

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4731487号  
(P4731487)

(45) 発行日 平成23年7月27日(2011.7.27)

(24) 登録日 平成23年4月28日(2011.4.28)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)  
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)  
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)  
G O 1 N 33/53 (2006.01)  
C O 7 K 16/18 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A  
C 1 2 Q 1/68 Z N A A  
C 1 2 Q 1/02  
G O 1 N 33/53 D  
G O 1 N 33/53 Y

請求項の数 12 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-531906 (P2006-531906)  
(86) (22) 出願日 平成17年8月23日(2005.8.23)  
(86) 国際出願番号 PCT/JP2005/015245  
(87) 国際公開番号 W02006/022243  
(87) 国際公開日 平成18年3月2日(2006.3.2)  
審査請求日 平成20年8月22日(2008.8.22)  
(31) 優先権主張番号 特願2004-243588 (P2004-243588)  
(32) 優先日 平成16年8月24日(2004.8.24)  
(33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 506137147  
エーザイ・アール・アンド・ディー・マネ  
ジメント株式会社  
東京都文京区小石川四丁目6番10号  
(74) 代理人 100102978  
弁理士 清水 初志  
(74) 代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一  
(72) 発明者 尾野 雄一  
京都府京都市下京区中堂寺粟田町93番地  
サイエンスセンタービル第3号館 株式  
会社カン研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Cor11 遺伝子を標的とした脊髄神経細胞の種類を識別する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Cor11遺伝子の転写産物にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを有効成分として含有する、脊髄神経細胞の種類を識別するための試薬。

【請求項2】

Cor11遺伝子の翻訳産物に結合する抗体を有効成分として含有する、脊髄神経細胞の種類を識別するための試薬。

【請求項3】

識別の対象となる脊髄神経細胞がd11、d12、d13、d14、d15、d16、d1LAまたはd1LBである、請求項1または2に記載の試薬、ここで脊髄神経細胞は、LH2A、LH2B、およびBrn3a 10  
遺伝子が発現しておりCor11遺伝子が発現していないことを指標としてd11であると識別され、Lim1、Lim2、およびBrn3a遺伝子が発現しておりCor11遺伝子が発現していないことを指標としてd12であると識別され、Isl1およびBrn3a遺伝子が発現しておりCor11遺伝子が発現していないことを指標としてd13であると識別され、Lbx1、Pax2、Lim1、Lim2、およびCor11遺伝子が発現していることを指標としてd14であると識別され、Lbx1、Lmx1b、Brn3a、およびCor11遺伝子が発現していることを指標としてd15であると識別され、Lbx1、Pax2、Lim1、Lim2、およびCor11遺伝子が発現していることを指標としてd16であると識別され、Lbx1、Pax2、Lim1、Lim2、およびCor11遺伝子が発現していることを指標としてd1LAであると識別され、Lbx1、Lmx1b、Brn3a、およびCor11遺伝子が発現していることを指標としてd1LBであると識別される。 20

## 【請求項 4】

Corl1遺伝子の転写産物にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドと、Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される1または複数の遺伝子の転写産物にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドとの組合せを含む、脊髄神経細胞の種類を識別するためのキット。

## 【請求項 5】

Corl1遺伝子の翻訳産物に結合する抗体と、Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される1または複数の遺伝子の翻訳産物に結合する抗体との組合せを含む、脊髄神経細胞の種類を識別するためのキット。

10

## 【請求項 6】

識別の対象となる脊髄神経細胞がdI1、dI2、dI3、dI4、dI5、dI6、dILAまたはdILBである、請求項4または5に記載のキット、ここで脊髄神経細胞は、LH2A、LH2B、およびBrn3a遺伝子が発現しておりCorl1遺伝子が発現していないことを指標としてdI1であると識別され、Lim1、Lim2、およびBrn3a遺伝子が発現しておりCorl1遺伝子が発現していないことを指標としてdI2であると識別され、Isl1およびBrn3a遺伝子が発現しておりCorl1遺伝子が発現していないことを指標としてdI3であると識別され、Lbx1、Pax2、Lim1、Lim2、およびCorl1遺伝子が発現していることを指標としてdI4であると識別され、Lbx1、Lmx1b、Brn3a、およびCorl1遺伝子が発現していることを指標としてdI5であると識別され、Lbx1、Pax2、Lim1、およびLim2遺伝子が発現しておりCorl1遺伝子が発現していないことを指標としてdI6であると識別され、Lbx1、Pax2、Lim1、Lim2、およびCorl1遺伝子が発現していることを指標としてdILAであると識別され、Lbx1、Lmx1b、Brn3a、およびCorl1遺伝子が発現していることを指標としてdILBであると識別される。

20

## 【請求項 7】

脊髄神経細胞の種類を識別するための方法であって、脊髄神経細胞におけるCorl1遺伝子の転写産物または翻訳産物を検出する工程を含む方法。

## 【請求項 8】

Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される1または複数の遺伝子の転写産物または翻訳産物を検出する工程を含む、請求項7に記載の方法。

30

## 【請求項 9】

識別の対象となる脊髄神経細胞がdI1、dI2、dI3、dI4、dI5、dI6、dILAまたはdILBである、請求項7または8に記載の方法、ここで脊髄神経細胞は、LH2A、LH2B、およびBrn3a遺伝子が発現しておりCorl1遺伝子が発現していないことを指標としてdI1であると識別され、Lim1、Lim2、およびBrn3a遺伝子が発現しておりCorl1遺伝子が発現していないことを指標としてdI2であると識別され、Isl1およびBrn3a遺伝子が発現しておりCorl1遺伝子が発現していないことを指標としてdI3であると識別され、Lbx1、Pax2、Lim1、Lim2、およびCorl1遺伝子が発現していることを指標としてdI4であると識別され、Lbx1、Lmx1b、Brn3a、およびCorl1遺伝子が発現していることを指標としてdI5であると識別され、Lbx1、Pax2、Lim1、およびLim2遺伝子が発現しておりCorl1遺伝子が発現していないことを指標としてdI6であると識別され、Lbx1、Pax2、Lim1、Lim2、およびCorl1遺伝子が発現していることを指標としてdILAであると識別され、Lbx1、Lmx1b、Brn3a、およびCorl1遺伝子が発現していることを指標としてdILBであると識別される。

40

## 【請求項 10】

脊髄神経細胞へ分化する能力のある細胞から脊髄神経細胞への分化を誘導する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で、脊髄神経細胞へ分化する能力のある細胞の脊髄神経細胞への分化を誘導する工程、

(b) 分化を誘導した細胞におけるCorl1遺伝子の転写産物または翻訳産物を検出する工程

50

(c) 被検試料の非存在下で検出した場合と比較して、該転写産物または翻訳産物の量を増大させる化合物を選択する工程、  
を含む方法。

【請求項 1 1】

脊髄神経細胞へ分化する能力のある細胞がES細胞である、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

以下の (a) または (b) の、脊髄神経細胞の種類を識別するための試薬の製造における使用。

(a) Cor11 遺伝子の転写産物に ストリンジェントな条件下 でハイブリダイズするポリヌクレオチド

10

(b) Cor11 遺伝子の翻訳産物に結合する抗体

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、脊髄介在ニューロン d14, d15, d1LA および d1LB に特異的に発現する遺伝子 Cor11、並びに、脊髄神経細胞の種類を識別するための該遺伝子の利用に関する。

【背景技術】

【0002】

脊髄神経系は、運動および知覚の制御において非常に重要な役割を果たす中枢神経系である。脊髄損傷などの脊髄神経系の障害に対する治療法として再生治療法が検討されている。例えば、ES細胞などから *in vitro* で分化誘導させた脊髄神経細胞を移植したり、患者自身の持つ神経幹細胞から *in vivo* で再生を促したりすることが考えられている。

20

【0003】

ES細胞から高効率に脊髄運動神経細胞を分化誘導する方法が開発されている（非特許文献 1）。また、運動神経細胞特異的マーカー HB9 遺伝子座に GFP をノックインした ES細胞を用いることで、脊髄運動神経前駆細胞を純化することも可能となっている（非特許文献 1）。さらに、運動神経細胞以外の脊髄神経細胞についても、胎児期の発生メカニズムの解明が進んでおり（非特許文献 2 - 5）、この知識を応用することで ES細胞および神経幹細胞から各種脊髄神経細胞を効率よく作り出すことが可能になるものと期待される。

【0004】

30

ここで、再生治療の際、移植材料中の細胞集団を詳細に同定することは、治療効果および安全面において重要となる。また、必要となる神経細胞のみを *in vitro* および *in vivo* で分化誘導することも治療効果向上のために重要と考えられるが、その際に個々の神経細胞を詳細に同定することは必須である。

【0005】

現在同定されている範囲で、脊髄には、約 15 種類ほどの異なる神経細胞が存在している（非特許文献 2 - 5）。一部の脊髄神経細胞については、選択的に発現する種々のホメオボックス型転写因子が同定されており、これらの発現の組み合わせにより、個々の脊髄神経細胞を同定することが出来る。

【0006】

40

しかし、一部の脊髄神経細胞については未だ特異的に発現するマーカーが同定されておらず、発生する胎児期においては発生場所から同定することが可能であるものの、*in vitro* で分化誘導した混在した脊髄神経細胞集団、*in vivo* で発生後に移動した脊髄神経細胞集団、および、成体で再生した脊髄神経細胞集団において、一部の脊髄神経細胞集団を同定することは困難である。

【0007】

なお、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

【非特許文献 1】 Wichterle H, Lieberam I, Porter AP and Jessell TM. Directed differentiation of embryonic stem cells into moter neurons. Cell 2002 Aug;110:385-39

【非特許文献2】 Jessell TM. Neuronal specification in the spinal cord: Inductive signals and transcriptional codes. Nat Rev Genetics 2000 Oct;1(1):20-29.(Review)

【非特許文献3】 Caspary T, Anderson KV. Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. Nat Rev Neurosci. 2003 Apr;4(4):289-97.(Review)

【非特許文献4】 Muller T, Brohmann H, Pierani A, Heppenstall PA, Lewin GR, Jessell TM, Birchmeier C. The homeodomain factor *lhx1* distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord. Neuron. 2002 May 16;34(4):551-62.

【非特許文献5】 Gross MK, Dottori M, Goulding M. *Lhx1* specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord. Neuron. 2002 May 16;34(4):535-49.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は脊髄神経細胞の種類を識別するための方法および試薬を提供することにある。より詳しくは、本発明は、内在性の $Cor11$ (Corepressor for *Lhx1*)遺伝子の発現を指標として、脊髄神経細胞 $d11$ 、 $d12$ 、 $d13$ 、 $d14$ 、 $d15$ 、 $d16$ 、 $d1LA$ または $d1LB$ を識別するための方法、および該方法において内在性の $Cor11$ 遺伝子の発現を検出するための試薬を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは上記課題を解決するために、マウス胎児脳領域で選択的に発現する遺伝子をサブトラクション法で探索した。その結果、 $Cor11$ をコードするcDNA断片を得た。 $Cor11$ の発現をRT-PCR法、*in situ*ハイブリダイゼーション法およびポリクローナル抗体を用いた免疫染色法で調べたところ、 $Cor11$ は特に胎児期の中枢神経系に選択的に強く発現していた。次に、胎児脊髄での $Cor11$ の発現を詳細に検討した。発現するニューロンの種類を同定するために各種マーカーと比較した結果、 $Cor11$ は脊髄介在ニューロン $d14$ 、 $d15$ 、 $d1LA$ および $d1LB$ に特異的に発現することが明らかになった。

【0010】

脊髄のニューロンは胎児期に発生し、それぞれがそれぞれの場所に移動して、最終的な機能組織を構築する。知覚を伝達する介在ニューロンは脊髄の背側で発生し、最終的にDorsal hornと呼ばれる領域に移動する。これらのニューロンの種類は、発生時期および各種マーカーの発現で区別されているが、 $d14$ と $d16$ を区別するマーカーは知られておらず、これまでは発生場所と移動の方向で区別されてきた。本発明で明らかとなった脊髄神経細胞サブタイプにおける $Cor11$ の特異的発現は、脊髄介在ニューロンを識別するためのマーカーとして有用であると考えられる。より詳しくは、本発明は以下の〔1〕～〔19〕を提供するものである。

