

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3986481号
(P3986481)

(45) 発行日 平成19年10月3日(2007.10.3)

(24) 登録日 平成19年7月20日(2007.7.20)

(51) Int. Cl.		F I		
CO7K	7/06	(2006.01)	CO7K	7/06 ZNA
CO7K	14/47	(2006.01)	CO7K	14/47
A61K	38/00	(2006.01)	A61K	37/02
A61P	15/18	(2006.01)	A61P	15/18

請求項の数 2 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2003-319869 (P2003-319869)	(73) 特許権者	500020760
(22) 出願日	平成15年9月11日(2003.9.11)		ザ・ユニバーシティ・オブ・クイーンズランド
(62) 分割の表示	特願平7-515294の分割		ンド
原出願日	平成6年11月30日(1994.11.30)		オーストラリア4072クイーンズランド
(65) 公開番号	特開2004-67698 (P2004-67698A)		州セント・ルチア
(43) 公開日	平成16年3月4日(2004.3.4)	(74) 代理人	100081422
審査請求日	平成15年9月11日(2003.9.11)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	PM2705	(74) 代理人	100084146
(32) 優先日	平成5年11月30日(1993.11.30)		弁理士 山崎 宏
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)	(72) 発明者	ハレ・モートン
(31) 優先権主張番号	PM8234		オーストラリア国クイーンズランド415
(32) 優先日	平成6年9月16日(1994.9.16)		1、コールパロー、オリオン・ストリート
(33) 優先権主張国	オーストラリア(AU)		75番
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シャペロニン10

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アミノ酸配列AGQAFRKFLLPLまたはアミノ酸配列EKSQGKVLQATからなるペプチド。

【請求項2】

配列

GSMAGQAFRKFLLPLFDRV LVERSAAETVTKGGIMLPEKS
Q G K V L Q A T V V A V G S G S K G K G G E I Q P V S V K V G D K V L L P E Y G
G T K V V L D D K D Y F L F R D G D I L G K Y V D

からなるペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、cpn10とも略称するシャペロニン10に関する。

【0002】

(先行技術)

シャペロニン類は、より広いクラスの分子シャペロン類に属し、翻訳後のひだ形成、ターゲティングおよび他のタンパク質の集合に含まれる分子であるが、Ellisら、1991、Ann.Rev.Biochem. 60, 321-347に論じられているように、それ自体は最終的な集合構造の部分形成しない。大部分のシャペロン類は“熱ショック”または“ストレス”タンパク

質(hsp)であり、すなわち、その生成は、種々の細胞傷害(例えば代謝性破壊、酸素ラジカル、炎症、感染および変形)により誘導または増大される。Lindquistら, 1988, *Annu.Rev.Genet.* 22 631-677で評されているように、熱がよりよい研究ストレスの唯一のものである。特定のタンパク質レベルにおけるこれらの量的変化と同様に、上記のLindquistらに言及されているように、ストレスは本質的に生成したストレスタンパク質の異なる細胞区分への移動を誘導し得る。熱ショック反応は最も高く維持されている遺伝系の一つであり、そして種々の熱ショックタンパク質が最も進化論的に安定なタンパク質の中に存在している。逆境条件の下で細胞が切り抜かれるように、これらの類のあるものは正常細胞内で基本的な機能を果たす。

【 0 0 0 3 】

2つの型のcpn分子、すなわちcpn60(単量体Mr ~ 60000)とcpn10(単量体Mr ~ 10000)がある。cpn60はよく研究されてきた。これはすべての細菌、ミトコンドリア、色素体で認められ、そして細胞質型、TCP-1は真核細胞中に認められる。いくつかの細胞の表面上でのその存在が報告されている。しかし上記のEllis文献やvan Eden, 1991, *Immunol.Reviews* 121 5-28では疑問視されて来た。非常に最近までcpn10は細菌中でのみ認められていたが、構造的および機能的に同等なものが葉緑体中(Bertschら, 1992, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89 8696-8700)、ラット中(Hartmanら, 1992, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89 3394-3398)および牛肝ミトコンドリア中(Lubbenら, 1990, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87 7683-7687)で見い出された。

【 0 0 0 4 】

ATPの存在下でcpn60とcpn10は機能的に相互作用をおこし、タンパク質の集合を仲介する。cpn60から独立して働くcpn10の例は報告されていないが、cpn60は単独で働き、本質的に相違する事象に関係している。例えば、それは細菌感染における抗体とT細胞反応の免疫支配標的であり、しかし、タンパク質が高く保持されているので自己反応性が生成される。van Eden, 1991, *Immunol.Reviews* 121 5-28で論じられているように、健常人は変形および感染自己細胞を排除するためにこの自己認識を用いることができ、かかる認識の調節を欠いている者は自己免疫疾患になり得る。当然のことであるが、cpn60はリウマチ性関節炎などの状態に関係している。分子シャペロン類は、多様なポリペプチド類の構造と結合したりあるいは変化する能力があり、タンパク質生物発生以外の細胞機能において最も重要な役割をなし得る。Hartmanら, 1993, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90 2276-2280を参照、これはcpn10およびcpn60を用いたタンパク質分子の安定化を記載している。

【 0 0 0 5 】

哺乳動物のcpn10については、非常に近似した配列相同性であることが確証できた。例えば、ラットcpn10分子(Hartmanら, 1992)は、J.E.Walker, MRC Lab. of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge, UK提供のMT BTC PN10においてEMBL Data Base Directoryに報告されている中のcpn10の構造と99%以上の相同性を有している。このことは、細菌cpn10がラットシャペロニン10とわずか34%平均相同性しか有していないことと対照的である。

【 0 0 0 6 】

初期妊娠因子(E P F)

E P Fは最初、妊娠関連物質として言及され(Mortonら, 1976, *Proc.R.Soc.B.* 193 413-419)、この発見は受精から6 - 24時間以内に妊娠の有無を検査できるので非常に興味を呼んだ。最初にE P Fは、リンパ球から免疫抑制因子を放出する能力により、免疫抑制剤としての役割が考えられた(Rolfeら, 1988, *Clin.exp.Immunol* 73 219-225)。これらの抑制因子は、マウスにおいて遅延型の過敏症を低下せしめ、よって、抗原的に異質の胎児に対する母体の免疫反応を抑制するのであろう。さらに最近の研究によると、E P Fの生成は妊娠に限られていない。これは初期および新生細胞増殖の産物であり、これらの状態において成長因子として働く(Quinnら, 1990, *Clin.exp.Immunol.* 80 100-108; *Cancer I*

10

20

30

40

50

mmunol. Immunother. 1992, 34 265-271)。E P Fは血小板活性化の産物でもあり、したがって、創傷治癒および皮膚再生に関係することが言われている(Cavanaghら, 1991, Journal Reproduction and Fertility 93, 355-365)。

【 0 0 0 7 】

E P Fは、Mortonら, 1992、Early Pregnancy Factor, Seminar in Reproduction Endocrinology 10 72-82で詳細に再検討された。E P F生成の場所および調節が記載され、さらに血小板からのE P Fの精製および精製物と他の源から導かれたE P Fとの関係についても述べている。この再検討は、精製工程のモニタリングおよび生成源の研究を含み、E P Fの生物検定法(すなわち、ロゼット阻害試験)についても論じている。E P Fの生物活性が論じられ、E P Fとそのアンタゴニストの可能な臨床適用が記載されている。

10

【 0 0 0 8 】

Mortonら, 1992, Repord.Fertil.Dev. 4 411-422は、E P Fの免疫抑制および成長因子の性質に関して以前なされた発表を再検討している。前胚保持におけるE P Fの役割についても、この文献で論じられている。

【 0 0 0 9 】

今まで、ロゼット阻害試験が複合生物学的混合物中のE P Fを検出する唯一の手段であった(Mortonら, 1976, Proc.R.Soc.B. 413-419)。この検定法は、免疫抑制の抗リンパ球血清(A L S)がリンパ球と非定型赤血球とのインピトロ自発性ロゼット形成を阻止し得るとのBachおよびAntoine, 1968, Nature(Lond) 217 658-659の最初の知見に基づいている。E P Fを検出するために修正法が導入された。まず、E P F中でプレインキュベーションしたリンパ球が同じ提供者のE P F未処理のリンパ球に比してA L Sで有意に高いロゼット阻害価(R I T)を有していることが上記の1976文献で示された。この試験は、詳細に、上記の1976文献およびMortonら, 1987, "In Current Topics in Developmental Biology" Vol.23 73-92, Academic Press, San Diegoに記載されており、簡単には、E P Fがリンパ球に結合し、続いて抑制因子の放出を誘導する一連の流れに関する(Rolfeら, 1988, Clin.exp.Immunol. 73 219-225)(Rolfeら, 1989, Immunol.cell Biol. 67 205-208)。

20

【 0 0 1 0 】

Athanasas-Platsisら, 1989, Journal Reproduction and Fertility 87 495-502およびAthanasas-Platsisら, 1991, Journal Reproduction and Fertility 92 443-451に、E P Fに対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体の生成および胚生存の欠如をもたらすこれらの抗体による妊娠ラットの受動免疫法について記載されている。これらの研究で妊娠がうまく成立するためにE P Fが必要であることがはっきりした。

30

【 0 0 1 1 】

Quinnら, 1990, Clin.exp.Immunol. 80, 100-108に、E P Fが培養腫瘍および変形細胞の成長調節物であることが示されている。これらの細胞は継続成長のためにE P Fに依存しており、すなわち、E P Fがオートクリンモードで働く。

【 0 0 1 2 】

腫瘍細胞の成長が抗E P F m A b sでかなり遅延されることから、E P Fが腫瘍の成長促進に役割を演じていることが確認されている。さらに、高い親和力の抗E P F抗体を生成するハイブリドーマは本来、不安定であろうことをこの文献は示している。

40

【 0 0 1 3 】

Quinnら, 1992, Cancer Immunol.Immunother, 34 265-371に、移植可能マウス腫瘍のインピボ成長に対する抗E P Fのモノクローナル抗体(m A b s)の作用が記載されている。この文献の要点は、E P Fの中和がインピボ腫瘍の成長を遅らすことにある。

【 0 0 1 4 】

癌が非常に初期段階にあるとき、抗E P F m A bによるE P Fの中和が、癌の拡大を止めることはQuinnら, 1992の文献により明らかである。しかし、癌が大きくなってしまおうと、これらのm A b sでの処置は癌の成長を止めるが完全に破壊しない。

【 0 0 1 5 】

50

腫瘍成長における E P F の役割に関する他の文献として、Quinn, 1991, Immunol.Cell. Biol.69 1-6およびQuinn.K.A.の1991年オーストラリアのクイーンズランド大学での“初期妊娠因子：細胞増殖に関する新因子”なる博士論文がある。

