

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-41195

(P2004-41195A)

(43) 公開日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 5
A 6 1 P 3/14	A 6 1 P 3/14	4 C O 8 4
審査請求 有 請求項の数 62 O L (全 83 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-169309 (P2003-169309)	(71) 出願人	000001856
(22) 出願日	平成15年6月13日 (2003.6.13)		三共株式会社
(62) 分割の表示	特願平10-543741の分割		東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号
原出願日	平成10年4月15日 (1998.4.15)	(74) 代理人	100090941
(31) 優先権主張番号	特願平9-97808		弁理士 藤野 清也
(32) 優先日	平成9年4月15日 (1997.4.15)	(74) 代理人	100113837
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 吉見 京子
(31) 優先権主張番号	特願平9-151434	(74) 代理人	100076244
(32) 優先日	平成9年6月9日 (1997.6.9)		弁理士 藤野 清規
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	山口 京二
(31) 優先権主張番号	特願平9-217897		埼玉県大宮市島町702-12 ライオン
(32) 優先日	平成9年8月12日 (1997.8.12)		ズガーデン 東大宮1-524
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	保田 尚孝
(31) 優先権主張番号	特願平9-224803		栃木県河内郡南河内町緑2-3293-4
(32) 優先日	平成9年8月21日 (1997.8.21)		6
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規蛋白質及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】新規蛋白質及びその製造法

【解決手段】破骨細胞形成抑制因子 (OCIF) に特異的に結合し、高い親和性を有する新規蛋白質。

骨吸収促進因子存在下で培養した骨芽様細胞膜あるいは骨髄由来のストローマ細胞から細胞の膜画分を調製、界面活性剤で膜蛋白質を可溶化しOCIF固定化アフニティカラムを用いて精製することによって得ることができる。

この蛋白質を用い生理活性物質をスクリーニングしたあるいはこの蛋白質に対する抗体を得ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次の物理化学的性質及び生物活性を有する新規蛋白質。

a. 親和性：破骨細胞形成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor; OCIF) に特異的に結合し、高い親和性 (細胞膜上での解離定数、 K_d 値が 10^{-9} M 以下) を有する。

b. 分子量：非還元条件下における SDS - ポリアクリルアミド電気泳動による分子量測定で、約 30,000 - 40,000 又は約 $40,000 \pm 4,000$ の分子量を示し、モノマータイプの OCIF とクロスリンクさせた場合の見かけ上の分子量は、約 90,000 - 110,000 を示す。

c. 生物活性：活性型ビタミン D₃ 及び副甲状腺ホルモン (PTH) などの、骨吸収促進因子存在下でのマウス骨芽細胞様ストローマ細胞とマウス脾臓細胞共培養において、破骨細胞の分化、成熟を支持又は促進する活性を有する。

10

【請求項 2】

骨吸収促進因子存在下で培養した骨芽様細胞株あるいは骨髄由来のストローマ細胞から細胞の膜画分を調製し、界面活性剤で膜蛋白質を可溶化し、OCIF 固定化アフィニティカラムを用いて精製することを特徴とする、請求項 1 記載の蛋白質の製造方法。

【請求項 3】

請求項 1 記載の蛋白質を用い、この蛋白質に特異的に結合し、その蛋白質の生物活性を阻害あるいは修飾する物質をスクリーニングする方法。

20

【請求項 4】

請求項 1 記載の蛋白質を用い、この蛋白質に特異的に結合し、その蛋白質の生物活性を伝達する物質をスクリーニングする方法。

【請求項 5】

請求項 3 又は 4 記載のスクリーニング方法により得られた物質を含有する医薬組成物。

【請求項 6】

請求項 1 記載の蛋白質に対する抗体。

【請求項 7】

配列表配列番号 1 記載のアミノ酸配列をコードする DNA。

【請求項 8】

配列表配列番号 2 記載の塩基配列からなる DNA。

30

【請求項 9】

配列表配列番号 2 記載の塩基配列の 1 又はそれ以上の塩基が欠失、置換、付加若しくは挿入されており、且つ破骨細胞抑制因子に特異的に結合し、その活性を抑制する性質を有する蛋白質をコードする DNA。

【請求項 10】

請求項 7 又は 9 のいずれかに記載の DNA と比較的温和な条件下でハイブリダイズする DNA。

【請求項 11】

請求項 7 ~ 10 のいずれかに記載の DNA と 70 % 以上の相同性を有する DNA。

40

【請求項 12】

請求項 7 ~ 11 のいずれかに記載の DNA を遺伝子工学的に発現することにより得られる蛋白質。

【請求項 13】

破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する活性を有する請求項 12 記載の蛋白質。

【請求項 14】

配列表配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。

【請求項 15】

請求項 7 ~ 11 のいずれかに記載の DNA を用いて遺伝子工学的に産生させることを特徴とする蛋白質の製造法。

50

【請求項 16】

請求項 7 ~ 11 のいずれかに記載の DNA によりコードされる蛋白質の発現を調節する物質のスクリーニング方法。

【請求項 17】

請求項 7 ~ 11 のいずれかに記載の DNA によりコードされる蛋白質に特異的に結合し、その生物活性を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法。

【請求項 18】

請求項 7 ~ 11 のいずれかに記載の DNA によりコードされる蛋白質に特異的に結合し、その結合を通して該蛋白質の生物活性を伝達する物質のスクリーニング方法。

【請求項 19】

請求項 16 ~ 18 のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られた物質を含有する医薬組成物。

10

【請求項 20】

配列表配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 76 ~ 316 番目のアミノ酸配列を含む蛋白質又はその蛋白質の断片、類縁体、あるいは変異体をコードする DNA。

【請求項 21】

配列表配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 72 ~ 316 番目のアミノ酸配列を含む蛋白質又はその蛋白質の断片、類縁体、あるいは変異体をコードする DNA。

【請求項 22】

配列表配列番号 1 記載のアミノ酸配列を含む蛋白質又はその蛋白質の断片、類縁体、あるいは変異体をコードする DNA。

20

【請求項 23】

破骨細胞形成抑制因子 OCIF に特異的に結合し、その生物活性を抑制する作用を有する蛋白質をコードする、請求項 20 ~ 22 のいずれかに記載の DNA。

【請求項 24】

配列表配列番号 2 の塩基配列を有する、請求項 20 ~ 23 のいずれかに記載の DNA。

【請求項 25】

請求項 20 ~ 24 のいずれかに記載の DNA と比較的温和な条件下でハイブリダイズする DNA。

【請求項 26】

請求項 20 ~ 25 のいずれかに記載の DNA と 70 % 以上の相同性を有する DNA。

30

【請求項 27】

請求項 20 ~ 26 のいずれかに記載の DNA を遺伝子工学的に発現することにより得られるポリペプチドを含む蛋白質。

【請求項 28】

破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する活性を有することを特徴とする、請求項 27 記載の蛋白質。

【請求項 29】

配列表配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質又はその蛋白質の断片、類縁体、あるいは変異体である、請求項 27 又は 28 に記載の蛋白質。

40

【請求項 30】

請求項 20 ~ 26 のいずれかに記載の DNA を用いて遺伝子工学的に生産させることを特徴とする蛋白質の製造方法。

【請求項 31】

請求項 20 ~ 26 のいずれかに記載の DNA によりコードされる蛋白質の発現を調節する物質のスクリーニング方法。

【請求項 32】

請求項 20 ~ 26 のいずれかに記載の DNA によりコードされる蛋白質に特異的に結合し、その生物活性を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法。

【請求項 33】

50

請求項 20 ~ 26 のいずれかに記載の DNA によりコードされる蛋白質に特異的に結合し、その結合を通して該蛋白質の生物活性を伝達する物質のスクリーニング方法。

【請求項 34】

請求項 31 ~ 33 のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られた物質を含有する医薬組成物。

【請求項 35】

配列表配列番号 11 記載のアミノ酸配列を含む蛋白質又はその蛋白質の断片、類縁体、あるいは変異体をコードする DNA。

【請求項 36】

破骨細胞形成抑制因子 OCIF に特異的に結合し、その活性を抑制する活性を有する蛋白質をコードする、請求項 35 に記載の DNA。 10

【請求項 37】

配列表配列番号 12 記載の塩基配列を有する、請求項 35 又は 36 記載の DNA。

【請求項 38】

請求項 35 ~ 37 のいずれかに記載の DNA と比較的温和な条件下でハイブリダイズする DNA。

【請求項 39】

請求項 35 ~ 38 のいずれかに記載の DNA と 70 % 以上の相同性を有する DNA。

【請求項 40】

請求項 35 ~ 39 のいずれかに記載の DNA を遺伝子工学的に発現することにより得られるポリペプチドを含む蛋白質。 20

【請求項 41】

破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する活性を有する請求項 40 記載の蛋白質。

【請求項 42】

配列表配列番号 11 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質又はその蛋白質の断片、類縁体、あるいは変異体である、請求項 40 又は 41 に記載の蛋白質。

【請求項 43】

請求項 35 ~ 39 のいずれかに記載の DNA を用いて遺伝子工学的に生産させることを特徴とする蛋白質の製造方法。

【請求項 44】

請求項 35 ~ 39 のいずれかに記載の DNA によりコードされる蛋白質の発現を調節する物質のスクリーニング方法。 30

【請求項 45】

請求項 35 ~ 39 のいずれかに記載の DNA によりコードされる蛋白質に特異的に結合し、その生物活性を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法。

【請求項 46】

請求項 35 ~ 39 のいずれかに記載の DNA によりコードされる蛋白質に特異的に結合し、その結合を通して該蛋白質の生物活性を伝達する物質のスクリーニング方法。

【請求項 47】

請求項 44 ~ 46 のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られた物質を含有する医薬組成物。 40

【請求項 48】

破骨細胞形成抑制因子 (OCIF) に特異的に結合する膜結合蛋白質分子 (OBM) 及び / 又はその膜結合部位を欠損した可溶性 OBM (sOBM) を認識する抗体。

【請求項 49】

マウス OBM 及び / 又はマウス sOBM を認識することを特徴とする、請求項 48 記載の抗体。

【請求項 50】

ヒト OBM 及び / 又はヒト sOBM を認識することを特徴とする、請求項 48 記載の抗体。

【請求項 5 1】

ポリクローナル抗体である、請求項 4 8 記載の抗体。

【請求項 5 2】

モノクローナル抗体である、請求項 4 8 記載の抗体。

【請求項 5 3】

ヒト O B M 及び / 又はヒト s O B M 及び / 又はマウス O B M 及び / 又はマウス s O B M に 交差性を有する請求項 5 2 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5 4】

次の性質を有する、請求項 5 2 記載のモノクローナル抗体。

a) 分子量 : 約 1 5 0 , 0 0 0

b) サブクラス : I g G ₁ 又は I g G ₂

c) ライトチェーン : κ 鎖

10

【請求項 5 5】

マウス又はヒトの O B M 又は s O B M で動物を免疫し、その動物の血液を精製すること
を特徴とする、ポリクローナル抗体の製造方法。

【請求項 5 6】

請求項 5 3 又は 5 2 ~ 5 4 記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 5 7】

受託番号 F E R M B P - 6 2 6 4 , F E R M B P - 6 2 6 5 又は F E R M B P - 6 2 6 6 である、ハイブリドーマ。

20

【請求項 5 8】

請求項 5 6 又は 5 7 記載のハイブリドーマを培養し、培養液中にモノクローナル抗体を産
生させ、これをその培養液から精製、回収することを特徴とする、モノクローナル抗体の
製造方法。

【請求項 5 9】

請求項 4 8 ~ 5 4 のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする、O B M の測定方法
。

【請求項 6 0】

請求項 4 8 ~ 5 4 のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする、s O B M の測定方
法。

30

【請求項 6 1】

請求項 4 8 ~ 5 4 のいずれかに記載の抗体を固相抗体及び酵素標識抗体として用いること
を特徴とする、O B M 又は s O B M の測定方法。

【請求項 6 2】

請求項 4 8 ~ 5 4 のいずれかに記載の抗体を有効成分とする医薬。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、破骨細胞形成抑制因子 (o s t e o c l a s t o g e n e s i s i n h i b i t o r y f a c t o r ; 以下、O C I F ということがある) に結合する新規な蛋白質 40
(O C I F 結合分子 ; 以下 O B M ということがある) 、及びその製造方法に関する。

また本発明は、該蛋白質をコードする D N A 、この D N A によりコードされるアミノ酸配
列を有する蛋白質、該蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法、及び該蛋白質を含有する医
薬組成物に関する。

さらに本発明は、該蛋白質及びその D N A を用いた、該蛋白質の発現を調節する物質、該蛋
白質の生物活性を阻害又は修飾する物質、あるいは該蛋白質と結合しその作用を伝達する
レセプターのスクリーニング方法、これにより得られた物質、及び得られた物質を含有す
る医薬組成物に関する。

またさらに本発明は、該蛋白質に対する抗体、その製造方法、それを用いた該蛋白質の測
定方法、及び抗体を含有する医薬に関する。

50

【 0 0 0 2 】

【 従来技術 】

骨代謝は、骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞の、総合された活性に依存している。骨代謝異常は、骨形成と骨吸収の均衡が崩れることにより発生すると考えられている。骨代謝の異常を伴う疾患としては、骨粗鬆症、高カルシウム血症、骨ページェット病、腎性骨異常栄養症、慢性関節リウマチ、及び変形性関節炎などが知られている。これらの骨代謝異常疾患の代表として骨粗鬆症が挙げられる。この疾患は、破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成を上まわることにより発生する疾患であり、骨の石灰質と骨基質とが等しく減少することを特徴とする。この疾患の発生メカニズムについては未だ完全には解明されていないが、骨の疼痛が発生し、骨の脆弱化による骨折が起こる疾患である。高齢人口の増加に伴い、骨折による寝たきり老人の原因となり、この疾患は社会問題にもなっており、その治療薬の開発が急務となっている。このような骨代謝異常による骨量減少症は、骨形成の促進、骨吸収の抑制、あるいはこれらのバランスの改善により治療できることが期待される。即ち、骨形成は、骨形成を担当する骨芽細胞の増殖、分化、機能を促進すること、破骨細胞前駆細胞からの破骨細胞への分化、成熟を抑制すること、あるいは破骨細胞の骨吸収活性などの機能を抑制することにより促進されると期待される。このような活性を有するホルモン、低分子物質、あるいは生理活性蛋白質について、現在精力的な探索及び開発研究が進められている。

10

【 0 0 0 3 】

すでに、骨に関わる疾患の治療及び治療期間の短縮を図る医薬品として、カルシトニン製剤、活性型ビタミンD₃製剤、エストラジオールを含有するホルモン製剤、イブリフラボン、ビタミンK₂、ビスフォスフォネート系化合物などがあり、さらに、より副作用が少なく、有効性に優れた治療薬の開発を目指して活性型ビタミンD₃誘導体、エストラジオール誘導体、第2世代または第3世代のビスフォスフォネート系化合物などの臨床試験が実施されている。

20

【 0 0 0 4 】

しかし、これらの薬剤を用いた治療法は、その効果並びに治療結果において必ずしも満足出来るものではなく、より安全かつ有効性の高い新しい治療薬の開発が期待されている。また、骨代謝疾患の治療に使用されている薬剤の中には、その副作用により治療可能な疾患が限定されているものもある。更に現在、骨粗鬆症などの骨代謝疾患の治療には、複数の薬剤を同時に使用する多剤併用療法が主流になってきている。このような観点から、従来の医薬品とは異なった作用メカニズムを持ち、しかもより有効性が高くかつ副作用の少ない医薬品の開発が期待されている。

30

【 0 0 0 5 】

前述したように、骨代謝を担当する細胞は骨芽細胞と破骨細胞である。これらの細胞は互いに密接に相互作用していることが知られており、この現象はカップリングと呼ばれている。即ち、破骨細胞の分化、成熟には骨芽細胞様ストローマ細胞が分泌するサイトカイン類、インターロイキン1 (IL - 1)、3 (IL - 3)、6 (IL - 6)、11 (IL - 11)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM - CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M - CSF)、インターフェロンガンマー (IFN - γ)、腫瘍壊死因子α (TNF - α)、トランスフォーミング増殖因子β (TGF - β) などが促進的又は抑制的に作用することが報告されている (非特許文献1; 非特許文献2; 非特許文献3; 非特許文献4)。骨芽細胞様ストローマ細胞は、未熟な破骨細胞前駆細胞や破骨細胞との細胞間接着により、それぞれ破骨細胞の分化、成熟や成熟破骨細胞による骨吸収などの機能発現に重要な役割を演じていることが知られている。この細胞間接着による破骨細胞形成に関与する因子として、骨芽細胞様ストローマ細胞の膜上に発現される破骨細胞分化誘導因子 (osteoclast differentiation factor, ODF) (非特許文献5; 非特許文献6) という分子が仮想されており、この仮説によれば破骨細胞の前駆細胞にODFのレセプターが存在している。

40

しかし、ODF及びこのレセプターとも未だ精製及び同定されておらず、それらの性質、

50

作用機作、及び構造に関する報告もない。このように、破骨細胞の分化、成熟のメカニズムは未だ十分に解明されておらず、このメカニズムの解明は基礎医学領域に多大な貢献をするだけでなく、新しい作用メカニズムに基づく新規な骨代謝異常症治療薬の開発にも貢献することが期待される。

【0006】

本発明者らは、このような状況に鑑み鋭意探索を進めた結果、ヒト胎児肺線維芽細胞、IMR-90(ATCC CCL186)の培養液中に破骨細胞形成抑制因子(osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF)を見出した(特許文献1)。

さらに、本発明者らは、OCIFのDNAクローニング、動物細胞を用いた遺伝子組み換え型OCIFの生産、遺伝子組み換え型OCIFによるin vivo薬効(骨代謝改善効果)の確認などに成功した。OCIFは、従来の医薬品よりも有効性が高くかつ副作用が少ない、骨代謝異常に関連する疾患の予防及び治療剤として期待されている。

【0007】

【特許文献1】WO96/26217号

【非特許文献1】Raisz: Disorders of Bone and Mineral Metabolism, 287-311, 1992

【非特許文献2】Suda et al.: Principles of Bone Biology, 87-102, 1996

【非特許文献3】Suda et al.: Endocrine Reviews, 4, 266-270, 1955

【非特許文献4】Lacey et al.: Endocrinology, 186, 2369-2376, 1995

【非特許文献5】Suda et al.: Endocrine Rev. 13, 66-80, 1992

【非特許文献6】Suda et al.: Bone 17, 87S-91S, 1995

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは破骨細胞形成抑制因子OCIFを用い、その結合蛋白質の存在を鋭意探索した結果、OCIF結合蛋白質が活性型ビタミンD₃や副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone, PTH)などの骨吸収促進因子の存在下で培養した骨芽細胞様ストローマ細胞上に特異的に発現することを見出した。さらに、このOCIF結合蛋白質の性質及びその生理的機能を調べたところ、該蛋白質は未熟な破骨細胞前駆細胞からの破骨細胞への分化、成熟に関与する、いわゆる破骨細胞分化、成熟を支持又は促進する因子としての生物活性を有していることを見出し、本発明を成すに至った。さらに、本発明蛋白質につき研究を重ねた結果、この新規な膜蛋白質は骨芽細胞様ストローマ細胞と脾臓細胞との共培養系において、骨芽細胞様ストローマ細胞による未熟な破骨細胞前駆細胞からの破骨細胞への分化、成熟を担う重要な蛋白質であることを明らかにした。本発明における破骨細胞の分化、成熟を支持又は促進する因子としての蛋白質の同定及びその単離精製の成功により、本発明蛋白質を利用した、生体の骨代謝機構に基づいた新規な骨代謝異常症治療薬のスクリーニングを可能にした。

【0009】

従って本発明は、破骨細胞形成抑制因子OCIFに結合する新規な蛋白質(OCIF結合分子; OBM)、及びその製造方法を提供することを課題とする。また本発明は、該蛋白質をコードするDNA、このDNAによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、該蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法、及び該蛋白質を含有する医薬組成物を提供することを課題とする。また、該蛋白質を含有する骨代謝異常症予防及び/又は治療剤を提供することを課題とする。さらに本発明は、該蛋白質を及びそのDNAを用いた、該蛋白質の発現を調節する物質、該蛋白質の生物活性を阻害又は修飾する物質、あるいは該蛋白質と

結合しその作用を伝達するレセプターのスクリーニング方法、これにより得られた物質、及び得られた物質を含有する医薬組成物を提供することを課題とする。またさらに本発明は、該蛋白質に対する抗体、その製造方法、それを用いた該蛋白質の測定方法、及び抗体を含有する医薬を提供することを課題とする。

【0010】

本発明蛋白質は、以下の物理化学的性質及び生物活性を示す。

即ち、

a. 親和性：破骨細胞形成抑制因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor; OCIF) に特異的に結合し、高い親和性 (細胞膜上での解離定数、 K_d 値が 10^{-9} M 以下) を有する。

10

b. 分子量：非還元条件下における SDS—ポリアクリルアミド電気泳動による分子量測定で、約 30,000 - 40,000 の分子量を示し、又、モノマータイプの OCIF とクロスリンクさせた場合の見かけ上の分子量は、約 90,000 - 110,000 を示す。

c. 生物活性：活性型ビタミン D_3 及び副甲状腺ホルモン (PTH) などの、骨吸収促進因子の存在下でのマウス骨芽細胞様ストローマ細胞とマウス脾臓細胞共培養において、破骨細胞の分化、成熟を支持又は促進する活性を有する。

破骨細胞形成の代表的なインビトロ培養系として、活性型ビタミン D_3 あるいは PTH 存在下でのマウス由来骨芽細胞様ストローマ細胞株・ST2 とマウス脾臓細胞との共培養系がよく知られている。本発明蛋白質の発現細胞は活性型ビタミン D_3 存在あるいは非存在下でそれぞれ培養したマウス骨芽細胞様ストローマ細胞あるいはマウス脾臓細胞への OCIF の結合性を試験することにより調べることができる。

20

【0011】

本発明蛋白質は、活性型ビタミン D_3 や PTH のような骨吸収促進因子の存在下で培養した骨芽細胞様ストローマ細胞上に特異的に誘導される蛋白質として特定される。又、活性型ビタミン D_3 存在下の上記共培養系に OCIF を添加することにより 1 から 40 ng/ml の範囲で用量依存的に破骨細胞の形成が阻害されること、活性型ビタミン D_3 存在下で ST2 細胞上に誘導される本発明蛋白質の発現の経時変化と破骨細胞形成の経時変化とがよく相関すること、又、ST2 細胞に発現される本発明蛋白質の多寡と ST2 細胞による破骨細胞形成支持能の強弱が一致し、ST2 細胞上の本発明蛋白質に OCIF が結合することにより破骨細胞形成が完全に抑制されることから、本発明蛋白質は破骨細胞の分化、成熟を支持又は促進する生物活性 (作用) を有する蛋白質として特定される。

30

【0012】

本発明蛋白質の OCIF に対する親和性は、OCIF を標識し、その標識体の動物細胞膜表面への結合性を試験することによって評価することができる。OCIF は、放射性同位元素による標識や蛍光標識などのような通常の蛋白質標識法を用いることによって標識することができる。例えば、OCIF の放射性同位元素による標識としてはチロシン残基の 125 I 標識が挙げられ、ヨードジェン法、クロラミン T 法、及び酵素法などの標識法を利用することができる。このようにして得た標識 OCIF を用いた、OCIF の動物細胞膜表面への結合性試験は常法に従い実施でき、又、結合性試験に用いる培地に標識 OCIF の 100 倍から 400 倍濃度未標識 OCIF を添加することにより、非特異的な結合量を測定することができる。OCIF の特異的結合量は、標識 OCIF の総結合量から非特異的な結合量を差し引くことにより算出される。細胞膜上に発現された本発明蛋白質の親和性は標識 OCIF の添加量を変えて試験を行い、特異的結合量を Scatchard plot で解析することによって評価される。このようにして求められた、本発明蛋白質の OCIF に対する親和力は約 100 - 500 pM であり、本発明蛋白質はこのように破骨細胞形成抑制因子 OCIF に高い親和性 (細胞膜上での解離定数、 K_d 値が 10^{-9} M 以下) を有する蛋白質として特定される。OBM の分子量は、ゲル濾過クロマトグラフィーや SDS - PAGE 等を用いて測定される。より正確に分子量を測定するためには SDS - PAGE を用いるのが好ましく、OBM は還元条件下で約 40,000 (40,0

40

50

00 ± 4, 000) の分子量を有する蛋白質として特定される。

【0013】

本発明蛋白質は、マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株ST2、マウス前脂肪細胞株PA6、その他のヒト骨芽細胞様細胞株、あるいはヒト、マウス、ラットなどの哺乳動物から採取し濃縮した骨芽細胞様細胞などから得ることができる。又、これらの細胞に本発明蛋白質を発現させるために必要な誘導物質としては、活性型ビタミンD₃ (Calcitriol)、副甲状腺ホルモン (PTH)、インターロイキン (IL) - 1、IL - 6、IL - 11、オンコスタチンM及び白血病細胞増殖抑制因子LIF) などの骨吸収促進因子が挙げられる。又、これらの誘導物質の添加濃度としては、活性型ビタミンD₃ やPTHでは、10⁻⁸ M、IL - 11やオンコスタチンMではそれぞれ10 ng/ml及び1 ng/ml、IL - 6では20 ng/mlのIL - 6と500 ng/mlのIL - 6可溶性レセプターを用いるのが望ましい。好ましくは、マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株ST2を用い、10⁻⁸ M活性型ビタミンD₃、10⁻⁷ Mデキサメサゾン、及び10%牛胎児血清を添加したα-MEM中で一週間以上培養してコンフルエントにした細胞を用いるとよい。このようにして培養した細胞はセルスクレイパーなどを用いて剥離させ、回収するとよい。又、回収した細胞は使用するまでの間 - 80 で保存しておくことができる。

【0014】

本発明蛋白質は、このようにして回収した細胞の膜画分から精製すると効率良く精製することができる。膜画分の調製は、細胞内器官の分画に利用される通常の方法に従って行うことができる。膜画分の調製に使用する緩衝液には、好ましくは各種プロテアーゼ阻害剤を添加するとよい。添加するプロテアーゼ阻害剤としては、例えばPMSF、APMSF、EDTA、0-フェナントリン、ロイペプチン、ペプスタチンA、アプロチニン、大豆トリプシンインヒビターなどのセリンプロテアーゼ阻害剤、チオールプロテアーゼ阻害剤、及びメタロプロテアーゼ阻害剤などが挙げられる。細胞の破碎には、Daunceホモジナイザー、ポリトロンホモジナイザー、超音波破碎装置などを用いることができる。破碎した細胞は0.5 Mシュクロースを加えた緩衝液に懸濁させ、600 × gで10分間遠心分離することにより、細胞核と未破碎の細胞を沈殿画分として分離することかできる。遠心分離で得た上清を150,000 × gで90分間遠心分離することにより、沈殿画分として膜画分を得ることかできる。このようにして得た膜画分を各種の界面活性剤で処理することにより、細胞膜に存在する本発明蛋白質を効率良く可溶化し、抽出することかできる。可溶化に用いる界面活性剤としては、細胞膜蛋白質の可溶化に一般的に使用されている各種界面活性剤、例えばCHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate)、Triton X-100、Nikkol、n-オクチルグリコシドなどを用いることができる。好ましくは、0.5% CHAPSを添加して4 で2時間攪拌し、本発明蛋白質を可溶化するのが良い。このようにして調製したサンプルを、150,000 × gで60分間遠心分離し、その上清を可溶化膜画分として得ることかできる。

【0015】

このようにして得られた可溶化膜画分からの本発明蛋白質の精製は、OCIFを固定化したカラム、ゲル、樹脂などを用いて効率よく精製することかできる。固定化に使用するOCIFとしては、WO96/26217号公報記載の方法に従って、ヒト胎児肺線維芽細胞株IMR-90の培養液から単離したもの、あるいは遺伝子工学的手法により得られたもの (rOCIF) を使用することができる。これらのrOCIFは、ヒト、ラット、あるいはマウスのcDNAを常法に従って発現ベクターに組み込み、CHO細胞、BHK細胞、Namlwa細胞などの動物細胞あるいは昆虫細胞などで発現させ、精製することによって得ることができる。このようにして得られたOCIFは、分子量約60 kDa (モノマー型) と120 kDa (ダイマー型) の分子量を示すが、固定化に用いるOCIFとしては、好ましくはダイマー型OCIFを用いる。OCIFを固定化するためのゲル、樹脂としてはECHセファロース4B、EAHセファロース4B、チオプロピルセファロース6B、CNBr-活性化セファロース4B、活性化CHセファロース4B、エポキシ

活性化セファロース 6 B、活性化チオールセファロース 4 B（以上、ファルマシア社）、T S K g e l A F - エポキシトヨパール 6 5 0、T S K g e l A F - アミノトヨパール 6 5 0、T S K g e l A F - フォルミルトヨパール 6 5 0、T S K g e l A F - カルボキシトヨパール 6 5 0、T S K g e l A F - トレシルトヨパール 6 5 0（以上、トーソー社）、アミノ - セルロファイン、カルボキシ - セルロファイン、F M P 活性化セルロファイン、フォルミル - セルロファイン（以上、生化学工業社）、アフィゲル 1 0、アフィゲル 1 5、アフィブレップ 1 0（以上、BioRad社）などを用いることができる。又、O C I F を固定化するためのカラムとしては H i T r a p N H S - a c t i v a t e d カラム（ファルマシア社）、T S K g e l T r e s y l - 5 P W（トーソー社）などを用いることができる。H i T r a p N H S - a c t i v a t e d カラム（1 m l、ファルマシア社）を用いた O C I F の固定化法として、具体的には以下の方法を挙げることができる。即ち、O C I F 1 3 . 0 m g を含む 0 . 2 M N a H C O ₃ / 0 . 5 M N a C l（p H 8 . 3）溶液 1 m l をカラムに添加し、室温で 3 0 分間カップリング反応させる。

10

【0016】

次いで、0 . 5 M エタノールアミン / 0 . 5 M N a C l（p H 8 . 3）と 0 . 1 M 酢酸 / 0 . 5 M N a C l（p H 4 . 0）を流し、再度 0 . 5 M エタノールアミン / 0 . 5 M N a C l（p H 8 . 3）に置き換え、室温で 1 時間放置し、過剰な活性基を不活性化する。その後、0 . 5 M エタノールアミン / 0 . 5 M N a C l（p H 8 . 3）と 0 . 1 M 酢酸 / 0 . 5 M N a C l（p H 4 . 0）で 2 度洗浄し、5 0 m M T r i s / 1 M N a C l / 0 . 1 % C H A P S 緩衝液（p H 7 . 5）で置換することにより、O C I F 固定化カラムを作製することができる。このようにして作製した O C I F 固定化カラムや O C I F 固定化ゲルあるいは樹脂などを用い、本発明蛋白質を効率よく精製することができる。本発明蛋白質の分解を抑制するために、精製に用いる緩衝液にも上記の各種プロテアーゼ阻害剤を添加するとよい。本発明蛋白質は、上記の可溶化膜画分を O C I F 固定化カラムに負荷する、あるいは O C I F 固定化ゲル、樹脂などと混ぜて攪拌することによって吸着させ、酸、各種蛋白質変性剤、カコジレートバッファーなどによって O C I F 固定化カラム、ゲル、あるいは樹脂などから溶出することができる。好ましくは、本発明蛋白質の変性を最小限に抑えるため、酸を用いて溶出し直ちに中和するとよい。溶出に用いる酸性緩衝液としては、例えば 0 . 1 M グリシン - 塩酸緩衝液（p H 3 . 0）、0 . 1 M グリシン - 塩酸緩衝液（p H 2 . 0）、及び 0 . 1 M クエン酸ナトリウム緩衝液（p H 2 . 0）などを用いることができる。

20

30

【0017】

このようにして精製した本発明蛋白質は、生物試料からの蛋白質の精製に汎用される通常の方法を用いて、本発明蛋白質の物理化学的性質を利用した各種の精製操作により更に精製することができる。本発明蛋白質溶液の濃縮には限外濾過、凍結乾燥及び塩析など、通常、蛋白質の精製過程で用いられる手法が挙げられる。

好ましくは、C e n t r i c o n - 1 0（BioRad社）などを用いた遠心による限外濾過を用いるのが良い。又、精製手段としては、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、調製用電気泳動などを用いた通常、蛋白質の精製に利用される各種の手法を組み合わせる用いることができる。より具体的には、S u p e r o s e 1 2 カラム（ファルマシア社）などを用いたゲル濾過クロマトグラフィーや逆相クロマトグラフィーを組み合わせる用いることにより、本発明蛋白質を純化することが可能である。又、精製過程中的本発明蛋白質の同定は、固定化 O C I F との結合活性あるいは O C I F との結合物を抗 O C I F 抗体による免疫沈降後、S D S - ポリアクリルアミド電気泳動（S D S - P A G E）で分析することにより検出できる。

40

このようにして得られた本発明蛋白質は、その活性より骨代謝異常症、例えば大理石病などの治療剤としての医薬、あるいは研究・診断用試薬として有用である。

【0018】

50

また本発明は、破骨細胞形成抑制因子 O C I F に結合する新規な蛋白質 (O C I F 結合分子 ; O B M) をコードする D N A、その D N A によりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、それを用いて O C I F に特異的に結合する蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法、及び該蛋白質を含有する骨代謝治療剤に関する。さらに本発明は、O B M の発現を調節する物質のスクリーニング方法、O B M と結合しその作用を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法、O B M と結合し O B M の作用を伝達するレセプターのスクリーニング方法、これらのスクリーニングの結果得られた物質を含有する医薬組成物に関する。

【 0 0 1 9 】

本発明の D N A によりコードされる新規蛋白質 O B M は、以下の物理化学的性質及び生物活性を示す。

10

即ち、

- a . 破骨細胞形成抑制因子 (O C I F) に特異的に結合する。
- b . 還元条件下における S D S - P A G E による分子量測定で、約 4 0 , 0 0 0 (± 4 , 0 0 0) の分子量を示す。又、モノマータイプの O C I F とクロスリンクさせた場合の見かけ上の分子量は約 9 0 , 0 0 0 - 1 1 0 , 0 0 0 である。
- c . 破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する活性を有する。