【0011】

〔1〕 $Cor11$ 遺伝子の転写産物にハイブリダイズするポリヌクレオチドを有効成分として含有する、脊髄神経細胞の種類を識別するための試薬。

〔2〕配列番号：1、配列番号：3および配列番号：5からなる群より選択される少なくとも一つに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを有効成分として含有する、脊髄神経細胞の種類を識別するための試薬。

〔3〕 $Cor11$ 遺伝子の翻訳産物に結合する抗体を有効成分として含有する、脊髄神経細胞の種類を識別するための試薬。

〔4〕配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6からなる群より選択される少なくとも一つに記載のアミノ酸配列またはその一部配列からなるポリペプチドと結合する抗体を有

10

20

30

40

50

効成分として含有する、脊髄神経細胞の種類を識別するための試薬。

〔 5 〕 識別の対象となる脊髄神経細胞がd11、d12、d13、d14、d15、d16、dILAまたはdILBである、〔 1 〕 ~ 〔 4 〕 のいずれか一項に記載の試薬。

〔 6 〕 Cor11遺伝子の転写産物にハイブリダイズするポリヌクレオチドと、Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される1または複数の遺伝子の転写産物にハイブリダイズするポリヌクレオチドとの組合せを含む、脊髄神経細胞の種類を識別するためのキット。

〔 7 〕 配列番号： 1、配列番号： 3 および配列番号： 5 からなる群から選択される少なくとも一つに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドと、Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子の転写産物に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドとを有効成分として含有する、脊髄神経細胞の種類を識別するためのキット。

〔 8 〕 Cor11遺伝子の翻訳産物に結合する抗体と、Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される1または複数の遺伝子の翻訳産物に結合する抗体との組合せを含む、脊髄神経細胞の種類を識別するためのキット。

〔 9 〕 配列番号： 2、配列番号： 4 および配列番号： 6 からなる群より選択される少なくとも一つに記載のアミノ酸配列またはその一部配列からなるポリペプチドと結合する抗体と、Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子の翻訳産物に結合する抗体とを有効成分として含有する、脊髄神経細胞の種類を識別するためのキット。

〔 10 〕 識別の対象となる脊髄神経細胞がd11、d12、d13、d14、d15、d16、dILAまたはdILBである、〔 6 〕 ~ 〔 9 〕 のいずれか一項に記載のキット。

〔 11 〕 脊髄神経細胞の種類を識別するための方法であって、脊髄神経細胞におけるCor11遺伝子の転写産物または翻訳産物を検出する工程を含む方法。

〔 12 〕 Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される1または複数の遺伝子の転写産物または翻訳産物を検出する工程を含む、〔 11 〕 に記載の方法。

〔 13 〕 識別の対象となる脊髄神経細胞がd11、d12、d13、d14、d15、d16、dILAまたはdILBである、〔 11 〕 または〔 12 〕 に記載の方法。

〔 14 〕 脊髄神経細胞の種類を識別するための方法であって、

( 1 ) 配列番号： 1、配列番号： 3 および配列番号： 5 からなる群より選択される少なくとも一つに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

または

( 2 ) 配列番号： 2、配列番号： 4 および配列番号： 6 からなる群より選択される少なくとも一つに記載のアミノ酸配列またはその一部配列からなるポリペプチドと結合する抗体

、

を脊髄神経細胞に接触させる工程を含む方法。

〔 15 〕 ( 1 ) Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子の転写産物に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

または

( 2 ) Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子の翻訳産物に結合する抗体、

を脊髄神経細胞に接触させる工程を含む、〔 14 〕 に記載の方法。

〔 16 〕 d11、d12、d13およびd16からなる群から選択される少なくとも一つの脊髄神経細胞とd14、d15、dILAおよびdILBからなる群から選択される少なくとも一つの脊髄神経細胞とを識別する工程を含む、〔 14 〕 または〔 15 〕 に記載の方法。

10

20

30

40

50

〔17〕Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される1または複数の遺伝子の転写産物を発現する脊髄神経細胞と、Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される1または複数の遺伝子の転写産物を発現していない脊髄神経細胞とを識別する工程を含む、〔14〕～〔16〕のいずれか一項に記載の方法。

〔18〕脊髄神経細胞へ分化する能力のある細胞から脊髄神経細胞への分化を誘導する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で、脊髄神経細胞へ分化する能力のある細胞の脊髄神経細胞への分化を誘導する工程、

(b) 分化を誘導した細胞におけるCorl1遺伝子の転写産物または翻訳産物を検出する工程

10

(c) 被検試料の非存在下で検出した場合と比較して、該転写産物または翻訳産物の量を増大させる化合物を選択する工程、

を含む方法。

〔19〕脊髄神経細胞へ分化する能力のある細胞がES細胞である、〔18〕に記載の方法。

また、本発明は、

〔20〕以下の(a)または(b)の、脊髄神経細胞の種類を識別するための試薬の製造における使用、

(a) Corl1遺伝子の転写産物にハイブリダイズするポリヌクレオチド

20

(b) Corl1遺伝子の翻訳産物に結合する抗体

に関する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】Corl1の構造および相同性を模式的に示す図である。

【図2】Corl1の成体マウス組織における発現、E12.5マウス後脳及び脊髄における発現を示す写真である。

【図3】E13.25脊髄におけるCorl1、Pax7およびβ-tubulinの発現の比較を示す写真である。

【図4】E10.75脊髄におけるCorl1、Brn3a、Lim1およびIsl1の発現の比較を示す写真である。

30

【図5】E13.25脊髄におけるCorl1、Brn3a、Lim1の発現の比較を示す写真である。

【図6】Corl1の発生期脊髄における発現パターンを模式的に示す図である。「TFs」は、転写調節因子を意味する。

【図7】ES細胞よりin vitroで分化誘導した脊髄神経細胞におけるCorl1の発現を示す写真である。

【図8】ES細胞よりin vitroで分化誘導した脊髄神経細胞におけるCorl1の発現を示す写真である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

40

本発明は、Corl1遺伝子の転写産物にハイブリダイズするポリヌクレオチドを有効成分として含有する、脊髄神経細胞の種類を識別するための試薬を提供する。本発明のポリヌクレオチドは、その鎖長は特に制限されず、所謂「オリゴヌクレオチド」も本発明のポリヌクレオチドに含まれる。

【0014】

本発明者らによってCorl1遺伝子が、脊髄神経細胞のうち、d14、d15、dILAおよびdILBに実質的に発現し、d11、d12、d13、およびd16では実質的に発現していないことが示された。従って、本発明の試薬による細胞種の識別の対象となる脊髄神経細胞としては、代表的にはd11、d12、d13、d14、d15、d16、dILAまたはdILBが挙げられる。

【0015】

50

本発明において「脊髄神経細胞の種類を識別する」とは、対象となる脊髄神経細胞が特定の種類の脊髄神経細胞であると識別する場合のみならず、対象となる脊髄神経細胞が特定の種類の脊髄神経細胞ではないと識別する場合も含まれる。例えば、対象となる脊髄神経細胞においてCor11遺伝子が実質的に発現していれば、該脊髄神経細胞は「d14、d15、d1LAまたはd1LBの可能性があると識別することができ、また、「d11、d12、d13、およびd16ではない」と識別することもできる。一方、対象となる脊髄神経細胞においてCor11遺伝子が実質的に発現していなければ、該脊髄神経細胞は「d11、d12、d13、またはd16の可能性があると識別することができ、また、「d14、d15、d1LAおよびd1LBではない」と識別することもできる。

## 【0016】

10

本発明において脊髄神経細胞の種類を識別するための指標となる「Cor11遺伝子」としては、上記した脊髄神経細胞における発現特異性を示すものであれば特に制限はなく、種々の脊椎動物のCor11遺伝子を本発明において用いることができる。

## 【0017】

マウスCor11遺伝子は公知であり、その塩基配列を配列番号：1に、アミノ酸配列を配列番号：2に示すが、本発明のCor11遺伝子には、そのホモログ、例えば、ヒトCor11（塩基配列を配列番号：3に、アミノ酸配列を配列番号：4に示す）やラットCor11（塩基配列を配列番号：5に、アミノ酸配列を配列番号：6に示す）が含まれる。また、Cor11遺伝子にはアレリック変異体などの自然界において生じた変異体が存在する可能性があり、そのような変異体も、本発明において脊髄神経細胞の種類を識別するための指標となりうる。

20

## 【0018】

従って、本発明において用いられる「Cor11遺伝子」は、下記(1)～(4)から選択される内因性のDNAとして定義することができる。

- (1) 配列番号：2、4、6のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (2) 配列番号：1、3、5のいずれかに記載の塩基配列からなるDNA、
- (3) 配列番号：2、4、6のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (4) 配列番号：1、3、5のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAに対応する他の脊椎動物のDNA

30

## 【0019】

アレリック変異体などの自然界において生じた変異体における変異数は、配列番号：1、3、5のいずれかに記載のCor11遺伝子の塩基配列と比較して、典型的には、アミノ酸レベルで、10アミノ酸以内（例えば、5アミノ酸以内、3アミノ酸以内）である。

## 【0020】

また、特定の脊椎動物のDNAに対応する他の脊椎動物のDNAは、一般的に、特定の脊椎動物のDNAと高い相同性を有する。高い相同性とは、50%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上（例えば、95%以上、さらには96%、97%、98%または99%以上）の相同性を意味する。この相同性は、mBLASTアルゴリズム(Altschul et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)によって決定することができる。また、特定の脊椎動物のDNAに対応する他の脊椎動物のDNAは、生体内から単離した場合、特定の脊椎動物のDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズすると考えられる。ここで「ストリンジентな条件」としては、例えば「2×SSC、0.1%SDS、50℃」、「2×SSC、0.1%SDS、42℃」、「1×SSC、0.1%SDS、37℃」、よりストリンジентな条件として「2×SSC、0.1%SDS、65℃」、「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」および「0.2×SSC、0.1%SDS、65℃」の条件を挙げることができる。

40

## 【0021】

50

本発明の試薬の有効成分であるポリヌクレオチドは、内在性のCor11遺伝子の転写産物にハイブリダイズする。

ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば「2×SSC、0.1%SDS、50℃」、  
「2×SSC、0.1%SDS、42℃」、  
「1×SSC、0.1%SDS、37℃」、よりストリンジентな条件として「2×SSC、0.1%SDS、65℃」、  
「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」及び「0.2×SSC、0.1%SDS、65℃」等の条件を挙げることができる。より詳細には、Rapid-hyb buffer (Amersham Life Science)を用いた方法として、68℃で30分間以上プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを添加して1時間以上68℃に保ってハイブリッド形成させ、その後2×SSC、0.1%SDS中、室温で20分間の洗浄を3回行い、続いて1×SSC、0.1%SDS中、37℃で20分間の洗浄を3回行い、最後に1×SSC、0.1%SDS中、50℃で20分間の洗浄を2回行うことができる。その他、例えばExpresshyb Hybridization Solution (CLONTECH)中、55℃で30分間以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識プローブを添加して37～55℃で1時間以上インキュベートし、2×SSC、0.1%SDS中、室温で20分間の洗浄を3回、1×SSC、0.1%SDS中、37℃で20分間の洗浄を1回行うこともできる。ここで、例えば、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションや2度目の洗浄の際の温度をより高く設定することにより、よりストリンジентな条件とすることができる。例えば、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの温度を60℃、さらにストリンジентな条件としては68℃とすることができる。当業者であれば、このようなバッファの塩濃度、温度等の条件に加えて、プローブ濃度、プローブの長さ、プローブの塩基配列構成、反応時間等のその他の条件を加味し、条件を設定することができる。

#### 【0022】

本発明の好ましい態様においては、配列番号：1、配列番号：3および配列番号：5からなる群から選択される少なくとも一つに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを有効成分として含有する、脊髄神経細胞の種類を識別するための試薬に関する。