【0016】

上記のことから、E P F は、胚の存在の指標でありまた必要であり、免疫抑制作用を有していると評価される。最近の研究は、変形、新生および正常細胞の成長調節剤としての E P F の重要性を示唆しており、血小板中でのその存在は炎症および創傷治癒において役割を演じる。

【0017】

この特異な結合作用を保持する分子は大きい意義を有しているが、今まで、この分子の構造は明らかでなかった。 10

【0018】

意外にも、哺乳動物のシャペロン10が初期妊娠因子(E P F)と同じアミノ酸配列を有することが確認された。

【0019】

(発明の開示)

発明の要約

一つの態様において、本発明は、cpn10がE P FであることおよびE P Fでもって示された未知または未予測の作用を有することの発見にある。cpn10のこの未知または未予測の作用は、成長因子および免疫抑制因子としての作用活性のような細胞外活性を含んでいる。他の態様において、本発明は、cpn10の未知または未予測の作用を開発するためにcpn10を利用して1またはそれ以上の方法を提供する。この方法は成長を促進するためにcpn10を利用する方法および免疫活性を抑制するためにcpn10を利用する方法を含んでいる。 20

【0020】

ここで用いられる語“cpn10”はその範囲に真核cpn10、groESを含む原核cpn10およびcpn10の誘導体を含んでいる。cpn10は生物体から精製され、合成的にまたは組換えDNA技法により製造され得る。この用語は生物学的フラグメントも含んでいる。

【0021】

本発明はその範囲に、修飾された組換え体、それから誘導される誘導体およびペプチドフラグメントをも含んでいる。 30

【0022】

本発明はその範囲に下記のものを含む。

1. cpn10についての検定

cpn10に対する、その修飾体に対する、またはフラグメントに対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体を単独で、相互に併用してまたはcpn60と共に(ATPまたは他のヌクレオチドトリホスフェートの存在下で)、下記の目的のために用いて、血清または他の生物体液中のcpn10の検出。

- (a)すべての哺乳類における妊娠の診断；
- (b)危険にさらされている妊娠における胚の状態の監視； 40
- (c)腫瘍の診断；および
- (d)腫瘍の外科的摘出後の患者の監視。

【0023】

2. cpn10による処置

下記の処置における成長因子または免疫抑制剤としてのcpn10の使用。

- (a)皮膚または臓器移植；
- (b)創傷治癒、組織修復または組織再生；
- (c)自己免疫疾患；
- (d)不妊/流産；
- (e)アレルギー性疾患；および 50

(f)炎症状態。

【0024】

実験

1.c.p.n.10の精製

(a)ヒト血小板からのヒトEPFの精製(図1a、1b、1c、1d)

抽出

臨床的に7日まで経過の濃縮血小板(血液銀行より)をチロード(Tyrodes)緩衝液で洗い、Method in Enzymology, 1989, 167 7-11に記載の技法を用い、液体N₂で凍らせて-70で保存した。

【0025】

精製の直前に、約100洗浄血小板単位を水浴で溶かし、75-85で15分間断続的に緩やかに攪拌した。氷冷した後、細胞片を遠心分離(8000g、20分、4)で除き、ペレットを0.05M酢酸/0.1M NaCl/0.1mg/mlナトリウムアジド pH3.0で均等化により2度抽出し、次いで遠心分離した(8000g、15分、4)。この3上清液をためて、全抽出量が500-600mlとなった。

【0026】

イオン交換クロマトグラフィー

100血小板単位からの抽出液を濃塩酸でpH3.0に調整し、0.05M酢酸/0.1M NaCl pH3.0であらかじめ平衡化した250ml SP-Sephadex C-25(Pharmacia-LKB)と共に緩やかに一晩、4で攪拌した。ゲルを同じ緩衝液20volで洗ったカラムに入れ、0.5Mリン酸ナトリウム緩衝液/0.05M NaCl pH7.5で溶出した。次いで、ゲルを、捨てた。

【0027】

親和性クロマトグラフィー

SP-Sephadex溶出物を、濃塩酸でpH6.3-6.4に調整し、0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液/0.05M NaCl pH6.3であらかじめ平衡化したHeparin-Sepharose CL-6Bのカラム(2.5×7.5cm; Pharmacia-LKB)にかけた。カラムを同じ緩衝液5volで洗い、0.05Mトリス-HCl/5mM CaCl₂/0.2M NaCl pH7.5の5volで溶出し、サンプル適用のために用いるカラムに逆方向でかけた。

【0028】

高性能疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC-h.p.l.c.)

固体の(NH₄)₂SO₄をHeparin-Sepharose溶出液に最終濃度が2Mになるまで加え、0.45μmフィルターを通した後、0.1Mトリス-HCl pH7.0/5mM CaCl₂/2M (NH₄)₂SO₄であらかじめ平衡化したTSK Phenyl 5PWカラム(7.5×7.5mm、Pharmacia-LKB)上の専用溶媒ラインを通してサンプルをポンプで送った。このカラムを同じ緩衝液10volで洗い、この緩衝液から0.1M トリス-HCl pH7.0/5mM CaCl₂/10%アセトニトリルの50分直線勾配溶出を行った(図1a)。

【0029】

RP-h.p.l.c.-1

活性HIC-h.p.l.c.フラクションをプールし、A、0.04M トリス/HCl pH7.0/5mM - CaCl₂およびB、0.04M トリス/HCl pH7.0/5mM CaCl₂/80%(v/v)アセトニトリルからなる溶媒を用いてC3カラム(Ultrapore RPSC, Beckman Institute)上で分画した。カラムをサンプル適用する前に溶媒Aで平衡化し、その後溶媒A5volで洗い、この溶媒から30分75%溶媒Bまでの直線勾配で溶出を行った(図1b)。

【0030】

RP-h.p.l.c.-2

いくつかの100単位血小板のRP-h.p.l.c.-1からの活性フラクションをプールし、EDTAとDTTをそれぞれの最終濃度が20mMと1mMになるように加え、この混合物を0.5-1時間4で放置した。溶媒Aの2volで希釈した後、C3カラムにかけ

10

20

30

40

50

、この工程および次の工程を行い、RP-h.p.l.c.-1に記載されたように、しかしCaCl₂を除き、分画した(図1c)。

【0031】

RP-h.p.l.c.-3

RP-h.p.l.c.-2からの活性フラクションをプールし、トリフルオロ酢酸(TFA)を最終濃度が0.1%になるように加え、0.1%TFA 2 volで希釈し、0.1%TFAであらかじめ平衡化したC3カラムに混合物をかけた。この溶媒と60%(v/v)アセトニトリル/0.1%TFAの30分直線勾配溶出を、次いで90%(v/v)アセトニトリル/0.1%TFAの3分直線勾配溶出を行った。活性フラクションをプールした(図1d)。

【0032】

1単位は約500mlである単一の血液提供からの血小板を表す。“活性フラクション”はロゼット阻害試験における活性フラクションであった。

【0033】

他の供給源からのEPFの精製

Cavanagh&Morton, 1994, Eur.J.Biochem. 222 551-560; Quinnら, 1994, Hepatology 20印刷中に論じられたように、種々の供給源からEPFを精製した。

【0034】

すべての例において、生物活性はヒト血小板について述べられている複合精製スキームを通して同じパターンであった。さらに、すべての供給源からの最終活性フラクションは固定化モノクローナル-抗EPFにより特に結合され、定量的に回収し得た(図1e)。

【0035】

これらの研究は次の理由により重要である：

A. すべての材料で観察された生化学的および免疫的類似性は、生物検定法が種々の生物学的状況において作用する単一の物質または近接する類の物質を検出することの証拠である。

B. これらの材料すべてから精製された活性体は、EPFであるとして以前に報告されたすべての物質よりも多くの程度より強力である。これは、上に論じたEPFの生物検定法の詳細な分析を基に、推定EPF製剤に関する活性が非常に少量の不純物の存在を反映しているに違いないとの我々の推測を確認している。

C. (活性の妨害として)タンパク質レベルで研究するのに十分なEPFを提供する唯一の供給源材料は血小板と再生肝であり、量はそれぞれ平均100単位当たり15μg(～501血に相当)および40g組織当たり5μg(6匹ラットよりの摘出肝)。EPFは細胞外に表れるよりも細胞中に多く存在していることは明白である。しかし、蓄積されたEPFについての生物学的知識(上記のMortonら、1992参照)は、この細胞外での出現が思いがけないものでないことを示している。

【0036】

ヒト血小板誘導EPFは、最も豊富であり、かなり詳細に研究されてきた。SDS-PAGEにおいて、Mrの単一バンド約8500として表れ、生物活性に一致した(図2a)；再生ラット肝臓由来のEPFは同様の行動を示した。質量分析計により血小板資料について分子量10843.5±2Daが明確かつ精密に決定され、この高いレベルでの同質性の明白な証拠であった(図2b)。エドマン分解法の後、分子がN-ブロックされていることを示すが、約4nmol EPFのタンパク質分解分裂が行われた。得たペプチドフラグメントを逆相HPLCで分離し、エドマン分解法で配列を決めた。12(フラグメント1)、27(フラグメント2)および33(フラグメント3)の残基を含む3配列領域は、ラットのミトコンドリアcpn10における残基7-18、27-53および69-101(C末端)に対応することが判明した。フラグメント2の残基52は異なっていた(cpn10中のS、ラットcpn10中のG；この相違のみでラットcpn10よりcpn10が30Da大きいことが説明できよう)。他のすべての残基は同一で、シャペロニン類の高く保持された本質に一致した(図2c参照)。

【0037】

10

20

30

40

50

E P F と cpn 1 0 の配列の同一性が確認されて以来、ラットミトコンドリア cpn 1 0、E .coli cpn 1 0 (groESとして知られる)および E .coli cpn 6 0 (groEL)を用いて、機能的な関係についていくつかの研究がなされてきた。最初に、cpn 1 0 が E P F として働くことが証明されている。ラット cpn 1 0 が E P F 生物検定法で検討され、予測された希釈範囲以上にポジティブであることが見いだされた。この活性は E P F に対するモノクローナル抗体で中和され得た(表 1)。興味あることに、ラット cpn 1 0 と ~ 4 0 % の同一性を有する E .coli cpn 1 0 は生物検定で活性を示さなかった(表 1)。これは、すべての哺乳動物の細胞系および酵母細胞が活性であるのに対し、E .coli の培地は活性でないとの知見に一致している。cpn 6 0 は生物検定で不活性であり、E P F 活性に作用しなかった。E P F は cpn 1 0 のように働き得ることを示していた。E P F を A T P の存在下または非存在下で cpn 6 0 と混合し、この混合物を TSK G3000SW ゲル浸透カラムで分析した。得られたフラクションを S D S - P A G E で分析した。cpn 6 0 はデカテトラマー(decamer)であり、このカラムの排除体積中に溶出する(排除限界 3 0 0 0 0 0)。A T P の存在下では、E P F もこのフラクションに存在し、cpn 6 0 と安定な複合物の形成を示す。A T P の非存在下ではそうでない。このフラクションは生物検定において活性であったが、A T P 非存在下の実験での同様のフラクション(E P F が cpn 6 0 と結合していなかった)は活性でない(図 3 a 参照)。このように E P F および cpn 1 0 活性は同じ分子に属する。

