

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02002/064771

発行日 平成16年6月17日(2004.6.17)

(43) 国際公開日 平成14年8月22日(2002.8.22)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/09
 A O 1 K 67/027
 C O 7 K 14/47
 C O 7 K 16/18
 C O 7 K 19/00

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 A O 1 K 67/027
 C O 7 K 14/47
 C O 7 K 16/18
 C O 7 K 19/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 43 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2002-565086 (P2002-565086)	(71) 出願人	000181147 持田製薬株式会社 東京都新宿区四谷1丁目7番地
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/001321	(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
(22) 国際出願日	平成14年2月15日(2002.2.15)	(74) 代理人	100113332 弁理士 一入 章夫
(31) 優先権主張番号	特願2001-39196 (P2001-39196)	(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(32) 優先日	平成13年2月15日(2001.2.15)	(72) 発明者	中村 祐輔 日本国神奈川県横浜市青葉区あざみ野1-17-33
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	菅野 純夫 日本国東京都杉並区南荻窪4-8-13
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, C, H, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, P, T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 活性化白血球に特異的な新規細胞接着分子

(57) 【要約】

免疫機能の調節に関与する新規な細胞接着分子の遺伝子及び蛋白質と、該蛋白質に対する活性調節剤の効率的な評価方法を提供する。

配列番号1に記載の塩基配列からなるDNA及び該DNAにコードされる細胞接着分子、該DNA配列に対するアンチセンス核酸、該蛋白質の活性調節物質の評価方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) または (b) の D N A ;

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる D N A ;

(b) 配列番号 1 の D N A とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ細胞接着分子をコードする D N A 。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の D N A にコードされる蛋白質。

【請求項 3】

以下の (a) または (b) の蛋白質 ;

(a) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列においてアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる細胞接着分子。

【請求項 4】

以下の (a) または (b) の D N A ;

(a) 配列番号 4 に記載の塩基配列からなる D N A ;

(b) 配列番号 4 の D N A とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつシアル酸含有糖鎖結合活性、リンパ球増殖活性および I L - 2 産生増強活性から選ばれる少くとも一つの活性を有する蛋白質をコードする D N A 。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の D N A にコードされる蛋白質。

【請求項 6】

以下の (a) または (b) の蛋白質 ;

(a) 配列番号 5 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 5 のアミノ酸配列においてアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつシアル酸含有糖鎖結合活性、リンパ球増殖活性および I L - 2 産生増強活性から選ばれる少くとも一つの活性を有する蛋白質。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の蛋白質を含んでなる融合蛋白質。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の D N A を含む組換えベクター。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の組換えベクターにより形質転換された形質転換細胞。

【請求項 10】

請求項 2 または請求項 3 に記載の蛋白質の発現を抑制するアンチセンス核酸。

【請求項 11】

塩基配列が、請求項 1 に記載の D N A の核酸の全部または一部に相補する配列である、請求項 10 に記載のアンチセンス核酸。

【請求項 12】

請求項 2 または請求項 3 に記載の蛋白質もしくはその部分ペプチドに対する抗体。

【請求項 13】

請求項 2 または請求項 3 に記載の蛋白質あるいは該蛋白質を発現している形質転換細胞と被験物質とを接触させることを特徴とする、該蛋白質の活性調節作用を示す物質の検索方法。

【請求項 14】

請求項 8 に記載の組換えベクターまたは請求項 9 に記載の形質転換細胞と被験物質とを接触させることを特徴とする、請求項 1 に記載の D N A の発現調節作用を示す物質の検索方法。

【請求項 15】

h r c 1 2 3 3 7 遺伝子組換え非ヒト動物。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

請求項 12 に記載の抗体を用いることを特徴とする、被験試料中の請求項 2 または請求項 3 に記載の蛋白質の測定方法。

【請求項 17】

請求項 12 に記載の抗体を含有すること特徴とする、被験試料中の請求項 2 または請求項 3 に記載の蛋白質を測定するための試薬またはキット。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、活性化白血球に特異的に発現する新規細胞接着分子及びその部分ペプチド、該蛋白質をコードする DNA 及びその断片、該 DNA を含む組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換細胞、該蛋白質の活性調節作用を示す物質の検索方法、該蛋白質若しくはその部分ペプチドに反応性を有する抗体、該抗体を用いた該蛋白質の測定方法、遺伝子組換え非ヒト動物に関する。

10

従来技術

細胞は他の細胞とコミュニケーションすることによって、細胞の機能や増殖、分化を制御している。細胞接着分子 (cellular adhesion molecule) の中でも、生体内のあらゆる免疫反応に深く関与する白血球の細胞接着分子は免疫機能そのものを調節する重要なものである。

シアロアドヘシンファミリーは、セレクチンとは異なるシアル酸含有糖鎖配列を認識し、イムノグロブリン様ドメイン構造を持つ細胞接着分子ファミリーである。現在までに CD 22 (Immunol. Today 15; 442 - 449 (1994))、シアロアドヘシン (sialoadhesin) (Curr. Biol. 4; 965 - 972 (1994))、MAG (myelin-associated glycoprotein) (Neuron 13; 229 - 246 (1994))、CD33 (Blood 85; 2005 - 2012 (1995))、AIRM1 (J Exp Med. 190; 793 - 801 (1999)) などが知られている。N 端を細胞外に向けた I 型膜貫通蛋白質であり、細胞外領域は 1 個の V 型と複数個の C 2 型イムノグロブリンドメインからなる (第 1 図参照)。V ドメインは A、B、C、C、C、D、E、F、G の 9 個のストラ

20

30

ンドからなり、GFCC C と ABED の 2 個のシート構造が B と E スtrand との間で、ジスルフィド結合で架橋された構造をとる。CD22 とシアロアドヘシンの V ドメイン内の点変異導入実験の結果から、シアロアドヘシンファミリー分子間で保存されている F スtrand のアルギニン残基がシアル酸依存的な結合に必須であることが示されている。各分子は細胞特異的に発現しており、シアリ化糖鎖結合を介して細胞接着に関与する。例えば、AIRM1 は NK 細胞に、CD33 は骨髄系前駆細胞に発現しており、それぞれ NK 細胞の活性化、樹状細胞への分化を抑制する受容体機能を有する。CD22 は成熟 B 細胞、シアロアドヘシンはマクロファージ、MAG はミエリン形成細胞に特異的に発現していることが知られている。

40

このように、白血球の細胞接着に関わる因子は近年数多く知られてきているが、生体内の複雑な免疫反応、炎症反応の解明のためには、これらに関与する新たな細胞接着分子の単離同定が望まれている。

発明が解決しようとする課題

本発明は、活性化白血球に特異的に発現する新規接着分子とその遺伝子を同定することにより、免疫疾患の予防並びに治療に有用な医薬及び方法を提供するものである。

課題を解決するための手段

本発明は、新規な遺伝子 (hrc12337 とする)、当該遺伝子にコードされる新規細胞接着分子 (HRC12337) に関する。また、該 DNA を含む組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換細胞、該蛋白質の活性調節物質の検索方法、該蛋白質若しくはその部分ペプチドに反応性を有する抗体、該抗体を用いた該蛋白質の測定方法、遺伝子組換え非ヒト動物に関する。

(核酸)

50

本発明は、HRC12337（後に詳しく述べる）をコードする遺伝子hrc12337を提供する。遺伝子hrc12337とは具体的には、配列番号2に示すアミノ酸配列からなる細胞接着分子をコードするDNAのことであり、配列番号1や配列番号3に示すcDNAのほか該cDNAの由来するゲノムDNAも含まれる。該遺伝子はヒト腎皮質上皮細胞から単離同定することができるが、本明細書に開示された配列を基に、一般的なハイブリダイゼーション等の遺伝子工学的手法を用いたクローニングやホスホアミダイト法などの化学合成的手法により調製されるDNAであってもよい。その形態としてはcDNA、ゲノムDNAの他、化学合成DNAなどが含まれるが、特に制限はない。本発明のDNAは1本鎖であっても、それに相補的な配列を有するDNAやRNAと結合して2重鎖、3重鎖を形成していても良い。また、当該DNAは、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）等の酵素や放射性同位体、蛍光物質、化学発光物質等で標識されていてもよい。

10

また、hrc12337の塩基配列が提供されれば、これより導かれるRNAの配列や、相補的なDNAおよびRNAの配列などは一義的に決定されるので、本発明は、本発明のDNAに対応するRNAあるいは本発明のDNAと相補的な配列を有するDNAおよびRNAもまた提供するものと理解すべきである。本明細書中において、「DNA」は「ポリヌクレオチド」と同義である。

さらに、本発明のDNAには、配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズするDNAをも含むものである。

配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAに対しては、これとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ該DNAにコードされる蛋白質が細胞接着分子であれば、塩基配列のバリエーションが許容される。例えば、いわゆるコドン縮重による同一アミノ酸残基をコードする複数のコドンの存在や、種々の人為的処理例えば部位特異的変異導入、変異剤処理によるランダム変異、制限酵素切断によるDNA断片の変異・欠失・連結等により、部分的にDNA配列が変化したものであっても、これらDNA変異体が配列番号1に記載のDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞接着分子をコードするDNAであれば、配列番号1に示したDNA配列との相違に関わらず、本発明の範囲内のものである。

20

上記のDNA変異の程度は、配列番号1に記載のDNA配列と70%以上、好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上の同一性を有するものであれば許容範囲内である。DNA配列の同一性の判断には、BLAST（J. Mol. Evol., Vol. 36; 290-300 (1993)、J. Mol. Biol., Vol. 215; 403-10 (1990)）を用いることができる。また、ハイブリダイズする程度としては、ストリンジエントな条件下、例えばDIG DNA Labeling kit（ロシュ・ダイアグノスティクス社製 Cat No. 1175033）でプローブをラベルした場合に、例えば32、好ましくは37、より好ましくは42のDIG Easy Hyb溶液（ロシュ・ダイアグノスティクス社製 Cat No. 1603558）中でハイブリダイズさせ、例えば50、好ましくは65の0.5×SSC溶液（0.1%（w/v）SDSを含む）中でメンブレンを洗浄する条件（1×SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウムである）でのサザンハイブリダイゼーションで、配列番号1に記載の核酸にハイブリダイズする程度であればよい。

30

40

配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAあるいはその部分断片は、自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー性疾患、炎症性疾患、腫瘍等本発明の蛋白質が関与する疾患の特異的プローブとして有用であると考えられる。

本発明のDNAは、HRC12337を大量に生産するために使用することができる。該DNAはまた、酵素等で標識して、組織における本発明の蛋白質の発現状況を検査するために使用することができる。すなわち、該DNAをプローブとして使用し、細胞における本発明の蛋白質の発現量を、mRNA発現量を指標として確認することにより、本発明の蛋白質の製造に適した細胞やその培養条件を決定することができるほか、本発明の蛋白質が関連する疾患、特に自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー性疾患、炎症性疾患、腫瘍等

50

の診断を行うことも可能である。

また、本発明のDNAの一部をプライマーとして使用したPCR-RFLP (Restriction fragment length polymorphism)法、PCR-SSCP (Single strand conformation polymorphism)法、シーケンシング等の方法により、核酸配列上の異常あるいは多形を検査・診断することができる。

また、本発明のDNAを生体内の細胞に導入し、自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー性疾患、炎症性疾患、腫瘍等の発症を予防または治療するための遺伝子治療にも使用することが出来る。

本発明のDNAは、形質転換細胞の調製、さらには該形質転換細胞を用いた組換蛋白質HRC12337の生産方法、あるいはHRC12337の発現を特異的に抑制する化合物の探索に大いに有用である。 10

本発明における形質転換細胞は当業者に公知の技術を適用して調製することが可能であり、例えば、市販されあるいは当業者が一般に入手可能な様々なベクターを利用して、適当な宿主細胞へ本発明のDNAを組み入れることが可能である。その際、遺伝子hrc12337をプロモーターやエンハンサーに代表される発現制御遺伝子の影響下におくことで、遺伝子hrc12337の宿主細胞内での発現を任意にコントロールすることが可能である。この手法は、形質転換された宿主細胞を用いたHRC12337の生産において好適に用いられる他、遺伝子hrc12337の発現制御機構の研究あるいは該遺伝子の発現を調節し得る物質の探索などにも応用することが可能となる。 20

例えば、任意の被験物質と遺伝子hrc12337を含むベクターで形質転換された細胞とを適当な条件下で接触させることで、被験物質の遺伝子hrc12337の発現を促進あるいは抑制する作用を有する物質を探索し、あるいは評価を行うことができる。

また、本発明であるDNAと公知の方法とを組み合わせ、マウスまたはその他の適当な動物を基にトランスジェニック動物を作製することが出来る。さらに、本発明の遺伝子hrc12337を利用すれば、ヒト以外の動物からヒトhrc12337に相当する遺伝子を破壊したいわゆるノックアウト動物を作製することも可能である。このモデル動物の物理学的、生物学的、病理学的及び遺伝子的特徴を分析することにより、本発明に係る遺伝子及び蛋白質の機能を解明することが可能となる。さらに、そのようにして内在性遺伝子が破壊された該動物に本発明のヒトhrc12337を導入することにより、ヒトhrc12337のみを有するモデル動物を作成することも可能となる。このモデル動物は、該導入されたヒトhrc12337をターゲットとした薬剤の開発、評価に有用である。(蛋白質HRC12337) 30

hrc12337にコードされる蛋白質HRC12337は、配列番号2に示すアミノ酸配列からなる細胞接着分子である。特にそのアミノ酸配列に見られる構造的特徴から、シアロアドヘシンファミリーに属する新規の細胞接着分子であると判断される。

HRC12337は分子内にイムノグロブリンドメイン2つとシアル酸結合モチーフを有し、アミノ酸レベルでCD33およびAIRM1と約40%の相同性を示す。また、シアル酸依存的な結合に必須とされるVドメイン中のアルギニン残基が保存されていた(第2図、第3図参照)。従って、他のシアロアドヘシンファミリー分子と同様、本発明の細胞接着分子は、シアル酸含有糖鎖に結合活性を有する蛋白質であると理解される。また、本発明の細胞接着分子は、活性化白血球において特異的に発現することから、免疫担当細胞間の認識や免疫反応を調節する活性を有する蛋白質であると理解される。本発明の細胞接着分子であるHRC12337のシアル酸含有糖鎖結合活性は、例えば実施例5に示す方法で確認することが出来る。また、Curr Biol. 4; 965-972(1994)に記載の方法に従って、HRC12337が認識するシアル酸含有糖鎖の特異性を決定することが出来る。本発明の細胞接着分子であるHRC12337の免疫反応を調節する活性は、例えば混合リンパ球反応(免疫実験操作法II 右田俊介編 南江堂1995年発行 p738-742)により確認することが出来る。より具体的には、HRC12337の免疫反応を調節する活性は、実施例10に示すように、混合リンパ球反応において 40 50

リンパ球を増殖させる活性、および/またはIL-2産生を増強する活性として検出可能である。更に詳しくは、IL-2産生を増強し、かつTNF産生およびIL-8産生には影響を与えないことを特徴とする。リンパ球を増殖させる活性および/またはIL-2産生を増殖する活性とは、混合リンパ球反応においてHRC12337蛋白質存在下と非存在下においてリンパ球増殖の測定値および/またはIL-2産生の測定値に差があることを言う。差があるとはたとえば、下記の式で計算される測定値変動率が10%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは50%以上、更に好ましくは70%以上、特に好ましくは90%以上であることをいう。

測定値変動率 = (HRC12337蛋白質存在下の測定値 - HRC12337蛋白質非存在下の測定値)の絶対値 / HRC12337蛋白質非存在下の測定値 * 100