ものである。

【 0 0 2 0 】

本発明の O C I F 結合分子、O B M をコードする D N A を同定し、O B M の性質を評価するためのプローブとして使用するヒト破骨細胞形成抑制因子 (O C I F) は、W O 9 6 / 2 6 2 1 7 号に従ってヒト胎児性線維芽細胞株 I M R - 9 0 の培養液から単離することができる。O B M の D N A の単離、同定には、遺伝子組換え型ヒト O C I F、遺伝子組換え型マウス O C I F、遺伝子組換え型ラット O C I F 等を用いることもできる。これらの遺伝子組換え型 O C I F はそれぞれの D N A を常法に従って発現ベクターに組み込み、C H O 細胞、B H K 細胞、N a m a l w a 細胞等の動物細胞あるいは昆虫細胞などで発現させ、精製することによって得ることができる。

20

【 0 0 2 1 】

目的の蛋白質をコードする c D N A を分離する (c D N A クローニング) 方法としては、その蛋白質の部分アミノ酸配列を決定しそれに対応する塩基配列をもとにハイブリダイゼーション法により目的の c D N A を単離する方法の他に、蛋白質のアミノ酸配列が不明であっても発現ベクター中に c D N A ライブラリーを構築し、それらを細胞中に導入し、目的の蛋白質の発現の有無をスクリーニングすることにより、目的の c D N A を単離する方法 (発現クローニング法) がある (D ' A n d r e a e t a l . : C e l l 5 7 , 2 7 7 - 2 8 5 , 1 9 8 9 ; F u k u n a g a e t a l . : C e l l 6 1 , 3 4 1 - 3 5 0 , 1 9 9 0) 。

30

発現クローニング法では、宿主細胞として細菌、酵母、動物細胞などが目的に応じて使い分けられている。本発明のように動物細胞の膜表面に存在すると考えられる蛋白質をコードする c D N A をクローニングする際には、動物細胞を宿主とする場合が多い。又、D N A の導入効率が高く、導入された D N A の発現効率の高い宿主が通常使用される。そのような特徴を持つ細胞のひとつが、本発明で用いたサル腎臓細胞 C O S - 7 細胞である。C O S - 7 細胞では S V 4 0 l a r g e T a n t i g e n が発現しているため、S V 4 0 の複製開始点を持つプラスミドは細胞中で多コピーのエピソームとして存在するようになり、通常より高発現が期待できる。又、D N A を導入した時点から数日のうちに最高の発現レベルに到達するので迅速なスクリーニングに適している。この宿主細胞に高発現可能なプラスミドを組み合わせることによって、極めて高レベルの遺伝子発現が可能となる。プラスミド上で最も遺伝子の発現量に影響を与える因子はプロモーターであり、高発現用のプロモーターとして S R α プロモーターやサイトメガロウィルス由来プロモーター等がよく使用される。

40

【 0 0 2 2 】

発現クローニングにより膜蛋白質の c D N A をクローニングしようとする際のスクリーニ

50

ング法として、バインディング法 (binding 法)、パニング法 (panning 法)、フィルムエマルジョン法などが考案されている。

本発明は、発現クローニング法とバインディング法を組み合わせることによって得た O C I F に特異的に結合する蛋白質 (O B M) をコードする D N A 及び発現蛋白質、及び D N A 又は発現蛋白質を用いた生理活性物質のスクリーニングに関する。本発明の D N A がコードする O B M は、O C I F を標識し、その標識体の動物細胞膜表面への結合性を試験することによって検出することができる。O C I F の標識法としては、放射性同位元素による標識や蛍光標識等、一般的な蛋白質の標識法を用いることができる。例えば、O C I F の放射性同位元素による標識としてはチロシン残基の^{1 2 5}I 標識が挙げられ、具体的標識法としてヨードジェン法、クロラミン T 法及び酵素法等がある。O C I F の動物細胞膜表面への結合性はこのようにして得た標識 O C I F を用い、常法に従った方法で試験できる。又、結合性の試験に用いる培地に標識 O C I F の 1 0 0 倍から 4 0 0 倍濃度の未標識 O C I F を添加することにより、非特異的な結合量を測定できる。O C I F の特異的結合量は、標識 O C I F の総結合量から非特異的な結合量を差し引くことにより算出される。

10

20

30

40

50

【0023】

本発明者らは、破骨細胞の分化に関与する因子は O C I F と相互作用するとの仮定のもと、遺伝子組み換え型 O C I F を用い、O C I F が結合する蛋白質を分離するため、マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株 S T 2 の m R N A から作製した発現ライブラリーを以下に述べる方法でスクリーニングした。S T 2 m R N A をもとに合成した D N A を動物細胞用発現ベクターに挿入し、それらをサル腎臓細胞 C O S - 7 細胞に遺伝子導入した。^{1 2 5}I 標識した O C I F をプローブとして用いて C O S - 7 細胞上に発現した目的の蛋白質をスクリーニングした。その結果、O C I F と特異的に結合する蛋白質をコードする D N A を分離するに至り、この O C I F 結合分子 (O C I F 結合分子; O B M) をコードする D N A の塩基配列を決定した。又、この D N A にコードされる O B M は細胞膜上で O C I F と強くしかも特異的に結合することを見出した。

【0024】

本発明でいう比較的温和な条件での D N A ハイブリダイゼーションとは、例えば常法に従いナイロンメンブレンに D N A をトランスファーし固定化した後、ハイブリダイゼーション用バッファー中で放射線標識したプローブの D N A と 4 0 ~ 7 0 、2 時間 ~ 1 晩程度ハイブリダイゼーションさせ、0 . 5 × S S C (0 . 0 7 5 M 塩化ナトリウム及び 0 . 0 0 7 5 M クエン酸ナトリウム) で 4 5 ~ 1 0 分洗浄する条件を言う。具体的には、常法に従い、ナイロンメンブレンにハイボンド N (アマシャム社) を用い、D N A をトランスファーし固定化した後、R a p i d H y b r i d i z a t i o n B u f f e r (アマシャム社) 中で^{3 2}P 標識したプローブの D N A と 6 5 ~ 2 時間ハイブリダイゼーションさせて、0 . 5 × S S C (0 . 0 7 5 M 塩化ナトリウム及び 0 . 0 0 7 5 M クエン酸ナトリウム) で 4 5 ~ 1 0 分洗浄する条件を言う。

【0025】

破骨細胞形成の代表的なインビトロ培養系として、活性型ビタミン D₃ あるいは P T H の存在下でのマウス由来骨芽細胞様ストローマ細胞株、S T 2 とマウス脾臓細胞との共培養系がよく知られている。本発明の O B M は活性型ビタミン D₃ や P T H のような骨吸収促進因子の存在下で培養した骨芽細胞様ストローマ細胞上に特異的に誘導される蛋白質として特定される。更に、活性型ビタミン D₃ あるいは P T H 非存在下でもマウス脾臓細胞の培養系に本発明の D N A によりコードされる蛋白質を添加することによって破骨細胞の形成が促進されることから、本発明の D N A によりコードされる O B M は破骨細胞の分化、成熟に関与していると考えられる。

【0026】

本発明の D N A を発現ベクターに挿入して O B M 発現プラスミドを作製し、これを各種の細胞又は菌株に導入して発現させることにより、組み換え型 O B M を製造することができる。発現させる際の哺乳動物細胞の宿主として C O S - 7、C H O、N a m a l w a など、又は細菌の宿主として大腸菌などを、用いることができる。その際、D N A の全長を用

いて膜結合型蛋白質として発現させる、あるいは膜結合部位をコードする部分を除去することにより分泌型、可溶化型としても発現させることができる。このようにして製造された組み換え型OBMは、通常用いられる蛋白精製法、例えばOCIF固定化カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、あるいはゲル濾過クロマトグラフィーなどを組み合わせることにより、効率よく精製することができる。このようにして得られた本発明蛋白質は、その活性より骨代謝異常症、例えば大理石病などの治療剤としての医薬、あるいは研究・診断用試薬として有用である。

【0027】

本発明のDNAにコードされる蛋白質OBMを利用して、(1)OBMの発現を調節する物質のスクリーニング、(2)OBMに特異的に結合し、OBMの生物活性を阻害、あるいは修飾する物質のスクリーニング、及び(3)破骨細胞前駆細胞に存在し、OBMの生物活性を伝達する蛋白質(OBMレセプター)のスクリーニング、更にはこのOBMレセプターを利用したアンタゴニストやアゴニストの開発が可能である。上述のOBMあるいはOBMレセプターを用いたコンビナトリアルケミストリーにおいて、アンタゴニストあるいはアゴニストの探索に必要なペプチドライブラリーは具体的に以下の方法で作製することができる。その一つに、スプリット法がある(Lam et al.; Nature 354, 82-84, 1991)。この方法は、合成担体(ビーズ)にそれぞれのアミノ酸(ユニット)を結合させたものを各ユニットごと別々に合成する。この合成された担体を一度すべて混ぜ、次にユニットの数に等分し、次のユニットをまた各々結合させる。この操作をn回繰り返すことにより、担体にn個のユニットが結合したライブラリーが作製される。このように合成を行うと一つの担体群には、1種類の配列しか合成されないで、本発明の蛋白質を用いた上記のスクリーニング法で陽性を示した担体群を選びだし、そのアミノ酸配列を決定すれば、特異的に結合するペプチドを同定することができる。又、別の方法としてファージディスプレイ法を用いることもできる。この方法はランダムなペプチドをコードする合成遺伝子をファージで発現させるもので、上記合成ライブラリーに比べ、ライブラリー中の分子数を多くできるという利点があるものの、ファージが嫌う配列はライブラリーに存在し得ないことなどがあり、分子数当たりの多様性が低いという欠点がある。ファージディスプレイ法でも同様に、本発明の蛋白質を用いたスクリーニング系を利用し、それに特異的に結合するファージをパニングにより濃縮し、得られた特異的結合性を有するファージを大腸菌で増幅し、そのペプチドをコードする塩基配列を決定すればよい。更に、前記(2)及び(3)のスクリーニング系を使用し、ペプチドライブラリーからOBMあるいはOBMレセプターに特異的にかつ高親和性のペプチドをスクリーニングしたい場合、スクリーニング時にそれぞれOCIFやOBMを共存させ、それぞれの濃度を上げながら、陽性を示した担体あるいはファージをスクリーニングすることにより、特異的かつ極めて高親和性のペプチドを得ることができる。例をあげれば、すでに造血ホルモンであるエリスロポエチン(EPO)のレセプターを用い、多様性に富んだペプチドライブラリーからのEPO様活性を有する低分子ペプチドアゴニストのスクリーニング及びその立体構造解析、更にはその立体構造に基づいた有機合成展開によるEPO活性を有する低分子物質(アゴニスト)の創製に成功している(Nicholas et al.; Science, 273, 458-463, 1996)。

【0028】

また本発明者らは、破骨細胞形成抑制因子OCIFを用い、その結合蛋白質が活性型ビタミンD₃や副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone, PTH)などの骨吸収因子の存在下で培養した骨芽細胞様ストローマ細胞株、ST2の細胞上に特異的に発現することをすでに見出した。さらに、該蛋白質は未熟な破骨細胞前駆細胞からの破骨細胞への分化、成熟に関与する、いわゆる破骨細胞分化、成熟を支持又は促進する因子としての生物活性を有していることを見出し、該蛋白質を精製することによりその物理化学的諸性質及びその生物活性を明らかにした。本発明者らは、本発明のDNAにより発現される遺伝子組み換え型蛋白質OBMと、すでに前記OCIFと特異的に結合する精製天然型蛋白質との異同を明らかにすべく、物理化学的性質及び生物活性を比較した。その

結果、両蛋白質とも ▲ 1 ▼ 膜結合蛋白質であり、特異的に O C I F と結合し、▲ 2 ▼ S D S - P A G E での分子量は約 40,000、▲ 3 ▼ モノマータイプの O C I F とクロスリンキングさせた場合の見かけの分子量は約 90,000 - 110,000 であり、物理化学的諸性質がよく一致していること、又、生物活性においても、両蛋白質は破骨細胞の分化、成熟を支持又は促進する活性を有していることから、両蛋白質は同一である可能性が示唆された。さらに、本発明 DNA を用いて遺伝子工学的に発現させ、精製した蛋白質（遺伝子組み換え型 O B M ）で作製したウサギ抗 O B M ポリクローナル抗体は、前記の方法で得られる精製天然型蛋白質に交差性を有し、O B M と O C I F との特異的結合を阻害すると同様に、前記の精製天然型蛋白質と O C I F との結合を特異的に阻害した。これらの結果から、本発明の DNA により発現される遺伝子組み換え型蛋白質 O B M は、前記 O C I F に特異的に結合する天然型蛋白質と同一であることが明らかである。 10

【 0 0 2 9 】

さらに本発明者らは、O C I F に特異的に結合し、天然型あるいは遺伝子組み換え型マウス O B M と同様にマウス脾臓細胞からの破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する活性を有するヒト由来 O C I F 結合蛋白分子（以下ヒト O B M と称する）をコードする遺伝子（cDNA）を単離するため、前述のとおりマウス O B M cDNA から作製したプライマーを用い、ヒトリンパ節由来 cDNA を鋳型として polymerase chain reaction（PCR）を行い、得られたヒト O B M cDNA 断片をプローブとして上記 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、O C I F と特異的に結合するヒト由来蛋白質をコードする cDNA を分離することに成功し、このヒト由来 O C I F 結合蛋白分子、即ちヒト O B M をコードする cDNA の塩基配列を決定した。この cDNA にコードされるヒト O B M は、マウス O B M と同様に細胞膜上で O C I F と強く、しかも特異的に結合する特性を有し、またマウス脾臓細胞からの破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する生物活性を有することを見出した。 20

【 0 0 3 0 】

即ち、本発明は破骨細胞形成抑制因子 O C I F に結合する新規なヒト由来蛋白質であるヒト O B M をコードする DNA、その DNA によりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、その DNA を用いて O C I F に特異的に結合する性質を有し、マウス脾臓細胞からの破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する活性を有する蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法、及び該蛋白質を含有する骨代謝異常症治療剤の提供、更にヒト O B M の発現を調節する物質のスクリーニング方法、ヒト O B M と結合しその作用を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法、ヒト O B M と結合しその作用を伝達するレセプターのスクリーニング方法及びこれらのスクリーニングの結果得られた物質を含有する医薬組成物を提供することを課題とする。 30

【 0 0 3 1 】

本発明は、O C I F に特異的に結合する特性を有し、また破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する生物活性を有する新規なヒト蛋白質であるヒト O B M をコードする DNA、その DNA によりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、その DNA を用いて O C I F に特異的に結合する特性を有し、また破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する生物活性を有する蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法、及び該蛋白質を含有する骨代謝異常症治療剤に関する。更に、本発明はヒト O B M の発現を調節する物質のスクリーニング方法、ヒト O B M と結合しその作用を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法、ヒト O B M と結合し O B M の生物活性を伝達するレセプターのスクリーニング方法、及びこれらのスクリーニングの結果得られた物質を含有する医薬組成物、さらにヒト由来 O C I F 結合蛋白質に対する抗体及びその抗体を用いた骨代謝異常症の予防及び/又は治療薬に関する。 40

【 0 0 3 2 】

本発明の DNA によりコードされる新規ヒト由来 O C I F 結合蛋白分子、即ちヒト O B M は、以下の物理化学的性質及び生物活性を示す。

即ち、

a . 破骨細胞形成抑制因子（osteoclastogenesis inhibitor） 50

ry factor, OCIF) (WO96/26217号) に特異的に結合する。

b. 還元条件下での SDS-PAGE による分子量測定で、約 40,000 (±5,000) の分子量を示す。又、モノマータイプの OCIF とクロスリンクさせた場合の見かけ上の分子量は約 90,000 - 110,000 である。

c. 破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する生物活性を有する。

ものである。

【0033】

本発明のヒト OBM をコードする cDNA を分離同定するための、プローブとして使用するマウス由来 OCIF 結合蛋白質であるマウス OBM cDNA は、前述の方法に従って、マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株、ST2 の cDNA ライブラリーから単離することができ、又、ヒト OBM cDNA を発現することにより得られる蛋白質の特性及びその生物活性を評価するために必要なヒト破骨細胞形成抑制因子 OCIF は、WO96/26217 号記載の方法に従って、ヒト線維芽細胞株 IMR-90 の培養液から単離、あるいはその DNA を用いて遺伝子工学的に製造することができる。ヒト OBM の特性や生物活性の評価には、遺伝子組み換えヒト OCIF、遺伝子組み換えマウス OCIF、遺伝子組み換えラット OCIF 等を用いることもできる。これらの遺伝子組み換え型 OCIF は、それぞれの cDNA を常法に従って発現ベクターに組み込み、CHO 細胞、BHK 細胞、Namalwa 細胞等の動物細胞あるいは昆虫細胞などで発現させ、精製することによって得ることができる。

10

【0034】

目的の蛋白質をコードするヒト型の cDNA を単離する (cDNA クローニング) 方法としては、▲1▼その蛋白質を精製し、その部分アミノ酸配列を決定し、それに対応する塩基配列を有する DNA をプローブとして用い、ハイブリダイゼーション法により目的の cDNA を単離する方法、▲2▼目的の蛋白質のアミノ酸配列が不明であっても発現ベクター中に cDNA ライブラリーを構築し、それらを細胞中に導入し、目的蛋白質の発現の有無をスクリーニングすることにより、目的の cDNA を単離する方法 (発現クローニング法)、及び ▲3▼ヒト由来の目的蛋白質と同じ特性及び生物活性を有するヒト以外の哺乳動物由来の蛋白質をコードする遺伝子、cDNA がクローニングしようとするヒト由来の目的蛋白質の cDNA と高いホモロジーを有すると想定し、前者の cDNA をプローブとし、ヒト細胞あるいは組織から構築した cDNA ライブラリーからハイブリダイゼーション法や polymerase chain reaction (PCR) 法により目的のヒト蛋白質をコードする cDNA を単離する方法がある。

20

30

【0035】

ヒト OBM cDNA は、前記マウス OBM cDNA と高い相同性を有するとの想定のもと、ヒト OBM 産生細胞あるいは組織は後者の cDNA をプローブとして、ノーザンハイブリダイゼーション法により調べることができる。ヒト OBM cDNA は、マウス OBM cDNA から作製したマウス OBM プライマーを用い、上記のようにして同定したヒト OBM 産生組織、例えばヒトリンパ節等から構築した cDNA を鋳型として、PCR によりヒト OBM cDNA 断片を得て、このヒト OBM cDNA 断片をプローブとし、上記の様に同定したヒト OBM 産生細胞あるいは組織の cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができる。本発明は、このようにして得られた OCIF に特異的に結合する性質を有し、また破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する生物活性を有するヒト由来蛋白質、即ちヒト OBM をコードする DNA に関する。本発明の DNA がコードするヒト OBM は、膜貫通領域を有する膜結合型蛋白質をコードすることから、OCIF を標識し、本発明の cDNA を発現した動物細胞表面への OCIF 標識体の結合によって検出することができる。OCIF の標識法としては、前述と同様、放射性同位元素による標識や蛍光標識等、一般的な蛋白質の標識法を用いることができる。

40

本発明のヒト OBM cDNA により発現される蛋白質の分子量は、ゲル濾過クロマトグラフィーや SDS-PAGE 等を用いて測定される。より正確に分子量を測定するためには、SDS-PAGE を用いるのが好ましく、ヒト OBM は、還元条件下で約 40,000

50

0 (4 0 , 0 0 0 ± 5 , 0 0 0) の分子量を有する蛋白質として特定される。

【 0 0 3 6 】

本発明でいう比較的温和な条件でのDNAハイブリダイゼーションとは、例えば常法に従いナイロンメンブランにDNAをトランスファーし、固定化した後、ハイブリダイゼーション用バッファー中で放射線標識したプローブのDNAと40 - 70 、2時間から一夜程度ハイブリダイゼーションさせ、0 . 5 × S S C (0 . 0 7 5 M 塩化ナトリウム及び0 . 0 0 7 5 M クエン酸ナトリウム) で45 、10分間洗浄する条件を言う。より具体的には、常法に従い、ナイロンメンブランにハイボンドN (アマシャム社) を用い、DNAをトランスファーし、固定化した後、Rapid Hybridization Buffer (アマシャム社) 中で³²P標識したプローブのDNAと65 、2時間ハイブリダイゼーションさせて、上記の0 . 5 × S S Cで45 、10分間洗浄する条件を言う。

10

【 0 0 3 7 】

破骨細胞形成の代表的なインビトロ培養系として、活性型ビタミンD₃あるいはPTHの存在下でのマウス由来骨芽細胞様ストローマ細胞株、ST2とマウス脾臓細胞との共培養系がよく知られている。このインビトロ培養系での破骨細胞形成には、骨芽細胞様ストローマ細胞と脾臓細胞間の接着による相互作用及び活性型ビタミンD₃やPTH等の骨吸収促進因子の存在が不可欠である。このインビトロ培養系において、骨吸収促進因子非存在下で、しかも破骨細胞形成支持能のないサル腎臓細胞株であるCOS細胞に本発明のcDNAを発現させた遺伝子組み換えCOS細胞株は、骨芽細胞様ストローマ細胞株、ST2と同様に脾臓細胞からの破骨細胞形成支持能を獲得した。また本発明のcDNAは膜結合型蛋白質をコードすることから、この膜結合部位をコードする部分を除去することにより分泌型、可溶型として発現させることもできる。骨吸収促進因子非存在下の上記インビトロ培養系に、この分泌型ヒトOBMを添加するだけで破骨細胞の形成が起こることも確認された。

20

これらの結果から、本発明のcDNAによりコードされるヒトOBMは破骨細胞の分化、成熟に關与する因子として特定される。

【 0 0 3 8 】

本発明のcDNAを発現ベクターに挿入してヒトOBM発現プラスミドを作製し、これを各種の細胞または菌株に導入して発現させることにより、組み換え型ヒトOBMを製造することができる。発現させる際の哺乳動物細胞の宿主としてCOS-7、CHO、Namalwa細胞などを、また細菌の宿主として大腸菌等を用いることができる。その際、cDNAの全長を用いて膜結合型蛋白質として発現させることができるし、また膜結合部位をコードする部分を除去することにより分泌型、可溶化型としても発現させることができる。このようにして製造された組み換え型ヒトOBMは、通常用いられる蛋白精製法、例えばOCIF固定化カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーやゲル濾過クロマトグラフィー等を組み合わせることにより効率良く精製できる。このようにして得られた本発明ヒトOBMは、その活性より骨代謝異常症、例えば大理石病などの治療剤としての医薬、あるいは研究・診断用試薬として有用である。

30

【 0 0 3 9 】

本発明のcDNAにコードされる蛋白質、ヒトOBMを利用することにより、▲1▼ヒトOBMの発現を調節する物質のスクリーニング、▲2▼ヒトOBMに特異的に結合し、その生物活性を阻害あるいは修飾する物質のスクリーニング、及び▲3▼ヒト破骨細胞前駆細胞に存在し、ヒトOBMの生物活性を伝達するヒト蛋白質 (ヒトOBMレセプター) のスクリーニング、さらにはこのヒトOBMレセプターを利用したアンタゴニストやアゴニストの開発が可能である。上述のヒトOBMあるいはヒトOBMレセプターを用いたコンビナトリアルケミストリーにおいて、アンタゴニストあるいはアゴニストの探索に必要なペプチドライブラリーはマウスOBMを用いたスクリーニングの方法と同様の方法で作製することができ、マウスOBMの代わりにヒトOBMを用いて、ペプチドライブラリーを同様にスクリーニングすることにより、特異的かつ極めて高親和性のペプチドを得ることができる。

40

50

【 0 0 4 0 】

さらにまた、前述のように O B M は有用性の高い蛋白質であるが、この蛋白質の測定を行うには O B M を特異的に認識する抗体とその抗体を用いた酵素免疫測定法の構築が必須である。しかしながら、これまでに O B M の測定に有用な抗体は得られていない。さらに、O B M あるいは s O B M の生物活性を中和する抗 O B M / s O B M 抗体は、O B M あるいは s O B M の作用、即ち破骨細胞形成の促進作用を抑制することが想定され、骨代謝異常症の治療薬としての開発が期待されるが、このような抗体も未だ得られていない。

【 0 0 4 1 】

上述の状況に鑑み本発明者らは鋭意研究の結果、破骨細胞形成抑制因子 (O C I F) に特異的に結合する膜結合蛋白質 (O C I F 結合分子 ; O B M) 及び膜結合部位を欠損した可溶性 O B M (s O B M) の両抗原を認識する抗体 (抗 O B M / s O B M 抗体) を見出すに至った。従って本発明は、破骨細胞形成抑制因子 O C I F に特異的に結合する膜結合蛋白質 O B M 及び膜結合部位を欠損した可溶性 O B M (s O B M) の両抗原を認識する抗体 (抗 O B M / s O B M 抗体)、その製造方法、この抗体を用いた O B M 及び s O B M の測定方法、さらにこの抗体を有効成分とする骨代謝異常症予防及び / 又は治療剤を提供することを課題とする。

【 0 0 4 2 】

本発明は、破骨細胞形成抑制因子 (O s t e o c l a s t o g e n e s i s i n h i b i t o r y f a c t o r ; O C I F) に特異的に結合する膜結合蛋白質 (O C I F b i n d i n g m o l e c u l e ; O B M) 及び膜結合部位を欠損した可溶性 O B M (s O B M) の両抗原を認識する抗体 (抗 O B M / s O B M 抗体)、その製造方法、この抗体を用いた O B M 及び s O B M の測定方法、さらにこの抗体を有効成分とする医薬、特に骨代謝異常症予防及び / 又は治療剤に関する。

本発明の抗体は、O B M 及び s O B M の生物活性である破骨細胞形成促進活性を中和する活性を有し、以下の性質を持つ抗体から構成される。

即ち、

- a) マウス O B M 及びマウス s O B M の両抗原を認識するポリクローナル抗体 (抗マウス O B M / s O B M ポリクローナル抗体)
- b) ヒト O B M 及びヒト s O B M の両抗原を認識するポリクローナル抗体 (抗ヒト O B M / s O B M ポリクローナル抗体)
- c) マウス O B M 及びマウス s O B M の両抗原を認識するモノクローナル抗体 (抗マウス O B M / s O B M モノクローナル抗体)
- d) ヒト O B M 及びヒト s O B M の両抗原を認識するモノクローナル抗体 (抗ヒト O B M / s O B M モノクローナル抗体)
- e) マウス O B M 及びマウス s O B M の両抗原に交差性を有する抗ヒト O B M / s O B M モノクローナル抗体、から構成される。

【 0 0 4 3 】

マウス O B M 及びマウス s O B M の両抗原を認識するポリクローナル抗体 (以下抗マウス O B M / s O B M ポリクローナル抗体と称する) 及びヒト O B M 及びヒト s O B M の両抗原を認識するポリクローナル抗体 (以下抗ヒト O B M / s O B M ポリクローナル抗体と称する) は、以下の手段によって得ることができる。免疫用抗原としての精製マウス O B M は、前述の方法に従って得ることができる。即ち、マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株 S T - 2 を活性ビタミン D₃ 処理し、その細胞膜上の O B M を O C I F 固定化カラム及びゲル濾過クロマトグラフィーにより精製することにより、天然型マウス O B M (n a t i v e O B M) を得ることができる。又、前述のマウス O B M c D N A (配列表配列番号 1 5) 又はヒト O B M c D N A (配列表配列番号 1 2) を常法により発現ベクターに組み込み、C H O 細胞、B H K 細胞、N a m a l w a、C O S - 7 細胞等の動物細胞、昆虫細胞、あるいは大腸菌などで発現させて、上記と同様の方法で精製することにより、遺伝子組み換えマウス O B M (配列表配列番号 1) 又はヒト O B M (配列表配列番号 1 1) を得ることができ、これを免疫用抗原として用いても良い。この時、膜結合蛋白質であるマ

10

20

30

40

50

ウスOBMあるいはヒトOBMを大量かつ高度に精製するには、多大の労力を要する。一方、膜結合型蛋白質であるOBMとその膜結合部位を欠損させて得られる可溶性蛋白質である可溶性OBM(sOBM)とは、前述のように破骨細胞の分化、成熟促進活性において差異がないことが認められている。従って、マウスsOBM及びヒトsOBMは発現及びその高度精製が比較的容易であることから、これら可溶性蛋白質であるsOBMを免疫用抗原として用いても良い。

【0044】

マウスsOBM(配列表配列番号16)及びヒトsOBM(配列表配列番号17)は、マウスsOBM cDNA(配列表配列番号18)又はヒトsOBM cDNA(配列表配列番号19)の5'上流側に他の分泌蛋白質由来の既知シグナル配列をコードする塩基配列を付加し、上記と同様に遺伝子工学的手法により発現ベクターに組み込み、各種動物細胞、昆虫細胞、あるいは大腸菌などを宿主として発現し、精製することにより、それぞれ得ることができる。このようにして得られた免疫用抗原を、リン酸塩緩衝生理食塩水(PBS)に溶解し、必要に応じ同容量のフロイント完全アジュバントと混合し乳化後、動物に約1週間間隔で皮下投与し、数回免疫する。抗体価を測定し、最高の抗体価に達した時点でブースター投与し、投与10日後に全採血を行う。得られた抗血清を硫酸アンモニウム分画沈澱し、グロブリン分画を陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製するか、あるいは抗血清をバインディングバッファー(Biorad社)で2倍希釈し、その希釈抗血清をプロテインA又はプロテインGセファロースカラムクロマトグラフィーにより精製することにより、目的とする抗マウス又は抗ヒトOBM/sOBMポリクローナル型抗体を得ることができる。

【0045】

本発明のモノクローナル抗体は、以下の方法により得ることができる。即ち、モノクローナル抗体の作製に必要な免疫用抗原としては、ポリクローナル抗体の時と同様に天然型マウスOBM(native OBM)、遺伝子組み換えマウス型又はヒトOBM、遺伝子組み換えマウス型又はヒト型sOBMを用いることができる。それぞれの抗原により哺乳動物を免疫するか、あるいはインビトロ法により免疫したリンパ球細胞を骨髓腫細胞株(ミエローマ)などと融合させ、常法によりハイブリドーマを作製する。このハイブリドーマ培養液について、高度に精製されたそれぞれの抗原を用いて、ソリッドフェーズELISAによりそれぞれの抗原を認識する抗体生産ハイブリドーマを選択する。得られたハイブリドーマをクローニングし、樹立した安定な抗体産生ハイブリドーマをそれぞれ培養することにより、目的とする抗体が得られる。ハイブリドーマの作製に当たっては、哺乳動物を使用する場合、マウスやラットなどの小動物を使用するのが一般的である。免疫は、抗原を適当な溶媒、例えば生理食塩水などで適当な濃度に希釈し、この溶液を静脈内や腹腔内に投与し、これに必要に応じてフロイント完全アジュバントを併用投与し、動物に1~2週間間隔で3~4回程度投与する方法が一般的である。このようにして免疫された動物を最終免疫後3日目に解剖し、摘出した脾臓から得られた脾臓細胞を免疫細胞として使用する。免疫細胞と細胞融合するマウス由来のミエローマとしては、例えばp3/x63-Ag8、p3-U1、NS-1、MPC-11、SP-2/0、FO、P3x63-Ag8、653及びS194などが挙げられる。又、ラット由来の細胞としては、R-210などの細胞株が挙げられる。ヒト型の抗体を生産する場合には、ヒトBリンパ球をインビトロで免疫し、ヒトミエローマ細胞やEBウイルスにより形質転換した細胞株と細胞融合させることにより、ヒト型の抗体を生産することができる。免疫された細胞とミエローマ細胞株との融合は公知の方法、例えばKoehlerとMilsteinらの方法(Koehler et al.: Nature 256, 495-497, 1975)が一般的に使用されるが、電気パルスを利用した電気パルス法などでも良い。免疫リンパ球とミエローマ細胞株は、通常行われている細胞数の比率に混合し、一般に使用される牛胎児血清(FCS)不含細胞培養用培地にポリエチレングリコールを添加して融合処理を行い、FCS添加HAT選択培地で培養を行い融合細胞(ハイブリドーマ)を選別する。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 6 】

次に、抗体を生産するハイブリドーマをE L I S A、ブランク法、オクタロニー法、凝集法など通常用いられる抗体の検出方法により選択し、安定なハイブリドーマを樹立する。このようにして樹立されたハイブリドーマは、通常の培養方法により継代培養可能であり、必要に応じて凍結保存できる。ハイブリドーマは常法により培養して、その培養液、または哺乳動物の腹腔内に移植することにより、腹水から抗体を回収することができる。培養液あるいは腹水中の抗体は、塩析法、イオン交換及びゲル濾過クロマトグラフィー、プロテインAまたはプロテインGアフィニティークロマトグラフィーなど通常用いられる方法により精製することができる。このような方法により、抗原としてs O B Mを用いて得られたモノクローナル抗体のほとんど全ては、s O B MだけでなくO B Mをも特異的に認識できる抗体（抗O B M / s O B Mモノクローナル抗体と称する）である。これらの抗体は、O B M及びs O B Mのそれぞれの測定に利用することができる。これらの抗体は放射性アイソトープや酵素ラベルすることにより、ラジオイムノアッセイ（R I A）やエンザイムイムノアッセイ（E I A）として知られている測定系に用いることにより、O B M量及びs O B M量を測定することができる。これらの測定系を用いることにより、血液、尿などの生体試料中のs O B M量を容易にかつ高感度で測定することができる。また、これらの抗体を用いることにより、組織や細胞表面に結合したO B M量をバインディングアッセイ等により容易にかつ高感度で測定することができる。