【 0 0 3 8 】

これらの研究者は、血小板誘導 E P F が cpn 1 0 と構造的および機能的に相同体であるとの明白な証拠を提供する。cpn 1 0 とロゼット阻害試験における活性との関係が試験された(図 3 b)。A T P の存在下において、A T P の非存在下ではそうでないのであるが、固定化 cpn 6 0 は原型源資料、妊娠血清からすべての活性を除去し得た。そして固定化複合物から A T P を取り除くと活性は回復し得た。図 3 a に記載した実験のように、この A T P の必要性は cpn 6 0 と活性分子との相互関係の特殊性を示している。cpn 1 0 は E P F 生物検定法において反応を司る分子単位である。

【 0 0 3 9 】

cpn 1 0 との E P F の同一性の確認は本主題についての研究を進める主段階であり、今日までなされた多くの知見を説明する助けとなった。E P F 生成がこのように多様な生物学的状態、例えば、着床前 - 後妊娠初期および主要細胞増殖および血小板活性において生じるとの主張に対して批判があった。hsp(heat stress protein: 熱ストレスタンパク質)としてのその役割において、E P F 生成の速い開始が期待されるすべての条件がある。細胞の生存に必須である hsp の機能は、上記の L i n q u i s t らに示されているように細胞内である。逆に、今日まで記載の E P F 活性は細胞外である。例えば、Morton ら、1987、Current Topics in Development Biology, Vol.23 73-92 に論じられているように、交配後 4 - 6 時間のマウス血清および Quinn 博士論文(1991)に示されているようにラットの部分的肝切除後 4 - 8 時間にその活性が表れる。上述の Quinn ら 1990 文献に論じられたようにオートクリン相または上述の Rolfe ら 1988 で論じられた外分泌相において、E P F が働き得ることを我々は示して来た。これらは hsp について以前に記された役割ではない。

【 0 0 4 0 】

E P F の構造が知られたので、組換え D N A 技法または化学合成などの適当な技術によって商業的な量で E P F が製造し得るものと評価される。

(b) cpn 1 0 をコードするヒト c D N A のクローニングおよび cpn 1 0 の製造

商業的使用のための製造は、哺乳動物 cpn 1 0 遺伝子、望ましくはヒト c D N A cpn 1 0 遺伝子を p G E X 系、p E T 系からのプラスミドのような適当なベクターに挿入し、コードされた哺乳動物 cpn 1 0 を発現し、組換え cpn 1 0 を精製することにより達成され得る。

【 0 0 4 1 】

略号：

A N G I S	オーストラリア国立遺伝情報サービス
bp	塩基対
B S A	牛血清アルブミン

10

20

30

40

50

cDNA	相補的DNA	
cpn10	シャペロニン	
DNA	デオキシリボ核酸	
E.coli	大腸菌	
GSH	グルタチオン(還元型)	
GST	グルタチオン-S-トランスフェラーゼ	
LB	ルリア-ベルタニブロス	
M	モル	
ORF	オープンリーディングフレーム(翻訳領域)	
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応	10
rePF	組換え初期妊娠因子	
RSP	逆配列プライマー	
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム	
SDS-PAGE	ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動	
Tris	トリ(ヒドロキシメチル)アミノメタン	
USP	正配列プライマー	

【0042】

材料および方法

ヒトcpn10オープンリーディングフレームのクローニング

メラノーマ細胞系A2058cDNAラムダライブラリー(Stratagene)からのヒトcpn10cDNAのORF(274bp)部分を最初に増幅するためにポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いた。変性cpn10アンプリマー(P1)は、ヒトcpn10のアミノ酸残基83-91に対応するアミノ酸配列VLDDKDYFLからつくられた。プライマーP1は配列5'ARRAARTARTCYTTRTCRTCC3'を有し、RはAまたはG、YはCまたはTである。逆配列プライマーは、PCR増幅(非特異的プライマー)および配列DNA構築に用いられ、配列5'CAGGAACAGCTATGAC3'を有する。正配列プライマーは配列5'GTAACAACGACGGCCAGT3'を有している。ファージ・ライブラリーのPCR増幅は、非特異的上流アンプリマー(RSP)およびP1を、それぞれ0.5μM最終濃度、1.5mM MgCl₂(Pharmacia Biotech)、1Xポリメラーゼ緩衝液(Boehringer Mannheim)、テルムスアクアティカス(Thermus aquaticus)DNAポリメラーゼ(Boehringer Mannheim)5単位および最終容量の50μL中で用いて、達成された。30サイクルについてのパラメーターは、94℃、1分間での変性、40℃、30秒間のアニーリングおよび72℃、3分間のエクステンションであった。72℃で7分間の最終エクステンションが410分間のソークサイクルに続いて、なされた。1μLのアリコートがコピー数を増すために同じ条件で増幅された。

【0043】

オープンリーディングフレームを有する2つのcpn10特異アンプリマーが作られた。上流プライマーP2、GCGCGGATCCATGGCAGGACAAAGCGTTTAG-3'が最初のPCRフラグメントの配列から作られた。下流プライマーP3、5'-ATATGAATTTCAGTCTACGTACTTTCC-3'は、Expressed Sequence Tag database via ANGIS(Accession No.HUM00TB037)から得られる配列から作られた。アニーリング温度を50℃にした以外は上述と同じ反応およびサイクリングの条件を用いてファージ・ライブラリーからA319bpフラグメントが増幅された。

【0044】

DNA構築および分析

Boehringer Mannheimから得た制限酵素およびバッファーを用いて、Sambrookら(Sambrookら, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY)に従って、PCR生成物およびベクターのすべての制限酵素による切断を行った。最初PCRフラグメントをEcoR1で消化し、プラスミドpRM

10

20

30

40

50

1 を形成する pBluescript KS (+) (Stratagene) の EcoR 1 と Sma I 位でライゲートした (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY) (図 4 ; 部分 cpn10 挿入 274 bp)。319 bp 生成物を BamHI および EcoR 1 で消化し、プラスミド pRM2 を形成する発現プラスミド pGEX-2T (Pharmacia Biotech) に最初にクローン化した。この同一性を確認するために、BamHI - EcoR 1 フラグメントを pBluescript (SK+) にサブクローン化し、配列決定した。DNA を、エチジウムブロマイドを含む 0.8 - 1.0 % (w/v) アガロースゲルで分析し、電気泳動の後、UV イルミネーションで観測した。

【0045】

E. coli の形質転換

適格な E. coli DH5 の細胞 (100 μ L) をプラスミドで熱律動法 (Sambrookら, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY) により形質転換した。細胞と DNA の混合物 (10 - 100 ng) を 30 分間氷の上におき、正確に 2 分間 42 で熱律動せしめ、2 分間氷の上にもどした。LB の 0.9 mL を加えた後 1 時間後振り、37 で細胞を回収した。100 μ L の部分標本を最終濃度 100 μ g/mL でアンピシリンを補った LB 寒天プレート上に置いた。37 で一夜、培養した後、ランダムコロニーを次の実験に選択した。

【0046】

DNA 配列決定

PCR 生成物の制限フラグメントを pBluescript 中にクローンし、製造業者 (Pharmacia Biotech) の指示に従って T7 ポリメラーゼキットを用いてジデオキシチンターミネーション法によって両定位に配列した。約 2 μ g のプラスミド DNA を変性し、エタノール沈殿し、USP、RSP または P3 のいずれかにアニーリングした。配列反応を 8 % アクリルアミド / 4.6 % ウレア ゲル上で電気泳動した。固定し乾燥した後、X-線フィルムをゲルに一夜さらし、そして現像した。

【0047】

E. coli における組換え cpn10 の発現および精製

Smithら (Smithら, 1988, Gene 67(1)31 - 40) に記載された方法により小培地スケール (2 ml) でグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質の発現のために pRM2 で組換えたクローンをスクリーニングした。一夜置いた培地を希釈し、0.1 mM IPTG を加え、37 で数時間おいて融合タンパク質を発現せしめた。細胞をペレット化し、PBS / 0.1 % Triton X-100 に溶解し、溶解質を 50 % グルタチオン-アガロースビーズ (Sigma Chemical Company) と混合した。組換え融合タンパク質を SDS バッファー中で煮沸することにより親和性ビーズから溶出した。サンプルのアリコートをして 10 % SDS-PAGE ゲルにかけた。ゲルを固定し、コーマシーブルー (Coomassie blue) で着色した。融合タンパク質の発現を確認した後 GST 分子からの rcpn10 の精製がより大きい規模で行われた。

【0048】

上述のように細胞を生長、誘導せしめて、細胞ペレットを PBS 中に懸濁し、超音波処理し (output level 4, 50% duty cycle, 2x30 sec) そして細胞溶解質を -30 で保存した。10 リットル細胞培地からの溶解質を解凍し、rLIF の分離のために Gearingら (Gearingら, 1989, Biotechnology 7, 1157 - 1161) が用いたと同じ方法により rcpn10 を分離した。直ちに、Triton X-100 を最終濃度 0.1 % になるまで加え、そして細胞切片を遠心分離で除いた (15 分、15000rpm、4)。10 ml のグルタチオン-セファロース 4 B ゲル (Pharmacia-LKB Biotechnology) を上清に加え、スラリーを 4 で 2 時間混合した。ゲルをペレットし、50 ml の PBS / 0.1 % Triton X-100 で 5 回、50 ml の 0.05 M Tris-HCl pH 8.0 / 0.15 M NaCl で 1 回および 0.05 M Tris-HCl pH 8.0 / 0.15 M NaCl / 2.5 mM CaCl₂ で 1 回洗った。ゲルを 4 ml の 0.05 M トリス-HCl pH 8.0 / 0.15 M NaCl / 2.5 mM CaCl₂ バッ