10

ここで、測定値については蛋白質の活性を確認できる系の種類によって適宜定められる。たとえば、実施例10に示す混合リンパ球反応におけるIL-2産生の測定系の場合には、測定値としてはIL-2産生量(pg/ml)を用いることができ、HRC12337蛋白質存在下の測定値 > HRC12337蛋白質非存在下の測定値となる場合、IL-2産生増強活性があるといえる。実施例10に示す混合リンパ球反応におけるリンパ球増殖反応の測定系の場合には、プロモデオキシウリジンの細胞DNAの取り込み量をELISA法により測定しているため吸光度を測定値として用いることができ、HRC12337蛋白質存在下の測定値 > HRC12337蛋白質非存在下の測定値となる場合、リンパ球増殖活性があるといえる。測定系にバックグラウンドやノイズの値が含まれる場合には、そのようなものを差し引いた値を測定値とすることは言うまでもない。HRC12337は、CD33およびAIRM1とは異なり細胞内領域に抑制性シグナルモチーフITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)を有さない。また、PHA (phytohemagglutinin)で活性化された末梢白血球に誘導的に発現し、脾臓、胸腺、子宮および精巣でやや発現を認めるものの、他の臓器での発現が少ないことが極めて特徴的である。また、実施例8に示すように、各種患者血清中のHRC12337蛋白質濃度の測定から、健常人と比較して花粉症・アトピー性皮膚炎・血管炎患者において高値を示す傾向があり、HRC12337がこれらの疾患と関係していることが明らかになった。

20

この様に、HRC12337はドメイン構造レベルにおいてはシアロアドヘシンファミリーに認められる特徴を高度に保持している一方、ITIMを有さない、末梢白血球の刺激時のみ誘導される、混合リンパ球反応においてリンパ球増殖活性を示す、混合リンパ球反応においてIL-2産生を増強する、花粉症・アトピー性皮膚炎・血管炎患者血清中において高値を示すなどの特徴を有する。このことから、HRC12337は、免疫機能の調節において、他のシアロアドヘシンファミリー分子にはない特徴的な役割を果たしていることが強く推認される。従って、HRC12337を標的とした医薬化合物は、従来にはない特徴を備えた医薬となり得るものと期待される。

30

なお、細胞接着分子である限り、配列番号2に示す蛋白質のアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が置換、欠失、および/もしくは付加したアミノ酸配列からなるポリペプチドあるいは蛋白質も本発明の範囲内である。

蛋白質の構成要素となるアミノ酸残基側鎖は、疎水性、電荷、大きさなどにおいてそれぞれ異なるが、実質的に蛋白質全体の3次元構造(立体構造とも言う)に影響を与えないという意味で保存性の高い幾つかの関係が知られている。例えば、アミノ酸残基の置換については、グリシン(Gly)とプロリン(Pro)、Glyとアラニン(Ala)またはバリン(Val)、ロイシン(Leu)とイソロイシン(Ile)、グルタミン酸(Glu)とグルタミン(Gln)、アスパラギン酸(Asp)とアスパラギン(Asn)、システイン(Cys)とスレオニン(Thr)、Thrとセリン(Ser)またはAla、リジン(Lys)とアルギニン(Arg)、等が挙げられる。また、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、メチオニン(Met)、フェニルアラニン(Phe)、トリプトファン(Trp)、Gly、Cysは、共に非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有すると考えられる。非荷電極性アミノ酸としては、Ser、Thr、チロシン

40

50

(Tyr)、Asn、Glnが挙げられる。酸性アミノ酸としては、AspおよびGluが挙げられる。塩基性アミノ酸としてはLys、Arg、ヒスチジン(His)が挙げられる。また、上述の意味の保存性を損なう場合でも、なおその蛋白質の本質的な機能、本発明においては細胞接着分子としての機能、を失わない変異も当業者に多く知られている。さらに、異なる生物種間に保存される同種の蛋白質が、幾つかのアミノ酸が集中あるいは分散して欠失あるいは挿入されていてもなお本質的な機能を保持している例も多く認められている。

従って、配列番号2に示したアミノ酸配列上の置換、挿入、欠失等による変異蛋白質であっても、それが細胞接着分子であれば、これらは本発明の範囲内にあるものと言うことができる。細胞接着分子であるとは、換言すれば本発明のHRC12337蛋白質と同等の機能を有することである。同等の機能を有するとは、糖鎖結合活性、リンパ球増殖活性およびIL-2産生増強活性から選ばれる少なくとも一つの活性を保持していることを言う。

10

このようなアミノ酸の改変は、遺伝子多型等によって生ずる変異の様に自然界において認められる他、当業者に公知の方法、例えばNTGなどの変異誘発剤を用いた突然変異誘発法や種々の組換え遺伝子手法を用いた部位特異的変異法を利用して、人為的に行うことができる。アミノ酸の変異部位および個数は、変異蛋白質が細胞接着分子である限り特に制限はないが、変異個数は通常数十アミノ酸以内、好ましくは10アミノ酸以内、より好ましくは1もしくは数個以内である。

また本発明では、HRC12337を上述のような全てのドメイン構造を有する分子全体として理解できるほか、特徴的なドメイン、特にリガンドとの結合能を担うドメインを保持した部分ペプチドとして理解することもできる。膜貫通型蛋白質の中には、リガンド結合部位を含む部分断片が、特徴的な立体構造を保持したまま他のドメインから切り離されるなどして、遊離の(あるいは可溶化とも言われる)部分ペプチドとして存在し得るものがあることが、以前より報告されている。このような部分ペプチドは、依然として特異的なリガンドとの結合能を保持していることから、これを用いて該蛋白質への結合能を有する化合物の探索が可能となる。HRC12337における部分ペプチドも、かかる意味においてそのリガンド結合能を有する限り、実質的には本発明と同等の物質であると理解すべきである。ここで、HRC12337についてのリガンドとは、シアル酸含有糖鎖と理解することが出来る。また、HRC12337は生体内において可溶型で存在することが示されたこと、および可溶型HRC12337-Fcは混合リンパ球反応においてリンパ球増殖活性およびIL-2産生を増強する活性を示すことから、可溶型HRC12337自体がリガンドとして機能し、何らかの受容体に結合し、免疫反応を調節する活性を発揮する可能性も考えられる。HRC12337では、細胞外領域を含むN末端側の部分ペプチドにおいてかかるリガンド結合機能または免疫反応を調節する活性が保持されるものと推定される。よって、HRC12337の細胞外領域を含んでなる蛋白質および該蛋白質をコードするDNAも、本発明の範囲内である。すなわち、本発明は以下の(1)から(4)のものを含有する。(1)以下の(a)または(b)のDNA;(a)配列番号:4に記載の塩基配列からなるDNA;(b)配列番号:4のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつシアル酸含有糖鎖結合活性、リンパ球増殖活性およびIL-2産生増強活性から選ばれる少なくとも一つの活性を有する蛋白質をコードするDNA。(2)(1)に記載のDNAにコードされる蛋白質。(3)以下の(a)または(b)の蛋白質;(a)配列番号:5に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質;(b)配列番号:5のアミノ酸配列においてアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつシアル酸含有糖鎖結合活性、リンパ球増殖活性およびIL-2産生増強活性から選ばれる少なくとも一つの活性を有する蛋白質。(4)(3)に記載の蛋白質を含んでなる融合蛋白質。部分ペプチドの他の好ましい態様としては、例えばIgドメインI(配列番号2の57~144a.a.)、またはIgドメインII(配列番号2の187~239a.a.)のいずれかを含むペプチドが挙げられる。リガンド結合能を有するという観点では、少なくともIgドメインIを含むことが好ましい。少なくともIgドメインI(配列番号

20

30

40

50

2の57~144 a. a.)を含む限り、他のドメインの全部または一部が連結していても良いし、他の蛋白質やペプチドとの融合蛋白質となっても良い。融合蛋白質がHRC12337の細胞外領域としてのシアル酸含有糖鎖結合活性、リンパ球増殖活性およびIL-2産生増強活性から選ばれる少なくとも一つの活性を有する限りにおいて、HRC12337細胞外領域に連結される他のポリペプチドには特に制限はない。このような融合蛋白質の好ましい一例は、配列番号6に示されるHRC123337-Hisや配列番号7に示されるHRC12337-Fcである。またシグナル配列を有する蛋白質ではシグナル配列が切断されたものが成熟蛋白質として機能している場合もある。よって本発明の蛋白質からシグナル配列が除かれた成熟ペプチドも、実質的には本発明と同等の物質であると理解すべきである。HRC12337の場合、配列番号2に示されるアミノ酸配列の7番目から20番目のアミノ酸残基付近にシグナル配列の存在が予測されている。

10

本発明の蛋白質またはその部分ペプチドは、該蛋白質の活性を調節する物質の探索に使用することが出来る。探索を通じて得られる化合物等は、本発明の蛋白質が関連する疾患、例えば自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー性疾患、炎症性疾患、腫瘍等に対する有効な治療薬または予防薬となることが期待される。

(抗体)

本発明はさらにHRC12337に結合する抗体を提供する。本発明の抗体は、HRC12337全体あるいはその部分ペプチドを抗原として特異的に認識する抗体であり、モノクローナル抗体及び/またはポリクローナル抗体が含まれる。また、免疫グロブリンの構造、物理化学的性質や免疫学的性質として分類される5つのクラス(IgG, IgA, IgM, IgD, IgE)、あるいはH鎖のタイプによるサブクラスのいずれに属するものであってもよい。さらに、免疫グロブリンを例えばペプシンで分解したときのF(ab')₂、パインで分解したときのFabなどのフラグメントであっても、またキメラ抗体やヒト化抗体であってもよい。またHRC12337あるいはその部分ペプチドを特異的に認識するのみでなく、HRC12337の活性を調節する機能を有する抗体も本発明に含まれる。HRC12337の活性を調節する機能を有する抗体とは、例えばHRC12337とリガンドの結合を阻害する中和抗体が挙げられる。これらの抗体は、HRC12337の研究的あるいは臨床的な検出等に有用である。

20

(アンチセンス核酸)

本発明は、生体内において核酸レベルでのHRC12337生合成を抑制することのできる、いわゆるアンチセンス核酸を提供する。かかるアンチセンス核酸は、HRC12337をコードするmRNAを作り出すのに必要なゲノム領域からpre-mRNAへの転写段階、pre-mRNAから成熟mRNAへのプロセッシング段階、核膜通過段階、蛋白への翻訳段階のいずれかで、遺伝子情報を担うDNAもしくはRNAに結合し、遺伝情報の伝達の正常な流れに影響を与えて蛋白質の発現を調節するものを意味し、遺伝子hrc12337の核酸配列の全体あるいはいずれかの部分に相補する配列からなるものであってもよい。好ましくは、配列番号1または配列番号3に記載の核酸配列に相当あるいは相補する配列から成る核酸(DNA、RNAを含む)である。また、ゲノム領域から転写されるmRNAがイントロン構造あるいは5'末端や3'末端に非翻訳領域を含む形であるときは、かかる非翻訳部分の配列に相当あるいは相補するアンチセンス核酸も本発明のアンチセンス核酸と同等の機能を有するものとなる。

30

40

本発明のアンチセンス核酸は、DNAやRNAの他、その立体構造や機能がDNAあるいはRNAと類似する各種誘導体のすべてを含むものである。例えば、3'末端もしくは5'末端に他の物質が結合した核酸、オリゴヌクレオチドの塩基、糖、リン酸の少なくともいずれか一つにおいて置換や修飾が生じた核酸、天然には存在しないような塩基、糖あるいはリン酸を有する核酸、糖-リン酸骨格以外の骨格(バックボーン)を有する核酸等が挙げられる。これらの核酸は、ヌクレアーゼ耐性、組織選択性、細胞透過性、結合力の少なくとも一つが高められた誘導體として好適である。すなわち、HRC12337の活性発現を抑制し得る機能を有する限り、核酸の形態に制限はない。

また本発明では、一般的には、ステム・ループを形成しているmRNAのループ部分に八

50

イブリダイズするような塩基配列、すなわちステム・ループを形成している領域の塩基配列に相補的な塩基配列をもつアンチセンス核酸が好適である。あるいは、翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、スプライス部位に結合するようなアンチセンス核酸、すなわちこれらの部位の配列に相補的な配列を有するアンチセンス核酸も、一般に高い発現抑制効果が期待できる点で好ましい。

この様なアンチセンス核酸を細胞内に取り込ませ、効率的に作用させるためには、本発明のアンチセンス核酸の鎖長は15塩基以上30塩基以下、好ましくは15塩基以上25塩基以下、より好ましくは18塩基以上22塩基以下の塩基数からなる塩基配列からなるものが好適である。

本発明のアンチセンス核酸の発現抑制効果は、公知の手法、例えば本発明の遺伝子の発現抑制領域、5'非翻訳領域、翻訳開始部位近傍領域または翻訳領域の一部等を含むDNAとルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子を連結した発現プラスミドを作製し、*in vitro* transcription反応(プロメガ社:Ribo max system等)と*in vitro* translation反応(プロメガ社:Rabbit Reticulocyte Lysate System等)を併用する系のような本発明の遺伝子が転写または翻訳される環境下で被験物質を系に添加し、該レポーター遺伝子の発現量を測定することにより評価することができる。

本発明のアンチセンス核酸は、生体内におけるhrc12337の発現を抑制することができるので、HRC12337が関連する疾患の予防・治療剤として有用である。

発明の実施の最良の形態

(核酸)

本発明のDNAをDNAライブラリーから得る例としては、適当なゲノムDNAライブラリーやcDNAライブラリーを、ハイブリダイゼーションによるスクリーニング法や、抗体を用いたイムノスクリーニング法等でスクリーニングし、目的のDNAを有するクローンを増殖させ、そこから制限酵素等を用いて切り出す方法がある。ハイブリダイゼーション法によるスクリーニングは、配列番号1に記載の塩基配列もしくはその一部を有するDNAを³²P等でラベルしてプローブとし、任意のcDNAライブラリーに対して、公知の方法で(例えば、Maniatis T.等, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982年)行うことができる。イムノスクリーニング法で用いる抗体は、後述する本発明の抗体を使用することができる。本発明の新規DNAはまた、ゲノムDNAライブラリーもしくはcDNAライブラリーを鋳型とするPCR(Polymerase Chain Reaction)によっても得る事ができる。PCRは、配列番号1に記載の塩基配列をもとに、センスプライマー、アンチセンスプライマーを作成し、任意のDNAライブラリーに対し、公知の方法(例えばMichael A. I.等, PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, Academic Press, 1990年参照)等を行って、本発明のDNAを得る事もできる。上記各種方法で使用するDNAライブラリーは、本発明のDNAを有するDNAライブラリーを選択して使用する。当該DNAライブラリーは、本発明のDNAを有するライブラリーであれば、いかなるものも使用可能であり、市販のDNAライブラリーを使用したり、本発明のDNAを有する細胞からcDNAライブラリーを作成するのに適した細胞を選び公知の方法(J. Sambrook等, Molecular Cloning, a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989年参照)に従って、cDNAライブラリーを作製し、利用することができる。

また、本明細書に開示された配列を基にホスホアミダイト法などの化学合成的手法により調製することも可能である。

本発明のDNAを含む組換えベクターは、環状、直鎖状等いかなる形態のものであってもよい。かかる組換えベクターは、本発明のDNAの全部または一部に加え、必要ならば他

10

20

30

40

50

の塩基配列を有していてもよい。一部とは例えば本発明の蛋白質の部分ペプチドをコードするDNAである。他の塩基配列とは、エンハンサーの配列、プロモーターの配列、リボゾーム結合配列、コピー数の増幅を目的として使用される塩基配列、シグナルペプチドをコードする塩基配列、他のポリペプチドをコードする塩基配列、ポリA付加配列、スプライシング配列、複製開始点、選択マーカーとなる遺伝子の塩基配列等のことである。本発明の組換えベクターの好ましい一例は、発現ベクターである。

遺伝子組み換えに際しては、適当な合成DNAアダプターを用いて翻訳開始コドンや翻訳終止コドンを本発明のDNAに付加したり、あるいは塩基配列内に適当な制限酵素切断配列を新たに発生させあるいは消失させることも可能である。これらは当業者が通常行う作業の範囲内であり、本発明のDNAを基に任意かつ容易に加工することができる。

また本発明のDNAを保持するベクターは、使用する宿主に応じた適当なベクターを選択して使用すればよく、プラスミドの他にバクテリオファージ、バキュロウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス等の種々のウイルスを用いることも可能であり、特に制限はない。

