

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4139214号
(P4139214)

(45) 発行日 平成20年8月27日(2008.8.27)

(24) 登録日 平成20年6月13日(2008.6.13)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 16/40 (2006.01)	C O 7 K 16/40	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	

請求項の数 20 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-535531 (P2002-535531)	(73) 特許権者	503139315
(86) (22) 出願日	平成13年10月17日(2001.10.17)		トリュデュ インスティテュート, インク
(65) 公表番号	特表2004-518414 (P2004-518414A)		.
(43) 公表日	平成16年6月24日(2004.6.24)		アメリカ合衆国 1 2 9 8 3 ニューヨー
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/032383		ク州, サラナク レイク, アルゴンキン
(87) 国際公開番号	W02002/032288		アヴェニュー 1 5 4
(87) 国際公開日	平成14年4月25日(2002.4.25)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成16年10月4日(2004.10.4)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	60/241,065	(74) 代理人	100096183
(32) 優先日	平成12年10月17日(2000.10.17)		弁理士 石井 貞次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100118773
前置審査			弁理士 藤田 節

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD38により調節される走化性

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号10で示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子。

【請求項2】

配列番号1で示されるDNA配列を含む請求項1記載の単離核酸分子。

【請求項3】

配列番号1で示されるDNA配列を含む単離核酸分子。

【請求項4】

配列番号10で示されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む請求項3記載の単離核酸分子。 10

【請求項5】

ストリンジェントな条件下において請求項1又は請求項3記載のヌクレオチド配列にハイブリダイズし且つ機能的に同等な遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を含む、単離核酸分子。

【請求項6】

配列番号1で示されるSM38ヌクレオチド配列に対して相補的なアンチセンス分子である単離核酸分子。

【請求項7】

配列番号10で示されるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。 20

【請求項 8】

配列番号 10 で示されるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

【請求項 9】

ストリンジェントな条件下において請求項 1 又は請求項 3 記載のヌクレオチド配列にハイブリダイズし且つ機能的に同等な遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む、単離ポリペプチド。

【請求項 10】

配列番号 10 の23番目～303番目のアミノ酸配列からなるシクラーゼドメインを含む、配列番号 10 で示されるアミノ酸配列からなるSM38タンパク質の精製フラグメント。

【請求項 11】

配列番号 10 で示されるアミノ酸配列からなるSM38タンパク質に結合することができる抗体。

【請求項 12】

請求項 5 記載の核酸を含む組換え細胞。

【請求項 13】

請求項 5 記載の核酸を含む組換え細胞を、該核酸によってコードされるタンパク質が該細胞によって発現されるように培養する工程、及び発現された該タンパク質を回収する工程を含む、タンパク質の産生方法。

【請求項 14】

(i) 基質の存在下でSM38を発現する細胞をテスト化合物に接触させてSM38活性レベルを測定する工程、(ii) 別の実験で、基質の存在下でSM38タンパク質を発現する細胞を対照ビヒクルに接触させてSM38活性レベルを測定する工程、この際の条件は工程(i)の条件と本質的に同じである、ならびに(iii) 工程(i)で測定したSM38活性レベルを工程(ii)で測定したSM38活性レベルと比較する工程を含み、テスト化合物の存在下でのSM38活性レベルが高ければ、そのテスト化合物がSM38活性化物質であることを示すものである、SM38酵素活性を活性化する化合物の同定方法であって、該SM38が配列番号 10 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質である、前記方法。

【請求項 15】

(i) 化学誘引物質及び基質の存在下でSM38を発現する細胞をテスト化合物に接触させてSM38活性レベルを測定する工程、(ii) 別の実験で、SM38タンパク質を発現する細胞及び基質を接触させてSM38活性レベルを測定する工程、この際の条件は工程(i)の条件と本質的に同じである、ならびに(iii) 工程(i)で測定したSM38活性レベルを工程(ii)で測定したSM38活性レベルと比較する工程を含み、テスト化合物の存在下でのSM38活性レベルが低ければ、そのテスト化合物がSM38阻害物質であることを示すものである、SM38酵素活性を阻害する化合物の同定方法であって、該SM38が配列番号 10 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質である、前記方法。

【請求項 16】

cADPRのレベルを測定する、請求項 14 又は請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

NAADPのレベルを測定する、請求項 14 又は請求項 15 記載の方法。

【請求項 18】

細胞内のカルシウムレベルを測定する、請求項 14 又は請求項 15 記載の方法。

【請求項 19】

配列番号 10 で示されるアミノ酸配列からなるSM38タンパク質による筋収縮を測定する工程をさらに含む、請求項 14 又は請求項 15 記載の方法。

【請求項 20】

(i) テスト化合物をSM38タンパク質に接触させる工程、(ii) 前記化合物がSM38タンパク質に結合するか否かを決定する工程、及び(iii) 前記SM38タンパク質に結合するテスト化合物を、SM38タンパク質の活性を調節するために使用することができる化合物として選択する工程、を含む、SM38の活性を調節する化合物の同定方法であって、該SM38が配

10

20

30

40

50

列番号10で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質である、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

1.はじめに

本発明は、炎症、虚血、喘息、自己免疫疾患、糖尿病、関節炎、アレルギー、寄生虫等の病原性生物による感染、及び移植拒絶反応を含む（ただしこれらに限定されない）障害を治療するために、CD38を発現する細胞の遊走活性（migratory activity）を調節する方法に関する。このような細胞としては、例えば好中球、リンパ球、好酸球、マクロファージ、及び樹状細胞が挙げられる。本発明はさらに、CD38のADP-リボシルシクラーゼ活性を調節する化合物を同定するよう設計された薬物スクリーニングアッセイ、ならびにCD38により調節される細胞遊走（cell migration）を伴う障害の治療におけるこのような化合物の使用に関する。さらに、本発明は寄生性扁虫であるマンソン住血吸虫に由来するCD38相同体の単離及び特徴付けに関する。このような相同体（本明細書においてSM38と呼ばれる）を同定することにより、病原性生物における関連酵素をスクリーニングするように設計された組成物及びアッセイ、ならびにSM38の活性及び/又は発現を調節する化合物をスクリーニングするための組成物及びアッセイが提供される。このような化合物は、このような寄生虫による感染により生じる病原性障害（pathogenic disorder）を治療するために使用することができる。本発明は、CD38のADP-リボシルシクラーゼ活性が走化性にとって必要であるという発見、及びマンソン住血吸虫が寄生虫におけるカルシウム応答を調節することができるCD38相同体を発現するという発見に基づく。

10

20

【0002】

2.発明の背景

好中球、単球、樹状細胞、好酸球及びリンパ球等の細胞を含む造血由来細胞（hematopoietically-derived cells）は、炎症反応の重要な媒介細胞（cellular mediator）であり、組織の損傷部位もしくは感染部位に移動してそこで新しく到着した細胞がエフェクター機能を発揮することによって、可溶性炎症媒介物質に反応する。

【0003】

循環している白血球集団の40～50%を占める好中球は、免疫及び炎症の両方にとって特に重要である。好中球は、普段は静止細胞であるが、刺激を受けると、種々の炎症活動を媒介することができる。様々な作用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に発現される特定の受容体に結合することによって媒介される。好中球は、活性化されると、内皮細胞に結合して、組織の損傷部位、病原体又は外来物質に向かって移動することができる。同様に、好酸球も強力な炎症エフェクター細胞であるが、これらの細胞は喘息等のアレルギー性疾患にもっとも関係がある。好中球と同様に、好酸球は、炎症反応を起こしこれを持続させることができる炎症性分子（proinflammatory molecule）の強力な兵器工場を有する。

30

【0004】

好酸球や好中球等の集中した細胞（recruited cell）は、炎症部位に到着すると、炎症性産物（inflammatory product）を放出して他の造血由来細胞を該部位に集合する（recruit）ことにより、さらに炎症を誘導する。あるケースでは、特異的に集合した造血由来細胞によって媒介される炎症反応は、感染物質を取り除くことによって宿主を疾病又は死から守る。他のケース（すなわち自己免疫、虚血/再灌流、移植、アレルギー）では、炎症反応は組織にさらにダメージを与え、病気をもたらす。このように、炎症又は細胞の集合化を変化させる作用物質は、病状を制御するのに有用である可能性がある。

40

【0005】

CD38の発現は、はじめはB細胞系列の細胞に限られると考えられていたが、後に多くのグループが行った実験により、CD38が造血由来細胞及び非造血由来細胞の両方において広く発現されることが分かった。また、CD38の相同体も、哺乳動物のストローマ細胞（Bst-1）において及び無脊椎動物ジャンボアメフラシ（*Aplysia californica*）から単離した細胞において発現されることが分かった（ADP-リボシルシクラーゼ酵素）（Prasad GS, 199

50

6, nature Structural Biol 3:957-964)。

【 0 0 0 6 】

さらに最近になって、CD38がNAD⁺グリコヒドロラーゼ (glycohydrolase) 活性及びADP-リボシルシクラーゼ活性 (これらの活性によってCD38はその基質であるNAD⁺及びNADPからニコチンアミド、ADP-リボース (ADPR)、サイクリックADPR (cADPR) 及びニコチン酸アデニンジヌクレオチドリン酸塩 (NAADP) を生成することができる) を有する多機能性細胞外酵素であることが分かった (Howardら, 1993 Science 252:1056-1059; Leeら, 1999 Biol. Chem. 380:785-793)。CD38により生成される代謝産物のうちcADPR及びNAADPの2つは、植物、無脊椎動物及び哺乳動物の組織から単離した細胞において細胞内カルシウムの放出を誘導することが判明した。このことは、これらの代謝産物がカルシウム応答の包括的な調節因子 (modulator) である可能性があるを示唆している (Leeら, 1999 Biol. Chem. 380:785-793)。

10

【 0 0 0 7 】

cADPR及びNAADPはいずれも、IP³受容体により制御されるものとは異なるカルシウム貯蔵からのカルシウム放出を誘導することが知られている (Clapper, DLら, 1987, J. Biological Chem. 262:9561-9568)。その代わり、リアノジン受容体のアゴニストはcADPRにより媒介されるカルシウム放出の感度を高め (sensitize)、リアノジン受容体のアンタゴニストはcADPR依存性カルシウム放出を遮断するので、cADPRはリアノジン受容体により調節される貯蔵からのカルシウム放出を調節すると考えられている (Galione Aら, 1991, Science 253:143-146)。このように、cADPRは、リアノジン受容体が発現される筋肉や膵臓等の組織においてカルシウム応答を調節するようである、と提唱されてきた。興味深いことに、寄生性扁虫であるマンソン住血吸虫の筋繊維がリアノジン受容体を発現すること、及びカフェイン等のリアノジン受容体のアゴニストが、寄生虫において細胞内カルシウム放出及び筋収縮を誘導し得ることが最近になって分かった (Dayら, 2000 Parasitol 120:417-422; Silvaら, 1998, Biochem. Pharmacol 56:997-1003)。哺乳動物の平滑筋細胞において、アセチルコリンに反応したカルシウム放出は、リアノジン受容体のアンタゴニストによってのみならず、8-NH²-cADPRや8-Br-cADPR等のcADPRの特異的アンタゴニストによっても遮断され得る (Guse, AH, 1999, Cell. Signal. 11:309-316)。

20

【 0 0 0 8 】

これら及び他の知見は、cADPRを含むリアノジン受容体のアゴニスト/アンタゴニストが、蠕虫から哺乳動物に至るまで様々な種から単離した細胞においてカルシウム応答を調節することができることを示すが、CD38やSM38等のADP-リボシルシクラーゼ酵素が、*in vivo*でのcADPRの産生に必要であるか否かははっきりしていない。さらに、CD38の酵素活性を、カルシウム放出、増殖、アポトーシス、遊走、又は他のエフェクター機能等の下流の反応に結びつける直接的な証拠はなかった。したがって、多くの細胞型でCD38が高レベルで発現されるにもかかわらず、免疫反応におけるCD38酵素活性についての明確な役割は、明確に確立されていなかった。

30

【 0 0 0 9 】

3. 発明の概要

本発明は、CD38酵素活性のアゴニスト又はアンタゴニストの投与を含む、CD38を発現する細胞の遊走活性を調節する方法、ならびに小分子、巨大分子及び抗体が関与するcADPR媒介性シグナル伝達経路に関する。また本発明は、CD38遺伝子発現を調節するために使用することができる化合物及びヌクレオチド配列も提供する。

40

【 0 0 1 0 】

本発明はさらに、寄生性扁虫マンソン住血吸虫に由来するCD38相同体 (本明細書中においてSM38と呼ばれる) の単離及び特徴付けに関する。このような相同体を同定することにより、病原性微生物 (蠕虫等) における関連酵素をスクリーニングするよう設計された組成物及びアッセイ、ならびにSM38の活性を調節する化合物をスクリーニングするための組成物及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による感染により生じる病原性障害を治療するために使用することができる。

50

【0011】

本発明は、CD38及び/又はSM38（CD38/SM38）の酵素活性を調節する化合物、すなわちCD38酵素活性のアゴニスト及びアンタゴニストとして機能する化合物をスクリーニングするように設計されたアッセイに関する。さらに、本発明のスクリーニングは、cADPRが関与するシグナル伝達経路のアンタゴニスト又はアゴニストへと変換されるCD38/SM38の基質を同定するために使用してもよい。また本発明のスクリーニングは、cADPRが関与するシグナル伝達経路のアゴニスト又はアンタゴニストを直接同定するために使用してもよい。

【0012】

また本発明は、CD38/SM38遺伝子発現を調節する化合物をスクリーニングするよう設計されたアッセイにも関する。例えば、細胞系のアッセイを用いて、CD38/SM38転写を調節する化合物（例えばCD38/SM38遺伝子発現に関与する転写因子の発現、産生又は活性を調節する化合物等）、CD38/SM38 mRNAの翻訳を調節するアンチセンス及びリボザイムポリヌクレオチド、ならびにCD38/SM38調節領域と共に三重らせん構造を形成してCD38/SM38遺伝子の転写を阻害するポリヌクレオチド等をスクリーニングすることができる。

10

【0013】

同定された化合物は、造血由来細胞等のCD38発現細胞の遊走活性が発病の一因となる障害の治療において使用してもよい。このような障害としては、例えばCD38アンタゴニストを用いて遊走活性を阻害することが望ましい、炎症、虚血、喘息、自己免疫疾患、糖尿病、関節炎、アレルギー、又は移植拒絶反応が挙げられるがこれらに限定されない。対照的に、病原性微生物に感染した被験者又は免疫抑制された被験者においては、例えばCD38のアゴニストを用いて造血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、同定された化合物は、SM38又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より生じる病原性障害を治療するために使用してもよい。

20

【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する。

【0015】

5. 発明の詳細な説明

本発明は、CD38 ADP-リボシルシクラーゼ活性の調節を含む、細胞の遊走活性を調節する方法に関する。本発明は、CD38KOマウス由来の好中球や好酸球等の顆粒球が、体内の炎症及び感染部位に効率的に集合することができないという発見に基づく。本発明は、CD38 ADP-リボシルシクラーゼ活性は好中球等の顆粒球の初期活性化（initial activation）にとって必須ではないが、*in vivo*及び*in vitro*の両方において好中球の走化性を調節するのに非常に重要であるという発見に基づく。特に、CD38 ADP-リボシルシクラーゼ活性の産物であるcADPRは、好中球の中に存在するカルシウム貯蔵からのカルシウム放出を誘導するのに必要である。この特殊な貯蔵（specialized store）からのカルシウムの放出は、血漿膜チャンネルを活性化させ及び開かせてカルシウムの容量性流入をもたらすのに必要であり、この流入は、化学誘引物質及び/又は炎症性産物への好中球の直接的な移動を媒介する。

30

【0016】

本発明は、CD38酵素活性のアゴニストやアンタゴニスト等の調節因子ならびに/又はcADPR依存性カルシウム応答及び走化性の調節因子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。本発明はさらに、CD38により制御された、化学誘引物質及び炎症性産物への細胞の遊走活性に基づいた、障害の治療におけるこのような調節因子の使用に関する。このような障害としては、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、及び臓器移植拒絶反応が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0017】

また本発明は、寄生虫マンソン住血吸虫に由来するCD38相同体であるSM38の同定、単離及び特徴付けにも関する。本発明は、蠕虫等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の活性及び発現を調節する化合物をスク

50

リーニングするための組成物及びアッセイを包含する。本発明はさらに、SM38又はこれに構造的に関係のある分子を発現する生物に感染した動物及びヒトにおける病原性障害を治療するためのこのような調節因子の使用に関する。

【0018】

以下のサブセクションにおいて、本発明の様々な態様についてさらに詳細に記載する。

【0019】

5.1. SM38遺伝子

マンソン住血吸虫SM38のcDNA配列及び推定アミノ酸配列を図14に示す(ATCC寄託番号:)。SM38 cDNAの全てのリーディングフレームが翻訳され、303個のアミノ酸からなる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71位ヌクレオチドに位置し、停止コドンは981位ヌクレオチドに見られる。

10

【0020】

本発明のSM38ヌクレオチド配列には、(a)図14に記載されたDNA配列、(b)図14に記載されたアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、(c)(i)ストリンジェントな条件[例えばフィルタに結合したDNAに0.5M NaHPO₄, 7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS), 1mM EDTA中で65にてハイブリダイズさせ、0.1xSSC/0.1% SDS中で68にて洗浄する(Ausubel F.M.ら編, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & sons, Inc., New York, at p.2.10.3)]下において(a)又は(b)に記載されたヌクレオチド配列にハイブリダイズし且つ(ii)機能的に同等な遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列、ならびに(d)よりストリンジェンシーの低い条件[例えば0.2xSSC/0.1% SDS中で42にて洗浄する(Ausubelら, 1989(前掲))等の中程度のストリンジェント条件]下で図14に記載されたアミノ酸配列をコードするDNA配列にハイブリダイズし且つ機能的に同等なSM38遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列が含まれる。SM38タンパク質の機能的同等物としては、マンソン住血吸虫以外の種に存在する天然のSM38が挙げられる。また本発明は、配列(a)~(d)の縮重変異体も含む。また本発明は、例えば(SM38遺伝子の核酸配列の増幅反応のため及び/又は該増幅反応のアンチセンスプライマーとして)SM38遺伝子調節において有用な、SM38アンチセンス分子をコードし得るもしくは該分子として機能し得る核酸分子も含む。

20

【0021】

上記SM38ヌクレオチド配列以外にも、過度の実験を行うことなく、当分野において周知である分子生物学的技法により、他の種の中に存在するSM38遺伝子の相同体を同定して簡単に単離することができる。例えば、cDNAライブラリー、又は目的の生物から得たゲノムDNAライブラリーを、本明細書中においてハイブリダイゼーションプローブ又は増幅プローブとして記載されるヌクレオチドを用いた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。

30

【0022】

また本発明は、突然変異型SM38、SM38のペプチドフラグメント、トランケート型SM38、及び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。これらのヌクレオチド配列としては、SM38のシクラーゼドメインもしくはこのドメインの一部に対応するポリペプチド又はペプチドをコードするヌクレオチド配列、該ドメインが欠失したトランケート型SM38(例えばシクラーゼ領域の全てもしくは一部が欠けている機能的SM38等)をコードするヌクレオチド配列が挙げられるがこれらに限定されない。これらのトランケート型もしくは突然変異型SM38タンパク質のうちあるものは、天然SM38タンパク質のドミナントネガティブ阻害物質として機能し得る。融合タンパク質をコードするヌクレオチドとしては、完全長SM38、トランケート型SM38、又はSM38のペプチドフラグメントが、マーカーとして使用することができる酵素、蛍光タンパク質又は発光タンパク質等の無関係のタンパク質もしくはペプチドに融合されたものが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0023】

SM38ヌクレオチド配列は、当業者に公知である種々の方法を用いて単離することができる。例えば、SM38を発現することが分かっている細胞又は組織に由来するRNAを用いて構築

50

されたcDNAライブラリーを、標識した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得ても良い。さらに、本明細書中に開示される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、SM38核酸配列を得ることができる。この反応に使う鋳型は、SM38を発現することが分かっている細胞系又は組織から調製したmRNAの逆転写によって得たcDNAであってもよい。

【0024】

また本発明は、(a)前記SM38配列及び/又はその相補体(即ちアンチセンス)のいずれかを含む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に機能的に連結された前記SM38配列のいずれかを含むDNA発現ベクター、(c)宿主細胞の中でSM38コード配列の発現を指令する調節エレメントに機能的に連結された前記SM38配列のいずれかを含む遺伝子操作された宿主細胞、ならびに(d)前記SM38配列のいずれかを含むトランスジェニックマウスもしくは他の生物も包含する。本明細書中で使用される調節エレメントとしては、誘導可能及び誘導不可能なプロモーター、エンハンサー、オペレーター、ならびに当業者に公知である発現を駆動及び調節する他のエレメントが挙げられるがこれらに限定されない。

【0025】

5.1.2. SM38タンパク質及びポリペプチド

SM38タンパク質、ポリペプチド、及びペプチドフラグメント、SM38の突然変異形、トランケート形もしくは欠失形、ならびに/又はSM38融合タンパク質は、種々の用途(抗体の作製、SM38活性の調節に関与する他の細胞性遺伝子産物(cellular gene product)の同定、及びSM38の活性を調節するために用いることができる化合物のスクリーニング等を含むがこれらに限定されない)のために調製することができる。

【0026】

図14は、SM38タンパク質の推定アミノ酸配列を表す。本発明のSM38アミノ酸配列は、図14に示すアミノ酸配列を含む。さらに、他の種のSM38も本発明により包含される。実際に、上記SM38ヌクレオチド配列によってコードされるあらゆるSM38タンパク質は、本発明の範囲内に含まれる。

【0027】

また本発明は、幾つかの判断基準(カルシウムを動員する第二メッセンジャー(calcium mobilizing second messenger)であるcADPRの産生を触媒することによりカルシウム応答を調節する能力を含むがこれらに限定されない)のいずれかによって判断した際に5.1節に記載されるヌクレオチド配列によってコードされるSM38と機能的に同等であるようなタンパク質も包含する。このような機能的に同等なSM38タンパク質としては、上記5.1節に記載したSM38ヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列の中にアミノ酸残基の付加又は置換を有するタンパク質であってこのような付加又は置換がサイレント変化をもたらす従って機能的に同等な遺伝子産物を産生するようなものであるタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0028】

また、SM38の1つ以上のドメインに対応するペプチド、及び完全長SM38、SM38ペプチド、又はトランケート型SM38が無関係のタンパク質に融合されたものである融合タンパク質も本発明の範囲内に含まれ、これらは本明細書中に開示されるSM38ヌクレオチド及びSM38アミノ酸配列を元に設計することができる。このような融合タンパク質は、マーカー機能を果たす酵素、蛍光タンパク質又は発光タンパク質との融合体を含む。

【0029】

SM38ポリペプチド及びペプチドは化学的に合成することができるが(例えばCreighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., N.Y.を参照されたい)、SM38遺伝子配列及び/又はコード配列を含む核酸を発現するための当分野で周知である技法を用いて、組換えDNA技法によって、SM38に由来する大きなポリペプチド及び完全長SM38そのものを作製することも有益である。このような方法を用いて、第5.