10

20

30

40

50

ァー中に懸濁し、1000単位のトロンピン(Sigma T6884)を加え、スラリーを振動水浴中、37で1時間混合した。ゲルをペレットし、上清を保持し、ゲルを3回4ml 0.05M トリス-HCl pH8.0 / 0.15M NaClで洗った。rcpn10を包有するものである、これらの洗液と上清をプールすると4-5mgの組換えタンパク質が得られた。ゲルと非特異的に結合している追加のrcpn10は次のように回収された。4mlの0.05M Tris-HCl pH8.0 / 2M NaClを加え、そしてスラリーを4で2時間混合した。

【0049】

ペレットした後、ゲルを3回、2mlのこの0.05M Tris-HCl pH8.0 / 2M NaCl bufferで洗い、洗液を最初の上清をプールして、さらに約1mgのrcpn10が得られた。タンパク質濃度はLawryらの方法(Lawryら., 1951, J. Biol. Chem. 193 265-275)によって測定された。15% Tris-Tricineゲルを用いてSDS-PAGEによってタンパク質が分析された(Schagger et al., 1987, Anal. Biochem. 166 368-379)。この組換えcpn10は、N末端で2つの付加アミノ酸を有する。天然タンパク質のN末端がAc-Alaであるが、組換え体タンパク質のN末端はGly-Ser-Met-Alaであった。組換え体cpn10のアミノ酸配列は、以下の配列である：GSMAGQAFRKFLLPLFDRVLVERSA AETVTKGGIMLPEKSGKVLQATVVAVGSGSKGKGG EIQPVSVKVGDKVLLPEYGGTKVVLDDKDYFLFRDGDILGKYVD。

【0050】

2. 哺乳類cpn10の投与

(a)cpn10の検定

抗原

細菌融合タンパク質、GST/cpn10を、cpn10の製造で記載したように、発現させ、グルタチオン-セファロースで単離した。この融合タンパク質を、トリス緩衝化食塩水中の50mM還元グルタチオンをかけることにより、ゲルから溶出させた。溶出フラクションをSDS-PAGEで分析し、最も融合タンパク質を含むフラクションをプールした。タンパク質の濃度をLowryら, 1951, J. Biol. Chem. 193 265-275の方法により測定した。

【0051】

抗体

融合タンパク質に対する抗体を、週4回の注射、続く少なくとも月4回の追加免疫からなる免疫化スケジュールによりウサギで発生させた。最初の注射用のフロイド完全アジュバント中およびその後のフロイド不完全アジュバント中に乳濁したタンパク質約10μgをそれぞれの注射に使用した。ウサギ血清で、最初にcpn10(5μg/ml)でプレートをコートし、ストレプトアビジン-ビオチン検出系(Amersham)を使用したELISAにより、cpn10に対する抗体をスクリーニングした。ウサギ#42の血清のcpn10および全融合タンパク質(GST/cpn10がプレートに結合している場合)に対する抗体(Ab)力価を図7に示す。このウサギから、4回目の追加免疫後に採取した血清サンプルのcpn10に対する力価を図8に図説する。

【0052】

免疫検定

次いで、抗体を下記のように行うcpn10検出用競合結合検定に使用した。1:32000および1:64000(最終希釈; 希釈50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.4、0.2%w/vゼラチン含有)に希釈した抗血清を、別々に、(一晚4で)種々の濃度のcpn10とインキュベーションした。これらの混合物を、図9に図説するように、上記のように、5μg/ml cpn10でコートしたプレートでELISAにより試験した。抗体/cpn10混合物の吸光度を、cpn10非存在下でインキュベーションした同じ抗体希釈により得られた値と比較する。プレートへの抗体の結合の阻害度が元の抗体-cpn10混合物におけるcpn10の量と比例している; これから、標準曲線を、図10に示すように作ることができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 3 】

4 2 が血清に存在する cpn 1 0 の非常に低い濃度を検出するのに十分感受性でないため。我々は：

(1) 製造超免疫化特性を示す抗 - cpn 1 0 の産生；したがって、既知の免疫応答の促進技術と組み合わせて、高い親和性抗体を産生できる；および

(2) 標準免疫検定技術における応答の産生

ができる技術を確立する。

【 0 0 5 4 】

改善された抗体による検出系の促進のための既知の方法の適用ならびに濃縮および部分的精製 cpn 1 0 (例えば、C 1 8 Sep-Pak カートリッジ [Waters] につけ、トリス緩衝化食塩水中の 8 0 % アセトニトリルで溶出するか、または A T P 存在下固定化 cpn 6 0 につけ、E D T A で溶出する)の両方のための血清の予備処理である、これらの技術は、単独または他の免疫検定技術と組み合わせて、血清中の cpn 1 0 の検出のために開発できる。

10

【 0 0 5 5 】

ロゼット阻害試験、E P F 生物検定の感受性

ロゼット阻害試験は、非定量的であり、正確な血清中 cpn 1 0 の濃度測定に使用できない。この検定は、サンプルの限界量を比較することにより、半定量的に使用され、即ち、サンプルの最も高い希釈が生物検定反応における位置を与える。それ自身生物検定に不活性である複合生物学的液体中の他の物質が、活性物質の応答に影響を与えることができるため、この研究には注意が必要である。

20

【 0 0 5 6 】

この生物検定が、純粋 cpn 1 0 5 - 5 0 ag / ml (Cavanagh ら, 1994, Eur. J. Biochem. 202 551-560) 程低い濃度を検出できることを我々は調べた。妊婦(妊娠初期血清から既知の阻害物質が除かれている)および癌動物およびヒトならびに部分肝切除 2 4 時間後のラットの血清の限界量の観察に基づき、血清中の cpn 1 0 濃度は 0 . 1 - 1 0 0 pg / ml の範囲であるようである。

【 0 0 5 7 】

3 . cpn 1 0 による処置

(a) 器官 / 皮膚移植片

ラットの同種皮膚移植片生存における組換え cpn 1 0 の効果

30

皮膚移植

皮膚移植片は、以下のプロトコールを使用して、近交系ルイス (Lewis) および D A ラット (~ 1 0 0 g) の間で交換した。腹部完全厚皮膚を、標準技術を使用して、胸郭側面に作った同じ大きさの欠損部に縫合した。6 匹のラットの群に 1 回で移植し、それぞれのラットが一つの自己移植片および一つの同種移植片を受けた。2 匹のルイスおよび 2 匹の D A ラットは、毎日 2 回の組換え cpn 1 0 の注射を受け、一匹のルイスおよび 1 匹の D A に、移植片の回りに緩衝液を注射した。異なった群は異なった用量の cpn 1 0 を投与された。注射は 1 4 日間続けた。移植片をワセリンガーゼ、メロリン包帯、ビニールラップおよび伸縮自在の包帯で覆った。7 日後、移植片を毎日壊死の兆候について試験した。拒絶反応の日は、移植皮膚の 5 0 % が壊死分解を示す日とした。

40

マウスに組換え cpn 1 0 を注射した後の血清における cpn 活性の寿命

【 0 0 5 8 】

種々の量の組換え cpn 1 0 (図 1 1 参照) を B A L B / c マウス (~ 2 0 g) に i. p. 注射し、マウスを、注射後 1 5 分に初めて (0 時間) 種々の時間に殺した。血清の cpn 1 0 活性を、C57BL/6 マウスの脾臓細胞と共に、ロゼット阻害試験 (Morton ら, 1987, Current Topics in Developmental Biology 23 73-92 参照) で試験した。

【 0 0 5 9 】

結果

結果は表 2 および図 1 1 に示す。

組換え cpn 1 0 注射に続いて、有意な移植片生存延長があった ($p < 0 . 0 0 1$ 、スチュ

50

ーデントの t 検定)。結果は、ベル型用量反応曲線を示し、最も有効な量は 2 - 20 μg cpn10 \times 2 / ラット / 日であった。マウスにおける実験は、この組換え cpn10 が、血小板 cpn10 と比較した場合、予期される半減期より短いことを示唆する；マウス血清における組換え cpn10 1 μg および 15 μg の半減期は、それぞれ僅か 3 時間および 7 時間であった；4 日間の半減期を有する血小板 cpn10 (5 μg) と比較。しかしながら、これらの結果は、cpn10 がラットにおいて同種皮膚移植片の生存率を有意に延長できることを示している(表 2 参照)。

【0060】

(b) ヒトを含む哺乳類の創傷治癒促進のための cpn10 による処置

組織修復における cpn10 の掛かり合い

10

成長因子は、血小板からのその最初の遊離が創傷修復において基本的に重要であるため、治癒工程に含まれるようである(Falange, 1993, J.Dermatol.Surg.Oncol. 19 716-720)。血小板は cpn10 の豊富な源であることが示され(cpn10 ; Cavanaghら, 1994, Eur.J.Biochem. 222 551-560)、従って、創傷治癒に密接に含まれる成長因子の一つであり得る。研究は、マウスで産生した完全厚皮膚欠損の治癒における局所適用組換え cpn10 (rcpn10) の効果を測定するために行われている。

【0061】

方法

非近交系、雄カッケンブッシュ(Quackenbush)マウス(8週齢)をネンブータル麻酔し、毛を剃り、皮膚を 70% v/v エチルアルコールで滅菌し、完全厚欠損(直径 8 mm)を胸郭外側領域に作った。トリス緩衝化 0.9% w/v 塩化ナトリウム(食塩水)、pH 7.4、5 μl 中の rcpn10 1 μg 、トリス緩衝化食塩水単独(5 μl)または食塩水単独(5 μl)を直接創傷に適用し、次いでワセリンガーゼ、メロリン非粘着性包帯で覆い、伸縮自在の包帯で固定した。1日2回、マウスをハロタン(Fluothane, ICI)で軽く麻酔し、包帯を外し、好適な溶液 5 μl を適用し、再び創傷に包帯をした。種々の間隔、即ち、24時間、48時間、3日、4日、5日、6日および7日に、マウス群をハロタンで安楽死させ、創傷および周りの組織を回収し、創傷の領域を測定した。

20

【0062】

結果

rcpn10 処置に続き、緩衝液または食塩水で処置した創傷と比較して、創傷収縮が有意に促進された(図 1 2)。cpn10 で処置した創傷において、創傷収縮は最初の 24 時間以内に開始するが、一方、対照の創傷では、収縮は 2 日以降に開始する(図 1 2)。3 日目を以降、創傷の大きさに有意な差はなかった。

30

結論

【0063】

マウスの完全厚創傷へ局所的に投与した cpn10 は、負傷直後開始するように見える工程により、縮小および治癒を速める。対照マウスにおける創傷収縮は 48 時間後まで明白ではなかった。