#### 【0023】

本発明の試薬におけるポリヌクレオチドは、Cor11遺伝子の発現を特異的に検出することができるのであればその鎖長に特に制限はないが、一般的には、Cor11遺伝子の塩基配列に相補的な少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドである。このような少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドは、Cor11 mRNAの発現を検出するためのプローブ、またはCor11 mRNAを増幅して検出するためのプライマーでありうる。通常、プローブとして使用する場合には、15～100個、好ましくは15～35個の塩基より構成されたポリヌクレオチドであることが望ましい。また、プライマーとして使用する場合には、少なくとも15個以上、好ましくは30個前後の塩基より構成されるポリヌクレオチドが望ましい。

#### 【0024】

プローブとして使用する場合には、ポリヌクレオチドは、適宜、放射性同位体または非放射性化合物などで標識して用いられる。また、プライマーとして使用する場合には、ポリヌクレオチドの3'末端側の領域を標的とする配列に対して相補的にし、5'末端側には制限酵素認識配列、タグ等を付加した形態に設計することができる。このような少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドは、Cor11 mRNAに対してハイブリダイズすることができる。

#### 【0025】

ポリヌクレオチドは、天然以外の塩基、例えば、4-アセチルシチジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、2'-O-メチルシチジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ジヒドロウリジン、2'-O-メチルプソイドウリジン、-D-ガラクトシルキユエオシン、2'-O-メチルグアノシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、1-メチルアデノシン、1-メチルプソイドウリジン、1-メチルグアノシン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノ

10

20

30

40

50

シン、7-メチルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、-D-マンノシルキユエオシン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、5-メトキシウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、N-((9--D-リボフラノシル-2-メチルチオプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、N-((9--D-リボフラノシルプリン-6-イル)N-メチルカルバモイル)トレオニン、ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル、ウリジン-5-オキシ酢酸、ワイプトキソシン、プソイドウリジン、キユエオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチルウリジン、N-((9--D-リボフラノシルプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、2'-0-メチル-5-メチルウリジン、2'-0-メチルウリジン、ワイプトシン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン等を必要に応じて含んでいてもよい。

10

## 【0026】

本発明の試薬の有効成分であるポリヌクレオチドは、Cor11の公知の配列情報に基づいて化学合成により製造することもできる。また、Cor11遺伝子を発現する細胞よりハイブリダイゼーション法、PCR法等を利用して調製することができる。

## 【0027】

本発明における脊髄神経細胞の種類を識別においては、Cor11遺伝子に、他の公知のマーカーを組み合わせて用いることができ、これにより、より詳細に脊髄神経細胞の種類を識別を行うことが可能となる。従って、本発明は、上記Cor11遺伝子の転写産物にハイブリダイズするポリヌクレオチドと、Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1 (Nat Rev Neurosci. 2003 Apr;4(4):289-97 Caspary T, Anderson KV. Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say.) およびTlx3 (Nat Rev Neurosci. 2003 Apr;4(4):289-97 Caspary T, Anderson KV.) からなる群より選択される1または複数の遺伝子の転写産物にハイブリダイズするポリヌクレオチドとの組合せを含む、脊髄神経細胞の種類を識別するためのキットも提供する。

20

## 【0028】

本発明の好ましい態様においては、配列番号：1、配列番号：3および配列番号：5からなる群より選択される少なくとも一つに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドと、Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子の転写産物に対してストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドとを有効成分として含有する、脊髄神経細胞の種類を識別するためのキットに関する。

30

## 【0029】

これらマーカー遺伝子の配列は、以下に示すように公知である。また、マーカー遺伝子の脊髄神経細胞における発現特異性については、図6を参照のこと。

## 【0030】

マウスBrn3aの塩基配列を配列番号：7、アミノ酸配列を配列番号：8に、ヒトBrn3aの塩基配列を配列番号：9、アミノ酸配列を配列番号：10に、ラットBrn3aの塩基配列を配列番号：11、アミノ酸配列を配列番号：12に示す。本発明においてBrn3a遺伝子とは、上記したCor11遺伝子の場合と同様に、下記(1)~(4)から選択される内因性のDNAとして定義することができる。

40

- (1)配列番号：8、10、12のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (2)配列番号：7、9、11のいずれかに記載の塩基配列からなるDNA、
- (3)配列番号：8、10、12のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (4)配列番号：7、9、11のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAに対応する他の脊椎動物のDNA。

50

## 【 0 0 3 1 】

マウスPax2の塩基配列を配列番号：13、アミノ酸配列を配列番号：14に、ヒトPax2の塩基配列を配列番号：15、アミノ酸配列を配列番号：16に示す。本発明においてPax2遺伝子とは、下記(1)～(4)から選択される内因性のDNAとして定義することができる。

- (1)配列番号：14または16に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (2)配列番号：13または15に記載の塩基配列からなるDNA、
- (3)配列番号：14または16に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (4)配列番号：13または15に記載の塩基配列からなるDNAに対応する他の脊椎動物のDNA。

10

## 【 0 0 3 2 】

マウスLbx1の塩基配列を配列番号：17、アミノ酸配列を配列番号：18に、ヒトLbx1の塩基配列を配列番号：19、アミノ酸配列を配列番号：20に示す。本発明においてLbx1遺伝子とは、下記(1)～(4)から選択される内因性のDNAとして定義することができる。

- (1)配列番号：18または20に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (2)配列番号：17または19に記載の塩基配列からなるDNA、
- (3)配列番号：18または20に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (4)配列番号：17または19に記載の塩基配列からなるDNAに対応する他の脊椎動物のDNA。

20

## 【 0 0 3 3 】

マウスLim1の塩基配列を配列番号：21、アミノ酸配列を配列番号：22に、ヒトLim1の塩基配列を配列番号：23、アミノ酸配列を配列番号：24に示す。本発明においてLim1遺伝子とは、下記(1)～(4)から選択される内因性のDNAとして定義することができる。

- (1)配列番号：22または24に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (2)配列番号：21または23に記載の塩基配列からなるDNA、
- (3)配列番号：22または24に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (4)配列番号：21または23に記載の塩基配列からなるDNAに対応する他の脊椎動物のDNA。

30

## 【 0 0 3 4 】

マウスLim2の塩基配列を配列番号：25、アミノ酸配列を配列番号：26に、ヒトLim2の塩基配列を配列番号：27、アミノ酸配列を配列番号：28に、ラットLim2の塩基配列を配列番号：29、アミノ酸配列を配列番号：30に示す。本発明においてLim2遺伝子とは、下記(1)～(4)から選択される内因性のDNAとして定義することができる。

- (1)配列番号：26、28、30のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (2)配列番号：25、27、29のいずれかに記載の塩基配列からなるDNA、
- (3)配列番号：26、28、30のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (4)配列番号：25、27、29のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAに対応する他の脊椎動物のDNA。

40

## 【 0 0 3 5 】

50

マウスIs11の塩基配列を配列番号：31、アミノ酸配列を配列番号：32に、ヒトIs11の塩基配列を配列番号：33、アミノ酸配列を配列番号：34に、ラットIs11の塩基配列を配列番号：35、アミノ酸配列を配列番号：36に示す。本発明においてIs11遺伝子とは、下記(1)～(4)から選択される内因性のDNAとして定義することができる。

- (1)配列番号：32、34、36のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (2)配列番号：31、33、35のいずれかに記載の塩基配列からなるDNA、
- (3)配列番号：32、34、36のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (4)配列番号：31、33、35のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAに対応する他の脊椎動物のDNA。

【0036】

マウスLH2Aの塩基配列を配列番号：37、アミノ酸配列を配列番号：38に、ヒトLH2Aの塩基配列を配列番号：39、アミノ酸配列を配列番号：40に示す。本発明においてLH2A遺伝子とは、下記(1)～(4)から選択される内因性のDNAとして定義することができる。

- (1)配列番号：38または40に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (2)配列番号：37または39に記載の塩基配列からなるDNA、
- (3)配列番号：38または40に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (4)配列番号：37または39に記載の塩基配列からなるDNAに対応する他の脊椎動物のDNA。

【0037】

マウスLH2Bの塩基配列を配列番号：41、アミノ酸配列を配列番号：42に、ヒトLH2Bの塩基配列を配列番号：43、アミノ酸配列を配列番号：44に、ラットLH2Bの塩基配列を配列番号：45、アミノ酸配列を配列番号：46に示す。本発明においてLH2B遺伝子とは、下記(1)～(4)から選択される内因性のDNAとして定義することができる。

- (1)配列番号：42、44、46のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (2)配列番号：41、43、45のいずれかに記載の塩基配列からなるDNA、
- (3)配列番号：42、44、46のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (4)配列番号：41、43、45のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAに対応する他の脊椎動物のDNA。

【0038】

マウスLmx1bの塩基配列を配列番号：47、アミノ酸配列を配列番号：48に、ヒトLmx1bの塩基配列を配列番号：49、アミノ酸配列を配列番号：50に、ラットLmx1bの塩基配列を配列番号：51、アミノ酸配列を配列番号：52に示す。本発明においてLmx1b遺伝子とは、下記(1)～(4)から選択される内因性のDNAとして定義することができる。

- (1)配列番号：48、50、52のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (2)配列番号：47、49、51のいずれかに記載の塩基配列からなるDNA、
- (3)配列番号：48、50、52のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (4)配列番号：47、49、51のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAに対応する他の脊椎動物のDNA。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 9 】

マウスTlx1の塩基配列を配列番号：53、アミノ酸配列を配列番号：54に、ヒトTlx1の塩基配列を配列番号：55、アミノ酸配列を配列番号：56に示す。本発明においてTlx1遺伝子とは、下記(1)～(4)から選択される内因性のDNAとして定義することができる。

- (1)配列番号：54または56に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (2)配列番号：53または55に記載の塩基配列からなるDNA、
- (3)配列番号：54または56に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (4)配列番号：53または55に記載の塩基配列からなるDNAに対応する他の脊椎動物のDNA。

10

## 【 0 0 4 0 】

マウスTlx3の塩基配列を配列番号：57、アミノ酸配列を配列番号：58に、ヒトTlx3の塩基配列を配列番号：59、アミノ酸配列を配列番号：60に示す。本発明においてTlx3遺伝子とは、下記(1)～(4)から選択される内因性のDNAとして定義することができる。

- (1)配列番号：58または60に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (2)配列番号：57または59に記載の塩基配列からなるDNA、
- (3)配列番号：58または60に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/または付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、
- (4)配列番号：57または59に記載の塩基配列からなるDNAに対応する他の脊椎動物のDNA。

20

## 【 0 0 4 1 】

本発明のキットには、上記ポリヌクレオチドの他に、Cor11や他のマーカー遺伝子の転写産物の発現を検出するための試薬、緩衝液等を、適宜含めることができる。更にはキットの使用方法を記載した指示書等をパッケージしておくこともできる。

## 【 0 0 4 2 】

脊髄神経細胞サブタイプにおけるCor11遺伝子の発現特異性は、上記した転写レベルのみならず、翻訳レベルにおいても認められた。従って、本発明はまた、Cor11遺伝子の翻訳産物に結合する抗体を有効成分として含有する、脊髄神経細胞の種類を識別するための試薬を提供する。さらに本発明の好ましい態様においては、配列番号：2、配列番号：4および配列番号：6からなる群より選択される少なくとも一つに記載のアミノ酸配列またはその一部配列からなるポリペプチドと結合する抗体を有効成分として含有する、脊髄神経細胞の種類を識別するための試薬に関する。

30

## 【 0 0 4 3 】

本発明の試薬の有効成分である抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体(scFv)(Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83; The Pharmacology of Monoclonal Antibody, Vol. 113, Rosenberg and Moore ed., Springer Verlag (1994) pp. 269-315)、ヒト化抗体、多特異性抗体(LeDoussal et al. (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62; Paulus (1985) Behring Inst. Mitt. 78: 118-32; Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9; Zimmermann (1986) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; VanDijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)、並びに、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fc、Fv等の抗体断片が含まれる。このような抗体は必要に応じ、PEG等により修飾されていてもよい。また、ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、GST、緑色蛍光タンパク質(GFP)等との融合タンパク質として製造して、二次抗体を用いずに検出できるようにすることもできる。また、ビオチン等により抗体を標識することによりアビジン、ストレプトアビジン等を用いて抗体の検出、回収を行い得るように改変することもできる。

