

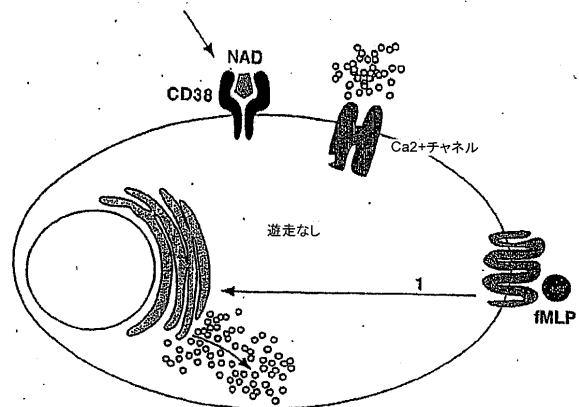


Figure 2

【図 3】

CD38酵素活性を制御するタンパク質(スクリーニングにより、
これらのタンパク質を活性化または不活性化する化合物が同定される)

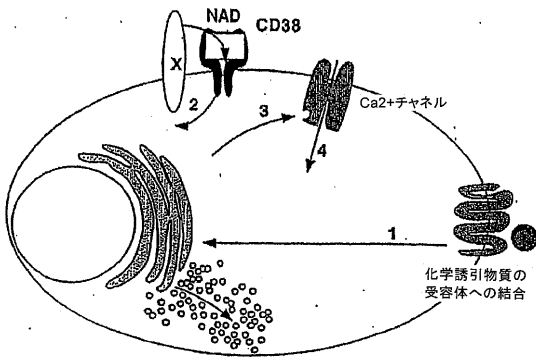


Figure 3

【図 4】

CD38の発現を制御するタンパク質(スクリーニングにより、
これらのタンパク質を活性化または不活性化する化合物が同定される)