【0064】

通常、創傷治癒は 3 相からなる。1 相、炎症相(0 - 48 時間)は負傷直後に開始し、その間活性化血小板が成長因子を欠損部に分泌し、繊維芽細胞活性化を助長し、創傷治癒の続く段階に含まれる細胞、例えば、マクロファージの活性化を増加する。2 相、増殖相(2 - 6 日)は最初の繊維芽細胞の出現で開始し、表皮細胞が増加し、創傷部位へ移動する。3 相は成熟相である。

40

【0065】

創傷縮小は通常 1 相では開始せず、遅滞期としても知られている。この相の間、切除創傷は、回りの皮膚の弾力により影響を受けている。これらの力は欠損部の最初の大きさを増加させ、皮膚に存在する圧力線に対応して異なった形を与える。我々が緩衝液または食塩水で処置したマウスで示したように、創傷は最初の 48 時間で大きくなった。比較して、rcpn10 で処置したマウスの創傷は、この間に収縮し、創傷への直接の rcpn10 の投与

50

が、創傷領域への線維芽細胞の移動およびコラーゲンの付着を促進することを示唆する。この発見は、促進された創傷収縮は体液損失および感染の危険性を非常に減少させるため、熱傷を含む創傷の処置に莫大な重要性を有するであろう。

【 0 0 6 6 】

(c)自己免疫疾患

ラットにおける、自己免疫疾患の動物モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎の発症における c p n 1 0 の効果

【 0 0 6 7 】

導入

実験的アレルギー性脳脊髄炎 (E A E) は、動物にアジュバント中の中枢神経系ミエリン塩基性タンパク質 (M B P) を接種することにより誘発される神経系の自己免疫性脱髄疾患であり、多発性硬化症の動物モデルとして広く研究された (Raine, 1984, Laboratory Investigation 50 608-635)。広く研究されている種であるラットにおける E A E の臨床的特徴は、接種後 1 0 日からの劇的一夜体重減少、続く尾弱体化および麻痺、後肢弱体化およびある場合は麻痺である。前肢弱体化は時々発症する (Pender, 1986, Journal of Neurological Sciences 75 317-328)。実験は、接種後のラットへの rcpn 1 0 投与が、疾病の進行に影響を与えるかどうかを測定するために行った。

【 0 0 6 8 】

方法

E A E モデル：E A E は、近交系、雌ルイスラット (年齢 ~ 1 0 週齢) の一方の足蹠にフロインドアジュバント内の M B P を接種後誘発された。ラット 3 群が研究に含まれる。全部、0 日に接種した。1 群 (n = 4) は、処置を受けず、動物は疾病の潜伏期間中 (0 日から 8 日) 抱き上げなかった。2 群 (対照群； n = 5) はトリス緩衝化食塩水 (0.1 ml) i.p. x 1 日 2 回を 0 日から 2 0 日に投与された。3 群 (試験群； n = 5) は、トリス緩衝化食塩水 (i.p.) x 1 日 2 回を 0 日から 2 0 日に投与された。8 日目から、全てのラットを体重測定し、毎日 3 0 日まで試験した。

【 0 0 6 9 】

(I) 尾弱体化は以下のように等級付した：

0 = 弱体化なし；

1 = 弱体化は尾の末端部のみ、尾末端部は試験者の指に巻き付くことができない；

2 = 尾全体の弱体化であるが、尾の付け根はまた重力に対して垂直に直立できる；

3 = 尾が揺れ動くのみの重度の弱体化；

4 = 尾が完全にぐにゃぐにゃのまひ。

【 0 0 7 0 】

(II) 後肢の弱体化は以下のように等級付した：

0 = 弱体化なし；

1 = 両方の後足部の足指の僅かな引きずり；

2 = 両方の後足部をひどく引きずるが、後肢の残りは違う；

3 = 両方の後肢をひどく引きずり、両方の後肢がしばしば体の一方に置かれる；

4 = 後肢が完全にぐにゃぐにゃの麻痺。

【 0 0 7 1 】

(III) 前肢は後肢と同様にして評価した。

合計得点は (I)、(II) および (III) の合計である。

【 0 0 7 2 】

結果

処置を受けていないまたは緩衝液のみ (対照群) を受けている群の体重減少開始時期および最大体重減少期間は有意に異ならなかった (表 3)。しかしながら、cpn 1 0 投与群 (試験群) は、処置を受けていない群と比較して、最初の体重減少が遅れ、また最大体重減少もそうであった (表 3； $p < 0.001\%$ ² 分布)。3 群で最大体重減少の平均に有意差はなかった (表 3)。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 3 】

ラットを必要なだけ抱き上げながら毎日2回 i.p.注射して投与することは、疾病の開始または重症度に影響を与えなかったが、疾病の進行を数日間延長した(図13に示されるように、17日から18日)。しかしながら、これらの2群の一つの目立つ差は、対照群において30日まで続く22日目の重い疾病の再発であった。処置を受けてない群では、僅かな再発が3匹のラットで27日および28日に起こった。

【 0 0 7 4 】

初期体重減少、尾と肢の弱体化および麻痺が試験群、rcpn10投与群で、対照群と比較して遅延される(図14:12日、 $p < 0.01$:13日、 $p < 0.05$ 、ヘテロセダスティック(Heteroscedastic)t検定)。14日から16日の試験群において、一匹のラットのみが対照ラットが発症したのと同程度の重い疾病を発症した。残りの4匹のラットは、この間軽い疾病を発症した(図15: $p < 0.95$ 、ヘテロセダスティックt検定)。試験群で、重い疾病は試験期間中再発しなかった;一匹のラットが22日、残りのラットが27日から10日にに緩和な疾病を発症した。

【 0 0 7 5 】

結論

処置それ自体、即ちラットへの液体のi.p.1日2回の投与は疾病の開始また重症度に影響を与えないが、その期間を僅かに延ばした。更に、トリス緩衝化食塩水を毎日投与されたラットにおいて、観察期間中重い疾病が再発したが、処置を受けていないラットではしなかった。

【 0 0 7 6 】

この研究の最も興味深い観察は、cpn10でのラットの処置が開始を有意に遅らせ、5匹中4匹のラットの臨床的特徴を変化させたことである。これらの動物を観察していた間の重い疾病の再発もまた防止した。

【 0 0 7 7 】

(d)不妊および流産

本発明の更なる態様は、cpn10の投与による不妊および/また流産の処置である。この問題がcpn10の欠乏により起こる場合、重大である。下記の実験的支持は、胚発育中のcpn10の必要性を証明する。

【 0 0 7 8 】

減少したcpn10濃度の状態を作るために、抗cpn10抗体を開発し使用した。入手可能な動物モデル系はない。従って、この実験的支持から、妊娠中のcpn10の濃度を増加させるためのcpn10の投与が、不妊および流産の前記の問題を解決するという事となる。cpn10由来ペプチドの合成

【 0 0 7 9 】

ペプチドは、cpn10のN末端フラグメント(N-ペプチド、即ちAc-AGQAFRKFLLPL)および内部フラグメント(I-ペプチド、即ちEKSQGKVLQAT)と一致するように合成した。

【 0 0 8 0 】

卵白アルブミンへのペプチドの結合

ペプチドを、異種2機能性試薬SPDPにより、製造者(Pharmacia LKB, Biotechnology, Uppsala, Sweden)の指示に従って、卵白アルブミンに結合させた。

【 0 0 8 1 】

免疫化スケジュール

成熟非近交系ニュージールランドウサギを、接合体の一つを週4回注射し、続いて数カ月追加免疫することにより免疫化した。

注射のために、抗原を0.9%食塩水(Mr12-15000除去透析管、Visking, Union Carbide, IL, USA)で透析し、等量のフロインドアジュバント(一回目は完全、それ以降不完全)に乳濁化した。免疫化はs.c.経路經由であった。

【 0 0 8 2 】

10

20

30

40

50

抗血清のスクリーニング

抗血清を、適当な抗原(即ち、I - ペプチドまたはN - ペプチド; 卵白アルブミン)(5 mg/ml)に対してELISAで試験した。結合IgGは、o - フェニレンジアミンを基質として、ピオチン - ストレプトアビジン系(Amersham)で検出した。吸光度は492 nmで読んだ。

【0083】

IgGを45%硫酸アンモニウムで抗血清から沈殿させ、その濃度をLowryおよびゲル電気泳動で測定した。IgG沈殿は免疫ペプチド、ウシ血清アルブミンに対する結合に対してELISAで試験した(表4)。沈殿は、また、ロゼット阻害試験におけるマウス妊娠血清の中和活性の能力を試験した。種々の濃度の抗体を等量の血清とインキュベーションし、次いで、混合物の活性をロゼット阻害試験で試験した。完全に活性を中和する抗体の最低濃度を決定した(Cavanaghら, 1994, Eur.J.Biochem. 222 551-560参照)。抗 - N - ペプチドAb 10 pgは妊娠血清1 mlの活性を中和するが、完全な中和のために抗 - I - ペプチドAb 4 ngが必要であった。

【0084】

受動免疫化

成熟非近交系雄および雌カッケンブッシュマウスを、7:30 a.m.に cages に入れ、8:30 p.m.に離した。膈栓のある雌マウスに、妊娠1日目(交配の日)および2日目の9:00 a.m.および5:00 p.m.に、抗 - N - ペプチド/卵白アルブミン、抗 - I - ペプチド/卵白アルブミンまたは抗 - 卵白アルブミンIgG製剤を注射した。2用量レジメにおける特異的IgGの注射量は、約1 mg/マウス/日と概算した。7日目に、マウスをCO₂で安楽死させ、着床胚および計数した黄体(CL)について子宮を試験した。それぞれの群において、試験IgGで処理したマウスの胚/CLの数を、同量の対照IgGを投与したものの数と比較した(²試験)。

【0085】

表5に示す結果は、妊娠血清におけるcpn10の中和が、妊娠初期の胚生存率に不利に作用できることを明らかに証明する。ロゼット阻害試験における抗体の中和活性の能力は、妊娠に不利に作用するインビボ能力のインビトロモニターである。

【0086】

本発明の他の態様

本発明の別の態様において、更なる実験が、ラットおよびヒトcpn10の1-11および34-44残基に対応する分子の2つの領域の生物活性を説明する。

【0087】

本発明は、従って、cpn10の活性中心として機能し得るアミノ酸配列:

(i) AGQAFRKFLLPL;

(ii) Ac - AGQAFRKFLLPL (式中、Acはアセチル);

(iii) EKSQ GKVLQAT

をその範囲内に含む。

【0088】

本発明は、また、1個またはそれ以上の末端配列A₁およびA₂、即ち

(iv) A₁AGQAFRKFLLPLA₂;

(v) AGQAFRKFLLPLA₂;