10

20

30

40

50

1節に記載されているSM38ヌクレオチド配列と、適当な転写制御シグナルと、適当な翻訳制御シグナルとを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法は、例えば *in vitro*組換えDNA技法、合成技法、及び *in vivo*遺伝子組換え法を含む（例えば Sambrook ら、1989（前掲）及び Ausubel ら、1989（前掲）に記載されている技法を参照されたい）。

【0030】

本発明のSM38ヌクレオチド配列を発現させるために、様々な宿主発現ベクター系を用いてもよい。SM38ペプチドもしく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、該ペプチドもしくはポリペプチドは宿主細胞から回収することができる。あるいは、SM38ペプチドもしくはポリペプチドが分泌される場合、該ペプチドもしくはポリペプチドは、培養基から回収することができる。このような発現系からのSM38の精製もしくは濃縮は、当業者に周知である適当な洗浄剤、脂質ミセル、及び方法を用いて行うことができる。このような遺伝子操作された宿主細胞自体は、SM38の構造的特徴及び機能的特徴を保つことだけでなく生物学的活性を評価することも重要である場合に（即ち薬物スクリーニングアッセイにおいて）使用することができる。

10

【0031】

本発明の目的のために用いることができる発現系としては、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した細菌等の微生物、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した酵母、又は哺乳動物細胞のゲノムもしくは哺乳動物ウイ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保有する哺乳動物細胞系が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0032】

SM38タンパク質の正しい修飾、プロセッシング及び細胞内の局在（sub-cellular localization）が起こるように、適当な発現系を選択することができる。このためには、SM38タンパク質を厳密に修飾及びプロセッシングする能力を持つ宿主細胞が好ましい。組換えSM38タンパク質の長期的な収率の高い産生（例えばスクリーニング目的の細胞系の開発に望ましいもの）を行うためには、安定な発現が好ましい。複製起点を含む発現ベクターを用いるのではなく、適当な発現制御エレメントにより制御されるDNA及び選択マーカー遺伝子（即ち幾つか例を挙げると *tk*、*hgprt*、*dhfr*、*neo*及び *hygro* 遺伝子等）を用いて、宿主細胞を形質転換することができる。外来DNAを導入した後、遺伝子操作された細胞を濃縮培地の中で1~2日間培養した後、選択培地に切りかえてもよい。このように遺伝子操作された細胞系は、SM38遺伝子産物の内因活性（endogenous activity）を調節する化合物のスクリーニング及び評価において特に有用である。

30

【0033】

5.1.3. トランスジェニック動物

SM38遺伝子産物は、トランスジェニック動物の体内で発現させることもできる。任意の種の動物（マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、マイクロブタ（micro-pig）、ヤギ及び非ヒト霊長類（例えばヒヒ、サル及びチンパンジー等）を含むがこれらに限定されない）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。

【0034】

当分野で公知である任意の方法を用いて、SM38導入遺伝子を動物の体内に導入して、トランスジェニック動物の創始者系列（founder line）を作製することができる。このような技法としては、前核微量注入法（pronuclear microinjection）（Hoppe, P.C. 及び Wagner, T.E., 1989, 米国特許第4,873,191号）、レトロウイルスを媒体とした生殖細胞系への遺伝子導入法（Van der Putten ら、1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-6152）、胚幹細胞における遺伝子ターゲティング（Thompson ら、1989, Cell, 56:313-321）、胚のエレクトロポレーション（Lo, 1983, Mol. Cell. Biol. 3:1803:1814）、及び精子を媒体とした遺伝子導入法（Lavitrano ら、1989, Cell 57:717:723）等が挙げられるが、これらに限定されない。このような技法の概説については、Gordon, 1989, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115:171-229（本明細書中に参考として全て組み込まれる）を

40

50

参照されたい。

【0035】

本発明は、全ての細胞の中にSM38導入遺伝子を保有するトランスジェニック動物、ならびに全ての細胞ではなく一部の細胞の中に該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。また、導入遺伝子は、例えばLaskoらの教示（Lasko, M.ら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236）に従って、特定の細胞型の中に選択的に導入して活性化することもできる。このような細胞型特異的活性化に必要な調節配列は、具体的な目的の細胞型によって異なり、当業者には自明である。SM38導入遺伝子を内因性SM38遺伝子の染色体部位の中に組み込みたい場合は、遺伝子ターゲティングが好ましい。要約すると、このような技法を用いる場合、内因性SM38遺伝子に相同な幾つかのヌクレオチド配列を含むベクターは、染色体配列との相同的組換えによって内因性SM38遺伝子のヌクレオチド配列の中に組み込んでその機能を妨害する目的で設計される。

10

【0036】

トランスジェニック動物を作製したら、標準的な技法を用いて組換えSM38遺伝子の発現を評価することができる。一回目のスクリーニングは、動物組織を分析して導入遺伝子の組込みが起こったか否かを評価するために、サザンブロット分析又はPCR技法によって行うことができる。トランスジェニック動物の組織中における導入遺伝子のmRNA発現のレベルも、その動物から得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、及びRT-PCR等の技法（ただしこれらに限定されない）を用いて評価することができる。SM38遺伝子を発現する組織のサンプルは、SM38導入遺伝子の産物に特異的な抗体を用いて免疫細胞化学的方法によって評価することもできる。

20

【0037】

5.4. SM38タンパク質に対する抗体

SM38の1つ以上のエピトープ、SM38の保存型変異体（conserved variant）のエピトープ、又はSM38のペプチドフラグメントを特異的に認識する抗体も、本発明により包含される。このような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（mAb）、ヒト化もしくはキメラ抗体、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って生成されるフラグメント、抗-イデオタイプ（抗-Id）抗体、及び上記抗体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がこれらに限定されない。

30

【0038】

本発明の抗体を、以下に記載するように例えば化合物スクリーニング法と一緒に用いて、SM38遺伝子産物の発現及び/又は活性に対してテスト化合物が及ぼす影響を評価することができる。

【0039】

抗体を作製するために、SM38タンパク質又はSM38ペプチドを注射して種々の宿主動物を免疫することができる。このような宿主動物には、幾つか例を挙げると、ウサギ、マウス及びラットが含まれるが、これらに限定されない。宿主の種に応じて、種々のアジュバント（フロイントの完全アジュバント及び不完全アジュバント、水酸化アルミニウム等の無機ゲル（mineral gel）、リゾレシチン等の界面活性剤、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤（oil emulsion）、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-ゲラン杆菌）やコリネバクテリウム-パルヴム（Corynebacterium parvum）等のヒトに利用できる可能性のあるアジュバントを含むがこれらに限定されない）を用いて免疫反応を強化することができる。

40

【0040】

不均質な抗体分子の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から得ることができる。モノクローナル抗体は、培養中の連続的な細胞系（continuous cell lines in culture）により抗体分子を作製する任意の技法によって得ることができる。これらの技法としては、Kohler及びMilsteinのハイブリドーマ技法（1975, Nature 256:495-497及び米国特許第4,376,110号）、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法（Kosborら, 1983, Immunology Today 4:72; Coleら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030）、及びEBV

50

-ハイブリドーマ技法 (Coleら, 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96) が挙げられるが、これらに限定されない。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及びこれらのサブクラスを含む任意の免疫グロブリンクラスのものであってもよい。この発明のmAbを産生するハイブリドーマは、in vitroで培養してもin vivoで培養してもよい。in vivoでMabが高力価で産生されるので、この方法は、現在のところ好適な産生方法である。

【0041】

さらに、適当な抗原特異性を有するマウス抗体分子から得た遺伝子を適当な生物学的活性を有するヒト抗体分子から得た遺伝子と一緒にスプライシングすることにより「キメラ抗体」を作製するために開発された技法を用いることができる (Morrisonら, 1984, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 81:6851:-6855; Neubergerら, 1984, Nature, 312: 604-608; Takedaら, 1985, Nature 314:452-454)。あるいは、ヒト化抗体 (米国特許第5,585,089号) 又は一本鎖抗体 (米国特許第4,946,778、Bird, 1988, Science 242:423-426; Hustonら, 1988, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883; 及びWardら, 1989, Nature 334:544-546) を作製するために開発された技法を用いて、SM38の1つ以上のエピトープを特異的に認識する抗体を作製することができる。

10

【0042】

5.2.CD38/SM38の活性を調節するのに有用な化合物のスクリーニングアッセイ

本発明は、MC38/SM38酵素活性、cADPRを媒介としたシグナル伝達、もしくはCD38/SM38遺伝子発現を調節し従って細胞遊走の調節又は感染症の治療に有用である化合物又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システムに関する。

20

【0043】

5.2.1.CD38の組換え発現

CD38/SM38活性を調節する化合物又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ためには、CD38/SM38タンパク質を組換えにより発現させることが必要である。Jackson, D.G.ら, 1990, J. Immunol. 151:3111-3118; Koguma, T.ら, 1994, Biochim Biophys Acta 1224:160-162及びHarada Nら, 1993, J. Immunol 151:3111-3118 (本明細書中に参考として組み込まれる) に記載されているように、ヒト、マウス及びラットを含む幾つかの種から、CD38のcDNA配列及び推定アミノ酸配列が特徴付けられている。さらに、本明細書中に記載されるマンソン住血吸虫のcDNA配列及び推定アミノ酸配列を用いて、CD38相同体タンパク質であるSM38タンパク質を組換え発現することができる。

30

【0044】

CD38/SM38ヌクレオチド配列は、当業者に公知である様々な方法を用いて単離することができる。例えば、標識したCD38/SM38プローブを用いて、CD38/SM38を発現することが知られている組織から得たRNAを用いて構築したcDNAライブラリーを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得ても良い。さらに、既知のCD38/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ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行うことにより、CD38/SM38核酸配列を得てもよい。この反応に使われる鋳型は、CD38/SM38を発現することが知られている細胞系又は組織から調製したmRNAの逆転写によって得たcDNAであってもよい。

40

【0045】

CD38/SM38タンパク質、ポリペプチド及びペプチドフラグメント、CD38/SM38の突然変異形態、トランケート形態、もしくは欠失形態、ならびに/又はCD38/SM38融合タンパク質は、抗体の作製、CD38/SM38を媒介とした細胞遊走の調節に関与する他の細胞性遺伝子産物の同定、及び細胞遊走を調節するために用いることができる化合物のスクリーニングを含む (ただしこれらに限定されない) 様々な用途のために調製することができる。CD38/SM38融合タンパク質は、マーカー機能を果たす酵素、蛍光タンパク質、ポリペプチドタグ、又は発光タンパク質との融合体を含む。

【0046】

50

CD38/SM38ポリペプチド及びペプチドは化学的に合成することができるが(例えばCreighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., N.Y. を参照されたい)、CD38/SM38から得た大きなポリペプチド及び完全長CD38/SM38そのものは、CD38/SM38遺伝子配列及び/又はコード配列を含む核酸を発現させるために当分野において周知である技法を用いて組換えDNA技術により産生するのが有利である。このような方法を用いて、CD38/SM38ヌクレオチド配列、適当な転写制御シグナル、及び適当な翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、例えばin vitro組換えDNA技法、合成技法、及びin vivo遺伝子組換え法が挙げられる(例えばSambrookら, 1989(前掲)及びAusubelら, 1989(前掲)に記載された技法を参照されたい)。

10

【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ペプチド又はポリペプチドが可溶性タンパク質又は誘導体(例えば細胞内もしくは細胞外ドメインに対応するペプチド)として発現されて分泌されない場合、該ペプチド又はポリペプチドは、宿主細胞から回収することができる。あるいは、CD38ペプチド又はポリペプチドが分泌される場合、該ペプチド又はポリペプチドは、培養基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又は機能的同等物を発現する遺伝子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の精製又は濃縮は、当業者に周知である適当な洗浄剤、脂質ミセル及び方法を用いて行うことができる。このような遺伝子操作された宿主細胞自体は、CD38/SM38の構造的特徴及び機能的特徴を保つことだけでなく生物学的活性を評価することも重要である場合に(即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。

20

【0048】

本発明の目的のために使用することができる発現系としては、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した細菌等の微生物、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した酵母、あるいは、哺乳動物、蠕虫、もしくは昆虫細胞のゲノムから又は哺乳動物もしくは昆虫ウイルスから得たプロモーターを含む組換え発現構築物を保有する哺乳動物、蠕虫、又は昆虫細胞系が挙げられるがこれらに限定されない。

30

【0049】

CD38/SM38タンパク質の正しい修飾、プロセッシング及び細胞内の局在が起るように、適切な発現系を選択することができる。このために、CD38/SM38タンパク質を適切に修飾及びプロセッシングする能力を有する真核宿主細胞が好ましい。組換えCD38/SM38タンパク質の長期的な収率の高い産生(例えばスクリーニング目的の細胞系の開発に望ましいもの)を行うためには、安定な発現が好ましい。複製起点を含む発現ベクターを用いるのではなく、適当な発現制御エレメントにより制御されるDNA及び選択マーカー遺伝子(即ち幾つか例を挙げるとtk, hgprt, dhfr, neo及びhygro遺伝子等)を用いて、宿主細胞を形質転換することができる。外来DNAを導入した後、遺伝子操作された細胞を濃縮培地の中で1~2日間増殖させた後、選択培地に切りかえることができる。このように遺伝子操作された細胞系は、CD38/SM38遺伝子産物の内因活性を調節する化合物のスクリーニング及び評価において特に有用である。

40

【0050】

5.2.2. 非細胞系アッセイ

本発明に従って、非細胞系のアッセイシステムを用いて、CD38と相互作用し(即ちCD38に結合し)てCD38の酵素活性を調節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又はアゴニストとして機能することができ、細胞遊走(造血由来細胞を含むがこれに限定されない)を調節するため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又は構造的に関係のある相同体を発現する病原性微生物の成長、筋収縮性、分化、成熟及び繁殖を調節することができる。組換えCD38/SM38(異なる機能的ドメインに対応するペプチド又はCD38/SM38融合タンパク質を含む)を発

50

現させて、CD38/SM38と相互作用する化合物を同定するためのアッセイにおいて使用することができる。

【0051】

このためには、可溶性CD38/SM38を組換え発現させ、CD38/SM38に結合する化合物を同定するための非細胞系のアッセイで用いることができる。組換え発現させたCD38/SM38ポリペプチド又はCD38/SM38の機能的ドメインのうちの1つ以上を含む融合ペプチドを上記のように調製し、非細胞系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、完全長CD38/SM38、可溶性のトランケート型CD38/SM38（例えば該分子から細胞質ドメイン及び膜貫通ドメインのうちの1つ以上が欠失したもの）、細胞外ドメインに対応するペプチド、又はこのアッセイシステムにおいて利益（例えば標識、得られる複合体の単離等）をもたらすタンパク質もしくはポリペプチドに融合されたCD38/SM38の細胞外ドメインを含む融合タンパク質を用いることができる。細胞質ドメインと相互作用する化合物を同定したい場合、CD38の細胞質ドメインに対応するペプチド及びCD38細胞質ドメインを含む融合タンパク質を用いることができる。

10

【0052】

またCD38/SM38タンパク質は、細胞膜からもしくは細胞の細胞質ゾルから完全に又は部分的に単離されたものであっても、粗抽出物又は半精製抽出物の一部として存在するものであってもよい。非限定的な例として、CD38タンパク質は細胞膜の調製物の中に存在しても良く、SM38タンパク質は細胞の細胞質ゾルの調製物の中に存在してもよい。本発明の特定の実施形態において、このような細胞膜は、当業者に公知である方法を用いて調製することができる。

20

【0053】

CD38/SM38に結合する化合物を同定するために用いられるアッセイの原理は、CD38/SM38とテスト化合物との反応混合物を、これら2つの成分が相互作用及び結合して複合体（これは反応混合物からの除去及び/又は反応混合物中での検出が可能である）を形成することができる程度に十分な条件及び時間で調製する、というものである。次に、結合したテスト化合物の正体を決定する。

【0054】

このスクリーニングアッセイは、一般に知られている様々な方法のいずれかによって行われる。例えば、このようなアッセイを行う1つの方法は、CD38/SM38タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、融合タンパク質又はテスト物質を固相に結合させ、反応終了時にこの固相に結合したCD38/テスト化合物複合体又はSM38/テスト化合物複合体を検出するものである。このような方法の1つの実施形態において、CD38/SM38反応体（reactant）を固相表面に結合させ、結合させていないテスト化合物を直接もしくは間接的に標識してもよい。

30

【0055】

実際には、マイクロタイタープレートを固相として用いるのが便利である。固定化成分は、非共有結合又は共有結合により固定される。該固相表面は、前もって作製して、保存しておくことができる。このアッセイを実施するために、固定化成分を含むコーティング表面に非固定化成分を加える。反応完了後、形成された複合体がその固相表面上に固定されたままとなるような条件下で、（例えば洗浄により）未反応成分を除去する。固相表面に固定された複合体の検出は、様々な方法で行うことができる。予め固定化されていない成分を前もって標識する場合、表面上に固定化された標識が検出されれば、複合体が形成されたことを示す。予め固定化されていない成分を前もって標識しない場合、固相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（例えばこの予め固定化されていない成分に特異的な標識した抗体を用いる等）ことができる。