本発明の遺伝子の発現は、該遺伝子固有のプロモーター配列の制御下に発現させることができる。かかる発現系を用いれば、本発明の遺伝子の転写を促進あるいは抑制する物質の探索がより有利に行える。あるいは、本発明の遺伝子上流に別の適当な発現プロモーターを該遺伝子固有のプロモーター配列に接続あるいは置き換えて使用することもできる。この場合に使用するプロモーターは、宿主及び発現の目的に応じて適宜選択すればよく、例えば宿主が大腸菌である場合にはT7プロモーター、lacプロモーター、trpプロモーター、PLプロモーターなどが、宿主が酵母である場合にはPHO5プロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター等が、宿主が動物細胞である場合にはSV40由来プロモーター、レトロウイルスプロモーター、延長因子1 (Elongation Factor 1) プロモーター等を例示できるが、当然ながらこれらには限定されない。

DNAをベクターに導入する方法は公知である(J. Sambrook等、Molecular Cloning, a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク(New York), 1989年、参照)。すなわち、DNAとベクターをそれぞれ適当な制限酵素で消化し、得られたそれぞれの断片を、DNAリガーゼを用いてライゲーションさせればよい。

(蛋白質)

本発明の蛋白質は、該蛋白質を発現している細胞や組織から調製することができ、またペプチド合成機(例えば、ペプチドシンセサイザー433A型、アプライドバイオシステムズ ジャパン株式会社製)を使用した化学合成法でも、また原核生物あるいは真核生物から選択される適当な宿主細胞を用いた組換え方法によっても調製することができる。しかしながら、その純度の面から遺伝子工学的な手法による生産ならびに組換え型蛋白質が好ましい。

前項の組換えベクターを用いて形質転換させる宿主細胞には特に制限はなく、E. coli、B. subtilisあるいはS. cerevisiaeに代表される遺伝子工学手法において利用可能な下等細胞、昆虫細胞、COS7細胞、CHO細胞、HeLa細胞に代表される動物細胞など多くの細胞が、本発明に対しても利用可能である。

本発明の形質転換細胞は、適当な宿主細胞を本発明の組換えベクターにより形質転換させることで得ることができる。前項の組換えベクターを宿主細胞に導入する方法としては、エレクトロポレーション法、プロトプラスト法、アルカリ金属法、リン酸カルシウム沈澱法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、ウイルス粒子を用いる方法等の公知方法(実験医学臨時増刊、遺伝子工学ハンドブック1991年3月20日発行、羊土社、参照)があるが、いずれの方法を用いても構わない。

当該蛋白質を遺伝子工学的に生産するには、上述の形質転換細胞を培養して培養混合物を回収し、当該蛋白質を精製する。形質転換細胞の培養は、一般的な方法で行うことができ

10

20

30

40

50

る。形質転換細胞の培養については各種の成書（例、「微生物実験法」社団法人日本生化学会編、株式会社東京化学同人、1992年）があるので、それらを参考にして行うことができる。

培養混合物から本発明の蛋白質を精製する方法としては、蛋白質の精製に通常使用されている方法の中から適切な方法を適宜選択して行うことができる。すなわち、塩析法、限外濾過法、等電点沈澱法、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーや抗体クロマトグラフィー等の各種アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィー等、通常使用され得る方法の中から適切な方法を適宜選択し、必要によりHPLCシステム等を使用して適当な順序で精製を行えば良い。

10

また、本発明の蛋白質を他の蛋白質やタグ（例、グルタチオンSトランスフェラーゼ、プロテインA、ヘキサヒスチジンタグ、FLAGタグその他）との融合蛋白質として発現させることも可能である。発現させた融合型は、適当なプロテアーゼ（例、トロンピン、エンテロカイナーズその他）を用いて切り出すことが可能であり、ときとして蛋白質の調製をより有利に行うことが可能となる。本発明の蛋白質の精製は当業者に一般的な手法を適宜組み合わせればよく、特に融合蛋白質の形態で発現させたときは、その形態に特徴的な精製法を採用することが好ましい。

また、組換えDNA分子を利用して無細胞系の合成方法（J. Sambrook, et al.: Molecular Cloning 2nd ed. (1989年)）で得る方法も、遺伝子工学的に生産する方法の1つである。

20

この様に本発明の蛋白質は、それ単独の形態でも別種の蛋白質との融合蛋白質の形態でも調製することができるが、これらの中に制限されるものではなく、本願発明の蛋白質を更に種々の形態へと変換させることも可能である。例えば、蛋白質に対する種々の化学修飾、ポリエチレングリコール等の高分子との結合、不溶性担体への結合など、当業者に知られている多種の手法による加工が考えられる。また、用いる宿主によっては糖鎖の付加の有無あるいはその程度にも違いが認められる。かかる場合にあっては、細胞接着分子として機能する限りにおいて、なお、本発明の思想下にあるというべきである。

本発明の蛋白質は、抗体を作製するための抗原として使用し、あるいは該蛋白質に結合する物質や該蛋白質の活性を調節する物質のスクリーニングに使用することができ、有用である。

30

本発明のHRC12337は、上述のような形質転換細胞、特に動物細胞を培養することにより、その細胞表面に目的分子を高発現させることが可能である。一方、HRC12337の細胞外領域蛋白質フラグメントなどの適当な断片を可溶性蛋白質として製造する場合には、当該細胞外領域あるいは各ドメインをコードするDNAを用いて上述のように形質転換細胞を調製し、外形質転換細胞を培養することにより培養上清中に分泌させることにより製造することができる。

一方、HRC12337が形質転換細胞のペリプラズムまたは細胞質内に存在する場合は、適当な緩衝液に懸濁した細胞に対して、例えば超音波処理、凍結融解処理、あるいはリゾチーム処理などを行って細胞壁および/または細胞膜を破壊した後、遠心分離やろ過などの方法で本発明の蛋白質を含有する膜画分を得、さらに該膜画分を適当な界面活性剤を用いて可溶化して粗溶液を調製する。そして、当該粗溶液から定法により目的蛋白質を単離、精製することができる。

40

（hrc12337遺伝子組換え非ヒト動物）

本発明は、hrc12337遺伝子組換え非ヒト動物を提供する。hrc12337遺伝子組換え非ヒト動物には、トランスジェニック非ヒト動物およびノックアウト非ヒト動物が含まれる。hrc12337遺伝子組換え非ヒト動物は、本発明の蛋白質をコードする遺伝子を該動物の染色体上に人為的に組み込むことにより、本発明の蛋白質の発現の程度、発現時期、発現部位等が制御されることを特徴とする。非ヒト動物としては、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、マウス、ウマ、ニワトリなどが挙げられるがこれらに限定されるものではない。非ヒト動物の中でも非ヒト哺乳動物が好ましい。

50

本発明の遺伝子 h r c 1 2 3 3 7 を用いれば、トランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。該トランスジェニック非ヒト動物は、トランスジェニック動物の製造において通常使用されるような定法（例、発生工学実験マニュアル、講談社サイエンティフィック発行、勝木元也編、野村達次監修、1987年）に従って作製することができる。すなわち、本発明の遺伝子または組換えベクターを非ヒト動物の全能性細胞に導入し、この細胞を個体へと発生させ、体細胞のゲノム中に導入遺伝子が組み込まれた個体を選別する。具体的には、例えば、トランスジェニックマウスの場合には、正常 C 5 7 B l a c k / 6 マウスから取得した前核期受精卵に h r c 1 2 3 3 7 遺伝子が発現可能なように構築された D N A を直接注入する。より具体的には、適切なプロモーターの下流に h r c 1 2 3 3 7 遺伝子を接続して導入したコンストラクトを作製し、その後必要であれば原核生物由来の配列を可能な限り除去した直鎖状 D N A を得て、これを前核期受精卵前核に微細なガラス針を用いて直接注入する。

10

該受精卵を仮親として別の偽妊娠マウスの子宮に移植する。偽妊娠マウスは一般的に I C R 雌マウスを、精管を切断または結紮した雄マウスと交配して作製する。移植胚由来の仔の組織よりゲノム D N A を抽出し、P C R 法またはサザンブロッティング法にて h r c 1 2 3 3 7 遺伝子の導入の有無を確認しトランスジェニックマウスを得る。

また、h r c 1 2 3 3 7（または h r c 1 2 3 3 7 のマウス相同遺伝子）の塩基配列に基づいて、いわゆる「ノックアウトマウス」を作製することができる。本発明における「ノックアウトマウス」とは、本発明のマウス由来の蛋白質をコードする内在性遺伝子がノックアウト（不活性化）されたマウスであり、例えば相同組換えを応用したポジティブネガティブセレクション法（米国特許第 5, 4 6 4, 7 6 4 号公報、同 5, 4 8 7, 9 9 2 号公報、同 5, 6 2 7, 0 5 9 号公報、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , V o l . 8 6 , 8 9 3 2 - 8 9 3 5 , 1 9 8 9、N a t u r e , V o l . 3 4 2 , 4 3 5 - 4 3 8 , 1 9 8 9 など）を用いて作製することができ、このようなノックアウトマウスも本発明の一態様である。

20

または、最近中大動物においても核移植によるクローン動物の作出が可能となった。これに伴い本技術を用いたトランスジェニックおよびノックアウト動物の作出も実際に行われるようになった。すなわち体細胞、あるいは生殖系列の細胞に対し h r c 1 2 3 3 7（または各動物における h r c 1 2 3 3 7 の相同遺伝子）の塩基配列に基づいて、E S 細胞に対して行うのと同様に相同組換えを行い、得られた細胞から核を得て、その核を用いてクローン動物を得ることができる。該動物は h r c 1 2 3 3 7（または各動物における h r c 1 2 3 3 7 の相同遺伝子）が失われたノックアウト動物である。または、上述の方法と同様、任意の動物の任意の細胞に h r c 1 2 3 3 7（または各動物における h r c 1 2 3 3 7 の相同遺伝子）遺伝子を導入し、その核を用いてクローン動物を得る事によりトランスジェニック動物を作製する事も可能である。このようなノックアウト非ヒト動物およびトランスジェニック非ヒト動物はその種に関わらず本発明の一態様である。

30

（抗体）

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体いずれも公知方法を参考にし得ることができる（例えば、免疫実験操作法、日本免疫学会編、日本免疫学会発行、参照）。以下に簡単に説明する。

40

当該新規抗体を得るには、まず動物に、免疫抗原として本発明の蛋白質を必要に応じてフロイントの完全アジュバント（F C A）や不完全アジュバント（F I A）等の適切なアジュバントとともに接種し、必要があれば 2 ~ 4 週間の間隔で追加免疫する。追加免疫後、採血を行い、抗血清を得る。抗原として用いる本発明の蛋白質は、それが抗体の作製に使用しうる精製度のものであればいかなる方法で得られたものであってもよい。本発明の蛋白質の部分ポリペプチドも免疫抗原として好適に使用しうる。免疫抗原として使用するポリペプチドが、低分子のポリペプチド、すなわち約 1 0 ~ 2 0 アミノ酸からなるポリペプチドである場合には、それをキーホールリンペットヘモシアニン（K L H）等のキャリアと結合させて抗原として使用すればよい。免疫する動物はいかなるものであっても良いが、好ましくは通常当業者で免疫学的な実験に使用されるラット、マウス、ウサギ、ヒツジ

50

、ウマ、ニワトリ、ヤギ、ブタ、ウシ等から、目的の抗体を産生しうる動物種を選択して使用することが好ましい。

ポリクローナル抗体は、得られた抗血清を精製することによって得る事が出来る。精製は、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の公知方法を適宜組み合わせれば良い。

モノクローナル抗体を得るには以下のように行う。すなわち、免疫した動物から脾細胞もしくはリンパ球等の抗体産生細胞を採取し、ポリエチレングリコール、センダイウイルス、電気パルス等を用いる公知方法によって、ミエローマ細胞株等と融合し、ハイブリドーマを作製する。その後、本発明の蛋白質に結合する抗体を産生しているクローンを選択して培養し、その選択されたクローンの培養上清を精製することによって得れば良い。精製は、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の公知方法を適宜組み合わせれば良い。

また、遺伝子工学的な方法を用いても当該新規抗体が得られる。例えば、本発明蛋白質またはその部分ポリペプチドで免疫した動物の脾細胞、リンパ球あるいは、本発明蛋白質またはその部分ポリペプチドに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから mRNA を採取し、これをもとに cDNA ライブラリーを作成する。抗原と反応する抗体を産生しているクローンをスクリーニングし、得られたクローンを培養し、培養混合物から目的とする抗体を公知方法を組み合わせ精製することができる。抗体を治療に使用する場合には、免疫原性の点からヒト化抗体が好ましい。ヒト化抗体は、免疫系をヒトのものと入れ替えたマウス(例 Nat. Genet. 15; 146-156 (1997))を免疫することにより調製することが出来る。また、モノクローナル抗体の超可変領域を用いて遺伝子工学的に調製することもできる(Method in Enzymology 203; 99-121 (1991))。

(アンチセンス核酸)

アンチセンス核酸は、公知方法で製造することができる(例えば、Stanley T. Crooke および Bernard Lebleu 編、in Antisense Research and Applications, CRC 出版、フロリダ、1993年)。天然の DNA や RNA であれば、化学合成機を使用して合成し、あるいは hrc 12337 を鋳型として PCR 法により本発明のアンチセンス核酸を得ることができる。また、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型等、誘導体の中には化学合成機(たとえばアプライドバイオシステムズ ジャパン株式会社製、Expedite Model 8909)を使用して合成できるものもある。この場合には、化学合成機に添付されたマニュアルに従って操作を行い、得られた合成産物を、逆相クロマトグラフィー等を用いた HPLC 法により精製することによっても、アンチセンス核酸を得ることができる。

本発明の DNA やアンチセンス核酸を診断用のプローブとして使用する場合には、それらを公知の方法に従い、ラジオアイソトープ、酵素、蛍光物質、あるいは発光物質等で標識する。次に、検体から DNA もしくは mRNA を公知方法で調製し、これを被験物質として、前記標識プローブを加えて反応させた後、洗浄して未反応の前記標識プローブを除去する。被験物質中に、遺伝子 hrc 12337 もしくは RNA が含まれていれば、当該アンチセンス核酸はそれらと結合する。結合形成の有無は、標識した酵素、蛍光物質、発光物質、あるいは放射性同位元素等による発光、蛍光、放射能等を指標として知ることができる。

本発明の DNA、アンチセンス核酸または組換えベクターを医薬用途に使用する場合には、医薬品として使用するのに適した純度のものを、薬理的に許容されうる使用方法で使用することが好ましい。

本発明の DNA、アンチセンス核酸または組換えベクターは、それらを直接適当な溶媒に溶解もしくは懸濁して使用してもよいし、リポソーム中に封入したり、適当なベクターに組み込んだ形にして使用してもよい。また、必要に応じて、薬理的に許容され得る補助成分を添加し、注射剤、錠剤、カプセル剤、点眼剤、クリーム剤、座剤、噴霧剤、パップ

10

20

30

40

50

剤等適当な剤型にして使用してもよい。薬理学的に許容され得る補助成分とは、溶媒、基剤、安定化剤、防腐剤、溶解剤、賦形剤、緩衝剤等のことである。

本発明のDNA、アンチセンス核酸または組換えベクターは、上述のような剤型とした場合、患者の年齢や、性別、疾患の種類、程度に応じて、その投与方法、その投与量を設定して使用することができる。すなわち、病態を改善するのに適した量を、経口投与、あるいは、吸入、経皮投与、点眼、腔内投与、関節内投与、直腸投与、静脈内投与、局所投与、筋肉内投与、皮下投与、腹腔内投与等から適当な方法を選んで投与すればよい。

(スクリーニング方法)