40

50

## 【 0 0 4 4 】

ポリクローナル抗体は、例えば、精製されたCor11ポリペプチドまたはその断片を、必要に応じアジュバントと共に哺乳動物に免疫し、免疫した動物より採取される血清より得ることができる。ここで用いる哺乳動物は、特に限定されないが、げっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が一般的である。マウス、ラット、ハムスター等のげっ歯目、ウサギ等のウサギ目、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等のサル等の霊長目の動物が挙げられる。動物の免疫化は、感作抗原をPhosphate-Buffered Saline(PBS)または生理食塩水等で適宜希釈、懸濁し、必要に応じてアジュバントを混合して乳化した後、動物の腹腔内または皮下に注射して行われる。その後、好ましくはフロイント不完全アジュバントに混合した感作抗原を4~21日毎に数回投与する。抗体の産生は、血清中の所望の抗体レベルを慣用の方法により測定することにより確認することができる。最終的に、血清そのものをポリクローナル抗体として用いても良いし、さらに精製して用いてもよい。具体的な方法として、例えば『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.12-11.13)を参照することができる。

10

## 【 0 0 4 5 】

また、モノクローナル抗体を産生するためには、まず、上述のようにして免疫化した動物より脾臓を摘出し、該脾臓より免疫細胞を分離し、適当なミエローマ細胞とポリエチレングリコール(PEG)等と用いて融合してハイブリドーマを作成する。細胞の融合は、Milsteinの方法(Galfre and Milstein (1981) Methods Enzymol. 73: 3-46)に準じて行うことができる。ミエローマ細胞としては、特に、薬剤により融合細胞を選択できるようにする細胞が好ましい。このような薬剤による選択が可能なミエローマを使用した場合、融合された細胞以外は死滅するヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液(HAT培養液)で培養することにより融合されたハイブリドーマを選択することができる。次に、作成されたハイブリドーマの中から、Cor11ポリペプチドまたはその断片に対して結合する抗体を産生するクローンを選択する。その後、選択したクローンをマウス等の腹腔内に移植し、腹水を回収してモノクローナル抗体を得る。また、具体的な方法として、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11)を参照することもできる。

20

## 【 0 0 4 6 】

ハイブリドーマは、その他、最初にEBウイルスに感染させたヒトリンパ球をin vitroで免疫原を用いて感作し、感作リンパ球をヒト由来のミエローマ細胞(U266等)と融合し、ヒト抗体を産生するハイブリドーマを得る方法(特開昭63-17688号公報)によっても得ることができる。また、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物を感作して製造した抗体産生細胞を用いても、ヒト抗体を得ることができる(W092/03918; W093/02227; W094/02602; W094/25585; W096/34096; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15: 146-56等)。ハイブリドーマを用いない例としては、抗体を産生するリンパ球等の免疫細胞に癌遺伝子を導入して不死化する方法が挙げられる。

30

## 【 0 0 4 7 】

また、遺伝子組換え技術により抗体を製造することもできる(Borrebaeck and Larrick (1990) Therapeutic Monoclonal Antibodies, MacMillan Publishers LTD., UK参照)。そのためには、まず、抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマまたは抗体産生細胞(感作リンパ球等)からクローニングする。得られた遺伝子を適当なベクターに組み込み、宿主に該ベクターを導入し、宿主を培養することにより抗体を産生させる。このような組換え型の抗体も本発明の試薬の有効成分に含まれる。代表的な組換え型の抗体として、非ヒト抗体由来可変領域およびヒト抗体由来定常領域とからなるキメラ抗体、並びに非ヒト抗体由来相補性決定領域(CDR)、およびヒト抗体由来フレームワーク領域(FR)および定常領域とからなるヒト化抗体が挙げられる(Jones et al. (1986) Nature 321: 522-5; Reichmann et al. (1988) Nature 332: 323-9; Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-6; Methods Enzymol. 203: 99-121 (1991))。

40

## 【 0 0 4 8 】

50

抗体断片は、上述のポリクローナルまたはモノクローナル抗体をパパイン、ペプシン等の酵素で処理することにより製造することができる。または、抗体断片をコードする遺伝子を用いて遺伝子工学的に製造することも可能である (Co et al. (1994) J. Immunol. 152: 2968-76; Better and Horwitz (1989) Methods Enzymol. 178: 476-96; Pluckthun and Skerra (1989) Methods Enzymol. 178: 497-515; Lamoyi (1986) Methods Enzymol. 121: 652-63; Rousseaux et al. (1986) 121: 663-9; Bird and Walker (1991) Trends Biotechnol. 9: 132-7参照)。

#### 【0049】

多特異性抗体には、二特異性抗体(BsAb)、ダイアボディ(Db)等が含まれる。多特性抗体は、(1)異なる特異性の抗体を異種二機能性リンカーにより化学的にカップリングする方法 (Paulus (1985) Bohring Inst. Mill. 78: 118-32)、(2)異なるモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを融合する方法 (Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9)、(3)異なるモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖遺伝子(4種類のDNA)によりマウス骨髄種細胞等の真核細胞発現系をトランスフェクトした後、二特異性の一価部分を単離する方法 (Zimmermann (1986) Rev. Physio. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)等により作製することができる。一方、Dbは遺伝子融合により構築される二価の2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーの抗体断片であり、公知の手法により作製することができる (Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-8; EP404097; WO93/11161参照)。

#### 【0050】

抗体および抗体断片の回収および精製は、プロテインAおよびGを用いて行うことができる。その他、抗体以外のポリペプチドと同様に、上記したタンパク質精製技術によって精製することもできる (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed. Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。例えば、本発明の抗体の精製にプロテインAを利用する場合、Hyper D、POROS、Sepharose F.F.(Pharmacia)等のプロテインAカラムが公知であり、使用可能である。得られた抗体の濃度は、その吸光度を測定することにより、または酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) 等により決定することができる。

#### 【0051】

抗体の抗原結合活性は、吸光度測定、蛍光抗体法、酵素免疫測定法 (EIA)、放射免疫測定法 (RIA)、ELISA法等により測定することができる。ELISA法により測定する場合、Cor11ポリペプチド又はその断片をプレート等の担体に固相化し、次いで目的とする抗体を含む試料を添加する。ここで、抗体を含む試料としては、抗体産生細胞の培養上清、精製抗体等が考えられる。続いて、本発明の試薬の有効成分である抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベートする。その後、プレートを洗浄し、二次抗体に付加されている標識の検出を行う。すなわち、二次抗体が例えばアルカリホスファターゼで標識されている場合には、p-ニトロフェニルリン酸等の酵素基質を添加して吸光度を測定することで、抗原結合活性を測定することができる。また、抗体の活性評価に、BIACore (Pharmacia) 等の市販の系を使用することもできる。

#### 【0052】

本発明の脊髄神経細胞の種類を識別においては、Cor11遺伝子の翻訳産物との組み合わせにおいて、他の公知のマーカー遺伝子の翻訳産物をも標的とすることができる。従って、本発明は、Cor11遺伝子の翻訳産物に結合する抗体と、Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される1または複数の遺伝子の翻訳産物に結合する抗体との組合せを含む、脊髄神経細胞の種類を識別するためのキットも提供する。

#### 【0053】

さらに本発明の好ましい態様においては、配列番号：2、配列番号：4および配列番号：6からなる群から選択される少なくとも一つに記載のアミノ酸配列またはその一部配列からなるポリペプチドと結合する抗体と、Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子の翻

10

20

30

40

50

訳産物に結合する抗体とを有効成分として含有する、脊髄神経細胞の種類を識別するためのキットに関する。

【0054】

本発明のキットには抗体の他に、結合活性を検出するための試薬、緩衝液等を、適宜含めることができる。更にはキットの使用方法を記載した指示書等をパッケージしておくこともできる。

【0055】

本発明は、また、脊髄神経細胞の種類を識別するための方法であって、脊髄神経細胞におけるCor11遺伝子の転写産物または翻訳産物を検出する工程を含む方法を提供する。

【0056】

本発明の方法におけるCor11遺伝子の転写産物の検出は、上記した本発明のポリヌクレオチドと脊髄介在ニューロンを含むと考えられる細胞試料由来の核酸抽出物とを接触させ、核酸抽出物中において該ポリヌクレオチドとハイブリダイズする核酸を検出することにより、実施することができる。

【0057】

Cor11遺伝子の転写産物を検出するために、ポリヌクレオチドプローブは、好ましくは放射性同位体または非放射性化合物で標識されたものである。例えば、標識するための放射性同位体としては、<sup>35</sup>S、<sup>3</sup>H等を挙げることができる。放射標識したポリヌクレオチドプローブを用いた場合、エマルジョンオートラジオグラフィーにより銀粒子を検出することによりマーカーと結合するRNAを検出することができる。また、ポリヌクレオチドプローブの標識のため慣用の非放射性同位体としては、ビオチン、ジゴキシゲニン等が公知である。ビオチン標識マーカーの検出は、例えば、蛍光、または、アルカリ性ホスファターゼ若しくは西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素を標識したアビジンを用いて行うことができる。一方、ジゴキシゲニン標識マーカーの検出には、蛍光、または、アルカリ性ホスファターゼ若しくは西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素を標識した抗ジゴキシゲニン抗体を使用することができる。酵素標識を使用する場合には、酵素の基質と共にインキュベートし、安定な色素をマーカー位置に沈着させることで検出を行う。

【0058】

Cor11遺伝子の転写産物を検出するために、ポリヌクレオチドプライマーを用いた場合には、Cor11遺伝子の転写産物は、例えば、RT-PCRなどの手法により、該ポリヌクレオチドプライマーとハイブリダイズする核酸を増幅することによって検出することができる。

【0059】

本発明の方法におけるCor11遺伝子の翻訳産物の検出は、上記した抗体と脊髄介在ニューロンを含むと考えられる細胞試料由来のタンパク質抽出物とを接触させ、該抗体と結合するタンパク質を検出することにより、実施することができる。抗体の抗原結合活性の測定方法については、上述したように、吸光度測定、蛍光抗体法、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、ELISA法等により測定することができる。

【0060】

本発明の方法においては、Cor11遺伝子の転写産物または翻訳産物に加えて、Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される1または複数の遺伝子の転写産物または翻訳産物を検出することにより、より詳細な脊髄神経細胞の種類を識別を行うことが可能であり、このような方法も本発明に含まれる。

本発明の脊髄神経細胞を識別するための好ましい態様として、以下の工程を含む方法を挙げることができる。

(1) 配列番号：1、配列番号：3および配列番号：5からなる群から選択される少なくとも一つに記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

または

(2) 配列番号：2、配列番号：4および配列番号：6からなる群から選択される少なく

10

20

30

40

50

とも一つに記載のアミノ酸配列またはその一部配列からなるポリペプチドと結合する抗体、  
を脊髄神経細胞に接触させる工程。

【0061】

また本発明のより好ましい態様としては、上述の工程に加えてさらに以下の工程を含む方法を挙げることができる。

(1) Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子の転写産物に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

または

(2) Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される少なくとも一つの遺伝子の翻訳産物に結合する抗体、  
を脊髄神経細胞に接触させる工程。

【0062】

さらに本発明の好ましい態様としては、上述の工程に加えてさらに、d11、d12、d13およびd16からなる群から選択される少なくとも一つの脊髄神経細胞とd14、d15、d1LAおよびd1LBからなる群から選択される少なくとも一つの脊髄神経細胞とを識別する工程を含む方法を挙げることができる。

【0063】

また、本発明の脊髄神経細胞を識別するための好ましい態様としては、Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される1または複数の遺伝子の転写産物を発現する脊髄神経細胞と、Brn3a、Pax2、Lbx1、Lim1、Lim2、LH2A、LH2B、Isl1、Lmx1b、Tlx1およびTlx3からなる群より選択される1または複数の遺伝子の転写産物を発現していない脊髄神経細胞とを識別する工程を含む方法を挙げることができる。

【0064】

Cor11は、分化誘導した脊髄介在ニューロンにおいて特異的な発現を示すため、脊髄神経細胞分化誘導試薬のスクリーニングにおいて利用することも考えられる。すなわち、被検試料の存在下で、脊髄神経細胞へ分化する能力のある細胞から脊髄神経細胞への分化を誘導し、分化を誘導した細胞におけるCor11の発現を検出することにより、該被検試料に脊髄神経細胞の分化を誘導する能力があるか否かを決定することができる。従って、本発明は下記(a)～(c)の工程を含む、Cor11の発現を指標とする脊髄神経細胞分化誘導試薬の候補化合物のスクリーニング方法を提供する。