10

【 0 0 4 7 】

得られた抗体をヒトに対する医薬として用いる場合、抗原性の問題からヒト型抗ヒトO B M / s O B M抗体を作製することが望ましい。ヒト型抗ヒトO B M / s O B M抗体の作製は、次に述べるような手法により得ることができる。即ち、▲ 1 ▼ヒト末梢血あるいは脾臓から採取したヒトリンパ球をin vitroでI L - 4存在下、抗原であるヒトO B Mあるいはヒトs O B Mで感作し、感作したヒトリンパ球をマウスとヒトとのヘテロハイブリドーマであるK₆ H₆ / B₅（A T C C C R L 1 8 2 3）と細胞融合させることにより、目的の抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングする。得られた抗体産生ハイブリドーマが生産する抗体は、ヒト型抗ヒトO B M / s O B Mモノクローナル抗体である。これらの抗体の中からヒトO B M / s O B Mの活性を中和する抗体を選別する。しかしながら、このようにヒトリンパ球をin vitroで感作する方法では、一般的に抗原に対して高親和性の抗体を得るのは困難である。

20

30

【 0 0 4 8 】

従って、ヒトO B Mおよびs O B Mに高親和性のモノクローナル抗体を得るには、上記のようにして得られた低親和性ヒト型抗ヒトO B M / s O B Mモノクローナル抗体を高親和化する必要がある。それには、上記のようにして得られ、中和抗体であるものの低親和性であるヒト型抗ヒトO B M / s O B Mモノクローナル抗体のC D R領域（特にC D R - 3）にランダム変異を導入し、これをファージで発現させてヒトO B M / s O B Mを固相化したプレートを用いてファージディスプレイ法により、抗原であるヒトO B M / s O B Mに強力に結合するファージを選択し、そのファージを大腸菌で増やし、その塩基配列から高親和性を有するC D Rのアミノ酸配列を決定すればよい。このようにして得られたヒト型抗ヒトO B M / s O B Mモノクローナル抗体をコードする遺伝子を一般的に使用されている哺乳動物細胞用発現ベクターに組み込んで、発現させることによりヒト型抗ヒトO B M / s O B Mモノクローナル抗体が得られる。これらの中から、ヒトO B M / s O B Mの生物活性を中和し、かつ高親和性である目的のヒト型抗ヒトO B M / s O B Mモノクローナル抗体を選別することができる。また、▲ 2 ▼B a l b / cマウスを用いて、本発明と同じように常法（K o e h l e r e t a l . : N a t u r e 2 5 6 , 4 9 5 4 9 7 , 1 9 7 5）によりマウス型抗ヒトO B M / s O B Mモノクローナル抗体を作製し、ヒトO B M / s O B Mの生物活性を中和し、かつ高親和性を有するモノクローナル抗体を選択する。この高親和性マウス型抗ヒトO B M / s O B Mモノクローナル抗体のC D R - 領域（C D R - 1 , 2 および 3）をヒトI g GのC D R領域に移植するC D R - g r a f t i n g（W i n t e r a n d M i l s t e i n : N a t u r e 3 4 9 , 2 9

40

50

3 - 299, 1991) の手法を駆使することによりヒト型化が可能である。上記に加え、さらに▲3▼ヒト末梢血リンパ球を Severe combined immune deficiency (SCID) マウスに移植し、この移植された SCID マウスはヒト型抗体を生産する (Mosier D. E. et al.: Nature 335, 256 - 259, 1988; Duchosal M. A. et al.: Nature 355, 258 - 262, 1992) ので、抗原としてヒト OBM あるいは s O B M を抗原として感作し、スクリーニングすることにより、ヒト O B M / s O B M に特異的なヒト型モノクローナル抗体を生産するリンパ球をそのマウスから採取することかできる。得られたリンパ球を前述のヒト型抗体の作製法▲1▼と同様に、マウスとヒトとのヘテロハイブリドーマである K₆ H₆ / B₅ (ATCC CRL 1823) と細胞融合させ、得られたハイブリドーマをスクリーニングすることにより、目的のヒト型モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。このようにして得られたハイブリドーマを培養することにより、目的のヒト型モノクローナル抗体を大量に製造でき、上述の方法と同様に精製することにより精製品を得ることができる。又、目的のヒト型モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから cDNA ライブラリーを構築し、目的のヒト型モノクローナル抗体をコードする遺伝子 (cDNA) をクローニングし、この遺伝子を遺伝子工学的手法により適当な発現ベクターに組み込み、各種動物細胞、昆虫細胞、あるいは大腸菌などを宿主として発現させることにより、遺伝子組み換えヒト型モノクローナル抗体を大量に製造することができる。

10

20

30

40

50

【0049】

得られた培養液から上述と同様の方法により精製することにより、精製されたヒト型モノクローナル抗体を大量に得ることができる。

さらに、上述の方法で得られた抗 O B M / s O B M モノクローナル抗体の中から、O B M / s O B M の生物活性を中和する抗体を得ることかできる。これら O B M / s O B M の生物活性を中和する抗体は、生体内での O B M / s O B M の生物作用、即ち破骨細胞形成促進作用をブロックすることから、医薬として、特に骨代謝異常症の予防及び / 又は治療剤として期待される。抗 O B M / s O B M 抗体による O B M あるいは s O B M の生物活性の中和活性は、in vitro での破骨細胞形成系における破骨細胞形成の抑制活性で測定することができる。in vitro アッセイ系として、以下の3つの方法がある。即ち、破骨細胞形成 (osteoclastogenesis) の in vitro 培養系として、▲1▼活性型ビタミン D₃ とデキサメサゾンの存在下、マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株、ST2 細胞とマウス脾臓細胞との共培養系、▲2▼サル腎臓細胞株、COS-7 細胞上に O B M を発現させ、ホルムアルデヒドにより固定化し、M - C S F 存在下、その細胞上でマウス脾臓細胞を培養する共培養系、▲3▼遺伝子組み換え s O B M 及び M - C S F 存在下でマウス脾臓細胞を培養する系などが挙げられる。これら培養系に種々の濃度で抗 O B M / s O B M 抗体を添加し、破骨細胞形成に及ぼす影響を調べることにより、抗 O B M / s O B M 抗体による破骨細胞形成抑制活性を測定することができる。又、in vivo での実験動物を利用した骨吸収抑制活性により抗 O B M / s O B M 抗体の破骨細胞形成抑制活性を評価することができる。即ち、破骨細胞形成が亢進している動物モデルとして、卵巣摘出モデルがある。この種の実験動物に抗 O B M / s O B M 抗体を投与し、骨吸収抑制活性 (骨密度の増強活性) を測定することにより、抗 O B M / s O B M 抗体による破骨細胞形成抑制活性を測定することができる。

【0050】

このようにして得られた O B M / s O B M の生物活性を中和する抗体は、医薬として、特に骨代謝異常症の予防及び / 又は治療を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断のための抗体として有用である。本発明抗体は、製剤化して経口的あるいは非経口的に投与することができる。本発明抗体を含む製剤は、O B M 及び / 又は s O B M を認識する抗体を有効成分として含有する医薬組成物として、ヒトあるいは動物に対し安全に投与されるものである。医薬組成物の形態としては、点滴を含む注射剤、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤などが挙げられる。モノクローナル抗体は高分子蛋白質

であることから、バイアル瓶などのガラス容器や注射筒などへの吸着が著しい上に不安定であり、種々の物理化学的因子、例えば熱、pHおよび湿度等により容易に失活する。従って、安定な形で製剤化するために、安定化剤、pH調整剤、緩衝剤、可溶化剤、界面活性剤などを添加する。

【0051】

安定化剤としては、グリシン、アラニン等のアミノ酸類、デキストラン40およびマンノース等の糖類、ソルビトール、マンニトール、キシリトール等の糖アルコール等が挙げられ、またこれらの二種以上を併用してもよい。これらの安定化剤の添加量は、抗体の重量に対して0.01~100倍、特に0.1~10倍添加するのが好ましい。これら安定化剤を加えることにより、液状製剤あるいは凍結乾燥製剤の保存安定性を向上することができる。緩衝剤としては、例えばリン酸バッファー、クエン酸バッファー等が挙げられる。緩衝剤は、液状製剤あるいは凍結乾燥製剤の再溶解後の水溶液のpHを調整し、抗体の安定性、溶解性に寄与する。緩衝剤の添加量としては、例えば液状製剤あるいは凍結乾燥製剤を再溶解した後の水量に対し、1~10mMとするのが好ましい。界面活性剤としては、好ましくはポリソルベート20、プルロニックF-68、ポリエチレングリコール等、特に好ましくはポリソルベート80が挙げられ、またこれらの2種以上を併用してもよい。抗体のような高分子蛋白質は容器の材質であるガラスや樹脂などに吸着しやすい。従って、界面活性剤を添加することによって、液状製剤あるいは凍結乾燥製剤の再溶解後の抗体の、容器への吸着を防止することができる。界面活性剤の添加量としは、液状製剤あるいは凍結乾燥製剤の再溶解後の水重量に対し0.001~1.0%添加することが好ましい。以上のような安定化剤、緩衝剤、あるいは吸着防止剤を加えて本発明抗体の製剤を調製することができるが、特に医療用又は動物薬用注射剤として用いる場合は、浸透圧比として許容される浸透圧比は1~2が好ましい。浸透圧比は、製剤化に際して塩化ナトリウムの増減により調製することができる。製剤中の抗体含量は、適用疾患、適用投与経路などに応じて適宜調整することができ、ヒトに対するヒト型化抗体の投与量は、抗体のヒトOBM/sOBMに対する親和性、即ちヒトOBM/sOBMに対する解離定数(Kd値)に依存し、親和性が高い(Kd値が低い)ほど、ヒトへの投与量を少なく薬効を発現することができる。又、ヒト型抗体はヒト血中での半減期が約20日間と長いことから、例えばヒトに対して投与する際には、約0.1~100mg/kgを1~30日間に1回以上投与すれば良い。

【0052】

【実施例】

以下の実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

【実施例1】

本発明蛋白質の製造

(1) ST2細胞の大量培養

マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株ST2(RIKEN CELL BANK, RCB O224)は、10%牛胎児血清を含む α -MEM培地を用いて培養した。付着細胞用225cm²Tフラスコでコンフルエントになるまで培養したST2細胞を、トリプシン処理してTフラスコから剥がし洗浄した後、5枚の225cm²Tフラスコに移し、 10^{-8} M活性型ビタミンD₃(Calcitriol)、 10^{-7} Mデキサメサゾン、及び10%牛胎児血清を添加した α -MEM培地各々60mlを加えてCO₂インキュベーター中で7~10日間培養した。培養したST2細胞はセルスクレイパーを用いて回収し、使用するまで-80℃で保存した。

【0053】

(2) 膜画分の調製と膜結合蛋白質の可溶化

225cm²のTフラスコ80枚を用いて培養した実施例1-(1)記載のST2細胞(容量約12ml)に、プロテアーゼ阻害剤(2mM APMSFP, 2mM EDTA, 2mM o-phenanthroline, 1mM leupeptin, 1

10

20

30

40

50

$\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin A 及び $100 \text{ units}/\text{ml}$ aprotinin) を含む 10 mM トリス - 塩酸緩衝液 ($\text{pH} 7.2$) を 3 倍容量 (36 ml) 加えた。ボルテックスミキサーを用いて 30 秒間この細胞を激しく攪拌した後、氷中で 10 分間放置した。

ホモジナイザー (DOUNCE TISSUE GRINDER, Asyrindge, WHEATON SCIENTIFIC 社) を用い、細胞を破碎した。この細胞破碎液に、上記のプロテアーゼ阻害剤、 0.5 M シュクロース、 0.1 M 塩化カリウム、 10 mM 塩化マグネシウム、及び 2 mM 塩化カルシウムを加えた 10 mM トリス - 塩酸緩衝液 ($\text{pH} 7.2$) の等量 (48 ml) を加え、攪拌した後、 $4,600 \times g$ で 10 分間遠心した。この遠心分離により、細胞核と未破碎の細胞を沈殿画分として分離した。遠心分離で得た上清を $4,150,000 \times g$ で 90 分間遠心し、沈殿画分として ST2 細胞の膜画分を得た。この膜画分に、上記のプロテアーゼ阻害剤、 15 mM 塩化ナトリウム、及び 0.1 M シュクロースを含む 10 mM トリス - 塩酸緩衝液 ($\text{pH} 7.2$) 8 ml を加えた後、 20% CHAPS ($3 - [(3 - \text{cholamidopropyl}) - \text{dimethylammonio}] - 1 - \text{propanesulfonate}$, Sigma 社) $200 \mu\text{l}$ を加え、 4 で 2 時間攪拌した。この液を $4,150,000 \times g$ で 60 分間遠心し、その上清を可溶化膜画分として得た。

10

【0054】

【実施例 2】

本発明蛋白質の精製

20

(1) OCIF 固定化アフィニティークラムの調製

HiTrap NHS-activated カラム (1 ml , ファルマシア社) 内のイソプロパノールを 1 mM 塩酸で置換した後、WO 96/26217 号公報記載の方法で調製した遺伝子組み換え型 OCIF 13.0 mg を含む 0.2 M NaHCO_3 / 0.5 M NaCl ($\text{pH} 8.3$) 溶液 1 ml をシリンジ (5 ml , テルモ社) を用いカラムに添加した。室温で 30 分間カップリング反応させた後、過剰な活性基を不活性化する為、 0.5 M エタノールアミン / 0.5 M NaCl ($\text{pH} 8.3$) と 0.1 M 酢酸 / 0.5 M NaCl ($\text{pH} 4.0$) を 3 ml ずつ交互に 3 回流し、再度 0.5 M エタノールアミン / 0.5 M NaCl ($\text{pH} 8.3$) に置き換え室温で 1 時間放置した。その後、 0.5 M エタノールアミン / 0.5 M NaCl ($\text{pH} 8.3$) と 0.1 M 酢酸 / 0.5 M NaCl ($\text{pH} 4.0$) で 2 度洗浄し、 50 mM Tris / 1 M NaCl / 0.1% CHAPS 緩衝液 ($\text{pH} 7.5$) に置換した。

30

【0055】

(2) OCIF 固定化アフィニティークラムによる本発明蛋白質の精製

OCIF 結合蛋白質の精製は、特に断らない限り 4 で行った。前述の OCIF 固定化アフィニティークラムを、実施例 1 - (2) 記載のプロテアーゼ阻害剤、 0.15 M 塩化ナトリウム、及び 0.5% CHAPS を加えた 10 mM トリス - 塩酸緩衝液 ($\text{pH} 7.2$) で平衡化した。このカラムに、実施例 1 - (2) 項記載の可溶化膜画分約 8 ml を流速 $0.01 \text{ ml}/\text{分}$ で負荷した。このカラムに、上記のプロテアーゼ阻害剤、 0.15 M 塩化ナトリウム、及び 0.5% CHAPS を加えた 10 mM トリス - 塩酸緩衝液 ($\text{pH} 7.2$) を流速 $0.5 \text{ ml}/\text{分}$ で 100 分間流してカラムを洗浄した。次に、プロテアーゼ阻害剤、 0.2 M 塩化ナトリウム、及び 0.5% CHAPS を加えた 0.1 M グリシン - 塩酸緩衝液 ($\text{pH} 3.3$) を流速 $0.1 \text{ ml}/\text{分}$ で 50 分間流し、カラムに吸着した蛋白質を溶出した。同様に、プロテアーゼ阻害剤、 0.2 M 塩化ナトリウム、及び 0.5% CHAPS を加えた 0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 ($\text{pH} 2.0$) を流速 $0.1 \text{ ml}/\text{分}$ で 50 分間流し、カラムに吸着した蛋白質を溶出した。溶出液は $0.5 \text{ ml}/\text{フラクション}$ にて分取した。分取した画分には、 2 M トリス溶液を加え、直ちに中和した。各緩衝液で溶出したフラクション (溶出液量 $1.0 - 5.0 \text{ ml}$) の各々をセントリコン - 10 (Centricon-10, Amicon, USA) を用いて 50 から $100 \mu\text{l}$ に濃縮した。濃縮した各フラクションの一部を分取し、それぞれに OCIF を添加後

40

50

、O C I F ポリクローナル抗体で免疫沈殿させた。その沈殿画分をS D S 化して後、S D S - P A G E にかけてO C I F に特異的な結合能を有する蛋白質のバンドが出現するフラクション (F r . N o . 3 - 1 0) を本発明蛋白質画分とした。

【 0 0 5 6 】

(3) ゲル濾過による本発明蛋白質の精製

実施例 2 - (2) 記載の方法で精製し、濃縮したO C I F 結合蛋白質 (0 . 1 M グリシン - 塩酸緩衝液、p H 3 . 3 及び 0 . 1 M クエン酸ナトリウム緩衝液、p H 2 . 0 溶出画分) を 1 0 m M T r i s - H C l , 0 . 5 M N a C l , 0 . 5 % C H A P S (p H 7 . 0) で平衡化した Superose 1 2 H R 1 0 / 3 0 カラム (ファルマシア社、1 . 0 x 3 0 c m) にかき、平衡化緩衝液を移動相として用い流速 0 . 5 m l / m i n で展開させ、0 . 5 m l ずつの画分を集めた。上記と同様にして本発明蛋白質画分 (F r . N o . 2 7 - 3 2) を同定し、各々のフラクションを C e n t r i c o n - 1 0 (A m i c o n) で濃縮した。

10

【 0 0 5 7 】

(4) 逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

前述のゲル濾過で精製したO C I F 結合蛋白質を 0 . 1 % トリフルオロ酢酸 (T F A) , 3 0 % アセトニトリルで平衡化した C₄ カラム (2 . 1 x 2 5 0 m m 、 V y d a c , U S A) に負荷した。最初の 5 0 分間でアセトニトリル濃度を 3 0 % から 5 5 % に、次の 1 0 分間でアセトニトリル濃度を 8 0 % にする勾配、流速 0 . 2 m l / m i n で溶出を行い、溶出された蛋白質のピークを 2 1 5 n m で検出した。溶出された各ピークの蛋白質を分取し本発明蛋白質のピークを同定することにより、高度に精製された本発明蛋白質を得た。

20

【 0 0 5 8 】

【 実施例 3 】

精製された本発明蛋白質の S D S - P A G E

まず、活性型ビタミン D₃ 存在下あるいは非存在下で培養した S T 2 細胞から調製した膜可溶化画分を上記のようにO C I F 固定化アフィニティーカラムで精製し、その精製標品をS D S - P A G E にかけた。図 1 (A) に示したように、活性型ビタミン D₃ 存在下で培養した S T 2 細胞からの精製標品のみに、約 3 0 , 0 0 0 - 4 0 , 0 0 0 のメジャーな蛋白質バンドが検出され、O C I F 固定化アフィニティーカラムにより、O C I F に特異的に結合する蛋白質、即ち本発明蛋白質が選択的に濃縮、精製されることが明らかになった。しかしながら、本発明蛋白質以外にO C I F 固定化カラムの担体やスペーサーなどに非特異的に結合した数種の蛋白質バンドが両精製サンプル中に共通して検出された。これらの本発明蛋白質以外の蛋白質を上記のようにゲル濾過及びC₄ 逆相クロマトグラフィーで除去し、得られた高度精製本発明蛋白質のS D S - P A G E を図 1 (B) に示した。高度精製本発明蛋白質は電気泳動的に均一であり、その分子量は約 3 0 , 0 0 0 - 4 0 , 0 0 0 であった。

30

【 0 0 5 9 】

【 実施例 4 】

O C I F の骨芽細胞への結合試験

40

(1) ¹²⁵I 標識 O C I F の調製

O C I F はヨードジェン (I o d o g e n) 法により ¹²⁵I 標識した。即ち、2 . 5 m g / m l I o d o g e n - クロロホルム溶液 2 0 μ l を 1 . 5 m l エッペンドルフチューブに移し、4 0 °C でクロロホルムを蒸発させて、ヨードジェンコートしたチューブを調製した。このチューブを 0 . 5 M リン酸ナトリウム緩衝液 (N a - P i , p H 7 . 0) 4 0 0 μ l で 3 回洗浄した後、0 . 5 M N a - P i , p H 7 . 0 , 5 μ l を加えた。このチューブに N a - ¹²⁵I 溶液 (A m e r s h a m 社、N E Z - 0 3 3 H 2 0) 1 . 3 μ l (1 8 . 5 M B q) を加えた後、直ちに 1 m g / m l r O C I F 溶液 (モノマー型あるいはダイマー型) 1 0 μ l を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、室温で 3 0 秒間放置した。この溶液を、予め 1 0 m g / m l ヨウ化カリウム、0 . 5 M N a

50

- P i , p H 7 . 0 溶液 8 0 μ l と 5 % 牛血清アルブミンのリン酸塩緩衝生理食塩水 5 μ l を添加しておいたチューブに移し攪拌した。この溶液を 0 . 2 5 % 牛血清アルブミンのリン酸塩緩衝生理食塩水溶液で平衡化しておいたスピンカラム (1 m l , G - 2 5 f i n e , フアルマシア社) に負荷し、 2 , 0 0 0 r p m で 5 分間遠心した。カラムから溶出された画分に 0 . 2 5 % 牛血清アルブミンのリン酸塩緩衝生理食塩水溶液 4 0 0 μ l を加え攪拌した後、 2 μ l を取り、その放射能をガンマカウンタで測定した。このようにして調製した 125 I 標識 O C I F 溶液の放射化学純度は 1 0 % T C A により沈殿する画分の放射能を測定することにより求めた。又、 125 I 標識 O C I F 溶液の O C I F 生物活性は、 W O 9 6 / 2 6 2 1 7 号公報記載の方法に従い測定した。又、 125 I 標識 O C I F 濃度は以下のように E L I S A により測定した。

10

【 0 0 6 0 】

(2) 125 I 標識 O C I F 濃度の E L I S A による測定

W O 9 6 / 2 6 2 1 7 号公報記載の抗 O C I F ウサギポリクローナル抗体を 2 μ g / m l になるように溶解させた 5 0 m M N a H C O ₃ (p H 9 . 6) 1 0 0 μ l ずつを 9 6 ウェルイムノプレート (M a x i S o r p ^{T M} , N u n c 社) の各ウェルに加えて 4 で一晩放置した。この液を吸い取った後、ブロックエース (雪印乳業) / リン酸塩緩衝生理食塩水溶液 (2 5 / 7 5) 3 0 0 μ l ずつを各ウェルに加え、室温で 2 時間放置した。この液を吸い取った後、各ウェルを 0 . 0 1 % ポリソルベート 8 0 を含むリン酸塩緩衝生理食塩水 (P - P B S) で 3 回洗浄し、次いで 125 I 標識 O C I F サンプルあるいは O C I F 標準品を添加したブロックエース / リン酸塩緩衝生理食塩水溶液 (2 5 / 7 5) 3 0 0 μ l ずつを各ウェルに加え、室温で 2 時間放置した。この液を吸い取った後、 P - P B S 2 0 0 μ l で各ウェルを 6 回洗浄した。パーオキシダーゼ標識したウサギ抗 O C I F ポリクローナル抗体を含むブロックエース (雪印乳業) / リン酸塩緩衝生理食塩水溶液 (2 5 / 7 5) 1 0 0 μ l ずつを各ウェルに加え、室温で 2 時間放置した。この液を吸い取った後、 P - P B S 2 0 0 μ l で各ウェルを 6 回洗浄した。 T M B 溶液 (T M B S o l u b l e R e a g e n t , H i g h S e n s i t i v i t y , S c y t e k 社) 1 0 0 μ l ずつを各ウェルに加え、室温で 2 - 3 分放置した後、停止液 (S t o p p i n g R e a g e n t , S c y t e k 社) 1 0 0 μ l ずつを各ウェルに加えた。各ウェルの 4 9 0 n m における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。 O C I F 標準品を用いて作製した検量線より、 125 I 標識 O C I F の濃度を求めた。

20

30

【 0 0 6 1 】

(3) O C I F の骨芽細胞あるいは脾臓細胞への結合試験

マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株 S T 2 あるいは脾臓細胞をそれぞれ 4×10^4 c e l l / m l 及び 2×10^6 c e l l / m l の濃度になるように、 10^{-8} M 活性型ビタミン D ₃ (C a l c i t r i o l) 及び 10^{-7} M デキサメサゾン添加あるいは無添加の 1 0 % 牛胎児血清 (F B S) を含む α - M E M 培地に懸濁させ、この培地 1 m l ずつを 2 4 ウェルマイクロプレートに播種した。細胞を C O ₂ インキュベーター中で 4 日間培養し α - M E M 培地で洗浄した後、上記の 125 I 標識 O C I F (モノマー型又はダイマー型) 2 0 n g / m l を加えた結合試験用培地 (0 . 2 % 牛血清アルブミン、 2 0 m M H e p e s 緩衝液、 0 . 2 % N a N ₃ を加えた α - M E M 培地) 2 0 0 μ l を各ウェルに加えた。又、別のウェルには、 8 μ g / m l r O C I F (4 0 0 倍濃度) を更に添加した結合試験用培地を 2 0 0 μ g / m l 加え、非特異的吸着量測定に供した。 C O ₂ インキュベーター中で 1 時間培養した後、 1 m l のリン酸塩緩衝生理食塩水 1 m l で 3 回洗浄した。この際、脾臓細胞は浮遊細胞であるため、 2 4 ウェルプレートを遠心分離しながら、各ウェルの細胞を洗浄した。洗浄後、 0 . 1 N N a O H 溶液 5 0 0 μ l を各ウェルに加え、室温に 1 0 分間放置することにより細胞を溶解させ、細胞に結合した R I 量をガンマカウンタで測定した。

40

125 I 標識 O C I F は、培養した脾臓細胞には結合せず、図 2 に示したように、活性型ビタミン D ₃ で培養した骨芽細胞様ストローマ細胞にのみ特異的に結合した。

このことから、本発明蛋白質は活性型ビタミン D ₃ とデキサメサゾンにより骨芽細胞様ス

50

トローマ細胞上に誘導される膜結合蛋白質であることが明らかになった。

【0062】

【実施例5】

本発明蛋白質の生物活性

(1) 骨芽細胞様ストローマ細胞の破骨細胞形成支持能

骨芽細胞の破骨細胞形成支持能は、形成される破骨細胞の酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性 (TRAP 活性) を測定することによって評価した。即ち、ddy マウス (8 - 12 週齢) の脾臓細胞 (2×10^5 cells / 100 μ l / well) とマウス骨芽細胞様ストローマ細胞 ST2 (5×10^3 cells / 100 μ l / well) を 10^{-8} M 活性型ビタミン D₃、 10^{-7} M デキサメサゾン、及び 10 % 牛胎仔血清を加えた α - MEM 培地に懸濁させ、96 ウェルプレートに播種した。CO₂ インキュベーター中で 1 週間培養した後、各ウェルをリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄し、更に 100 μ l のエタノール / アセトン (1 : 1) を加えて、室温で 1 分間固定した。固定後、5 mM p - nitrophenol phosphate と 10 mM 酒石酸ナトリウムを含む 50 mM クエン酸緩衝液、pH 4.5、100 μ l を各ウェルに加え、室温で 15 分間反応させた。反応後、0.1 N NaOH 溶液を各ウェルに添加し、405 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。RIKEN CELL BANK から購入した後の継代数約 10 代の ST2 細胞と継代数約 40 代の ST2 細胞の破骨細胞形成支持能を試験した結果を図 3 に示す。この結果から、継代数の多い ST2 細胞は破骨細胞形成支持能が高いことが明らかになった。

10

20

【0063】

(2) 活性型ビタミン D₃ 及びデキサメサゾン存在下での培養における骨芽細胞様ストローマ細胞膜上の本発明蛋白質発現の経時変化と共培養系における破骨細胞形成の経時変化

実施例 4 - (3) と同様に、骨芽細胞様ストローマ細胞株 ST2 を活性型ビタミン D₃ 及びデキサメサゾン存在下で 7 日間培養した。OCIF 結合試験は、実施例 4 - (1) に記載した ¹²⁵I 標識 OCIF (モノマータイプ) を用いて行った。非特異的結合は 400 倍濃度の非標識 OCIF を用いて ¹²⁵I 標識 OCIF の ST2 細胞への結合を競合させることにより測定した。その結果、活性型ビタミン D₃ とデキサメサゾンにより、培養日数の経過と共に ¹²⁵I 標識 OCIF の特異的結合量が上昇した。即ち、図 4 及び図 5 に示したように本発明蛋白質は活性型ビタミン D₃ により ST2 細胞の表面に培養日数と共に発現し、その発現は培養 4 日目に最大に達した。一方、マウス脾臓細胞と ST2 細胞の共培養を活性型ビタミン D₃ 存在下で行うことにより、破骨細胞様の細胞が形成される。破骨細胞のマーカー酵素である TRAP 陽性の単核前破骨細胞様細胞は培養 3、4 日目には形成され、さらに分化、成熟した TRAP 陽性の多核細胞は培養 5、6 日目に形成される。本発明蛋白質の発現の経時変化と破骨細胞形成のそれとは良く相関していることが明らかになった。

30

【0064】

(3) 共培養期間において、種々の培養期間のみ OCIF 処理した場合の破骨細胞形成抑制効果

本発明蛋白質が破骨細胞形成に関与する因子であることを更に明確にするために、前述の実施例 5 - (2) における 6 日間の共培養期間において、種々の培養期間 (各 2 日間、但し 5 日目のみ 1 日間) の細胞を、100 ng / ml の OCIF で処理した。その結果、図 6 に示したように、ST2 細胞上に最も本発明蛋白質が発現される培養 48 - 96 時間目での OCIF 処理が最も効果的に破骨細胞の形成を抑制した。即ち、OCIF は本発明蛋白質を介して ST2 細胞に結合することにより、破骨細胞形成を抑制することが明らかになった。

以上の結果から、本発明蛋白質は活性型ビタミン D₃ とデキサメサゾンにより骨芽細胞様ストローマ細胞膜上に誘導され、破骨細胞の分化、成熟を支持又は促進する因子としての生物活性 (作用) を有することが明らかになった。

40

50

【 0 0 6 5 】

【 実施例 6 】

^{1 2 5}I 標識 O C I F と本発明蛋白質とのクロスリンク試験

本発明蛋白質の存在をさらに確認するため、^{1 2 5}I 標識 O C I F と本発明蛋白質とのクロスリンクを行った。実施例 4 - (3) と同様にマウス骨芽細胞様細胞株 S T 2 を活性型ビタミン D₃ 及びデキサメサゾン存在下及び非存在下で 4 日間培養した。細胞をリン酸塩緩衝生理食塩水 1 m l で洗浄した後、上記の^{1 2 5}I 標識 O C I F (モノマー型) 2 5 n g / m l、又は W O 9 6 / 2 6 2 1 7 号公報にある配列表配列番号 7 6 記載の蛋白質を動物細胞で発現させ上記の方法で標識することにより得られた^{1 2 5}I 標識 O C I F - C D D 1 4 0 n g / m l を加えた結合試験用培地 (0 . 2 % 牛血清アルブミン、2 0 m M H e p e s 緩衝液、0 . 2 % N a N₃、及び 1 0 0 μ g / m l ヘパリンを加えた α - M E M 培地) 2 0 0 μ l を添加した。又、別のウェルには、4 0 0 倍濃度の O C I F を更に添加した結合試験用培地を添加し、非特異的吸着試験に供した。C O₂ インキュベーター中で 1 時間培養した後、1 0 0 μ g / m l ヘパリンを加えたリン酸塩緩衝生理食塩水 1 m l で 3 回洗浄した。これらのウェルに 1 0 0 μ g / m l のクロスリンク剤、D S S (D i s u c c i n i m i d y l s u b e r a t e、P i e r c e 社) を溶解させたリン酸塩緩衝生理食塩水 5 0 0 μ l を加え、0 で 1 0 分間反応させた。これらのウェルの細胞を 0 に冷却したリン酸塩緩衝生理食塩水 1 m l で 2 回洗った後、1 % T r i t o n X - 1 0 0、2 m M P M S F (p h e n y l m e t h y l s u l f o n y l f l u o r i d e)、1 0 μ M p e p s t a t i n、1 0 μ M l e u p e p t i n、1 0 μ M a n t i p a i n、及び 2 m M E D T A を加えた 2 0 m M H e p e s 緩衝液 1 0 0 μ l を各ウェルに加えて室温に 3 0 分間放置して細胞を溶解させた。これらのサンプル 1 5 μ l を常法により非還元条件下で S D S 化した後、S D S - ポリアクリルアミド電気泳動用ゲル (4 - 2 0 % ポリアクリルアミドグラジエント、第一化学社) を用いて泳動させた。泳動後、ゲルを乾燥させ、B i o M a x M S フィルム (K o d a k 社) と B i o M a x M S 増感スクリーン (K o d a k 社) を用いて - 8 0 で 2 4 時間感光させた。感光させたフィルムを常法により現像した。

^{1 2 5}I 標識 O C I F (モノマー型、6 0 k D a) を用いた場合には分子量約 9 0 , 0 0 0 - 1 0 , 0 0 0 のクロスリンクされた蛋白質が検出された。又、^{1 2 5}I 標識 O C I F - C D D 1 (3 1 k D a) を用いた場合、図 7 に示すように約 7 0 - 8 0 k D a (平均 7 8 k D a) のクロスリンクされた蛋白質が検出された。

【 0 0 6 6 】

【 実施例 7 】

S T 細胞上に発現する本発明蛋白質の S c a t c h a r d P l o t による解析

上記の^{1 2 5}I 標識 O C I F (モノマー型) を 1 , 0 0 0 p M になるように加えた結合試験用培地 (0 . 2 % 牛血清アルブミン、2 0 m M H e p e s 緩衝液、0 . 2 % N a N₃ を加えた α - M E M 培地) を調製し、結合試験用培地を用い、1 / 2 希釈倍率で段階的に希釈した。又、非特異的な結合を求めるため、これらの溶液に更に 4 0 0 倍濃度の未標識モノマー型 O C I F を添加した溶液を調製した。調製したこれらの溶液 2 0 0 μ l を 1 0⁻⁸ M 活性型ビタミン D₃ (C a l c i t r i o l) と 1 0⁻⁷ M デキサメサゾン存在下で 4 日間培養した上記の S T 2 細胞 (約 1 0 継代目) のウェルに加えて、実施例 4 - (3) と同様の方法で^{1 2 5}I 標識 O C I F の結合を試験した。得られた結果を常法に従って S c a t c h a r d P l o t し、O C I F と O C I F 結合蛋白質の解離定数と S T 2 細胞当たりの O C I F 結合蛋白質の個数 (サイト数) を求めた。その結果、O C I F と本発明蛋白質の解離定数は 2 8 0 p M、S T 2 細胞当たりの O C I F 結合蛋白質のサイト数は約 3 3 , 0 0 0 個 / 細胞であった。又、実施例 5 - (1) で記載したように、約 4 0 継代培養した S T 2 細胞は破骨細胞形成支持能が 1 0 継代培養した S T 2 細胞よりも高かったことから、前者の S T 2 細胞上に発現した本発明蛋白質のサイト数を測定したところ、サイト数が 5 8 , 0 0 0 個 / 細胞であり、明らかに 1 0 継代培養した S T 2 細胞よりも多く、本発明蛋白質の発現量の多寡が S T 2 細胞による破骨細胞形成支持能の強弱に繋がっ