本発明は、本発明の蛋白質、該蛋白質を発現している形質転換細胞、本発明のDNA、該DNAを含む組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換細胞またはhrc12337遺伝子組換え非ヒト動物を用いることを特徴とし、本発明の蛋白質の機能または発現を調節する物質、特にアンタゴニストをスクリーニング方法に関する。より具体的には、(1)被験物質の存在下/非存在下における本発明の蛋白質の活性を評価する方法、(2)被験物質の存在下/非存在下における本発明の蛋白質または遺伝子の発現レベルを比較し、本発明の蛋白質の発現を調節する物質をスクリーニングする方法などが挙げられる。(1)の例としては、実施例5に示す系において、被験物質存在下/非存在下における本発明の蛋白質の活性を測定すればよい。(2)の例としては、hrc12337遺伝子の発現制御領域、5'非翻訳領域、翻訳開始部位近傍領域または翻訳領域の一部等を含むDNAとルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子を連結した発現プラスミドを作製し、本発明の遺伝子が転写または翻訳される環境下で該レポーター遺伝子の発現量を被験物質の存在下/非存在下で測定し、被験物質の転写促進活性または転写抑制活性を確認する方法が挙げられる。本発明のスクリーニング方法は、本発明の蛋白質、該蛋白質を発現している形質転換細胞、本発明のDNA、該DNAを含む組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換細胞またはhrc12337遺伝子組換え非ヒト動物と被験物質を接触させる工程；被験物質添加群と被験物質無添加群とにおける本発明の蛋白質の活性または本発明のDNAの発現レベルに差があるかどうかを検出する工程；差が認められた被験物質を本発明の蛋白質の活性調節物質または本発明のDNAの発現調節物質として選択する工程を含み得る。本発明の蛋白質の活性を調節する作用を示す物質とは、HRC12337蛋白質の活性を模倣(ミミック)ないし増強する(アゴニスト)、あるいは阻害する(アンタゴニスト)作用を有する物質のいずれでも良いが、好ましくはアンタゴニストである。本発明のDNAの発現調節作用を示す物質とは、遺伝子hrc12337の発現を促進あるいは抑制する作用を有する物質のいずれでもよいが、好ましくは抑制する作用を有する物質である。被験物質が本発明の蛋白質の活性調節作用または本発明のDNAの発現調節作用を示すかどうかは、蛋白質の活性を確認できる系またはDNAの発現を確認できる系に被験物質を添加した場合と無添加の場合の蛋白質の活性またはDNAの発現レベルに差があるかどうかを調べればよい。DNAの発現レベルとは、hrc12337遺伝子のmRNAの発現強度、蛋白質の発現強度のいずれにより検出しても良い。また、hrc12337遺伝子またはHRC12337蛋白質自体の発現レベルではなく、代替としてレポーター遺伝子の発現レベルを検出しても良い。レポーターアッセイ系は、転写調節領域の下流に配置したレポーター遺伝子の発現量を指標として、該転写調節領域に作用する物質をスクリーニングするアッセイ系をいう。転写調節領域としては、プロモーター、エンハンサー、通常プロモーター領域に見られるCAATボックス、TATAボックス等を例示することができる。またレポーター遺伝子としては、CAT(chloramphenicol acetyltransferase)遺伝子、ルシフェラーゼ(luciferase)遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ(β -galactosidase)遺伝子等を利用することができる。本発明の遺伝子の発現制御領域や5'非翻訳領域は公知の方法で取得することが可能である(新細胞工学実験プロトコール(秀潤社)、1993年)。阻害(または抑制)する作用を有する、あるいは増強(または促進)する作用を有するとは、蛋白質の活性またはDNAの発現レベルの測定値が、被験物質添加群と、被験物質無添加群との間に差があることをいう。たとえば、下記の式で計算される

10

20

30

40

50

阻害（または抑制）率あるいは増強（または促進）率が10%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは50%以上、更に好ましくは70%以上、特に好ましくは90%以上であることをいう。

阻害（または抑制）率あるいは増強（または促進）率 = (被験物質無添加群の測定値 - 被験物質添加群の測定値) の絶対値 / 無添加群の測定値 * 100

ここで、阻害または増強のどちらの活性であるかについて、および測定値については蛋白質の活性を確認できる系またはDNAの発現を確認できる系の種類によって適宜定められる。たとえば、蛋白質の活性を確認できる系が実施例5に示すシアル酸含有糖鎖結合活性の測定系の場合には、測定値としてはrosettesの形成レベルを用いることができ、被験物質添加群の測定値 < 被験物質無添加群の測定値となる場合、被験物質にはHRC12337蛋白質活性阻害作用があるといえる。また蛋白質の活性を確認できる系が実施例10に示す混合リンパ球反応におけるIL-2産生の測定系の場合には、測定値としてはIL-2産生量を用いることができ、被験物質添加群の測定値 < 被験物質無添加群の測定値となる場合、被験物質にはHRC12337蛋白質活性阻害作用があるといえる。測定系にバックグラウンドやノイズの値が含まれる場合には、そのようなものを差し引いた値を測定値とすることは言うまでもない。

本発明である蛋白質は、細胞接着分子であることから、上述のスクリーニング方法あるいはトランスジェニック動物を用いた探索を通じて得られる化合物等は、自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー性疾患、炎症性疾患等に対する有効な治療薬または予防薬となることが期待される。被験物質としては蛋白質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、合成化合物、天然由来化合物、醗酵生成物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられるがこれに限定されず、新規物質でも公知物質でもよい。

< 本発明の抗体を用いる測定法、試薬、キット >

本発明は、(1) 本発明の抗体を用いることを特徴とする、被験試料中のHRC12337蛋白質の測定方法、(2) 本発明の抗体を含有すること特徴とする、被験試料中のHRC12337蛋白質を測定するための試薬またはキット、(3) ヒト体液中のHRC12337蛋白質量の増加または減少を測定し、HRC12337の機能異常、それらを伴う疾患または該疾患に付随する病態の予知、検出または診断に用いる(1)に記載のHRC12337蛋白質の測定方法、(4) 前記疾患が花粉症、アトピー性皮膚炎および血管炎より選ばれる少なくとも1つの疾患である(3)に記載の測定方法を提供する。

本発明の測定方法は、本発明の抗体を用いるステップを含むが、該ステップは、対象試料中の被験物質であるHRC12337蛋白質と、本発明の抗体との抗原抗体反応による、対象試料中の被験物質をトラップする工程であることが好ましい。本発明の測定方法における被験物質の検出原理は特に限定されないが、凝集法、サンドイッチ法、固相直接法または固相結合法、競合法等が例示される。この内、サンドイッチ法及び競合法が好ましく、特にサンドイッチ法が好ましい。凝集法では、抗体を粒子、例えばラテックス粒子や赤血球（例えば羊赤血球）の表面に結合させて、HRC12337蛋白質が存在すると粒子の凝集が生じるようにし、この粒子の凝集の程度を指標としてHRC12337蛋白質を測定する。

なお、この凝集法では、ラテックスや赤血球以外にも、ゼラチンやマイクロビーズ、カーボン粒子等、一般に用いられている粒子を使用することができる。また、サンドイッチ法、固相直接法または固相結合法、競合法では、標識された抗体や抗原を使用し、エンザイムイムノアッセイ(EIA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、ケミルミネッセンスイムノアッセイ(化学発光免疫測定法)、フルオロイムノアッセイ(蛍光免疫測定法)、時間分解蛍光免疫測定法(TR-FIA)、イムノクロマトグラフィアッセイ(ICA)等の原理で測定を行なうことができる。

以下に、本発明の測定方法の好適例の1つである、EIAの原理に基づく、サンドイッチ法、固相直接法、競合法を説明する。EIAによるサンドイッチ法では、まず、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ等の酵素で標識した、HRC12337蛋白質を認識する抗体または二次抗体を準備する。特にポリペルオキシダー

10

20

30

40

50

ゼ標識した抗体は好ましい例である。また、使用する固相には、HRC12337蛋白質を認識する抗体を吸着させておく。サンプル(試料)もしくはスタンダードを添加後、上述の酵素標識抗体を添加し、抗原抗体反応を行なわしめる。過剰の酵素標識抗体を洗浄操作で除去した後、使用する酵素に応じた発色基質、例えばオルトフェニレンジアミンと H_2O_2 、p-ニトロフェニルリン酸、2-ニトロフェニル-D-ガラクトシド等を加えて酵素と反応させる。基質の発色は、酵素量、ひいてはサンプル中のHRC12337蛋白質に依存するので、発色最終産物の量を測定することによりHRC12337蛋白質を定量することができる。

固相直接法では、サンプル(試料)を直接固相に吸着させ、固相のHRC12337蛋白質非吸着面を、その測定系には影響しないタンパク質、例えばBSA(ウシ血清アルブミン)などでブロッキング処理し、次いでHRC12337蛋白質を認識する酵素標識抗体を添加し、反応させる。以降は、サンドイッチ法と同様の操作を行ない、サンプル中のHRC12337蛋白質の有無を判定するか定量を行う。

競合法では、使用する抗体が認識する一定量のHRC12337蛋白質を直接固相に吸着させ、次いでブロッキング処理した後、ここに、HRC12337蛋白質を認識する酵素標識抗体とサンプル(試料)とを添加する。一定時間反応させた後、洗浄して固相に非結合の物質を除去し、発色基質を加えて酵素と反応させる。反応後、サンプル添加による、酵素標識抗体の固相HRC12337蛋白質への結合阻害度を測定することにより、サンプル中のHRC12337蛋白質を定量する。

なお、はじめに抗体を固相に吸着させ、酵素標識したHRC12337蛋白質をサンプルと同時に添加し、サンプル添加による標識物の固相化抗体への結合阻害度を測定することにより、サンプル中のHRC12337蛋白質を定量してもよい。

上記以外の方法として、抗原抗体反応を液相中で行ない、後に、抗体を用いた凝集沈降法もしくは物理化学的手法によって、標識抗体と結合したHRC12337蛋白質と結合しなかったHRC12337蛋白質を分離し定量する方法もある。また、HRC12337蛋白質を認識する抗体を標識するのではなく、その抗体を認識する二次抗体を得、それを標識し、抗原抗体反応を行なわせて、HRC12337蛋白質を測定することも可能である。

サンドイッチ法、固相直接法、競合法のいずれにおいても、標識酵素-発色基質の組合せを、標識酵素-生物発光基質または化学発光基質、標識酵素-蛍光基質等の組合せに変えることが可能である。この場合の、酵素-発光基質の代表的な組合せは、アルカリフォスファターゼ-AMP-PD、ホースラディッシュペルオキシダーゼ-ルミノール、ルシフェラーゼ-ルシフェリン等があり、酵素-蛍光基質の代表的な組合せは、アルカリフォスファターゼ-ウンベリフェリルフォスフェート、ホースラディッシュペルオキシダーゼ-p-ヒドロキシフェニルプロピオン酸等がある。

さらに、上記3種の測定方法において、酵素に代わって、放射性物質や化学発光物質あるいは蛍光物質で直接あるいは間接的に標識された抗体や抗原を用い、放射能や発光、蛍光の強度を測定することにより、サンプル中のHRC12337蛋白質を測定することも可能である。

放射性物質としては、 ^{125}I や ^{131}I 等が一般に使用されており、化学発光物質の代表的な物には、アクリジニウムエステル等がある。また、蛍光強度を測定する場合には、より高感度な方法として、抗体あるいは抗原にキレート剤を直接あるいは間接的に結合させ、励起光照射後にそのキレート剤に結合する希土類金属から発せられる蛍光の強度を時間分解的に測定することにより、試料中のHRC12337蛋白質を測定する方法(時間分解蛍光免疫測定法)も有用である。なお、代表的な希土類金属の例として、ユーロピウムがあげられる。

本発明の測定方法は、以上説明したように、試料中のHRC12337蛋白質を検出または測定することを目的としている。この場合、被験試料は動物、特にヒトの体液あるいは、組織、細胞および菌体ならびにそれらの抽出液、培養上清、塗末標本および切片があげられるが、体液であることが好ましい。より好ましくは、血液、血漿、血清、尿、髄液、

10

20

30

40

50

リンパ液、唾液、腹水、胸水より選ばれる試料である。

本発明の測定方法を用いて健常人及び種々の疾患を有する患者の体液中のHRC12337蛋白質を測定することができる。また、初めて体液中のHRC12337蛋白質濃度が明らかとなり、特定の疾患においてHRC12337蛋白質濃度が変動することも明らかとなった。健常人及び種々の疾患を有する患者の体液中のHRC12337蛋白質の濃度を比較する際には、当業者が通常用い得る統計学的手法を用いて両者の測定値に差があるか否かを判断すればよい。

なお、本発明の測定試薬及びキットは、上記した測定方法の構成等に準拠することができる。

実施例

以下の実施例により本発明を更に詳述するが、本発明はこれら実施例に限定して理解されるべきものではない。

実施例1 遺伝子hrc12337のクローニング

(1) オリゴキャップ法による完全長cDNAライブラリーの作製

ヒト腎皮質上皮細胞よりSambrookらの方法(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.)に従い、オリゴdTセルロースを用いてポリ(A)⁺RNAを調製した。次に5-10 μ gのポリ(A)⁺RNAを、100mMのTris-HCl(pH8.0)、5mMの2-メルカプトエタノール及び100UのRNasin(Promega)を含む緩衝液中で、1.2UのBacterial Alkaline Phosphatase(以下BAPと略する)(Takara)と37 $^{\circ}$ で40分間反応させ、キャップ構造を持たないポリ(A)⁺RNAの脱リン酸化を行った。その後、フェノール：クロロホルム=1：1の混合液にて反応液を2回抽出し、ポリ(A)⁺RNAをエタノール沈殿として回収した。回収したポリ(A)⁺RNAは、50mMの酢酸ナトリウム(pH5.5)、1mMのEDTA、5mMの2-メルカプトエタノール及び100UのRNasinを含む緩衝液中で20UのTobacco acid pyrophosphatase(以下TAPと略する)(Maruyama and Sugano, Gene vol. 138, 171-174)にて37 $^{\circ}$ で45分間処理し、キャップ構造の除去を行った。その後、フェノール：クロロホルム=1：1の混合液にて反応液を2回抽出して、エタノール

沈殿を行い、BAP-TAP処理済ポリ(A)⁺RNAを回収した。この回収したポリ(A)⁺RNA 2-4 μ gを0.4 μ gの5オリゴマー(5'-AGC AUC GAG UCG GCC UUG UUG GCC UAC UGG-3')とライゲーション反応を行った。この反応は50mMのTris-HCl(pH7.5)、5mMのMgCl₂、5mMの2-メルカプトエタノール、0.5mMのATP、25%のPEG8000及び100UのRNasinを含む緩衝液中で、250UのRNAリガーゼ(Takara)を用いて20 $^{\circ}$ で3-16時間行った。その後、未反応のオリゴマーを除去してcDNA合成を行った。すなわち、2-4 μ gのオリゴキャップポリ(A)⁺RNAを10pmolのdTアダプタープライマー(5'-GCG GCT GAA GAC GGC CTATGT GGC CTT TTT TTT TTT TTT TTT-3')と混合し、SuperScript II RNase H⁻Reverse Transcriptase(GibcoBRL)を用い、添付の緩衝液中で42 $^{\circ}$ 、1時間反応させた。

鋳型のRNAを除去するために15mMのNaOHを用いて65 $^{\circ}$ で1時間反応させた後に、cDNAの増幅操作を行った。1 μ gのオリゴキャップポリ(A)⁺RNAより合成されたcDNAを16pmolのセンスプライマー1(5'-AGC ATC GAG TCG GCC TTG TTG-3')及びアンチセンスプライマー1(5'-GCG GCT GAA GAC GGC CTA TGT-3')と混合し、XL PCR kit(Perkin-Elmer)を用いて増幅した。この際のPCR反応の条件は、94 $^{\circ}$ で1分間、58 $^{\circ}$ で1分間、72 $^{\circ}$ で10分間のサイクルを5-10回行った。P

10

20

30

40

50

C R産物をフェノール：クロロホルム = 1 : 1の混合液にて抽出し、エタノール沈殿として回収した。その後、回収物を S f i I で消化し、アガロースゲル電気泳動にて 1 0 0 0 b p 以上の c D N A を分離し、哺乳動物細胞発現ベクターである p M E 1 8 S - F L 3 (G e n B a n k a c c e s s i o n N o . A B 0 0 9 8 6 4) の D r a I I I サイトに挿入した。尚、p M E 1 8 S - F L 3 の D r a I I I サイトは非対称性となっており、c D N A 断片の末端にはこれと相補的な S f i I サイトとなっているため、挿入した c D N A 断片は一方向性に挿入されている。