(a) 被検試料の存在下で、脊髄神経細胞へ分化する能力のある細胞から脊髄神経細胞への分化を誘導する工程、

(b) 分化を誘導した細胞におけるCor11遺伝子の転写産物または翻訳産物を検出する工程、

(c) 被検試料の非存在下で検出した場合と比較して、該転写産物または翻訳産物の量を増大させる化合物を選択する工程。

【0065】

ここで「脊髄神経細胞へ分化する能力のある細胞」としては、好ましくは多分化能を有するES細胞等、脊髄神経細胞へと分化誘導され得る細胞を含む細胞試料である。in vitroにおける脊髄神経細胞の分化誘導は、公知のES細胞、骨髄間質細胞、神経由来の不死化セルライン(特表平8-509215号公報；特表平11-506930号公報；特表2002-522070号公報)、ニューロン始原細胞(特表平11-509729号公報)等の細胞を出発材料として方法が公知である。

【0066】

細胞と接触させる被検試料はどのような化合物であってもよいが、例えば、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物ライブラリー、合成ペプチドライブラリー、抗体、細菌放出物質、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)抽出液、細胞(微生物、植物細胞、

10

20

30

40

50

動物細胞)培養上清、精製または部分精製ポリペプチド、海洋生物、植物または動物等由来の抽出物、土壌、ランダムファージペプチドディスプレイライブラリーが挙げられる。

【0067】

Corl1遺伝子の転写産物または翻訳産物の検出は、上記したように、Corl1遺伝子の転写産物にハイブリダイズするポリヌクレオチドやCorl1遺伝子の翻訳産物に結合する抗体を用いて検出することができる。

【0068】

細胞の分化は、被験試料の非存在下におけるCorl1発現のレベルと比較することにより判定することができる。すなわち、被験試料の非存在下で検出した場合と比較して、Corl1遺伝子の転写産物または翻訳産物の量を増大させる場合、該被験試料は脊髄神経細胞の分化を誘導する能力を有すると判定できる。ここで「増大」とは、例えば、2倍、好ましくは5倍、より好ましくは10倍以上をいう。

10

【0069】

本方法によりスクリーニングされた被験試料は、脊髄神経細胞分化誘導試薬として、脊髄神経細胞における何等かの欠陥が病因となっている疾病の治療薬候補となり得、有用と考えられる。

【0070】

さらに本発明は、以下の(a)または(b)の脊髄神経細胞の種類を識別するための試薬の製造における使用に関する。

(a) Corl1遺伝子の転写産物にハイブリダイズするポリヌクレオチド

20

(b) Corl1遺伝子の翻訳産物に結合する抗体

【0071】

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【0072】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0073】

[実施例1] Corl1の単離と配列解析

30

胎児期脳領域特異的に発現する遺伝子を単離するために、E12.5マウス中脳腹側領域と背側領域で発現の異なる遺伝子をサブトラクション(N-RDA)法により同定した。単離した断片の一つは機能未知なタンパク質をコードするcDNA断片であった。

【0074】

1. N-RDA法

1-1. アダプターの調製

下記のオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、100 μMに調製した。

(ad2: ad2S+ad2A、ad3: ad3S+ad3A、ad4: ad4S+ad4A、ad5: ad5S+ad5A、ad13: ad13S+ad13A)

ad2S: cagctccacaacctacatcattccgt (配列番号: 61)

40

ad2A: acggaatgatgt (配列番号: 62)

ad3S: gtccatcttctctctgagactctggt (配列番号: 63)

ad3A: accagagtctca (配列番号: 64)

ad4S: ctgatgggtgtcttctgtgagtgtgt (配列番号: 65)

ad4A: acacactcacag (配列番号: 66)

ad5S: ccagcatcgagaatcagtgtgacagt (配列番号: 67)

ad5A: actgtcacactg (配列番号: 68)

ad13S: gtcgatgaacttcgactgtcgatcgt (配列番号: 69)

ad13A: acgatcgacagt (配列番号: 70)

【0075】

50

## 1-2. cDNA合成

日本SLCより入手したマウス12.5日胚より中脳腹側および中脳背側領域を切り出した。RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて全RNAを調製し、cDNA synthesis kit (TAKARA)を用いて二本鎖cDNAを合成した。制限酵素RsaIで消化したのち、ad2を付加し、ad2Sをプライマーとして、15サイクルのPCRでcDNAを増幅した。増幅条件は72 で5分インキュベートした後、94 で30秒、65 で30秒、及び72 で2分の反応を15サイクル行い、最後に72 で2分インキュベートした。N-RDAのPCRはすべて以下の反応液組成で行った。

10 × ExTaq 5 μ l

2.5mM dNTP 4 μ l

ExTaq 0.25 μ l

100 μ M primer 0.5 μ l

cDNA 2 μ l

蒸留水 38.25 μ l

【 0 0 7 6 】

## 1-3. Driverの作製

ad2Sで増幅したcDNAをさらに5サイクルのPCRで増幅した。増幅条件は94 で2分インキュベートした後、94 で30秒、65 で30秒、及び72 で2分の反応を5サイクル行い、最後に72 で2分インキュベートした。Qiaquick PCR purification kit (Qiagen)を用いてcDNAを精製し、RsaI消化した。1回のサブトラクションに3 μ gずつ使用した。

【 0 0 7 7 】

## 1-4. Testerの作製

ad2Sで増幅したcDNAをさらに5サイクルのPCRで増幅した。増幅条件は94 で2分インキュベートした後、94 で30秒、65 で30秒、及び72 で2分の反応を5サイクル行い、最後に72 で2分インキュベートした。Qiaquick PCR purification kit (Qiagen)を用いてcDNAを精製し、RsaI消化した。60ngのRsaI消化cDNAにad3を付加した。

【 0 0 7 8 】

## 1-5. サブトラクション1回目

上記3及び4で作製したTesterおよびDriverを混合し、エタノール沈殿した後に、1xPCR buffer 1 μ lに溶解した。98 5分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 1 μ lを加えた。さらに98 5分の後、68 で16時間ハイブリダイズさせた。

ハイブリダイズさせたcDNAをad3Sをプライマーとして10サイクルのPCRで増幅した後(72 で5分インキュベートした後、94 で30秒、65 で30秒、及び72 で2分の反応を10サイクル行った)、Mung Bean Nuclease (TAKARA)で消化し、Qiaquick PCR purification kitで精製した。さらに13サイクルのPCRで増幅した。増幅条件は94 で2分インキュベートした後、94 で30秒、65 で30秒、及び72 で2分の反応を13サイクル行い、最後に72 で2分インキュベートした。

【 0 0 7 9 】

## 1-6. 均一化

サブトラクション1回目で増幅したcDNA 8ngに2xPCR buffer 1 μ lを加えた。98 5分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 2 μ lを加えた。さらに98 5分の後、68 で16時間ハイブリダイズさせた。

ハイブリダイズさせたcDNAをRsaIで消化し、Qiaquick PCR purification kitで精製した。これをad3Sをプライマーとして11サイクルのPCRで増幅した後(94 で2分インキュベートした後、94 で30秒、65 で30秒、及び72 で2分の反応を11サイクル行い、最後に72 で2分インキュベートした) RsaIで消化し、ad4を付加した。

【 0 0 8 0 】

## 1-7. サブトラクション2回目

上記6でad4を付加したcDNA 20ngをTesterとして、上記3のDriverと混合し、さらに、上記5と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的にRsaI消化したcDNAにad5を付加した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 1 】

## 1-8. サブトラクション3回目

上記7でad5を付加したcDNA 2ngをTesterとして、上記3のDriverと混合し、さらに、上記5と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的にRsaI消化したcDNAにad13を付加した。

## 【 0 0 8 2 】

## 1-9. サブトラクション4回目

上記8でad13を付加したcDNA 2ngをTesterとして、上記3のDriverと混合し、以下、上記5と同様の方法でサブトラクションを行った。増幅したcDNAをpCRII (Invitrogen)にクローニングし、ABI3100シーケンスアナライザーを用いて塩基配列を解析した。

10

## 【 0 0 8 3 】

## 2. cDNA全長配列決定

N-RDA法で得られたcDNA断片の配列からBlast検索を行った結果、この遺伝子は機能未知なタンパク質をコードする遺伝子 (Genbank, accession No.: NM-172446) であることが明らかになった。そこで、登録配列を参考にプライマーを設計し、全長cDNAをRT-PCR法でクローニングした。

## 【 0 0 8 4 】

マウス12.5日胚より間脳、中脳、後脳を含む脳領域を切り出した。RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて全RNAを調製し、RNA PCR kit (TAKARA)を用いて1本鎖cDNAを合成し、鑄型に用いた。PCRの増幅条件は、94 で5分インキュベートした後、94 で30秒、65 で30秒、及び72 で5分の反応を35サイクル行い、最後に72 で2分インキュベートした。PCRは以下の反応液組成で行った。

20

10 × buffer 5 μ l

2.5mM dNTP 4 μ l

Pyrobest polymerase (TAKARA) 0.5 μ l

100 μ M primer 0.5 μ l

cDNA 1 μ l

DMSO 2.5 μ l

蒸留水 36 μ l

プライマー配列

30

Cor11 F1: GAGGTCGACATGGCATTGCTGTGTGGCCTTGGGAG (配列番号: 7 1)

Cor11 R1: GAGGTCGACCTAGGGCAGCAGCGGAGGCTTGAAGG (配列番号: 7 2)

増幅したcDNAをpCRII (Invitrogen)にクローニングし、ABI3100シーケンスアナライザーを用いて塩基配列を解析した。その結果、936アミノ酸をコードすることが確認され、この遺伝子をCor11と命名した。

## 【 0 0 8 5 】

Cor11アミノ酸配列からBlast検索によりホモロジーサーチを行った結果、Cor11はSki, SnoN, Dachと相同性の高いタンパク質であることが明らかになった (図1)。また、Cor11と相同性の高い機能未知遺伝子も見出され、Cor12と命名した。また、Cor11と相同性の高いショウジョウバエの遺伝子 (CG11093) も見出され、進化上保存された機能を有することが示唆された。

40

## 【 0 0 8 6 】

## [実施例2]Cor11の発現解析

次にCor11の発現を解析した。まずは、成体マウス組織における発現をRT-PCR法で解析した。

各組織全RNA (Promega) に対して、RNA PCR kit (TAKARA)を用いて1本鎖cDNAを合成し、鑄型に用いた。PCRの増幅条件は、94 で2分インキュベートした後、94 で30秒、65 で30秒、及び72 で30秒の反応を35サイクル行い、最後に72 で2分インキュベートした。PCRは以下の反応液組成で行った。

10 × buffer 1 μ l

50

2.5mM dNTP 0.8  $\mu$ l  
 ExTaq 0.05  $\mu$ l  
 100  $\mu$ M primer 0.1  $\mu$ l  
 cDNA 1  $\mu$ l  
 蒸留水 7.05  $\mu$ l  
 プライマー配列

Cor11 F2: ATGCAGAGAGCATCGCTAAGCTCTAC (配列番号: 73)

Cor11 R2: AAGCGTTGGACTCTACGTCCACCTC (配列番号: 74)

その結果、Cor11は成体では脳および精巣に特異的に発現していることが明らかになった (図2)。また、脳での発現は成体よりも胎児期の方が高いことも明らかとなった。

10

#### 【0087】

次に、Cor11遺伝子を用いて以下のプロトコールにより *in situ*ハイブリダイゼーションによる発現解析を行った。

まず、マウスE12.5日胚をOCTで包埋し、厚さ16  $\mu$ mの新鮮凍結切片を作製した。スライドガラス上で乾燥させた後に4%PFAで室温30分間固定した。PBSで洗浄した後、ハイブリダイゼーション (1  $\mu$ g/mlDIG化RNAプローブ、50%ホルムアミド、5xSSC、1%SDS、50  $\mu$ g/ml yeast RNA、50  $\mu$ g/ml Heparin) を65度で40時間行った。その後、洗浄 (50%ホルムアミド、5xSSC、1%SDS) を65度で行い、RNase処理 (5  $\mu$ g/ml RNase) を室温5分間行った。0.2xSSCで65度の洗浄、1xTBSTで室温の洗浄ののち、ブロッキング (Blocking reagent: Roche) を行った。アルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体 (DAKO) を反応させ、洗浄 (1xTBS T、2mM Levamisole) の後、NBT/BCIP (DAKO) を基質として発色させた。