(vi) A₁AGQAFRKFLLPL;

(vii) Ac - A₁AGQAFRKFLLPLA₂;

(viii) Ac - AGQAFRKFLLPLA₂;

(ix) Ac - A₁AGQAFRKFLLPL;

(x) A₁EKSQ GKVLQATA₂;

(xi) EKSQ GKVLQATA₂;

(xii) A₁EKSQ GKVLQAT;

[式中、A₁およびA₂は分子(i)から(xii)の一端または両端に付加し得るアミノ酸配列であり、Acはアセチルである。]

10

20

30

40

50

を有する分子(i)、(ii)および(iii)をその範囲内に含む。

【0089】

上記分子(i)から(xii)において、このような分子が、単一アミノ酸付加、欠失または置換をその範囲内に含むことは認められよう。

【0090】

自己免疫疾患の処置におけるcpn10の使用に関して、cpn10の投与により処置し得る関連疾病は、インシュリン依存性糖尿病、リウマチ性関節炎、全身性紅斑狼瘡、シェーグレン症候群、グレーブス病および多発性硬化症を含む。これは、本明細書に記載のEAEラットモデルに関する関連支持データにより明白である。

【0091】

器官移植、皮膚移植の処置におけるcpn10の使用に関して、本明細書に記載のラット皮膚移植モデルに関して、関連支持データが提供されている。

【0092】

不妊処置または流産予防におけるcpn10の使用に関して、関連支持データはマウスの胚発育および着床におけるcpn10抗体の効果に関する。

【0093】

創傷治癒および組織修復または組織再生におけるcpn10の使用に関して、これは、cpn10が熱傷、手術、外傷、床ずれおよび糖尿病性潰瘍を含む皮膚潰瘍、組織および器官障害を含む感染性疾患(例えば、肝炎)、組織および器官障害を含む代謝性疾患(例えば、肝硬変)および組織または器官障害を含む退行性疾患に使用できることを意味する。この結論の支持は、本明細書に記載のマウス創傷モデルについて、およびQuinnら, 1994, Hepatology 20印刷中記載の部分的肝切除後の肝臓再生データにより与えられる。

【0094】

本明細書に記載のデータは、また、炎症性腸疾患および感染性疾患を含む炎症性疾患の処置へのcpn10の使用を明らかに支持する。本明細書に記載のこのようなデータは、ラットEAEモデルおよび皮膚移植モデルにおける免疫抑制効果から導き出される参考データを含む。これは、また、EPFがマウスにおける遅延型過敏症を減少できることを示す、Rolfeら, 1983, Clin.Exp.Immunol. 51 45-52およびNature 278 No.5705 649-651により支持される。

【0095】

アレルギー性鼻炎、喘息、アトピー性皮膚炎、急性蕁麻疹および薬剤過敏症を含むアレルギー性疾患におけるcpn10の使用は、また、ラットEAEモデルおよび皮膚移植モデルにおけるcpn10の免疫抑制効果により十分支持される。この結論は、また、EPFがマウスにおける遅延型過敏症を減少できることを示す、Rolfeら, 1983, Clin.Exp.Immunol. 51 45-52およびNoonanら, 1979, Nature 278 No.5705 649-651により導き出すことができる。

【0096】

癌の診断および/または癌の外科適切所後の患者の追跡におけるcpn10の使用は、Quinnら, 1992, Cancer Immunol.Immunother. 34 265-271の参考データにより支持される。

【0097】

cpn10の投与に関して使用し得る用量に関して、簡便な量は、1 - 1000 μ g/体重kg、更に好ましくは50 - 200 μ g/体重kgである。

【0098】

表1

10

20

30

40

【表 1】

サンプル	限界量(逆数対数)	
	未処理	+5 / 3 4 1
ヒト血小板EPF (50 μ g/ml)	1 3	< 2
ラット肝臓cpn 1 0 (50 μ g/ml)	1 3	< 2
E. coli cpm 1 0 (groES) (50 μ g/ml)	NA	NA

10

【0099】

表 2

【表 2】

処置	皮膚移植片生存時間	
	ルイス→DA 日 \pm SD(n)	DA→ルイス 日 \pm SD(N)
緩衝液単独	8.7 \pm 0.75(7)	9.1 \pm 0.83(8)
1 μ g	—	9.0 \pm 1.0(3)(NS)
5 μ g	14.0 \pm 1.6(4)*	14.5(2)
20 μ g	15.2 \pm 0.92(4)*	12.5(2)
70 μ g	10.0(2)	11.0(2)

20

30

【0100】

表 3

【表 3】

処置群	n	体重減少 開始(日)	体重減少 最大期間 (日)	p#	最大体重減 少(10日目 の体重%)	p*
無処置	4	1 1	14-16		15.4	
緩衝液(対照)	5	1 1	15-17	NS	13.9	NS
cpn10(試験)	5	12-14	17-19	p<0.001	13.9	NS

40

【0101】

50

表 4

【表 4】

抗体(mg/ml)	力価(血清希釈逆数)	
	N-ペプチド(5 µg/ml)	I-ペプチド(5 µg/ml)
抗-N-ペプチド	128000	<1000*
抗-I-ペプチド	<1000*	32000
抗-卵白アルブミン	<1000*	<1000*

10

【0102】

表 5

【表 5】

抗体(全量 2mg/マウス)	群中の動物の数	黄体/マウス (平均±sem)	胚/マウス (平均±sem)	p*
抗-N-ペプチド-卵白アルブミン	6	19.1±1.2	10.6±3.8	<0.05
抗-I-ペプチド-卵白アルブミン	6	20.8±0.8	17.1±1.1	<0.02
抗-卵白アルブミン	5	17.8±1.0	16.8±0.5	NS

20

【0103】

表の説明

表 1

ロゼット阻害試験におけるcpn10の活性

30

表 2

皮膚移植片生存時間

緩衝液のみ投与された対照群と比較したp値

* p < 0.001

【0104】

表 3

EAE経過における3処置群の初期体重減少および最大体重減少の時間

#²分布

* スチューデントのt検定

40

表 4

N-ペプチドおよびI-ペプチドに対するELISAで試験した抗-N-ペプチド、抗-I-ペプチドおよび対照抗卵白アルブミン抗体

* 1/1000が試験した最低希釈であった

表 5

確認交配マウスのcpn10由来ペプチドの1日目および2日目p.c.による受動免疫の、p.c.7日目に存在する着床胚および黄体数における効果

* (ヘテロセダスティックt検定)

【図面の簡単な説明】

【0105】

50

【図1a】図1aは、EPFの精製。熱抽出ヒト血小板(100単位)をSP-セファデックスおよびヘパリンセファロースで分画し、次いで、TSK-フェニル5PWカラムにかけ、逆塩勾配で溶出した。フラクションはロゼット阻害試験で試験した(免疫抑制抗リンパ球血清のロゼット阻害活性を増大させるEPFの能力を基本にして)。

【図1b】図1bは、(a)の活性フラクション()をRP-HPLC-1で分画した。

【図1c】図1cは、(b)の活性フラクション()をRP-HPLC-2で分画した。

【図1d】図1dは、(c)の活性フラクション()をRP-HPLC-3で分画した。

【図1e】図1eは、(d)由来の活性フラクションを伴う固定化モノクローナル抗EPF抗体5/341とヒト妊娠血清、妊娠6日(10ml);ヒト妊娠尿、妊娠1カ月まで(10リットル);プロラクチンで刺激した発情マウス卵巣(100)により条件付した培地とマウス胚条件付培地(卵巣CM);ウシ腎臓細胞系MDBK(MDBK-CM;ATCC CCL22、10リットル)により条件付した無血清培地;部分的肝切除後24時間に得たラット血清(ポスト-pH、10ml);ポスト-pH24時間のラット肝臓(40g);(a)から(d)の全フラクションの等価フラクションの相互作用。抗EPF結合および非結合フラクションは、ロゼット阻害試験で試験し、活性が結合しない無関係抗体を使用した平衡実験と比較することにより特異性を証明した。

【図2a】図2aは、図1Aのように300単位ヒト血小板から精製したEPFの分析。モノマーサイズの決定。ヨウ素化EPFをSDS-PAGE29で分画し、ゲルスライス(2mm広さのスライス)し、放射活性および生物活性の分布を比較した。(挿入図)同様の調製物における直接クマーシーブルー染色。

【図2b】図2bは、EPFのイオン噴霧マスペクトル、多重プロトン化分子イオンとして表示。(挿入図)分子質量のコンピューター復元。

【図2c】図2cは、ラットcpn10(下線)と比較した、ヒトEPF由来のペプチドのアミノ酸配列(1文字標記)。EPFをエンドプロテイナーゼlysCおよびエンドプロテイナーゼgluCで消化し、残ったペプチドをRP-HPLCにより分離し、配列決定した。この個々のフラグメントの配列を示す;74-101以外は、lys消化由来である。

【図3】図3は、EPFとcpn60(groEL)の相互作用を示す。図3aは、cpn60-EPF混合物+Mg²⁺ATPをかけた後のTSKG3000SWゲル透過カラムの除去量におけるピークフラクションをSDS-PAGE(Schaggerら,1987)で分析し、銀染色した(Morrissey,1981)。左レーン+ATP、右レーン-A TP。(cpn60は14量体、M_r84000、カラム溶出限界>300000。SDSゲルの高い方のMrバンドはgroELの多量体形である)。図3bは、固定化cpn60をヒト妊娠血清(妊娠6日目)とMg²⁺ATP存在下または非存在下で混合した。非結合および結合フラクション(後者はゲルから、EDTAによるATPの除去により回収した)を、次いで、ロゼット阻害試験で試験した。結果は限界量、ロゼット阻害試験で陽性結果となるサンプルの最も高い希釈として示す。

【図4】図4は、pRM1を示す。

【図5】図5は、pRM2を示す。

【図6】図6は、pRM3を示す。

【図7】図7は、cpn10の抗体の製造を示す。

【図8】図8は、ウサギ血清中の抗cpn10抗体のELISAによる検出を示す。

【図9】図9は、cpn10の競合結合検定を示す。

【図10】図10は、抗体結合阻害%を示す。

【図11】図11は、i.p.注射後のマウス血清における組換えcpn10および血小板cpn10活性の時間経過を示す。

【図12】図12は、マウスの創傷縮小におけるcpn10の効果。創傷(~45mm²)をマウスに作り、rcpn101μgまたは対照溶液(5μl)を一日2回局所投与し、マウス群の創傷の大きさを指示した時間に測定した(平均±SD);0日n=10、1日-3日n=3、4日-7日n=2*対照群と比較してp<0.05を示す。