40

【0056】

あるいは、液相において反応を行い、CD38/SM38タンパク質、融合タンパク質又はテスト化合物に特異的な固定化された抗体を用いて未反応成分から反応精製物を分離し、そして形成されたであろうと推定される複合体の他の成分に特異的な標識した抗体を用いて、固

50

定化された複合体を検出することにより、複合体を検出する。

【0057】

本発明に従って、非細胞系のアッセイは、CD38/SM38に関係する酵素活性を直接阻害又は活性化する化合物をスクリーニングするために用いることもできる。このような活性としては、ADP-リボシルシクラーゼ活性、グリコシル転移活性、及びNAD+グリコヒドロラーゼ活性が挙げられるがこれらに限定されない。このために、CD38/SM38とテスト化合物との反応混合物を基質の存在下にて調製し、CD38/SM38の酵素活性を、テスト化合物の不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アッセイで用いられる基質としては、NAD+、NADP、及びそれらを標識したものが挙げられるがこれらに限定されない。さらに、ニコチンアミドグアニンジヌクレオチド (NGD) 及びニコチンアミド1、N⁶-エテノ-アデニンジヌクレオチド (1,N⁶エテノ-NAD) 等のNADの誘導体を用いてもよい。

10

【0058】

本発明の非限定的な実施例において、CD38/SM38とテスト化合物と基質との反応混合物を調製し、CD38/SM38の活性を、テスト化合物の不在下で観察される活性と比較する。この際、テスト化合物の存在下でのCD38/SM38酵素活性のレベルが低ければ、CD38/SM38アンタゴニストが同定されたことを示す。あるいは、CD38/SM38とテスト化合物と基質との反応混合物を調製し、CD38/SM38の活性を、テスト化合物の不在下で観察される活性と比較する。この際テスト化合物の存在下でのCD38/SM38酵素活性のレベルが高ければ、CD38/SM38アゴニストが同定されたことを示す。

【0059】

CD38/SM38の酵素活性は様々な方法で検出することができる。例えば、放射能標識したNAD、NADP又はNA等の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) 又は薄層クロマトグラフィー (TLC) (Aarhus Rら, 1995, J. Biochem. Chem. 270:30327-30333; Muller-Steffner HM, J. Biol. Chem. 271: 23967-23972; 及びLund FEら, 1999, J. Immunology 162:2693-2702; Higashida, H.ら, 1997, J. Biol. Chem. 272:3127-3177) を用いて、サイクリックアデノシンニリン酸リボース (cADPR)、アデノシンニリン酸リボース (ADPR)、及び/又はニコチン酸アデニンジヌクレオチドリニン酸 (NAADP) のレベルを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, FEBS Lett 371:204-208; Vu CQら, 1997, Biochem Biophys Res Commun 236: 723-726; Vuら, Adv Exp Med Biol 419: 381-388; 及びGraeff RMら, 1997, Methods Enzymol 280:230-241) 、バイオアッセイ (Aarhus Rら, 1995, J. Biol Chem. 270:30327-30333; Clapper DLら, J. Biol. Chem. 262:9561:-9568; 及びLeeら, J. Biol. Chem. 264:1608-1615) 、及び/又は蛍光アッセイ (Graeff RMら, 1996, Biochem. 35:379-:386; Graeffら, 1994, J. Biol. Chem. 269: 30260-30267; 及びGadangi Pら, 1996, J. Immunol. 156:1937-1941) を用いて、cADPR、ADPR又はNAADPレベルを測定してもよい。本発明のさらに他の実施形態において、NGD (ニコチンアミドグアニンジヌクレオチド) やニコチンアミド1,N⁶-エテノ-アデニンジヌクレオチド (1,N⁶エテノ-NAD) 等の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がCD38により加水分解される場合、得られる生成物のうちの1つは蛍光を発する (Mullerら, 1983, Biochem. J. 212:459-464; 及びCockayne Dら, 1998, Blood 92:1324-1333) 。類似体NGDがCD38/SM38のADP-リボシル活性を介して環化される場合、生成物は蛍光化合物を形成し、この蛍光化合物は蛍光計によって検出することができる (Graeffら, 1996, Biochem 35:379-386; 及びGraeffら, 1994, J. Biol. Chem. 269:30260-30267) 。

20

30

40

【0060】

本発明の他の実施形態において、コンピュータモデリング及び検索技術により、CD38/SM38酵素活性の潜在的な調節因子を同定することが可能である。例えば、アメフラシシクラーゼ活性部位 (Munshi C.ら, 199, J. Biol. Chem. 274: 30770-30777) 及びCD38活性部位 (Lund FEら, 1999, J. Immunology 162:2693-2702; Munshi, Cら, 2000, J. Biol. Chem. 275:21566-21571; Graeff Rら, 2001, J. Biol. Chem. 276:12169-12173) についての知識及びCD38/SM38基質と基質類似体との複合体の研究に基づいて、CD38/SM38活性の潜

50

在的な調節因子を同定することができる。

【0061】

活性部位の3次元幾何学構造は、完全な分子構造を決定することができるX線結晶学等（例えば、アフラシADPリボシルシクラーゼの結晶構造について記載しているPrasad GSら、Nature Struc. Biol. 3:957-964を参照されたい）の既知の方法を用いて決定することができる。他方、固相又は液相NMRを用いて、一定の分子内距離（intramolecular distance）を決定することができる。他の実験的な構造決定方法を用いて、CD38活性部位の部分的もしくは完全な幾何学構造を得ることができる。

【0062】

CD38/SM38活性部位の構造を決定したら、化合物及びその分子構造についての情報を含むデータベースを検索することにより、候補の調節化合物（modulating compound）を同定することができる。このような検索は、決定した活性部位構造と一致する構造を持つ化合物及びその活性部位を画定する基と相互作用する構造を持つ化合物を検索する。このような検索はマニュアルによるものであってもよいが、好ましくはコンピュータ支援によるものである。この検索から見つけ出されたこれらの化合物は、潜在的なCD38調節化合物である。

【0063】

あるいは、これらの方法を用いて、既に知られている調節化合物からより優れた調節化合物を同定することができる。例えば、基質としてNAD/NADPを利用する他の酵素の酵素活性を調節する沢山の化合物（即ちPARPファミリー相同体）が既に同定されている。既知の化合物の組成は変更することができ、変更が与える構造的影響は、その新しい組成に適応させた実験及びコンピュータモデリング方法を用いて決定することができる。次に、この変更した構造をその化合物の活性部位構造と比較して、フィット又は相互作用が改善されるか否かを決定する。このようにして、システムティックな組成変更（例えば側基を変更することによるもの等）を素早く評価し、優れた特異性もしくは活性を有する改変された調節化合物もしくは基質を得ることができる。

【0064】

5.2.3. 細胞系のアッセイ

本発明に従って、細胞系のアッセイシステムを用いて、CD38/SM38の活性を調節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、細胞系のアッセイシステムを用いて、CD38の活性を調節することにより化学誘引物質誘導型のCa²⁺流入及び細胞の遊走を調節する化合物をスクリーニングすることができる。さらに、この細胞系のシステムを用いて、SM38の活性を調節することにより細胞内カルシウム放出及び/又は細胞内の筋収縮性を調節する化合物をスクリーニングすることができる。このためには、内因的にCD38/SM38を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、マクロファージ及び樹状細胞が含まれる。さらに、SM38を発現するマンソン住血吸虫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。あるいは、CD38/SM38を発現するように遺伝子操作された、293細胞、COS細胞、CHO細胞、線維芽細胞等の細胞系を、スクリーニング目的で用いることが可能である。機能的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したスクリーニングでは、化学誘引物質又は炎症性刺激（inflammatory stimuli）に反応することができる宿主細胞を使用することが好ましい。SM38を発現するように遺伝子操作された宿主細胞を利用したスクリーニングでは、筋収縮を誘導するアセチルコリンや高濃度のK⁺等の様々な刺激に反応することができるマンソン住血吸虫起源の細胞を使用することが好ましい。さらに、CD38/SM38タンパク質を発現するように遺伝子操作された卵母細胞やリポソームは、CD38/SM38活性の調節因子を同定するために開発されたアッセイにおいて用いることができる。

【0065】

本発明は、CD38/SM38の酵素活性（NADグリコヒドロラーゼ活性、ADP-リボシルシクラーゼ活性及び/又はグリコシル転移（交換）活性を含むがこれらに限定されない）のうちの1

10

20

30

40

50

つ以上を変更する化合物を同定する方法を提供する。特に、CD38/SM38酵素活性を促進する化合物（即ちアゴニスト）又はCD38/SM38酵素活性を阻害する化合物（即ちアンタゴニスト）を同定することができる。CD38酵素活性を阻害する化合物は、化学誘引物質誘導型のカルシウム応答及び細胞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、化学誘引物質誘導型のカルシウム応答及び細胞遊走を促進する。SM38酵素活性を活性化又は阻害する化合物は、SM38を発現する病原性生物の生存率又は機能的活性を変更する。このような化合物は、CD38/SM38の活性化部位と相互作用することにより酵素活性を調節する化合物、又はCD38/SM38への基質の結合を競合/促進する又は基質の触媒反応を競合/阻害する化合物であってもよい（図2）。あるいは、CD38/SM38タンパク質を修飾する（即ちリン酸化する、リボシル化する等）タンパク質の活性を調節することによりCD38の活性を調節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としては、例えば、CD38/SM38をリボシル化してCD38/SM38を酵素的に不活性とするADP-リボシルトランスフェラーゼが挙げられる。さらに、CD38/SM38発現を調節することにより細胞内の酵素活性レベルを調節する化合物を同定することができる（図4）。

【0066】

本発明は、(i) 基質の存在下でCD38/SM38及び化学誘引物質受容体を発現する細胞をテスト化合物に接触させてCD38/SM38活性のレベルを測定する工程、(ii) 別の実験で、基質の存在下でCD38/SM38タンパク質及び化学誘引物質受容体を発現する細胞を対照ビヒクル（vehicle control）に接触させてCD38/SM38活性のレベルを測定する工程、この際の条件は工程(i)と本質的に同じ条件である、ならびに次に(iii) 工程(i)で測定したCD38/SM38活性レベルを工程(ii)で測定したCD38/SM38活性レベルと比較する工程を含み、この際テスト化合物の存在下でのCD38/SM38活性レベルが高ければ、そのテスト化合物がCD38/SM38活性化物質であることを示すものである、CD38/SM38酵素活性を活性化する化合物の同定方法を提供する。

【0067】

また本発明は、(i) 化学誘引物質及び基質の存在下でCD38/SM38及び化学誘引物質受容体を発現する細胞をテスト化合物に接触させてCD38/SM38活性のレベルを測定する工程、(ii) 別の実験で、CD38/SM38及び化学誘引物質受容体を発現する細胞を化学誘引物質及び基質に接触させてCD38/SM38活性のレベルを測定する工程、この際の条件は工程(i)と本質的に同じ条件である、ならびに次に(iii) 工程(i)で測定したCD38/SM38活性レベルを工程(ii)で測定したCD38/SM38活性レベルと比較する工程を含み、この際テスト化合物の存在下でのCD38/SM38活性レベルが低ければ、そのテスト化合物がCD38/SM38阻害物質であることを示すものである、CD38/SM38酵素活性を阻害する化合物の同定方法も提供する。

【0068】

CD38/SM38活性を検出するために用いられるアッセイに応じて、上記に記載したCD38/SM38の活性化物質及び阻害物質の同定方法は、工程(i)及び(ii)において化学誘引物質を含んでも含まなくても良い。例えば、CD38/SM38 ADP-リボシルシクラーゼ活性を直接分析する場合又はCD38/SM38代謝産物の生成を分析する場合、化学誘引物質が存在したり、テスト細胞上に化学誘引物質受容体が発現されたりする必要はない。しかし、例えばCD38発現細胞において走化性又は細胞内カルシウムレベルの変化を測定する場合、化学誘引物質を含む必要がある。あるいは、SM38発現細胞において筋収縮性又は細胞内カルシウムレベルの変化を測定する場合、筋収縮及び/又はカルシウム放出を活性化する刺激物質（例えばアセチルコリン、セロトニン（Dayら、1994, Paristol. 108:425-432）、FMRF-アミド関連ペプチド（FaRP）（Dayら、1994, Paristol. 109:455-459）又は培地中における高いK⁺濃度（Dayら、1993, Paristol. 106:471-477）等を含むがこれらに限定されない）を含む必要がある場合もある。さらに、使用した刺激物質に特異的な受容体を発現する宿主細胞を用いてこれらの実験を行うことが必要であろう。当業者であれば、常套実験を用いることにより、効果的且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。

【0069】

本明細書中で定義される「化学誘引物質」とは、CD38によるcADPR産生に依存するメカニズムを介して細胞の遊走を誘導する化合物又は分子複合体である。このような化学誘引物質の例としては、fMet-leu-Phe (fMLP) が挙げられるが、これらに限定されない。使用可能な他の化学誘引物質としては、エオタキシン (eotaxin)、GRO-1、IP-10、SDF-1、BLC、Rantes、MIP-1A、MCP-3、MIP3a、IL-8、CLS、ELC、Lymphotactin、PAF、Ltb4、補体c5a及びヒスタミンが挙げられる。

【0070】

上記細胞系を利用する際には、このような細胞系 (CD38/SM38タンパク質を発現する細胞) を、テスト化合物又は対照ピヒクル (例えば偽薬等) に曝露させる。曝露後、細胞を分析してCD38/SM38の活性を測定したり、又はCD38依存性シグナル伝達経路自体の活性を分析したりすることができる。

10

【0071】

標準的な生化学的技法及び生理学的技法を用いて、テスト分子がCD38/SM38の活性を調節する能力を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もしくは抑制又はcADPR及び/もしくはNAADP等のCD38/SM38代謝産物の生成等の応答を測定することができる。cADPR、ADPR及び/又はNAADPのレベルは、放射能標識したNAD、NADP又はNA等の基質の使用と組み合わせてHPLC又はTLCを用いることにより、測定することができる。さらに、上記第5.1.1節に記載したアッセイ等のような、ラジオイムノアッセイ、バイオアッセイ及び/又は蛍光アッセイを用いて、cADPR又はNAADPレベルを測定することができる。本発明のさらに他の実施形態において、NGD (ニコチンアミドグアニンジヌクレオチド) 及びニコチンアミド1,N⁶-エテノ-アデニンジヌクレオチド (1,N⁶-エテノ-NAD) 等のNADの誘導體を用いて、CD38/SM38活性を測定することができる。

20

【0072】

また、細胞系のカルシウム及び/又は遊走アッセイを用いてテスト化合物を分析し、化学誘引物質誘導型のCD38依存性カルシウム応答及び細胞遊走を阻害又は活性化することができる化合物を同定することもできる。本発明の非限定的な実施形態において、Ca²⁺指示薬染料 (例えばIndo、Fluo-3及びFura-Red等) の蛍光によって、細胞内のCa²⁺レベルの変化をモニターしてもよい。さらに、CD38/SM38酵素活性の調節により得られる膜電位の変化は、電位固定法又はパッチ記録法 (patch recording method) を用いて測定することができる。また、方向性を持った細胞の移動は、改良型のボイデンチャンバー又はスライドにおいて標準的な走化性アッセイによってモニターしてもよい。このようなアッセイシステムは、本明細書の実施例の中にさらに詳細に説明されている (実施例6を参照されたい)。また筋収縮性は、文献の中に詳細に記載されている標準的なアッセイによって測定することもできる (例えば (Dayら, 1994, Parasitology 109:455-9) 及び当該文献に引用された文献等)。

30

【0073】

テスト化合物に曝露した後、又はテスト化合物の存在下において、fMLP等の化学誘引物質又は高濃度のK⁺等の筋肉活性化因子 (muscle activator) で細胞を刺激することができ、そして細胞内のカルシウムレベル、cADPRもしくはNAADPレベル、筋収縮性及び/又は細胞遊走の変化を測定することができる。これらの測定値を、対照ピヒクルで処理した細胞と比較する。テスト化合物の存在下における細胞内Ca²⁺レベルの増加、cADPRの生成量の増加、筋収縮性の増大、及び/又は化学誘導物質への細胞遊走の増加は、その化合物がアゴニストとして機能して、Ca²⁺応答を増加させ、筋収縮性を増大させ、及び化学誘引物質誘導型CD38依存性細胞遊走を増加させることを示す。テスト化合物の存在下における、細胞内Ca²⁺のレベルの減少、cADPRの生成量の減少、筋収縮性の低下、及び/又は化学誘引物質への細胞遊走の減少は、その化合物がアンタゴニストとして機能して、Ca²⁺応答を阻害し、筋収縮性を低下させ、及び化学誘引物質誘導型CD38依存性細胞遊走を阻害することを示す (例えば図2及び図3を参照されたい)。

40

【0074】

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、cADP

50

R依存性Ca²⁺シグナル伝達経路のアゴニスト又はアンタゴニストへと変換される化合物を同定することができる(図5)。これらの仕様に合致する化合物は、本明細書の実施例(実施例6、図11)にさらに詳細に記載されている。あるいは、本発明のアッセイは、(ii) cADPR媒介性Ca²⁺シグナル伝達経路を特異的に妨げる化合物を同定するために用いても良い(図6)。本発明の非限定的な実施形態において、テスト化合物は、CD38/SM38の公知もしくは未知の基質の化学的誘導体を含み得る(例えば基質類似体8-Br-NADは、cADPR媒介性Ca²⁺シグナル伝達のアゴニストとして機能する改変型生成物8-Br-cADPRへと変換される)。化学誘引物質又は筋肉刺激物質の存在下で、CD38/SM38及び適当な化学誘引物質受容体を発現する細胞に、このテスト基質を投与してもよい。cADPRの活性を調節することができる改変型生成物への改変型テスト基質の変換は、上記方法を利用して測定することができる。またテスト基質を分析して、これらがカルシウム流入、筋収縮性及び/又は細胞遊走に対して及ぼす影響を決定することもできる。テスト基質及び化学誘引物質で処理した細胞において、細胞内でのCa²⁺の蓄積及び化学誘引物質への遊走を測定し、非改変基質(すなわちNAD及び化学誘引物質)を与えた細胞と比較することができる。改変型生成物即ち8-Br-cADPRに変換されてcADPR誘導型カルシウム応答、筋収縮性又は方向性を持った遊走を競合的もしくは非競合的に阻害する化合物は、cADPR Ca²⁺シグナル伝達経路のアンタゴニストとして同定され、cADPR Ca²⁺のシグナル伝達経路の競合的もしくは非競合的アゴニストである改変型生成物に変換される化合物は、アゴニスト又は活性化因子として定義される。

【0075】

本発明のさらに他の実施形態において、cADPRの活性(即ち誘導型のカルシウム放出及び細胞遊走)を直接変更する(すなわち活性化もしくは不活化する)化合物を、アッセイにおいてテストすることができる。このようなアゴニスト又はアンタゴニストは、細胞内へのCa²⁺の流入を調節して細胞の遊走活性又は収縮能を変化させると期待される。アンタゴニストであれば、化学誘引物質の存在下において、Ca²⁺応答を低下させ、収縮性を低下させ、及び/又は遊走を減少させるであろう。アンタゴニストの例としては、8-NH₂-cADPR、8-Br-cADPR、8-CH₃-cADPR、8-OCH₃-cADPR及び7-Deaza-8-Br-cADPRが挙げられるがこれらに限定されない。これらの仕様に合致する化合物は、本明細書の実施例(実施例6、図10)にさらに詳しく記載されている。アゴニストは、化学誘引物質の存在下において、Ca²⁺応答を増加させ、収縮性を増大させ、及び/又は遊走を増加させるであろう。アゴニストの例としては、2'-デオキシ-cADPR、3'-デオキシ-cADPR及び2'-ホスホ-cADPRが挙げられるがこれらに限定されない。cADPR活性を直接測定するアッセイとしては、Howardら(1995, Science 262:1056); Galioneら(1993, Nature 365:456-459)ならびにLee及びAarhus(1991, Cell Regulation 2:203-209)により記載されたもの等のバイオアッセイが挙げられる。