20

#### 【0088】

*in situ*ハイブリダイゼーションによる発現解析の結果、E12.5では、Cor11は中枢神経系に特異的な発現を示し、後脳および脊髄の一部の細胞に選択的に発現していることが明らかになった (図2)。さらに脊髄横断切片を用いて発現を解析した結果、発生期の脊髄では、Cor11は背側領域に限局して発現していることも明らかになった。以上の結果から、Cor11は、胎児期の中枢神経系の一部の集団に選択的に発現することが明らかになった。

#### 【0089】

次にCor11のタンパク質レベルでの発現を解析した。以下の方法で抗Cor11ポリクローナル抗体を作製し、E12.5脊髄におけるCor11タンパク質の発現を調べた。

30

まず免疫に必要な抗原であるCor11の569-813 アミノ酸にあたる領域とGSTの融合タンパク質発現ベクターを構築した。このベクターをE.coli (JM109株) に導入した後、IPTGによって発現誘導し、グルタチオンビーズを用いて融合タンパク質を回収した。融合タンパク質をウサギに数回免疫した後に採血し、その血清から免疫に用いたGST-Cor11抗原による affinity精製を行うことによって、抗Cor11ポリクローナル抗体を得た。

#### 【0090】

免疫染色は以下のプロトコールで行った。マウスE12.5を摘出し、4%PFA/PBS(-) で4、7時間固定したのち、10%ショ糖/PBS(-) で4、8時間、その後20%ショ糖/PBS(-) で4、一晩置換し、OCTで包埋した。厚さ12  $\mu$ mの切片を作製し、スライドガラスに貼り付けた後、室温で1時間乾燥させ、0.1%TritonX-100/PBS(-) で5分間、PBS(-) で5分間湿潤させた。その後、ブロッキング (25%ブロッカー/ PBS(-)) を室温、30分間行い、一次抗体を室温、1時間反応させた後、さらに4で一晩反応させた。その後、0.1%TritonX-100/PBS(-) で、室温で10分間の洗浄を4回行った。次に蛍光標識した2次抗体を室温、20分間反応させ、同様に洗浄を行った後、PBS(-) によって室温で10分間の洗浄を2回行い、封入した。蛍光シグナルは共焦点顕微鏡で検出した。

40

#### 【0091】

抗Cor11抗体を用いた免疫染色の結果、Cor11の核内局在が認められ、また、発現パターンとしては *in situ*ハイブリダイゼーションと同様のパターンが観察された。したがって、Cor11は、E12.5脊髄においてmRNAだけでなくタンパク質としても発現していることが明

50

らかになり、さらに、in situ hybridizationおよび免疫染色のシグナルの特異性が確認された。(図2)。

【0092】

E12.5では、神経管内ではアストロサイトやオリゴデンドロサイトはまだ発生しておらず、したがって、Cor11は神経前駆細胞に発現すると考えられる。そこで、Cor11の神経前駆細胞の分化段階における発現様式を検討した。一般に神経細胞は、増殖中のprogenitorが存在する脳室領域(Ventricular Zone (VZ))で最終分裂を終え、すみやかに外套層(mantle layer(ML))に移動し、成熟することが知られている。まずは、Cor11が増殖progenitorに発現しているのか、あるいは分裂停止後のneural precursorに発現しているのかを調べるために、増殖progenitorマーカーPax7とneural precursorマーカー -III tubulinの発現とCor11の発現を比較した。その結果、Cor11はMLにのみ発現が認められ、Pax7との共発現は認められなかった。また、Cor11陽性細胞は全て、神経細胞にコミットした前駆細胞マーカーである -III tubulinを発現していた。以上の結果から、Cor11は分裂停止後のneural precursorに特異的に発現していることが明らかになった(図3)。

【0093】

脊髄の神経細胞は -III tubulinを発現する頃には、そのidentityがすでに決定されていることが知られている。Cor11は脊髄の一部の細胞で特異的に発現していたことと合わせて、Cor11は神経細胞の種類を同定するためのマーカーとして有用であると考えられる。そこで、次にCor11発現細胞の同定を試みた。マウス背側の脊髄では、発生初期(E10-E11.5)にはd11~d16までの6種類の介在ニューロンが産生され、後期(E12-E13.5)にはd1LA,d1LBの2種類の介在ニューロンが同領域から産生されることが知られている。これらの神経細胞は、その発生時期と、それぞれに選択的に発現する転写因子マーカーによって区別することができる。そこで、Cor11と各種マーカーの発現を初期(E10.75)および後期(E13.25)で比較した。

【0094】

E10.75のマウス脊髄におけるCor11の発現をd11, d12, d13, d15のマーカーであるBrn3a, d13のマーカーであるIsl1、そしてd12, d14, d16のマーカーであるLim1と比較した結果、d13とd16の間にCor11陽性細胞が発生し、d14のLim1, d15のBrn3aとCor11が共発現していたことから、Cor11はd14, d15に特異的に発現していることが明らかになった。(図4)。一方、E13.25では、d1LAマーカーであるLim1およびd1LBマーカーであるBrn3a陽性細胞双方にCor11の共発現が認められたため、Cor11はd1LA, d1LBの両方に発現していることが明らかになった(図5)。以上の結果から、Cor11はd14, d15, d1LA, d1LBに特異的に発現しており、これらを識別するためのマーカーとして有用であると考えられる(図6)。特に、これまで発生場所からしか識別できなかったd14とd16を区別する初めてのマーカーとして、有用であると考えられる。

【0095】

[実施例3]ES細胞よりin vitroで分化誘導した脊髄神経細胞におけるCor11の発現解析

Cor11がin vitroで分化誘導した脊髄神経細胞の識別に使用できるのか調べるために、以下のプロトコールにより、ES細胞より分化誘導した脊髄神経細胞におけるCor11の発現を解析した。

【0096】

未分化なES細胞株であるCCE細胞を、Glasgow Minimum Essential Medium (Invitrogen) に10% Knockout serum replacement (Invitrogen)、2mM L-glutamine (Invitrogen)、0.1mM Non-essential amino acid (Invitrogen)、1mM sodium pyruvate (sigma)、0.1mM 2-mercaptoethanol (sigma)、100U/ml penicillin (Invitrogen)、100 µg/ml streptomycin (Invitrogen) を添加したものに10 µlあたり1000個の細胞の割合で懸濁し、プラスチックディッシュのふたに10 µlずつ播き、逆さにして37 °C、二酸化炭素5%、湿度95%の条件で、2日間培養した。その後、形成された細胞塊(EB)を上記培地中に回収し、2 µM retinoic acid (RA) (sigma)、または2 µM retinoic acidと300nM sonic hedgehog (Shh) (R&D) を添加し、さらに5日間培養した。その後、PBS (Sigma) で洗浄し、4%

10

20

30

40

50

paraformaldehyde / PBS - (和光) で4、20分間固定し、PBS - (Sigma) で洗浄した後、0.2% Triton X-100 / PBS - で透過処理し、Block-ace (大日本製薬) でブロッキングし、抗Cor11抗体 (1:10希釈) と抗Lim3抗体 (1:50希釈、Developmental studies hybridoma bank) を室温で1時間反応させた後、さらに4、一晩反応させた。その後、0.05% Tween20 / PBS - で洗浄し、Cy3標識した抗ウサギ免疫グロブリン抗体 (10 µg/ml、Jackson) とFITC標識した抗マウス免疫グロブリン抗体 (10 µg/ml、Jackson) を室温で1時間反応させた。その後、0.05% Tween20 / PBS - で洗浄し、Prolong (Molecular Probe) で包埋した。

#### 【0097】

その結果、Shh非存在下での背側脊髄神経細胞を誘導した場合に、高頻度にCor11の発現細胞が観察された (図7)。一方、Shh存在下で培養した場合、v2およびmotor neuron (MN) のマーカーである腹側のLim3陽性細胞が出現し、逆にCor11陽性細胞は減少した。以上の結果から、ES細胞よりin vitroで分化誘導した脊髄神経細胞でもその種類に依存してCor11は発現していることが明らかとなり、Cor11を細胞種識別マーカーとして使用することが可能であることが確認された。

10

#### 【0098】

次に、ES細胞より分化誘導した脊髄神経細胞において、in vivoの発現と同様にCor11がd14、d15に発現するかどうかを以下のプロトコールで調べた。

上記と同様の方法で分化誘導した後、4%PFA/PBS(-) で4、2時間固定し、10%ショ糖/PBS(-) で4、一晩、その後20%ショ糖/PBS(-) で4、6時間置換し、OCTで包埋した。厚さ12 µmの切片を作製し、スライドガラスに貼り付けた後、室温で1時間乾燥させ、0.1%Triton X-100/PBS(-) で5分間、PBS(-) で5分間湿潤させた。その後、ブロッキング (25%ブロッカー/ PBS(-)) を室温、30分間行い、一次抗体を室温、1時間反応させた後、さらに4で一晩反応させた。その後、0.1%TritonX-100/PBS(-) で、室温で10分間の洗浄を4回行った。次に蛍光標識した2次抗体を室温、20分間反応させ、同様に洗浄を行った後、PBS(-) によって室温で10分間の洗浄を2回行い、封入した。蛍光シグナルは共焦点顕微鏡で検出した。

20

#### 【0099】

その結果、Cor11/Lim1共陽性およびCor11/Brn3a共陽性細胞が見出され (図8)、Cor11はES細胞よりin vitroで誘導させた脊髄神経細胞においても、マウス胎児脊髄と同様の神経細胞における発現を示すことが確認された。

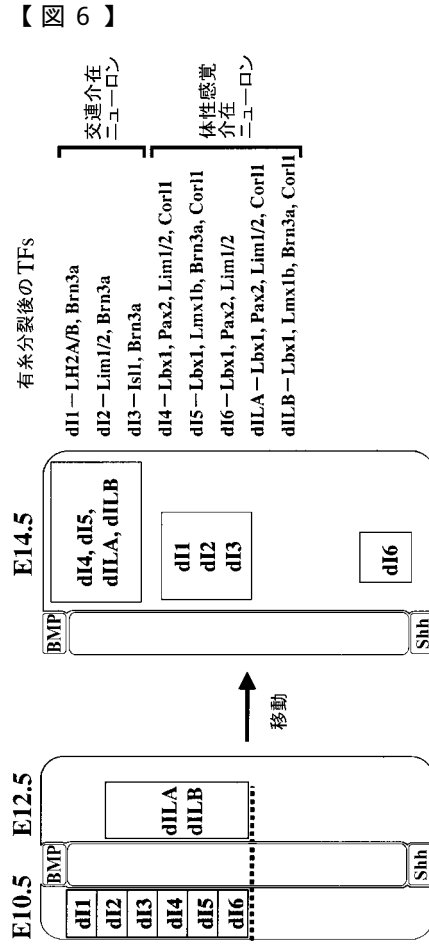
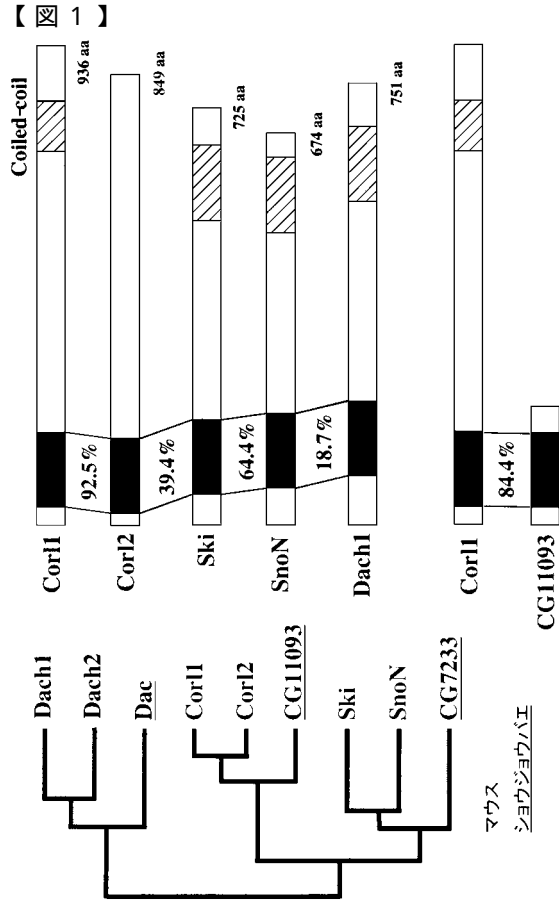
30

