

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] （参考）
G 0 1 N 33/53	ZNA	G 0 1 N 33/53	ZNA P 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 15/06	4 B 0 6 3
A 6 1 P 15/06		29/00	4 C 0 8 4
29/00		43/00	111
43/00	111	C 1 2 Q 1/68	A
審査請求 未請求 予備審査請求（全 86数） 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001－578963(P2001－578963)	(71)出願人	セイント ヴィンセンツ ホスピタル シ ドニー リミテッド オーストラリア国 エヌエスダブリュ 20 10,ダーリンハースト,ヴィクトリア スト リート
(86)(22)出願日	平成13年4月20日(2001.4.20)	(72)発明者	ブライト, サミュエル, ノルバート オーストラリア国 エヌエスダブリュ 20 72,ゴードン,カルロッタ アヴェニュー 33
(85)翻訳文提出日	平成14年10月17日(2002.10.17)	(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 （外2名）
(86)国際出願番号	PCT/AU01/00456		
(87)国際公開番号	W001/081928		
(87)国際公開日	平成13年11月1日(2001.11.1)		
(31)優先権主張番号	PQ 7037		
(32)優先日	平成12年4月20日(2000.4.20)		
(33)優先権主張国	オーストラリア(AU)		
(31)優先権主張番号	PQ 7465		
(32)優先日	平成12年5月11日(2000.5.11)		
(33)優先権主張国	オーストラリア(AU)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 マクロファージ抑制サイトカイン－1（MIC－1）が関連する診断アッセイおよび治療方法

(57)【要約】

本発明は、流産および／または早産、胎児異常、癌（例えば、前立腺癌）ならびに炎症性疾患（例えば、慢性関節リウマチ）のリスクを診断する方法を開示する。この診断方法は、身体サンプル中における異常なレベルのマクロファージ阻害サイトカイン-1(MIC-1)を測定するステップ、あるいはMIC-1変異タンパク質の存在を判定するステップを含む。さらに、本発明は、妊娠被験者における流産および／または早産のリスクを低減するための方法、ならびに炎症性疾患および／または癌を治療するための方法を開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 異常なレベルのMIC-1の発現を特徴とする疾患もしくは症状の診断または評価方法であって、以下のステップ：

(i) 試験被験者から採取した身体サンプル中に存在するMIC-1の量を測定するステップ；および

(ii) 上記(i)における測定量と、正常被験者から採取した等価な身体サンプル中に存在するMIC-1の量または量の範囲を比較するステップ；

を含む上記方法。

【請求項2】 上記身体サンプルが、全血、血清、血漿および尿から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 流産のリスクおよび／または早産の診断方法であって、以下のステップ：

(i) 既知の妊娠期にある妊娠試験被験者から採取した身体サンプル中に存在するMIC-1の量を測定するステップ；および

(ii) 上記(i)における測定量と、上記試験被験者の既知の妊娠期と実質的に等価な妊娠期にある正常妊娠被験者から採取した等価な身体サンプル中に存在するMIC-1の量または量の範囲を比較するステップ；

を含む上記方法。

【請求項4】 上記身体サンプルが、全血、血清、血漿、羊水、胎盤抽出物、尿および脳脊髄液から選択される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 上記身体サンプルが、血清、羊水、および胎盤抽出物から選択される、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 上記身体サンプルが血清由来のサンプルである、請求項3～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 上記試験被験者が妊娠期の第1トリメスターにあり、該試験被験者の血清中に存在するMIC-1の測定量が4 ng/mL以下であることが流産および／または早産の高リスクの指標となる、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 上記試験被験者が妊娠期の第2トリメスターにあり、該試験被験者の血清中に存在するMIC-1の測定量が8 ng/mL以下であることが流産および

／または早産の高リスクの指標となる、請求項6に記載の方法。

【請求項9】 上記試験被験者が妊娠期の第3トリメスターにあり、該試験被験者の血清中に存在するMIC-1の測定量が12ng/mL以下であることが流産および／または早産の高リスクの指標となる、請求項6に記載の方法。