【0076】

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(即ちアゴニスト)且つ細胞内カルシウム貯蔵の枯渇によってカルシウム経路の感度を低下させる(desensitize)化合物を同定することができる。このような感度の低下(desensitization)は、ときには、カルシウム貯蔵の枯渇による細胞遊走又は筋収縮の阻害につながる場合がある。このように、CD38/SM38酵素アッセイにおいてアゴニストとして機能するが走化性又は筋収縮アッセイにおいてアンタゴニストとして機能する化合物を同定することができる。このようなアッセイ及び化合物は、本発明の範囲内に含まれる。

【0077】

5.2.4. CD38/SM38の発現を調節する化合物のアッセイ

本発明に従って、細胞系のアッセイシステムを用いて、細胞内でCD38/SM38の発現を調節する化合物をスクリーニングすることができる。アッセイは、転写もしくは翻訳レベルでCD38/SM38発現を調節する化合物をスクリーニングするように設計することができる。1つの実施形態において、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して、適当な無傷の細胞、細胞抽出物又は細胞ライゼートの中で、CD38/SM3

10

20

30

40

50

8遺伝子発現を調節する化合物を同定するために用いることができる。このようなレポーター遺伝子としては、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、又は胎盤性アルカリホスファターゼ（SEAP）が挙げられるがこれらに限定されない。このような構築物を細胞内に導入することにより、CD38/SM38遺伝子発現の調節因子を同定するように設計されたスクリーニングアッセイに有用な組換え細胞を提供する。

【0078】

細胞をテスト化合物に曝露した後、レポーター遺伝子の発現レベルを定量して、CD38/SM38発現を調節するそのテスト化合物の能力を測定することができる。アリカリホスファターゼは細胞から分泌されるので、アリカリホスファターゼアッセイは本発明の実施において特に有用である。従って、組織培養上清を、分泌されたアルカリホスファターゼについて分析することができる。さらに、アルカリホスファターゼ活性は、熱量、生物発光、又は化学発光アッセイ（例えばBronstein, I.ら（1994, *Biotechniques* 17:172-177）に記載されたもの等）によって測定することができる。このようなアッセイは、創薬スクリーニングのための、単純且つ感度の高い、簡単に自動化可能な検出システムを提供する。

【0079】

CD38/SM38の翻訳を調節する化合物を同定するために、CD38/SM38転写産物を含む細胞又は *in vitro*細胞溶解液を、CD38/SM38 mRNA翻訳の調節についてテストすることができる。CD38/SM38翻訳の阻害物質について分析するために、テスト化合物を、*in vitro*翻訳抽出物においてCD38/SM38 mRNAの翻訳を調節するその能力について分析する。

【0080】

本発明の実施形態において、CD38/SM38 mRNA転写産物の翻訳を阻害するもしくは妨げるためのアンチセンス法又はリボザイム法、あるいはCD38/SM38遺伝子の転写を阻害する三重らせん法を用いて、CD38/SM38の発現レベルを調節することができる。このような方法を利用して、炎症やアレルギー等の障害を治療することができる。この場合、骨髄由来細胞の遊走を妨げるためにCD38/SM38発現の阻害が設計されるか、又はマンソン住血吸虫の生理機能及び病理発生を変えるためにSM38の阻害が設計される。

【0081】

アンチセンス法は、CD38/SM38 mRNAに相補的なオリゴヌクレオチド（DNA又はRNA）の設計を行うものである。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、相補的なmRNA転写産物に結合して翻訳を妨げる。完全に相補的であることが好ましいが、その必要はない。当業者であれば、ハイブリダイズした複合体の解離温度（melting point）を決定するための標準的な手法を用いることにより、ミスマッチの許容度を確認することができる。

【0082】

本発明のさらに他の実施形態において、CD38/SM38 mRNA転写産物を酵素的に切断するよう設計されたりボザイム分子を用いて、CD38/SM38 mRNAの翻訳及びCD38/SM38の発現を妨げることもできる。（例えば1990年10月4日に公開された国際特許出願公開第W090/11364号；Sarverら、1990、*Science* 247:1222-1225を参照されたい）。あるいは、体内の標的とされる造血由来細胞の中で、CD38/SM38遺伝子の調節領域（すなわちCD38プロモーター及び/又はエンハンサー）に相補的なデオキシリボヌクレオチド配列をターゲティングして、CD38/SM38遺伝子の転写を妨げる三重らせん構造を形成することにより、内因性CD38/SM38遺伝子発現を減少させることができる。（一般にHelene, C.ら、1991、*Anticancer Drug Des.* 6:569-584及びMaher, LJ、1992、*Bioassays* 14:807-815を参照されたい）。

【0083】

本発明のオリゴヌクレオチド（即ちアンチセンス、リボザイム、及び三重らせんを形成するオリゴヌクレオチド）は、当分野で公知である標準的な方法により、例えば自動DNA合成装置（Biosearch, Applied Biosystemsから市販されているもの等）を用いることにより、合成することができる。あるいは、本発明のオリゴヌクレオチドの発現を指令するために、組換え発現ベクターを構築してもよい。このようなベクターは、当分野において標準的である組換えDNA技術の方法によって構築することができる。特定の実施形態におい

10

20

30

40

50

て、目的が標的細胞内での阻害性オリゴヌクレオチドのin vivo発現であるような遺伝子療法に用いるために、ウイルスベクター等のベクターを設計してもよい。

【0084】

5.2.5. 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

上記アッセイは、CD38/SM38活性を調節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としては、CD38/SM38に結合して、酵素活性を活性化する化合物（アゴニスト）又は酵素活性を遮断する化合物（アンタゴニスト）が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、CD38/SM38に直接結合しないが、CD38酵素活性を調節するタンパク質の活性を変化させることによりCD38/SM38酵素活性を変化させ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）。また、cADPR Ca²⁺シグナル伝達経路を活性化又は阻害する改変型生成物へと変換されるCD38の基質となる化合物も、本発明のスクリーニングによって同定することができる。また、細胞内でcADPR Ca²⁺シグナル伝達経路を直接活性化もしく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てカルシウム経路の感度を低下させる化合物を同定することもできる。このような感度を低下させる化合物は、細胞遊走を阻害すると期待される。さらに、本発明のスクリーニングを用いて、（CD38/SM38遺伝子発現に影響を及ぼすことにより）CD38/SM38遺伝子活性に影響を及ぼす化合物（例えば転写に影響を及ぼしたり又はスプライシングを妨害したりして完全長もしくはトランケート型のCD38/SM38の発現を調節することができるタンパク質や小さな有機分子等の分子を含む）を同定することができる。

【0085】

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としては、CD38/SM38に結合して、CD38/SM38の公知もしくは未知の基質のいずれかにより誘発される活性を模倣する（すなわちアゴニスト）又はCD38/SM38の公知もしくは未知の基質のいずれかにより誘発される活性を阻害する（すなわちアンタゴニスト）、小さな有機もしくは無機化合物、ペプチド、抗体及びそのフラグメント、ならびに他の有機化合物（例えばペプチド模倣体等）が挙げられるがこれらに限定されない。化学誘引物質又は筋肉刺激物質の存在下又は不在下で、CD38/SM38に結合して、CD38/SM38酵素活性（即ちADP-リボシルシクラーゼ活性、NADグリコヒドロラーゼ活性、グリコシル転移活性）を強める化合物（即ちアゴニスト）、又はCD38/SM38酵素活性を阻害する化合物（即ちアンタゴニスト）が同定される。CD38/SM38の酵素活性を変更/調節するタンパク質に結合する化合物が同定される。天然基質（即ちNAD(P)）を模倣する化合物であって、CD38/SM38酵素活性によってcADPR誘導型カルシウム放出経路のアゴニスト又はアンタゴニストとして機能する生成物へと変換される化合物を同定することができる。細胞内でcADPR Ca²⁺シグナル伝達経路を直接活性化又は阻害する化合物を同定することができる。

【0086】

化合物には、例えば以下に挙げるものを含む（ただしこれらに限定されない）可溶性ペプチド等のペプチドが含まれるが、これらに限定されない：ランダムペプチドライブラリーのメンバー（例えばLam, K.S.ら, 1991, Nature 354:82-84; Houghten, Rら, Nature 354:84-86を参照されたい）；ならびに立体配置がD形及び/又はL形であるアミノ酸、ホスホペプチド（phosphopeptide）（ランダムな又は一部変性した特異的（directed）ホスホペプチドライブラリーのメンバーを含むがこれらに限定されない）（例えばSongyang, Z.ら, 1993, Cell 72:767-778を参照されたい）、抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗-イデオタイプ抗体、キメラ抗体、又は一本鎖抗体、Fab、F(ab')₂及びFAb発現ライブラリーフラグメント、ならびにこれらのエピトープ結合性フラグメントを含むがこれらに限定されない）、及び小さな有機もしくは無機分子で構成されたコンピナトリアル化学により得た分子ライブラリーのメンバー。

【0087】

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としては、（例えば遺伝子発現に関わる調節領域又は転写因子に相互作用することによって）CD38/SM38遺伝子又はCD3

10

20

30

40

50

8/SM38シグナル伝達経路に關与するある他の遺伝子の発現に影響を及ぼす小さな有機分子、あるいはCD38/SM38の酵素活性もしくはCD38/SM38酵素活性の調節に關わるある他の因子（例えばCD38/SM38をリボシル化することによりCD38/SM38酵素活性を不活化するタンパク質等）の活性に影響を及ぼすこのような化合物が挙げられるがこれらに限定されない。

【0088】

5.3. CD38/SM38の調節因子を含む組成物及びその使用

本発明は、CD38を発現する細胞を有効量のCD38調節化合物（例えば上記第5.1節に記載されたアッセイを用いて同定されるCD38アゴニスト又はアンタゴニスト等）に接触させる工程を含む、細胞遊走の調節方法を提供する。さらに、本発明は、SM38を発現する細胞を有効量のSM38調節化合物（例えば上記第5.1節に記載されたアッセイを用いて同定されるSM38アゴニスト又はアンタゴニスト等）に接触させる工程を含む、カルシウム応答及び/又は筋収縮性の調節方法を提供する。CD38/SM38阻害物質（即ちアンタゴニスト）の「有効量」とは、化学誘引物質誘導型の細胞遊走を減少させ、細胞内カルシウムレベルを低下させ、筋収縮を減少させ、及び/又は上記アッセイのいずれかによって測定したCD38/SM38酵素活性の検出可能な低下に關係する量である。CD38/SM38活性化物質（即ちアゴニスト）の「有効量」とは、本質的に、化学誘引物質誘導型の細胞遊走を増加させ、細胞内カルシウムレベルを増加させ、筋収縮を増大させ、及び/又は上記アッセイのいずれかによって測定したCD38/SM38酵素活性の検出可能な増加に關係する量である。また本発明の組成物には、改変型CD38/SM38基質、CD38/SM38発現の調節因子、及びcADPRのアゴニスト/アンタゴニストも含まれる。

【0089】

本発明はさらに、上記第5.1節に記載したように同定されるCD38酵素活性を調節する化合物を含む組成物を被験者に投与する工程を含む、被験者の体内において細胞遊走を調節する方法を提供する。該組成物は、ある量のCD38酵素の活性化物質もしくは阻害物質、CD38発現の調節因子、改変型CD38基質、又はcADPRにより制御されるCa²⁺応答の直接的なアゴニスト/アンタゴニストを含み得る。したがって、本発明は、CD38の活性化物質及び阻害物質を含む組成物を提供する。

【0090】

本発明は、CD38の活性、CD38の発現、及び/又はcADPRの活性を調節することにより細胞の遊走活性を調節することができる有効量の化合物と薬学的に許容可能な担体とを含む組成物を提供する。特定の実施形態において、「薬学的に許容可能な」という用語は、動物、特にヒトへの使用が、連邦政府もしくは州政府の取締機関により承認されている、又は米国薬局方もしくは他の一般に認可された薬局方に記載されている、という意味である。「担体」という用語は、治療薬と一緒に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、又はビヒクルを指す。好適な薬学的担体の例は、E.W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical sciences」に記載されている。

【0091】

本発明は、CD38の発現又は活性を調節する化合物の投与による、細胞遊走に關係する様々な疾患及び障害の治療又は予防法を提供する。このような化合物には、CD38抗体、CD38アンチセンス核酸、CD38のアゴニスト及びアンタゴニスト（図2～3を参照されたい）、改変型CD38基質（図5を参照されたい）、ならびにcADPRのアゴニスト及びアンタゴニスト（図6を参照されたい）が含まれるがこれらに限定されない。本発明の非限定的な実施形態において、造血由来細胞の遊走に關係する障害は、CD38活性を調節する化合物を投与することにより治療又は予防される。このような障害としては、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、及び臓器移植拒絶反応が挙げられるが、これらに限定されない。

【0092】

本発明の化合物は、ヒトに使用する前に、所望の治療活性又は予防活性についてin vitroでテストした後、in vivoでテストするのが好ましい。例えば、特定の治療薬の投与を必要とするか否かを決定するために使用することができるin vitroアッセイとしては、CD38

10

20

30

40

50

を発現する細胞を治療的化合物に曝露するか、さもなくば、該細胞に該化合物を投与してこのような治療薬がCD38活性に対して及ぼす影響を観察するin vitro細胞培養アッセイが挙げられる。本発明の特定の実施形態において、化合物が細胞遊走を調節する（即ち活性化もしくは阻害する）能力を分析することができる。

【0093】

本発明はさらに、マンソン住血吸虫等の蠕虫に感染した被験者に、上記第5.1節に記載したように同定されるSM38酵素活性を調節する化合物を含む組成物を投与することにより、蠕虫において筋収縮又は他の生理学的パラメータを調節する方法を提供する。この組成物は、ある量のSM38酵素活性化物質もしくは阻害物質、SM38発現の調節因子、改変型SM38基質、又はcADPRにより制御されるCa²⁺応答の直接的なアゴニスト/アンタゴニストを含み得る。従って、本発明は、SM38活性化物質及び阻害物質を含む組成物を提供する。

10

【0094】

本発明は、SM38の活性、SM38の発現及び/又はcADPRの活性を調節することによって寄生生物の活動及び生存率を調節することができる有効量の化合物と、薬学的に許容可能な担体とを含む組成物を提供する。特定の実施形態において、「薬学的に許容可能な」という用語は、動物、特にヒトへの使用が、連邦政府もしくは州政府の取締機関により承認されている、又は米国薬局方もしくは他の一般に認可された薬局方に記載されていることを意味する。「担体」という用語は、治療薬と一緒に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、又はビヒクルを指す。好適な薬学的担体の例は、E.W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical sciences」に記載されている。

20

【0095】

本発明は、蠕虫感染に係る様々な疾患及び障害の治療又は予防法を提供する。このような化合物としては、SM38抗体、SM38アンチセンス核酸、SM38のアゴニスト及びアンタゴニスト（図2～3を参照されたい）、改変型SM38基質（図5を参照されたい）、ならびにcADPRのアゴニスト及びアンタゴニスト（図6を参照されたい）が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の非限定的な実施形態において、蠕虫感染に係る障害は、SM38活性を調節する化合物の投与により治療又は予防される。このような障害としては、肝臓及び肺における肉芽腫形成及び線維症が挙げられるが、これらに限定されない。

【0096】

本発明の化合物は、ヒトに使用する前に、所望の治療活性又は予防活性についてin vitroでテストした後、in vivoでテストするのが好ましい。例えば、特定の治療薬の投与を必要とするか否かを決定するために使用することができるin vitroアッセイとしては、SM38を発現する細胞を治療的化合物に曝露するかさもなくば該細胞に該化合物を投与してこのような治療薬がSM38活性に対して及ぼす影響を観察するin vitro細胞培養アッセイが挙げられる。本発明の特定の実施形態において、化合物が筋収縮性又は細胞内カルシウム蓄積を調節する（即ち活性化もしくは阻害する）能力を分析することができる。さらに、マンソン住血吸虫感染のマウスモデルにおいて、本発明の化合物がマンソン住血吸虫の病理発生、成長、分化、及び繁殖に対して及ぼす影響について分析することができる。このようなアッセイは、寄生生物の増殖、雌蠕虫の成熟、肝臓及び肺における肉芽腫の量、肝臓、肺、膀胱及び腸管内の卵の量、肺及び肝臓内の蠕虫の量、ならびに尿及び便の中で検出されるミラキジウムの量に及ぼす影響についてのテストを含む。

30

40

【0097】

さらに、本発明の化合物がマンソン住血吸虫の病理発生、成長、分化及び繁殖に及ぼす影響について分析することができる。このような化合物は、マンソン住血吸虫感染のマウスモデルにおいてテストすることができる。このようなアッセイは、寄生生物の増殖、肝臓及び肺における肉芽腫の量、肝臓、肺、膀胱及び腸管内の卵の量、ならびに尿及び便の中で検出されるミラキジウムの量に及ぼす影響についてのテストを含む。

【0098】

本発明は、有効量の本発明の化合物を被験者に投与することによる治療及び/又は予防法を提供する。好適な態様において、該化合物は実質的に精製されたものである。被験者

50

は好ましくは動物であり、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトである。

【0099】

様々な送達系が公知であり、これらは、CD38活性、cADPR、又はCD38発現を調節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（例えばリポソームへのカプセル化、微粒子、マイクロカプセル、該化合物を発現することができる組換え細胞、受容体を媒介とするエンドサイトーシス等）（例えばWu及びWu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照されたい）。導入方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻内、硬膜外及び経口経路が挙げられるが、これらに限定されない。化合物は、任意の便利な経路から、例えば注入もしくはポラス注射、上皮もしくは粘膜皮膚の内張り（例えば口腔粘膜、直腸及び腸管粘膜等）を介した吸収により投与することができ、また、他の生体活性因子と一緒に投与してもよい。投与は全身投与であっても局所投与であってもよい。例えば吸入器又はネブライザーを使用し、エアロゾル化剤と一緒に製剤化して、肺投与を用いることもできる。

10

【0100】

特定の実施形態において、本発明の組成物を身体の特定の領域に局所投与することが望ましい。これは、限定する訳ではないが、例えば外科手術中の局所注入、表面塗布（例えば外科手術後の創傷包帯と一緒に）、注射により、カテーテルを用いて、坐剤を用いて、又は移植片（多孔性、非多孔性、又はゲル状の材料で構成されたシラスチック膜等の膜や繊維等）を用いて、行うことができる。

【0101】

また本発明は、医薬組成物も提供する。このような組成物は、CD38活性、cADPR活性又はCD38発現を調節することができる治療的有効量の化合物と、薬学的に許容可能な担体とを含む。特定の実施形態において、「薬学的に許容可能な」という用語は、動物、特にヒトへの使用が、連邦政府又は州政府の取締機関により承認されている、又は米国薬局方もしくは他の一般に認可された薬局方に記載されていることを意味する。「担体」という用語は、治療薬と一緒に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、又はビヒクルを指す。このような薬学的担体は、水又は油等の滅菌液であってもよく、例えば石油、動物、植物又は合成起源のものが含まれる（落花生油、大豆油、鉱油、ごま油等）。水は、医薬組成物を静脈内に投与する場合に、好適な担体である。また、特に注射用溶液としては、食塩水、デキストロース水溶液、及びグリセロール水溶液を液体担体として使用することもできる。組成物は、伝統的な結合剤及び担体（グリセリド等）と一緒に坐剤として製剤化することができる。経口投与用製剤としては、医薬品レベルのマニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、糖ナトリウム（sodium saccharine）、セルロース、炭酸マグネシウム等の標準的担体を含み得る。好適な薬学的担体の例は、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、治療的有効量の治療的化合物（好ましくは精製されたもの）を、患者に適切に投与される形状にするような適当な量の担体と一緒に含む。製剤は投与方法に合ったものでなければならない。

20

30

【0102】

特定の障害又は症状の治療に効果的な本発明の化合物の量は、その障害又は症状の性質によって異なり、標準的な臨床技法によって決定することができる。さらに、最適な投薬量範囲を同定するために、場合によりin vitroアッセイを補助的に使用してもよい。製剤中に使用される正確な用量は、投与経路、及び疾患又は障害の重症度によっても異なり、現場の医師の判断及び各患者の状況に従って決定すべきである。有効な用量は、in vitroもしくは動物モデルのテストシステムから得た用量-反応曲線から外挿法により決定することができる。さらに、in vitro及びin vivo研究により、該化合物と他の公知の効力のある薬物とを組み合わせるときの相乗作用的もしくは付加的な治療効果が得られることが分かった場合、これらを組み合わせると投与することができる。