ていることが明らかになった。このことは、本発明蛋白質は破骨細胞の分化、成熟を支持又は促進する因子であることを示す。

【0067】

【実施例8】

OBMC DNAのクローニング

(1) マウスST2細胞からのRNAの抽出

マウス骨芽細胞様ストローマ細胞株ST2 (RIKEN CELL BANK, RCB O224) は、10% 牛胎児血清を含む α -MEM培地 (ギブコBRL社) を用いて培養した。付着細胞用225 cm² T-フラスコでコンフルエントになるまで培養したST2細胞を、トリプシン処理してT-フラスコから剥がし洗浄した後、5枚の225 cm² T-フラスコに移し、 10^{-8} M活性化ビタミンD₃ (Calcitriol、和光純薬社)、 10^{-7} Mデキサメサゾン、及び10%牛胎児血清を添加した α -MEM培地を各々60 mlずつ加えてCO₂ インキュベーター中で5日間培養した。培養したST2細胞からISOGEN (和光純薬社) を用いて総RNAを抽出した。総RNA約600 μ gからOligo (dT) - celluloseカラム (5' - 3' Prime社) を用いてポリA⁺ RNAを調製した。約8 μ gのポリA⁺ RNAを得た。

10

【0068】

(2) 発現ライブラリーの構築

実施例8 - (1) で得られたポリA⁺ RNA 2 μ gからGreat Lengths cDNA Synthesis kit (Clontech社) を用い、その説明書に従い二本鎖cDNAを合成した。即ち、ポリ⁺ RNA 2 μ gとOligo (dT)₂₅ (dN) プライマーを混合し蒸留水を加え最終容量を6.25 μ lとし、70℃で3分保温後、氷中で2分冷却した。この溶液に蒸留水2.2 μ l、5X First-strand buffer 2.5 μ l、100 mM DTT (ジチオスレイトール) 0.25 μ l、PRIME RNase Inhibitor (1 U/ml) (5' - 3' Prime社) 0.5 μ l、5倍希釈した [α -³²P] dCTP (アマシャム社、3000 Ci/mmol、2 μ Ci/ μ l) 0.5 μ l、dNTP (各20 mM) 0.65 μ l、MMLV (RNase H⁻) 逆転写酵素1.25 μ l (250ユニット) を加え、42℃で90分保温した。さらに、蒸留水を62.25 μ l、5X second-strand buffer 20 μ l、dNTP (各20 mM) 0.75 μ l、Second-strand enzyme cocktail 5 μ lを添加し、16℃で2時間保温した。この反応液にT4 DNA polymerase 7.5ユニットを加え、16℃でさらに30分保温後0.2 M EDTA 5 μ l添加して反応を停止し、フェノール・クロロフォルム処理後、エタノール沈殿を行った。この二本鎖cDNAの末端にEcoRI-SalI-NotIリンカー (Clontech社) を付加し末端をリン酸化した。サイズフラクショネーション用カラムにより500 bp以上のcDNAを分離し、エタノール沈殿を行った。沈殿したDNAを水に溶解し、あらかじめ制限酵素EcoRI (宝酒造社) 切断及びCIAP (ウシ小腸アルカリフォスファターゼ、宝酒造社) 処理して調製したpcDL-SR α 296 (Molecular and Cellular Biology, Vol. 8, pp 466 - 472, 1988) に挿入した。

20

30

40

【0069】

(3) OCIFとの結合を指標とした発現ライブラリーのスクリーニング

実施例8 - (2) で得られたDNAを用い大腸菌、XL2 Blue MRF' (東洋紡社) を形質転換し、1ウェルあたり約100コロニーとなるように細胞培養用24ウェルプラスチックプレートに調製したL-カーベニシリン寒天培地 (1%トリプトン、0.5%イーストエキス、1% NaCl、60 μ g/mlカーベニシリン、1.5%寒天) 上に増殖させた。各ウェル中の形質転換株を3 mlのTerrific Brothアンピシリン培地 (1.2%トリプトン、2.4%イーストエキス、0.4%グリセロール、0.017 M KH₂PO₄、0.072 M K₂HPO₄、100 μ g/mlアンピシリン

50

に懸濁し、37 で一晩振盪培養した。遠心により集菌しQ I A w e l l k i t (Q I A G E N 社) を用いてプラスミドDNAを調製した。260nmにおける吸光度によりDNA含量を測定し、エタノール沈殿により濃縮し、200ng/μlとなるように蒸留水に溶解した。この様にしてそれぞれ約100個のコロニーから由来するDNAプールを500プール調製し、COS-7細胞(R I K E N C E L L B A N K , R C B O 5 3 9) へのトランスフェクションに用いた。COS-7細胞を24ウェルプレートに8×10⁴細胞/ウェルとなるように播種し、10% 牛胎児血清を含むDMEM培地を用いて、CO₂ インキュベーター中で37 にて一晩培養した。翌日、培地を除いた後、無血清DMEM培地で細胞を洗浄した。トランスフェクション用試薬リポフェクトアミン(ギブコBRL社)添付のプロトコールに従い、予めOPTI-MEM培地(ギブコBRL社)を用いて希釈しておいた前記プラスミドDNAとリポフェクトアミン(ギブコBRL社)を混合し、15分後この混合液を各ウェルの細胞に加えた。用いたDNA及びリポフェクタミンの量はそれぞれ1μg及び4μlとした。5時間後、培地を除去し、1mlの10% 牛胎児血清を含むDMEM培地(ギブコ社)を添加し、CO₂ インキュベーター中(5% CO₂)、37 で2-3日培養した。上記の様にトランスフェクトし2-3日培養したCOS-7細胞を無血清DMEM培地で洗浄した後、¹²⁵I 標識したOCIF 20ng/mlを加えた結合試験用培地(0.2%牛血清アルブミン、20mM H e p e s 緩衝液、0.1mg/ml h e p a r i n 及び0.02% N a N ₃を加えた無血清DMEM培地) 200μlを各ウェルに加えた。CO₂ インキュベーター中(5% CO₂)で37 1時間培養した後、細胞を0.1mg/ml h e p a r i nを含むリン酸塩緩衝生理食塩水500μlで2回洗浄した。洗浄後、0.1N N a O H 溶液 500μlを各ウェルに加え、室温に10分間放置することにより細胞を溶解させ、各ウェル中の¹²⁵Iの量をガンマカウンター(パッカード社)で測定した。計500プールをスクリーニングすることにより、OCIFと特異的に結合する蛋白質をコードするcDNAを含むDNAプール1つを分離した。さらに本発明のcDNAを含むDNAプールを細分化し、前記と同様のトランスフェクションとスクリーニング操作を繰り返すことにより、OCIFと結合する蛋白質をコードするcDNAを単離した。このcDNAを含むプラスミドをpOBM291と名付けた。このプラスミドを含む大腸菌は、pOBM291として通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(現独立行政法人産業技術総合研究所 微生物寄託センター)に受託番号FERM BP-5953として平成9年5月23日に寄託されている。OCIFの¹²⁵I 標識ならびにELISAによる¹²⁵I 標識OCIFの定量法を以下に示す。OCIFはヨードジェン(I o d o g e n) 法により¹²⁵I 標識した。2.5 mg/ml I o d o g e n - クロロホルム溶液20μlを1.5 mlエッペンドルフチューブに移し、40 でクロロホルムを蒸発させて、ヨードジェンコートしたチューブを調製した。このチューブを0.5Mリン酸ナトリウム緩衝液(N a - P i , p H 7.0)400μlで3回洗浄した後、0.5 M N a - P i , p H 7.0, 5μlを加えた。このチューブにN a - ¹²⁵I 溶液(A m e r s h a m 社、N E Z - 0 3 3 H 2 0) 1.3μl(18.5 M B q)を加えた後、直ちに1mg/ml OCIF溶液(モノマー型あるいはダイマー型) 10μlを加え、ボルテクスミキサーで攪拌した後、室温で30秒間放置した。この溶液を、予め10mg/ml沃化カリウム、0.5M N a - P i , p H 7.0溶液80μlと5% 牛血清アルブミンを含むリン酸塩緩衝生理食塩水(B S A - P B S) 5μl を添加しておいたチューブに移し攪拌した。この溶液をB S A - P B S で平衡化しておいたスピナラム(1ml, G - 2 5 f i n e , フアルマシア社)に負荷し、2,000rpmで5分間遠心した。カラムから溶出された画分にB S A - P B S を400μl加え攪拌した後、2μlを取り、その放射能をガンマカウンターで測定した。このようにして調製した¹²⁵I 標識OCIF溶液の放射化学純度は10% T C A により沈殿する画分の放射能を測定することにより求めた。また、¹²⁵I 標識OCIF溶液のOCIF生物活性は、WO96/26217号公報記載の方法に従い測定した。また、¹²⁵I 標識OCIF濃度は、以下のようにELISAにより測定した。即ち、WO96/2621

7号公報記載のウサギ抗OCIFポリクローナル抗体を $2\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように溶解させた 50mM NaHCO_3 , $\text{pH } 9.6$ を $100\mu\text{l}$ ずつ96ウェルイムノプレート(Nunc, MaxiSorpTM)の各ウェルに加えて4で一夜放置した。この液を吸い取った後、ブロックエース(雪印乳業)とリン酸塩緩衝生理食塩水の混合水溶液(混合比25:75)(B-PBS)を $200\mu\text{l}$ ずつ各ウェルに加え、室温で2時間放置した。この液を吸い取った後、各ウェルを 0.01% Polysorbate 80を含むリン酸塩緩衝生理食塩水(P-PBS)で3回洗浄し、次いで¹²⁵I標識OCIFサンプルあるいはOCIF標準品を添加したB-PBSを $100\mu\text{l}$ ずつ各ウェルに加え、室温で2時間放置した。この液を吸い取った後、P-PBS $200\mu\text{l}$ で各ウェルを6回洗浄した。パーオキシダーゼ標識したウサギ抗OCIFポリクローナル抗体をB-PBSで希釈した溶液を $100\mu\text{l}$ ずつ各ウェルに加え、室温で2時間放置した。この液を吸い取った後、P-PBS $200\mu\text{l}$ で各ウェルを6回洗浄した。TMB溶液(TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scyttek社)を $100\mu\text{l}$ ずつ各ウェルに加え、室温で2-3分放置した後、停止液(Stopping Reagent, Scyttek社)を $100\mu\text{l}$ ずつ各ウェルに加えた。各ウェルの450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。OCIF標準品を用いて作製した検量線より¹²⁵I標識OCIFの濃度を求めた。

10

【0070】

(4) OBMの全アミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列の決定

実施例8-(3)で得られたOBMcDNAの塩基配列を、タックダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシングキット(パーキンエルマー社)を用いて決定した。即ち、pOBM291を鋳型とし、直接挿入断片の塩基配列を決定した。また、pOBM291を制限酵素EcoRIで切断し得られた約 1.0kb ならびに約 0.7kb の断片をプラスミドpUC19(宝酒造社)のEcoRI部位に挿入し、それらの断片の塩基配列も決定した。用いたプライマーは、pcDL-SR α 296の挿入断片DNAの塩基配列を決定するためのプライマーSRR2、プラスミドpUC19の挿入断片DNAの塩基配列を決定するためのプライマーml3PrimerM3、ml3PrimerRV(ともに宝酒造社)及びOBMcDNAの塩基配列に基づいて設計された合成プライマーOBM#8である。これらプライマーの配列を配列表配列番号3~6に示す。また、決定されたOBMcDNAの塩基配列を配列番号2に、その配列から推定されるア

20

30

【0071】

〔実施例9〕

本発明cDNAにコードされる蛋白質の発現

プラスミドpOBM291を6ウェルプレートの各ウェル中でCOS-7細胞にリポフェクトアミンを用いトランスフェクションし、 10% 牛胎児血清を含むDMEM培地中で2日間培養した。 5% 透析牛胎児血清を添加した、システイン・メチオニン不含DMEM(大日本製薬社)に培地交換し($800\mu\text{l}/\text{well}$) 15 分培養した後、Express Protein Labeling Mix(NEN社、 $10\text{mCi}/\text{ml}$)を $14\mu\text{l}$ 添加した。 4 時間培養後、 10% 牛胎児血清を含むDMEM培地を $200\mu\text{l}$ 加え 1 時間培養した。細胞をPBSで2回洗浄後、 1% Triton X-100、 1% bovine hemoglobin、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin、 $0.2\text{TIU}/\text{ml}$ aprotinin、 1mM PMSFを含むTSAバッファー(0.14M NaCl 、 0.025% NaN_3 を含む 10mM Tris-HCl ($\text{pH } 8.0$))を 0.5ml 加え、氷上 1 時間静置した。ピペッティングにより細胞を破碎した後、4で $3000\times g$ 10 分間遠心分離し上清を得た。この上清 $100\mu\text{l}$ に $200\mu\text{l}$ の希釈バッファー(0.1% Triton X-100、 0.1% bovine hemoglobin、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin、 $0.2\text{TIU}/\text{ml}$ aprotinin、 1mM PMSFを含むTSAバッファー)を加え、protein A Sepharose($50\mu\text{l}$)とともに4で 1 時間振とうさ

40

50

せた後、4 で1500Xg にて1分間遠心分離し上清を回収することにより、protein A Sepharose に非特異的に吸着する分画を除いた。この上清にOCIF (1 μ g)を加え、4 で1時間振とうさせながらOBMとOCIFを結合させた後、抗OCIFポリクローナル抗体 (50 μ g)を加えて4 で1時間振とうした。これにprotein A Sepharose (10 μ l)を加えさらに4 で1時間振とうした。4 で1500Xg にて1分間遠心分離し沈澱画分を回収した。4 、1500Xg で1分間の遠心分離による沈澱の洗浄を、希釈バッファーで2回、bovine hemoglobinを含まない希釈バッファーで2回、TSAバッファーで1回、50mM Tris-HCl (pH 6.5)で1回行った。洗浄後、沈澱に10% β メルカプトエタノールを含むSDS バッファー (0.125 M Tris-HCl、4 10 %ドデシル硫酸ナトリウム、20%グリセロール、0.002%ブロモフェノールブルー、pH 6.8)を加え、100 で5分加熱後 SDS-PAGE (12.5%ポリアクリルアミドゲル、第一化学社)を行った。常法によりゲルを固定した後、Amplify (アマシャム社)により、アイソトープのシグナルを増強した後、Bio Max MRフィルム (KODAK社) を用いて-80 で感光させた。結果を図8に示す。本発明cDNAにコードされる蛋白質の分子量は約40,000であることが示された。

【0072】

〔実施例10〕

本発明cDNAにコードされる蛋白質とOCIFとの結合

プラスミドpOBM291 を24ウェルプレートの各ウェル中でCOS細胞にリポフェクトアミンを用いてトランスフェクトし、その細胞を2-3日培養したのち無血清DMEM培地で洗浄し、これに¹²⁵I 標識したOCIF 20ng/mlを加えた結合試験用培地 (0.2%牛血清アルブミン、20mM HEPES緩衝液、0.1mg/ml heparin、0.2% NaN₃を加えた無血清DMEM培地) 200 μ lを加えた。また別のウェルには、¹²⁵I 標識したOCIF 20ng/mlに加えて8 μ g/mlの非標識OCIFを更に添加した結合試験用培地を200 μ l加えて実験を行った。CO₂ インキュベーター中 (5% CO₂) で37 にて1時間培養した後、細胞を0.1mg/mlのheparinを含むリン酸緩衝生理食塩水500 μ lで2回洗浄した。洗浄後、0.1N NaOH溶液500 μ lを各ウェルに加え、室温に10分間放置することにより細胞を溶解させ、ウェル中の¹²⁵Iの量をガンマカウンターで測定した。その結果、図9に示したようにプラスミドpOBM291 をトランスフェクトした細胞にのみ¹²⁵I 標識したOCIFが結合することが確認された。また、その結合は、400倍濃度のOCIFを添加することで著しく阻害されることが確認された。以上の結果から、プラスミドpOBM291上のcDNAにコードされる蛋白質、OBMは、COS-7細胞表面でOCIFと特異的に結合することが明らかとなった。

【0073】

〔実施例11〕

¹²⁵I 標識したOCIFと本発明cDNAにコードされる蛋白質とのクロスリンク試験

本発明cDNAにコードされる蛋白質の性質をさらに詳しく解析するため、¹²⁵I 標識したモノマー型OCIFと本発明cDNAにコードされる蛋白質とのクロスリンクを行った。実施例8-(3)に記載の方法に従ってプラスミドpOBM291をCOS-7細胞にトランスフェクトした後、上記の¹²⁵I 標識したOCIF (25ng/ml)を加えた結合試験用培地200 μ lを添加した。また、別のウェルには、¹²⁵I 標識したOCIFに加え400倍濃度の非標識OCIFをさらに添加した結合試験用培地を加えた。CO₂ インキュベーター中 (5% CO₂) で37 1時間培養した後、細胞を0.1mg/ml heparinを含むリン酸緩衝生理食塩水500 μ lで2回洗浄した。この細胞に100 μ g/mlのクロスリンク剤、DSS (Disuccinimidyl suberate, Pierce社)を溶解させたリン酸緩衝生理食塩水500 μ lを加え、0 で10分間反応させた。これらのウェル 40 50

の細胞を 0 に冷却したリン酸緩衝生理食塩水 1 ml で 2 回洗った後、この細胞に 1 % Triton X - 100 (和光純薬社)、2 mM PMSF (phenyl methylsulfonyl fluoride、シグマ社)、10 μ M pepstatin (和光純薬社)、10 μ M leupeptin (和光純薬社)、10 μ M aprotinin (和光純薬社)、及び 2 mM EDTA (和光純薬社)を含む 20 mM Hepes 緩衝液 100 μ l を加え、室温に 30 分間放置して細胞を溶解させた。これらのサンプル 15 μ l を常法により還元条件下で SDS 化した後、SDS - 電気泳動用ゲル (4 - 20 % ポリアクリルアミドグラジエント、第一化学社) を用いて泳動した。泳動後、ゲルを乾燥させ、BioMax MS フィルム (Kodak 社) と BioMax MS 増感スクリーン (Kodak 社) を用いて - 80 で 24 時間感光させた。感光させたフィルムを常法により現像した。この結果、¹²⁵I 標識モノマー型 OCIF と本発明 cDNA によりコードされる蛋白質をクロスリンクさせることにより、図 10 に示すように分子量約 90,000 - 110,000 のバンドが検出された。

10

【0074】

〔実施例 12〕

ノーザンブロットによる解析

付着細胞用 25 cm² T フラスコでコンフルエントになるまで培養した ST2 細胞を、トリプシン処理して T フラスコから剥がし洗浄した後、1 枚の 225 cm² T フラスコに播種し、10⁻⁸ M 活性化ビタミン D₃、10⁻⁷ M デキサメサゾン、及び 10 % 牛胎児血清を添加した α - MEM 培地各々 60 ml を加えて CO₂ インキュベーター中で 4 日間培養した。培養した ST2 細胞から ISOGEN (和光純薬社) を用いて総 RNA を抽出した。また、活性化ビタミン D₃ とデキサメサゾン非存在下で培養した ST2 細胞からも上記の方法で総 RNA を抽出した。各総 RNA 20 μ g (4.5 μ l) にそれぞれ 2.0 μ l の 5X ゲル泳動緩衝液 (0.2 M モルホリノプロパンスルホン酸、pH 7.0、50 mM 酢酸ナトリウム、5 mM EDTA)、3.5 μ l のホルムアルデヒド及び 10.0 μ l のホルムアミドを加え 55 で 15 分保温後、電気泳動に供した。電気泳動用のゲルは 1.0 % アガロース、2.2 M 脱イオン化ホルムアルデヒド、40 mM モルホリノプロパンスルホン酸 pH 7.0、10 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA の組成で調製した。

20

また、電気泳動は 40 mM モルホリノプロパンスルホン酸、pH 7.0、10 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA の緩衝液中で行った。電気泳動後、RNA をナイロンメンブレンに転写した。pOBM291 を制限酵素 EcoRI で切断して得られた、約 1.0 kb の DNA 断片を、メガプライム DNA ラベリングキット (アマシャム社) 及び α - ³²P - dCTP (アマシャム社) を用いて標識したものをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、図 11 に示すように、ST2 細胞では活性化ビタミン D₃ とデキサメサゾンの存在下で培養した場合に、本発明 cDNA にコードされる蛋白質 (OBM) の遺伝子発現が強く誘導されていることが明らかとなった。

30

【0075】

〔実施例 13〕

本発明 cDNA にコードされる蛋白質の破骨細胞形成支持能

実施例 8 - (3) に記載の方法で COS 細胞に pOBM291 をトランスフェクトした。3 日後トリプシナイズした細胞をリン酸塩緩衝生理食塩水で一回遠心洗浄したのち、1 % パラフォルムアルデヒドを含む PBS に細胞をサスペンドしながら室温で 5 分間固定し、PBS にて 6 回遠心洗浄した。10⁻⁸ M 活性化ビタミン D₃、10⁻⁷ M デキサメサゾン、10 % 牛胎児血清を含む α - MEM 培地にて調製した 1 $\times$ 10⁶ 個/ml のマウス脾臓細胞及び 4 $\times$ 10⁴ 個/ml の ST2 細胞を 24 ウェルプレートにそれぞれ 700 μ l、350 μ l 添加したのち TC インサート (Nunc 社) を各ウェルにセットした。上記培地にて段階希釈した固定化 COS 細胞 (350 μ l) 及び OCIF (50 μ l) を TC インサート中に添加して 37 で 6 日間培養した。この結果、OC

40

50

IFによる破骨細胞形成阻害活性が、本発明cDNAにコードされる蛋白質により抑制されることが明らかとなった。

【0076】

〔実施例14〕

分泌型OBMの発現

(1) 分泌型OBM発現プラスミドの構築

OBM HF (配列表配列番号7)とOBM XR (配列表配列番号8)をプライマー、pOBM291を鋳型としPCR反応を行った。この生成物を、アガロースゲル電気泳動で精製した後、制限酵素HindIII、EcoRIで切断し、さらにアガロースゲル電気泳動で精製した。この精製断片(0.6kb)を、pSec Tag A (インビトロゲン社)のHindIII/EcoRV断片(5.2kb)と、OBM cDNAのEcoRI/PmaCI断片(0.32kb)とともにライゲーションキットver.2 (宝酒造社)を用いてライゲーションを行い、その反応生成物を用いて大腸菌DH5αを形質転換した。得られたアンピシリン耐性株より、アルカリSDS法によりプラスミドを精製し、制限酵素で切断することによりpSec Tag Aに0.6Kbと0.32kbの断片が挿入されたプラスミドを選び出した。

さらにこのプラスミドにつきダイターミネーターサイクルシーケンシングFSキット(パーキン・エルマー社)を用いてシーケンスを行い、このプラスミドが分泌型OBMをコードする配列(塩基配列:配列表配列番号2の338~1355番、アミノ酸配列:配列表配列番号1の72~316番)を持っていることを確認した。このプラスミドを制限酵素NheI、XhoIで切断した後、分泌型OBM cDNAに相当する断片(1.0kb)をアガロースゲル電気泳動で回収した。この断片をライゲーションキットを用いて発現ベクターpCEP4 (インビトロゲン社)のNheI/XhoI断片(10.4kb)に挿入し、その反応生成物を用いて大腸菌DH5αを形質転換した。得られたアンピシリン耐性株より、アルカリSDS法によりプラスミドを精製し、制限酵素で切断して解析することにより、目的の構造を持った分泌型OBM発現プラスミド(pCEP sOBM)を持つ大腸菌株を選び出した。pCEP sOBMを持つ大腸菌株を培養し、キアフィルタープラスミドミディキット(キアゲン社)を用いてpCEP sOBMを精製した。

【0077】

(2) 分泌型OBMの発現

293-EBNA細胞を10%FCSを含むIMDM(IMDM-10%FCS)に懸濁し、コラーゲンコートした24ウェルプレート(住友ベークライト社)に 2×10^5 個/2ml/ウェルになるように播種し、一晚培養した。この細胞に1μgのpCEP sOBM又はpCEP4をリポフェクトアミン(ギブコ社)4μlを用いて形質導入し、0.5mlの無血清IMDM又はIMDM-10%FCS中でさらに2日間培養し、その培養上清を回収した。分泌型OBMの培養上清中での発現は、以下のようにして確認した。培養上清に最終濃度0.1Mになるよう炭酸水素ナトリウムを加えた後、培養液を96ウェルプレートに添加し、4℃で一晩放置し、培養上清中のOBMを96ウェルプレートに固相化した。このプレートをPBSで4倍希釈したブロックエース(雪印乳業社)溶液(B-PBS)で室温に2時間放置しブロッキングした後、B-PBSで希釈した3-100ng/mlのOCIFを各ウェルに100μlずつ加え37℃で2時間放置した。0.05% Tween 20を含むPBS(PBS-T)でプレートを洗浄した後、B-PBSで希釈したWO96/26217号記載のパーオキシダーゼ標識ウサギ抗OCIFポリクローナル抗体を各ウェルに100μlずつ添加し、37℃で2時間放置した。PBS-Tで各ウェルを6回洗浄した後、TMB溶液(TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek社)を100μlずつ各ウェルに加え、室温で約10分放置した後、停止液(Stopping Reagent, Scytek社)を100μlずつ各ウェルに加えた。各ウェルの450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。結果を図1

10

20

30

40

50

2に示す。pCEP sOBMを形質導入した細胞の培養上清を固相化したプレートでは、添加したOCIFの濃度に依存して450nmの吸収が増加したが、ベクターpCEP4を形質導入した細胞の培養上清を固定化した場合は吸収の増加はみられなかった。又、固定化に用いる培養上清の割合を5-90%の範囲で種々に変化させ、一定濃度のOCIF(50ng/ml)を添加した際の実験の結果を図13に示す。pCEP sOBMを形質導入した細胞の培養上清を固相化したプレートでは、培養上清の割合が高くなるほど450nmの吸収が増加したが、ベクターpCEP4を形質導入した細胞の培養上清を固定化したプレートでは、吸収の増加は見られなかった。以上の結果より、分泌型OBMが、pCEP sOBMを形質導入した細胞の培養上清中に生産されていることが確認された。

10

【0078】

〔実施例15〕

チオレドキシン - OBM 融合蛋白質 (Trx - OBM) の発現

(1) チオレドキシン - OBM 融合蛋白質 (Trx - OBM) 発現ベクターの構築

10μlの10X ExTaqバッファー(宝酒造社)、8μlの10mM dNTP(宝酒造社)、77.5μlの滅菌蒸留水、2μlのpOBM291水溶液(10ng/μl)、1μlのプライマーOBM3(100pmol/μl、配列表配列番号9)、1μlのプライマーOBMSalR2(100pmol/μl、配列表配列番号10)、0.5μlのExTaq(5u/μl)(宝酒造社)を混合しマイクロ遠心管中でPCR反応を行った。95 5分、50 1秒、55 1分、74 1秒、72 5分の反応後、96 1分、50 1秒、55 1分、74 1秒、72 3分の反応を25サイクル行った。1%アガロースゲル電気泳動により、反応液全量から約750bpのDNA断片をQIAEXII gel extraction kit(QIAGEN社)を用いて精製した。精製したDNA断片全量を制限酵素SalI, EcoRI(宝酒造社)で切断した後、1.5%アガロースゲル電気泳動を行い約160bpのDNA断片(断片1)を精製し20μlの滅菌蒸留水に溶解した。同様に、4μgのpOBM291を制限酵素BamHI, EcoRI(宝酒造社)で切断し得られた約580bpのDNA断片(断片2)、及び2μgのpTrxFus(InVitrogen社)を制限酵素BamHI, SalI(宝酒造社)で切断し得られた約3.6kbのDNA断片(断片3)をそれぞれ精製し、それぞれを20μlの滅菌蒸留水に溶解した。DNA断片の精製にはQIAEXII gel extraction kitを用いた。断片1、断片2、断片3をDNALigation kit ver.2(宝酒造社)を用い、16で2時間30分保温することにより結合させた。ライゲーション反応液を用い大腸菌GI724株(インビトロゲン社)をThioFusion Expression System(インビトロゲン社)添付のInstruction Manualに記載の方法で形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換株の中から、制限酵素切断により得られるDNA断片地図の解析並びにDNA配列の決定により、OBMcDNA断片(塩基配列:配列表配列番号2の350~1111、アミノ酸配列:配列表配列番号1の76~316)がチオレドキシン遺伝子に同じ読み枠で結合しているプラスミドを持つ菌株を選び出した。得られた菌株をGI724/pTrxOBM25と名付けた。

20

30

40

【0079】

(2) 大腸菌でのOBMの発現

GI724/pTrxOBM25株及びpTrxFusを持つGI724株(GI724/pTrxFus)それぞれを2mlのRMG-Amp培地(0.6%Na₂HPO₄, 0.3%KH₂PO₄, 0.05%NaCl, 0.1%NH₄Cl, 1.2%カザミノ酸(Difco社)、1%グリセロール、1mM MgCl₂、100μg/mlアンピシリン(Sigma社)pH7.4)で30で6時間振とう培養した。菌液0.5mlを50mlのInduction培地(0.6%Na₂HPO₄, 0.3%KH₂PO₄, 0.05%NaCl, 0.1%NH₄Cl、0.