【請求項10】 上記身体サンプルが羊水由来のサンプルである、請求項3～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】 上記試験被験者が妊娠期の第2トリメスターにあり、該試験被験者の羊水サンプル中に存在するMIC-1の測定量が10ng/mL以下であることが流産および／または早産の高リスクの指標となる、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 上記身体サンプルが胎盤抽出物由来のサンプルである、請求項3～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】 上記試験被験者が妊娠期の第3トリメスターにあり、該試験被験者の胎盤抽出物サンプル中に存在するMIC-1の測定量が約18ng/mL以下であることが流産および／または早産の高リスクの指標となる、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 上記試験被験者が妊娠期の第3トリメスターにあり、該試験被験者の胎盤抽出物サンプル中に存在するMIC-1の測定量が約10ng/mL以下であることが流産および／または早産の高リスクの指標となる、請求項12に記載の方法。

【請求項15】 流産および／または早産のリスクを低減させるための妊娠被験者の治療方法であって、該被験者に対し、有効量のMIC-1を、必要に応じて薬学上許容される担体および／または賦形剤と混合させて、投与すること、を含む上記方法。

【請求項16】 上記有効量のMIC-1は、投与されたMIC-1と被験者の胎盤組織中に存在する内因性MIC-1との合計量が15～70ng/mLの範囲に維持される量である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 上記有効量のMIC-1は、投与されたMIC-1と被験者の胎盤組織中に存在する内因性MIC-1との合計量が30～50ng/mLの範囲に維持される量である、請求項15に記載の方法。

【請求項18】 流産および／または早産のリスクを低減させるための妊娠被験者を治療する方法であって、発現可能なMIC-1コードヌクレオチド配列を含む組換えアデノウイルスベクターもしくは組換えアデノウイルス関連ベクターを該被験者に投与するステップ；あるいは、適切なプロモーター配列に機能的に連結された線状MIC-1コードDNAを含むリポソームを該被験者に投与するステップ、を含む上記方法。

【請求項19】 胎児異常の診断方法であって、以下のステップ：

- (i) 既知の妊娠期にある妊娠試験被験者から採取した身体サンプル中に存在するMIC-1の量を測定するステップ；および
 - (ii) 上記(i)における測定量と、上記試験被験者の既知の妊娠期と実質的に等価な妊娠期にある正常妊娠被験者から採取した等価な身体サンプル中に存在するMIC-1の量または量の範囲を比較するステップ；
- を含む上記方法。

【請求項20】 異常なレベルのMIC-1の発現を特徴とする癌の診断方法または評価方法であって、以下のステップ：

- (i) 試験被験者から採取した身体サンプル中に存在するMIC-1の量を測定するステップ；および
 - (ii) 上記(i)における測定量と、正常被験者から採取した等価な身体サンプル中に存在するMIC-1の量または量の範囲を比較するステップ；
- を含む上記方法。

【請求項21】 上記身体サンプルが、血清、血漿、尿、脳脊髄液、滑液、精液または組織生検から選択される、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 上記癌が、前立腺癌、乳癌、大腸癌、直腸癌または膀胱癌である、請求項20または21に記載の方法。

【請求項23】 慢性関節リウマチの診断方法であって、以下のステップ：

- (i) 試験被験者から採取した身体サンプル中に存在するMIC-1の量を測定するステップ；および
- (ii) 上記(i)における測定量と、正常被験者から採取した等価な身体サンプル中に存在するMIC-1の量または量の範囲を比較するステップ；

を含む上記方法。

【請求項24】 上記身体サンプルが、血清、血漿および滑液から選択される、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 身体サンプル中に存在するMIC-1の量を、MIC-1に対する抗体またはそのフラグメントを使用するイムノアッセイまたは免疫組織化学によって測定する、請求項1～14または19～24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】 被験者の炎症を治療する方法であって、該被験者に対し、有効量のMIC-1を、必要に応じて薬学上許容される担体および／または賦形剤と混合させて、投与すること、を含む上記方法。

【請求項27】 ヒト被験者における炎症性疾患および／または癌の診断方法または評価方法であって、被験者から採取した適切なサンプル中においてMIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質の存在を判定するステップを含む上記方法。