40

【0103】

また本発明は、本発明の医薬組成物の成分のうちの1種以上を充填した1個以上の容器を

50

含む医薬パックもしくはキットも提供する。場合により、このような容器には、医薬品又は生物学的製品の製造、使用又は販売を取り締まる政府当局により規定された様式で書かれた注意書き（ヒト投与のための製造、使用又は販売を取り締まる管轄機関による認可を表す）が添付されていてもよい。

【0104】

6. 実施例：好中球は、走化性、容量性Ca⁺流入（capacitative Ca⁺ entry）及び細菌浄化のためにCD38を必要とする

以下のサブセクションは、化学誘引物質により活性化された好中球へのカルシウムの流入が、CD38酵素反応により得られる生成物、cADPRにより制御されることを示すデータを表す。容量性カルシウム流入（CD38により生成されるcADPRにより制御される）は、好中球が化学誘引物質に向かって効率良く移動するのに必要である。

【0105】

6.1. 材料及び方法

6.1.1. マウス

C57BL/6Jx129CD38KO F2動物（Cockayneら，1998，Blood 92:1324-1333）を、C57BL/6Jに6世代（N6）戻し交配した後、同系交配させて、ホモ接合性類似遺伝子系C57BL/6J.129 CD38KOマウスを作製した。C57BL/6J.129（N6）CD38 KOマウスをC57BL/6J.129(N8)Rag-2 KOマウスとかけあわせた後（Shin Kaiら，1992 Cell 68:855-867）、その子孫をかけあわせてホモ接合性二重KO動物を得ることにより、CD38-Rag-2二重KO（dKO）マウスを作製した。WTマウス又はCD38KOマウスから単離した 1×10^7 個の無傷の骨髄細胞を、致死量の放射線（950rad）を照射したWT宿主に移植することによって、骨髄キメラマウスを作製した。全てのマウスを飼育し、Trudeau Institute Animal Breeding Facilityで保管した。

【0106】

6.1.2. cADPR含有量の測定

全身灌流したWTマウス又はCD38KOマウスからマウス組織を単離し、液体窒素の中で瞬間冷凍した。Rag-2KOもしくはRag-2-CD38 dKOマウスの脛骨及び大腿骨から骨髄細胞を取り出した。次に、過去に記載されているように（Vuら，1997 Biochem Biophys Res Commun 236:723-726）、マウス組織及び骨髄細胞の中のcADPR含有量を測定した。

【0107】

肺炎連鎖球菌感染。American Type Tissue Culture (Rochville, Maryland)から入手した100又は1000CFUの肺炎連鎖球菌4型（Klein株）を気管内に投与して、マウスを感染させた。感染マウスから、血液、気管支肺胞洗浄液（BAL）及び肺組織を回収した（Garvyら，1996 Inflammation 20:499-512）。肺ホモジェネート及び血液中の細菌力価を、肺あたり又は血液mlあたりで計算した。細胞遠心分離調製物（cytocentrifuge preparation）からBAL細胞の数を数えた。

【0108】

6.1.3. in vitro走化性アッセイ

ビオチン結合GR-1（PharMingen）及びMACSストレプトアビジンマイクロビーズ（Miltenyi Biotec, Auburn CA）を用いた正の選択により、骨髄好中球を精製した（純度95%）。孔サイズ3 μ mのポリカーボネートフィルタを備えた24ウェル-トランスウェルプレート（24-well transwell plate）（Costar, Cambridge, MA）を用いて、走化性アッセイ（Falkら，1980, J. Immuno. Methods 33:239-247）を行った。培地（HBSS+Ca²⁺+Mg²⁺）、fMLP（1 μ M, Sigma, St. Louis, MO）、又はIL-8（100nM, Sigma）を、チェッカーボードフォーマットの下側及び/又は上側のチャンバーに入れた。 1×10^5 個の好中球を上側のチャンバーの中に入れ、プレートを37 $^{\circ}$ Cにて45分間インキュベートした。移行した（transmigrated）細胞を下側の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 CA）でカウントした。各サンプル中の細胞の絶対数を決定するために、標準個数のサイズ20 μ Mの蛍光マイクロスフィア（Polysciences, Inc. Warrington, PA）を各試験管に加え、細胞と一緒にカウントした。移行した細胞の総数 = カウントした好中球の数 \times ビーズの総数 / カウントしたビーズである。幾つかの実験では、好

10

20

30

40

50

中球を、EGTA (2mM) 中でインキュベートするか、又は8-Br-cADPR (25 ~ 100 μ M, Sigma) もしくはN(8-Br-A)D⁺ (1.0mM) で20分間、前処理した。

【0109】

6.1.4. CD38発現

WTマウス又はCD38KOマウスから、骨髄、血液又は腹膜腔細胞を単離し、抗-マウスGR-1 FITC、抗-マウスMAC-1 PE及び抗-マウスCD38 APC (PharMingen, San Diego CA) で染色した。フィコール勾配でヒト末梢血好中球を単離した後、抗-hCD15-FITC (Becton Dickinson, San Jose CA) 及び抗-hCD38-ビオチン (Caltag Laboratories, Burlingame CA) で染色した。フローサイトメトリーによりマウス及びヒト好中球を分析した (マウス好中球の場合はMAC-1⁺GR-1⁺及びヒト好中球の場合はCD15⁺)。炎症反応を誘導するために、マウスに1mlの3%チオグリコール酸塩培地 (Becton Dickinson, Cockeysville MD) を腹腔内注射した。注射の12時間後にこれらの動物を犠牲にし、腹膜腔に浸潤している細胞を回収した。

10

【0110】

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。1x10⁶個の精製した骨髄好中球を、96ウェルマイクロプレート中の100 μ l HBSS中で37 $^{\circ}$ Cにて20分間インキュベートした。NGD (40 μ M) (Sigma) を加え、次の10分間、NGD⁺からcGDPRへの酵素的変換を、蛍光定量法 (Graeffら, 1994 J. bio l. Chem. 269:30260-30267) により測定した (415nm発光及び300nm励起)。

【0111】

20

6.1.5. 好中球の中におけるRyR-3 mRNA発現

精製した骨髄好中球又は脳組織から単離したRNAからcDNAを調製した。投入量0.03 ~ 2 μ gのcDNA及びRyR-3特異的プライマーを用いて、RT-PCRを30サイクル (アニーリング温度61 $^{\circ}$ C) 行った (Guseら, 1999 Nature 398:70-73)。

【0112】

N(8-Br-A)D⁺の合成。以前記載されたように (Abdallahら, 1975 Eur. J. Biochem 50:475-481)、N(8-Br-A)D⁺を合成した。

【0113】

6.1.6. 細胞内カルシウムの測定

精製した骨髄好中球を、細胞充填用培地 (cell loading media) (Ca²⁺及びMg²⁺+1%FBS+4mMプロベネシドを加えたHBSS) の中に1x10⁷細胞/mlの濃度で再懸濁した。蛍光染料Fluo-3 AM (4 μ g/ml) 及びFura Red AM (10 μ g/ml) (Molecular Probes, Eugene OR) と一緒に細胞を37 $^{\circ}$ Cにて30分間インキュベートした後、2回洗浄し、細胞充填用培地又はカルシウムを含まない培地中に1x10⁶細胞/mlの濃度で再懸濁した。幾つかの実験では、5 μ Mジギトニンを含むカルシウムを含まない培地中で細胞を透過性とした。他の実験では、EGTA (2mM)、8-Br-cADPR (10 ~ 100 μ M)、ルテニウムレッド (Sigma) 又はN(8-Br-A)D⁺ (1mM) と一緒に細胞を予めインキュベートしておいた後、対照担体 (DMSO 0.01%)、fMLP (1 μ M)、IL-8 (100nM)、リアノジン (1 μ M)、cADPR (100 μ M) 又はタブシガーギン (1 μ M) で刺激した。フローサイトメトリーにより、FL-1チャンネルの中ではFluo-3の蛍光発光を、及びFL-3チャンネルの中ではFura-Redの蛍光発光を測定して、個々の細胞の中の[Ca²⁺]_iの蓄積を評価した。FlowJo3.2 (Tree Star, Inc. San Carlos, CA) を用いて、データを分析した。相対的な[Ca²⁺]_iは、一定時間のFluo-3及びFura Redの平均蛍光強度の比率で表した。

30

40

【0114】

6.2. 結果

CD38は、リンパ組織の中で発現される主要なADP-リボシルシクラーゼである。in vivoでのカルシウム感受性免疫反応におけるCD38及びcADPRの必要性を直接テストするために、CD38ノックアウト (CD38KO) マウスを作成した (Cockkayneら, 1998 Blood 92:1324-1333)。CD38がマウス中で発現される主要なシクラーゼであるか否かを決定するために、CD38KO及びC57BL/6J野生型 (WT) マウスから単離した組織及び細胞の中のcADPR含有量を比較

50

した(表1)。

【0115】

【表1】

表1: CD38KO 及び WT 動物から単離した組織の中の cADPR 含有量の比較

組織	cADPR 含有量 (WT 組織) (pmol/mg タンパク質)	cADPR 含有量 (CD38KO 組織) (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 骨髄性細胞	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

8~12週齢のCD38KOもしくはWTマウスから単離した組織から、又はRag-2KOもしくはRag-2-CD38二重KOマウスから単離した骨髄(BM)骨髄性細胞から抽出物を調製し、cADPR含有量について分析した。1回の分析あたり3匹のマウスから単離した組織について精製及び分析を3回別個に行った。*P=0.01、**P=0.07; Anova分析。検出の限界、0.2pmol/mgタンパク質。

【0116】

主にリンパ系細胞又は骨髄性細胞を含むWT組織(例えば脾臓、胸腺及びリンパ系細胞不足骨髄(骨髄性細胞)等)は、簡単に検出できるレベルのcADPRを有していた。これに対し、CD38KOマウスから単離したリンパ組織又は骨髄組織ではcADPRは検出されなかった。しかし、脳、腎臓及び心臓等のCD38KO組織のcADPR含有量は、同じWT組織のcADPR含有量とほぼ等しかった。従って、脳及び心臓等の器官におけるcADPR産生には他の未知のシクラーゼが関与しているに違いが、CD38は、骨髄性細胞及びリンパ系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。

【0117】

CD38欠陥マウスは、細菌感染によりかかりやすい。先天性の炎症性免疫反応におけるCD38及びcADPRの必要性をテストするために、CD38KO及びWTマウスを肺炎連鎖球菌に感染させ、生存率を評価した(図7A)。CD38KO動物のLD50はWTマウスよりも少なくとも10倍低いという観察結果を得た。つまり100コロニー形成単位(CFU)は感染後2.5日以内にCD38KOマウスの50%を殺傷したが、同じ期間内にWT動物の50%を殺傷するには1000CFUが必要であった。

【0118】

CD38は反応している免疫細胞及び気管支上皮から発現されるので(Fernandez JEら, J. Biol. Reg. Homeost. Agents 12:81-91)、WT又はCD38KO骨髄を、放射線照射したWT宿主に移植して、肺及び/又は免疫系におけるCD38発現が防御に必要であるか否かをテストした。再構成したキメラ動物はCD38+又はCD38-欠陥骨髄由来細胞を保有していたが、気管支上皮を含む他の全ての細胞型は、いずれのグループの動物においてもWT起源のものであった。次に、再構成マウスを肺炎連鎖球菌に感染させ、生存率をモニターした(図7B)。CD38KO骨髄を受容した再構成動物は、WT骨髄を受容したマウスに比べてはるかに感染しやすかった。このことは、肺炎連鎖球菌感染へのCD38KOマウスの高い罹病性が、骨髄由来リンパ系細胞及び/又は骨髄性細胞におけるCD38の欠陥によるものであることを示している。

【0119】

10

20

30

40

50

肺炎連鎖球菌へのCD38KO動物の高い罹病性が、細菌の成長及び全身部位への広がりを抑制できないことによるものであるか否かを決定するために、CD38KO及びWTマウスを1000CFUの肺炎連鎖球菌に感染させ、感染後12時間で、肺及び血液中の細菌力価を評価した(図7C)。CD38KOマウスの肺中の細菌力価は対照WTと比較して5倍高かった。しかし、CD38KOマウスの血液中の細菌負荷量は、WTマウスに比べて200~500倍多かった。このことは、この細菌がCD38KOマウスにおいて急速に広まることを示している。

【0120】

骨髄性細胞又はリンパ系細胞が細菌の蔓延促進の一因になるか否かを決定するために、Rag-2 KOマウス(Shin Kaiら, 1992 Cell 68:855-867)(リンパ球が不足しているが全ての骨髄性細胞上にCD38を発現することができる)及びCD38-Rag-2二重ノックアウトマウス(リンパ球が不足しており且つ骨髄性細胞上にCD38を発現することができない)を1000CFUの肺炎連鎖球菌に感染させた後、12時間後に肺及び血液中の細菌力価を測定した(図7C)。リンパ系細胞不足CD38-Rag-2二重KOマウスの肺及び血液中の細菌力価はCD38KOマウスに見られる細菌力価と同じくらい高く、Rag-2KO又はWTマウスに比べて有意に高かった。従って、CD38欠陥骨髄性細胞は、肺炎連鎖球菌へのCD38KOマウスの高い罹病性の一因である。

【0121】

CD38欠陥好中球は感染部位及び炎症部位に蓄積されない。骨髄性細胞が肺炎連鎖球菌に感染したCD38KO動物の肺に適切に漸増されるか否かをテストするために、CD38KO及びWTマウスを感染させた後、感染後に肺気道に漸増された細胞を数えた。CD38KO及びWT動物の気道内の細胞の総数は、感染後6~18時間、同等に増加した(図8A)。しかし、好中球は、感染後12~18時間でWT動物の肺の中に見られる優性な細胞型であったが、CD38KO動物の肺中の浸潤細胞は、主にマクロファージから構成されていた(図8B~C)。従って、CD38は、感染部位及び炎症部位への好中球の漸増維持に必要であると思われる。

【0122】

CD38欠陥好中球は、化学誘引物質fMLPに対する不完全な走化性反応を起こす。好中球は、局所細胞及び侵入病原体により生成されるケモカイン及び化学誘引物質の勾配に反応して感染部位に移動する(Hubら, 1996 Chemoattractant Ligands and Their Receptors (Horuk編)301-325 (CRC Press, Boca Raton, FL); Servant G.ら, 2000 Science 287:1037-1040; Gao, J.L., 1999 J.Exp. Med 189:657-662)。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、活性化された好中球の前縁は、その勾配の最も高い濃度に向かって分極し、方向性を持って移動する(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(phenylalanine)(fMLP)等の細菌由来ホルミル化ペプチドによりそのN-ホルミルペプチド受容体(FPR)が刺激されると、感染部位に向かって移動することは、既に証明されている。CD38KO好中球がfMLPに向かって移動する能力に欠陥があるか否かをテストするために、トランスウェルチェッカーボードアッセイ(transwell checkerboard assay)にてCD38KO好中球及びWT好中球がケモキネシス及び走化性により遊走する能力を測定した(Falkら, 1980 J. Immunol. Methods 33:239-247)(図8D)。上側及び下側のチャンバーにfMLPがなかった場合、又はfMLPが上側のチャンバーのみにあった場合、少ない(<2300細胞)が同等数のCD38KO及びWT好中球が下側のチャンバーへと遊走した。等濃度のfMLPが上側及び下側のチャンバーにあった場合(ケモキネシス条件)、数は増加したが同等数のWT及びCD38KO好中球が下側のチャンバーに遊走した。このことは、活性化により誘導されるfMLPへのケモキネシスが、CD38KO及びWT好中球では等しかったことを示している。fMLPが下側のチャンバーのみに在った場合(走化性条件)、下側のチャンバーへのWT好中球の移動はさらに増加した。しかし、CD38KO好中球は、fMLP勾配の不在下に比べて走化性勾配の存在下では遊走性が僅かに高かっただけであった。このことは、CD38KO好中球が、細菌性化学誘引物質によって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る。これがCD38KO好中球の一般的特性であるか否かを決定するために、ケモカインIL-8(好中球の強力な活性化物質である)を用いて同じ実験を行った(Baggiolini

10

20

30

40

50

ら, 1989 J. Clin. Invest 84:1045-1049)。fMLPで観察されたものとは対照的に、IL-8により誘導されたCD38KO及びWT好中球の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好中球が、幾つか(ただし全てではない)の化学誘引物質に対して不完全な走化反応を起こすことを示している。

【0123】

CD38は、好中球上に発現され、酵素的に活性である。CD38KO好中球は走化性において本質的な欠陥を有すると思われるので、マウス及びヒト好中球におけるCD38の発現及び酵素活性を測定した。WTマウスの骨髄及び血液から単離した好中球は、CD38を明らかに発現し(図9A)、同様に、ヒト末梢血好中球もCD38を発現した(図9B)。興味深いことに、WTマウスに炎症性物質であるチオグリコール酸塩を腹腔内注射したところ、血液及び腹膜腔から単離した好中球においてCD38発現が有意に増加した(図9D)。次に、CD38を発現する好中球がシクラーゼ反応を触媒することができるか否かをテストするために、WT及びCD38KO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)と一緒にインキュベートした後、NGDが環化して蛍光化合物サイクリックGDP-リボース(Graeffら, 1994 J. Biol. Chem 269:30260-30267)(cGDPR)となる様子を測定した。図9Cに示すように、NGDと一緒にインキュベートすると、WT好中球はcGDPRを速やかに生成したが、CD38KO好中球はこれを生成しなかった。このことは、CD38を発現する好中球が、サイクリックヌクレオチドを生成する能力を持つことを示している。

【0124】

cADPR及びリアノジンは、好中球の中で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(Galioneら, 1991 Science 253:1143-1146)を介して細胞内カルシウム放出を誘導するので、RyR/cADPRカルシウムシグナル伝達経路が好中球において機能的であるか否かをテストした。RT-PCR分析を行ったところ、好中球はRyR3のmRNAを発現するが(Sorrentino, V.ら, 1993 TIPS 14:98-103; Hakamata Y.ら, 1992 FEBS Lett 312:229-235)、脳内で見られるものに比べてはるかに低レベルであることが分かった(図9D)。好中球により発現されるRyRが機能的であるか否かをテストするために、カルシウムを含まない緩衝液中で透過性とした後に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)。リアノジンで刺激した好中球において少量ではあるが再現性のある $[Ca^{2+}]_i$ の増加(これはRyR阻害物質であるルテニウムレッドにより遮断することができる)が観察された(Galioneら, 1991 Science 253:1143-1146)。次に、好中球の中でcADPRが細胞内カルシウム放出を誘導することができるか否かをテストするために、カルシウムを含まない緩衝液の中で好中球を透過性とした後、精製したcADPRで該細胞を刺激した(図9F)。僅かではあるが簡単に検出することができる細胞内遊離カルシウムの増加が観察された。cADPRをまず熱不活化により加水分解した場合(Leeら, 1989 J. Biol. Chem. 264:1608-1615)又は細胞を8-Br-cADPR(RyRへのcADPRの結合を競合的に拮抗するcADPRの不活性類似体)(Guseら, 1994 Annu. Rev. Immunol 12:593-633)で前処理した場合、カルシウム放出は観察されなかった。cADPR媒介性カルシウム放出に対するアンタゴニスト8-Br-cADPRの特異性はさらに、8-Br-cADPRがタブシガーゲンにより媒介される細胞内遊離カルシウムの蓄積を遮断することができないことを示すことによって証明された(図9G)。まとめると、これらのデータは、RyR及びcADPRを媒介としたメカニズムにより好中球の中で細胞内カルシウムが放出され得ることを示す。

【0125】

CD38により触媒されたcADPRは、fMLPにより活性化された好中球の中への細胞外カルシウムの流入に必要である。ケモカイン/化学誘引物質G-タンパク質共役型受容体(例えばFPRやIL-8受容体等)を介したシグナル伝達により、細胞内カルシウム放出と細胞外カルシウムの流入とが組み合わせることにより、 $[Ca^{2+}]_i$ が増大する(Murphy, P.M., 1994 Annu. Rev. Immunol 12:593-633; Demaurex N.ら, 1994 Biochem J. 297:595-601; Schorr W.ら, 1999 Eur. J. Immunol 29:897-904; Lewら, 1989 Eur. J. Clin. Invest. 19:338-346)。CD38KO好中球は、fMLPへの走化性アッセイにおいて欠陥があり、カルシウムを動員する代謝産物であるcADPRを生成する能力を持たないので、CD38KO好中球においてfMLPに反