50

2 % カザミノ酸、0 . 5 % グルコース、1 m M $MgCl_2$ 、100 $\mu g / ml$ アンピシリン、p H 7 . 4) に添加し、30 で振とう培養した。OD_{600nm} の値が約 0 . 5 になった時点で最終濃度が 0 . 1 m g / ml になるように L - トリプトファンを添加し、さらに 30 での振とう培養を 6 時間継続した。菌液を 3000 $\times g$ で遠心し菌体を集め、12 . 5 m l の P B S (10 m M リン酸バッファー、0 . 15 M N a C l、p H 7 . 4) に懸濁した。懸濁液を超音波発生装置 (U l t r a s o n i c s 社) にか
け菌体を破碎し、7000 $\times g$ で 30 分遠心して上清を集め可溶性蛋白質画分とした。この可溶性蛋白質画分液 10 μl ずつを還元条件下での S D S ポリアクリルアミド (10 %) 電気泳動に供した。この結果、G I 7 2 4 / p T r x O B M 2 5 の可溶性蛋白質画分液には G I 7 2 4 / p T r x F u s の可溶性蛋白質画分液には見られない分子量約 40 k D a のバンドが検出された (図 1 4)。よって、チオレドキシンと O B M の融合蛋白質 (T r x - O B M) が大腸菌中で発現していることが確認された。 10

【 0 0 8 0 】

(3) T r x - O B M の O C I F との結合能

発現させた T r x - O B M が O C I F と結合することを以下の実験により確認した。即ち、96 ウェルイムノプレート (N u n c 社) の各ウェルに 10 m M 炭酸水素ナトリウム水溶液で 5000 倍に希釈した抗チオレドキシン抗体 (インビトロゲン社) を 100 μl ずつ添加し 4 で一晩放置した。各ウェル中の液を捨てた後、ブロックエース (雪印乳業社) を P B S で 2 倍希釈した溶液 (B A - P B S) を各ウェルに 200 μl ずつ添加し室温で 1 時間放置した。液を捨てた後、各ウェルに B A - P B S で段階希釈した上
記 G I 7 2 4 / p T r x O B M 2 5 由来及び G I 7 2 4 / p T r x F u s 由来可溶性蛋白質画分液を 100 μl ずつ添加し室温で 2 時間放置した。P B S - T で各ウェルを 3 回洗浄した後、B A - P B S で希釈した O C I F (100 n g / m l) を各ウェルに 100 μl ずつ添加し室温で 2 時間放置した。P B S - T で各ウェルを 3 回洗浄した後、B A - P B S で 2000 倍希釈した W O 9 6 / 2 6 2 1 7 号記載のパーオキシダーゼ標識ウサギ抗 O C I F ポリクローナル抗体を各ウェルに 100 μl ずつ添加し、2 時間室温で
放置した。P B S - T で各ウェルを 6 回洗浄した後、T M B 溶液 (T M B S o l u b l e R e a g e n t , H i g h S e n s i t i v i t y , S c y t e k 社) を 100 μl ずつ各ウェルに加え、室温で約 10 分放置した後、停止液 (S t o p p i n g R e a g e n t , S c y t e k 社) を 100 μl ずつ各ウェルに加えた。各ウェルの
50 n m における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。結果を図 1 5 に示す。G I 7 2 4 / p T r x F u s 由来可溶性蛋白質画分液を添加したものではありません。G I 7 2 4 / p T r x O B M 2 5 由来可溶性蛋白質画分液を添加したものではありません。その添加濃度の増加に依存して吸光度が上昇した。又、添加する可溶性画分液の希釈割合を一定 (1 %) にし、B A - P B S で段階希釈した O C I F (0 - 100 n g / m l) を添加した場合の実験結果を図 1 6 に示す。G I 7 2 4 / p T r x F u s 由来可溶性蛋白質画分液を用いたものでは O C I F 濃度に係わりなく吸光度は低いままであったが、G I 7 2 4 / p T r x O B M 2 5 由来可溶性蛋白質画分液を用いたものでは添加した O C I F 濃度に依存して吸光度が上昇した。この結果より、G I 7 2 4 / p T r x O B M 2 5 で生産される T r x - O B M は、O C I F と結
合する能力があることが確認された。 40

【 0 0 8 1 】

(4) T r x - O B M を生産する大腸菌の大量培養

G I 7 2 4 / p T r x O B M 2 5 を R M G - A m p 寒天培地 (0 . 6 % N a₂ H P O₄、0 . 3 % K H₂ P O₄、0 . 05 % N a C l、0 . 1 % N H₄ C l、2 % カザミノ酸、1 % グリセロール、1 m M $MgCl_2$ 、100 $\mu g / ml$ アンピシリン、1 . 5 % 寒天、p H 7 . 4) に白金耳で塗まつし、30 で一晩培養した。菌を 10 m l の I n d u c t i o n 培地に懸濁し、5 m l ずつを 500 m l の I n d u c t i o n 培地のはいった 2 L 用三角フラスコ計 2 本に添加し、30 で振とう培養した。OD_{600nm} の値が約 0 . 5 になった時点で最終濃度が 0 . 1 m g / m l になるように L - トリプトフ 50

ァンを添加し、さらに30 で振とう培養を6時間継続した。菌液を3000 × gで20分間遠心分離して菌体を集め、菌体を160 ml のPBSに懸濁した。懸濁液を超音波発生装置 (Ultrasonics 社) にかけて菌体を破碎し、7000 × gで30分間遠心して上清を集め可溶性蛋白質画分とした。

【0082】

(5) OCIF 固定化アフィニティーカラムの調製

TSK gel AF - トレシルトヨパール650 (東ソー社) 2 gとWO96 / 262 17号に記載の方法で調製した遺伝子組み換え型OCIF 35.0 mgを含む1.0 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 40 mlとを混合し4 で一晩ゆっくり振とうしカップリング反応を行った。過剰な活性基を不活性化する為、遠心分離により上清を除去した後、40 mlの0.1 Mトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) を沈殿した担体に加え、室温で1時間おだやかに振とうした。0.01% Polysorbate 80 と0.2 M NaClを含む0.1 M グリシン - 塩酸緩衝液 (pH 3.3) 及び0.01% Polysorbate 80 と0.2 M NaClを含む0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.0) を通液しカラムを洗浄した後、0.01% Polysorbate 80 を含む10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) で2度洗浄し、平衡化した。

【0083】

(6) OCIF 固定化アフィニティーカラムによるTrx - OBMの精製

Trx - OBM の精製は、特に断らない限り4 で行った。上記のOCIF 固定化アフィニティー担体 (10 ml) と上記実施例15 - (4) 記載の可溶性蛋白質画分液 (120 ml) とを混合後、50 ml遠心管 (4本) 中で、ローターを用いて4 で一晩おだやかに振とうした。この混合液中の担体をエコノカラム (バイオラッド社、内径1.5 cm 長さ15 cm) に充填した。0.01% Polysorbate 80 を含むPBS 300 ml、0.01% Polysorbate 80 と2 M NaClを含む10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 100 ml、及び0.01% Polysorbate 80 と0.2 M NaClを含む0.1 M グリシン - 塩酸緩衝液 (pH 3.3) 100 ml を順次通液してカラムを洗浄した。次に、0.01% Polysorbate 80 と0.2 M NaClを含む0.1 Mクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.0) を通液し、カラムに吸着した蛋白質を溶出した。溶出液は5 ml ずつ分取した。分取した画分には、10%容量の2 Mトリス溶液 (pH 8.0) を加え、直ちに中和した。溶出液各画分中のTrx - OBMの有無を上記実施例15 - (3) 記載の方法 (OCIFとの結合能) により調べた。

Trx - OBMを含む画分を集めさらに精製した。

【0084】

(7) ゲル濾過によるTrx - OBMの精製

上記実施例15 - (6) のTrx - OBMフラクション約25 mlを、Centriplus 10 及びCentricon 10 (amicon社) を用いて、約0.5 mlに遠心濃縮した。このサンプルを、予め0.01% Polysorbate 80 を含むPBSで平衡化したSuperose 12 HR 10 / 30 カラム (1.0 × 30 cm、ファルマシア社) にかけた。分離には、0.01% Polysorbate 80 を含むPBSを移動相として用い、流速 0.25 ml/minで展開した。カラムからの溶出液は0.25 ml ずつ分取した。分取した画分のTrx - OBMは、実施例15 - (3) 記載の方法及びPhast System (ファルマシア社) を用いたSDS - ポリアクリルアミド電気泳動 (10 - 15% ポリアクリルアミドゲル、ファルマシア社) と銀染色で検出した。純化されたTrx - OBMを含むフラクション (Fr. 20 - 23) を集め、Trx - OBMの蛋白質濃度を測定した。蛋白質濃度の測定は、ウシ血清アルブミンを標準品として用いDC - protein assay kit (バイオラッド社) で行った。

【0085】

〔実施例 16〕

O B M の破骨細胞形成誘導活性

p O B M 2 9 1 及び p c D L - S R α 2 9 6 をリポフェクトアミン（ギブコ社）を用いて C O S - 7 細胞にそれぞれトランスフェクトした。それぞれの細胞を 1 0 % F C S を含む D M E M で 1 日培養後トリプシン処理し、カバーガラス（15 mm 丸形、マツナミ社）を敷いた 2 4 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 5×10^4 個の細胞を播種し、さらに 2 日間培養した。培養プレートを P B S で 1 回洗浄したのち、1 % パラフォルムアルデヒドを含む P B S を加えて室温で 8 分間インキュベートし細胞を固定した。細胞を固定したプレートを P B S にて 6 回洗浄したのち、 10^{-8} M 活性型ビタミン D₃、 10^{-7} M デキサメサゾン、1 0 % 牛胎児血清を含む α - M E M にて 1×10^6 個 / m l に懸濁したマウス脾臓細胞を 1 ウェルあたり 7 0 0 μ l 添加した。各ウェル上に M i l l i c e l l P C F（ミリポア社）をセットし、上記培地にて 4×10^4 個 / m l に懸濁した S T 2 細胞を M i l l i c e l l P C F 中に 7 0 0 μ l 添加し 3 7 °C、6 日間培養した。培養終了後、M i l l i c e l l P C F を取り除き、プレートを P B S で 1 回洗浄後、アセトン - エタノール溶液（5 0 : 5 0）で 1 分間細胞を固定した後、L E U K O C Y T E A C I D P H O S P H A T A S E キット（シグマ社）を用いて破骨細胞特異的マーカーである酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性（T R A P 活性）を示す細胞のみを染色した。顕微鏡観察の結果、p c D L - S R α 2 9 6 をトランスフェクトした C O S - 7 細胞を固定したウェル中には T R A P 活性を示す細胞は全く検出されなかったのに対し、p O B M 2 9 1 をトランスフェクトした細胞を固定したウェル中には 45 ± 18 個（平均 $\pm$ 標準偏差、 $n = 3$ ）の T R A P 陽性細胞が観察された。又、これらの T R A P 陽性細胞に、カルシトニンが結合することも確認された。これより、O B M には破骨細胞形成を誘導する活性があることが明らかとなった。

【0086】

〔実施例 17〕

T r x - O B M 及び分泌型 O B M による破骨細胞形成誘導活性

マウス脾臓細胞を 10^{-8} M 活性型ビタミン D₃、 10^{-7} M デキサメサゾン、1 0 % 牛胎児血清を含む α - M E M に 2×10^6 個 / m l になるように懸濁し、この懸濁液を 2 4 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 3 5 0 μ l 添加した。精製した T r x - O B M を上記培地で希釈した溶液（4 0 n g / m l）、p C E P s O B M 又は p C E P 4 を形質導入した 2 9 3 - E B N A 細胞を I M D M - 1 0 % F C S で培養した培養上清を上記培地にて 1 0 倍希釈した溶液、又は上記培地のみをそれぞれ 3 5 0 μ l 上記のウェルに添加した後、M i l l i c e l l P C F（ミリポア社）を各ウェルにセットし、上記培地にて懸濁した 4×10^4 個 / m l の S T 2 細胞を M i l l i c e l l P C F に 6 0 0 μ l 添加した。6 日間培養した後、M i l l i c e l l P C F を取り除き、プレートを P B S で一回洗浄後、アセトン - エタノール溶液（5 0 : 5 0）で 1 分間細胞を固定したのち、L E U K O C Y T E A C I D P H O S P H A T A S E キット（シグマ社）を用いて酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性（T R A P 活性）を示す細胞のみを染色した。顕微鏡観察の結果、T r x - O B M を添加しなかったウェル中には T R A P 活性を示す細胞は全く検出されなかったのに対し、T r x - O B M を添加したウェルには 106 ± 21 個（平均 $\pm$ 標準偏差、 $n = 3$ ）の T R A P 陽性細胞が観察された。同様に p C E P 4 で形質導入された 2 9 3 - E B N A の培養上清を添加したウェル中には T R A P 活性を示す細胞は全く検出されなかったのに対し、p C E P s O B M で形質導入された 2 9 3 - E B N A の培養上清を添加したウェルには 120 ± 31 個（平均 $\pm$ 標準偏差、 $n = 3$ ）の T R A P 陽性細胞が観察された。又、これらの T R A P 陽性細胞に、カルシトニンが結合することも確認された。これより、T r x - O B M 及び分泌型 O B M には、破骨細胞形成を誘導する活性があることが明らかとなった。

【0087】

〔実施例 18〕

本発明の c D N A により発現される蛋白質 O B M と本発明の天然型の O C I F 結合蛋白質

との同一性

(1) ウサギ抗OBMポリクローナル抗体の作製

雄性日本白色ウサギ（体重2.5 - 3.0 kg、北山ラベス社より入手）3羽に、実施例14 - (6)及び(7)記載の方法により得られた精製OBM（チオレドキシン - OBM融合蛋白質）200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ をフロイント完全アジュバント（DIFCO社）と等量混合してエマルジョンとしたものを、1回1mlずつ皮下免疫した。免疫は1週間間隔で合計6回行い、最終免疫後10日目に全採血を行った。分離した血清から抗体を以下の様に精製した。即ち、PBSで2倍希釈した抗血清に最終濃度が40%（w/v %）となるように硫酸アンモニウムを添加して4℃で1時間放置後、8000 $\times g$ で20分間遠心分離を行い、沈殿を得た。沈殿を少量のPBSに溶解し、PBSに対して4℃で透析した後、Protein G-Sepharoseカラム（ファルマシア社製）に負荷した。PBSで洗浄後、0.1 M グリシン - 塩酸緩衝液（pH 3.0）で吸着した免疫グロブリンGを溶出し、直ちに1.5 M トリス - 塩酸緩衝液（pH 8.7）で中性pHとした。溶出蛋白質画分をPBSに対して透析後、280 nmにおける吸光度を測定し、その濃度を決定した（ $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ 13.5）。西洋ワサビパーオキシダーゼ標識した抗OBM抗体は、マレイミド活性化パーオキシダーゼキット（ピラス社）を用いて作製した。即ち、1mgの精製抗体に80 μg のN - スクシンイミド - S - アセチルチオ酢酸を添加し、室温で30分間反応させた。これに5mgのヒドロキシルアミンを添加して脱アセチル化した後、修飾された抗体をポリアクリルアミド脱塩カラムにて分画した。蛋白質画分を1mgのマレイミド活性化パーオキシダーゼと混合し、室温で1時間反応させ酵素標識抗体を得た。

10

20

【0088】

(2) ウサギ抗OBMポリクローナル抗体による本発明のcDNAにより発現される蛋白質（OBM）あるいは本発明の天然型の蛋白質とOCIFとの特異的結合能の阻害

実施例15 - (6)及び(7)記載の方法で得られた精製OBM（チオレドキシン - OBM融合蛋白質）及び実施例2 - (4)の天然型精製OCIF結合蛋白質をそれぞれ0.1 M 炭酸水素ナトリウムに2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解し、それぞれの溶液100 μl ずつを96ウェルイムノプレート（Nunc社製）の各ウェルに加え、4℃で一晩放置した。各ウェルに50%濃度のブロックエースを200 μl ずつ加え、室温で1時間放置した。各ウェルを0.1%ポリソルベート20を含むPBS（P20 - PBS）で3回洗浄した後、P20 - PBSで希釈した25%濃度のブロックエースにウサギ抗OBM抗体を200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解し、その抗体溶液あるいは抗体を含まない25%濃度のブロックエース溶液を100 μl ずつ各ウェルに添加し、37℃、1時間インキュベートした。各ウェルをP20 - PBSで3回洗浄した後、実施例8 - (3)記載の ^{125}I 標識したOCIF 20 ng/mlを加えた結合試験溶液（0.2%牛血清アルブミン、20 mM HEPES、0.1 mg/mlヘパリンを加えたP20 - PBS）を100 μl ずつ各ウェルに添加した。又、別のウェルには、 ^{125}I 標識したOCIF 20 ng/mlに加えて8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の非標識OCIFを含む結合試験溶液を100 μl 加えて実験を行った。そのイムノプレートを37℃、1時間インキュベートした後、各ウェルをP20 - PBSで6回洗浄した。各ウェル中の ^{125}I の量をガンマカウンターで測定した。結果を図17に示す。図に示したように、本発明cDNAにより発現され、精製して得られるOBM及び本発明の天然型のOCIFに特異的に結合する蛋白質は、ウサギ抗OBMポリクローナル抗体で処理することによって、 ^{125}I 標識したOCIFとの結合は全く起こらなかった。一方、抗体処理しなかった両蛋白質には、 ^{125}I 標識OCIFが結合することが確認された。又、それらの結合は400倍濃度の非標識OCIF（8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を添加することにより顕著に阻害されることから、両蛋白質のOCIFへの結合は特異的結合であることが明らかになった。以上の結果から、ウサギ抗OBMポリクローナル抗体は、本発明cDNAにより発現される蛋白質であるOBM及び本発明の天然型のOCIF結合蛋白質を共に認識し、両蛋白質とOCIFとの特異的結合を阻害することが明らかになった。

30

40

50

【 0 0 8 9 】

〔 実施例 1 9 〕

ヒト O B M c D N A のクローニング(1) マウス O B M プライマーの調製

ヒト O B M c D N A のスクリーニングには、上記の実施例の方法に従い調製したマウス O B M プライマー、O B M # 3 及び O B M # 8 を用いた。それぞれの配列を配列表配列番号 9 及び 6 に示す。

【 0 0 9 0 】

(2) P C R によるヒト O B M c D N A 断片の取得

ヒトリンパ節由来 c D N A ライブラリーとして H u m a n L y m p h N o d e M a r r a t h o n r e a d y c D N A (クロンテック社) を鋳型として、上記 (1) で調製したマウス O B M c D N A プライマーを用いて、P C R を行いヒト O B M c D N A 断片を取得した。 10

以下に用いた P C R の条件を示す。

1 0 × E X T a q バッファー (宝酒造社) 2 μ l

2 . 5 m M d N T P 1 . 6 μ l

c D N A 溶液 1 μ l

E X T a q (宝酒造社) 0 . 2 μ l

蒸留水 1 4 . 8 μ l

4 0 μ M プライマー O B M # 3 0 . 2 μ l 20

4 0 μ M プライマー O B M # 8 0 . 2 μ l

上記溶液をマイクロフュージチューブ中で混合後、以下の条件で P C R を行った。9 5 で 2 分間前処理し、9 5 3 0 秒、5 7 3 0 秒及び 7 2 2 分 3 0 秒間の 3 段階の反応を 4 0 回繰り返し続けた後、7 2 で 5 分間保温した。反応液の一部をアガロース電気泳動に供したところ、上記マウス O B M c D N A プライマーで増幅される約 6 9 0 b p の D N A 断片が検出された。

【 0 0 9 1 】

(3) P C R により増幅されたヒト O B M c D N A 断片の精製と塩基配列の決定

実施例 1 9 - (2) で得られたヒト O B M c D N A 断片をアガロース電気泳動により分離し、さらに Q I A E X ゲルエクストラクションキット (キアゲン社) を用いて精製した。 30
この精製されたヒト O B M c D N A 断片を鋳型として、再度上記マウス O B M c D N A プライマーを用いて P C R を行い、このヒト O B M c D N A 断片を大量に調製し、同様に Q I A E X ゲルエクストラクションキットにより精製した。精製されたヒト O B M c D N A 断片の塩基配列を、O B M # 3 及び O B M # 8 (配列表 9 及び 6) をプライマーとして、タックダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシング F S キット (T a q D y e D e o x y T e r m i n a t o r C y c l e S e q u e n c i n g F S k i t ; パーキンエルマー社) を用いて決定した。このヒト O B M c D N A 断片の塩基配列は、マウス O B M c D N A の相当する領域と比較した結果、8 0 . 7 % の相同性を示した。

【 0 0 9 2 】

(4) 約 6 9 0 b p のヒト O B M c D N A 断片をプローブとしたハイブリダイゼーション法による全長ヒト O B M c D N A のスクリーニング

実施例 1 9 - (3) で精製された約 6 9 0 b p のヒト O B M c D N A 断片をメガプライム D N A ラベリングキット (アマシャム社) を用いて [α ^{3 2} P] d C T P で標識し、全長のヒト O B M c D N A をスクリーニングした。スクリーニングの対象としては、H u m a n L y m p h N o d e 5 ' - S T R E T C H P L U S c D N A ライブラリー (クロンテック社、U S A) を用いた。同社のプロトコールに従い、組み換えファージを 3 7 で 1 5 分間大腸菌 C 6 0 0 H f 1 に感染させた後、その大腸菌を 4 5 に加温した L B 寒天培地 (1 % トリプトン、0 . 5 % イーストエキス、1 % N a C l 、0 . 7 % 寒天) に添加し、1 . 5 % 寒天を含む L B 寒天培地プレート上に流し込ん 50

だ。37 で一夜培養後、ブランクの生じたプレート上にハイボンドN（アマシャム社）を約3分間密着させた。このフィルターを常法に従いアルカリ変性処理した後、中和し、 $2 \times \text{SSC}$ 溶液に浸した後、UVクロスリンク（ストラタジーン社）によりDNAをフィルターに固定した。得られたフィルターをRapid-hyb バッファー（アマシャム社）に浸漬し、65 で15分間前処理した後、熱変性した上記ヒトOBMcDNA断片（約690bp、 5×10^5 cpm/ml）を添加した上記バッファーに移し替え、65 で一夜ハイブリダイゼーションさせた。反応後、フィルターをそれぞれ0.1% SDSを含む $2 \times \text{SSC}$ 、 $1 \times \text{SSC}$ 及び $0.1 \times \text{SSC}$ で順次1回ずつ65 で15分間洗浄した。得られたいくつかの陽性クローンをさらに2回スクリーニングを繰り返すことにより純化した。それらの中から、約2.2kbのインサートを持つクローンを選択し、以下の実験に用いた。この純化したファージを λ hOBMと名付けた。純化した λ hOBMからQIAGEN Lambdaキット（キアゲン社）のプロトコールに従い、約10 μ gのDNAを得た。このDNAを制限酵素SalIで消化した後、アガロース電気泳動により約2.2kbのhOBMインサートcDNAを分離した。QIAGENゲルエクストラクションキット（キアゲン社）を用いて精製したこのDNA断片を、あらかじめ制限酵素SalIで切断し、脱リン酸化しておいたプラスミドpUC19（MBI社）にDNAライゲーションキット ver. 2（宝酒造社）を用いて挿入した。得られたDNA断片を含むpUC19で大腸菌DH5 α （ギブコBRL社）を形質転換させた。得られた形質転換株はpUC19hOBMと名付け、これを増殖させ、約2.2kbのヒトOBMcDNAが挿入されたプラスミドを常法により精製した。

10

20

【0093】

（5）ヒトOBMの全アミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列の決定

実施例19-（4）で得られたヒトOBMcDNAの塩基配列を、タックダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシングFSキット（パーキンエルマー社）を用いて決定した。即ち、pUC19hOBMを鋳型とし、挿入断片の塩基配列を決定した。プライマーとして、pUC19の挿入断片DNAの塩基配列を決定するためのプライマー、m13PrimerM3及びm13PrimerRV（ともに宝酒造社）、及びヒトOBMcDNA断片（約690bp）の塩基配列に基づいて設計した合成プライマーヒトOBM#8を用いた。用いたプライマー、m13PrimerM3及びm13PrimerRVの配列を、それぞれ配列表配列番号4及び5に示す。これにより決定された、ヒトOBMcDNAの塩基配列から推定されるヒトOBMのアミノ酸配列を配列表配列番号11、又、ヒトOBMcDNAの塩基配列を配列表配列番号12にそれぞれ示す。得られたヒトOBMcDNAを含むプラスミド、pUC19hOBMで形質転換した大腸菌は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（現独立行政法人産業技術総合研究所微生物寄託センター）に受託番号FERM BP-6058として平成9年8月13日に寄託されている。

30

【0094】

〔実施例20〕

OCIFの¹²⁵I標識ならびにELISAによる¹²⁵I標識OCIFの定量

OCIFはヨードジェン（Iodogen）法により¹²⁵I標識した。2.5mg/ml Iodogen-クロロホルム溶液20 μ lを1.5mlエッペンドルフチューブに移し、40 でクロロホルムを蒸発させて、ヨードジェンコートしたチューブを調製した。このチューブを0.5Mリン酸ナトリウム緩衝液（Na-Pi, pH7.0）400 μ lで3回洗浄した後、5 μ lの0.5M Na-Pi, pH7.0を加えた。このチューブにNa-¹²⁵I溶液（アマシャム社、NEZ-033H）1.3 μ l（18.5MBq）を加えた後、直ちに1mg/ml OCIF溶液（モノマー型あるいはダイマー型）10 μ lを加え、ポルテックスミキサーで攪拌した後、室温で30秒間放置した。この溶液を、予め10 mg/ml沃化カリウムを含む0.5M Na-Pi（pH7.0）溶液80 μ lと5%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水（BSA-PBS）5 μ lを添加しておいたチューブに移し攪拌した。この溶液をBSA-PBSで平

40

50

衡化したスピンカラム (1 ml, G-25 Sephadex fine, ファルマシア社) に負荷し、2,000 rpm で5分間遠心した。カラムから溶出された画分にBSA-PBSを400 µl 加え攪拌した後、2 µl を取り、その放射能をガンマカウンタで測定した。このようにして調製した¹²⁵I 標識OCIF溶液の放射化学純度は10%トリクロロ酢酸(TCA)により沈殿する画分の放射能を測定することにより求めた。

¹²⁵I 標識OCIFのOCIF生物活性は、WO96/26217号記載の方法に従い測定した。又、¹²⁵I 標識OCIF濃度は、以下のようにELISAにより測定した。即ち、WO96/26217号公報記載のウサギ抗OCIFポリクローナル抗体を2 µg/mlになるように溶解した50 mM NaHCO₃, pH 9.6を100 µlずつ96ウェルイムノプレート(Nunc社、MaxisorpTM)の各ウェルに加えて、4 ー夜放置した。この溶液を捨てた後、ブロックエース(雪印乳業社)とリン酸塩緩衝生理食塩水との混合水溶液(混合比25:75)(B-PBS)を200 µlずつ各ウェルに加え、室温で2時間放置した。この液を捨てた後、各ウェルを0.01% Polysorbate 80を含むリン酸塩緩衝生理食塩水(P-PBS)で3回洗浄し、次いで¹²⁵I 標識OCIFサンプルあるいはOCIF標準品を添加したB-PBSを100 µlずつ各ウェルに加え、室温で2時間放置した。この液を捨てた後、P-PBS 200 µlで各ウェルを6回洗浄した。パーオキシダーゼ標識したウサギ抗OCIFポリクローナル抗体をB-PBSで希釈した溶液を100 µlずつ各ウェルに加え、室温で2時間放置した。この溶液を捨てた後、P-PBS 200 µlで各ウェルを6回洗浄した。TMB溶液(TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek社)を100 µlずつ各ウェルに加え、室温で2~3分間放置した後、停止液(Stopping Reagent, Scytek社)を100 µlずつ各ウェルに加えた。各ウェルの450 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。OCIF標準品を用いて作成した検量線より¹²⁵I 標識OCIFの濃度を求めた。

【0095】

〔実施例21〕

本発明cDNAにコードされる蛋白質の発現

(1) 動物細胞用hOBM発現ベクターの構築

pUCHOBMを制限酵素SalIで切断し、約2.2 kbのDNA断片を1%アガロース電気泳動により精製し、DNAプランティングキット(宝酒造社)により末端を平滑化した(平滑化hOBMcDNA断片)。発現プラスミドpCDL-SRα296(Molecular and Cellular Biology, Vol 8, pp 466-472 (1988))を制限酵素EcoRIで切断し、プランティングキットにより末端を平滑化したものと、平滑化したhOBMcDNA断片とをDNAライゲーションキットver. 2により結合させた。ライゲーション反応液を用い大腸菌DHαを形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換株から、制限酵素切断により得られるDNA断片地図の解析並びにDNA配列の決定により、SRαプロモーターによる転写方向に対してhOBMcDNAの転写方向が順向きに挿入されているプラスミド、phOBMを持つ菌株を選びだし、DH5α/phOBMと名付けた。

【0096】

(2) COS-7細胞でのヒトOBMの発現

大腸菌、DH5α/phOBMを培養し、キアフィルタープラスミドミディキット(キアゲン社)を用い、プラスミドphOBMを精製した。phOBMを6ウェルプレートの各ウェル中でCOS-7細胞にリポフェクトアミンを用いてトランスフェクションし、10%牛胎児血清を含むDMEM中で2日間培養した。5%透析牛胎児血清を添加した、ステイン・メチオニン不含DMEM(大日本製薬社)に培地交換し(88 µl/well)15分間培養した後、Express Protein Labeling Mix(NEN社、10 mCi/ml)を14 µl添加した。4時間培養後、10%牛胎児血清を

含むDMEMを200 μ l 加え1時間培養した。細胞をPBSで2回洗浄後、1% Triton X-100、1%牛ヘモグロビン、10 μ g/mlロイペプチン(leupeptin)、0.2 TIU/mlアプロチニン(aprotinin)及び1mM PMSFを含むTSAバッファ(0.14M NaCl、0.025% NaN_3 を含む10mMトリス-塩酸、pH 8.0)を0.5ml加え、氷上で1時間静置した。ピペティングにより細胞を破碎した後、4、3,000 $\times$ g、10分間遠心し上清を得た。この上清100 μ lに200 μ lの希釈バッファ(0.1% Triton X-100、0.1%牛ヘモグロビン、10 μ g/mlロイペプチン、0.2 TIU/mlアプロチニン及び1mM PMSFを含むTSAバッファ)を加え、Protein A Sepharose (50 μ l)とともに4で1時間振盪させた後、4、1,500 $\times$ gで1分間遠心分離し上清を回収することにより：Protein A Sepharoseに非特異的に吸着する蛋白質を除去した。この上清にOCIF (1 μ g)を加え、4で1時間振盪させながらヒトOBMとOCIFを結合させた後、ウサギ抗OCIFポリクローナル抗体(50 μ g)を加えて4で1時間振盪した。この溶液にProtein A Sepharose (10 μ l)を加え、更に4で1時間振盪した。4、1,500 $\times$ gで1分間遠心分離し沈殿画分を回収した。4、1,500 $\times$ gで1分間遠心分離して得られた沈殿を希釈バッファで2回、牛ヘモグロビンを含まない希釈バッファで2回、TSAバッファで1回、50mMトリス-塩酸(pH 6.5)で1回、それぞれ洗浄後、沈殿に10% β メルカプトエタノールを含むSDSバッファ(0.125M トリス-塩酸、4%ドデシル硫酸ナトリウム、20%グリセロール、0.002%ブromoフェノールブルー、pH 6.8)を加え、100で5分間加熱後、SDS-PAGE (12.5%ポリアクリルアミドゲル、第一化学社)にかけた。常法によりゲルを固定、乾燥させ、Amplify(アマシャム社)により、アイソトープのシグナルを増強した後、Bio Max MRフィルム(コダック社)を用いて-80で感光させた。結果を図18に示す。この結果、本発明のcDNAにコードされる蛋白質の分子量は、約40,000であることが明らかとなった。

【0097】

〔実施例22〕

本発明cDNAにコードされる蛋白質とOCIFとの結合

実施例21-(2)と同様に精製されたphOBMを24ウェルプレートの各ウェル中でCOS-7細胞にリポフェクトアミンを用いてトランスフェクトし、その細胞を2~3日間培養した後、無血清DMEMで洗浄し、これに¹²⁵I標識したOCIF 20 ng/mlを加えた結合試験培地(0.2%牛血清アルブミン、20mM HEPES緩衝液、0.1mg/mlヘパリン、0.2% NaN_3 を加えた無血清DMEM)200 μ lを加えた。また別のウェルには、¹²⁵I標識したOCIF 20 ng/mlに加えて更に8 μ g/mlの非標識OCIFを添加した結合試験培地を200 μ l加えて実験を行った。CO₂インキュベーター中(5% CO₂)、37で1時間培養した後、細胞を0.1mg/mlのヘパリンを含むリン酸塩緩衝生理食塩水500 μ lで2回洗浄した。洗浄後、0.1N NaOH溶液500 μ lを各ウェルに加え、室温に10分間放置することにより細胞を溶解させ、ウェル中の¹²⁵Iの量をガンマカウンターで測定した。この結果、図19に示したように、phOBMをトランスフェクトした細胞にのみ¹²⁵I標識したOCIFが結合することが確認された。又、その結合は400倍濃度の非標識OCIF(8 μ g/ml)を添加することにより、顕著に阻害されることが確認された。以上の結果から、phOBM上のcDNAにコードされる蛋白質ヒトOBMは、COS-7細胞表面でOCIFに特異的に結合することが明らかとなった。

【0098】

〔実施例23〕

¹²⁵I標識したOCIFと本発明cDNAにコードされる蛋白質とのクロスリンク試験

本発明cDNAにコードされる蛋白質の性質を更に詳しく解析するため、¹²⁵I標識し

たモノマー型OCIFと本発明cDNAにコードされる蛋白質とのクロスリンキングを行った。即ち、実施例21-(1)及び(2)に記載した方法に従って、それぞれ発現ベクターをpHOBMを構築し、COS-7細胞にトランスフェクトした後、上記の¹²⁵I標識したOCIF(25ng/ml)を加えた結合試験用培地を200μlずつ各ウェルに添加した。又、別のウェルには、¹²⁵I標識したOCIFに加え400倍濃度の非標識OCIFを更に添加した結合試験用培地を加えた。CO₂インキュベーター中(5%CO₂)、37で1時間培養した後、細胞を0.1mg/mlのヘパリンを含むリン酸塩緩衝生理食塩水500μlで2回洗浄した。この細胞に100μg/mlのクロスリンキング剤、DSS(Dissuccinimidyl suberate, Pierce社)を溶解させたリン酸塩緩衝生理食塩水500μlを加え、0で10分間反応させた。これらのウェルの細胞を0に冷却したリン酸塩緩衝生理食塩水1mlで2回洗浄した後、この細胞に1%Triton X-100(和光純薬社)、2mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride、シグマ社)、10μM ペプスタチン(和光純薬社)、10μMロイペプチン(和光純薬社)、10μM アンチpain(antipain、和光純薬社)及び2mM EDTA(和光純薬社)を含む20mM HEPES緩衝液100μlを加え、室温に30分間放置して細胞を溶解させた。これらのサンプル15μlを常法により還元条件下でSDS化した後、SDS-電気泳動用ゲル(4-20%ポリアクリルアミドグラジエント、第一化学社)を用いて泳動した。泳動後、ゲルを乾燥させ、BioMax MSフィルム(コダック社)とBioMax MS増感スクリーン(コダック社)を用いて-80で24時間感光させた。感光させたフィルムを常法により現像した。この結果、¹²⁵I標識モノマー型OCIFと本発明cDNAによりコードされる蛋白質をクロスリンクさせることにより、図20に示すように、分子量約90,000-110,000の蛋白質バンドが検出された。

【0099】

〔実施例24〕

分泌型ヒトOBMの発現

(1) 分泌型ヒトOBM発現プラスミドの構築

ヒトOBM SF(配列表配列番号13)とマウスOBM #8(配列表配列番号6)をプライマー、pUC19HOBMを鋳型としてPCR反応を行った。この生成物をアガロースゲル電気泳動で精製した後、制限酵素SPLI、HindIIIで切断し、さらにアガロースゲル電気泳動で精製して、0.27kbの断片を得た。ヒトOBM cDNAを制限酵素DraIで部分消化し、一ヶ所切断された断片をアガロース電気泳動で精製し、その精製断片をさらに制限酵素HindIIIで切断した。0.53kbのDraI/HindIII断片をアガロース電気泳動で精製し、この精製断片と上記のPCR生成物のSPLI, HindIII断片(0.27kb)をpSec Tag A(インビトロゲン社)のSPLI/EcoRV断片(5.2kb)と共にライゲーションキットver.2(宝酒造社)を用いてライゲーションを行い、その反応生成物を用いて大腸菌DH5αを形質転換した。得られたアンピシリン耐性株より、アルカリSDS法によりプラスミドを精製し、制限酵素で切断することによって、pSec Tag Aに0.27kbと0.53kbの断片が挿入されたプラスミドを選び出した。さらに、このプラスミドをタックダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシングFSキット(パーキンエルマー社)を用いてシーケンスを行い、このプラスミドが分泌型ヒトOBMをコードする配列を持っていることを確認した。このプラスミドを制限酵素NheI、XhoIで切断した後、分泌型ヒトOBM cDNAに相当する断片(0.8kb)をアガロースゲル電気泳動で回収した。この断片をライゲーションキットを用いて発現ベクターpCEP4(インビトロゲン社)のNheI/XhoI断片(10.4kb)に挿入し、その反応生成物を用いて大腸菌DH5αを形質転換した。得られたアンピシリン耐性株より、アルカリSDS法によりプラスミドを精製し、制限酵素で切断することにより、目的の構造を持った分泌型ヒトOBM発現プラスミ

ド (p C E P s h O B M) を持つ大腸菌株を選択した。p C E P s h O B M を持つ大腸菌株を培養し、キアフィルタースミドミディキット (キアゲン社) を用いて p C E P s h O B M を精製した。