【請求項28】 ヒト被験者における炎症性疾患および／または癌への素因を評価する方法であって、被験者から採取した適切なサンプル中においてMIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質の存在を判定するステップを含む上記方法。

【請求項29】 ヒト被験者における炎症性疾患および／または癌の診断方法または評価方法であって、被験者から採取した適切なサンプル中においてMIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にヒスチジンを有するMIC-1変異タンパク質の存在を判定するステップを含む上記方法。

【請求項30】 ヒト被験者における炎症性疾患および／または癌への素因を評価する方法であって、被験者から採取した適切なサンプル中においてMIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にヒスチジンを有するMIC-1変異タンパク質の存在を判定するステップを含んでなる上記方法。

【請求項31】 上記炎症性疾患が慢性関節リウマチである、請求項27～30のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】 上記癌が前立腺癌である、請求項27～30のいずれか1項に記載の方法。

【請求項33】 上記サンプル中のMIC-1変異タンパク質の存在を、ヒト野生型MIC-1および/もしくは202位にヒスチジンを有する変異体または202位にアスパラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質と特異的に結合する抗体、あるいはそのフラグメントを使用するイムノアッセイによって判定する、請求項27～32のいずれか1項に記載の方法。

【請求項34】 上記サンプルが、全血、血清、血漿、尿または組織生検から選択される、請求項27～33のいずれか1項に記載の方法。

【請求項35】 MIC-1に関してヒト被験者の遺伝子型を決定する方法であって、MIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にヒスチジンを有するMIC-1タンパク質に対して、または、MIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質に対して、該被験者がホモ接合型またはヘテロ接合型であるかどうかを判定することを含む上記方法。

【請求項36】 ヒト被験者における炎症性疾患および/または癌の診断方法または評価方法、あるいは、ヒト被験者における炎症性疾患および/または癌への素因を評価する方法であって、MIC-1に関してヒト被験者の遺伝子型を決定するステップを含み、該ステップは、MIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にヒスチジンを有するMIC-1タンパク質に対して、または、MIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質に対して該被験者がホモ接合型またはヘテロ接合型であるかどうかを判定することを含むものである、上記方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

本発明は医学的診断方法の分野に関する。特に本発明は、流産および／または早産、胎児異常、癌（例えば、前立腺癌）ならびに炎症性疾患（例えば、慢性関節リウマチ）のリスクを診断する方法を提供する。さらに、本発明は、妊娠している被験者における流産および／または早産のリスクを低減するための方法を提供する。

【0002】**発明の背景**

トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β)スーパーファミリーは、増殖、分化および腫瘍形成等の様々な細胞過程を制御する多数の分子を含む。TGF- β スーパーファミリーのメンバーは主要なファミリーグループに分類される。そのようなグループとしては、TGF- β 、骨誘導因子(BMP)、増殖分化因子(GDF)、インヒビン／アクチビン、ミューラー管抑制物質(MIS)、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)およびさらに最近ではマクロファージ抑制性サイトカイン-1(Bootcovら, 1997)等が挙げられる。ヒトの妊娠におけるTGF- β スーパーファミリーの関与は、羊水中のTGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、アクチビンおよびインヒビンの検出、ならびに胎盤絨毛部へのTGF- β 1、アクチビンおよびインヒビンの局在化によって示される(Grahamら, 1992 ; Petragliaら, 1993a ; Petragliaら, 1992 ; Minamiら, 1992 ; LangおよびSearle, 1994 ; QuおよびThomas, 1992 ; Altmanら, 1990; Canniggiaら, 1999; Wallaceら, 1997)。

【0003】

TGF- β スーパーファミリーは、その生物学的重要性および治療可能性のため集中して研究されている。その生物学的特性および機能は周知であり、また、広範囲にわたって総説されている(例えば、Miyazonoら, 1993 ; Wahl, 1992 ; およびRobertsら, 1993を参照されたい)。それらは、マクロファージおよび繊維芽細胞に対する強力な化学遊走因子であり、また、おそらく分化におけるその役割のため通常は細胞増殖を抑制する。炎症については、TGF- β は、繊維芽細胞、コラ