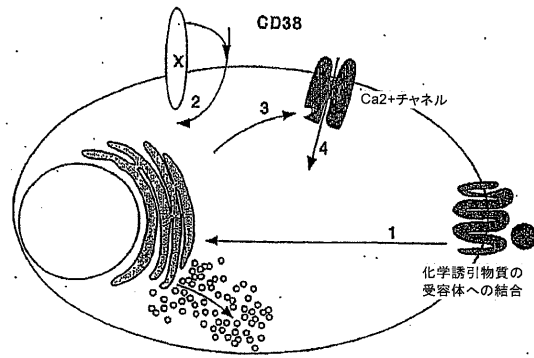


Figure 4

【図 5】

CD38の代替基質はcADPRの阻害剤を生成し、
容量性のCa2+放出を抑制しうる

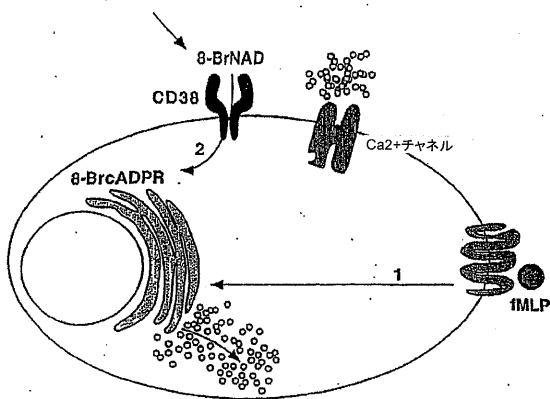


Figure 5

【図 6】

cADPR結合の阻害剤は、容量性Ca2+流入を阻止する

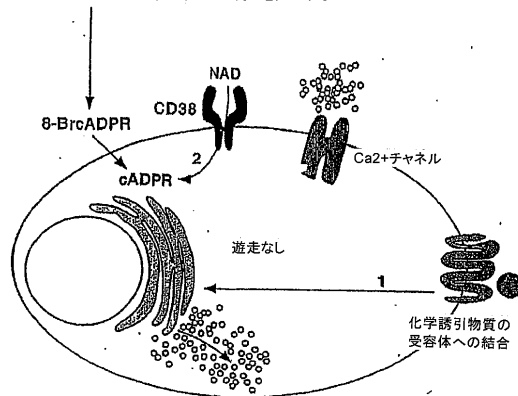


Figure 6

【図 7】

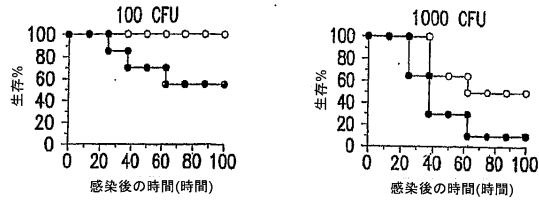


FIG. 7A

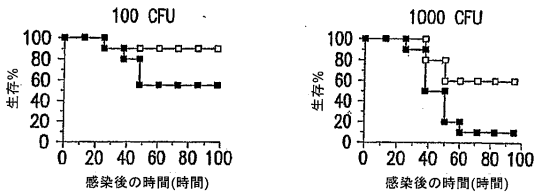


FIG. 7B

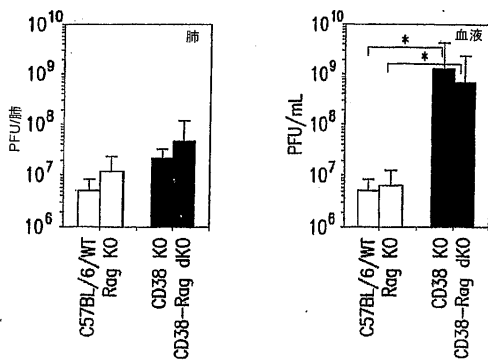


FIG. 7C

【図 8 (B)】

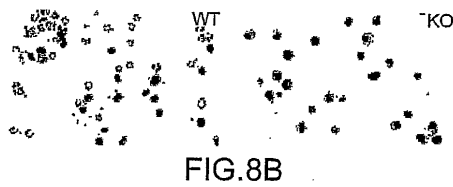


FIG. 8B

【図 8 (A) (C)】

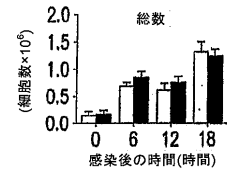


FIG. 8A

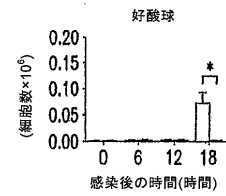
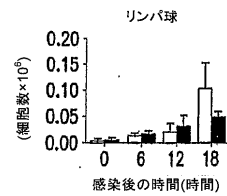
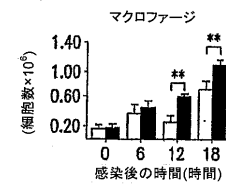
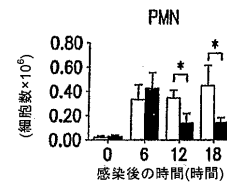