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0100】

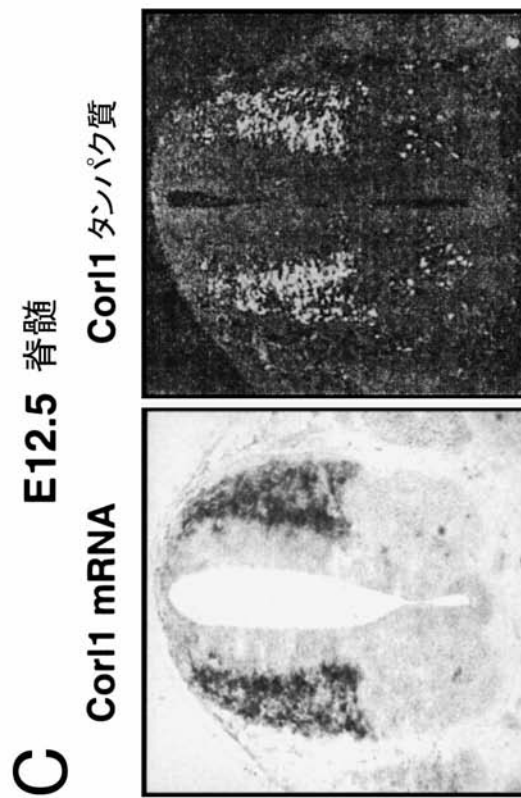
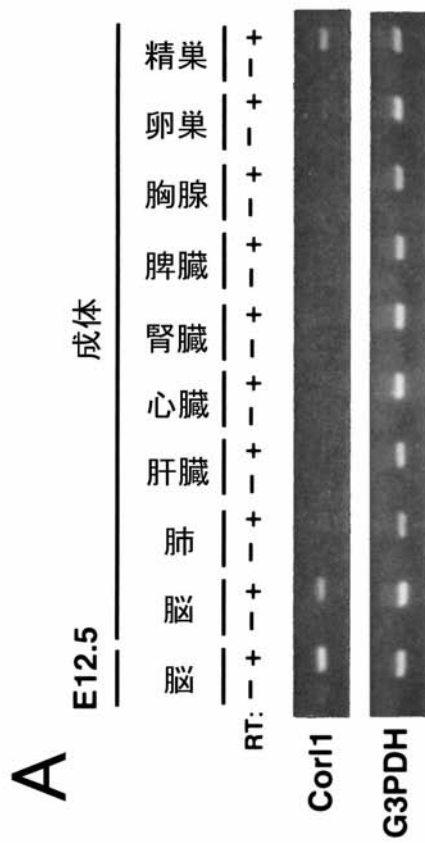
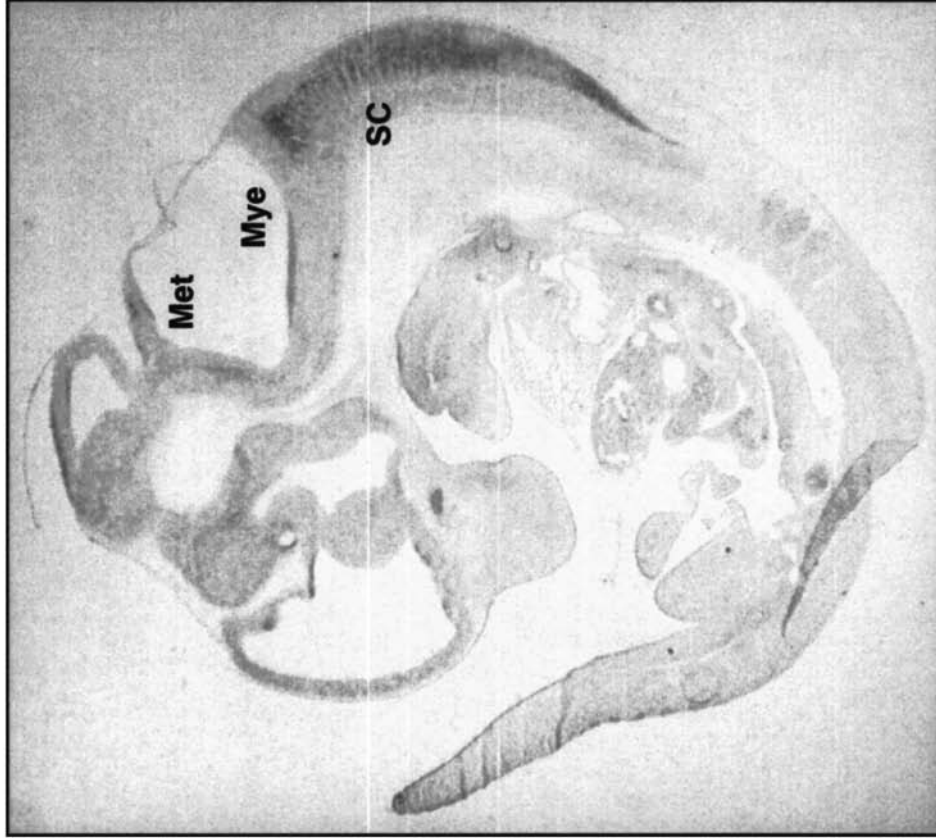
本発明により、脊髄介在ニューロンd14、d15、d1LAおよびd1LBに特異的に発現する遺伝子Cor11が同定された。脊髄損傷などの再生医療時に、組織内で再生した神経細胞、あるいは移植する材料としてin vitroで分化誘導した神経細胞の種類を正確に同定することは、安全性、治療効果の両面で重要な課題となる。この問題を克服するために、細胞種識別マーカーとしてのCor11は有用であると考えられる。特にこれまで発生位置によってのみ分類が可能であった、すなわち、ランダムな配置で分化するin vitro系で誘導された神経細胞では識別不可能であった、d14とd16の区別がCor11によって可能になった。