ーゲンおよびマトリックスタンパク質合成の強力な刺激因子であり、血管新生を促進し、接着分子の発現をモジュレートし、リンパ細胞増殖、いくつかのリンホカインの産生およびNK細胞機能を抑制する。さらに、TGF- β タンパク質は慢性の炎症過程およびメカニズムの病因に深く関係していることが示されている。

【0004】

さらに、TGF- β スーパーファミリーは、妊娠中に多数の役割を果たすと考えられている。細胞と細胞との接着、細胞の移動および組織再構築を調節するTGF- β イソ型の能力により、何人かの著者によりこれらの分子が妊娠初期における栄養膜の侵入および着床を制御しうることを示唆している。その他の可能性ある役割としては、胎児の成長の制御および母体の免疫系の抑制が挙げられる。胎盤の細胞はTGF- β スーパーファミリー分子の主要な供給源であり、また、少なくともTGF- β 1、TGF- β 3、アクチビンおよびインヒビンによって調節されている。例えば、アクチビンはインヒビンの生成を抑制し、胎盤細胞によるプロゲステロン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)、およびゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)を促進する(Petragliaら, 1989)。インヒビンは胎盤性hCG、GnRHおよびアクチビンによって誘導されるプロゲステロンの放出を抑制する(Petragliaら, 1989)一方、TGF- β 1は胎盤に誘導されるヒト胎盤性ラクタゲン(hPL)生成を抑制する。アクチビンとTGF- β 3は妊娠初期における外側に微絨毛を有する栄養膜の侵入を調節するときに反対の効果を有することも示されている(Caniggiaら, 1997; Caniggiaら, 1999)。これらの知見により、TGF- β 1、TGF- β 3、アクチビンおよびインヒビンは自己分泌様式で胎盤の成長および分化を調節することが示唆される。さらに、TGF- β 1、アクチビンおよびインヒビンは、成長および分化を調節することが示されている胚における適所に存在する。特に、TGF- β スーパーファミリーメンバーは、中胚葉誘導を促進するその能力が周知である。

【0005】

TGF- β スーパーファミリータンパク質は胎児の生存を促進することも示唆されている。実験証拠によって、分娩時に、炎症誘発性サイトカインであるインターロイキン-1(IL-1)、IL-6および腫瘍壊死因子- α (TNF- α)の羊水中濃度が上昇することが示唆されている。さらに、子宮内感染を伴う炎症誘発性サイトカイン生

成は、胎児に対する拒絶反応または予定日前の分娩（早期分娩）に関連している (Romeroら, 1992; Hillierら, 1993; Opsjonら, 1993)。TGF- β 1およびインヒビンは、それぞれマクロファージおよびリンパ細胞に由来する炎症誘発性サイトカインの生成を抑制する一方 (BogdanおよびNathan, 1993; Petragliaら, 1991)、アクチビンはマクロファージおよび羊膜に対して炎症誘発性作用を及ぼすことが示されている (NusingおよびBarsig, 1997; Petragliaら, 1993b)。このことにより、TGF- β 1およびインヒビンは、母体免疫系による炎症誘発性サイトカインの生成を抑制することによって、胎児の生存を促進するといった示唆につながっている。

【0006】

本願出願人らは、最近、TGF- β スーパーファミリーの異なるメンバーである、マクロファージ阻害サイトカイン(MIC-1)をクローニングし、特性決定した (Bootcovら, 1997)。このマクロファージ阻害サイトカイン(MIC-1)の発現はマクロファージの活性化と関連する。妊娠におけるMIC-1の何らかの機能特性を判定するために、本願出願人らは、MIC-1の定量化のために高感度サンドイッチ型酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)を開発した。そして、このアッセイ法を使用することによりヒト母体血清MIC-1濃度と妊娠期間との経時的関係を調査し、さらに、羊水および胎盤抽出物中のその濃度を測定した。さらに、本願出願人らは、胎盤絨毛癌細胞系(BeWo)のサイトカイン合成能を評価することにより、MIC-1の起源を詳細に示す実験を実施した。以下に示す結果は、子宮内における母体由来の炎症誘発性サイトカインの産生を抑制することによってMIC-1は胎児生存率を上昇させることができることを示すものである。したがって、母体血清、羊水および胎盤抽出物サンプル中のMIC-1に関する定量的診断アッセイによって、異常なレベルのMIC-1を有することを検出することにより、流産および／または早産のリスクがある妊娠女性を検出するという可能性を提供する。