【図13】図13は、ラットのEAE発病における処置レジメの効果を示す。

10

20

30

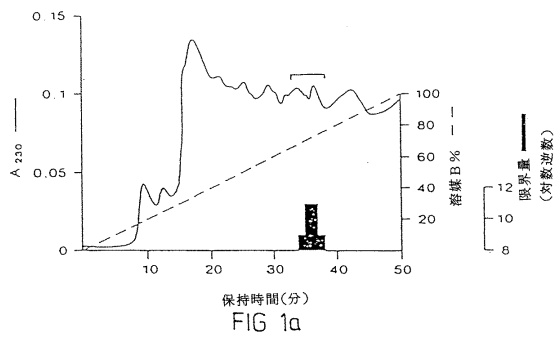
40

50

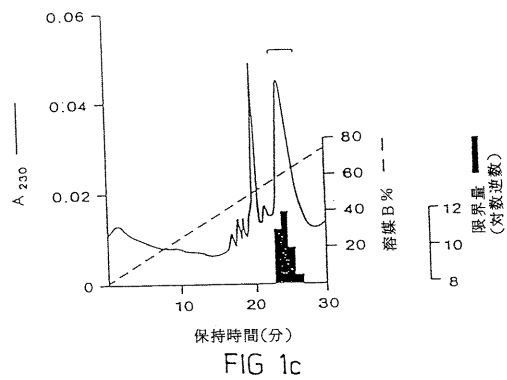
【図14】 図14は、ラットのEAE発病におけるcpn10の効果を示す。

【図15】 図15は、ラットのEAE発病におけるcpn10の効果を示す。

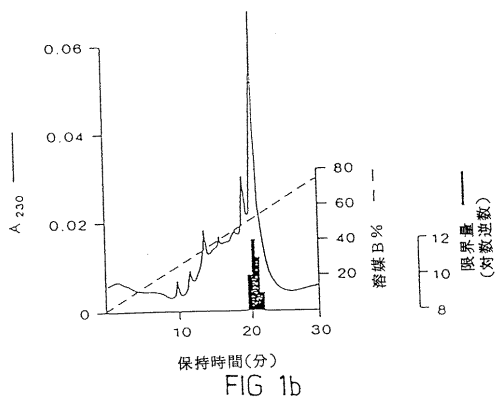
【図1a】



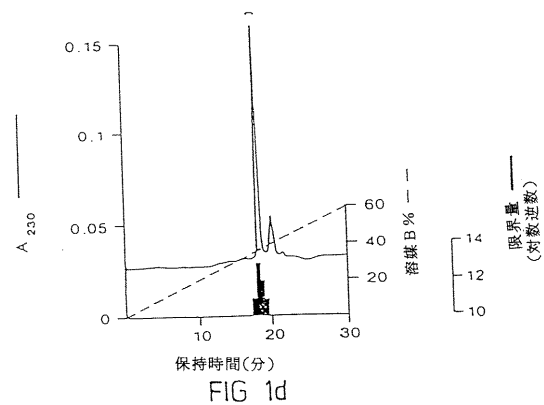
【図1c】



【図1b】



【図1d】



【 図 1 e 】

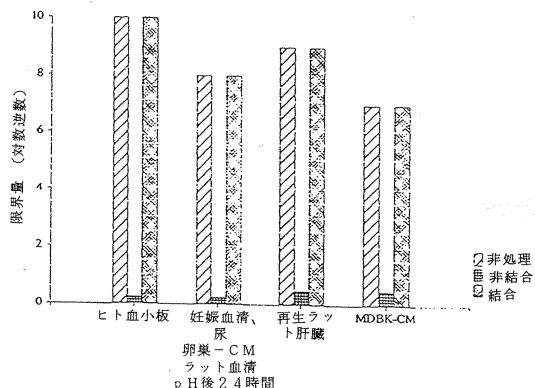


FIG 1e

【 図 2 a 】

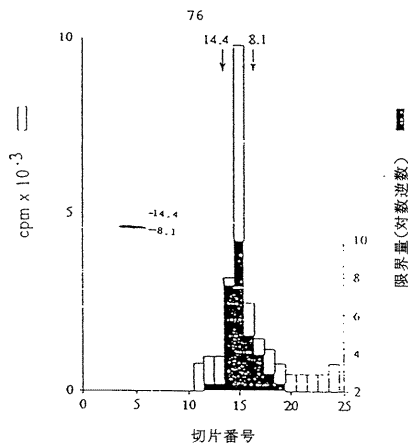


FIG 2a

【 図 2 b 】

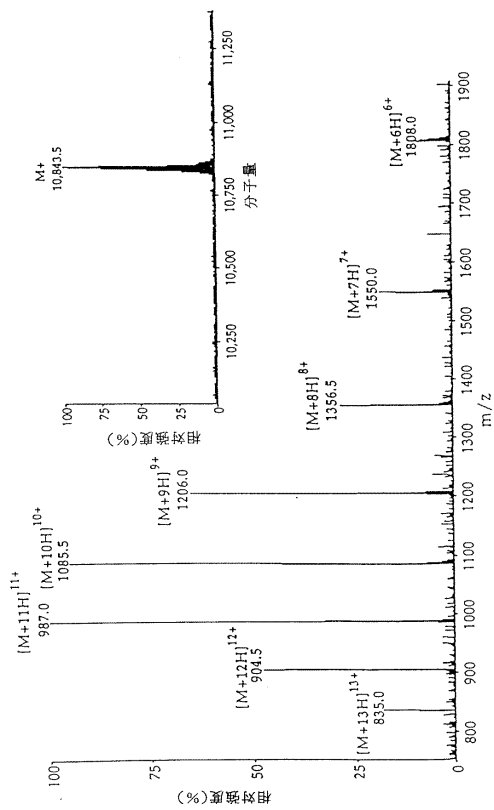


FIG 2b

【 図 2 c 】

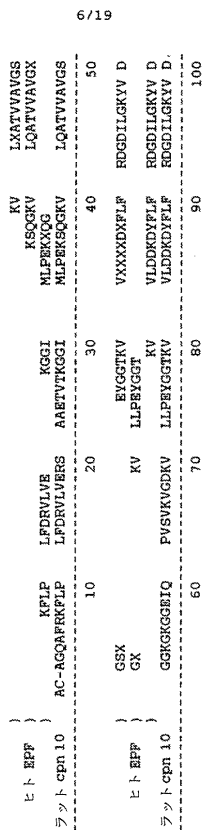
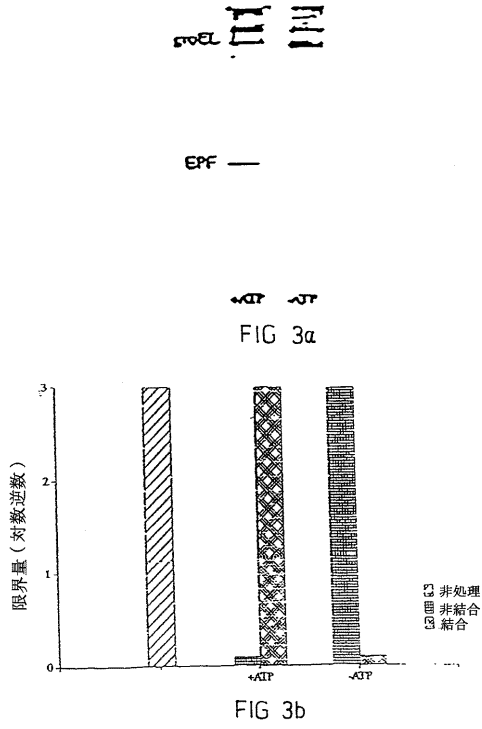


FIG 2c

【 図 3 】



【 図 4 】

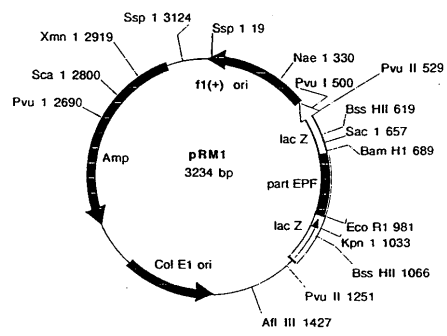


FIG 4

【 図 5 】

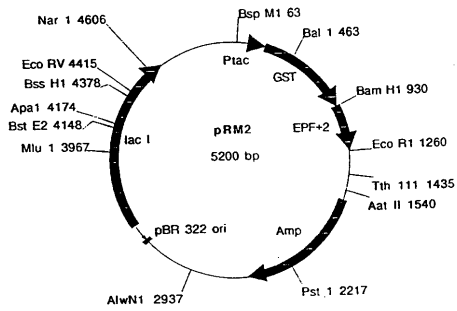


FIG 5

【 図 6 】

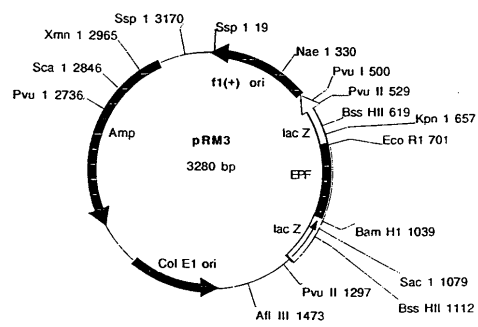


FIG 6

【 図 7 】

融合タンパク質(GST:rcpn10)