FIG. 8C

【図 8 (D)】

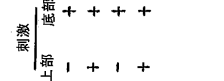


FIG. 8D

【図 9 (A)】

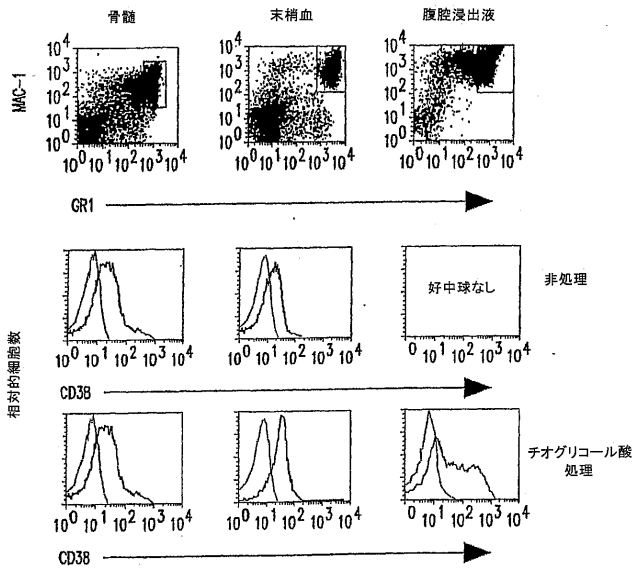


FIG. 9A

【図 9 (B) (C) (E) (F) (G)】

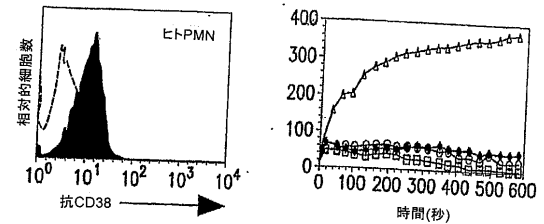


FIG. 9B

FIG. 9C

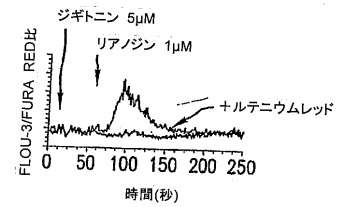


FIG. 9E

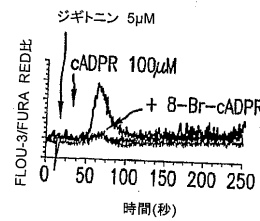


FIG. 9F

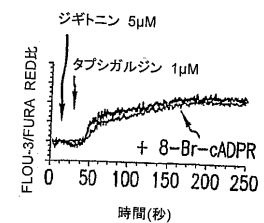


FIG. 9G

【図 9 (D)】

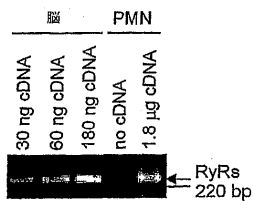


FIG. 9D

【図 10 (A) (B)】

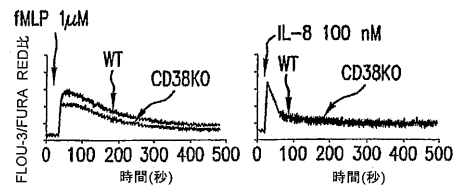


FIG. 10A

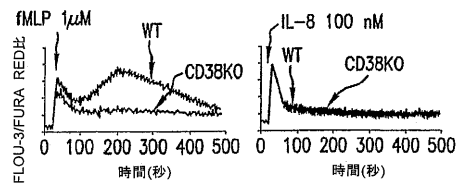


FIG. 10B

【図 10 (C) (D)】

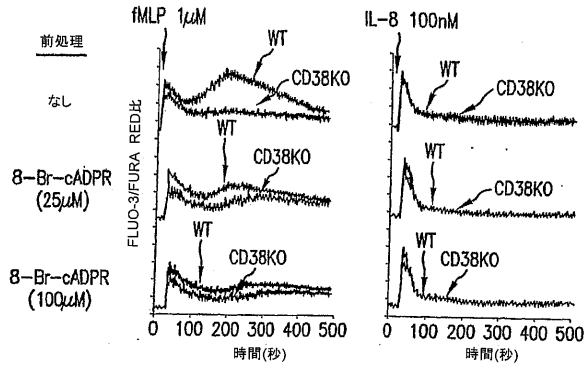


FIG. 10C

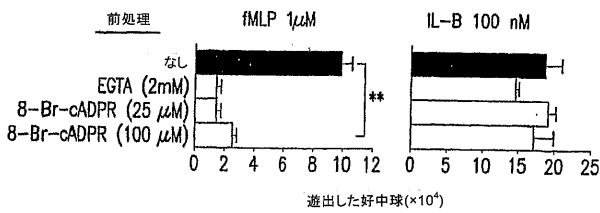


FIG. 10D

【図 12】

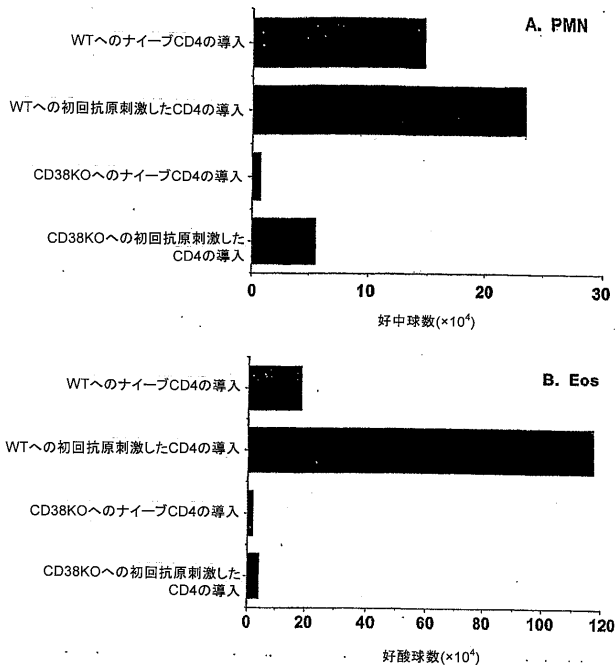


Figure 12

【図 11】

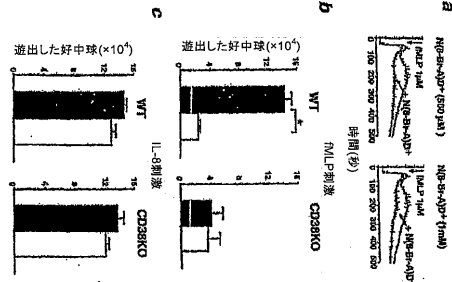


Figure 11A-C

【図 13】

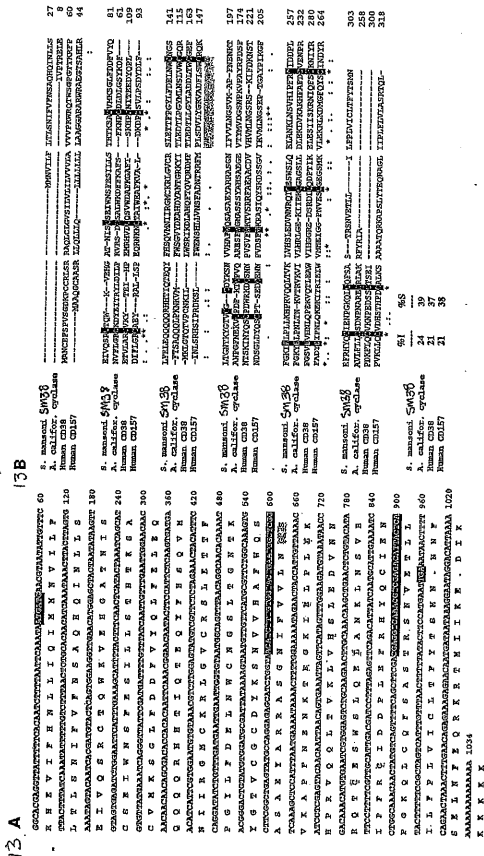
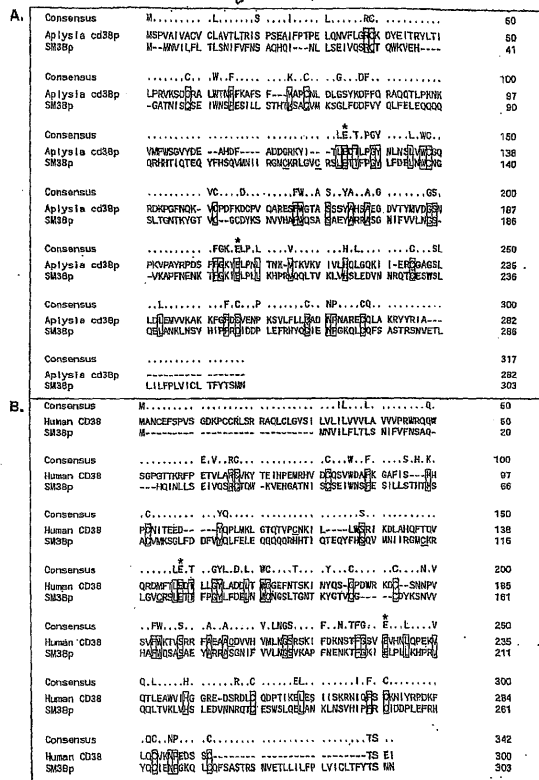


Figure 13

【図 14】

Figure 14 A-B



【图 17】

ATGATGAAY	TNATHYTNTT	YYTNACNYTN	WSNAAYATHT	TYGTNTTYAA	50
YWSNGNCNAR	CAYCARATHA	AYYNTYTNWS	NGARATHGTH	CARWSNMGNT	100