40



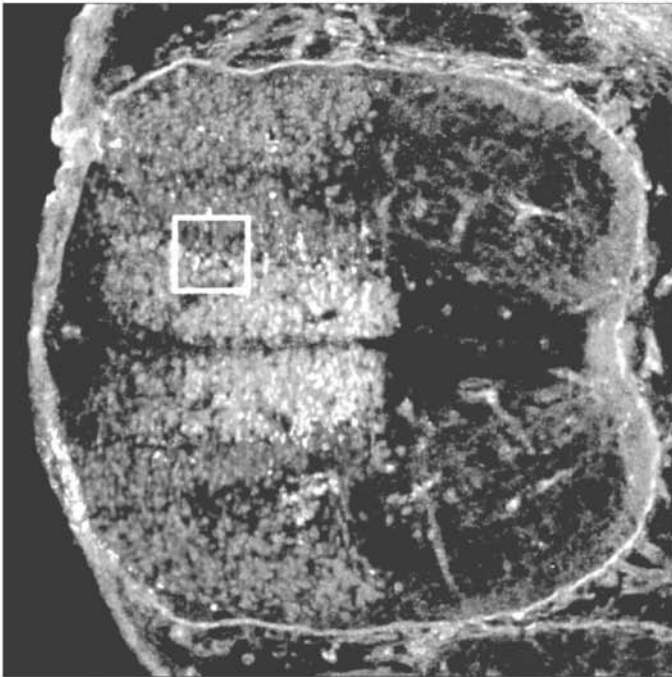
【 図 2 】

B E12.5 Corl1 mRNA

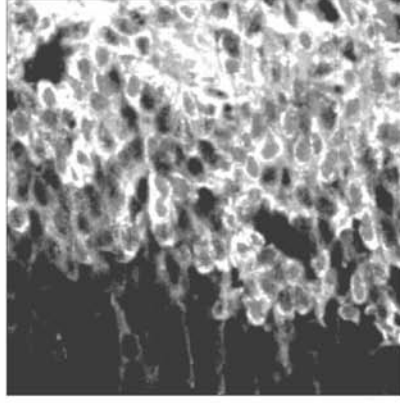


【 図 3 】

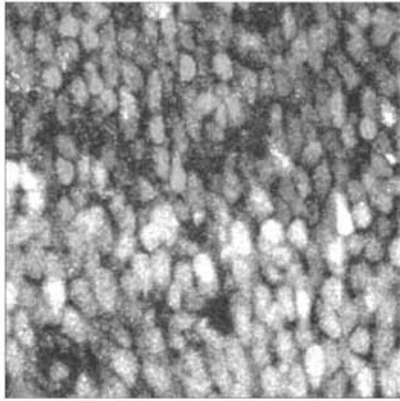
Corl1 Pax7



Corl1  $\beta$ III-tubulin

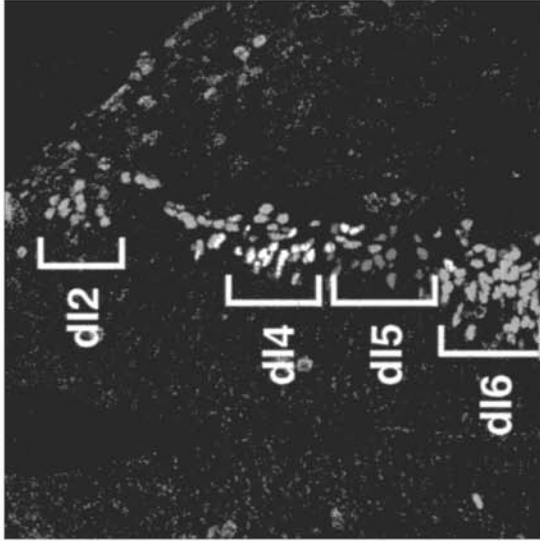


Corl1 Pax7

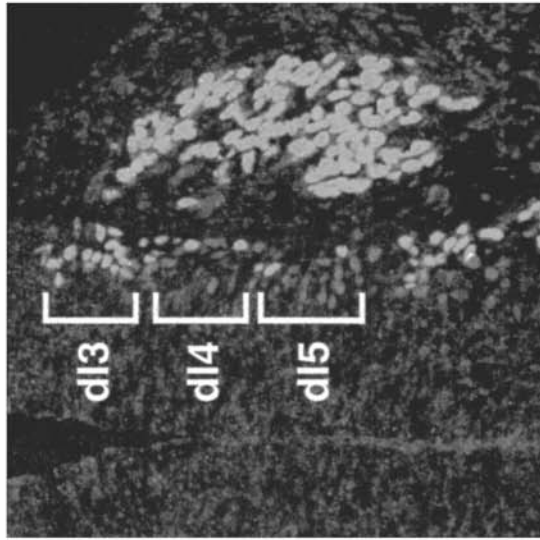


【 図 4 】

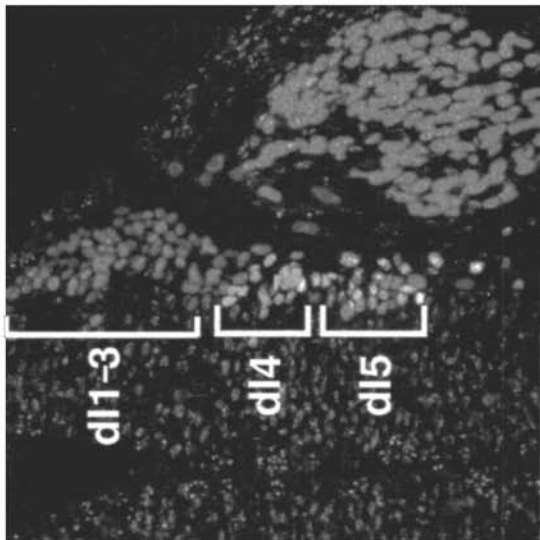
Cor11 Lim1+2



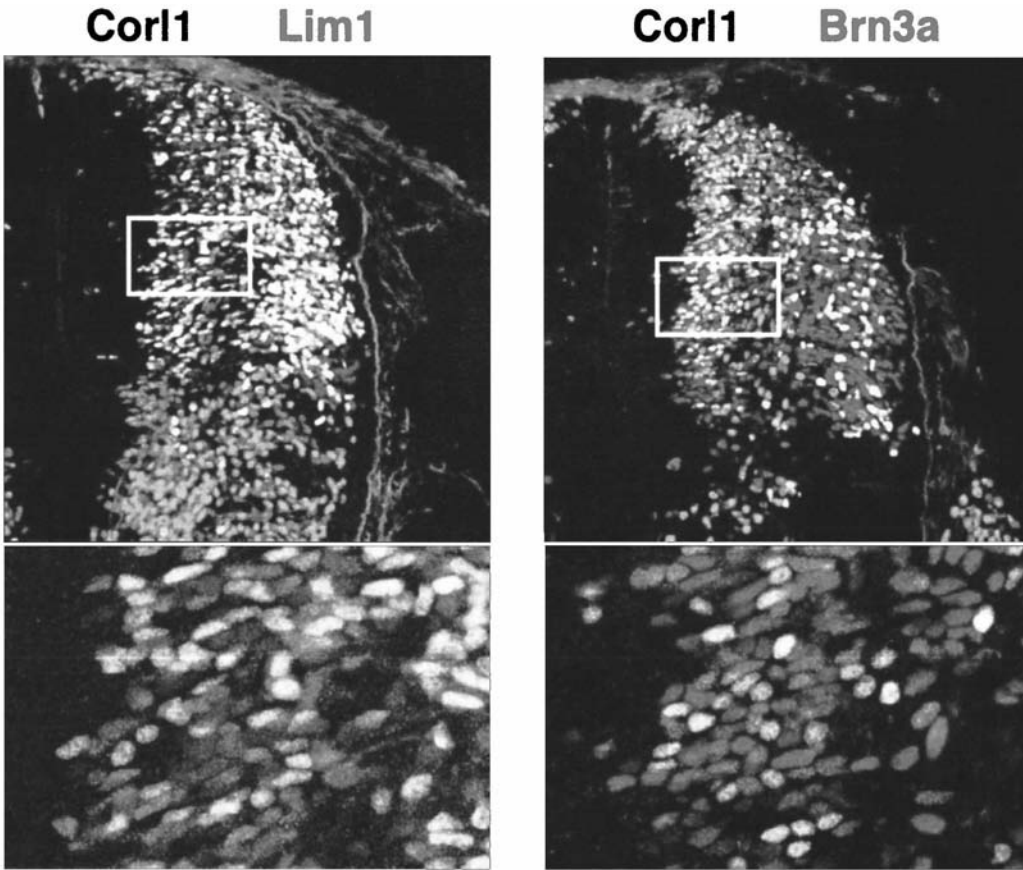
Cor11 Isl1+2



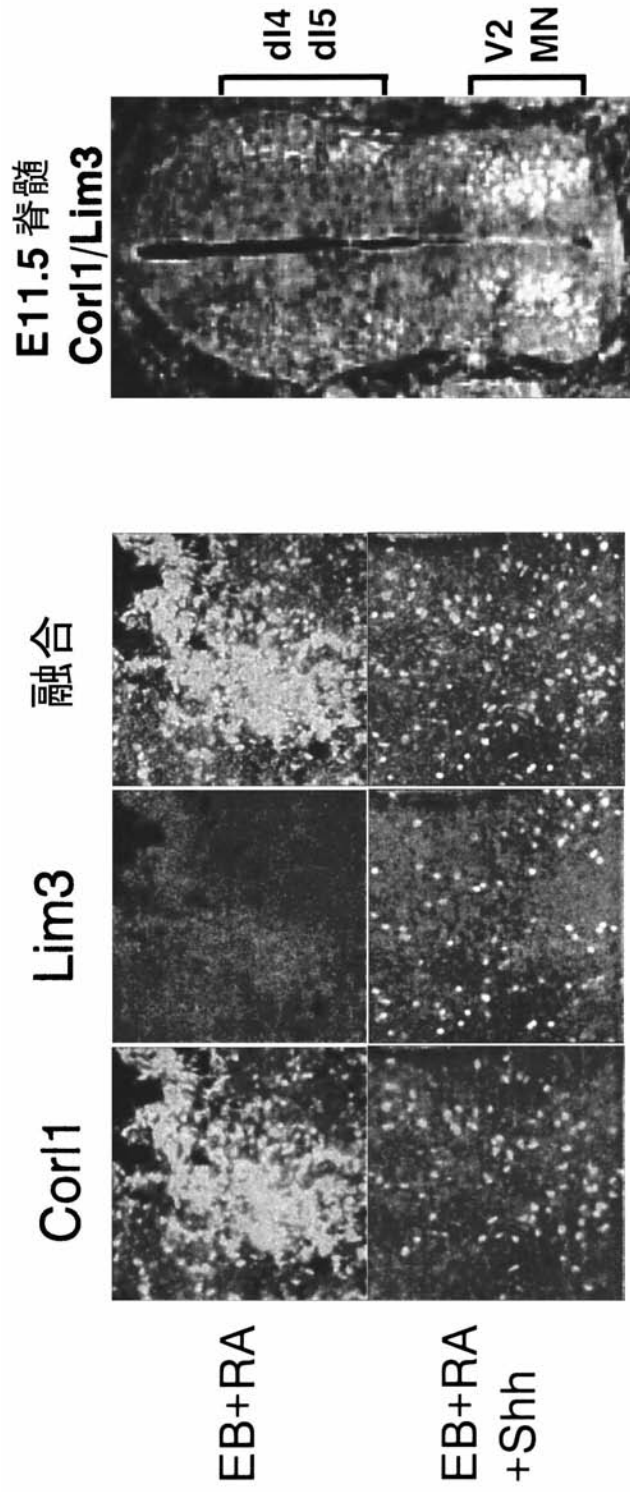
Cor11 Brn3a



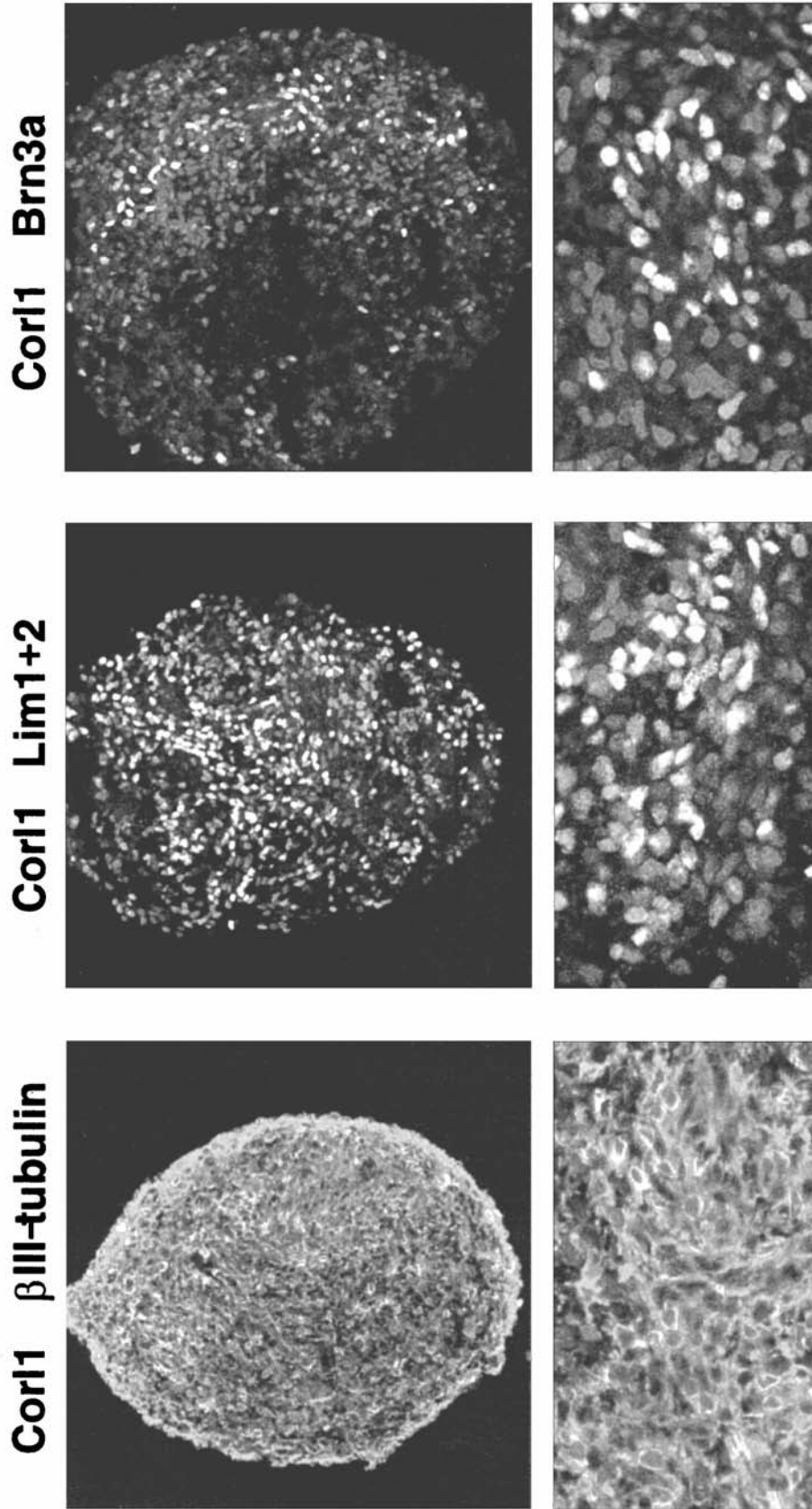
【 図 5 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 配列表 】

[0004731487000001.app](#)

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 0 7 K 16/18

(72)発明者 中川 康子

京都府京都市下京区中堂寺粟田町9番地 サイエンスセンタービル第3号館 株式会社カン研究所内

(72)発明者 中谷 智哉

京都府京都市下京区中堂寺粟田町9番地 サイエンスセンタービル第3号館 株式会社カン研究所内

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 The Journal of biological chemistry. 2005 Feb(Epub 2004 Nov), Vol.280, No.5, p.3645-3655

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00-15/90

C12Q 1/00-3/00

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

专利名称(译)	鉴定靶向Corl1基因的脊神经细胞类型的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4731487B2</a>	公开(公告)日	2011-07-27
申请号	JP2006531906	申请日	2005-08-23
[标]申请(专利权)人(译)	卫材株式会社		
申请(专利权)人(译)	卫材研发管理有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	卫材研发管理有限公司		
[标]发明人	尾野雄一 中川康子 中谷智哉		
发明人	尾野 雄一 中川 康子 中谷 智哉		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/53 C07K16/18		
CPC分类号	C12Q1/6876 C12Q2600/158 G01N33/5026 G01N33/5058 G01N33/5073		
FI分类号	C12N15/00.A C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/53.Y C07K16/18		
代理人(译)	清水初衷		
审查员(译)	清水慎		
优先权	2004243588 2004-08-24 JP		
其他公开文献	JPWO2006022243A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

作为通过减法法搜索在小鼠胎儿脑区域中选择性表达的基因的结果，本发明人获得了编码Corl1的cDNA片段。当通过RT-PCR，原位杂交和使用多克隆抗体的免疫染色检查Corl1的表达时，Corl1特异性地在胚胎神经系统中被选择性地和强烈地表达。接下来，为了比较胎儿脊髓中Corl1与各种标记物的表达以鉴定待表达的神经元的类型，结果显示Corl1在脊髓中间神经元dl4，dl5，dlLA和dlLB中特异性表达。它成了。根据本发明，使用Corl1表达作为指标，可以区分dl4和dl6，其仅可以通过发生位置进行分类。