【0007】

さらに、本願出願人らは、いくつかのMIC-1対立遺伝子変異体が存在することを見出し、それら全てが9位、48位および202位にわずかなアミノ酸配列の相違を示すことを見出した（国際特許公開WO 97/00958号参照、この全ての内容を参

照により本明細書に組み入れる、参照文献中MIC-1はCL13として引用されている)。最も重要なアミノ酸位置はアミノ酸202位であり、なぜならば、この位置は成熟形態のMIC-1(すなわち、リーダー配列が切断により除かれている)の6位に相当するからである。同定された変異体のいくつかにおいては、通常202位に存在するヒスチジン(H)残基(すなわち「H6」)がアスパラギン酸(D)と置換されている。これは、604位のシトシン(C)がグアノシン(G)によって置換されているような、MIC-1遺伝子内の一塩基置換によるものである。現在、本願出願人は、Asp²⁰²-MIC-1(すなわち「D6」)対立遺伝子変異体に対してヘテロ接合性またはホモ接合性のいずれかである被験者が、炎症性疾患および／または癌に対して素因および疾病経過が変化することを認識している。

【0008】

発明の開示

したがって、第1の態様として、本発明は、異常なレベルのMIC-1発現を特徴とする疾患もしくは症状の診断方法または評価方法を提供する。該方法は、以下のステップ:

- (i)試験被験者から採取した身体サンプル中に存在するMIC-1の量を測定するステップ、および
- (ii)上記ステップにおいて測定した量と、正常被験者から採取した等価な身体サンプル中に存在するMIC-1量またはMIC-1量の範囲を比較するステップ、を含むものである。

【0009】

比較したMIC-1量の相違が、疾患または病状に関係する異常なレベルのMIC-1発現を試験被験者が有することを示するものである。例えば、本発明の好ましい実施形態においては、身体サンプル、好ましくは妊娠試験被験者から採取した血清、羊水または胎盤抽出物サンプル中の低下したMIC-1量を検出することによって、流産および／または早産のリスクが増大する状態(高リスク)の指標となりうる。

【0010】

したがって、第2の態様として、本発明は、流産および／または早産のリスク

を診断する方法を提供する。該方法は、以下のステップ：

- (i) 既知の妊娠期間にある妊娠試験被験者から採取した身体サンプル中に存在するMIC-1の量を測定するステップ、および
- (ii) 上記ステップにおいて測定した量と、上記試験被験者の既知の妊娠期間と実質的に等価な妊娠期間にある正常妊娠被験者から採取した等価な身体サンプル中に存在するMIC-1量またはMIC-1量の範囲を比較するステップ、を含むものである。

【0011】

上述したように、第2の態様の方法において使用する好ましい身体サンプルは、血清、羊水または胎盤抽出物由来のサンプルである。しかしながら、全血、血漿、尿および脳脊髄液由来のサンプルもまた適している。

【0012】

正常妊娠被験者の身体サンプル中に存在するMIC-1量または量の範囲は、妊娠期間が進むに連れて増大する。したがって、試験被験者由来のサンプルの測定したMIC-1量を、実質的に等価な妊娠期間にある正常妊娠被験者由来の等価なサンプル中に存在するMIC-1量とを比較することは重要である。したがって、使用する身体サンプルが血清サンプルである場合には、第1トリメスターの試験被験者からは4 ng/mL以下、第2トリメスターの試験被験者からは8 ng/mL以下、そして、第3トリメスターの試験被験者からは12 ng/mL以下の測定量が、低減したMIC-1レベルと、その結果として流産および／または早産の高リスクの指標となる。使用する身体サンプルが羊水サンプルである場合には、第2トリメスターの試験被験者からは10 ng/mL以下の測定量が、低減したMIC-1レベルと、その結果として流産および／または早産の高リスクの指標となる。さらに、使用する身体サンプルが胎盤抽出物である場合には、第3トリメスターの試験被験者由来の胎盤抽出物サンプル中、約18 ng/mL以下、より好ましくは約10 ng/mL以下の測定量が、低減したMIC-1レベルと、その結果として流産および／または早産の高リスクの指標となる。