(2) c D N A クローン塩基配列及びその推定蛋白質情報の解析

(1) の方法で作製した c D N A ライブラリーより、P I - 1 0 0 口ポット (K U R A B O) を用いてプラスミドを調製し、各クローンの塩基配列を確認し、データベース化した。塩基配列決定は、A u t o C y c l e s e q u e n c i n g k i t (A m e r s h a m P h a r m a c i a) と R . O . B . D N A p r o c e s s o r (A m e r s h a m P h a r m a c i a) を用い添付のプロトコールに従ってシーケンス反応を行い、A L F D N A s e q u e n c e r (A m e r s h a m P h a r m a c i a) により行った。 10

(1) に記載の方法で取得したクローン C - H R C 1 2 3 3 7 には、配列番号 2 で表される 3 2 8 個のアミノ酸からなる新規な蛋白質をコードする、配列番号 1 で表される 9 8 4 塩基の塩基配列からなるオープンリーディングフレーム (O R F) を含む、全長 1 5 2 3 塩基対の塩基配列 (配列番号 3) からなる c D N A が含まれていた。このプラスミド C - H R C 1 2 3 3 7 は、国際微生物寄託機関である独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に、平成 1 3 年 (2 0 0 1) 2 月 1 4 日付にて受託番号 F E R M B P - 7 8 8 2 として寄託されている。 20

(3) c D N A クローン及びその推定蛋白質の相同性解析

相同性の検索には B L A S T (J M o l E v o l 3 6 ; 2 9 0 - 3 0 0 (1 9 9 3) 、 J M o l B i o l 2 1 5 ; 4 0 3 - 1 0 (1 9 9 0)) を用いて、局所的な配列の一致を検索した。

C - H R C 1 2 3 3 7 完全長 c D N A 配列から推定される蛋白質配列を相同性検索をおこなう b l a s t p プログラムを用いて G e n b a n k 蛋白質データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に対し B L A S T 相同性検索を行った。1 9 9 残基にわたりヒト C D 3 3 a n t i g e n (G e n B a n k A c c e s s i o n : N P _ 0 0 1 7 6 3) との相同性が 4 3 % 、 2 6 0 残基にわたりヒト D - s i g l e c p r e c u r s o r (G e n B a n k A c c e s s i o n : N P _ 0 5 7 6 2 7) との相同性が 4 0 % 、 2 6 0 残基にわたりヒト Q A 7 9 m e m b r a n e p r o t e i n (G e n B a n k A c c e s s i o n : C A B 5 1 1 2 7) との相同性が 4 0 % 、 2 0 1 残基にわたりヒト s i a l i c a c i d b i n d i n g I g - l i k e l e c t i n - 5 (G e n B a n k A c c e s s i o n : A A D 5 0 9 7 8) との相同性が 4 3 % みられた。 30

さらに推定された蛋白質配列と相同性検索から得られた蛋白質配列 (G e n B a n k A c c e s s i o n : N P _ 0 0 1 7 6 3 、 N P _ 0 5 7 6 2 7 、 C A B 5 1 1 2 7 、 A A D 5 0 9 7 8) をマルチプルアライメントプログラム C l u s t a l W (N u c l e i c A c i d s R e s . 2 2 ; 4 6 7 3 - 8 0 (1 9 9 4)) を用いて多重整列した結果を第 2 図に示す。 40

モチーフとは実験などから同定された機能部位 (例えば、酵素などの活性部位やリガンドやエフェクターなどの結合部位、リン酸化などの修飾部位) のコンセンサス配列として記述されたもので、特に重要な機能部位は進化的にも保存されるケースが多いことから、ある機能を発現する蛋白質に特徴的に現れる保存配列、さらには類縁蛋白質ファミリーを特徴づける指標としても用いられる。このように、モチーフを検索することでホモロジー検索に比べてより直接的に機能に結びついた解釈が期待できる。

モチーフデータベースである P R O S I T E データベース (<http://www.expasy.ch/prosite/>) ではモチーフを、「コンセンサス配列をパターンで 50

標記」又は、「出現頻度などに基づくスコアをモチーフ内の各位置に対して各アミノ酸ごとに行列であらわしたプロファイルで標記」している。

推定される蛋白質配列の機能について、PROSITEデータベースに対しパターン検索した結果、172番目および、312番目のアスパラギンが糖鎖結合部位であるモチーフがみられた。

隠れマルコフモデルを用いた相同性検索プログラムであるHMMER (R. Durbin, S. Eddy, A. Krogh, G. Mitchison. Cambridge University Press (1998))を用いて蛋白質ドメインデータベースであるPfam (<http://www.sanger.ac.uk/Pfam/>)に検索を実施した結果、有為な相同性のあるドメインとしてアミノ酸番号57から144番目および187から239番目、にImmunoglobulin domain [Pfam Accession: PF00047]が見出された。 10

重み行列を用いた膜貫通予測プログラムtmap (J Mol Biol. 237; 182-92 (1994))により膜貫通ヘリックスの予測をおこなったところ、255番目から283番目のアミノ酸残基の29残基において膜貫通領域が予測された。またSOSUI programでは、263番目から285番目のアミノ酸残基に膜貫通領域が予測された。

重み行列を用いたシグナルペプチド切断部位予測プログラムsigcleave (Nucleic Acid Research. 14; 4683-4690 (1986))によりシグナルペプチドの予測をおこなったところ、7番目から20番目のアミノ酸残基の14残基においてシグナルペプチドが予測された。またSOSUI programでは、3番目から22番目のアミノ酸配列においてシグナルペプチドが予測された。 20

実施例2 PCRによる発現プロファイルの確認

Real time PCR (Journal of Clinical Microbiology 38; 586-590 (2000))は外部研究機関に委託し、以下の手法で行った。

ヒト冠動脈内皮細胞 (HCAEC) 及びヒト白血球、ヒト胎盤組織から定法によりtotal RNAを調製した。また、白血球を5 µg/mlのPHAにて24時間白血球を刺激した後にtotal RNAを定法により調製した。さらにヒトの肺、腎臓、膵臓、肝臓、大腸、小腸、胸腺、脾臓、心臓、子宮、精巣、前立腺、骨格筋、脳のtotal RNAについてはクローンテック社より購入した。次に、各total RNA 1-2 µgよりオリゴdTプライマーを用いて1本鎖cDNAの合成を定法に従って行った。逆転写酵素としてはSuperScript IIRNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen社)を用いた。これらの合成したcDNAを鋳型にReal time PCRを行い、hrc12337のmRNAの発現について確認した。Real time PCRはLight Cycler (ロッシュ・ダイアグノスティクス社)を用いてプロトコルに従って行った。伸長用のプライマーとしてはセンス側のプライマー (5' - CAC CAA CAT CCA TTT CAG C - 3') 及びアンチセンス側のプライマー (5' - ATG GTT GTC CAC A TA GGA GG)を用いた。また、ハイブリダイゼーションプローブとして5'端をRed 640標識した20merよりなるオリゴマー (5' - TGT GCC AGC CAA GCC TCG - 3') 及び3'端をFITC標識した20merよりなるオリゴマー (5' - TGC CCG AGA ACC AGG ACT GG - 3')を用いた。その結果、脾臓、PHA刺激白血球、子宮及び精巣でhrc12337の発現が確認でき、特にPHA刺激白血球でその発現が高かった (第4図)。 30 40

実施例3 HRC12337蛋白質の発現

(1) 可溶型HRC12337蛋白質の発現

可溶型のHRC12337蛋白質として、細胞外ドメインのC端側にHisタグを結合したキメラ蛋白質の発現を行った。発現プラスミドは下記の方法で構築した。まず、センスプライマー (5' - CGT TAC AGA TCC AAG CTC TG - 3') とア 50

ンチセンスプライマー (5' - CCG CTC GAG CCA GGT AGA CG C TGG CCT C - 3') を設計し、C - HRC12337 を鋳型にし、Pyrobest DNA Polymerase (TAKARA) により98 で10秒、55 で30秒、72 で1分30秒のサイクルを25回繰り返して、PCR反応を行った。得られた約1.1kbのPCR産物をXhoIにて消化し、アガロースゲル電気泳動にて約0.9kbのDNA断片を回収した。またpcDNA3.1(+)/Myc-HisCをXhoIにて消化した後に、脱リン酸化を行った。このベクターDNAと前述のPCR断片をligationし、定法に従いコンピテンとセルJM109をtransformationしてHRC12337-His tag protein発現プラスミドを構築した。

10

得られたプラスミド12.5μgをFuGENE6 (ロシュ・ダイアグノスティックス社) 50μlと添付プロトコールに従い混合し、150cm² フラスコにセミコンフルエントに増殖したCOS-1細胞に添加した。5%CO₂、37 の条件下で72時間培養した後に、上清を回収した。その後His Trap Kit (アマシャムファルマシアバイオテク社) を用い、バイオ基礎実験攻略ガイド 2000-2001 (アマシャムファルマシアバイオテク社) に従い、HRC12337蛋白質-His tag protein (以下、HRC12337-Hisと呼ぶ場合がある) を精製した。HRC12337-Hisのアミノ酸配列を配列番号6に示す。

(2) 全長HRC12337蛋白質の発現

C - HRC12337プラスミドを下記の方法でCOS細胞に導入し、全長蛋白質の発現を行った。

20

FuGENE6 (ロシュ・ダイアグノスティックス社) 50μlを上記プラスミドDNA 12.5μgと添付プロトコールに従い混合し、150cm² フラスコにセミコンフルエントに増殖したCOS細胞に添加した。5%CO₂、37 の条件下で72時間培養した後に、HRC12337蛋白質発現細胞を回収し、実施例5に示す活性測定アッセイに供した。

(3) HRC12337-Fcの作製

HRC12337蛋白質の細胞外ドメインとヒトIgG Fcフラグメントとのキメラ(融合)蛋白質を生産した。HRC12337蛋白質の細胞外ドメインとヒトIgG Fcフラグメントのキメラ蛋白質であるHRC12337-Fcの発現プラスミドは以下の方法で構築した。センスプライマー(5' - CGT TAC AGA TCC AAG C TC TG - 3') 及びアンチセンスプライマー(5' - CGC GGA TCC CAG GTA GAC GCT GGC CT - 3') を合成し、C - HRC12337を鋳型にPyrobest DNA Polymerase (TAKARA) により98 で10秒、55 で30秒、72 で1分のサイクルを25回繰り返して、PCR反応を行った。得られた約1.1kbのPCR産物をEcoRI及びBamHIにて消化し、アガロースゲル電気泳動にて約0.9kbのDNA断片を回収した。また再公表WO97/42319に記載のpM1304をEcoRI及びBamHIにて消化し、前述のDNA断片をライゲーションした。コンピテンセルHB101 (TAKARA) を形質転換して定法に従いHRC12337-Fc発現プラスミドを調製した。得られた発現プラスミドは、以下の方法でCOS細胞に導入した。即ち、FuGENE6 (ロシュ・ダイアグノスティックス社) 50μlと上記各プラスミドDNA 12.5μgとを添付プロトコールに従い混合し、150cm² フラスコにセミコンフルエントに増殖したCOS細胞に添加した。5%CO₂ 存在下、37 で3日間培養した後に培養上清を回収した。培養上清に含まれるHRC12337-FcはProteinAカラムを用いて精製した。精製HRC12337-FcをSDS-PAGE電気泳動後、抗Fc抗体(パーオキシダーゼ標識抗ヒトIgA, IgG, IgM, Kappa, Lambda抗体; DAKO)を用いてウエスタンブロッティングにて検出した。HRC12337-Fcのアミノ酸配列を配列番号7に示す。

30

40

実施例4 抗HRC12337抗体の作製

50

(1) HRC 12337の部分ペプチドの調製

HRC 12337に対する抗体を作製するため、Chou-Fasman及びRobsonの2次構造予測プログラムを用いて蛋白質の表面上に露出されていると予想されるペプチド配列を解析した。その結果、N末のアミノ酸のうち24番目から39番目の配列(KIDTTENLLNTEVHSS)は親水性が高く、ヘリックスを含む構造であり免疫が可能と判断した。また、64番目から75番目の配列(CTFTHPHRHYDG)、121番目から142番目の配列(RRNDLSLRVERLALLADDRRYFC)は中に一部ターン構造を有するコンベクション構造を取ることが予想されたため、蛋白質表面に露出されているものと推定し、免疫が可能と判断した。KIDTTENLLNTEVHSSのペプチドはキャリア蛋白と結合するため、C端にシステインを結合した配列とした。ペプチドの合成はABI432Aペプチド合成機(アプライドバイオシステムズ社)を用いて行い、定法により樹脂よりペプチドの切り出し脱保護を行い、C18逆相HPLC(CAPCELL-PAK、資生堂)を用いて精製した。

10

(2) HRC 12337のペプチドキャリア抗原の調製

合成したペプチドを蒸留水で10mg/mLに溶解し、10mg/mLのマレイミド化キールホルリンペットヘモシアニン(PIERCE)と等量混合した。室温で2時間反応後、NAP-10カラム(ファルマシア)で脱塩した。蛋白濃度は使用したKLH量を液量で割ったものを用いた。

(3) ペプチド抗体の作製

調製した各ペプチドキャリア抗原20μgを100μLの生食に溶解し、フロインド完全アジュバント(DIFCO)と等量混合した。BALB/cマウス5週齢メスの腹腔に投与し、2週間後ペプチドキャリア抗原20μgを100μLの生食に溶解し、フロインド不完全アジュバント(DIFCO)と等量混合し同様に腹腔に投与した。また、各ペプチドキャリア抗原100μgを100μLの生食に溶解し、フロインド完全アジュバント(DIFCO)と等量混合し、Wistarラット8週齢メスの各後足フットパッドに100μLづつ投与した。マウスは2回目投与1週間後、ラットは初回投与2週間後に眼底より採血を行い抗体価の上昇をウエスタンブロッティングにより確認した。すなわち精製HRC 12337-Hisを4-20%SDS-ポリアクリルアミドゲル(TEFCO)にて泳動し、ミリポア社の方法にしたがってPVDF膜に転写した。転写後5%スキンミルク、0.05%Tween20を含む0.076Mリン酸緩衝液(pH6.4)(以下PBSと記載)にてブロッキングを行った。採血した抗血清を0.5%BSA、0.05%Tween20を含む0.076Mリン酸緩衝液(pH6.4)で500倍に希釈し転写したPVDF膜と4で一夜反応させた。メンブレンを0.05%Tween20を含むPBS(pH6.4)で3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(DAKO)又はペルオキシダーゼ標識抗ラットIgG抗体(DAKO)を0.5%BSA、0.05%Tween20を含むPBS(pH6.4)で500倍に希釈しメンブレンと室温で1時間反応させた。メンブレンを同様に3回洗浄後、化学発光試薬ECL(アマシャム)で検出した。その結果、約37kDa付近にバンドが検出され抗体価の上昇が確認された。抗体価の上昇した個体のうち、特に力価が高かった24番目から39番目の配列(KIDTTENLLNTEVHSS)を投与したラットより腸骨リンパ節を摘出し細胞融合を行った。すなわち、リンパ節よりセルストレイナー(ファルコン)を用いてリンパ球を分離し、ミエローマ細胞(Sp2/O-Ag14)と混合後、ポリエチレングリコールを用いて安東民衛・千葉丈/著「単クローン抗体実験操作入門」83ページ、1991年(講談社)にしたがって細胞融合を行った。HAT培地によりハイブリドーマを選択し、1週間後目的の抗体を産生しているハイブリドーマのスクリーニングを行った。また、抗体価の上昇したマウスは最終投与を行い、3日後脾細胞よりリンパ球を分離し、Sp2/O-Ag14と混合後、ポリエチレングリコールを用いて安東民衛・千葉丈/著「単クローン抗体実験操作入門」(講談社)にしたがって細胞融合を行った。HAT培地によりハイブリドーマを選択し、1週間後目的の抗体を産生しているハイブリドーマのスクリーニングを行った。また、マウスは腹腔に抗原100μgを最終投与投