応したカルシウム動員に欠陥があるという仮説がたてられた。これをテストするために、カルシウムを含まない培地中で、CD38KO又はWT好中球をfMLP又はIL-8で刺激し、細胞内カルシウム放出を測定した(図10A)。fMLPで刺激したWT好中球では、すぐに細胞内カルシウムの急激な上昇が観察され、その後5分間かけて徐々に減少した。これに対して、fMLPで刺激したCD38KO細胞では、fMLPで刺激した後の $[Ca^{2+}]_i$ の量は約20%減少し、この $[Ca^{2+}]_i$ は、少なくとも2分早く、基準線まで減少した。fMLPで刺激したCD38KO好中球において見られる $[Ca^{2+}]_i$ の低さとは異なり、IL-8で刺激したCD38KO及びWT好中球の $[Ca^{2+}]_i$ は同じであった。従って、これらのデータは、CD38がfMLP刺激後の最適な細胞内カルシウム放出に必要なが、IL-8刺激後には必要ではないことを示した。

【0126】

次に、CD38が細胞外カルシウムの流入に必要なか否かを評価するために、カルシウム含有培地の中で、刺激したCD38KOもしくはWT好中球をfMLP又はIL-8で刺激した(図10B)。fMLPをWT好中球に加えた場合、細胞内カルシウム放出による $[Ca^{2+}]_i$ の急激な上昇が観察されると同時に、細胞外カルシウムの流入によって、2度目の長い $[Ca^{2+}]_i$ の上昇も観察された。極めて対照的に、この反応のカルシウム流入期は、fMLPで刺激したCD38KO好中球においてほぼ皆無であった。興味深いことに、カルシウム含有培地中においてWT及びCD38KO好中球をIL-8で刺激した場合、IL-8は、WT及びCD38KO好中球の両方において $[Ca^{2+}]_i$ の同等の急激な上昇を誘導し、これは急速に基準線レベルまで減少することが分かった。このことは、WT又はCD38KO好中球のいずれにおいてもIL-8が細胞外カルシウムの流入を誘導しなかったことを示している。

【0127】

cADPRがfMLPにより刺激された好中球においてカルシウム動員を調節するか否かを決定するために、CD38KO及びWT好中球を、濃度を段階的に高くしたcADPRアンタゴニスト、8-Br-cADPRと一緒に予めインキュベートさせておいた後、fMLP又は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ならびに細胞外カルシウムの流入は用量依存式にCD38KO細胞内で見られるレベルにまで低下した。これに対し、IL-8で刺激した好中球に8-Br-cADPRを加えても、WT又はCD38KO好中球いずれの $[Ca^{2+}]_i$ に対しても全く影響を及ぼさなかった。まとめると、これらのデータは、CD38により生成されたcADPRがfMLPに反応した細胞内カルシウム放出及び細胞外カルシウム流入を調節すること、ならびにCD38とcADPRはいずれも、IL-8で刺激した好中球におけるカルシウム動員には必要でないことを示す。

【0128】

CD38により触媒されるcADPRは、fMLPへの好中球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により媒介されるカルシウム動員がfMLPへの走化性に必要であるか否かをテストするために、WT好中球を、EGTA又は8-Br-cADPRと一緒に予めインキュベートした後、チェッカーボード走化性アッセイにおいてfMLP又はIL-8への走化性を測定した(図10D)。WT好中球(前処理なし)を、上側のチャンバーの中で培地と一緒に、及び下側のチャンバーの中でfMLP又はIL-8と一緒にインキュベートした場合、細胞は下側のチャンバーに効率良く遊走した。しかし、細胞外カルシウムをEGTAでキレートした場合又は細胞をcADPRアンタゴニストである8-Br-cADPRで前処理した場合、fMLPへのWT好中球の走化性は、80%以上減少した。重要なことは、EGTA又は8-Br-cADPRで処理しても、好中球がIL-8に向かって遊走する能力に対して全く影響を及ぼさなかった。従って、cADPR媒介性細胞内カルシウム放出によって調節される細胞外カルシウムの流入は、好中球のfMLP誘導型走化性に必要である。

【0129】

NAD⁺の類似体は、IL-8ではなくfMLPへの好中球の走化性をCD38-依存式に阻害する。CD38により触媒されるcADPRは、fMLPへの好中球の走化性にとって必要であると思われたので、この走化性は、CD38によりcADPRシグナル伝達経路のアンタゴニストへと変換され得るNAD⁺類似体で好中球を処理することによって阻害することができるであろう、と予想された。この仮説をテストするために、好中球を、CD38によって、本発明者らの初期の実験で

10

20

30

40

50

使用したcADPRアンタゴニストである8-Br-cADPRへと変換されることが出来る基質、ニコチンアミド8-プロモアデニンジヌクレオチド(N-(8-Br-A)D⁺)で前処理した。fMLPにより活性化された好中球においてN-(8-Br-A)D⁺が細胞外カルシウムの流入を変化させるか否かをまずテストするために、WT好中球をN-(8-Br-A)D⁺で前処理しておき、細胞をfMLPで刺激した後、[Ca²⁺]_iを測定した(図11A)。N-(8-Br-A)D⁺で前処理したところ、fMLPで処理した好中球の中への細胞外カルシウムの入り込みを阻害した。次に、WT及びCD38KO好中球をN-(8-Br-A)D⁺で前処理するか又は培地のみの中に入れておいた後、これらがfMLP(図11B)又はIL-8(図11C)に向かって遊走する能力についてテストした。未処理のWT好中球はfMLP及びIL-8の両方に向かって移動し、一方、未処理のCD38KO好中球はfMLPへ向かって移動することはできなかったがIL-8へは移動することができた。興味深いことに、WT好中球をN-(8-Br-A)D⁺で前処理したところ、fMLPへの好中球の走化性を著しく低下させたが、IL-8へ向かって遊走する能力には全く影響を及ぼさなかった。N-(8-Br-A)D⁺でCD38KO好中球の前処理を行ったところ、fMLP又はIL-8へのCD38KO好中球の走化性には全く影響を及ぼさなかった。このことは、N-(8-Br-A)D⁺により誘導された、fMLPにより媒介される走化性の阻害は、CD38依存性であることを示している。まとめると、これらのデータは、NAD⁺類似体が、CD38依存式にカルシウム応答及び好中球の走化性を調節することができることを示している。

【0130】

7. 実施例：アレルギー性肺疾患のマウスモデル及びCD38の役割

以下のサブセクションは、CD38欠陥好酸球が、アレルゲンにより誘導される気道炎症部位に漸増されることができないことを示すデータについて記載する。

【0131】

7.1. 材料及び方法

OVAによる初回抗原刺激及び感作：C57BL/6 WTマウスを、ミョウバンに吸着させた20 µgのニワトリオボアルブトニン(ovalbutnin, OVA)の腹腔内投与により免疫した。免疫したマウスを免疫後30日で犠牲にし、抗CD4に直接結合させたMACS磁気ビーズを用いて、OVAで初回抗原刺激したCD4 T細胞を脾臓から精製した。抗CD4結合MACSビーズを用いて、免疫していないC57BL/6 WTマウスから、ナイーブCD4 T細胞を精製した。ナイーブなもしくはOVAで初回抗原刺激したT細胞を、C57BL/6 WTマウス又はCD38KO受容マウスに、マウス1匹あたり1x10⁷個のCD4 T細胞の割合で静脈内注射し、それぞれ10匹のマウスで構成される4つのグループを作製した(図11A及びBに図示)。次に受容マウスを、T細胞移植の直後から7日間連続して、OVA(10 µg)のPBS溶液中の気道内投与により感作した。T細胞移植後8日目にマウスを犠牲にし、上記第6.2.2節に記載したように気管支肺胞(bronchoalveolar)洗浄により肺の気道及び肺胞から浸潤細胞を取り出した。次に、血球計でカウントすることにより細胞の総数を数え、細胞を遠心分離してスライドガラスに載せ、Diff-Quickで染色し、倍率400x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、分画細胞のカウント(differential cell count)を行った。

【0132】

7.2. 結果

CD38が、好中球以外の細胞の肺への漸増を制御するか否かを決定するために、ヒト喘息の特性の多くに似た特性を示すアレルギー性疾患のマウスモデルを用いた(Lloyd CMら, 2001, Adv. Immunol. 77:263-295)。喘息の重要な構成要素は、気道の炎症であり、これは、肺に漸増された好酸球の活性によって誘導されるもしくは悪化すると考えられる。好酸球は主に喘息の病理を担当するが(Broide, DHら, 1991, J. Allergy Clin. Immunol. 88:637-648)、これらの漸増及び機能は、アレルゲン性の抗原により初回抗原刺激されたT細胞によって制御されるようである(Gavettら, 1994, Respir. Cell Mol. Biol. 10:587-593)。このようなT細胞はしばしば、IL-4、IL-5及びIL-13等の2型サイトカインならびにエオタキシン等のケモカインを生成する(Cohn, L.ら, 1988, J. Immunol. 161:3813-3816; Drazen JMら, 1996, J. Exper Med. 183:1-5)。T細胞の活性化に対するCD38のあらゆる影響とは無関係にCD38が好酸球の漸増を調節する能力を検証するために、WTマウスを

にて1分間、及び72にて2分間を35回繰り返した後、72にて5分間を1回。EST AW017229に対応する推定330bpバンドを単離し、TOPOクローニングを行った後、プローブとして用いて、マンソン住血吸虫cDNAライブラリーから250,000プラークをスクリーニングした。5つの陽性クローンを単離した後、プラーク純粋クローン (plaque pure clone) を作製するために、さらに3回スクリーニングにかけた。全ての5つのクローンの両鎖を全て配列決定した。これらのクローンのうち4つのヌクレオチド配列及びアミノ酸翻訳は全く同じであった (SM38と呼ばれる)。停止コドン及びポリアデニル化部位は、これらのSM38クローンの全てにおいて同定されたが、開始メチオニンはこれらのクローンのいずれにも存在しなかった。SM38遺伝子の5'側末端を得るために、単一プライマー伸長法 (NAR, 1994, vol 22, No. 16, p.3427-3428) を用いた。PCRの第1ラウンドは、外側SM38プライマー (5' catcgaataaacctgatttcataacac) 及びBluescript用の万能逆方向プライマー (universal reverse primer) を用いて行った。次にこの反応物2 μ lを、内側nested SM38プライマー (5' gataaagtaagaactcgtgcc) 及び万能逆方向プライマーを用いたPCRにかけた。この反応物から200bpバンド及び300bpバンドを同定し、直接配列決定を行った。得られた配列は、SM38クローンの5'側末端

と124bp重複しており、さらに153bpの追加配列を含んでいたが、停止コドンは検出されず、このことは、本発明者らがこの遺伝子の5'側末端をまだ得ていなかったことを示している。従って、マンソン住血吸虫成虫から単離したRNAから調製したcDNAを用いて、古典的な5'RACE (PNAS vol 85 pp 8998-9002, Dec. 1998) を行った (RNAはP.Lo Verde博士 (SUNY Buffalo) により提供された)。10xTaq緩衝剤、dNTP、cDNA及びExpand High Fidelity TaqをdT-APプライマーと合わせ (詳細についてはref.を参照されたい)、以下のサイクルを行った: 95にて5分間の後、50にて2分間及び72にて40分間。この40分間のインキュベーションの後、5'側の外側SM38プライマー (上記を参照されたい) 及びAPプライマーを加え、以下の条件下において35サイクルを繰り返した: 95にて15秒間、47にて30秒間、72にて2分間の後、72にて5分間伸長。これらの反応物を1.5%アガロースゲル上で泳動させ、Qiagen Gel Kitを用いて300bpバンドを単離した。AP及び5'外側SM38プライマーを用いて5'RACE生成物を直接配列決定した。その配列の中で2つの潜在的な開始メチオニンが同定され、これらのメチオニン残基の13~19アミノ酸上流に2つの停止コドンが見つかった。続いてRACE生成物をクローニングした。SM38配列を含む全ての3つのクローン (PCRにより作製した2つのクローン及びマンソン住血吸虫cDNAライブラリーから得た1つのクローン) は隙間なく重複していた。アSEMBLしたところ、SM38配列は、5'側非翻訳配列、2つの潜在的開始メチオニン、303アミノ酸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、停止コドン、3'側非翻訳配列、及びポリアデニル化部位を含む1049bpの配列を含んでいた。

【 0 1 3 7 】

8.2. 結果

住血吸虫の筋線維においてカルシウム応答を調節する薬物は、有効な抗蠕虫試薬であると思われるので (Kohnら, 2001, J. Biol. Chem. 276:36873-36876)、本発明者等は、住血吸虫の特定のカルシウム調節標的の同定に着手した。最近になって、住血吸虫がその筋線維の中でリアノジン受容体 (RyR) を発現することが分かった (Dayら, 2000, Parasitol. 120:417-420; Silvaら, 1998, Biochem. Pharmacol. 56:997-1003)。脊椎動物の平滑筋及び骨格筋において発現されるRyRのアゴニストは、細胞内カルシウム放出、電圧依存性カルシウム流入及び筋収縮性を調節することが知られている。興味深いことに、カフェイン等のRyRアゴニストでマンソン住血吸虫筋線維を処理したところ、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。カフェイン等の薬物はRyR依存性カルシウム応答を調節することができるが、(少なくとも脊椎動物の筋線維において) RyRの生理的調節因子 (physiological modulator) は、サイクリックADP-リボース (cADPR) である。cADPRは、哺乳動物CD38タンパク質等のADP-リボシルシクラーゼ酵素及び無脊椎動物アメフラシシクラーゼ酵素によって生成される公知のカルシウムを動員する代謝産物である。住血吸虫がカルシウムを動員する2次メッセンジャーであるcADPRを生成することができる

酵素を発現するか否かを決定するために、翻訳されたときに哺乳動物CD38及びアメフラシ酵素と相同性を有する住血吸虫配列を求めて、一般利用可能なEST配列の検索を行った。隙間なく重複する配列へとアセンブルすることができる3つのEST配列 (EST AI067047、EST AW017229及びEST N20756) を同定した (図 1 3)。このアセンブルされた配列は、CD38及びアメフラシシクラーゼ酵素の両方と、限定的ではあるが有意な相同性を共有していた。

【 0 1 3 8 】

アセンブルされたESTが事実上、原物に忠実なcDNA (authentic cDNA) を表すか否かを決定するために、EST AW017229の配列からプライマーを調製し、マンソン住血吸虫cDNAライブラリーに対してPCRを行った。PCR反応物から330塩基対のフラグメントを単離し、配列決定した。予想通り、このフラグメントの配列はESTの配列と一致した。次にこのフラグメントをプローブとして用い、マンソン住血吸虫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5つの独立したプラークを単離し、プラークを精製し、両方のDNA鎖の配列決定を行った。次に、この配列の情報をを用いてさらなるプライマーを設計し、該cDNAの5'側末端を単離した (「方法」を参照されたい)。次に、マンソン住血吸虫ライブラリーから単離した完全なcDNA配列をアセンブルして、ESTと比較した。図 1 3 に示すアラインメントは、EST配列の隙間のないアセンブリが正しいこと、及びクローニングされたcDNA (SM38とも呼ばれる) が、どのESTにも見られない少なくとも421塩基対の異なる配列を含んでいたことを示す。このDNA配列が翻訳されると、シクラーゼ酵素に典型的な構造モチーフを含む299アミノ酸配列が生成する (図 1 4) (Prasad, GS, 1996 Nature Struct. biol. 3:957-964)。特に、SM38タンパク質は、アメフラシシクラーゼ酵素 (Munshi Cら, 1999, J. Biol. Chem. 274:30770-30777) 及び哺乳動物CD38 (Munshi Cら, 2000, J. Biol. Chem. 275:21566-21571 ; Graeff R. 2001, J. Biol. Chem. 276 : 12169-12173) に見られる重要な触媒部位及び活性部位の残基とアラインメントされる、保存されたアミノ酸残基を含む (図 1 5 A ~ B)。さらに、シクラーゼ酵素の3次構造のアセンブリにとって重要なシステイン残基 (Prasad GSら, 1996, Nature Struct. biol. 3:957-964) もまたSM38において保存されている (図 1 5 A ~ B)。重要なことに、SM38 cDNA配列は完全なシクラーゼ酵素ドメインをコードする (図 1 6)。

【 0 1 3 9 】

これらの結果に基づいて、本発明者等は、マンソン住血吸虫等の住血吸虫が、カルシウム動員の2次メッセンジャーであるcADPRの産生を触媒することができる酵素に、構造レベルで高い相同性を有するタンパク質 (SM38) をコードすることを証明した。また住血吸虫は、cADPRに反応して細胞内カルシウムを放出するRyRも発現するので、SM38は住血吸虫においてカルシウム応答を調節することができるかと推測される。さらに、特に住血吸虫の筋線維におけるカルシウム流入の調節は、蠕虫の麻痺及び浄化をもたらすことができるので、本発明者等は、住血吸虫においてSM38及びRyR経路のアゴニスト/アンタゴニストが抗蠕虫薬として有効であると予想している。

【 0 1 4 0 】

本発明は、本明細書中に記載された特定の実施形態によってその範囲を限定されるものではなく、これらの実施形態は、本発明の個々の態様の一例として記載されるのであって、機能的に同等な方法及び構成要素は、本発明の範囲内に含まれる。実際に、本明細書中に示され記載されたもの以外にも、前述の説明及び添付の図面から、当業者には、本発明の様々な変更が自明となろう。このような変更は特許請求の範囲内に含まれるものとする。様々な出版物が本明細書中に引用されているが、これらの内容は本明細書中に参考として全て組み込まれる。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 図1は、化学誘引物質のシグナル伝達に対する正常な細胞応答を示す。(1) 化学誘引物質が受容体に結合してシグナル伝達を開始する。(2) CD38がNADを加水分解してcADPRを生じ、cADPRはCa²⁺の内部貯蔵からの放出を促進する。(3) cADPRにより制御され

10

20

30

40

50

る内部貯蔵からCa²⁺が放出され、これにより外部のCa²⁺チャンネルを活性化する。(4)細胞外Ca²⁺が細胞内に流れ込み、遊走を可能にする。

【図2】 図2は、CD38によるcADPR産生の阻害物質は、容量性Ca²⁺流入及び化学誘引物質誘導型遊走を妨げることに示す(スクリーニングは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てシグナル伝達を開始する。(2)CD38の阻害物質が、NADの加水分解を妨げる(酵素は不活性であり生成物は作られない)、又はcADPRの生成を特異的に阻害する(ADP-リボシルシクラーゼ活性を遮断するが酵素は不活性でない場合がある)。(3)cADPRの欠乏により、内部貯蔵からのcADPRを媒介としたCa²⁺放出が起こらない。(4)容量性Ca²⁺流入及び遊走は起こらない。

【図3】 図3は、CD38酵素活性を調節するタンパク質について示す(スクリーニングはこれらのタンパク質を活性化もしくは不活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てシグナル伝達を開始する。(2)タンパク質XがCD38を修飾してCD38酵素活性を不活化する。(3)cADPRの欠乏により、内部貯蔵からのcADPRを媒介としたCa²⁺放出が起こらない。(4)容量性Ca²⁺流入及び遊走は起こらない。

【図4】 図4は、CD38発現を調節するタンパク質について示す(スクリーニングはこれらのタンパク質を活性化もしくは不活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てシグナル伝達を開始する。(2)タンパク質XがCD38遺伝子の転写を抑制する。(3)CD38の欠乏によりcADPRがなくなるため、内部貯蔵からのcADPRを媒介としたCa²⁺放出が起こらない。(4)容量性Ca²⁺流入及び遊走は起こらない。

【図5】 図5は、CD38の代わりとなる基質は、cADPRの阻害物質を生成して容量性Ca²⁺放出を妨げ得ることについて示す(スクリーニングは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てシグナル伝達を開始する。(2)CD38が改変された基質(例えば8-BrNAD)を加水分解し、改変型生成物(例えば8-Br-cADPR)を生成する。(3)改変型生成物が、内部貯蔵からのcADPR誘導型Ca²⁺放出を競合的もしくは非競合的に阻害する。(4)容量性Ca²⁺流入及び遊走は起こらない。