【 0 1 0 0 】

(2) 分泌型 O B M の発現

2 9 3 - E B N A 細胞を 1 0 % F C S を含む I M D M (I M D M - 1 0 % F C S) に懸濁し、コラーゲンコートした 2 4 ウェルプレート (住友ベークライト社) に 2×10^5 細胞 / 2 m l / ウェルになるように播種し、一夜培養した。この細胞に $1 \mu\text{g}$ の p C E P s h O B M 及び p C E P 4 のそれぞれをリポフェクトアミン (ギブコ社) $4 \mu\text{l}$ を用いて形質導入し、0 . 5 m l の無血清 I M D M または I M D M - 1 0 % F C S 中で更に 2 日間培養し、その培養上清を回収した。分泌型ヒト O B M の培養上清中での発現は、以下のようにして確認した。即ち、培養上清に最終濃度が 0 . 1 M になるように炭酸水素ナトリウムを加えて 4 で一夜放置し、培養上清中のヒト O B M を 9 6 ウェルプレートに固相化した。このプレートを P B S で 4 倍希釈したブロックエース (雪印乳業社) 溶液 (B - P B S) で室温に 2 時間放置しブロッキングした後、B - P B S で希釈した 3 - 1 0 0 n g / m l の O C I F を加えて 3 7 で 2 時間放置した。0 . 0 5 % P o l y s o r b a t e 2 0 を含む P B S (P - P B S) でプレートを洗浄した後、B - P B S で希釈した W O 9 6 / 2 6 2 1 7 号記載のパーオキシダーゼ標識抗 O C I F 抗体を各ウェルに $100 \mu\text{l}$ ずつ添加し、3 7 で 2 時間放置した。P - P B S で各ウェルを 6 回洗浄した後、T M B 溶液 (T M B S o l u b l e R e a g e n t , H i g h S e n s i t i v i t y , S c y t e k 社) を $100 \mu\text{l}$ ずつ各ウェルに加え、室温で約 1 0 分間放置した後、停止液 (S t o p p i n g R e a g e n t . S c y t e k 社) を $100 \mu\text{l}$ ずつ各ウェルに加えた。各ウェルの 4 5 0 n m における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。結果を図 2 1 に示す。p C E P s h O B M を形質導入した細胞の培養上清を固相化したプレートでは、添加した O C I F の濃度に依存して 4 5 0 n m の吸光度が増加した。一方、ベクターのみの p C E P 4 を形質導入した細胞の培養上清を固相化した場合には、その吸光度の増加は見られなかった。又、固相化に用いる培養上清量の割合を 5 ~ 9 0 % の範囲で種々変化させ、一定濃度の O C I F (5 0 n g / m l) を添加した際の結果を図 2 2 に示す。p C E P s h O B M を形質導入した細胞の培養上清を固相化したプレートでは、添加する培養上清量の増加につれて 4 5 0 n m における吸光度が増加したが、ベクター p C E P 4 を形質導入した細胞の培養上清を固相化したプレートでは、吸光度の増加は見られなかった。これらの結果により、分泌型ヒト O B M が p C E P s h O B M を形質導入した細胞の培養上清中に発現していることが確認された。

【 0 1 0 1 】

〔実施例 2 5〕

チオレドキシン - ヒト O B M 融合蛋白質 (T r x - h O B M) の発現

(1) チオレドキシン - ヒト O B M 融合蛋白質 (T r x - h O B M) 発現ベクターの構築

$10 \mu\text{l}$ の $10 \times \text{ExTaq}$ バッファ - (宝酒造社) 、 $8 \mu\text{l}$ の 10 mM d N T P (宝酒造社) 、 $77.5 \mu\text{l}$ の滅菌蒸留水、 $2 \mu\text{l}$ の p U C 1 9 h O B M 水溶液 ($100 \text{ ng} / \mu\text{l}$) 、 $1 \mu\text{l}$ のプライマーマウス O B M # 3 (配列表配列番号 9) ($100 \text{ pmol} / \mu\text{l}$) 、 $1 \mu\text{l}$ のプライマー h O B M S a l R 2 (配列表配列番号 1 4) ($100 \text{ pmol} / \mu\text{l}$) 、 $0.5 \mu\text{l}$ の ExTaq ($5 \text{ u} / \mu\text{l}$) (宝酒造社) を混合しマイクロ遠心管中で P C R 反応を行った。9 5 5 分、5 0 1 秒、5 5 1 分、7 4 1 秒、7 2 5 分の反応後、9 6 1 分、5 0 1 秒、5 5 1 分、7 4 1 秒、7 2 3 分の反応を 2 5 サイクル行った。反応液全量から約 7 5 0 b p の D N A 断片を精製した。精製した D N A 断片 (全量) を制限酵素 S a l I (宝酒造社) 及び B s p H I (ニューイングランドバイラズ社) で切断した後、1 % アガロース電気泳動を行い、約 3 2 0 b p の D N A 断片 (断片 1) を精製し $20 \mu\text{l}$ の滅菌蒸留水に溶解した。同様に、実施例 1 9 - (3) 記載の p U C 1 9 h O B M $4 \mu\text{g}$ を制限酵素 B a m H I , B s p H

I (宝酒造社) で切断して得られた約 450 bp の DNA 断片 (断片 2)、及び 2 µg の pTrxFus (インビトロジェン社) を制限酵素 BamHI, SalI (宝酒造社) で切断して得られた約 3.6 kb の DNA 断片 (断片 3) をそれぞれ精製し、それぞれを 20 µl の滅菌蒸留水に溶解した。DNA 断片の精製には QIAEXII gel extraction kit を用いた。断片 1、断片 2、及び断片 3 を DNA ligation kit ver. 2 (宝酒造社) を用い、16 で 2 時間 30 分保温することにより結合させた。ライゲーション反応液を用い大腸菌 GI724 株 (インビトロジェン社) を ThioFusion Expression System (インビトロジェン社) 添付の Instruction Manual に記載の方法で形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換株の中から、制限酵素切断により得られる DNA 断片地図の解析並びに DNA 配列の決定により、hOBM cDNA 断片がチオレドキシン遺伝子に同じ読み枠で結合しているプラスミドを持つ菌株を選択した。得られた菌株を GI724/pTrxhOBM と名付けた。

【0102】

(2) 大腸菌での Trx - hOBM の発現

GI724/pTrxhOBM 株及び pTrxFus を持つ GI724 株 (GI724/pTrxFus) をそれぞれ 2 ml の RMG - Amp 培地 (0.6% Na₂HPO₄、0.3% KH₂PO₄、0.05% NaCl、0.1% NH₄Cl、2% カザミノ酸、1% グリセロール、1 mM MgCl₂、100 µg/ml アンピシリン、pH 7.4) 中、37 で 6 時間振盪培養した。菌液 0.5 ml を 50 ml の Induction 培地 (0.6% Na₂HPO₄、0.3% KH₂PO₄、0.05% NaCl、0.1% NH₄Cl、0.2% カザミノ酸、0.5% グルコース、1 mM MgCl₂、100 µg/ml アンピシリン、pH 7.4) に添加し、30 で振盪培養した。OD_{600nm} における値が約 0.5 になった時点で、最終濃度が 0.1 mg/ml になるようにレトリプトファンを添加し、更に 30 で 6 時間振盪培養した。菌液を 3,000 × g で遠心し菌体を集め、12.5 ml の PBS に懸濁した。懸濁液を超音波発生装置 (Ultrasonics 社) にかけて菌体を破碎し、7,000 × g で 30 分間遠心して上清を集めて可溶性蛋白質画分とした。これらの画分溶液 10 µl ずつを還元条件下での SDS - PAGE (10% ポリアクリルアミド) に供した。この結果、図 23 に示すように、GI724/pTrxOBM の可溶性蛋白質画分には、GI724/pTrxFus の可溶性蛋白質画分には見られない分子量約 40,000 の蛋白質のバンドが検出された。以上の結果から、チオレドキシンとヒト OB M の融合蛋白質 (Trx - hOBM) が大腸菌中で発現していることが確認された。

【0103】

(3) Trx - hOBM の OCIF との結合能

発現させた Trx - hOBM が OCIF と結合することを、以下の実験により確認した。即ち、96 ウェルイムノプレート (Nunc 社) の各ウェルに 10 mM 炭酸水素ナトリウム水溶液で 5000 倍に希釈した抗チオレドキシン抗体 (インビトロジェン社) を 100 µl ずつ添加し 4 で一夜放置した。各ウェル中の液を捨てた後、ブロックエース (雪印乳業社) を PBS で 2 倍希釈した溶液 (BA - PBS) を各ウェルに 200 µl ずつ添加し室温で 1 時間放置した。液を捨てた後、各ウェルを P - PBS で 3 回洗浄した。各ウェルに BA - PBS で段階希釈した上記 GI724/pTrxhOBM 由来及び GI724/pTrxFus 由来可溶性蛋白質画分溶液を 100 µl ずつ添加し室温で 2 時間放置した。P - PBS で各ウェルを 3 回洗浄した後、BA - PBS で希釈した OCIF (100 ng/ml) を各ウェルに 100 µl ずつ添加し室温に 2 時間放置した。P - PBS で各ウェルを 3 回洗浄した後、BA - PBS で 2000 倍に希釈した WO96/26217 号記載のパーオキシダーゼ標識した抗 OCIF 抗体を各ウェルに 100 µl ずつ添加し、室温で 2 時間放置した。P - PBS で各ウェルを 6 回洗浄した後、TMB 溶液を 100 µl ずつ各ウェルに加え、室温で約 10 分間放置した後、停止液 (Stopping Reagent) を 100 µl ずつ各ウェルに加えた。各ウェルの

450 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。結果を図24に示す。GI724/pTrxFus由来可溶性蛋白質画分溶液を添加したもの、添加しなかったものの間で吸光度には差異は見られなかったが、GI724/pTrxhOBM由来可溶性蛋白質画分溶液を添加したものでは、その添加濃度が増加するにつれて吸光度が上昇した。又、添加する可溶性蛋白質画分溶液の希釈割合を一定(1%濃度)にし、BA-PBSで段階希釈したOCIF(0-100 ng/ml)を添加した場合の実験結果を図25に示す。GI724/pTrxFus由来可溶性蛋白質画分溶液を用いたものでは、OCIFの濃度に係わりなく吸光度は低値であったが、GI724/pTrxhOBMに由来可溶性蛋白質画分溶液を添加したものでは、OCIF濃度が増加するにつれて吸光度が増加した。これらの結果から、GI724/pTrxhOBMで生産されるTrx-hOBMには、OCIFと結合する能力があることが確認された。

10

【0104】

(4) Trx-hOBMを生産する大腸菌の大量培養

GI724/pTrxhOBMをRMG-Amp 寒天培地(0.6% Na₂HPO₄、0.3% KH₂PO₄、0.05% NaCl、0.1% NH₄Cl、2% カザミノ酸、1.5% 寒天、pH 7.4)に白金耳で塗抹し、30℃で一夜培養した。菌体を10 mlのInduction培地に懸濁し、5 mlずつを500 mlのInduction培地の入った2 l用三角フラスコ計2本に添加し、30℃で振盪培養した。OD_{600nm}での吸光度が約0.5になった時点で最終濃度が0.1 mg/mlとなるようにL-トリプトファンを添加し、更に30℃で6時間振盪培養した。菌液を3,000×gで20分間遠心分離して菌体を集め、菌体を160 mlのPBSに懸濁した。懸濁液を超音波発生装置(Ultrasonics社)にかけ菌体を破碎し、7,000×gで30分間遠心分離して上清を集め可溶性蛋白質画分とした。

20

【0105】

(5) OCIF固定化アフィニティーカラムの調製

TSK gel AF-トレシルトヨパール650(東ソー社)2gと、WO96/26217号公報記載の方法で調製した遺伝子組み換え型OCIF35.0 mgを含む1.0 Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)40 mlとを混合し、4℃で一夜穏やかに振盪することによりカップリング反応を行った。過剰な活性基を不活性化するため、遠心分離により上清を除去した後、40 mlの0.1 Mトリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)を沈殿した担体に加え、室温で1時間穏やかに振盪した。0.01% Polysorbate 80と0.2 M NaClを含む0.1 Mグリシン-塩酸緩衝液(pH 3.3)及び0.01% Polysorbate 80と0.2 M NaClを含む0.1 Mクエン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.0)を通液しカラムを洗浄した後、0.01% Polysorbate 80を含む10 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)で2回洗浄し、カラムを平衡化した。

30

【0106】

(6) OCIF固定化アフィニティーカラムによるTrx-hOBMの精製

Trx-hOBMの精製は、特に断らない限り4℃で行った。上記のOCIF固定化アフィニティー担体(10 ml)と上記実施例25-(4)記載の可溶性蛋白質画分溶液(120 ml)とを混合後、50 ml遠心管(4本)中で、ローテーターを用いて4℃で一夜穏やかに振盪した。この混合液中の担体をエコノカラム(内径1.5 cm×長さ15 cm、バイオラッド社)に充填した。0.01% Polysorbate 80を含むPBS 300 ml、0.01% Polysorbate 80及び2.0 M NaClを含む10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)100 ml、0.01% Polysorbate 80及び0.2 M NaClを含む0.1 Mグリシン-塩酸緩衝液(pH 3.3)100 mlを順次通液してカラムを洗浄した。次に、0.01% Polysorbate 80及び0.2 M NaClを含む0.1 Mクエン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.0)を通液し、カラムに吸着した蛋白質を溶出した。溶出液は5 mlずつ分取した。分取した画分には、10%容量の2 Mトリス溶液(pH

40

50

8.0) を加えて直ちに中和した。溶出液各画分中の Trx - hOBM の有無を、実施例 25 - (3) 記載の方法により調べた。又、Trx - hOBM を含む画分を集め、更に精製を進めた。

【0107】

(7) ゲル濾過による Trx - hOBM の精製

上記実施例 25 - (6) 記載の Trx - hOBM フラクション約 25 ml を Centriplus 10 及び Centricon 10 (Amicon 社) を用いて、約 0.5 ml に遠心濃縮した。この濃縮サンプルを予め 0.01% Polysorbate 80 を含む PBS で平衡化した Superose 12 HR 10/30 カラム (1.0 × 30 cm、ファルマシア社) に負荷した。移動相として 0.01% Polysorbate 80 を含む PBS を用い、流速 0.25 ml/min でカラムを展開した。カラムからの溶出液は 0.25 ml ずつ分取した。分取した画分の Trx - hOBM は、実施例 25 - (3) 記載の方法及び SDS - PAGE により検出した。純化された Trx - hOBM を含むフラクションを集め、Trx - hOBM の蛋白質濃度を測定した。蛋白質濃度は牛血清アルブミンを標準品として用い、DC - protein assay kit (バイオラッド社) で測定した。

【0108】

[実施例 26]

hOBM の破骨細胞形成誘導活性

phOBM 及び pcDL - SRα 296 をリポフェクトアミン (ギブコ社) を用いて COS - 7 細胞にそれぞれトランスフェクトした。それぞれの細胞を 10% FCS を含む DMEM で 1 日間培養後トリプシン処理し、カバーガラス (1 mm 丸形、マツナミ社) を敷いた 24 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 5×10^4 個の細胞を播種し、さらに 2 日間培養した。培養プレートを PBS で 1 回洗浄した後、1% パラフォルムアルデヒドを含む PBS を加えて室温で 8 分間インキュベートし細胞をカバーガラス上に固定化した。細胞を固定化したプレートを PBS で 6 回洗浄した後、 10^{-8} M 活性化ビタミン D₃、 10^{-7} M デキサメサゾン、10% 牛胎児血清を含む α - MEM にて 1×10^6 個/ml になるように懸濁したマウス脾臓細胞を 1 ウェル当たり 700 μl ずつ添加した。各ウェル上に Milllicell PCF (ミリポア社) をセットし、上記培地にて 4×10^4 個/ml に懸濁した ST2 細胞を Milllicell PCF 中に 700 μl ずつ添加し、37 で 6 日間培養した。培養終了後、Milllicell PCF を取り除き、プレートを PBS で 1 回洗浄後、アセトン - エタノール溶液 (50:50) で 1 分間細胞を固定した後、LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASE キット (シグマ社) を用いて破骨細胞特異的マーカーである酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性 (TRAP 活性) を示す細胞のみを染色した。顕微鏡観察の結果、ヒト OBM cDNA を含まないベクターのみの pcDL - SRα 296 をトランスフェクトした COS - 7 細胞を固定化したウェル中には TRAP 活性を示す細胞は全く検出されなかったのに対し、phOBM をトランスフェクトした細胞を固定化したウェル中には 65 ± 18 個 (n = 3、平均値 ± 標準偏差) の TRAP 陽性細胞が観察された。又、これらの TRAP 陽性細胞は ¹²⁵I - 標識サケカルシトニン (アマシャム社) と特異的結合を示したことから、カルシトニンレセプターを発現していることが確認された。これらの結果から、本発明 cDNA によりコードされる蛋白質であるヒト OBM は破骨細胞形成を誘導する活性があることが明らかとなった。

【0109】

[実施例 27]

Trx - hOBM 及び分泌型ヒト OBM による破骨細胞形成誘導活性

マウス脾臓細胞を 10^{-8} M 活性化型ビタミン D₃、 10^{-7} M デキサメサゾン、10% 牛胎児血清を含む α - MEM に 2×10^6 個/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 350 μl 添加した。精製した Trx - hOBM を上記培地で希釈した溶液 (40 ng/ml)、pCEPshOBM または pCEP4 を形質導入した 293

- E B N A 細胞を I M D M - 1 0 % F B S で培養した培養上清を上記培地にて 1 0 倍希釈した溶液または上記培地のみをそれぞれ 3 5 0 μ l 添加した後、M i l l i c e l l P C F (ミリポア社) を各ウェルにセットし、上記培地にて懸濁した 4 $\times$ 1 0 ⁴ 個 / m l の S T 2 細胞を M i l l i c e l l P C F に 6 0 0 μ l 添加した。6 日間培養した後、M i l l i c e l l P C F を取り除き、プレートに P B S で 1 回洗浄後、アセトン - エタノール溶液 (5 0 : 5 0) で 1 分間細胞を固定した後、L E U K O C Y T E A C I D P H O S P H A T A S E キット (シグマ社) を用いて酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性 (T R A P 活性) を示す細胞のみを染色した。顕微鏡観察の結果、T r x - h O B M を添加しなかったウェル中には T R A P 活性を示す細胞は全く検出されなかったのに対し、T r x - h O B M を添加したウェルには 1 1 5 $\pm$ 1 9 個 (n = 3 、平均値 $\pm$ 標準偏差) の T R A P 陽性細胞が観察された。同様に、p C E P 4 で形質導入された 2 9 3 - E B N A の培養上清を添加したウェル中には T R A P 活性を示す細胞は全く検出されなかったのに対し、p C E P s h O B M で形質導入された 2 9 3 - E B N A の培養上清を添加したウェルには 1 2 5 $\pm$ 2 3 個 (n = 3 、平均値 $\pm$ 標準偏差) の T R A P 陽性細胞が観察された。又、これら T R A P 陽性細胞は ^{1 2 5} I 標識したサケカルシトニン (アマシャム社) と特異的結合を示しことから、カルシトニンレセプターを発現していることが確認された。これらの結果から、T r x - h O B M 及び分泌型 O B M には、破骨細胞形成を誘導する活性があることが明らかとなった。

10

【 0 1 1 0 】

〔 実施例 2 8 〕

20

ポリクローナル抗体の作製

免疫抗原として用いるマウス s O B M 又はヒト s O B M は、前記の方法に従って得た。即ち、マウス s O B M c D N A (マウス O B M の N 末端から 7 2 番目までのアミノ酸を欠損させた膜結合部位を持たないマウス s O B M (配列表配列番号 1 6) をコードする c D N A 、配列表配列番号 1 8) 又はヒト O B M c D N A (ヒト O B M の N 末端から 7 1 番目までのアミノ酸を欠損させた膜結合部位を持たないヒト s O B M (配列表配列番号 1 7) をコードする c D N A 、配列表配列番号 1 9) を、イムノグロブリンの κ - チェーンのシグナルペプチドをコードする塩基配列を含む発現ベクター p S e c T a g A (インビトロゲン社) の H i n d I I I / E c o R V 断片 (5 . 2 k b) と、O B M c D N A の E c o R I / P m a C I 断片 (0 . 3 2 k b) とともにライゲーションキット v e r . 2 (宝酒造社) を用いてライゲーションを行い、その反応生成物を用いて大腸菌 D H 5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性株からアルカリ S D S 法によりプラスミドを精製し、制限酵素で切断することにより p S e c T a g A に 0 . 6 K b と 0 . 3 2 K b の断片が挿入されたプラスミドを選び出した。このプラスミドをダイナーミネーターサイクルシーケンシング F S キット (パーキン - エルマー社) を用いてシーケンスを確認した結果、このプラスミドがマウス又はヒト s O B M をコードする配列を有することを確認した。このプラスミドを制限酵素 N h e I 、X h o I で切断した後、分泌型 O B M c D N A に相当する断片 (1 . 0 k b) をアガロースゲル電気泳動で回収した。この断片をライゲーションキットを用いて発現ベクター p C E P 4 (インビトロゲン社) の N h e I / X h o I 断片 (1 0 . 4 k b) に挿入し、その反応生成物を用いて大腸菌 D H 5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性株からアルカリ S D S 法によりプラスミドを精製し、制限酵素で切断して解析することにより、目的の構造を持った分泌型 O B M 発現プラスミド (p C E P s O B M) を持つ大腸菌株を選び出した。p C E P s O B M を持つ大腸菌株を培養し、キアフィルタープラスミドミディキット (キアゲン社) を用いて p C E P s O B M を精製した。次に、2 9 3 - E B N A 細胞を 1 0 % F C S を含む I M D M (I M D M - 1 0 % F C S) に懸濁し、コラーゲンコートした 2 4 ウェルプレート (住友ベークライト社) に 2 $\times$ 1 0 ⁵ 個 / 2 m l / ウェルになるように播種し、一夜培養した。この細胞に 1 μ g の p C E P s O B M 又は p C E P 4 をリポフェタミン (ギブコ社) 4 μ l を用いて形質導入し、0 . 5 m l の無血清 I M D M 又は I M D M - 1 0 % F C S 中でさらに 2 日間培養し、その培養上清を回収した。遺伝子組み換えマウス可溶性 O B M (m

30

40

50

s O B M) あるいはヒト可溶性 O B M (h s O B M) の高生産細胞株を以下のようにスクリーニングした。m s O B M あるいは h s O B M を含むと見られる培養上清に最終濃度が 0 . 1 M になるように炭酸水素ナトリウムを添加後、それぞれの培養上清を 1 0 0 μ l ずつ 9 6 ウェルイムノプレート (N u n c 社) の各ウェルに添加し、4 で一夜放置して培養上清中の m s O B M あるいは h s O B M を各ウェルに固相化した。このプレートの各ウェルに P B S で 4 倍希釈したブロックエース (雪印乳業社) 溶液 (B - P B S) を 2 0 0 μ l 加え、室温で 2 時間放置した。0 . 1 % p o l y s p r b a t e 2 0 を含む P B S (P - P B S) で 3 回洗浄後、B - P B S で段階的に希釈した遺伝子組み換え O C I F (r O C I F) 溶液 (3 ~ 1 0 0 n g / m l) を 1 0 0 μ l ずつ各ウェルに添加し、3 7 で 2 時間放置した。そのプレートを P B S で 3 回洗浄した後、B - P B S で希釈したパーオキシダーゼ標識抗 O C I F ポリクローナル抗体 (W O 9 6 / 2 6 2 1 7 号) を 1 0 0 μ l ずつ各ウェルに添加し、3 7 で 2 時間放置した。P - P B S で各ウェルを 6 回洗浄後、T M B 溶液 (T M B S o l u b l e A g e n t , H i g h s e n s i t i v i t y , S c y t e k 社) を 1 0 0 μ l ずつ各ウェルに加え、室温で約 1 0 分間放置した後、停止液 (S t o p p i n g R e a g e n t , S c y t e k 社) を 1 0 0 μ l ずつ各ウェルに加えた。各ウェルの 4 5 0 n m における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。m s O B M あるいは h s O B M の生産細胞株の培養上清を固相化したプレートでは、O C I F の添加濃度に比例して、吸光度が顕著に増加した。m s O B M あるいは h s O B M の生産細胞株について、その吸光度の増加の割合の高い生産株を、それぞれ高生産株として選択した。このように選択された m s O B M あるいは h s O B M 高生産 2 9 3 - E B N A 細胞をそれぞれ 5 % F C S を含有する I M D M を培地として用い、T - フラスコ (T - 2 2 5) を 2 5 枚用いて大量培養した。コンフルエントに達した後、新鮮な培地を T - 2 2 5 フラスコ 1 枚当たり 1 0 0 m l ずつ加え、3 ~ 4 日間培養して、培養上清を回収した。この操作を 4 回繰り返して、m s O B M あるいは h s O B M を含む培養上清をそれぞれ 1 0 リットル得た。実施例 2 5 - (6) 及び (7) 記載の方法に従い r O C I F 固定化カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製することにより、これら培養上清から S D S - ポリアクリルアミド電気泳動的に均一 (分子量 3 2 k D a) な精製 m s O B M 及び h s O B M をそれぞれ約 1 0 m g 及び 1 2 m g 得た。このようにして得られた精製標品を、それぞれ免疫抗原として用いた。得られた各抗原を、リン酸塩緩衝生理食塩水 (P B S) に 2 0 0 μ g / m l になるように溶解し、等容量のフロイント完全アジュバントと混合し乳化後、日本白色ウサギ各 3 羽に約 1 週間間隔で 1 m l を皮下投与し免疫した。抗体価を測定し、抗体価が最高に到達した時点で、ブースター投与し、投与 1 0 日後に全採血した。抗血清をプロテイン A セファロースクロマトグラフィー用バインディングバッファー (B i o R a d 社) で 2 倍希釈し、同バッファーで平衡化したプロテイン A カラムに負荷した。同バッファーでカラムを充分洗浄後、カラムに吸着した抗 s O B M 抗体をエリューションバッファー (B i o R a d 社) あるいは 0 . 1 M グリシン - H C l バッファー、p H 2 . 9 - 3 . 0 で溶出した。抗体溶出液を直ちに中和する目的で、1 . 0 M T r i s - H C l , p H 8 . 0 を少量含む試験管を用いて溶出溶液を分画した。抗体溶出液を P B S に対して 4 、一夜透析した。抗体溶液の蛋白量をウシ I g G をスタンダードとして L o w r y 法により測定した。このようにして、本発明のポリクローナル抗体を含む精製イムノグロブリン (I g G) が、ウサギ抗血清 1 m l 当たり約 1 0 m g 得られた。

【 0 1 1 1 】

〔 実施例 2 9 〕

ポリクローナル抗体を用いた E L I S A による O B M 及び s O B M の測定

実施例 2 8 で得られたウサギ抗ヒト s O B M ポリクローナル抗体を、固相抗体及び酵素標識抗体としたサンドイッチ E L I S A を構築した。酵素標識は、石川らの方法 (I s h i k a w a e t a l : J . I m m u n o a s s a y , V o l . 4 , 2 0 9 - 3 2 7 , 1 9 8 3) に従いパーオキシダーゼ (P O D) 標識した。実施例 2 8 で得られた抗ヒト s O B M ポリクローナル抗体を 2 μ g / m l となるように 0 . 1 M N a H C O ₃

10

20

30

40

50

溶液に溶解し、96-ウェルイムノプレート(Nunc社)の各ウェルに100 μ lずつ添加、室温で一夜放置した。次いで、各ウェルに200 μ lずつ50%ブロックエース(雪印乳業社)を加え、室温で1時間放置し、各ウェルを0.1%poly sorbate 20を含むPBS(洗浄バッファー)で3回洗浄した。

実施例26の方法と同様にヒトOBMを発現し実施例2の方法で精製することにより得られた精製ヒトOBM、及び実施例28で得られた精製ヒトsOBMをそれぞれ一次反应用バッファー(40%ブロックエース、0.1%poly sorbate 20を含む0.2M Tris-HClバッファー、pH7.2)で段階希釈した溶液を、100 μ lずつ各ウェルに加えた。室温で2時間放置後、各ウェルを上記洗浄バッファーで3回洗浄した。二次反应用バッファー(25%ブロックエース、0.1%poly sorbate 20を含む0.1M Tris-HClバッファー、pH7.2)で1000倍希釈したPOD標識抗ヒトsOBMポリクローナル抗体を100 μ lずつ各ウェルに加え、室温で2時間放置した後、各ウェルを3回洗浄バッファーで洗浄した。各ウェルに酵素基質溶液(TMB, Scy Tek社)を100 μ lずつ添加し、室温で10分間放置後、反応停止液(Stopping reagent, Scy Tek社)を100 μ lずつ各ウェルに加えて酵素反応を停止させた。各ウェルの450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。結果を図26に示す。ウサギ抗ヒトsOBMポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAは、ヒトsOBM(分子量約32kDa)及びヒトOBM(分子量約40kDa)をほぼ等しく認識し、それぞれの測定感度は約 1.25×10^{-3} pmol/ml(ヒトOBMで約500pg/ml、ヒトsOBMで約400pg/ml)であった。実施例28で得られたウサギ抗マウスsOBMポリクローナル抗体を用いたELISAによるマウスsOBM及びマウスOBMの測定は上記と同様に実施でき、それぞれの測定感度も同程度で極めて微量のマウスsOBMあるいはマウスOBMを測定できることが明らかとなった。

以上のように、実施例28で得られた本発明抗ヒトsOBMポリクローナル抗体は、ヒトsOBM及びヒトOBMの両抗原を等しく認識することから、抗ヒトOBM/sOBMポリクローナル抗体と名付けた。又、実施例28で得られた抗マウスsOBMポリクローナル抗体は、同様にマウスsOBM及びマウスOBMの両抗原を等しく認識することから、抗マウスOBM/sOBMポリクローナル抗体と名付けた。

【0112】

〔実施例30〕

モノクローナル抗体の作製

免疫用抗原には、実施例28で得られた精製ヒトsOBMを用いた。精製ヒトsOBMを10 μ g/mlになるように生理食塩水に溶解した。このようにして調製したヒトsOBM溶液に、同容量のフロイント完全アジュバントを加え良く乳化した後、それぞれの抗原をBalb/cマウス一匹当たり腹腔内に200 μ lずつ1週間間隔で3回投与し、マウスを免疫した。次に、ヒトsOBMを5 μ g/ml含む生理食塩水に同容量のフロイント不完全アジュバントを添加し、充分乳化したものを上記Balb/cマウス一匹あたり200 μ lずつ、1週間間隔で4回追加免疫した。4回目の追加免疫の1週間後、ブースターとしてヒトsOBMを10 μ g/ml含む生理食塩水をBalb/cマウス1匹当たり100 μ lずつ静脈内に投与した。最終免疫後3日目に脾臓を摘出、脾臓細胞を分離し、マウスミエローマ細胞P3x63-AG8.653とを公知の方法(KoeHLer, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495(1975))に従い細胞融合した。融合終了後、細胞懸濁液をヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むHAT培地中で10日間培養した。ミエローマ細胞が死滅し、ハイブリドーマが出現した後、HAT培地からアミノプテリンを除いたHT培地に培地交換し、培養を続けた。

【0113】

〔実施例31〕

ハイブリドーマの選択及びクローニング

10

20

30

40

50

実施例 30 の細胞融合及び培養を開始して 10 日後にハイブリドーマの出現を認めたので、下記に記載した改良ソリッドフェーズ E L I S A により、ヒト s O B M を認識する高親和性抗体及びその抗体を産生するハイブリドーマの選択を行った。又、ヒト s O B M とマウス s O B M の両方を認識する抗 O B M モノクローナル抗体を選択するために、ソリッドフェーズ E L I S A 用抗原として、ヒト s O B M 以外に実施例 27 で得られたマウス s O B M も使用した。ヒト s O B M 及びマウス s O B M をそれぞれ $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように 0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液に溶解し、それぞれの抗原溶液を $50 \mu\text{l}$ ずつ 96 - ウェルイムノプレート (Nunc 社) の各ウェルに加え、4 で一夜静置しそれぞれの抗原を固相化した。各ウェル中の抗原溶液を捨て、各ウェルに 50 % ブロックエース (雪印乳業社) を $200 \mu\text{l}$ ずつ加え、室温で 1 時間放置してブロッキングした。各ウェルを 0.1 % p o l y s o r b a t e 20 を含むリン酸塩緩衝生理食塩水 (P B S - P) で洗浄し、各ウェルに $40 \mu\text{l}$ の牛血清 (ハイクローン社) を加えた。次いで、各ウェルに $10 \mu\text{l}$ のハイブリドーマ培養上清を加え、80 % 血清濃度下、室温で 2 時間反応させた。80 % 血清存在下でのソリッドフェーズ E L I S A の目的は、高濃度の蛋白質及び血清由来の免疫反応妨害物質等の存在中でも微量のヒト s O B M あるいはマウス s O B M と結合できる抗体、即ちヒト s O B M あるいはマウス s O B M に対して高親和性の抗体生産ハイブリドーマを選択するためである。室温で 2 時間反応後、プレートを P B S - P で洗浄し、25 % ブロックエースを含む生理食塩水で 5000 分の 1 に希釈したパーオキシダーゼ標識抗マウス I g G (K P L 社) を各ウェルに $50 \mu\text{l}$ 加え、室温で 2 時間反応させた。プレートを P B S - P で 3 回洗浄した後、各ウェルに $50 \mu\text{l}$ の酵素基質溶液 (T M B , S c y T e k 社) を加え、室温で 5 分間反応させた。次いで、反応停止液 (s t o p p i n g r e a g e n t , S c y T e k 社) $50 \mu\text{l}$ を加えて酵素反応を停止させた。各ウェルの 450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (イムノリーダー N J 2000、日本インターメッド社) を用いて測定し、ヒト s O B M あるいはマウス s O B M を認識する抗体生産ハイブリドーマを選択した。特に高い吸光度 ($\text{OD}_{450 \text{ nm}}$) を示すそれぞれの抗体生産ハイブリドーマを選択し、それらを限界希釈法により 3 ~ 5 回クロニングを繰り返すことにより、安定な抗体生産ハイブリドーマを樹立した。得られた抗体生産株の中から、さらに抗体の生産性が高いハイブリドーマ株を選別した。