GACNACARTG	GAARGTNGAR	CAYGGNGCNA	CNAAAYTHWS	NTGYWSNGAR	150
ATHTGGAAYT	SNTTYTGARWS	NATHYNTYTN	WSNACNCAYA	CNAAARWSNGC	200
NTGYGTNATG	AARWSNNGNY	TNTTYTGAYGA	YTTYGTNTAY	CARYTNTTYG	250
ARYTNGARCA	RCRCARCARG	CARMGNCAYC	AYACNATHCA	RACNGARCAR	300
TAYTTYCAYT	SNARGCTNAT	GAAYATHATH	MNGNGNATGT	GYAARMGNYT	350
NGNGNTNTGY	MGNWSNYTNG	ARNACNACNTT	YCCNGGNTAY	YTNTTYGAYG	400
ARYTNAAYTG	GTGYAAYGGV	WSNTYTNACNG	GNAAAYCNAA	RTAYGNGACN	450
GTNTGYGGNT	GYGATYAYAA	RWSNAAAYGTN	GTNCAACNGT	TYTGGCARWS	500
NGCNWSNCGCN	GARTAYGCGM	GMMNGCGCWS	NGGNAAYATH	TTYGTNGTNY	550
TNAAAYGGNWS	NGTNAARGCNG	CCNTTYTNGA	ARARAYAACR	NTTYGNGAAR	600
ATHGARYTNC	CNYTHYTNAAR	CATYACNGMN	GTNCAACNGT	TNACNGTNGA	650
RTYGTNGTNC	WSNYTNGGARG	AYGTNAAAYAA	YMGNCARACN	TGYGARWSNT	700
GGWSNTYACAY	RGARYTNGCN	AAAYARYTNA	AYWSNGTNGCA	YATHCCNTTY	750
MGNTGYATHG	AYGAYCCNYT	NGARTYTGMN	CATYAYTCART	GYATHGARAA	800
YCCNGNGNAAR	CARYTNTGYC	ARTTTYWSNGC	NWSNACNMGN	WSNAAAYGTNG	850
ARACNYTNYT	NATHYTNTTY	CCNYTNGTNA	THTYGYTNA	NTTYTAYACN	900
WSNATGAAY					900

Figure 17

【図 15】

[illegible]