20

30

40

50

与し、3日後、脾臓を摘出した。脾臓よりリンパ球を分離し、P3×63-Ag.8.U・1と10:1で混合しポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行った。HAT培地によりハイブリドーマを選択し、1週間後目的の抗体を産生しているハイブリドーマのスクリーニングを行った。その結果、HRC12337と反応したウエルを限界希釈法によりクローニングした。

スクリーニングは0.01M炭緩衝液(pH9.5)で精製HRC12337-Hisを1μg/mLに希釈し、イムノプレート(Maxisorb、NUNC)に50μL/ウエル添加した。37にて1時間反応後イオン交換水で5回洗浄し、0.5%BSAを含むPBS(pH6.4)を各ウエルに100μL添加しブロッキングを行った。次に培養上清を各ウエルに添加し37で1時間反応させた後、0.05%Tween20を含む生理食塩水で3回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体(DAKO)又はペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体(DAKO)を10%ウサギ血清を含むPBS(pH6.4)で1000倍に希釈し各ウエルに50μL添加した。37で1時間反応後、同様に5回洗浄し0.01%過酸化水素を含むテトラメチルベンジジン溶液を各ウエルに添加した。室温で10分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止し、プレート分光光度計(NJ-2100、日本インターメッド)で450nmの吸光度を測定した。その結果、HRC12337-Hisと反応した細胞を選択し、限界希釈法によりクローニングを行った。10日後、同様にスクリーニングを行い、マウスからはHRC12337-Hisと反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ5クローン(F1105-1~5)を得た。また、ラットからはHRC12337-Hisと反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ2クローン(F1114-1-2、F1114-4-1)を得た。選択したハイブリドーマを10%FCS/RPMI-1640培地(GIBCO)で培養後、Hybridoma-SFM培地(GIBCO)で培養し抗体を産生させ、Prosep-A又はProsep-Gカラム(ミリポア)を用いて抗体を精製した。得られた抗体のうち、特に反応性の高いF1114-1-2抗体のサブタイプをZYMED社のラットタイピングキットを用いて決定したところサブタイプはIgG2bであった。

(4) ポリクローナル抗体の作製

HRC12337蛋白質に対するウサギポリクローナル抗体を作製するため、調製した各ペプチドキャリア抗原をそれぞれ各40μgずつ混合し、さらにフロインド完全アジュバント(DIFCO)と等量混合し、ニュージーランド白色ウサギ(北山ラベス)メス、2.0-2.49kgの背部皮内に1mL投与した。2週間後、抗原をフロインド不完全アジュバント(DIFCO)と等量混合し、同様に投与した。1週間後耳静脈より採血し抗血清を調製した。また、同様に精製したHRC12337を30μg/bodyで複数回投与し、抗血清を作製した。得られた抗血清を(3)に記載のHRC12337-His固定化プレートを用いて抗体価の上昇を確認したところ抗体価の上昇はわずかに認められるものの、免疫組織染色、免疫測定等に使用できるほど高い力価ではなかった。HRC12337が哺乳動物においてホモロジーが高く、抗原性が低いことが抗体価の上昇を抑制している原因として考えられたことから、ヒト、ウサギ等の哺乳動物と種が遠く離れているニワトリを用いて抗体の作成を試みた。投与抗原としては実施例3に記載の抗原性が強いヒトのガンマーグロブリンのFcを結合した融合蛋白質HRC12337-Fcを用い、ニワトリの免疫はサワディーテクノロジー株式会社に依頼した。投与開始から60日後にニワトリを全採血し、抗血清を得た。しかしながら同様に抗体価を測定したところ、免疫組織染色、免疫測定等に使用できるほど高い力価の抗体は得られなかった。

(5) 抗HRC12337モノクローナル抗体の作製

BALB/cマウス(メス、6週令)の腹腔に精製したHRC12337蛋白質(HRC12337-His又はHRC12337-Fc)20μgをフロインド完全アジュバント(DIFCO)と等量混合して投与した。初回投与2週間後に抗原20μgを生食に溶解し、フロインド不完全アジュバント(DIFCO)と等量混合後腹腔に投与した。1週間後、抗体価の上昇を実施例2記載の方法により確認し最終投与を行った。マウスの腹腔

10

20

30

40

50

に抗原 100 μ g を投与し、3 日後、脾臓を摘出した。脾臓よりリンパ球を分離し、P3 \times 63 - Ag . 8 . U . 1 と 10 : 1 で混合しポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行った。HAT 培地によりハイブリドーマを選択し、1 週間後目的の抗体を産生しているハイブリドーマのスクリーニングを行った。(3) に記載の方法により抗 HRC 12337 抗体産生ウエルのスクリーニングを行い、HRC 12337 と反応したウエルを限界希釈法によりクローニングした。再度スクリーニングを行い抗 HRC 12337 モノクローナル抗体 (F1144 - 1 - 1 ~ 10) 10 種類を得た。ハイブリドーマを 10% FCS / RPMI - 1640 培地 (GIBCO) で培養後、Hybridoma - SFM 培地 (GIBCO) で培養し抗体を産生させ、Prosep - A カラム (ミリポア) を用いて抗体を精製した。しかしながら同様に抗体価を測定したところ、免疫組織染色、免疫測定等に使用できるほど高い力価の抗体は得られなかった。

また、ラットモノクローナル抗体は以下のように作製した。まず、HRC 12337 - Fc 蛋白質 100 μ g を 100 μ L の生食に溶解し、フロインド完全アジュバント (DIFCO) と等量混合し、Wistar ラット 8 週齢メスの各後足フットパッドに 100 μ L づつ投与した。2 週間後、腸骨リンパ節を摘出し細胞融合を行った。すなわち、リンパ節よりセルストレイナー (ファルコン) を用いてリンパ球を分離し、ミエローマ細胞 (Sp2/O - Ag14) と混合後、ポリエチレングリコールを用いて安東民衛・千葉丈ノ著「単クローン抗体実験操作入門」83 ページ、1991 年 (講談社) にしたがって細胞融合を行った。HAT 培地によりハイブリドーマを選択し、1 週間後目的の抗体を産生しているハイブリドーマのスクリーニングを行った。

スクリーニングは HRC 12337 - His 蛋白質を直接プレートに固定化する (3) に記載の ELISA 法で行った。その結果、HRC 12337 蛋白質と反応する抗体を産生しているハイブリドーマを含むウエルを選択し、限界希釈法によりクローニングを行った。10 日後、HRC 12337 蛋白質と結合する抗体を産生するハイブリドーマを同様にスクリーニングした。その結果、HRC 12337 蛋白質と結合するラットモノクローナル抗体 F1133 を得た。ハイブリドーマを 10% FCS / RPMI - 1640 培地 (GIBCO) で培養後、Hybridoma - SFM 培地 (GIBCO) で培養し抗体を産生させ、Prosep - G カラム (Bioprocessing) を用いて抗体を精製した。

実施例 5 HRC 12337 のシアル酸含有糖鎖結合活性の確認

実施例 3 で調製した組換え HRC 12337 発現 COS 細胞をヒト赤血球と DMEM + 0.2% BSA 中で 37 $^{\circ}$ C 1 時間インキュベートしたのち、結合しなかった赤血球を洗浄して除き、残った細胞を 0.25% glutaraldehyde で固定し COS 細胞と赤血球の結合を観察した。対照群として、組換え HRC 12337 を発現しない COS 細胞を用意し、同様に処理した。その結果、組換え HRC 12337 発現細胞群では対照群に比較して、顕著な rosettes の形成が認められた。

実施例 6 サンドイッチ ELISA 系の作製

F1133 抗体固相 / ペルオキシダーゼ標識 F1114 - 1 - 2 抗体を用いて以下のようにサンドイッチ ELISA 系を作製した。まず、中根らの方法 (J. Histochem. Cytochem., 22, 1084, 1974) に従い 1 mg のペルオキシダーゼ (東洋紡) を蒸留水に溶解し、蒸留水で溶解した 100 mM の過ヨウ素酸を添加し 25 $^{\circ}$ C で 20 分間反応した。反応終了後 1.5% エチレングリコールを添加し 25 $^{\circ}$ C で 10 分間反応後 1 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.4) に対して透析した。F1114 - 1 - 2 抗体を 10 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.5) で透析し、抗体 1 mg に対して 1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) を添加して活性化した 1 mg のペルオキシダーゼを混合し 25 $^{\circ}$ C で 2 時間反応した。4 mg / mL の水素化ホウ素ナトリウムを添加しさらに 2 時間 4 $^{\circ}$ C で反応した後、反応液を PBS (pH 6.4) に透析しペルオキシダーゼ標識 F1114 - 1 - 2 抗体を得た。次に、F1133 抗体固相化プレートは F1133 抗体を PBS (pH 6.4) で 10 μ g / mL に希釈し、イムノプレート (Maxisorp, NUNC) の各ウエルに 50 μ L 添加し、45 $^{\circ}$ C で 30 分間反応後イオン交換水で 5 回洗浄し、20% ブロックエース (

雪印乳業)を含むPBS(pH6.4)を各ウエルに100 μ L添加し調製した。標準品は精製HRC12337-His蛋白質をラット血清で8、16、31、63、125、250、500ng/mlに希釈し調製した。ブランクはラット血清を使用した。測定は、まずプレートのブロッキング剤を廃棄し、調製した標準品及びブランクを25 μ l分注し、続けて、1%BSAを含むPBS(pH7.4)により5 μ g/mlに希釈したペルオキシダーゼ標識F1114-1-2抗体を25 μ l添加し、4で一晚反応させた。0.05%Tween20を含む生理食塩水で5回洗浄しテトラメチルベンジジン溶液(TMB-BioFX)を各ウエルに添加した。室温で20分間反応後、0.5M硫酸溶液で反応を停止し、プレート分光光度計(NJ-2100、日本インターメッド)で450nmの吸光度を測定し、標準曲線を作成した。第5図に作成した標準曲線を示した。

10

実施例7 各種細胞株培養上清中HRC12337蛋白質の測定

各種細胞株(173種類)の培養上清中HRC12337蛋白質濃度を実施例6に記載の測定系を用いて測定した。その結果、第6図に示すように培養上清中のHRC12337蛋白質濃度はHeLa、A549細胞同様多くの細胞では10ng/ml前後であったが(第6図に示す15種以外の158種の細胞株では、いずれも0~20ng/mlの範囲内であった)、Dauidi、DG75、BAL細胞等のBリンパ球系の細胞株では50ng/mlから100ng/ml程度の濃度のHRC12337蛋白質が検出された。また、CMK細胞に代表される巨核球系細胞でも50ng/ml程度のHRC12337蛋白質濃度が検出された。以上の結果はHRC12337蛋白質が抗体産生に關与するBリンパ球や血小板産生に關与する巨核球の制御に關与している可能性を示唆している。

20

実施例8 各種患者血清中HRC12337蛋白質の測定

健常人40例(男性20例、女性20例)及び各種疾患患者(35疾患、103例)を実施例6に記載の測定系を用いて測定した。その結果、健常人のHRC12337蛋白質濃度は0~50ng/mlに分布し、平均値は24ng/mlであった。男女差は認められなかった。各種患者血清中のHRC12337蛋白質濃度は第7図に示すように花粉症、アトピー性皮膚炎で高値傾向を示した。また、血管炎患者血清中HRC12337蛋白質濃度も高値傾向を示した。

各種培養細胞株培養上清中HRC12337蛋白質濃度及び患者血清中HRC12337蛋白質濃度測定の結果は、HRC12337蛋白質が免疫系及び血液系細胞の分化制御に關与している可能性を示している。特に、花粉症、アトピー性皮膚炎、血管炎に關連することが明らかになった。また、生体内において可溶型のHRC12337蛋白質が存在することを示すものである。

30

実施例9 Flow cytometryによるHRC12337発現細胞の解析(1)抗HRC12337ペプチド抗体の蛍光染色

実施例4で作製したF1114-1-2抗体をFlow cytometryで用いるために蛍光色素染色を行なった。即ち、Oregon Green 488 Protein Labeling Kit(Molecular Probes社)を用い、添付のプロトコールに従って、Oregon Green 488 dye標識を行なった(以下Oregon Green 488標識F1114-1-2をOG標識F1114-1-2と称する。)。さらにこのOG標識F1114-1-2抗体の反応性を確認するために、以下の方法でFlow cytometry解析を行なった。実施例3-(2)に示す方法で、C-HRC12337プラスミドをCOS細胞に導入した後、0.1%EDTAを含むPBSにて細胞を剥離した。剥離したCOS形質転換体を10 μ g/mlのラットIgGと氷上で30分間インキュベーションした後に、0.15%ラット血清、0.15%マウス血清および0.1%EDTAを含むPBSで2度洗浄した。次にCOS形質転換体を3%ラット血清、3%マウス血清および0.1%EDTAを含むPBSの溶液中で、OG標識F1114-1-2と氷上で60分間インキュベーションし、0.15%ラット血清、0.15%マウス血清および0.1%EDTAを含むPBSで三度洗浄した後に、FACACalibur(日本ベクトンディッキンソン)で解析を行なった。その結果、OG標識したコントロール抗体に比べ、OG標識F1114-1-2で特異的な染色

40

50

が確認でき、HRC12337の細胞膜上への発現が確認された(第8図)。

(2) ヒト末梢血単核球におけるHRC12337の発現

ヒト末梢血単核球を用い、HRC12337を発現する単核球画分を調べた。BIO WHITTAKER社(代理店;三光純薬)より購入したヒト末梢血単核球を5%非動化FBS含有RPMI1640培地(Sigma)に懸濁し、 1.0×10^6 cells/wellで24well-plateに植え込んだ。その際に、培地のみもしくは5ng/mlのPhorbol 12-myristate 13-acetate(以下、PMAと表記、Sigma)と0.5 μ g/mlのIonomyacin(Sigma)あるいは5 μ g/mlのLeucoagglutinin(以下PHA-Lと表記、Sigma)を添加した。5%CO₂、37 $^{\circ}$ Cで16時間培養後、(1)で作製したOG標識F1114-1-2抗体を用い、(1)と同様の方法でFlow cytometry解析した。その結果、未刺激の末梢血単核球ではHRC12337の発現はほとんど確認できないが、PMA+IonomyacinあるいはPHA-Lで刺激することにより、末梢血単核球でHRC12337の発現が上昇していた(第9図)。この結果は、実施例2の発現プロフィール解析とも一致している。また、市販のPhycerythrin(PE)標識細胞表面マーカー(日本ベクトンディッキンソン)とOG標識F1114-1-2で末梢血単核球を二重染色した結果、HRC12337はCD3ポジティブ細胞の一部で発現が確認され、PMA+IonomyacinあるいはPHA-L刺激でその割合が上昇しており、HRC12337は活性化したT細胞で発現していると思われる。HRC12337と相同性を示すCD33ポジティブ細胞ではHRC12337の発現は確認されなかった。

実施例10 混合リンパ球反応

HRC12337のリンパ球機能に対する影響を検討するため、混合リンパ球反応にHRC12337-Fcを添加し、その影響を検討した。密度勾配遠心法により分取された異なるドナー由来のヒト末梢血単核細胞(三光純薬株式会社CC-2702)を5%非動化FBSを含むRPMI1640培地(SIGMA社R6504)にて細胞濃度 1×10^6 cells/mlに調製した。96穴プレートにHRC12337-Fcを終濃度2 μ g/mlになるよう分注し、ここに異なるドナー由来のヒト末梢血単核細胞を100 μ lづつ添加した。CO₂インキュベーターにて4日間培養後、リンパ球増殖反応をプロモデオキシウリジン(BrdU)の細胞DNAへの取り込みを指標としたCell Proliferation ELISA, BrdU(ロシュ・ダイアグノスティック社1647229)にて定量した。その結果、HRC12337-Fcは混合リンパ球反応におけるヒト末梢リンパ球増殖を促進することが示された(第10図)。同時に培養上清中の各種サイトカイン濃度をELISA法(アマシャムファルマシアRPN2752)にて測定した。その結果、HRC12337-Fc添加時にIL-2濃度上昇が観察された(第11図)。一方、TNF及びIL-8濃度に関してはHRC12337-Fc添加による変動は観察されなかった。