【図6】 図6は、cADPR結合の阻害物質は容量性Ca²⁺流入を遮断することを示す。(1)化学誘引物質が受容体に結合してシグナル伝達を開始する(スクリーニングはこのような化合物を同定する)。(2)CD38がNADを加水分解してcADPRを生成する。(3)cADPRの阻害物質(8-Br cADPR)は、内部貯蔵からのcADPR誘導型Ca²⁺放出を競合的もしくは非競合的に遮断する。(4)容量性Ca²⁺流入及び遊走は起こらない。

【図7】 図7は、CD38KOマウスは、肺炎連鎖球菌感染にかかりやすいことを示す。(a)C57BL/6WTマウス(白い円)及びCD38KOマウス(黒い円)に肺炎連鎖球菌を2回気管内投与して感染させた。その後4日間、感染マウスの生存率をモニターした。(b)放射線照射し、WT骨髄(白い四角形)又はCD38KO骨髄(黒い四角形)で再構成したWTマウスに肺炎連鎖球菌を2回投与して感染させ、4日間モニターした。データは、少なくとも5回の独立した実験を行った結果を表す。n=10マウス/グループ。(c)WT又はRag-2KOマウス(白いバー)及びCD38KO又はCD38-RAG-2二重KOマウス(黒いバー)に肺炎連鎖球菌を気管内投与して感染させ、感染の12時間後に、肺及び末梢血中の細菌力価を測定した。データは3回の独立した実験を行った結果を表す。n=10マウス/グループ。*P<0.001; スチューデントt検定。

【図8】 図8は、CD38KO好中球は感染部位に集合せず、細菌由来化学誘引物質に向かって遊走することができないことを示す。(a)WTマウス及びCD38KOマウスに肺炎連鎖球菌を気管内投与して感染させ、感染後の複数の経過時間ポイントにおいて、気道中の浸潤細胞を回収してカウントした(パネルa、WT=白いバー及びCD38KO=黒いバー)。(b)感染したWTマウス及びCD38KOマウスの肺の中の浸潤細胞の正体及び頻度を、顕微鏡検査(倍率×400)及びDiff-Quick染色した細胞遠心分離調製物のカウントによって決定した。(c)WTマウス(白いバー)及びCD38KOマウス(黒いバー)の肺洗浄における分画した細胞の数を、細胞の平均数×10⁶±(SE)として表す。5回の独立した実験において同様の結果が得られた。n=5マウス/グループ/経過時間ポイント。*P<0.01 **P=0.01; スチューデントt検定。(d)従来のトランスウェルチェッカーボードケモキネシス/走化性アッセイにおいて

10

20

30

40

50

、WTマウス（白いバー）及びCD38KOマウス（黒いバー）から精製した骨髄好中球の、培地 fMLP又はIL-8に反応して遊走する能力についてテストした。何の刺激も与えない時に、トランスウェルの下側のチャンバーに移動する細胞の数は、CD38KO好中球とWT好中球とでは大きな差はなく、1500~2300細胞であった（図示せず）。同等の濃度の刺激に反応して両方のチャンバーに移動する（ケモキネシス）好中球の数及び走化性勾配（chemotactic gradient）に反応して遊走する好中球の数（走化性）を表す。図示した値は、4回の異なる実験の平均±S.E.である。*P<0.001；スチューデントt検定。

【図9】 図9は、好中球を発現するCD38はcADPRを産生し、cADPR及びリアノジンに反応して細胞内カルシウムを放出することを示す。（a）WTマウス及びCD38KOマウス、又は12時間前にチオグリコール酸塩を腹腔内注射しておいたWTマウス及びCD38KOマウスから、骨髄細胞、末梢血細胞及び腹膜腔細胞を単離した。Mac-1^{hi}GR-1^{hi}好中球上でのCD38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（実線ヒストグラム）及びCD38KO好中球上（破線ヒストグラム）でのCD38の発現を表す。（b）CD15+ヒト末梢血好中球を、抗-CD38mAb（黒く塗りつぶしたヒストグラム）又はアイソタイプの対照Ab（破線）で染色することにより、CD38発現について評価した。（c）WT及びCD38KOの骨髄好中球におけるシクラーゼ活性を測定した。WTもしくはCD38KOの好中球を単独で（WT=円及びCD38KO=四角形）又はNGDの存在下で（WT=三角形及びCD38KO=ダイヤモンド形）10分間インキュベートした。蛍光分析により生成物cGMPの蓄積を測定した。（d）RT-PCRによりRyR3 mRNA発現レベルを測定した。精製したWT骨髄好中球（PMN）又は脳組織からcDNAを単離した。cDNAの投入量が示されている。（e~g）Fluo-3/Fura Redを負荷した骨髄好中球においてFACSにより細胞内遊離カルシウムレベルを測定した。（e）好中球をジギトニンで透過性とした後、ルテニウムレッドの存在下（オレンジのライン）又は不在下（ブルーのライン）においてリアノジンで刺激した。（f）好中球をジギトニン中で透過性とした後、cADPR（ブルーのライン）、熱不活化cADPR（緑色のライン）又は8-Br-cADPR+cADPR（赤いライン）で刺激した。（g）好中球をタブシガーギン（ブルーのライン）又はタブシガーギン+8-Br-cADPR（赤のライン）で刺激した。パネルe~gの中の全てのデータは、少なくとも3回の独立した実験を行った結果を表す。

【図10】 図10は、CD38の触媒作用により生成したcADPRは、好中球における細胞内カルシウム放出、細胞外カルシウムの流入及び走化性を調節することを示す。（a~c）Fluo-3/Fura Redを負荷した骨髄好中球においてFACSにより細胞内遊離カルシウムレベルを測定した。（a）CD38KO（赤いライン）及びWT（ブルーのライン）の好中球を、カルシウムを含まない緩衝液の中でfMLP又はIL-8で刺激した。（b）CD38KO（赤いライン）及びWT（ブルーのライン）の好中球を、カルシウム含有緩衝液の中でfMLP又はIL-8で刺激した。（c）CD38KO（赤いライン）及びWT（ブルーのライン）の好中球を、カルシウム含有培地+8-Br-cADPRの中で予めインキュベートした後、fMLP又はIL-8で刺激した。パネルa~cの中の全てのデータは、少なくとも5回の独立した実験を行った結果を表す。（d）WT好中球を培地EGTA又は8-Br-cADPRと一緒に予めインキュベートした後、下側チャンバーの中にfMLP又はIL-8を含むトランスウェルの上側チャンバーの中に入れた。走化性勾配に反応して下側のチャンバーに移動した細胞を回収し、フローサイトメトリーにより数えた。図示した値は、各実験条件当たり3ウェルを用いて3回の別々の実験から得た平均±S.E.である。**P=0.008；Mann Whitney Rank Sum検定。

【図11】 図11は、NAD+類似体は、fMLPで活性化した好中球においてカルシウムの流入及び走化性を調節することを示す。（a）染料を負荷したWTマウス由来精製骨髄好中球を、培地（ブルーのライン）又は濃度の異なるN(8-Br-A)D+（赤いライン）の中で予めインキュベートした後、fMLPで刺激した。フローサイトメトリーにより細胞内カルシウムレベルの変化を測定した。データは、3回の独立した実験を行った結果を表す。（b~c）WT好中球（左側のパネル）及びCD38KO好中球（右側のパネル）を、培地（黒いバー）又はN(8-Br-A)D+（白いバー）と一緒に予めインキュベートした後、下側チャンバーの中にfMLP（パネルb）又はIL-8（パネルc）を含むトランスウェルの上側チャンバーの中に入れた。走化性勾配に反応して下側チャンバーに移動した細胞を回収し、フローサイトメトリーに

10

20

30

40

50

より数えた。図示した数値は、3ウェル/実験条件を用いて3回の別々の実験から得た平均±S.E.である。*P<0.001スチューデントt検定。

【図12】 図12A及び図12Bは、アレルギー性喘息のモデルにおける好中球及び好酸球の肺への集合は、CD38KOマウスにおいて損なわれていることを示す。WT C57BL/6マウスから得た未感作 (naive) CD4T細胞又はWT C57BL/6マウスから得たOVAで初回免疫刺激を行ったCD4 T細胞を、示されているようにWT C57/BLマウス又はCD38KO-C57BL/6マウスに移植した。次に受容マウスを連続7日間、OVA (10 µg) のPBS溶液の気管内点滴注入によりチャレンジした。一回目のチャレンジを行った後8日目に、Diff-Quick染色した細胞遠心分離調製物の顕微鏡検査 (倍率400×) により、肺洗浄における好中球 (A) 及び好酸球 (B) を数えた。

10

【図13】 図13は、マンソン住血吸虫SM38 cDNAとマンソン住血吸虫ESTとの比較結果を示す。「方法」に記載されるように、マンソン住血吸虫 cDNAライブラリーからSM38 cDNAを単離し、クローニングした。SM38のcDNAは、5'側非翻訳配列 (グレーのボックス)、開始メチオニン (下線部)、303アミノ酸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 (白いボックス)、停止コドン (下線部)、3'側非翻訳配列 (グレーのボックス)、及びポリアデニル化部位 (下線部) を含む。完全長cDNAを、公表されているマンソン住血吸虫EST配列と比較したところ、SM38配列の一部と同一である3つの別々のEST配列が見つかった。SM38 cDNAは、一般データベースには見られない421塩基対のユニークな配列 (70bpの5'側非翻訳配列及び351bpのオープンリーディングフレーム) を含む。

【図14】 図14は、SM38 cDNAの翻訳産物を示す。SM38 cDNAは全てのリーディングフレームにおいて翻訳され、303個のアミノ酸からなる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71位~73位のヌクレオチドに位置し、停止コドンは980~983位のヌクレオチドに見られる。

20

【図15】 図15は、SM38はアメフラシADP-リボシルシクラーゼ及びヒトCD38シクラーゼと相同であることを示す。SM38のタンパク質配列を、アメフラシADP-リボシルシクラーゼ (パートa) 及びヒトADP-リボシルシクラーゼCD38 (パートb) のタンパク質配列とアラインメントした。アメフラシタンパク質とSM38との間には21%の同一性、及びヒトCD38とSM38との間には23%の同一性という、高い相同性 (ボックスで囲まれた残基) が観察された。シクラーゼタンパク質ファミリーの全てのメンバーの中に存在する保存された10個のシステイン残基も、SM38中に存在する (影付きのボックス)。SM38ではまた、CD38の中に見られる2個の更なるシステイン (下線部) (アメフラシには見られない) が欠失している。しかし、SM38タンパク質は、CD38にもアメフラシシクラーゼにも見られないユニークな2個の更なるシステイン残基を含む (下線部)。最も重要なことに、CD38及びアメフラシ酵素について同定された活性部位触媒残基 (星印がついた残基) も、SM38の中に存在する。

30

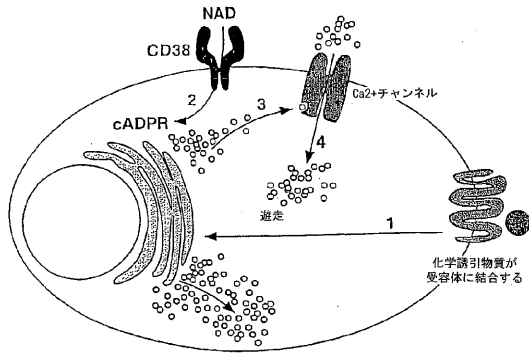
【図16】 図16は、SM38は可溶性タンパク質であることを示す。SM38タンパク質が、CD38のようなII型膜結合タンパク質であるか、アメフラシシクラーゼのような可溶性タンパク質であるか、他のシクラーゼファミリータンパク質のようなGPI結合型タンパク質 (GPI-linked protein) であるか、又は分泌タンパク質であるかを決定するために、SM38のタンパク質配列を調べた。保存された酵素ドメイン (図15を参照されたい) には影をつけてある。SM38は、該酵素ドメインの5'側にたった22個のアミノ酸しか含まない。これらの22個のアミノ酸は疎水性ではないので、該酵素ドメインの5'側にはリーダー配列を同定することができなかった。このことは、SM38が分泌タンパク質やGPI結合型タンパク質ではないことを示している。さらに、5'側膜貫通ドメインは同定されなかった。このことは、SM38がII型膜タンパク質ではないことを示している。従って、SM38はアメフラシシクラーゼのような可溶性細胞質タンパク質である可能性が最も高い。

40

【図17】 図17は、SM38の逆翻訳産物を示す。SM38タンパク質をコードする縮重DNA配列を同定するために、SM38の303アミノ酸コード領域を逆翻訳した。

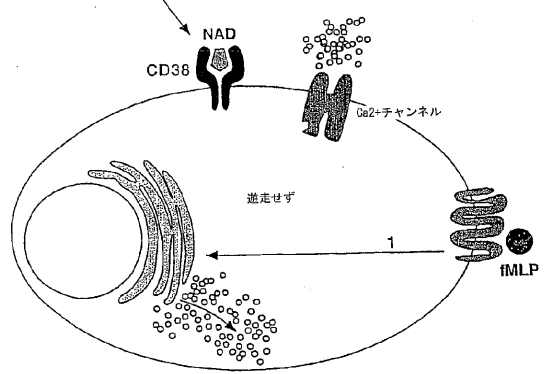
【図1】

化学誘引物質のシグナル伝達に対する正常な細胞応答



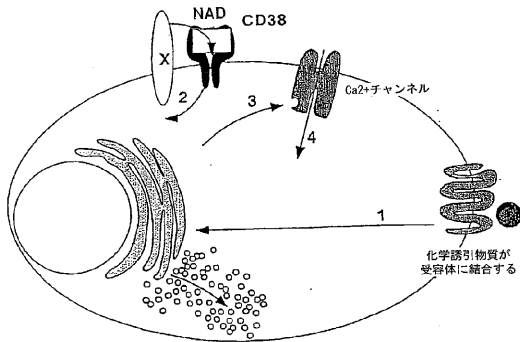
【図2】

CD38によるcADPR産生の阻害物質は、容量性Ca2+流入及び化学誘引物質により誘導される遊走を妨げる



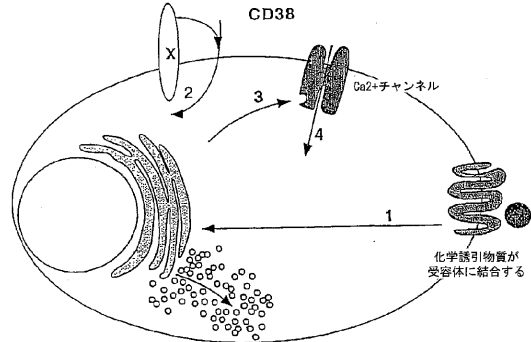
【図3】

CD38 酵素活性を調節するタンパク質 (スクリーニングは、これらのタンパク質を活性化又は不活化する化合物を同定する)



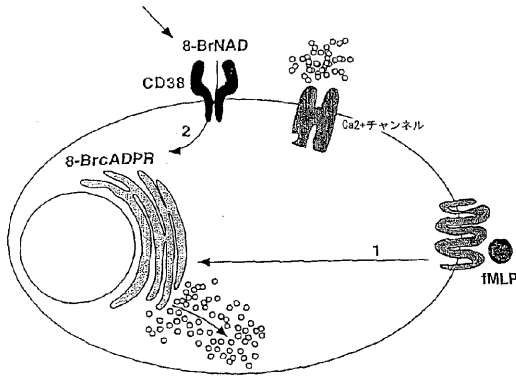
【図4】

CD38 の発現を調節するタンパク質 (スクリーニングは、これらのタンパク質を活性化又は不活化する化合物を同定する)



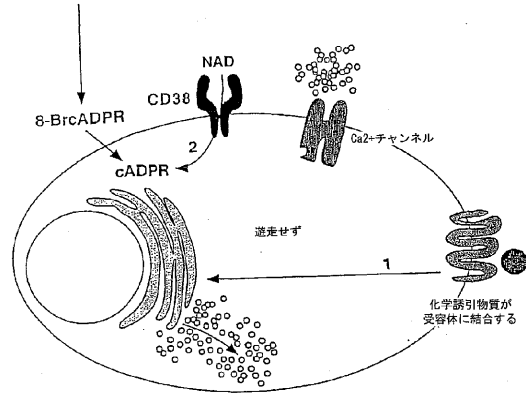
【 図 5 】

CD38 の代わりとなる基質は、
cADPR の阻害物質を産生して容量性 Ca²⁺放出を妨げ得る

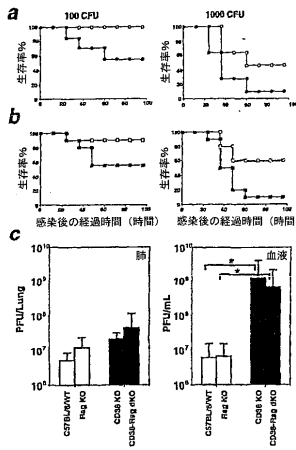


【 図 6 】

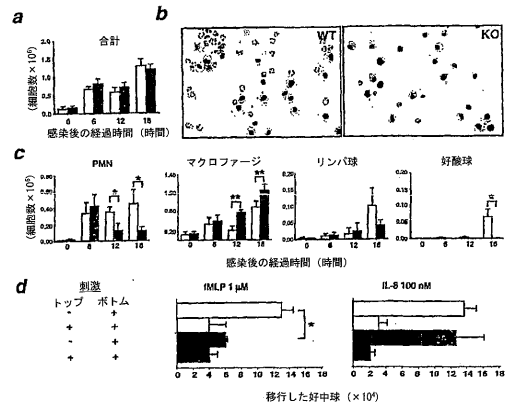
cADPR 結合の阻害物質は、容量性 Ca²⁺の流入を遮断する



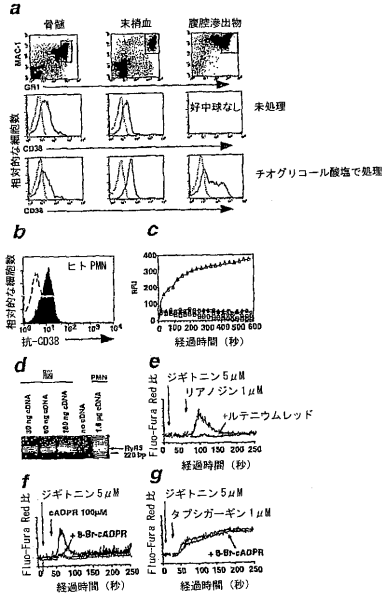
【 図 7 】



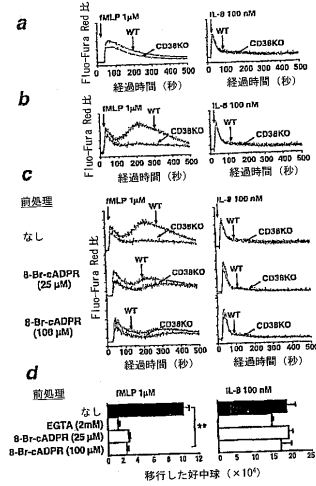
【 図 8 】



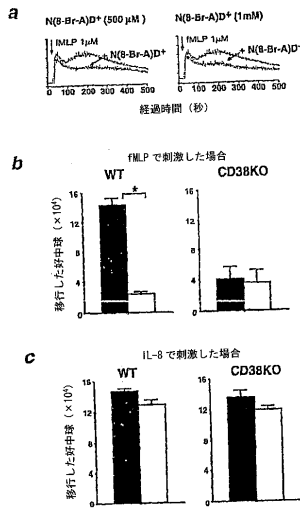
【図9】



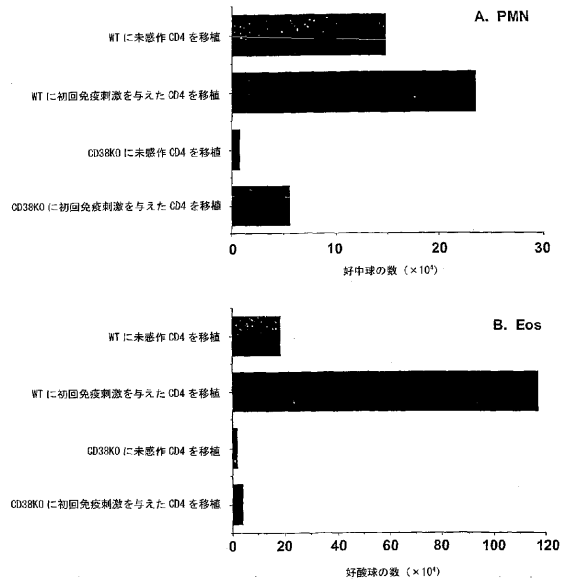
【図10】



【図11】



【図12】



【 1 3 】

コンセンサス	GGAAAGACG TAGACATATA TTGTTATATA GATTGTGCTA GTTATTTTTC	50
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	GGAAAGACG TAGACATATA TTGTTATATA GATTGTGCTA GTTATTTTTC	50
コンセンサス	ACAATCTTTT AATTCAATA ATGATGACG TAATATGTTT TCTTACTTIA	100
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	ACAATCTTTT AATTCAATA ATGATGACG TAATATGTTT TCTTACTTIA	100
コンセンサス	TCAAATATTT TTGCTTTTAA CTCTGCACAA CATCAAATTA ACTTACTTAG	150
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	TCAAATATTT TTGCTTTTAA CTCTGCACAA CATCAAATTA ACTTACTTAG	150
コンセンサス	TGAAATAGTA CAATCAGAT GTACTCAGTC GAAGTTGAA CATGGACCTA	200
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	TGAAATAGTA CAATCAGAT GTACTCAGTC GAAGTTGAA CATGGACCTA	200
コンセンサス	CTAATATTAAG TTGTATGAG ATCTGGGAT CATTTGAAAG CATTTACTT	250
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	CTAATATTAAG TTGTATGAG ATCTGGGAT CATTTGAAAG CATTTACTT	250
コンセンサス	TCAACTCATTA CTAATACAGC ATGCTGTATG AAATCAGGTT TATTCGATGA	300
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	TCAACTCATTA CTAATACAGC ATGCTGTATG AAATCAGGTT TATTCGATGA	300
コンセンサス	TTTTGTTTAT CAATTGTTTG AATTGGACA ACAACACAA CAGCGACACC	350
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	TTTTGTTTAT CAATTGTTTG AATTGGACA ACAACACAA CAGCGACACC	350
コンセンサス	ACACAATTC AAGGAAACA TACTTCCATT CTCAGTGTAT GAGCATCAT	400
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	ACACAATTC AAGGAAACA TACTTCCATT CTCAGTGTAT GAGCATCAT	400
コンセンサス	CTTGGAAATG GTAACAGCTC TGGAGATGT CTTTCTCTAG AAACATCAT	450
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	CTTGGAAATG GTAACAGCTC TGGAGATGT CTTTCTCTAG AAACATCAT	450