Fig. 15

【図 16】

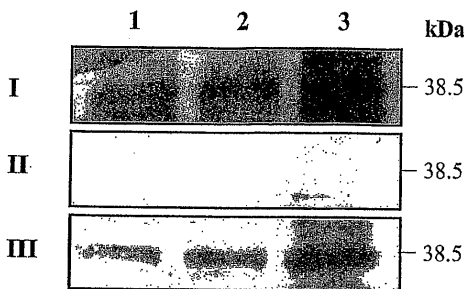


Fig. 16

【例 18】

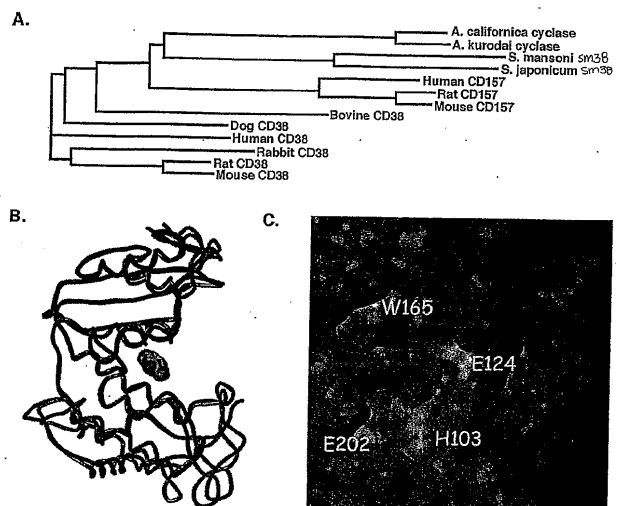


Figure 18

【図 19】

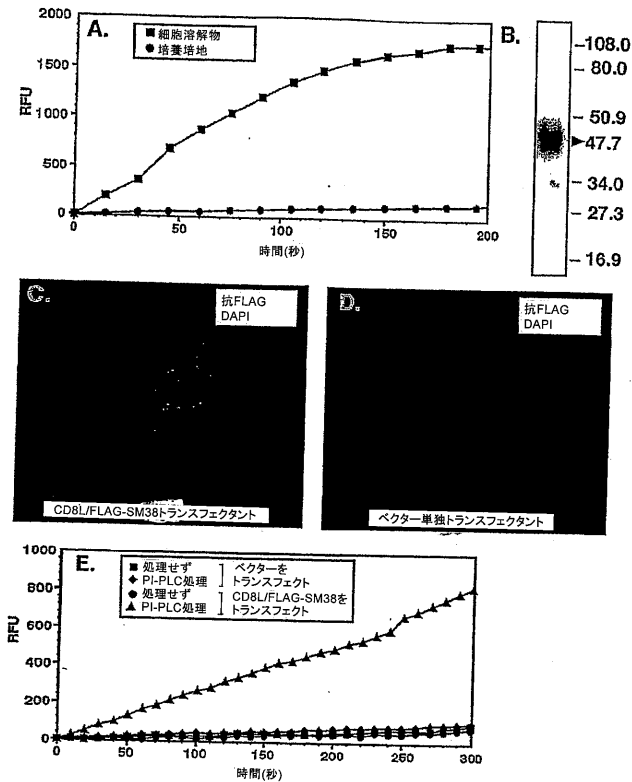


Figure 19

【図 21】

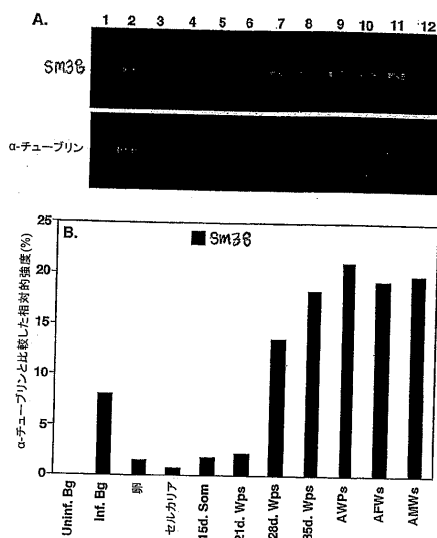


Figure 21

【図 20】

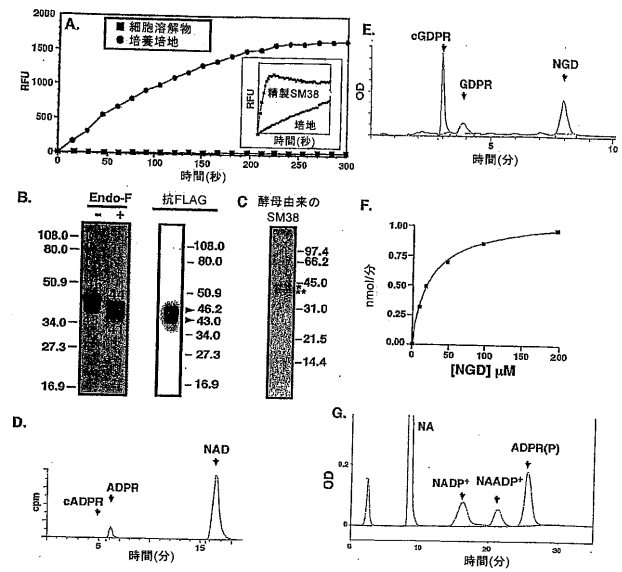


Figure 20

【図 22】

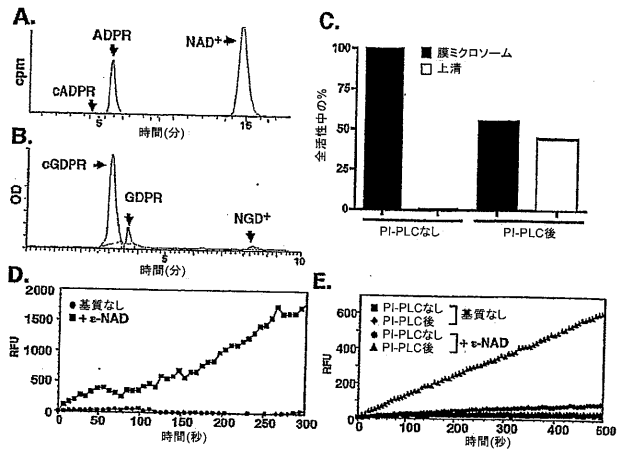


Figure 22

【図 2 3】

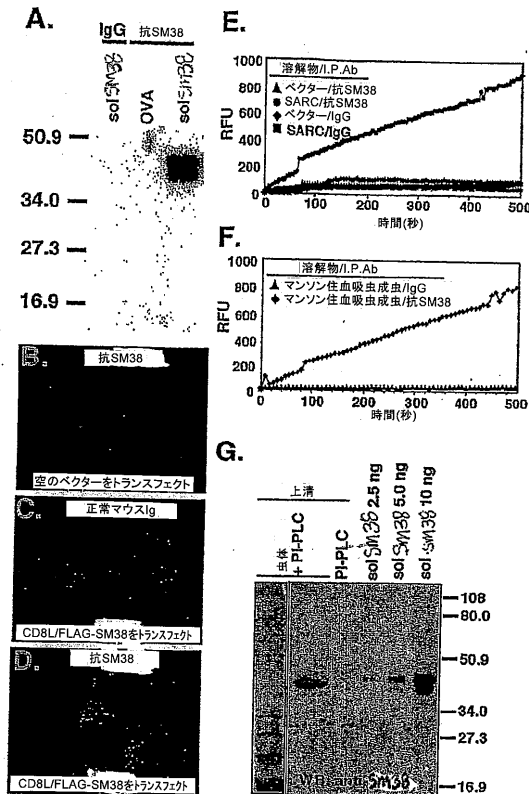


Figure 23

【図 2 5】

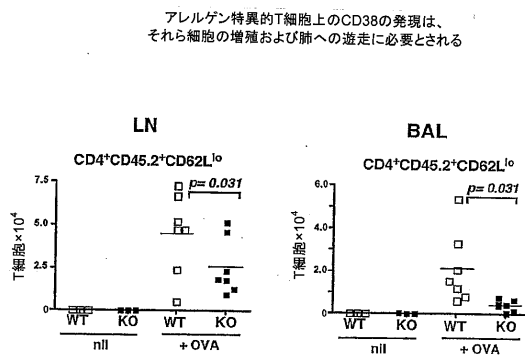


Figure 25

【図 2 4】

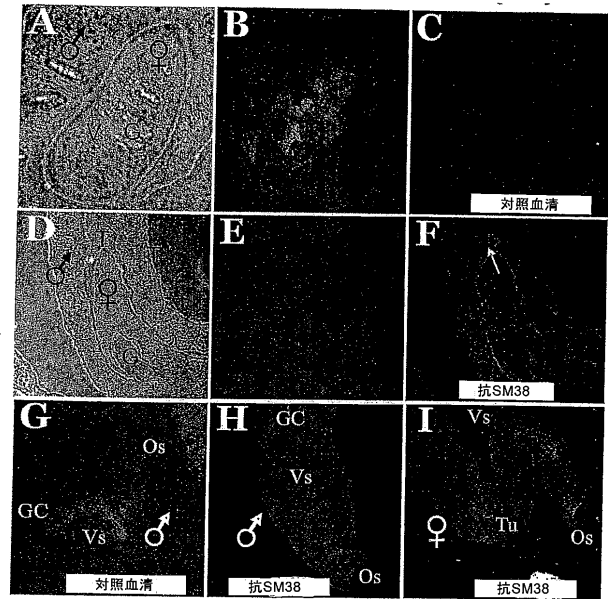


Figure 24

【図 2 6】

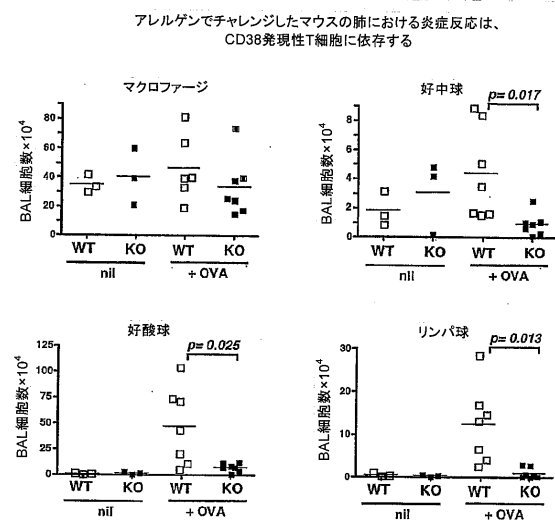


Figure 26