実施例11 トランスジェニックマウスの作製

(1) hrc12337遺伝子を含むトランスジェニック作製用ベクターの構築 トランスジェニックマウス作製に用いるプラスミドは以下の方法で構築した。センスプライマー(5'-GCT CTA GAA TGG AAA AGT CCA TCT GGC TGC TGG CCT GCT TGG-3')及びアンチセンスプライマー(5'-CGG GGT ACC TCA CGG TGA GCA CAT GGT GGC TGG TGG GCT CC-3')を合成し、C-HRC12337を鋳型にPyrobest DNA Polymerase(TAKARA)により98 $^{\circ}$ Cで5秒、55 $^{\circ}$ Cで30秒、72 $^{\circ}$ Cで1分30秒のサイクルを25回繰り返してPCR反応を行った。得られた約1.0kbのPCR産物をXbaI及びKpnIにて消化し、アガロースゲル電気泳動にてDNA断片を回収した。また発現ベクターpM1101(ヒトElongation Factor 1プロモーター及びSV40 poly A付加シグナルを持つ発現ベクター)をXbaI及びKpnIにて消化し、前述のDNA断片をライゲーション

ンした。コンピテントセルHB101 (TAKARA)を形質転換して定法に従いトランスジェニックマウス作製用プラスミドを構築した。

(2) インジェクション用DNAの調整

(1)で得たプラスミドベクターを原核生物のプラスミド由来配列を除去するために制限酵素EcoT22I、SalI、BsaIで切断し、得られた2.9kbのDNA断片をインジェクションに用いた。

(3) インジェクション

マイクロマニピレーターを用い、常法に従い(2)で得られたインジェクション用DNAをC57BlacK/6 (以下B6と記載する)マウスの前核期受精卵雄性前核へ注入した。合計453個の受精卵に注入し、正常に生存していた428個の卵を偽妊娠0.5日目のICR系偽妊娠雌マウス(計17匹)の輸卵管に移植し、分娩予定日に帝王切開を施し、仔は里親に哺育させた。その結果これらの処置胚から109匹の産仔を得た。これらのうち離乳期まで成長した96匹について導入遺伝子の伝達の有無を確認した。

10

(4) 遺伝子伝達個体の確認

遺伝子伝達個体の確認は、サザンブロッティングによって以下の通りに行った。

1 DNA抽出

(3)で得た遺伝子注入胚由来の産仔96匹のマウスについて生後3週目に尾部の先端5mmを切断した。切断した尾部より以下の手順でDNAを抽出した。尾部は0.5ml組織溶解液(50mM Tris-HCl pH8.0、100mM NaCl、20mM EDTA、0.5% SDS、200µg/ml Proteinase K)中で一晩処理し、溶解させた。これをフェノール、クロロホルム処理を行なった後にイソプロパノールを用いてDNAを沈殿させた。このDNAを70%エタノールでリンスし、TEに溶解した。

20

2 プローブの作製

発現ベクターpM1101のElongation Factorのプロモーター領域に相当する部位を制限酵素EcoT22IおよびXbaIで切断した。得られたDNA断片はジーンイメージ(アマシャムファルマシア社製)をプロトコルに従って用いてフルオレセイン標識しプローブ(以下便宜上EFプローブと呼称する)とした。

3 ブロッティングおよび検出

1で得たゲノミックDNAを以下の手順で泳動、ブロッティングおよび検出を行なった。

30

- ゲノムDNA 5µgを制限酵素HindIII処理(37、3時間)
- 制限酵素消化DNA 2.5µgを0.5%のアガロースゲルTAEバッファー中で電気泳動(50V、1時間)
- アガロースゲルをアルカリ液(0.4M NaOH、0.6M NaCl)で処理(20分×2回)
- アガロースゲルにナイロンメンブレン(Hybond Nアマシャム社)をのせアルカリ液でブロッティング(約3時間)
- メンブレンを2×SSCでリンス
- メンブレンをハイブリバッグ(コスモバイオ社製)に入れハイブリダイゼーションバッファー(5×SSC、0.1% SDS、5%デキストラン硫酸、1/20量のブロッキング試薬(アマシャム社ジーンイメージキット添付)、100µg/ml ニシン精子DNA)にてプレハイブリダイゼーション(60、20分)
- ハイブリダイゼーションバッファーに1µl/mlのプローブを加えてハイブリダイゼーション(60 O/N)
- メンブレンを1×SSC、0.1% SDS、60にて20分間、0.5×SSC、0.1% SDS、60にて30分間洗浄
- 抗フルオレセイン抗体アルカリフォスファターゼ標識(ジーンイメージキット)を0.5%BSAを含むバッファーA(300mM NaCl、100mM Tris-HCl (pH9.5))にて5000倍希釈し室温で1時間処理

40

50

j . メンブレンを 0 . 3 % T w e e n 2 0 を含むバッファ-A にて室温で 1 0 分間洗浄 (3 回)

k . メンブレンをバッファ-A にて室温でリンス

l . メンブレンをハイブリバッグに入れ C D P - S t a r を加え、フィルムに感光させる。

遺伝子が導入されている個体では約 2 . 9 k b のバンドが検出される。

これらの解析の結果、遺伝子の導入が認められたものは 2 個体であった。産仔数に対する生存遺伝子導入個体数は通常より極めて低く、h r c 1 2 3 3 7 遺伝子産物の胎児期の違所性発現は胎生致死をもたらす可能性が高いことが示唆された。

発明の効果

本発明の H R C 1 2 3 3 7 は、免疫機能の異常による疾患の発症あるいは進行に対してその原因となり得る蛋白質であり、自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー性疾患、血管炎・肝炎・敗血性ショックなどの炎症性疾患、腫瘍等の予防あるいは治療のための医薬品の開発において、極めて有用である。

また、遺伝子 h r c 1 2 3 3 7 は、アンチセンス医薬品として、また遺伝子治療において利用することができ、蛋白質 H R C 1 2 3 3 7 は、それ自体あるいはその可溶性断片 (細胞外領域や各ドメイン) を作製することにより可溶性蛋白医薬品として有用である。さらに、H R C 1 2 3 3 7 またはその断片に反応性を有する抗体及びその抗体の一部は、生体内での H R C 1 2 3 3 7 機能を制御する抗体医薬品として有用である。

【配列表】

10

20

SEQUENCE LISTING

<110> Mochida Pharmaceutical Co. Ltd.

<120> Novel cellular adhesion molecule of activated leukocyte

<130> SAP-685-PCT

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

10

<211> 984

<212> DNA

<400> 1

```

atggaaaagt ccactctggct gctggcctgc ttggcgtggg ttctcccgac aggctcatt 60
gtgagaacta aaatagatac tacggagaac ttgctcaaca cagaggtgca cagctcgcca 120
gcgcagcgtt ggtccatgca ggtgccaccc gaggtgagcg cggaggcagg cgacgcggca 180
gtgctgcctt gcaccttcac gcaccgcac cgcactacg acgggcccgt gacggccatc 240
tggcgcggcg gcgagcccta tggggcccg caggtgttcc gctgcgctgc ggcgcggggc 300
agcgagctct gccagacggc gctgagcctg cacggcccgt tccggctgct gggcaaccgc 360
cgccgcaacg acctctcgtt gcgctcgag cgctcgcgc tggctgacga ccgcccgtac 420
ttctgccgcg tcgagtctgc cggcgacgtc catgaccgct acgagagccg ccacggcgtc 480
cggctgcaag tgacagccgc gcccgggatc gtcaacatct cggctgctgc cagtccggt 540
cacgccttcc gcgcgctctg cactgccgaa ggggagccgc cgcgccctt cgcctggctc 600
ggccccggcc tgggcaacag cttggcagcc gtgcggagcc cgcgtgaggg tcacggccac 660
ctagtgaccg ccgaaactgc cgcactgacc catgacggcc gctacacgtg tacggcccgc 720
aacagcctgg gccgctccga ggccagcgtc tacctgttcc gcttccatgg cgccagcggg 780
gcctcgacgg tcgccctcct gctcggcgct ctcggttca aggcgctgct gctgctcggg 840
gtcctggccg cccgcgctgc ccgcccgcg ccagagcacc tggacacccc ggacacccca 900
ccacggctcc aggcccagga gtccaattat gaaaatttga gccagatgaa cccccggagc 960
ccaccagcca ccactgtctc accg                                     984

```

20

30

<210> 2

<211> 328

<212> PRT

<400> 2

Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro

1

5

10

15

40

Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
 20 25 30
 Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
 35 40 45
 Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
 50 55 60
 Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
 65 70 75 80
 Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
 85 90 95
 Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
 100 105 110
 Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
 115 120 125
 Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
 130 135 140
 Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
 145 150 155 160
 Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
 165 170 175
 Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
 180 185 190
 Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
 195 200 205
 Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
 210 215 220
 Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
 225 230 235 240
 Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg Phe His
 245 250 255
 Gly Ala Ser Gly Ala Ser Thr Val Ala Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gly
 260 265 270
 Phe Lys Ala Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Ala Arg Ala Ala Arg
 275 280 285
 Arg Arg Pro Glu His Leu Asp Thr Pro Asp Thr Pro Pro Arg Ser Gln
 290 295 300

10

20

30

40

<210> 4

<211> 762

<212> DNA

<400> 4

atggaaaagt ccatctggct gctggcctgc ttggcgtggg ttctcccgac aggctcattt 60
 gtgagaacta aaatagatac tacggagaac ttgtcaaca cagaggtgca cagctcgcca 120
 gcgcagcgcct ggtccatgca ggtgccaccc gaggtgagcg cggaggcagg cgacgggca 180
 gtgctgcctt gcacctcac gcaccgcac gccactacg acgggcccgt gacggccatc 240
 tggcgcgcgg gcgagcccta tgcgggcccg caggtgttcc gctgcgctgc ggcgcggggc 300
 agcgagctct gccagacggc gctgagcctg cacggccgct tccggctgct gggcaaccgc 360
 cgccgcaacg acctctcgtt gcgcgtcgag cgctcgcgc tggctgacga ccgccgttac 420
 ttctgccgcg tcgagttcgc cggcgacgtc catgaccgct acgagagccg ccacggcgtc 480
 cggctgcacg tgacagccgc gcccgggatc gtcaacatct cggctgctgc cagtccggct 540
 cacccttcc gcgcgctctg cactgccgaa ggggagccgc cgcgccctt cgcctggctc 600
 ggccccggcc tgggcaacag cttggcagcc gtggcgagcc cgcgtgaggg tcacggccac 660
 ctagtgaccg ccgaactgcc cgactgacc catgacggcc gctacacgtg tacggccgcc 720
 aacagcctgg gccgctccga ggccagcgtc tacctgttcc gc 762

10

20

<210> 5

<211> 254

<212> PRT

<400> 5

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

30

40

Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
 115 120 125
 Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
 130 135 140
 Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
 145 150 155 160
 Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
 165 170 175
 Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
 180 185 190
 Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
 195 200 205
 Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
 210 215 220
 Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
 225 230 235 240
 Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Phe Arg
 245 250

10

20

<210> 6

<211> 279

<212> PRT

<400> 6

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

30

40

100 105 110
 Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
 115 120 125
 Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
 130 135 140
 Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
 145 150 155 160
 Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
 165 170 175
 Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
 180 185 190
 Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
 195 200 205
 Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
 210 215 220
 Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
 225 230 235 240
 Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Ala Arg Gly His
 245 250 255
 Pro Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Met His Thr
 260 265 270
 Gly His His His His His His
 275

10

20

<210> 7

<211> 489

<212> PRT

<400> 7

30

Met Glu Lys Ser Ile Trp Leu Leu Ala Cys Leu Ala Trp Val Leu Pro
 1 5 10 15
 Thr Gly Ser Phe Val Arg Thr Lys Ile Asp Thr Thr Glu Asn Leu Leu
 20 25 30
 Asn Thr Glu Val His Ser Ser Pro Ala Gln Arg Trp Ser Met Gln Val
 35 40 45
 Pro Pro Glu Val Ser Ala Glu Ala Gly Asp Ala Ala Val Leu Pro Cys
 50 55 60

40

Thr Phe Thr His Pro His Arg His Tyr Asp Gly Pro Leu Thr Ala Ile
 65 70 75 80
 Trp Arg Ala Gly Glu Pro Tyr Ala Gly Pro Gln Val Phe Arg Cys Ala
 85 90 95
 Ala Ala Arg Gly Ser Glu Leu Cys Gln Thr Ala Leu Ser Leu His Gly
 100 105 110
 Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asn Pro Arg Arg Asn Asp Leu Ser Leu Arg
 115 120 125
 Val Glu Arg Leu Ala Leu Ala Asp Asp Arg Arg Tyr Phe Cys Arg Val
 130 135 140
 Glu Phe Ala Gly Asp Val His Asp Arg Tyr Glu Ser Arg His Gly Val
 145 150 155 160
 Arg Leu His Val Thr Ala Ala Pro Arg Ile Val Asn Ile Ser Val Leu
 165 170 175
 Pro Ser Pro Ala His Ala Phe Arg Ala Leu Cys Thr Ala Glu Gly Glu
 180 185 190
 Pro Pro Pro Ala Leu Ala Trp Ser Gly Pro Ala Leu Gly Asn Ser Leu
 195 200 205
 Ala Ala Val Arg Ser Pro Arg Glu Gly His Gly His Leu Val Thr Ala
 210 215 220
 Glu Leu Pro Ala Leu Thr His Asp Gly Arg Tyr Thr Cys Thr Ala Ala
 225 230 235 240
 Asn Ser Leu Gly Arg Ser Glu Ala Ser Val Tyr Leu Gly Ser Arg Ser
 245 250 255
 Asn Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 260 265 270
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 275 280 285
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 290 295 300
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 305 310 315 320
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 325 330 335
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 340 345 350

10

20

30

40

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 355 360 365
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 370 375 380
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 385 390 395 400
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 405 410 415
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 420 425 430
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 435 440 445
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 450 455 460
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 465 470 475 480
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485

10

20

【図面の簡単な説明】

第1図は、シアロアドヘシンファミリーの構造図を示す。S-Sはジスルフィド結合による架橋を表す。

第2図は、HRC12337と公知のシアロアドヘシンファミリーとのアライメント結果を示す。図中、左端の表示は蛋白質をGenBankアクセッション番号で表したものであり、NP_001763はヒトCD33 antigenを、NP_057627はヒトD-siglec precursorを、CAB51127はヒトQA79 membrane proteinを、AAD50978はヒトsialic acid binding Ig-like lectin-5を表す。

30

第3図は、HRC12337の構造の模式図を示す。図中、シアル酸結合モチーフは、シアル酸含有糖鎖結合に必須なアルギニン残基が保存されていることを示す。

第4図は、hrc12337遺伝子のヒト臓器および各種細胞での発現プロファイルを表す。

第5図は、抗HRC12337抗体を用いたサンドイッチELISA系の標準曲線を示したものである。

第6図は、抗HRC12337抗体を用いたサンドイッチELISA系を用いて各種細胞株培養上清中のHRC12337濃度の測定結果を示したものである。

40

第7図は、抗HRC12337抗体を用いたサンドイッチELISA系を用いて各種患者血清中のHRC12337濃度の測定結果を示したものである。

第8図は、OG標識抗HRC12337抗体によるCOS細胞形質転換体のFlow cytometry解析結果を示す。白抜きの領域がOG標識F1114-1-2抗体で染色した結果を示し、塗りつぶしの領域はOG標識したコントロール抗体での染色結果を示す。

第9図は、ヒト末梢血単核球でのHRC12337発現をFlow cytometryにて解析した結果を示す。塗りつぶしの領域は未刺激の末梢血単核球をOG標識F1114-1-2抗体で染色した結果を示し、白抜き実線で示される領域はPMA+Ionomy cinで刺激した末梢血単核球をOG標識F1114-1-2抗体で染色した結果を、白