10

20

30

40

50

【0114】

〔実施例 32〕

モノクローナル抗体の生産及び精製

実施例 31 で得られた抗体、即ち高親和性でヒト s O B M を認識する抗体生産ハイブリドーマ及びマウス s O B M にも交差性を有する抗体を産生するハイブリドーマをそれぞれ培養し、マウス一匹当たりそれぞれのハイブリドーマを 1×10^6 細胞ずつ、約 1 週間前にプリスタン (アルドリッチケミカル社) を投与しておいた B a l b / c 系マウスの腹腔内に移植した。約 2 ~ 3 週間後、蓄積した腹水を採取し、本発明のヒト s O B M あるいはヒト s O B M 及びマウス s O B M を認識するモノクローナル抗体を含む腹水を得た。実施例 28 に記載したプロテイン A カラムによる抗 O B M / s O B M ポリクローナル抗体の精製法に準じて、プロテイン A カラム (ファルマシア社) クロマトグラフィーにより腹水から精製モノクローナル抗体を得た。

【0115】

〔実施例 33〕

モノクローナル抗体の抗原特異性

ヒト s O B M を特異的に認識するモノクローナル抗体並びにヒト s O B M 及びマウス s O B M にも交差性を有するモノクローナル抗体について、ヒト s O B M、膜結合部位を有する i n t a c t なヒト O B M、マウス s O B M、及び膜結合部位を有する i n t a c t なマウス O B M を抗原とした時の抗原特異性について調べた。30 数種類のモノクローナル抗体を得たが、それらのうち代表的なモノクローナル抗体についての結果を第 1 表に示す。この結果、ヒト s O B M を特異的に認識する抗ヒト s O B M モノクローナル抗体のほとんど全ては膜結合部位を有する i n t a c t なヒト O B M も認識するが、マウス s O B M

及び膜結合部位を有する *i n t a c t* なマウス O B M は認識しないことが明らかとなった。一方、ヒト s O B M 及びマウス s O B M も認識するモノクローナル抗体も得られたが、その数は極めて少なく、これらの抗体はヒト O B M 並びにマウス O B M にも交差性を有していることがわかった。これらの結果は、ヒト O B M とマウス O B M には共通した抗原認識部位、即ちエピトープが存在していることを示すものである。ヒト s O B M を免疫抗原として作製した抗ヒト s O B M モノクローナル抗体は、膜結合型の *i n t a c t* な蛋白質であるヒト O B M も等しく認識することから、抗ヒト s O B M モノクローナル抗体を抗ヒト O B M / s O B M モノクローナル抗体と名付けた。

【 0 1 1 6 】

【表 1】

10

抗体名	抗 原			
	hsOBM	hOBM	msOBM	mOBM
H-OBM 1	+	+	—	—
H-OBM 2	+	+	—	—
H-OBM 3	+	+	—	—
H-OBM 4	+	+	—	—
H-OBM 5	+	+	—	—
H-OBM 6	+	+	—	—
H-OBM 7	+	+	—	—
H-OBM 8	+	+	—	—
H-OBM 9	+	+	+	+
H-OBM 10	+	+	—	—
H-OBM 11	+	+	—	—
H-OBM 12	+	+	—	—
H-OBM 13	+	+	+	+
H-OBM 14	+	+	—	—

20

(hsOBM: ヒト可溶性OBM、hOBM: ヒト膜結合型 OBM、
msOBM: マウス可溶性OBM、mOBM: マウス膜結合型 OBM)

30

【 0 1 1 7 】

〔実施例 3 4〕

モノクローナル抗体のクラス及びサブクラスの検定

本発明のモノクローナル抗体のクラス及びサブクラスを、イムノグロブリンクラス及びサブクラス分析キット（アマシャム社）を用いて検定した。検定は、キットに指示されているプロトコールに従い実施した。代表的なモノクローナル抗体についての結果を表 2 に示す。抗ヒト O B M / s O B M モノクローナル抗体の大多数は I g G₁ であり、その他 I g G_{2 a} 及び I g G_{2 b} も存在していた。又、いずれの抗体もライトチェーンは κ 鎖であった。

40

【 0 1 1 8 】

【表 2】

抗体名	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃	IgA	κ
H-OBM 8	—	+	—	—	—	+
H-OBM 9	+	—	—	—	—	+
H-OBM 10	+	—	—	—	—	+
H-OBM 11	+	—	—	—	—	+
H-OBM 12	—	—	+	—	—	+
H-OBM 13	+	—	—	—	—	+
H-OBM 14	+	—	—	—	—	+

10

【0119】

〔実施例35〕

モノクローナル抗体の解離定数 (Kd 値) の測定

公知の方法 (Betrand Friguert et al.: Journal of Immunological Methods, 77, 305-319, 1986) に従い、モノクローナル抗体の解離定数を測定した。即ち、実施例32で得られた精製抗体を 5 ng/ml に 40% ブロックエース、0.1% polysorbate 20 を含む 0.4 M Tris-HCl pH 7.4 (1次バッファー) で希釈し、これに実施例28で得られた精製ヒト可溶性OBM (hsOBM) を 6.25 ng/ml ~ 10 μ g/ml になるように1次バッファーで希釈したものを等容量混ぜ、4 で15時間静置することによりhsOBMとモノクローナル抗体を結合させた。15時間後、hsOBMと未結合の抗体をhsOBM (10 μ g/ml、100 μ l/ウェル) を固相化したソリッドフェーズELISAにて測定することにより、モノクローナル抗体のhsOBMに対する解離定数を算定した。又、hsOBMに対するモノクローナル抗体でありながら、マウス可溶性OBM (msOBM) にも交差する抗体のmsOBMに対する親和性についても、上記のhsOBMの代わりにmsOBMを使用することにより同様に測定した。特に、各抗原に高い親和性を示し、酵素免疫測定法やその他バインディングアッセイ等に有用な抗体についての結果を第3表に示す。

20

30

【0120】

【表3】

抗体名	サブクラス	抗原	解離定数 Kd (M)
H-OBM 1	IgG ₁ (κ)	hsOBM	$1 \times 10^{-11} < Kd < 1 \times 10^{-10}$
H-OBM 4	IgG ₁ (κ)	hsOBM	$1 \times 10^{-11} < Kd < 1 \times 10^{-10}$
H-OBM 9	IgG ₁ (κ)	hsOBM	$1 \times 10^{-9} < Kd < 1 \times 10^{-8}$
H-OBM 9	IgG ₁ (κ)	msOBM	$1 \times 10^{-8} < Kd < 1 \times 10^{-7}$

40

この結果、ヒト可溶性OBM (hsOBM) に特異的な抗体であるH-OBM 1及びH-OBM 4は解離定数 (Kd) が 10^{-11} Mオーダーで、hsOBMに極めて高い親和性を有していることが明らかになった。一方、hsOBM及びマウス可溶性OBM (msO

50

B M) の両方を認識する抗体、H - O B M 9 の K d 値は、m s O B M に対しては 10^{-8} オーダーであり、h s O B M に対しては 10^{-9} M オーダーであった。又、表 1 に記載の両抗原を認識する他の抗体、H - O B m 1 3 の両抗原に対する解離定数は、H - O B M 9 と差異はなく、両抗体はサブクラスも一致していることから、同じエピトープを認識する同一抗体である可能性が示唆された。

【 0 1 2 1 】

〔 実施例 3 6 〕

抗ヒト O B M / s O B M モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ E L I S A によるヒト O B M 及び s O B M の測定方法

実施例 3 5 で得られた 2 種類の高親和性モノクローナル抗体、H - O B m 1 及び H - O B M 4 をそれぞれ固相抗体と酵素標識抗体として、サンドイッチ E L I S A を構築した。10
抗体の標識は、マレイミド活性化パーオキシダーゼキット（ピアス社）を用いて行った。H - O B m 1 抗体を $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ になるよう 0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液に溶解し、 $100 \mu\text{l}$ ずつ 96 - ウェルイムノプレート（Nunc 社）の各ウェルに加え、4 で一夜静置し固相化した。各ウェルの溶液を捨て、 50% 濃度のブロックエース $300 \mu\text{l}$ を加え、室温で 2 時間静置しブロッキングした。ブロッキング後、プレートを 0.1% p o l y s o r b a t e 20 を含むリン酸塩緩衝生理食塩水（P B S - P）で洗浄した。ヒト可溶性 s O B M 及びヒト O B M をそれぞれ 40% ブロックエース（雪印乳業社）及び 0.1% p o l y s o r b a t e 20（和光純薬社）を含む 0.4 M T r i s - H C l（p H 7 . 4）（1 次 反 応 バ ッ フ ァ ー）に溶解、希釈し、種々の濃度の被験溶液を調製した。種
20 々の濃度に調製したそれぞれの被験溶液を $100 \mu\text{l}$ ずつ各ウェルに加え、室温で 2 時間反応させた。2 時間後、プレートを P B S - P で洗浄し、 25% ブロックエース及び 0.1% p o l y s o r b a t e 20 を含む 0.2 M T r i s - H C l（p H 7 . 4）（2 次 反 応 バ ッ フ ァ ー）で希釈した P O D 標識 H - O B M 4 抗体を各ウェルに $100 \mu\text{l}$ 加え、室温で 2 時間反応させた。
プレートを P B S - P で洗浄した後、各ウェルに $100 \mu\text{l}$ の酵素基質溶液（T M B , S c y T e k 社）を加えて発色させた後、反応停止液（s t o p p i n g r e a g e n t , S c y T e k 社）を $100 \mu\text{l}$ ずつ各ウェルに加えて酵素反応を停止した。各ウェルの 450 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。結果を図 2 7 に示す。30

この結果、実施例 3 5 で得られた 2 種類の高親和性抗ヒト O B M / s O B M モノクローナル抗体、H - O B m 1 及び H - O B M 4 を用いて構築したサンドイッチ E L I S A は、ヒト O B M 及びヒト s O B M を等しく認識し、その測定感度は約 $1.25 - 2.5 \times 10^{-3} \text{ pmol} / \text{ml}$ （分子量約 40 kDa のヒト O B M では約 $50 - 100 \text{ pg} / \text{ml}$ 、分子量約 32 kDa のヒト s O B M では約 $40 - 80 \text{ pg} / \text{ml}$ ）で極めて微量のヒト O B M 及びヒト s O B M を測定できることが明らかとなった。尚、これら 2 種類の抗ヒト O B M / s O B M モノクローナル抗体、H - O B m 1 及び H - O B M 4 を生産するハイブリドーマを H - O B m 1 及び H - O B M 4 と命名し、またマウス O B M 及びマウス s O B M も認識し、破骨細胞形成抑制活性を発揮する抗ヒト O B M / s O B M モノクローナル抗体、H - O B M 9 を生産するハイブリドーマを H - O B M 9 と命名した。これらのハイブリド
40 マーマは、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（現独立行政法人産業技術総合研究所 微生物寄託センター）に受託番号 F E R M B P - 6 2 6 4（H - O B m 1）、F E R M B P - 6 2 6 5（H - O B M 4）、及び F E R M B P - 6 2 6 6（H - O B M 9）として、平成 9 年 1 1 月 5 日にそれぞれ寄託されている。

【 0 1 2 2 】

〔 実施例 3 7 〕

マウス O B M 及びマウス s O B M を認識する抗ヒト O B M / s O B M モノクローナル抗体を用いたマウス O B M 及びマウス s O B M の測定

実施例 3 3 及び 3 5 で得られたマウス O B M 及びマウス s O B M も認識する抗ヒト O B M / s O B M モノクローナル抗体、H - O B M 9 を固相抗体とし、実施例 2 8 で得られた抗 50

マウス O B M / s O B M ポリクローナル抗体を酵素標識抗体とするサンドイッチ E L I S A を構築した。

マウス O B M 及びマウス s O B M をそれぞれ実施例 3 5 と同様に一次反応用バッファーで段階的に希釈し、実施例 3 6 と同様の方法によりマウス O B M 及びマウス s O B M を測定した。結果を図 2 8 に示す。この結果、本発明のマウス O B M 及びマウス s O B M も認識する本発明の抗ヒト O B M / s O B M モノクローナル抗体、H - O B M 9 を使用することにより、マウス O B M 及びマウス s O B M を同様に測定できることが確認された。実施例 3 5 の結果に示すように、この抗ヒト O B M / s O B M モノクローナル抗体、H - O B M 9 はマウス s O B M に対する解離定数が高い、即ちマウス s O B M に対する親和性が比較的低いことから、本 E L I S A によるマウス O B M (分子量約 4 0 k D a) 及びマウス s O B M (分子量約 3 2 k D a) の測定感度は、約 2.5×10^{-3} p m o l / m l (マウス O B M では約 1 n g / m l 、マウス s O B M では約 0 . 8 n g / m l) 程度であった。

10

【 0 1 2 3 】

〔 実施例 3 8 〕

抗 O B M / s O B M 抗体による破骨細胞形成抑制活性試験

マウス脾細胞と S T 2 細胞 (マウス骨髓由来間質細胞) との c o - c u l t u r e で o s t e o c l a s t - l i k e c e l l (O C L) が誘導されることが知られている (E n d o c r i n o l o g y , 1 2 5 , 1 8 0 5 - 1 8 1 3 (1 9 8 9)) 。そこで、O B M / s O B M 抗体をこの c o - c u l t u r e に添加した時、O C L 誘導を抑制するか否かを検討した。この c o - c u l t u r e 系においてはマウス O B M が発現している
20
ので、実施例に使用する抗体はマウス O B M を認識するウサギ抗マウス O B M / s O B M ポリクローナル抗体、及びヒト O B M 及びマウス O B M の両抗原を認識するヒト抗 O B M / s O B M モノクローナル抗体、H - O B M 9 を用いた。1 0 % F C S を含む α M E M にて段階希釈したそれぞれの O B M 抗体を 2 4 w e l l p l a t e (ヌンク社) に 7 0 0 μ l / w e l l 、上記培地にて懸濁した雄マウス脾細胞 (2×10^6 / m l) を 3 5 0 μ l / w e l l 添加した。次いでトリプシナイズした S T 2 細胞を 4×10^{-8} M V i t a m i n D ₃ 及び 4×10^{-7} M D e x a m e t h a z o n e を含む上記培地に懸濁し (8×10^4 c e l l s / m l) 3 5 0 μ l / w e l l 添加し、3 7 °C で 6 日間培養した。培養プレートを P B S にて 1 回洗浄したのち、5 0 % エタノール、5 0 % アセトンの混合液にて室温で 1 分間固定した。プレートを風乾した後、L E U K O C Y T E A C I D
30
P H O S P H A T A S E キット (シグマ社) のプロトコールに従い基質液を 5 0 0 μ l / w e l l 添加し、3 7 °C で 5 5 分間反応させた。この反応により破骨細胞特異的マーカーである酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性 (T R A P 活性) を示す細胞のみが染色される。プレートを蒸留水で 1 回洗浄した後風乾して T R A P 陽性細胞数をカウントした。結果を表 4 に示す。この結果、ウサギ抗マウス O B M / s O B M ポリクローナル抗体及びマウス O B M を認識する抗ヒト O B M / s O B M モノクローナル抗体、H - O B M 9 とともに抗体濃度に依存して O C L 誘導を阻害することがわかった。

20

30

これらの抗体は、破骨細胞形成因子、O C I F / O P G と同様に破骨細胞形成抑制活性を有し、骨代謝異常症治療薬として有望であることが明らかになった。

【 0 1 2 4 】

40

【 表 4 】

抗体添加量 (ng/ml)	TRAP 陽性多核細胞数	
	ウサギ 抗マウス OBM/sOBM ポリクローナル 抗体	マウス 抗ヒトOBM/sOBM モノクローナル 抗体 (H-OBM 9)
0	1155 ± 53	1050 ± 45
10	510 ± 24	650 ± 25
100	10 ± 3	15 ± 4

(平均±標準偏差、n=3)

10

【0125】

〔実施例39〕

Trx - OBMのヒト破骨細胞形成誘導活性

成人健常者より静脈採取した全血から、Histopaque (sigma社)を用い、添付のプロトコルに従い density gradient 法によって単核細胞を調製した。この単核細胞を 10^{-7} M デキサメサゾン、200 ng/ml マクロファージコロニー刺激因子 (ミドリ十字社)、10% 牛胎児血清及び実施例15で得られた。精製された Trx - OBM (0 - 100 ng/ml) を含む α - MEM に 1.3×10^6 / ml になるように懸濁し、この懸濁液を48ウェルプレートに1ウェルあたり300 μ l 添加し3日間37℃で培養した。培養液を上記培地で交換後、さらに4日間37℃で培養した。培養した細胞を実施例5に示した方法で酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性 (TRAP 活性) を示す細胞を選択的に染色し、染色された多核細胞の数を顕微鏡観察により測定した。結果を図29に示す。この結果、Trx - OBM を添加しなかったウェル中には TRAP 活性を示す細胞はほとんど検出されなかったのに対し、Trx - OBM を添加すると濃度依存的に TRAP 陽性多核細胞が出現した。又、これらの TRAP 陽性多核細胞は破骨細胞のマーカーであるビトロネクチンレセプターも陽性であった。さらに、同様の培養を48ウェルプレートに静置した象牙質切片上で行うと、Trx - OBM 存在下でのみ象牙質切片上に吸収窩が形成された。これより、Trx - OBM にはヒト破骨細胞形成を誘導する活性があることが明らかとなった。

20

30

【0126】

〔実施例40〕

抗OBM / sOBM 抗体による骨吸収抑制活性

妊娠15日目の ddY マウス (日本 SLC 社) に $[^{45}\text{Ca}] - \text{CaCl}_2$ 溶液 (Ame r s h a m 社) を1匹あたり25 μ Ci 皮下注射し、胎仔の骨を ^{45}Ca でラベルした。翌日、マウスを屠殺し開腹して、子宮から胎仔を取り出した。胎仔より前肢を摘出して、皮膚及び筋肉を剥がし長管骨を摘出し、さらに軟骨を除去して長管骨の骨幹部のみにした。骨幹部は24穴プレートに入れた0.5 ml の培養液 (0.2% 牛血清アルブミン (s i g m a 社) を含む BGJb medium (G I B C O B R L 社)) に1本ずつ浮かべ、37℃、5% CO_2 存在下で24時間培養した。前培養終了後、各種骨吸収因子 (ビタミン D_3 、プロスタグランジン E_2 、副甲状腺ホルモン、インターロイキン 1α)、及び正常ウサギ IgG (100 μ g/ml; 対照として) 又は実施例28で得られたウサギ抗OBM / sOBM ポリクローナル抗体を含む新しい培養液 (0.5 ml) に長管骨を移し、さらに72時間培養した。培養終了後、長管骨は0.5 ml の5% トリクロロ酢酸水溶液 (和光純薬社) に入れ、室温で3時間以上処理して脱灰した。培養液及びトリクロロ酢酸抽出液 (共に0.5 ml) にシンチレーター (A Q U A S O L - 2、P A C K A R D 社) 5 ml を加え、 ^{45}Ca の放射活性を測定し、骨吸収により培養液中に遊離した ^{45}Ca の割合を算出した。結果を図30~図33にそれぞれ示す。この結果、ビタミン D_3 (10^{-8} M) は骨吸収活性を上昇させたが、ウサギ抗OBM / sOBM ポリクロー

40

50

ーナル抗体を加えることにより、濃度依存的にビタミンD₃による骨吸収を抑制し、100 μg/mlの濃度において完全に抑制した(図30)。又、プロスタグランジンE₂(10⁻⁶ M)あるいは副甲状腺ホルモン(100 ng/ml)は骨吸収活性を上昇させたが、ウサギ抗OBM/sOBMポリクローナル抗体の添加(100 μg/ml)により、プロスタグランジンE₂及び副甲状腺ホルモンによる骨吸収をほぼ完全に抑制した(図31及び図32)。一方、陽性対照として用いた正常ウサギIgG(100 μg/ml)は、プロスタグランジンE₂及び副甲状腺ホルモンによる骨吸収に対して影響しなかった。又、インターロイキン1α(10 ng/ml)によっても骨吸収が引き起こされたが、ウサギ抗OBM/sOBMポリクローナル抗体(100 μg/ml)により有意に抑制された(図23)。これらの結果より、本発明抗体は骨吸収抑制物質として優れていることが明らかとなった。マウス抗ヒトOBM/sOBM抗体であるH-OBM9についても同様の実験を行った結果、ウサギ抗OBM/sOBMポリクローナル抗体とほぼ同等の骨吸収抑制活性があることが確認された。

10

【0127】

産業上の利用の可能性

本発明により、破骨細胞形成抑制因子(Osteoclastogenesis inhibitory factor; OCIF)に結合する新規な蛋白質、その製造方法、この蛋白質を用いて該蛋白質の発現を調節する物質のスクリーニング方法、該蛋白質の作用を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法、該蛋白質と結合してその作用を伝達するレセプターのスクリーニング方法、及びこれらのスクリーニング方法により得られた物質を含有する医薬組成物、該蛋白質に対する抗体、及びその抗体を用いた骨代謝異常治療剤が提供される。

20

また、本発明により、破骨細胞形成抑制因子OCIFに結合する新規な蛋白質(OCIF結合分子)をコードするDNA、そのDNAによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、そのDNAを用いてOCIFに特異的に結合する蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法、及び該蛋白質を含有する骨代謝治療剤が提供される。更に、OCIF結合分子の発現を調節するスクリーニング方法、OCIF結合分子と結合しその作用を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法、OCIF結合分子と結合しその作用を伝達するレセプターのスクリーニング方法、これらのスクリーニングの結果得られた物質を含有する医薬組成物が提供される。

30

さらに、破骨細胞形成抑制因子OCIFに結合する新規なヒト蛋白質(ヒト由来OCIF結合分子、ヒトOBM)をコードするDNA、そのDNAによりコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、そのDNAを用いてOCIFに特異的に結合する性質を有し、破骨細胞の分化、成熟を支持、促進する生物活性を有する蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法、及び該蛋白質を含有する骨代謝異常症治療剤が提供される。OCIF結合分子の発現を調節する物質のスクリーニング方法、OCIF結合分子と結合し、その作用を阻害又は修飾する物質のスクリーニング方法、OCIF結合分子と結合し、その生物作用を伝達するレセプターのスクリーニング方法、及びこれらのスクリーニングの結果得られた物質を含有する医薬組成物、さらにヒト由来OCIF結合蛋白質に対する抗体及びその抗体を用いた骨代謝異常症の予防及び/又は治療薬が提供される。

40

またさらに、本発明により、OCIFに特異的に結合する膜結合分子(OCIF binding molecule; OBM)蛋白質及び膜結合部位を欠損した可溶性OBM(sOBM)の両抗原を認識する抗体(抗OBM/sOBM抗体)、その製造方法、この抗体を用いたOBM及びsOBMの測定方法、さらにこの抗体を有効成分とする骨代謝異常症予防及び/又は治療剤が提供される。

本発明により得られた蛋白質あるいは抗体は、医薬あるいは研究又は試験用試薬として有用である。

【0128】

【配列表フリーテキスト】

配列番号3: PCRプライマー SRR2

50

配列番号4 : P C R プライマー m l 3 P r i m e r M 3
 配列番号5 : P C R プライマー m l 3 P r i m e r R V
 配列番号6 : P C R プライマー O B M # 8
 配列番号7 : P C R プライマー O B M H F
 配列番号8 : P C R プライマー O B M X R
 配列番号9 : P C R プライマー O B M # 3
 配列番号10 : P C R プライマー O B M S a l R 2
 配列番号13 : P C R プライマー ヒト O B M S F
 配列番号14 : P C R プライマー ヒト O B M S a l R 2

【配列表】

10

SEQUENCE LISTING

<110> Sankyo Co., Ltd

<120> Novel Protein and Method for Producing the Protein

<130> 2003-104SV

20

<140>

<141>

<150> JP H09-97808

<151> 1997-04-15

<150> JP H09-151434

30

<151> 1997-06-09

<150> JP H09-217897

<151> 1997-08-12

<150> JP H09-224803

40

<151> 1997-08-21

<150> JP H09-332241

<151> 1997-12-02

<150> PCT/JP98/01728

<151> 1998-04-15

<150> JP H10-543741

<151> 1998-04-15

<160> 19

10

<170> PatentIn version 3.1.2

<210> 1

<211> 316

<212> PRT

<213> mouse OBM

20

<220>

<223> Inventor: Yamaguchi, Kyoji

Inventor: Yasuda, Hisataka

Inventor: Nakagawa, Nobuaki

Inventor: Shima, Nobuyuki

Inventor: Kinosak, Masahiko

Inventor: Tsuda, Eisuke

Inventor: Goto, Masaaki

Inventor: Yano, Kazuki

Inventor: Tomoyasu, Akihiro

Inventor: Kobayashi, Fumie

Inventor: Washida, Naohiro

Inventor: Takahashi, Ken

Inventor: Morinaga, Tomonori

30

40

Inventor: Higashio, Kanji

<400> 1

Met	Arg	Arg	Ala	Ser	Arg	Asp	Tyr	Gly	Lys	Tyr	Leu	Arg	Ser	Ser
1				5					10					15
Glu	Glu	Met	Gly	Ser	Gly	Pro	Gly	Val	Pro	His	Glu	Gly	Pro	Leu
				20					25					30
His	Pro	Ala	Pro	Ser	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala
				35					40					45
Ser	Arg	Ser	Met	Phe	Leu	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Gln
				50					55					60
Val	Val	Cys	Ser	Ile	Ala	Leu	Phe	Leu	Tyr	Phe	Arg	Ala	Gln	Met
				65					70					75
Asp	Pro	Asn	Arg	Ile	Ser	Glu	Asp	Ser	Thr	His	Cys	Phe	Tyr	Arg
				80					85					90
Ile	Leu	Arg	Leu	His	Glu	Asn	Ala	Gly	Leu	Gln	Asp	Ser	Thr	Leu
				95					100					105
Glu	Ser	Glu	Asp	Thr	Leu	Pro	Asp	Ser	Cys	Arg	Arg	Met	Lys	Gln
				110					115					120
Ala	Phe	Gln	Gly	Ala	Val	Gln	Lys	Glu	Leu	Gln	His	Ile	Val	Gly
				125					130					135
Pro	Gln	Arg	Phe	Ser	Gly	Ala	Pro	Ala	Met	Met	Glu	Gly	Ser	Trp
				140					145					150
Leu	Asp	Val	Ala	Gln	Arg	Gly	Lys	Pro	Glu	Ala	Gln	Pro	Phe	Ala
				155					160					165
His	Leu	Thr	Ile	Asn	Ala	Ala	Ser	Ile	Pro	Ser	Gly	Ser	His	Lys
				170					175					180
Val	Thr	Leu	Ser	Ser	Trp	Tyr	His	Asp	Arg	Gly	Trp	Ala	Lys	Ile
				185					190					195

10

20

30

40

Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp
 200 205 210
 Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu
 215 220 225
 Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr
 230 235 240
 Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met
 245 250 255
 Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His
 260 265 270
 Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly
 275 280 285
 Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro
 290 295 300
 Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile
 305 310 315

10

20

Asp

316

<210> 2

<211> 1538

<212> DNA

<213> mouse OBM cDNA

30

<400> 2

gccaggacct ctgtgaaccg gtcggggcgg gggccgcctg gccgggagtc tgctcggcgg 60
 tgggtggccg aggaaggag agaacgatcg cggagcaggg cgcccgaact ccgggcgccc 120
 cgccatgcgc cgggccagcc gagactacgg caagtacctg cgcagctcgg aggagatggg 180
 cagcggcccc ggcgtccac acgagggtcc gctgcacccc gcgccttcg caccggctcc 240

40

ggccgcccga cccgcccgt cccgctccat gticctggcc ctccctggggc tgggactggg 300
 ccaggctggc tgcagcatcg ctctgttct gtactttcga gcgcagatgg atcctaacag 360
 aatacagaa gacagcactc actgcttita tagaatcctg agactccatg aaaacgcagg 420
 ttgcaaggac tcgactctgg agagtgaaga cacactacct gactcctgca ggaggatgaa 480
 acaagccitt cagggggccg tgcagaagga actgcaacac attgtggggc cacagcgctt 540
 ctcaaggagct ccagctatga tgggaaggctc atgggttggat gtggcccagc gaggcaagcc 600
 tgaggcccag ccatttgcac acctaccat caatgtctgc agcatcccat cgggttccca 660
 taaagtcact ctgtctcttt ggtaccacga tcgaggctgg gccaaagatct ctaacatgac 720
 gttaagcaac ggaaaactaa gggttaacca agatggcttc tattacctgt acgccaacat 780
 ttgctttcgg catcatgaaa catcgggaag cgtacctaca gactatcttc agctgatggg 840
 gtaigtctgt aaaaccagca tcaaaatccc aagtctctat aacctgatga aaggaggag 900
 cacgaaaaac tggctgggca attctgaatt ccacttttat tccataaatg ttgggggatt 960
 ttcaagctc cgagctggcg aagaaattag cattcaggcg tccaaccttt cctgtctgga 1020
 tccggatcaa gatgcgacgt actttggggc tticaaagtt caggacatag actgagactc 1080
 attcgtgga acattagcat ggatgtctta gatgtttgga aacttcttaa aaaatggatg 1140
 atgtctatac atgtgtaaga ctactaagag acatggccca cggtgtatga aactcacagc 1200
 cctctctctt gagcctgtac aggttgtgta taigttaaagt ccataggatg tgttagattc 1260
 atggtgatta cacaacgggt ttacaatttt gtaatgattt cctagaattg aaccagattg 1320
 ggagaggat tccgatgctt atgaaaaact tacacgtgag ctatggaagg gggtcacagt 1380
 ctctgggtct aacctctgga catgtgccac tgagaacctt gaaattaaaga ggatgccatg 1440
 tcatgcaaa gaaatgatag tgtgaagggt taagtctttt tgaattgtta cattgcgctg 1500
 ggacctgcaa ataagttctt tttttctaat gaggagag 1538

10

20

30

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer SRR2

<400> 3

aaacgcaaaa aaccagaaag g 21

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer ml3PrimerM3

<400> 4

gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer ml3PrimerRV

<400> 5

caggaaacag ctatgac 17

<210> 6

<211> 22

10

20

30

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer OBM#8

<400> 6

aagccccaaa gtacgtcgca tc 22

10

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer OBM HF

<400> 7

cgaagctttc gagcgcatat ggaacc 26

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer OBM XR

40

<400> 8

cctctagagt ctaatgcctg aagtttg 27

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer OBM#3

<400> 9

atcagaagac agcactcact 20

<210> 10

20

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer OBM SalR2

30

<400> 10

gggtcgacc taggacatcc atgctaattg tcc 33

<210> 11

<211> 317

<212> PRT

<213> human OBM

40

<400> 11

Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Thr Lys Tyr Leu Arg Gly Ser Glu
 5 10 15
 Glu Met Gly Gly Gly Pro Gly Ala Pro His Glu Gly Pro Leu His Ala
 20 25 30
 Pro Pro Pro Pro Ala Pro His Gln Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met
 35 40 45
 Phe Val Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Val
 50 55 60
 Ala Leu Phe Phe Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Gly Thr His Cys Ile Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn
 85 90 95
 Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile
 100 105 110
 Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln
 115 120 125
 Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys
 130 135 140
 Ala Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu
 145 150 155 160
 Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro
 165 170 175
 Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
 180 185 190
 Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile Val
 195 200 205
 Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His
 210 215 220

10

20

30

40

10

20

30

40

```

tttagcaatg gaaaactaat agttaatcag gatggctttt attacctgta tgccaacatt 660
tgctttcgac atcatgaaac ttcaggagac ctagctacag agtatcttca actaatggig 720
tacgtcacta aaaccagcat caaaatccca agttctcata cctgatgaa aggaggaagc 780
accaagtatt ggtcaggga ttcctgaattc cttttttatt ccataaacgt tggtaggatt 840
tttaagttac ggtctggaga ggaaatcagc atcgaggctt ccaacccctc ctactggat 900
ccggatcagg atgcaacata ctttggggct tttaaagttc gagatataga ttaga 954

```

10

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer human OBM SF

20

<400> 13

```
ggcgtacgca gagcgagat ggatcct 27
```

<210>14

<211>34

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer human OBM SalR2

<400> 14

```
ggggtcgacc atccaggaaa ttcataaca ctcc 34
```

40

<210> 15

<211> 951

<212> DNA

<213> mouse OBM DNA

<400> 15

aigcgccggg ccagccgaga ctacggcaag tacctgcgca gctcggagga gatgggcagc	60	10
ggccccggcg tcccacacga gggtecctg cccccgcgc cttctgcacc ggctccggcg	120	
ccgccacccg ccgcctcccg ctccatgttc ctggccctcc tggggctggg actgggccag	180	
gtggctctgca gcatcgctct gtctctgtac ttctgagcgc agatggatcc taacagaata	240	
tcagaagaca gcactcactg cttttataga atctgagac tccatgaaa cgcaggtttg	300	
caggactcga ctctggagag tgaagacaca ctacctgact cctgcaggag gatgaaacaa	360	
gcccttcagg gggccgtgca gaaggaactg caacacattg tggggccaca gcgcttctca	420	
ggagctccag ctatgatgga aggcctatgg ttggatgtgg cccagcgagg caagcctgag	480	20
gccagccat ttgcacacct caccatcaat gcigccagca tcccatcggg tcccataaa	540	
gtcactctgt cctcttggta ccacgatcga ggctgggcca agatctctaa catgacgtta	600	
agcaacggaa aactaagggt taaccaagat ggcttctatt acctgtacgc caacatttgc	660	
tttcggcatc atgaaacatc gggaagcgta cctacagact atcttcagct gatgggtgtat	720	
gtcgttaaaa ccagcatcaa aatcccaagt tctcataacc tgatgaaagg agggagcacg	780	
aaaaactggg cgggcaattc tgaattccac ttttattcca taaatgttgg gggatttttc	840	
aagctccgag ctgggtgaaga aattagcatt cagggtgtcca acccttcct gctggatccg	900	30
gatcaagatg cgacgtactt tggggcttcc aaagttcagg acatagactg a	951	

<210> 16

<211> 244

<212> PRT

<213> mouse sOBM

<400> 16

40

Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Ser Thr His Cys Phe
 1 5 10 15
 Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Gly Leu Gln Asp Ser Thr
 20 25 30
 Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg Met Lys Gln
 35 40 45
 Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Pro
 50 55 60
 Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala Met Met Glu Gly Ser Trp Leu Asp
 65 70 75 80
 Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr
 85 90 95
 Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser
 100 105 110
 Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu
 115 120 125
 Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr
 130 135 140
 Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr
 145 150 155 160
 Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile
 165 170 175
 Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser
 180 185 190
 Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe
 195 200 205
 Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser
 210 215 220
 Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val