【0013】

流産および／または早産のリスクの増大（高リスク）は、低減したMIC-1レベ

ルと関係する異常な妊娠および／または胎盤の発達の結果である可能性がある。すなわち、異常な胎盤の発達が、低減したMIC-1レベルの検出によって判定される場合、これにより、出産の早期誘導の指標となりうる。なぜならば、胎盤が正常に発達および成長しない場合、胎児は危険な状態にありうるからである。

【0014】

妊娠女性において流産および／または早産のリスク評価を成功させることにより、予防的治療および適用しうる他の手段（例えば、休息、食事の改善等）を行うことが可能となる。

【0015】

さらに、本発明は、流産および／または早産のリスクを低減させるための治療方法を意図するものであり、該方法はMIC-1の投与を含むことを特徴とする。

【0016】

したがって、第3の態様において、本発明は、流産および／または早産のリスクを低減させるための妊娠被験者の治療方法を提供し、該方法は、該被験者に対し、有効量のMIC-1を、必要に応じて薬学上許容される担体および／または賦形剤と混合させて投与することを含むものである。

【0017】

好ましくは、投与した量によって、胎盤抽出物サンプル中に存在するMIC-1合計量（すなわち、投与したMIC-1量プラス内因性MIC-1量）が15～70ng/mL、より好ましくは30～50ng/mLの範囲に維持される。

【0018】

MIC-1は、慣用される公知の経路のいずれかにより投与することができる。そのような投与経路としては、例えば、経口、経鼻、静脈内および筋肉内経路が挙げられる。さらに、MIC-1は子宮に直接投与することもできる。本発明はさらに、MIC-1投与のための周知の遺伝子治療技術の使用を意図するものである。そのような使用としては、例えば、発現可能なMIC-1コードヌクレオチド配列を含む組換えアデノウイルスもしくはアデノウイルス関連ベクターの使用、または適当なプロモーター配列に機能的に連結されリポソーム内に投与される線状MIC-1コードDNAの使用が挙げられる。

【0019】

第3の態様における方法は、胎盤の成長を促進し、それにより異常な胎盤の発達に伴う問題を克服することを可能とするだろう。

【0020】

その他、本発明の好ましい実施形態において、妊娠試験被験者由来の身体サンプル中のMIC-1量低下もしくは上昇の検出は、胎児異常のリスクが増加している可能性がある状態（高リスク）を示唆しうる。

【0021】

したがって第4の態様において、本発明は、胎児異常の診断方法を提供し、その方法には、以下のステップ：

- (i) 既知の妊娠期間にある妊娠試験被験者から採取した身体サンプル中に存在するMIC-1の量を測定するステップ、および
- (ii) 上記の測定した量と、上記試験被験者の既知の妊娠期間と実質的に等価な妊娠期間にある正常妊娠被験者から採取した等価な身体サンプル中に存在するMIC-1の量または量の範囲とを比較するステップ、を含む。

【0022】

本願出願人らはまた、癌に伴うMIC-1発現レベルの上昇を見出し、また試験被験者の適切な身体サンプルからのMIC-1の量を調べることが、癌、特に前立腺癌、乳癌、大腸癌、直腸癌または膀胱癌の診断（および進行のモニタリング）を可能にしうることを見出した。例えば、正常あるいは前立腺特異的抗原（PSA；前立腺癌のマーカー）のレベルが上昇した50人の被験者由来の血清サンプルにおいて、MIC-1とPSAの間に強い相関関係が観察され、また何人かの患者においては、正常レベルの10倍以上高いMIC-1のレベルが測定された（図1参照）。このことは、MIC-1が腫瘍マーカーとして、および前立腺癌における進行度の尺度として有用であることを強く示唆している。さらに、広範な種類の上皮細胞においてMIC-1の発現が観察されることは、MIC-1が同様に乳癌、大腸癌、膀胱癌などの癌に対して有用な腫瘍マーカーでありうることを示唆する。