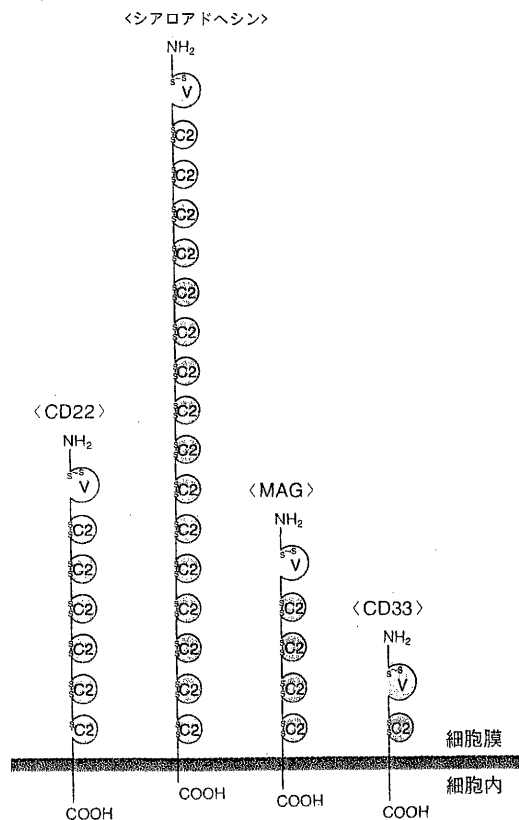
50

抜き点線で示される領域は P H A - L で刺激した末梢血単核球を O G 標識 F 1 1 1 4 - 1 - 2 抗体で染色した結果をそれぞれ示す。

第 1 0 図は、H R C 1 2 3 3 7 - F c の混合リンパ球反応に対する作用を混合リンパ球反応時のプロモデオキシウリジンの細胞 D N A への取り込みを指標に測定したものである。

第 1 1 図は、H R C 1 2 3 3 7 - F c の混合リンパ球反応に対する作用を混合リンパ球反応時の培養上清中 I L - 2 濃度を指標に測定したものである。

【 図 1 】
第 1 図

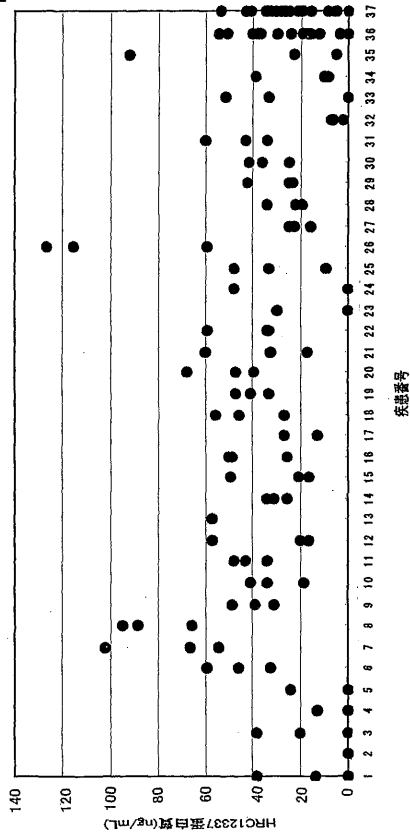


【 図 2 】
第 2 図

NP_001763	---MPLLLLLPLLWA-----	-----GALAMPNFWLQVQESVTVOEGLCV
AAD50978	---MLLLLLPLLWG-----	-----GSLQEKPYVELQVKSVTVQEGLCV
NP_057627	---MLLLLLPLLWGRE-----	-----RVEGQKSNRKDYSLTMQSSVTQEGMCA
CAB51127	---MLLLLLPLLWGRE-----	-----RVEGQKSNRKDYSLTMQSSVTQEGMCA
C-HRC12337	MEKSIWLGLAWLPTGSAFVVRTKIDTTENLNTEVHSSPAGRWSMQVPPVSEAEAGDAA	
	** * *	: : : * : * : *
NP_001763	LVPCTFFHPIPYDKNSPVHGWFRE---	GAIIISGDSPVATNKLQEQVEETQGRFRLLG
AAD50978	LVPCTFFHPIPYDKNSPVHGWFRE---	GEIPYYAEVATNPNDRVKPETQGRFRLLG
NP_057627	HVRCFSFYPVDSQTDSDPVHGWFRA---	GNDISWKAPVATNPNPAWAVEETRDRFRLLG
CAB51127	HVRCFSFYPVDSQTDSDPVHGWFRA---	GNDISWKAPVATNPNPAWAVEETRDRFRLLG
C-HRC12337	VLPCTFTHPHRHVDG---PLTAIWRAGEPYAGPQVFRCAARGSELQCTALSLHGRFRLLG	
	: * : * * * * :	: : : * : * : * * * :
NP_001763	DPSRNWCSLSIVDARRRDNQSYFFRNERG--	STKYSYKSPQ--LSVHVDTLTHRPKILIPG-
AAD50978	DVQKKNCSLSIGDARMEDTGSYFFRVERGRDVKYSYQQNK--	LNLEVTALIEKPDHIFL-
NP_057627	DPQTKNCTLSIRDARMSDAGRFFRMEKG--	NIKWNYKYG--LSVNVTDPPQNLTVTVPQG
CAB51127	DPQTKNCTLSIRDARMSDAGRFFRMEKG--	NIKWNYKYG--LSVNVTDPPQNLTVTVPQG
C-HRC12337	NPRRNDLSLVERLALADDRYFCRVEFAGDVHRYCSRHGVRHLHYTAAPRIVMISVLP-	
	: : : * : * * * * :	: : : * : * : * * * :
NP_001763	---TLEPGHKNLTC---	SVSWAC--EQGPPPIFSWLSAAPTSLGPRTHSSVLIITP
AAD50978	---PLESGRPTLSC---	SLPGSC--EAGPPLTFWTGNALSPDPETTRSSLELITP
NP_057627	EGTASTALGNSSSLSVLEGGSLRLVCAVDSNPPARLSWTWRSLTLYPSQSPNPLVLELQV	
CAB51127	EGTASTALGNSSSLSVLEGGSLRLVCAVDSNPPARLSWTWRSLTLYPSQSPNPLVLELQV	
C-HRC12337	---SPAFAF---	RALCTA--EGEPPPALAWSGPALGNSLAAVRSR--EGHG
	: : : * * * * :	: : : * * * * :
NP_001763	RPQDHGTNLTCQVKFAGAVTERTIQLNVTYVPPQ	
AAD50978	RPEDHGTNLTCQMKRGAQVTTERTVQLNVSYPQTITIFRNGIALEILQNTSYPVLEG	
NP_057627	HLGDEG-EFTCRA--QNS--	LGSQHVSILNLSLQQE
CAB51127	HLGDEG-EFTCRA--QNS--	LGSQHVSILNLSLQQE
C-HRC12337	HLVTAELPALTHD---	GRYTCTAANSLGRS
	: : : * * * * :	: : : * * * * :
NP_001763	NP-----	TTGIF
AAD50978	QALRLLCDAPSNPPAHLWSFQSPALNATPISNTGILELRRVRSAEKGGFTCRAQHPLGF	
NP_057627		
CAB51127		
C-HRC12337		
	-----	-----GDGS-----
NP_001763	LQIFLNLVSVYLPQLLGPSCSWEAEGLHRCRFRAPAPSLCWRLEEKPLEGNSSQGSFK	
AAD50978		-----YT-----
NP_057627		-----YT-----
CAB51127		-----YT-----
C-HRC12337		-----YT-----

【 図 7 】

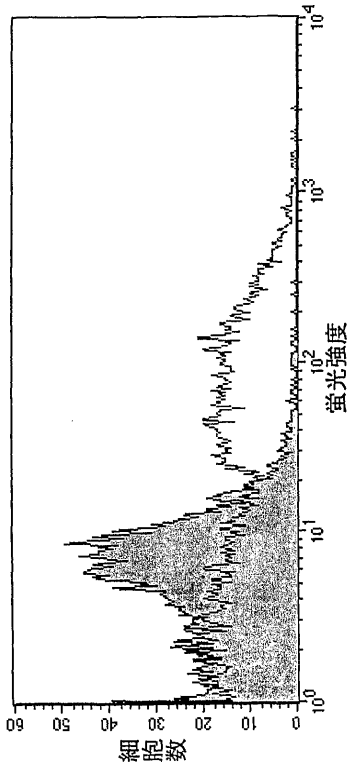
第7図



疾患番号	疾患名	疾患番号	疾患名
1	狭心症	21	骨髄腫
2	急性心筋梗塞	22	前立腺ガン
3	心不全	23	脳梗塞
4	高血圧症	24	痴呆
5	心臓病	25	慢性関節リウマチ
6	気管支喘息	26	血管炎症
7	花粉症	27	自己免疫疾患
8	アトピー性皮膚炎	28	不整脈
9	肺腫瘍	29	卵巣がん
10	シェーグレン症候群	30	急性白血病
11	胆石	31	慢性白血病
12	肝不全	32	腎不全
13	自己免疫性肝炎	33	糸球体腎炎
14	肝硬変	34	前立腺肥大症
15	肺炎	35	Alzheimer 型老年痴呆症
16	糖尿病 Type2	36	健常男性
17	高脂血症	37	健常女性
18	骨粗しょう症		
19	Graves 病		
20	Cushing 症候群		

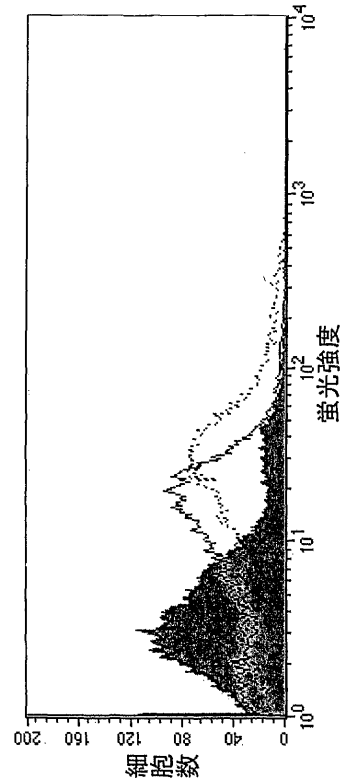
【 図 8 】

第8図

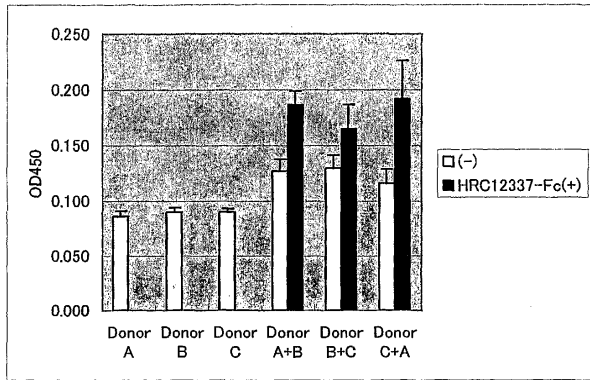


【 図 9 】

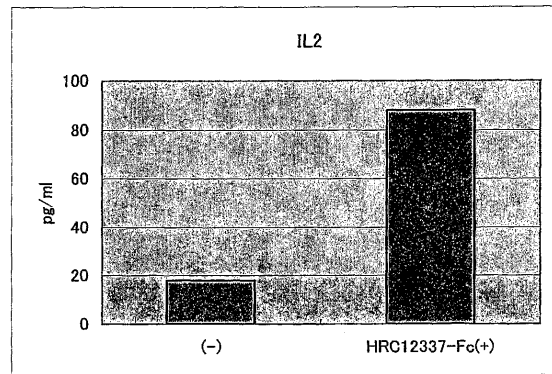
第9図



【 図 1 0 】
第 1 0 図



【 図 1 1 】
第 1 1 図



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/01321
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. ⁷ C12N15/09, C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/02, A61K48/00, G01N33/50		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁷ C12N15/09, C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/02, A61K48/00, G01N33/50		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) SwissProt/EIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Jiquan Q. ZHANG et al., Siglec-9, a Novel Sialic Acid Binding Member of the Immunoglobulin Superfamily Expressed Broadly on Human Blood Leukocytes. The Journal of Biological Chemistry, July 2000, Vol.275, No.29, pages 22121 to 22126	1-17
A	Michela FALCO et al., Identification and Molecular Cloning of p75/AIRM1, A Novel Member of the Sialoadhesin Family That Functions as an Inhibitory Receptor in Human Natural Killer Cells. J.Exp.Med. September, 1999, Vol.190, No.6, pages 793 to 801	1-17
A	Ann L. CORNISH et al., Characterization of Siglec-5, a Novel Glycoprotein Expressed on Myeloid Cells Related to CD33. Blood September, 1998, Vol.92, No.6, pages 2123 to 2132	1-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 15 March, 2002 (15.03.02)	Date of mailing of the international search report 26 March, 2002 (26.03.02)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/01321									
<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl¹ C12N15/09, C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/02, A61K48/00, G01N33/50</p>											
<p>B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl¹ C12N15/09, C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/02, A61K48/00, G01N33/50</p>											
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>											
<p>国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリ*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>Jiquan Q. ZHANG et al. Siglec-9, a Novel Sialic Acid Binding Member of the Immunoglobulin Superfamily Expressed Broadly on Human Blood Leukocytes. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY July 2000, Vol. 275, No. 29, p. 22121-22126</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Michela FALCO et al. Identification and Molecular Cloning of p75/ALRM1, A Novel Member of the Sialoadhesin Family That Functions as an Inhibitory Receptor in Human Natural Killer Cells. J. Exp. Med. September 1999, Vol. 190, No. 6, p. 793-801</td> <td>1-17</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	A	Jiquan Q. ZHANG et al. Siglec-9, a Novel Sialic Acid Binding Member of the Immunoglobulin Superfamily Expressed Broadly on Human Blood Leukocytes. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY July 2000, Vol. 275, No. 29, p. 22121-22126	1-17	A	Michela FALCO et al. Identification and Molecular Cloning of p75/ALRM1, A Novel Member of the Sialoadhesin Family That Functions as an Inhibitory Receptor in Human Natural Killer Cells. J. Exp. Med. September 1999, Vol. 190, No. 6, p. 793-801	1-17
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
A	Jiquan Q. ZHANG et al. Siglec-9, a Novel Sialic Acid Binding Member of the Immunoglobulin Superfamily Expressed Broadly on Human Blood Leukocytes. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY July 2000, Vol. 275, No. 29, p. 22121-22126	1-17									
A	Michela FALCO et al. Identification and Molecular Cloning of p75/ALRM1, A Novel Member of the Sialoadhesin Family That Functions as an Inhibitory Receptor in Human Natural Killer Cells. J. Exp. Med. September 1999, Vol. 190, No. 6, p. 793-801	1-17									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリ 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献</p>											
国際調査を完了した日	15. 03. 02	国際調査報告の発送日 26.03.02									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 明照	4B 2936 電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/01321
C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Ann L. CORNISH et al. Characterization of Siglec-5, a Novel Glycoprotein Expressed on Myeloid Cells Related to CD33. Blood September 1998, Vol. 92, No. 6, p. 2123-2132	1-17

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A

- (72)発明者 加藤 穰
日本国東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内
- (72)発明者 高橋 智裕
日本国東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内
- (72)発明者 白川 嘉門
日本国東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	对活化的白细胞特异的新型细胞粘附分子		
公开(公告)号	JPWO2002064771A1	公开(公告)日	2004-06-17
申请号	JP2002565086	申请日	2002-02-15
申请(专利权)人(译)	持田製薬株式会社		
[标]发明人	中村祐輔 菅野純夫 加藤穰 高橋智裕 白川嘉門		
发明人	中村 祐輔 菅野 純夫 加藤 穰 高橋 智裕 白川 嘉門		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K48/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/12 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/57496 A61K48/00 C07K14/70503 C07K16/28 G01N33/566 G01N33/68 G01N2500/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A		
代理人(译)	小野 诚		
优先权	2001039196 2001-02-15 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了参与免疫功能调节的新型细胞粘附分子的基因和蛋白质，以及有效评估该蛋白质的活性调节剂的方法。包含由SEQ ID No : 1表示的核苷酸序列的DNA；该DNA编码的细胞粘附分子；该DNA序列的反义核酸；和评估该蛋白的活性调节剂的方法。

【 図 1 】