【図 27】

抗原提示細胞上のCD38の発現は、
アレルゲン特異的T細胞の増殖に必要とされる

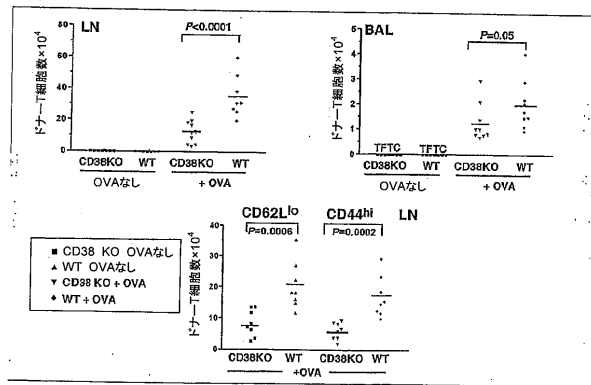


Figure 27

【図 28】

抗原提示細胞上のCD38の発現は、
アレルゲンでチャレンジしたマウスの気道および
肺組織における細胞性炎症を促進する

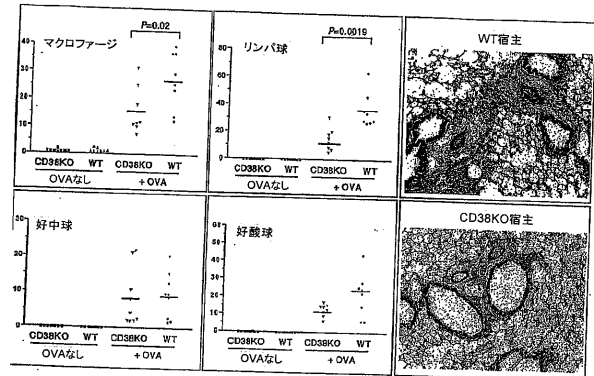


Figure 28

【図 29】

CD38欠損マウスは、肺における
アレルゲン誘発性炎症に対してより抵抗性である

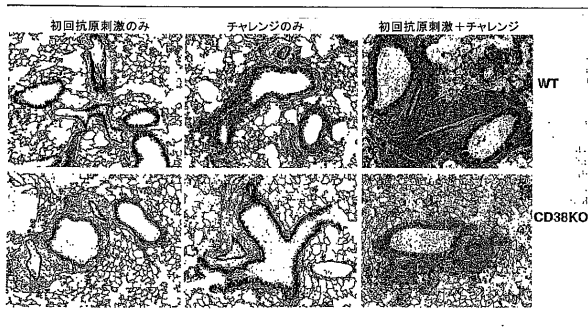


Figure 29

【図 30】

CD38欠損マウスでは糖尿病の発症が遅延する

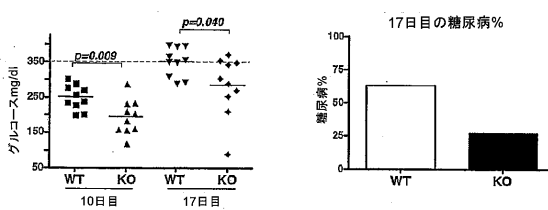


Figure 30

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US06/05314

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8): C12P 21/06(2007.01); G01N 33/53(2007.01); C12N 5/00(2007.01)

USPC: 435/68.1, 7.1, 325, 375

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. : 435/68.1, 7.1, 325, 375

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)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02-32288 A2 (TRUDEAU INSTITUTE, INC) 25 April 2002, see entire document, Abstract in particular	1-42

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 December 2006 (01.12.2006)

Date of mailing of the international search report

24 JAN 2007

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. (571) 273-3201

Authorized officer

Michail A. Belyavsky

Telephone No. 571-272-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US06/05314