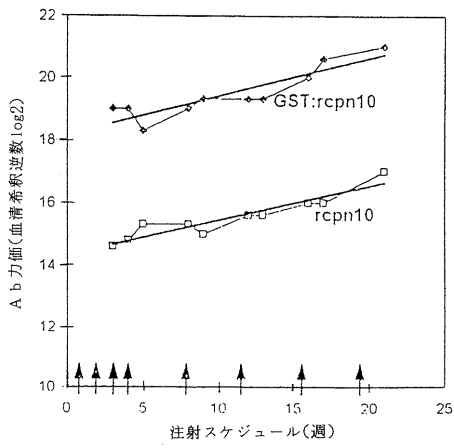


FIG 7

【 図 8 】

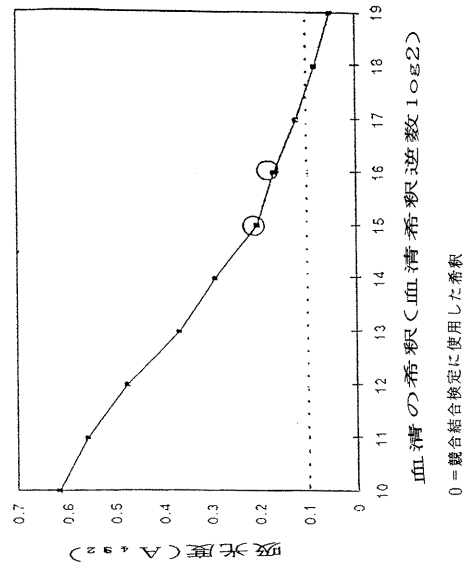


FIG 8

【 図 9 】

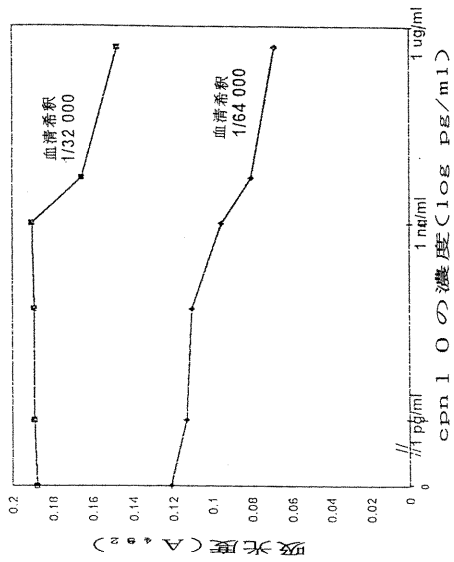


FIG 9

【 図 10 】

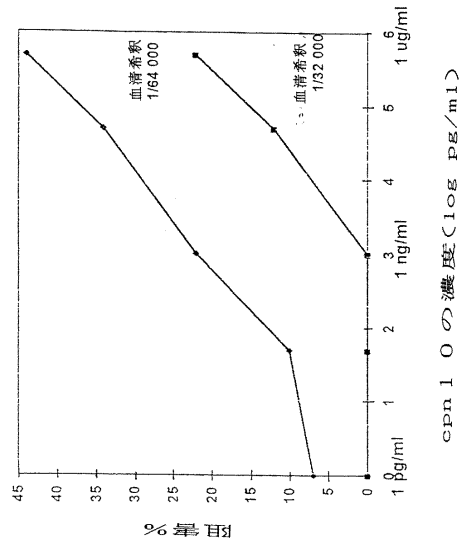
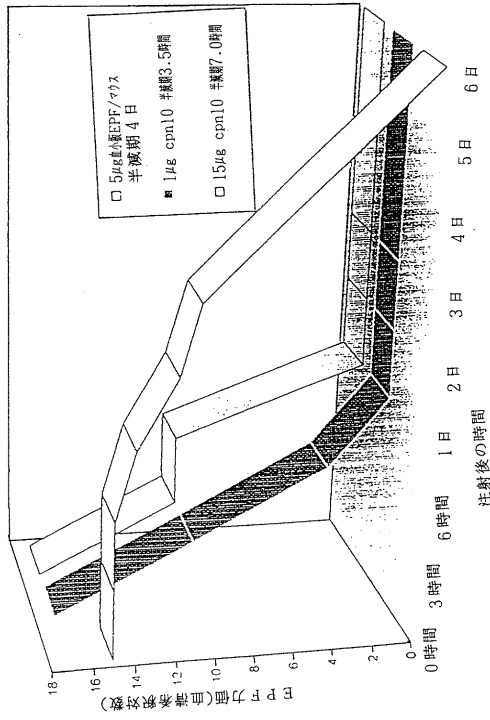
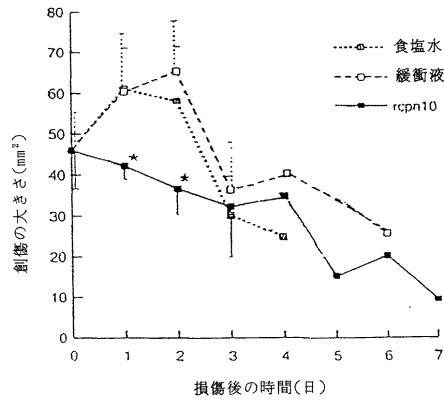


FIG 10

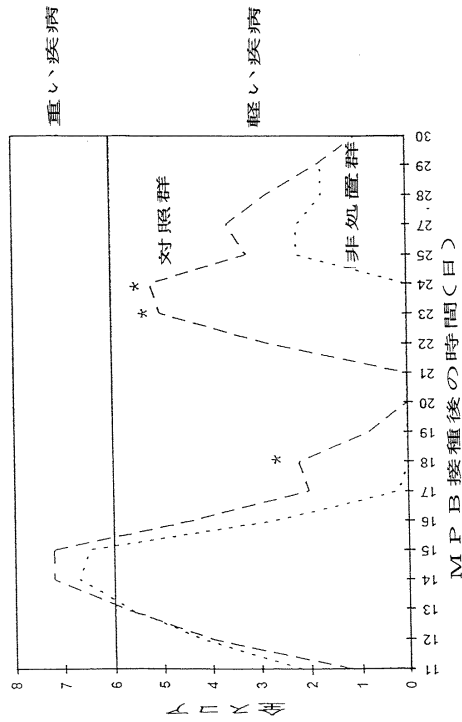
【 図 1 1 】



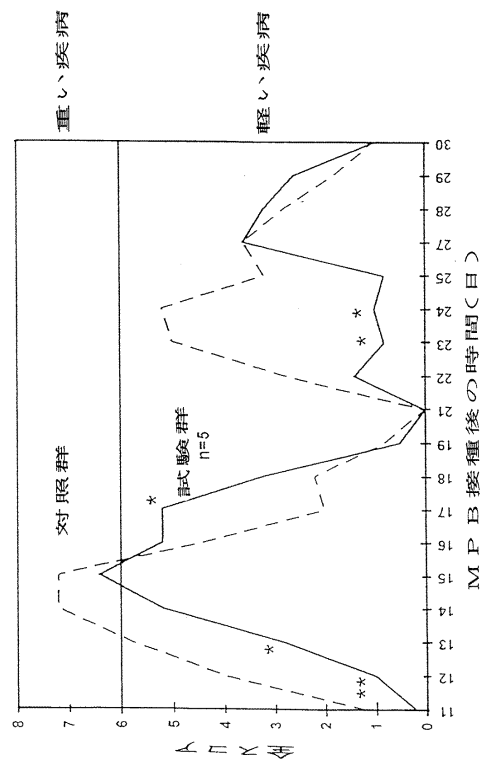
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 15 】

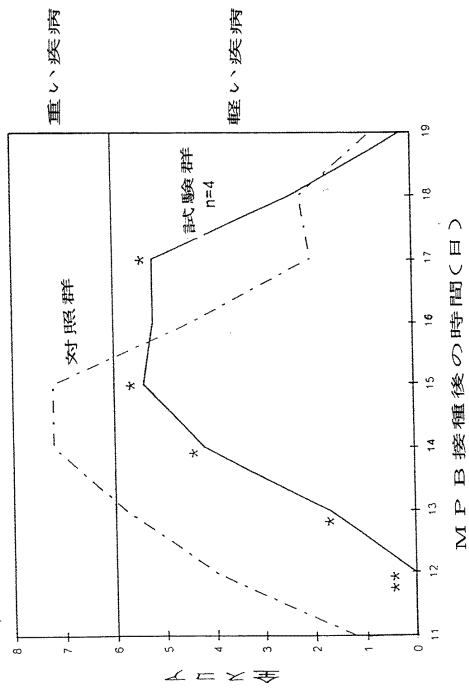


FIG 15

【 配列表 】

[0003986481000001.app](#)

フロントページの続き

(72)発明者 アリス・クリスチナ・キャバナフ
オーストラリア国クイーンズランド4060、アッシュグローブ、アンダーソン・アベニュー29
番

審査官 高 美葉子

(56)参考文献 Proc Natl Acad Sci USA(1992),Vol.89,No.8,p.3394-3398
FEBS Lett.(1994 Jan),Vol.337,No.2,p.152-156
Eur J Biochem.(1994 Jun),Vol.222,No.2,p.551-560
Journal of Reproduction and Development(1993),Vol.39,NO.4,p.309-317

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 7/00

C07K 14/00

C07K 16/00

C12N 15/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CA(STN)

REGISTRY(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/Geneseq

JMEDPlus(JDream2)

JST7580(JDream2)

JSTPlus(JDream2)

专利名称(译)	伴侣蛋白10		
公开(公告)号	JP3986481B2	公开(公告)日	2007-10-03
申请号	JP2003319869	申请日	2003-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	昆士兰大学		
申请(专利权)人(译)	昆士兰大学		
当前申请(专利权)人(译)	昆士兰大学		
[标]发明人	ハレモートン アリスクリスチナキャバナフ		
发明人	ハレ・モートン アリス・クリスチナ・キャバナフ		
IPC分类号	C07K7/06 C07K14/47 A61K38/00 A61P15/18 G01N33/53 A61K39/395 A61K45/00 A61P5/00 A61P15/06 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/02 A61P25/20 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/00 C07K16/18 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12R1/19		
CPC分类号	A61K38/00 A61P15/06 A61P15/08 A61P15/18 A61P17/00 A61P17/02 A61P25/20 A61P29/00 C07K14/4715 C07K16/18		
FI分类号	C07K7/06.ZNA C07K14/47 A61K37/02 A61P15/18 A61K38/00 A61K38/02 A61K38/03 A61K38/08 A61K38/10 A61K38/16 A61P15/06 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P5/00 C07K14/00		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA18 4C084/BA21 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/NA14 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB262 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/BA16 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA29 4H045/FA74 4H045/GA01 4H045/GA21		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏		
优先权	1993PM2705 1993-11-30 AU 1994PM8234 1994-09-16 AU		
其他公开文献	JP2004067698A JP2004067698A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供医学上有用的重组伴侣蛋白10 (cpn10)。 数组 [表1] 和具有相关氨基酸序列的肽。此外，(i) 制备针对cpn10的抗体，(ii) 使该抗体与可能含有cpn10的生物流体样品的样品反应，(iii) 通过来自cpn10-的产生的信号放大来扩增样品中cpn10的信号。还提供了用于检测血清或其他生物体液中的cpn10的方法，包括检测存在的每个步骤，以及促进细胞生长或免疫抑制的方法，包括向哺乳动物施用cpn10。 【选择图】无

【表2】

処置	皮膚移植片生存時間	
	ルイス→DA 日±SD(n)	DA→ルイス 日±SD(N)
rEPF/cpn10 (用量×2/ラット/日)		
緩衝液単独	8.7±0.75(7)	9.1±0.83(8)
1 μg	—	9.0±1.0(3)(NS)
5 μg	14.0±1.6(4)*	14.5(2)
20 μg	15.2±0.92(4)*	12.5(2)
70 μg	10.0(2)	11.0(2)