10

20

30

40

225 230 235 240
 Gln Asp Ile Asp

<210> 17

<211> 246

<212> PRT

<213> human sOBM

10

<400> 17

Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Gly Thr His Cys Ile
 1 5 10 15
 Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr
 20 25 30
 Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile
 35 40 45
 Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val
 50 55 60
 Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys Ala Met Val Asp Gly Ser Trp
 65 70 75 80
 Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu Glu Ala Gln Pro Phe Ala His
 85 90 95
 Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Ser
 100 105 110
 Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met
 115 120 125
 Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr
 130 135 140
 Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Asp Leu

20

30

40

145 150 155 160
 Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile
 165 170 175
 Lys Ile Pro Ser Ser His Thr Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr
 180 185 190
 Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly
 195 200 205
 Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn
 210 215 220
 Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe
 225 230 235 240
 Lys Val Arg Asp Ile Asp
 245

10

20

<210> 18

<211> 735

<212> DNA

<213> mouse sOBM cDNA

<400> 18

gcgcagaatgg atcctaacag aatatcagaa gacagcactc actgcitttta tagaatccig 60
 agactccatg aaaacgcagg ttgcaggac tcgactctgg agagtgaaga cacactacct 120
 gactccigca ggaggatgaa acaagccitt cagggggccg tgcagaagga actgcaacac 180
 attgtggggc cacagcgctt ctcaggagct ccagctatga tgggaaggctc atggttggat 240
 gggggccagc gaggcaagcc tgaggcccag ccatttgcac acccaccat caatgctgcc 300
 agcatcccat cgggttccca taaagtcact ctgtcctctt ggtaccacga tcgaggctgg 360
 gccaaagtct ctaacatgac gttaagcaac ggaaaactaa gggttaacca agatggcttc 420
 tattacctgt acgccaacat ttgctttcgg catcatgaaa catcgggaag cgtacctaca 480
 gactatcttc agctgatggt gtatgtcgtt aaaaccagca tcaaaatccc aagtctcat 540

30

40

```

aacctgaiga aaggaggag cacgaaaaac tggtcgggca attctgaatt ccactttat 600
tccataaatg ttgggggatt ttccaagctc cgagctggig aagaaattag cattcaggig 660
tccaaccttt ccttgctgga tccggatcaa gatgcgacgt actttggggc ttccaagitt 720
caggacatag actga 735

```

<210> 19

<211> 741

<212> DNA

<213> human sOBM cDNA

<400> 19

```

gcgcagatgg atcctaataa aatacagaa gatggcactc actgcattta tagaattttg 60
agactccaig aaaatgcaga tttcaagac acaactctgg agagtcaaga taaaaaatta 120
atacctgatt catgtaggag aattaaacag gcctttcaag gagctgtgca aaaggaattta 180
caacataatc ttggatcaca gcacatcaga gcagagaaag cgatgggtgga tggctcatgg 240
ttagatctgg ccaagaggag caagcttgaa gctcagcctt ttgctcatct cactattaat 300
gccaccgaca tcccatctgg ttccataaaa gtgagtcgtt cctcttggta ccatgatcgg 360
ggttggggcca agatctccaa catgactttt agcaatggaa aactaatagt taatcaggat 420
ggcttttatt acctgatgc caacatttgc tticgacatc atgaaacttc aggagaccia 480
gctacagagt atcttcaact aatgggtgtac gtcactaaaa ccagcatcaa aatcccaagt 540
tctcatacc tgaigaaagg aggaagcacc aagtattggt cagggaattc tgaattccat 600
ttttattcca taaacgttgg tggatttttt aagttacggt ctggagagga aatcagcatc 660
gaggctcca accctcttt actggatccg gatcaggatg caacatactt tggggctttt 720
aaagttcgag atatagattg a 741

```

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明実施例 3 のマウス O B M 蛋白質の S D S - P A G E の結果を示す。

〔符号の説明〕

(A) : レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : 活性型ビタミン D₃ とデキサメサゾン存在下で培養した S T 2 細胞からの部分精製標品 (G l y - H C l (p H 2 . 0) 溶出画分)

レーン 3 : 活性型ビタミン D₃ とデキサメサゾン非存在下で培養した S T 2 細胞からの部分精製標品 (G l y - H C l (p H 2 . 0) 溶出画分)

(B) : レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : 逆相高速液体クロマトグラフィーで精製した本発明マウス O B M 蛋白質 (実施例 3)

【図 2】実施例 4 の ¹²⁵I で標識した O C I F の骨芽細胞様ストローマ細胞 S T 2 への結合試験の結果を示す。

【図 3】実施例 5 (1) の継代数の違う骨芽細胞様ストローマ細胞 S T 2 による破骨細胞

10

20

30

40

50

形成支持能を示す。

〔符号の説明〕

1：継代数約10代のST2細胞の破骨細胞形成支持能

2：継代数約40代のST2細胞の破骨細胞形成支持能

【図4】実施例5(2)の活性型ビタミンD₃及びデキサメサゾン存在下での培養における骨芽細胞様ストローマ細胞膜上の本発明蛋白質発現の経時変化を示す。

【図5】実施例5(2)の共培養系における破骨細胞形成の経時変化を示す。

【図6】実施例5(3)の共培養期間において、種々の培養期間のみOCIF処理した場合の破骨細胞形成抑制効果を示す。

【図7】実施例6の1251標識OCIFと本発明蛋白質とのクロスリンク試験の結果を示す。 10

〔符号の説明〕

レーン1：¹²⁵I標識OCIF-CDDL

レーン2：¹²⁵I標識OCIF-CDDLとST2細胞をクロスリンクさせたもの

レーン3：400倍濃度の未標識OCIFを添加してクロスリンクさせたもの

【図8】実施例9における、SDS-PAGEの結果を示す。

〔符号の説明〕

レーン1：pOBM291をトランスフェクトしたCOS-7細胞の蛋白質を、OCIF無添加で免疫沈降させたもの

レーン2：pOBM291をトランスフェクトしたCOS-7細胞の蛋白質を、OCIFを添加して免疫沈降させたもの 20

【図9】実施例10における、¹²⁵Iで標識したOCIFの、pOBM291をトランスフェクトしたCOS-7細胞への結合試験の結果を示す。

〔符号の説明〕

レーン1及び2：¹²⁵Iで標識したOCIFの、pOBM291をトランスフェクトしたCOS-7細胞への結合量

レーン3及び4：¹²⁵Iで標識したOCIFの、pOBM291をトランスフェクトしたCOS-7細胞への結合量(400倍濃度の未標識OCIF添加時)

【図10】実施例11における、¹²⁵Iで標識したOCIFを用いたクロスリンク試験の結果を示す。 30

〔符号の説明〕

レーン1：¹²⁵I標識OCIF

レーン2：¹²⁵I標識OCIFと、pOBM291をトランスフェクトしたCOS-7細胞をクロスリンクさせたもの

レーン3：400倍濃度の未標識OCIF存在下で、¹²⁵I標識OCIFと、pOBM291をトランスフェクトしたCOS-7細胞をクロスリンクさせたもの

【図11】実施例12における、ノーザンブロットの結果を示す。

〔符号の説明〕

レーン1：ビタミンD及びデキサメサゾン無添加で培養したST2細胞由来RNA

レーン2：ビタミンD及びデキサメサゾンを添加し培養したST2細胞由来RNA 40

【図12】実施例13-(2)における、OCIF濃度を変えた時の培養上清中蛋白質のOCIF結合能を示す。

〔符号の説明〕

○：pCEP4

●：pCEP-sOBM

【図13】実施例13-(2)における、培養上清の割合を変えた時の培養上清中蛋白質のOCIF結合能を示す。

〔符号の説明〕

○：pCEP4

●：pCEP-sOBM 50

【図14】実施例14-(2)における、大腸菌で発現させたチオレドキシンとマウスOBMの融合蛋白質のSDS-PAGEの結果を示す。

〔符号の説明〕

レーン1：分子量マーカー

レーン2：GI724/pTrxFus由来可溶性蛋白質画分

レーン3：GI724/pTrxOBM25由来可溶性蛋白質画分

【図15】実施例14-(3)における、可溶性蛋白質画分の割合を変えた時のOCIF結合能を示す。

〔符号の説明〕

□：GI724/pTrxFus

○：GI724/pTrxOBM25

10

【図16】実施例14-(3)における、OCIF濃度を変えた時の可溶性蛋白質画分(1%)のOCIF結合能を示す。

〔符号の説明〕

□：GI724/pTrxFus

○：GI724/pTrxOBM25

【図17】本発明のマウスOBM cDNAにより発現され精製して得られる蛋白質マウスOBM、及び天然型の精製OCIF結合蛋白質とOCIFとの特異的結合能の、ウサギ抗マウスOBM抗体による阻害結果を示す。

〔符号の説明〕

20

1：抗体で処理したcDNAにより発現され精製して得られる蛋白質、OBM + ¹²⁵I - OCIF

2：抗体で処理した天然型の蛋白質 + ¹²⁵I - OCIF

3：抗体未処理のcDNAにより発現されて得られる蛋白質、マウスOBM + ¹²⁵I - OCIF

4：抗体未処理の天然型の蛋白質 + ¹²⁵I - OCIF

5：3 + 非標識OCIF (¹²⁵I - OCIFの400倍量)

6：4 + 非標識OCIF (¹²⁵I - OCIFの400倍量)

【図18】本発明のcDNAにより発現される蛋白質、ヒトOBMのSDS-PAGEの結果を示す。

30

〔符号の説明〕

レーン1：分子量マーカー

レーン2：本発明のcDNAを含む発現ベクター、phOBMをトランスフェクトしたCOS-7細胞の蛋白質をOCIF無添加でウサギ抗OCIFポリクローナル抗体で免疫沈降させたもの

レーン3：本発明cDNAを含む発現ベクター、phOBMをトランスフェクトしたCOS-7細胞の蛋白質をOCIF添加でウサギ抗OCIFポリクローナル抗体で免疫沈降させたもの

【図19】本発明cDNAを含む発現ベクター、phOBMをトランスフェクトしたCOS-7細胞へのOCIFの結合試験の結果を示す。

40

〔符号の説明〕

レーン1：phOBMをトランスフェクトしたCOS-7細胞に¹²⁵I - OCIFを添加したもの

レーン2：phOBMをトランスフェクトしたCOS-7細胞に¹²⁵I - OCIFを添加し、さらに400倍量の非標識OCIFを加えたもの

【図20】本発明cDNAでコードされる蛋白質、ヒトOBMと¹²⁵I - OCIF(モノマー型)とのクロスリンク試験の結果を示す。

〔符号の説明〕

レーン1：¹²⁵I - OCIF

レーン2：¹²⁵I - OCIFとphOBMをトランスフェクトしたCOS-7細胞膜

50

上の蛋白質とをクロスリンクさせたもの

レーン 3 : 400 倍濃度の非標識 O C I F 存在下で、¹²⁵I - O C I F と p h O B M をトランスフェクトした C O S - 7 細胞膜上の蛋白質とをクロスリンクさせたもの

【図 2 1】実施例 2 3 - (2) における、O C I F 濃度を変えた時の培養液上清中蛋白質 (分泌型 h O B M) の O C I F 結合能を示す。

〔符号の説明〕

○ : 分泌型ヒト O B M をコードする c D N A を含まないベクターのみの p C E P 4 をトランスフェクトした 2 9 3 - E B N A 細胞の培養液

● : 分泌型ヒト O B M をコードする c D N A を含む発現ベクターの p C E P s h O B M をトランスフェクトした 2 9 3 - E B N A 細胞の培養液

10

【図 2 2】実施例 2 3 - (2) における、O C I F 濃度を一定にし、添加する培養液量を変えた時の培養液上清中蛋白質 (分泌型ヒト O B M) の O C I F 結合能を示す。

〔符号の説明〕

○ : 分泌型ヒト O B M をコードする c D N A を含まないベクターのみの p C E P 4 をトランスフェクトした 2 9 3 - E B N A 細胞の培養液

● : 分泌型ヒト O B M をコードする c D N A を含む発現ベクターの p C E P s h O B M をトランスフェクトした 2 9 3 - E B N A 細胞の培養液

【図 2 3】大腸菌で発現させたチオレドキシンとヒト O B M の融合蛋白質の S D S - P A G E の結果を示す。

〔符号の説明〕

20

レーン 1 : 分子量マーカー

レーン 2 : 大腸菌 G I 7 2 4 / p T r x F u s 由来可溶性蛋白質画分

レーン 3 : 大腸菌 G I 7 2 4 / p T r x h O B M 由来可溶性蛋白質画分

【図 2 4】実施例 2 4 - (3) における、チオレドキシンとヒト O B M の融合蛋白質を含む大腸菌由来可溶性蛋白質画分の添加割合を変えた時の融合蛋白質と、O C I F との結合能を示す。

〔符号の説明〕

○ : 大腸菌 G I 7 2 4 / p T r x F u s 由来可溶性蛋白質画分

● : 大腸菌 G I 7 2 4 / p T r x s h O B M 由来可溶性蛋白質画分

【図 2 5】実施例 2 4 - (3) における、O C I F 濃度を変えた時の大腸菌由来可溶性蛋白質画分中のチオレドキシンとヒト O B M の融合蛋白質と、O C I F との結合能を示す。

30

〔符号の説明〕

○ : 大腸菌 G I 7 2 4 / p T r x F u s 由来可溶性蛋白質画分

● : 大腸菌 G I 7 2 4 / p T r x s h O B M 由来可溶性蛋白質画分

【図 2 6】本発明のウサギ抗ヒト O B M / s O B M ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ E L I S A による、ヒト O B M 及び s O B M の測定結果を示す。

〔符号の説明〕

□ : ヒト O B M

● : ヒト s O B M

40

【図 2 7】本発明の抗ヒト O B M / s O B M モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ E L I S A による、ヒト O B M 及び s O B M の測定結果を示す。

〔符号の説明〕

□ : ヒト O B M

● : ヒト s O B M

【図 2 8】本発明のマウス O B M 及び s O B M にも交差性を有する抗ヒト O B M / s O B M モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ E L I S A による、マウス O B M 及び s O B M の測定結果を示す。

〔符号の説明〕

□ : マウス O B M

50

● : マウス s O B M

【図 2 9】チオレドトキシンとマウス O B M の融合蛋白質によるヒト破骨細胞様細胞形成の促進活性を示す。

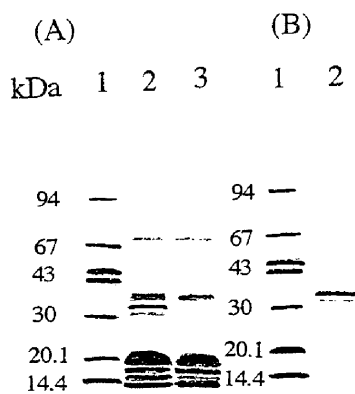
【図 3 0】ビタミン D₃ 刺激による骨吸収活性の、抗 O B M / s O B M 抗体による抑制を示す。

【図 3 1】プロスタグランジン E₂ (P G E₂) 刺激による骨吸収活性の、抗 O B M / s O B M 抗体による抑制を示す。

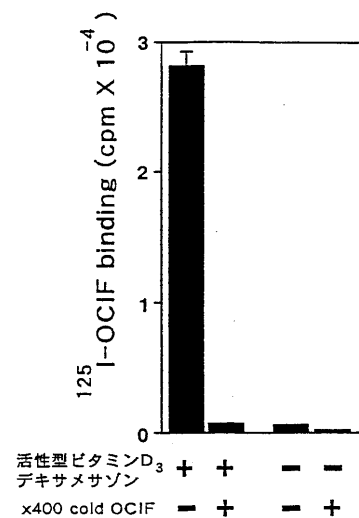
【図 3 2】副甲状腺ホルモン (P T H) 刺激による骨吸収活性の、抗 O B M / s O B M 抗体による抑制を示す。

【図 3 3】インターロイキン 1 α (1 L - 1) 刺激による骨吸収活性の、抗 O B M / s O B M 抗体による抑制を示す。 10

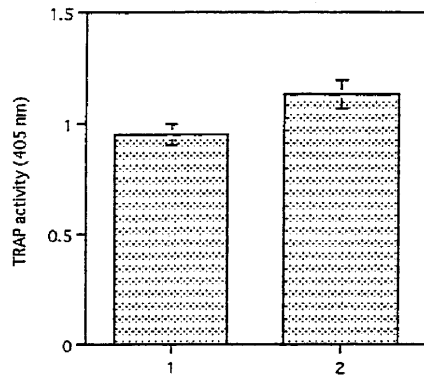
【図 1】



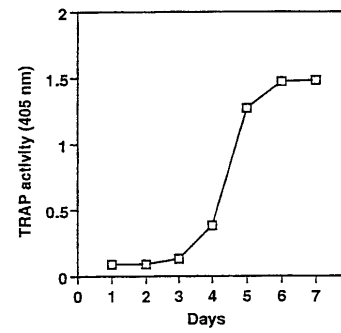
【図 2】



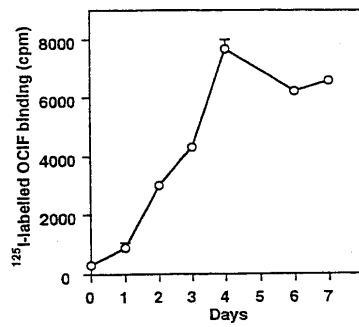
【 図 3 】



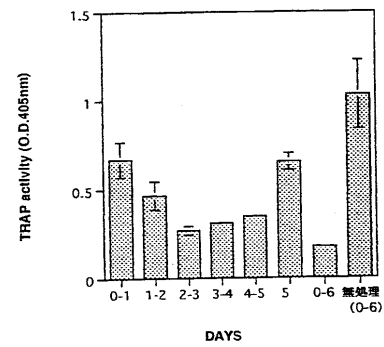
【 図 5 】



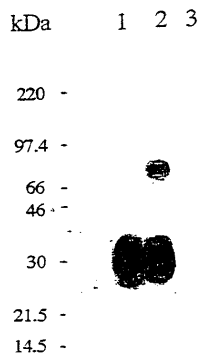
【 図 4 】



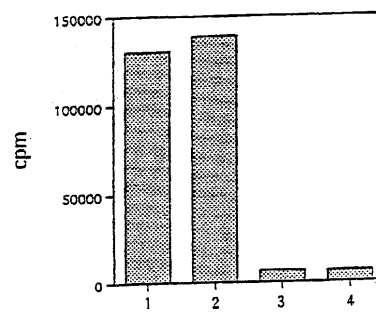
【 図 6 】



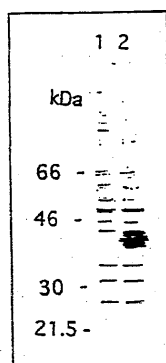
【 図 7 】



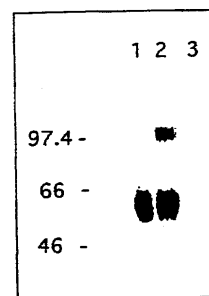
【 図 9 】



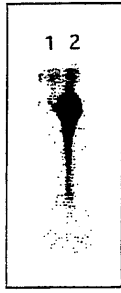
【 図 8 】



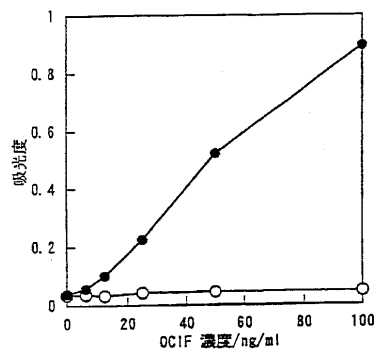
【 図 10 】



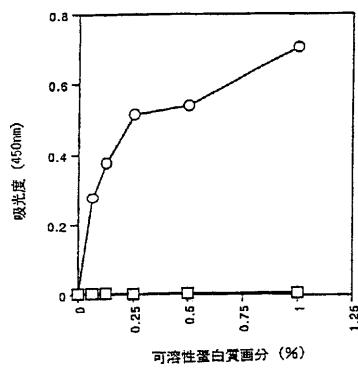
【図 1 1】



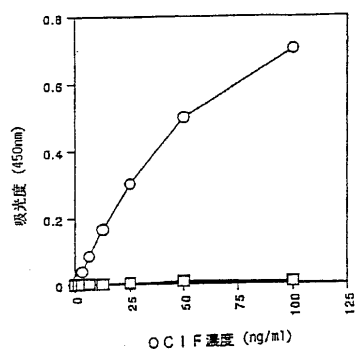
【図 1 2】



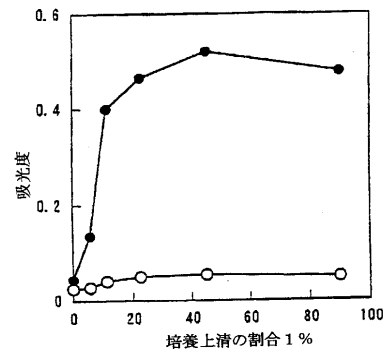
【図 1 5】



【図 1 6】



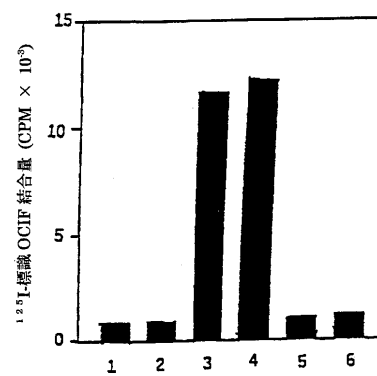
【図 1 3】



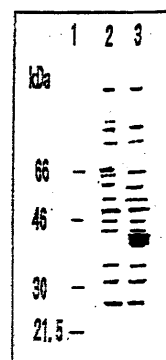
【図 1 4】



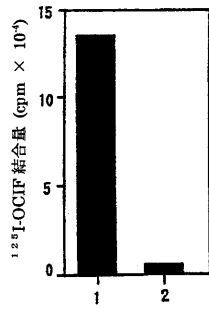
【図 1 7】



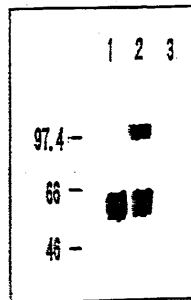
【図 1 8】



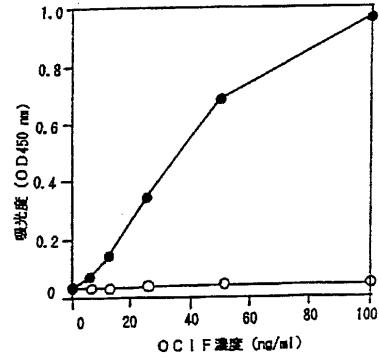
【図 19】



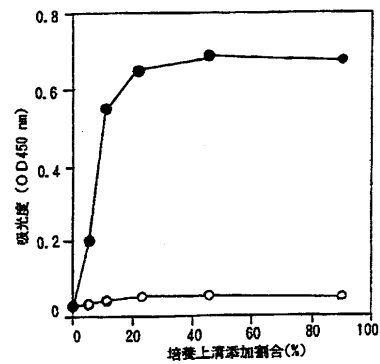
【図 20】



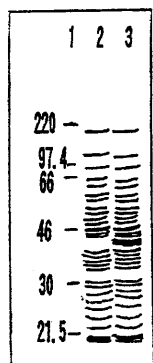
【図 21】



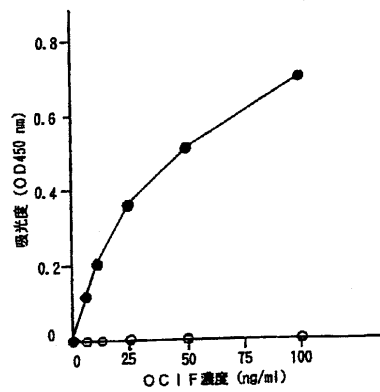
【図 22】



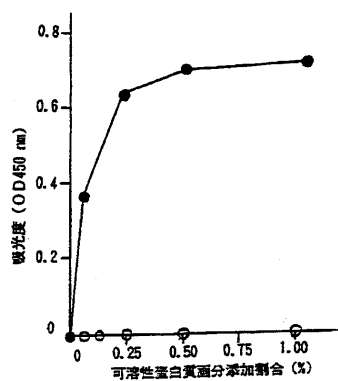
【図 23】



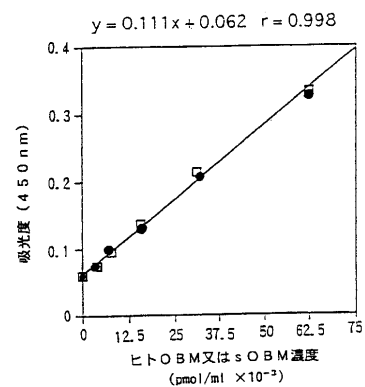
【図 25】



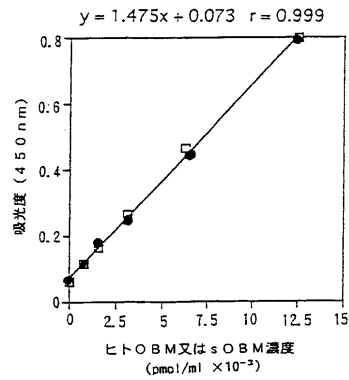
【図 24】



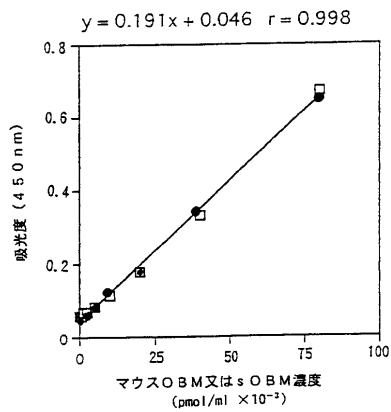
【図 26】



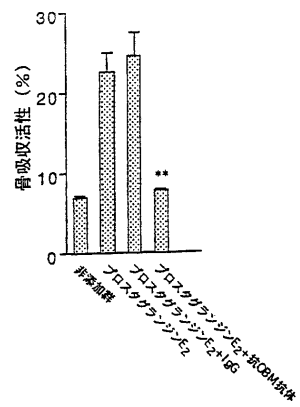
【図 27】



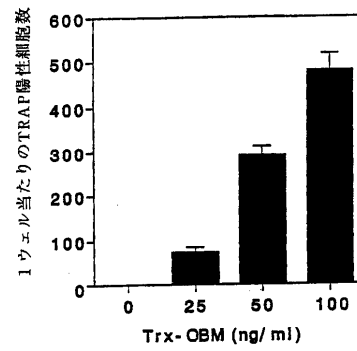
【図 28】



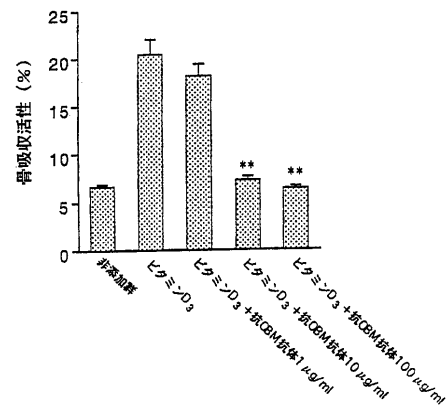
【図 31】



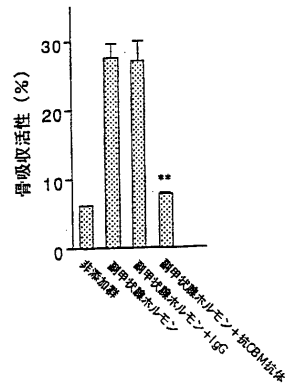
【図 29】



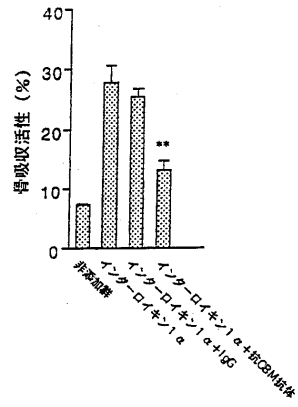
【図 30】



【図 32】



【図 33】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	4 C 0 8 5
A 6 1 P 19/08	A 6 1 P 19/08	4 H 0 4 5
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
C 0 7 K 1/22	C 0 7 K 1/22	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 15/02	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 30/48	R
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 30/88	J
G 0 1 N 30/48	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 30/88	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/543	5 4 5 D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/543	C 1 2 N 15/00	C
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	

(31)優先権主張番号 特願平9-332241

(32)優先日 平成9年12月2日(1997.12.2)

(33)優先権主張国 日本国(JP)

(72)発明者 中川 信明

栃木県下都賀郡石橋町石橋 5 7 8 - 1 5 西浦ハイツ 2 - 4

(72)発明者 島 伸行

栃木県河内郡南河内町緑 4 - 1 7 - 2 8

(72)発明者 木野崎 雅彦

栃木県河内郡上三川町ゆうきが丘 5 3 - 8

(72)発明者 津田 英資

栃木県河内郡南河内町祇園 2 - 1 3 - 1 ダイアパレス 自治医大 5 番館 4 0 7

(72)発明者 後藤 雅昭

栃木県下都賀郡石橋町下古山 4 5 6 - 1

(72)発明者 矢野 和樹

栃木県下都賀郡石橋町石橋 5 7 8 - 1 5 西浦ハイツ 3 - 1

(72)発明者 友保 昌拓

栃木県下都賀郡石橋町大松山 1 - 3 - 3 E S K マンション

(72)発明者 小林 文枝

栃木県河内郡河内町下岡本 3 7 7 7 - 4

(72)発明者 鷺田 尚洋

栃木県下都賀郡石橋町花の木 3 - 4 - 1 2

(72)発明者 高橋 研

栃木県下都賀郡石橋町石橋 5 7 8 - 1 5 西浦ハイツ 1 - 4

(72)発明者 森永 伴法

栃木県下都賀郡壬生町幸町 3 - 1 1 - 1 2

(72)発明者 東尾 侃二

埼玉県川越市山田 1 7 6 9 - 1 0

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB02 BB03 BB20 BB29 CB01 CB17 CB21 DA12 DA13
DA36 DA37 FB02 FB03 FB06
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 DA06 EA04 GA11 HA15
4B064 AG01 AG27 CA02 CA10 CA19 CA20 CC24 CD02 CD13 CE10
CE12 DA01 DA13
4B065 AA26X AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 BB03
BB12 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 CA23 CA56
MA01 NA14 ZA962 ZA972 ZB152 ZC212
4C085 AA13 AA14 CC32 EE01 GG01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74
GA22 GA26

专利名称(译)	新型蛋白质及其制备方法		
公开(公告)号	JP2004041195A	公开(公告)日	2004-02-12
申请号	JP2003169309	申请日	2003-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社三共		
申请(专利权)人(译)	三共株式会社		
[标]发明人	山口京二 保田尚孝 中川信明 島伸行 木野崎雅彦 津田英資 後藤雅昭 矢野和樹 友保昌拓 小林文枝 鷺田尚洋 高橋研 森永伴法 東尾侃二		
发明人	山口 京二 保田 尚孝 中川 信明 島 伸行 木野崎 雅彦 津田 英資 後藤 雅昭 矢野 和樹 友保 昌拓 小林 文枝 鷺田 尚洋 高橋 研 森永 伴法 東尾 侃二		
IPC分类号	C07K14/715 A61K A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P3/14 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P29/00 B01J20/281 C07K C07K1/22 C07K14/47 C07K14/525 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/28 C12N C12N5/10 C12N5/20 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/12 C12P C12P21/02 C12P21 /08 C12Q G01N G01N30/88 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01N33 /577 G01N30/48		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/505 A61P3/14 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/08 A61P19/10 A61P29/00 A61P43/00 C07K14/525 C07K14/705 C07K14/70578 C07K16/28 C07K16/2875 C07K16 /2878 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2319/00 G01N33/566 G01N2333/525 G01N2333/70578 G01N2800/108		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P3/14 A61P19/02 A61P19/08 A61P19 /10 A61P29/00.101 C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C12P21/02.C C12P21/08 G01N30/48.R G01N30 /88.J G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/543.545.D G01N33/577.B C12N15/00.C C12N5/00.B A61K37/02 A61K38/00 A61K38/16 B01J20/281.R C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5 /00.102 C12N5/20 C12R1/91 G01N30/88.201.R		

F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB02 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/BB29 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB06 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA15 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CD02 4B064/CD13 4B064/CE10 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB03 4B065/BB12 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/CA23 4C084/CA56 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB152 4C084/ZC212 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA22 4H045/GA26
优先权	1997097808 1997-04-15 JP 1997151434 1997-06-09 JP 1997217897 1997-08-12 JP 1997224803 1997-08-21 JP 1997332241 1997-12-02 JP
其他公开文献	JP3935861B2 JP2004041195A5
外部链接	Espacenet

摘要(译)

解决的问题：提供一种新型蛋白质及其生产方法 一种特异性结合破骨细胞形成抑制剂（OCIF）并具有高亲和力的新型蛋白质。 要从在骨吸收促进因子存在下培养的成骨样细胞膜或源自骨髓的基质细胞制备细胞的膜级分，请用去污剂溶解膜蛋白，并使用OCIF固定的亲和柱进行纯化。 可以通过 使用该蛋白质，可以筛选生理活性物质或获得针对该蛋白质的抗体。

抗体名	抗 原			
	hsOBM	hOBM	msOBM	mOBM
H-OBM 1	+	+	-	-
H-OBM 2	+	+	-	-
H-OBM 3	+	+	-	-
H-OBM 4	+	+	-	-
H-OBM 5	+	+	-	-
H-OBM 6	+	+	-	-
H-OBM 7	+	+	-	-
H-OBM 8	+	+	-	-
H-OBM 9	+	+	+	+
H-OBM 10	+	+	-	-
H-OBM 11	+	+	-	-
H-OBM 12	+	+	-	-
H-OBM 13	+	+	+	+
H-OBM 14	+	+	-	-

(hsOBM: ヒト可溶性OBM、hOBM: ヒト膜結合型 OBM、msOBM: マウス可溶性OBM、mOBM: マウス膜結合型 OBM)