コンセンサス	TCCAGGATAT CTGTTTGATG AATTGAATG GTGTAATGGC AGTTTAACAG	500
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	TCCAGGATAT CTGTTTGATG AATTGAATG GTGTAATGGC AGTTTAACAG	700
コンセンサス	GCACACAAA ATACGGGACT GTATGTGGAT GCGATTATAA AAGTAATGTT	550
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	GCACACAAA ATACGGGACT GTATGTGGAT GCGATTATAA AAGTAATGTT	550
コンセンサス	GTTCATGCGT TCTGGCAAAG TCGTTGGCT GAGTATGCCA GGAGACATC	600
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	GTTCATGCGT TCTGGCAAAG TCGTTGGCT GAGTATGCCA GGAGACATC	600
コンセンサス	TGTTAAACAT TTTGCGTAC TGAATGGCT GGTCAAAGCT CCATTAAATG	650
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	TGTTAAACAT TTTGCGTAC TGAATGGCT GGTCAAAGCT CCATTAAATG	650
コンセンサス	AAATTAAMAC TTTTGGAAA ATAGAATCAT CATT-GTTAA AACCTCTCG	700
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	AAATTAAMAC TTTTGGAAA ATAGAATCAT CATT-GTTAA AACCTCTCG	700
コンセンサス	AAATTAAMAC TTTTGGAAA ATAGAATCAT CATT-GTTAA AACCTCTCG	729
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	AAATTAAMAC TTTTGGAAA ATAGAATCAT CATT-GTTAA AACCTCTCG	729
コンセンサス	ACTACACAAA TTACAGTGA AATTAGTCA TAGTTGGAA GATGTAATA	750
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	ACTACACAAA TTACAGTGA AATTAGTCA TAGTTGGAA GATGTAATA	750
コンセンサス	AGTACACAAA TTACAGTGA AATTAGTCA TAGTTGGAA GATGTAATA	773
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	AGTACACAAA TTACAGTGA AATTAGTCA TAGTTGGAA GATGTAATA	773
コンセンサス	ACCGACAAAC ATGTGAATCG TGGACTCTGC AAGAACTGCG AAACAAGCTG	800
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	ACCGACAAAC ATGTGAATCG TGGACTCTGC AAGAACTGCG AAACAAGCTG	800
コンセンサス	AACTCTGTAC ATATCTCTTT TCGTTGATT CAGCATCTTT TACAGTTCAG	850
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	AACTCTGTAC ATATCTCTTT TCGTTGATT CAGCATCTTT TACAGTTCAG	850
コンセンサス	ACATTATCAA TGCATTGAAA ATCCGCGCAA ACAACTATGT CAGTTTTGAG	900
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	ACATTATCAA TGCATTGAAA ATCCGCGCAA ACAACTATGT CAGTTTTGAG	900

コンセンサス	CTTCCAGCAG GTCAAACGTC GAGACATTAC TCATACTTTT TCCGCTAGTC	850
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	CTTCCAGCAG GTCAAACGTC GAGACATTAC TCATACTTTT TCCGCTAGTC	850
コンセンサス	ATTTGTTTAA CTTTTTATAC TTCCATGAAT TGAATAACT TTTCCAGACT	1000
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	ATTTGTTTAA CTTTTTATAC TTCCATGAAT TGAATAACT TTTCCAGACT	1000
コンセンサス	AAACTTTGAA CAGAGAAAGA GAACAATGAT AATAAGGAAA TAGGCCATT	1050
EST AW017229 comp	-----	
EST A1067047 comp	-----	
EST N20756 comp	-----	
SM38	AAACTTTGAA CAGAGAAAGA GAACAATGAT AATAAGGAAA TAGGCCATT	1050

【 1 4 】	GGAAAGACGTAGACATATATGTTATATAGATTTGTCAGTATTTTTTACAATCTTTTAACTAAATA	70
	E R T . T Y J V J I C S V I F H N L L I Q I	
	ATGATGAACGTAAATATGTTTCTTACTTATCAATATTTTGTCTTAACTCTGCAACACCAATAA	140
	M H N V J L F L T L S N I F V F N S A Q H O I	
	ACTTACTTAGTGAATAGTAACTCAGATGCTACTGAGTGAAGTGAACACTGAGCTACTAATATAAG	210
	N L L S E I V O S R C T Q W K V E H G A T N I S	
	TTGTAGTGAGATCTGGAATTCATTTGAAAGCTTTTACTTTCAACTCATACTAAATCAGCATGTTGTATG	280
	C S E I W N S F E S I L L S T H T K S A C V H	
	AAATCAGGTTTATCGATGATTTTGTATCAATTTTCAATTTGGAACAACAACAACAGCCACACC	350
	K S G L F D D F V Y Q L F L E O Q Q O R H	
	ACACAATTC AAGGAAACA TACTTCCATT CTCAGTGTAT GAGCATCAT	420
	H T I D T E D Y F H S Q V H N I R G M C K R L	
	TGGAGTATGCGTCTTCCAGGATATCTGTTGATGAATGGAATGCTGATGCTGATGCTG	490
	G V C R S L E T T F P G Y L F D E L N W C N G	
	AGTTTAAACAGCAACAATAACAGGACTGTATGTCATGTCGATTATAAAGTAATGTTTGTATGCTGCT	560
	S L T I G N T K Y G T V C G C D Y K S N V V H A	
	CTGCAAGTGTCTTCCGCTGAGTATCCAGGAGGATCTGGTAACTCTTTGCTGACTGAATGCTC	630
	F W O S A S A E Y A R R A S G N I F V V L N B S	
	GTCAACGCTCCATTTAAGAAAATAAAACTTTTGGAAAATAAGAATCACTGATGTTAAACATCTCGA	700
	V K A P F N E N K T F G K I E L P L L K H P R	
	GTACACAATTAACAGTGAATGATTCATAGTTTGAAGATGTAATAACGACAAACATGTAATGCT	770
	V Q L L T V K L V H S L E D V V N N R O T C E S	
	GGAGTCTGCAAGACTTCAACAAGCTGAACTCTGTACATATCTTTTTCGTTGCTGATGCTGCTTT	840
	W S L Q E L A N K L N S Y H I P F R C I D D P L	
	AGAGTTCACACATTAATGCAATTTGAAAATCTGGCAACACTATGTCAGTTTTGCTGCTGAGGAGS	910
	E F R H Y O C I E N P G K Q L C D F S A S T R	
	TCAAAGCTCAGACATTAATCATACTTTTCCGCTAGTCTTTGTTAACTTTTATACCTCCATGAAAT	980
	S N Y E T L L I L F P L V I C L T F Y T S H N	
	GAAATACCTTTTCAAGAACTAACTTTGAAACAGAAAGAGACAAATGATAAAGGAAATGACATTA	1050
	N N F S E L N F E O R K R T M I I K E . D I N	
	TGAAAAAATAAAAAAAAAAAAA 1073	
	E K K K K K K	

【 15 】

コンセンサス	M.....L.....S.....RC.....	50
アメラシc d38p	NSPIAVAVY QAVLTVRIIS PSEAFPTPE LQNFLEFCK EWEITIKVLI	50
SM38p	V--MVLFLF TLNIVFVNS AQKQI---NL LSEIVSSET QKQVEH---	41
コンセンサスC...W..F.....K..C...G...DF.....	100
アメラシc d38p	LPRKVSLSIA LNTVFKAFS F---DAPPL DLGSKYDFQ PAGOPLMVK	97
SM38p	-GATHISGEI FMSSEISLL STRVTSQAVM KSLGDFDFVY QLFLELDQKQ	90
コンセンサスLE.T.PGY.....L..C..	150
アメラシc d38p	VWFGSVYDE -MDF---ADGGRYII -TEVLEFV NLSNINHEQ	138
SM38p	CRHITITED YFHSQAMII RGVKRLVC RSLNIFPEV LFDLMDVHG	140
コンセンサスVC...D.....FW..A.S..YA..A.G.....GS.	200
アメラシc d38p	RKPKFQKQ VDPDFKCPV QARESLGTA SSVYHSREG DVTYVDSG	167
SM38p	SLTGATKVGST VJ--GCVKVS KVVAHNSA SAEVDRSSG NIFVVLNSG	166
コンセンサスK.K.F.L.P.L.....V.....H.L.....C...SL	250
アメラシc d38p	PKVAVRHS FVDFELVH TNRHTVWV YVLRGQKI I-ERFASLS	235
SM38p	-VKAFHNSK TSKKELPL KHRDGLTV KLVSLSDVW NROTDESGL	236
コンセンサス	...L.....F..C...P.....C...NP...CQ.....	300
アメラシc d38p	LLEWVYKAK KRFVQENP KSVLFLLEAD FFAAREOLA KRYVRIA--	282
SM38p	QELWAKNSV HIFREITDP LEFRHYGIE HGGKQLDPS ASTRSKVEL	285
コンセンサス	317
アメラシc d38p	282
SM38p	LILFLVIGL TTYTSM	303
コンセンサス	M.....L.....L.....Q.	50
ヒト 0308	WAKDFPVS QDPQCLRSR RAGLCVSI LVLILVAVLA VVPRKGGW	50
SM38p	M.....MNVILFLTLS NIFVNSAQ-	20
コンセンサスE.V..RC.....C...W..F.....S.H.K.	100
ヒト 0308	SQPTIKRPP ETVLARDKY TEHPPDRHV QDQVDAFK GAFIS--H	97
SM38p	--HMLNLS EIVSSQFQV -KVENGATHI SSSVWSEJE SILLSTHES	86
コンセンサスYQ.....S.....	150
ヒト 0308	PNTTEED-- --NPLMKL GTQVFNKI L---LWRI KDLAVGTQV	138
SM38p	ADWRSGLFD CFVGLFELE GQQQRHIT QTEQYFISQV MNIIRGCKR	116
コンセンサスLE.T...GVL.D.L..WC...T...Y...C.....N.V	200
ヒト 0308	QRMVTEPI LLELADMT PPFHFTSKI RYVS-PPWR KDL-SMIPV	185
SM38p	LGVSSLEPI FFDL FDELW KQSSLTGHT KYVYSG-- --DVKSNV	161
コンセンサス	..PR...S...A..A.....V.LIGS...F..M.TFG...E...L...V	250
ヒト 0308	SVKXKTSRR FRAFDVAV VALLGRSKI FDKNSTFSS VNKILOPKI	235
SM38p	HAEVGSASAE VDRQSNIF VVLLGSKAP FNEKNTSKI ELPLQIPRL	211
コンセンサス	Q.L.....H.....R..C.....EL.....I.F..C.....	300
ヒト 0308	DTLEAVHIG GRE-DSKRLQ QDPTIKLES IISKRNIPS QNIVRPNK	284
SM38p	QQLTVWVMS LEDVNRGTHI ESLSLQJAN KLVSHVPPR QIDDPLEFRH	251
コンセンサス	..QC..NP...C.....TS..	342
ヒト 0308	LCEVWREDS SE-----TS EI	300
SM38p	VQIPLKQK LQFSASTRS NVETLLILFP LVICLTFYTS NN	303

【 16 】

MMNVILFLTL SNIFVNSAQ HQINLLSEIV QSRCTQWKVE HGATNISCSE	50
IWNSFESILE STHTKSACVM KSLGDFDFVY QLFLEEQQQ QRHHTIQTEQ	100
YFHSQVMNII RGMCKRLGVC RSLFTFPGY LFDLWNCWG SLTGNTKYGT	150
VCGDYKSNV VHAFWQSASA EYARRASGNI FVVLNGSVKA PFENKTFGK	200
I.LPLKHPR VOQLTVKLVH SLEDVNRQT CESWSLQELA NKLSVHIFP	250
RCIDDPLEFR HYQCIENPGK QLCQFSASTR NVETLLILF PLVICLTFYI	300
SMN-	303

【 17 】

ATGATGAAYG TNATHYTNTT YYTNACNYTN WSNAAAYATH TYGTNTTYAA	50
YWSNGNCAR CAYCARATHA AYYTNYTNWS NGARATHGTN CARWSNMGNT	100
GYACNCARTG GAARGTNGAR CAYGGNGCNA CNAAYATHWS NTGYWSNGAR	150
ATHTGGAAAYW SNTTYGARWS NATHYTNYTN WSNACNCAYA CNAARWSNGC	200
NTGYGTNATG AARWSNGNAY TINTTYGAYGA YTYGTNTAY CARYTINTTYG	250
ARYTNGARCA RCARCARCAR CARMGNCAYC AYACNATHCA RACNGARCAR	300
TAYTTYCAYW SMCARGTNTAT GAAYATHATH MGNNGNATGT GYAARMGNVT	350
NGNGTNTGY MGNWSNYTNG ARACNACNTT YCCNGGNTAY YTNTTYGAYG	400
ARYTNGARCA RCARCARCAR CARMGNCAYC AYACNATHCA RACNGARCAR	450
NTGYGTNATG AARWSNGNAY TINTTYGAYGA YTYGTNTAY CARYTINTTYG	500
ARYTNGARCA RCARCARCAR CARMGNCAYC AYACNATHCA RACNGARCAR	550
TAYTTYCAYW SMCARGTNTAT GAAYATHATH MGNNGNATGT GYAARMGNVT	600
NGNGTNTGY MGNWSNYTNG ARACNACNTT YCCNGGNTAY YTNTTYGAYG	650
ARYTNGARCA RCARCARCAR CARMGNCAYC AYACNATHCA RACNGARCAR	700
NTGYGTNATG AARWSNGNAY TINTTYGAYGA YTYGTNTAY CARYTINTTYG	750
ARYTNGARCA RCARCARCAR CARMGNCAYC AYACNATHCA RACNGARCAR	800
TAYTTYCAYW SMCARGTNTAT GAAYATHATH MGNNGNATGT GYAARMGNVT	850
NGNGTNTGY MGNWSNYTNG ARACNACNTT YCCNGGNTAY YTNTTYGAYG	900
ARYTNGARCA RCARCARCAR CARMGNCAYC AYACNATHCA RACNGARCAR	950
NTGYGTNATG AARWSNGNAY TINTTYGAYGA YTYGTNTAY CARYTINTTYG	1000

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 N	9/00	(2006.01)	C 1 2 N	9/00	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/25	(2006.01)	C 1 2 Q	1/25	

- (72)発明者 ランド, フランセス, イー.
 アメリカ合衆国 1 2 9 3 8 ニューヨーク州, サラナク レイク, アルゴンキン アヴェニュー
 1 0 0, ピー.オー.ボックス 5 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 3 8 ニューヨーク州, サラナク レイク, アルゴンキン アヴェニュー
 1 0 0, ピー.オー.ボックス 5 9
- (72)発明者 パーティダ - サンシェズ, サンティアゴ
 アメリカ合衆国 1 2 9 3 8 ニューヨーク州, サラナク レイク, アルゴンキン アヴェニュー
 1 0 0, ピー.オー.ボックス 5 9

審査官 田中 公子

- (56)参考文献 特開昭63-039888(JP, A)
 J. Immunol., 1990年, Vol.144, No.7, p.2811-2815
 Biol.Chem., 1999年, Vol.380, p.785-793
 J. Immunol., 1998年, Vol.169, p.395-402

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09
 C07K 16/40
 C12N 1/15
 C12N 1/19
 C12N 1/21
 C12N 5/10
 C12N 9/00
 C12Q 1/02
 C12Q 1/25
 BIOSIS/WPI(DIALOG)
 PubMed
 Science Direct
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 SwissProt/PIR/GeneSeq
 JSTPlus(JDreamII)

专利名称(译)	CD38调节的趋化性		
公开(公告)号	JP4139214B2	公开(公告)日	2008-08-27
申请号	JP2002535531	申请日	2001-10-17
[标]申请(专利权)人(译)	Toryu杜墨研究所		
申请(专利权)人(译)	Toryudeyu研究所墨水.		
当前申请(专利权)人(译)	Toryudeyu研究所墨水.		
[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	C12N15/09 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/00 C12Q1/02 C12Q1/25 G01N33/50 C07K14/435 C12N9/24 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/573		
CPC分类号	A61P3/10 A61P9/10 A61P11/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P33/00 A61P37/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/4354 C12N9/2497 C12Y302/02005		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12N9/00 C12Q1/02 C12Q1/25		
审查员(译)	田中 公子		
优先权	60/241065 2000-10-17 US		
其他公开文献	JP2004518414A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及调节表达CD38的细胞的迁移活性以治疗疾病的方法，所述疾病包括但不限于炎症，局部缺血，哮喘，自身免疫疾病，糖尿病，关节炎，过敏，病原生物感染和移植排斥。这些细胞包括例如嗜中性粒细胞，淋巴细胞，嗜酸性粒细胞，巨噬细胞和树突细胞。本发明还涉及设计用于鉴定调节CD38的ADP-核糖基环化酶活性的化合物的药物筛选试验，以及这些化合物在治疗涉及CD38调节的细胞迁移的疾病中的用途。本发明基于以下发现：趋化性需要CD38 ADP-核糖基环化酶活性。此外，本发明涉及鉴定调节曼氏血吸虫CD38同源物的酶活性的化合物的方法，并使用这些化合物治疗由蠕虫感染引起的病理性疾病。这是基于发现蠕虫如曼氏血吸虫表达CD38同源物。

CD38の発現を調節するタンパク質（スクリーニングは、これらのタンパク質を活性化又は不活化する化合物を同定する）