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
BIOSIS,CAPLUS,SCISEARCH,MEDLINE,EMBASE, USPATFULL,PCTFULL
Search terms: inventor name search, Cd38 enzyme activity ADP-ribosyl cyclase;

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 7 5
G 0 1 N 33/566 (2006.01)	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/536 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 1 B
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 33/536	D
	C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, L R, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(71)出願人 308006988
 ランドール, トロイ, ディー.
 アメリカ合衆国 1 2 9 8 3 ニューヨーク州, サラナク レイク, デューイ マウンテン ロード 8 9

(71)出願人 308006999
 パーティダーサンシェズ, サンティアゴ
 アメリカ合衆国 4 3 1 1 9 オハイオ州, ギャロウェイ, スクワッド ドライヴ 8 3 2 0

(74)代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔

(74)代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次

(74)代理人 100118773
 弁理士 藤田 節

(72)発明者 ランド, フランセス, イー.
 アメリカ合衆国 1 2 9 8 3 ニューヨーク州, サラナク レイク, デューイ マウンテン ロード 8 9

(72)発明者 ランドール, トロイ, ディー.
 アメリカ合衆国 1 2 9 8 3 ニューヨーク州, サラナク レイク, デューイ マウンテン ロード 8 9

(72)発明者 パーティダーサンシェズ, サンティアゴ
 アメリカ合衆国 4 3 1 1 9 オハイオ州, ギャロウェイ, スクワッド ドライヴ 8 3 2 0

Fターム(参考) 2G045 CA12 CA15 CA17 CA20 CB01 DA30 DB07 FB01 FB02 FB03
 FB08 FB11 FB12
 4B024 AA01 BA07 BA31 CA01 DA02 EA04 GA11 HA11
 4B063 QA18 QQ08 QQ22 QQ26 QQ61 QQ62 QQ89 QR66 QR77 QR82
 QS03 QS28 QS36 QS39 QX01 QX02 QX07

专利名称(译)	通过CD38调节趋化性		
公开(公告)号	JP2008530990A	公开(公告)日	2008-08-14
申请号	JP2007555367	申请日	2006-02-14
[标]申请(专利权)人(译)	Toryu杜墨研究所 土地法语套房 兰德尔·迪特洛伊 党圣大禽族圣地亚哥		
申请(专利权)人(译)	Toryudeyu研究所墨水. 乐园, フランセス, イ. 兰德尔, 特洛伊, 迪伊. Patida - Sanshezu, 圣地亚哥		
[标]发明人	ランドフランセスイー ランドールトロイディー パーティダサンシェズサンティアゴ		
发明人	ランド, フランセス, イー. ランドール, トロイ, ディー. パーティダ-サンシェズ, サンティアゴ		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/26 C12Q1/48 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/536 C12N15/09		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA C12Q1/26 C12Q1/48 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/543.575 G01N33/566 G01N33/543.541.B G01N33/536.D C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/CA12 2G045/CA15 2G045/CA17 2G045/CA20 2G045/CB01 2G045/DA30 2G045/DB07 2G045 /FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB11 2G045/FB12 4B024/AA01 4B024/BA07 4B024/BA31 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA18 4B063 /QQ08 4B063/QQ22 4B063/QQ26 4B063/QQ61 4B063/QQ62 4B063/QQ89 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX02 4B063 /QX07		
优先权	11/058924 2005-02-15 US 11/115964 2005-04-26 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明, 但不限于, 炎症, 局部缺血, 哮喘, 自身免疫疾病, 糖尿病, 关节炎, 过敏症, 感染性致病生物, 如寄生虫, 和疾病, 包括移植排斥的治疗, 表达CD38的细胞的迁移活性涉及用于调节的方法。这种细胞, 例如, 嗜中性粒细胞, 淋巴细胞, 嗜酸性细胞, 包括巨噬细胞和树突状细胞。本发明还涉及在涉及细胞迁移设计药物筛选试验病症的治疗中使用这些化合物的, 并且CD38是为了鉴定调节ADP-核糖基环化酶活性的CD38的化合物调制剂。此外, 本发明是CD38同源物的从曼氏血吸虫的隔离是寄生扁虫, 和一个表征。

表II

SM38^aによる基質の変換に対する反応速度論パラメータ

基質	K_m	V_{max}	k_{cat}	k_{cat}/K_m
	μM	$\mu mol/分/mg$	s^{-1}	$M^{-1}s^{-1}$
NAD ⁺	38.5±6.8	13.2±2.6	6.51±1.28	1.69×10 ⁵
NGD ⁺	23.4±1.1	4.8±0.1	2.37±0.05	1.01×10 ⁵
NADP ⁺	13.7±2.9	39.2±1.6	19.34±0.79	14.12×10 ⁵

^a反応は全て、ピキア・パストリスにおいて生成された精製した組換えSM38の存在下で、10mMリン酸カリウムバッファー(pH7.4)中、37℃で行った。