【0023】

したがって、第5の態様において、本発明は、異常なレベルのMIC-1の発現を

特徴とする癌の診断方法または評価方法を提供するものであって、その方法は、以下のステップ：

- (i)試験被験者から採取した身体サンプル中に存在するMIC-1の量を測定するステップ、および
- (ii)上記の測定した量と、正常被験者から採取した等価な身体サンプル中に存在するMIC-1の量または量の範囲とを比較するステップ、を含む。

【0024】

好ましくは、第5の態様の方法で使用される身体サンプルは、血清、血漿、尿、脳脊髄液、関節滑液、精液または組織生検のサンプルである。

【0025】

さらに、本願出願人らは、ある種の身体サンプル中におけるMIC-1レベルの上昇が慢性関節リウマチに関連していることを見出した。例えば、コルチコステロイドを高用量で静脈内に投与する処置後の被験者の組織生検を調べることによって、浸潤細胞におけるMIC-1の発現が顕著に減少していることが示された（図2参照）。

【0026】

したがって、第6の態様において、本発明は、慢性関節リウマチの診断方法を提供するものであって、その方法は：

- (i)試験被験者から採取した身体サンプル中に存在するMIC-1の量を測定するステップ、および
- (ii)上記の測定した量と、正常被験者から採取した等価な身体サンプル中に存在するMIC-1の量または量の範囲とを比較するステップ、を含む。

【0027】

第6の態様の方法で使用される身体サンプルは、尿、脳脊髄液、精液または組織生検サンプルを使用することができる。しかし、好ましくは、該身体サンプルは血清、血漿もしくは関節滑液である。

【0028】

身体サンプル中に存在するMIC-1の量は、例えば、MIC-1に対する抗体（モノクローナルもしくはポリクローナル）またはそのフラグメントを使用するイムノア

ッセイあるいは免疫組織化学（例えば、組織生検からの切片を用いて行う）によって容易に測定することができる。抗MIC-1抗体およびそのフラグメントは当業者に公知の方法のいずれかにより作製することができる。

【0029】

第7の態様において、本発明は、被験者の炎症を治療する方法を提供し、該方法は、被験者に対し、有効量のMIC-1を、必要に応じて薬学上許容される担体および／または賦形剤と混合させて、投与することを含むものである。

【0030】

第8の態様において、本発明は、ヒト被験者における炎症性疾患および／または癌の診断方法または評価方法を提供し、該方法は、被験者から採取した適切なサンプル中においてMIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質の存在を判定するステップを含むものである。

【0031】

第9の態様において、本発明は、ヒト被験者における炎症性疾患および／または癌への素因を評価する方法を提供し、該方法は、被験者から採取した適切なサンプル中においてMIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質の存在を判定するステップを含むものである。

【0032】

好ましくは、第8および第9の態様における炎症性疾患は慢性関節リウマチである。好ましくは、第8および第9の態様における癌は前立腺癌である。

【0033】

慢性関節リウマチに関しては、MIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質の検出が、慢性関節リウマチまたは慢性関節リウマチへの素因の指標となる。前立腺癌に関しては、MIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質の検出が、前立腺癌の存在がないことまたは前立腺癌に対する素因が全くないかもしくはごくわずかである指標

となりうる。

【0034】

MIC-1変異タンパク質の存在は、正常ヒトMIC-1すなわち「野生型」MIC-1もしくはMIC-1の202位にヒスチジンを有する変異体と202位にアスパラギン酸を有する変異体とを識別しうる抗体またはそのフラグメントを使用するイムノアッセイによって容易に判定することができる。かかる抗体またはそのフラグメントは、当技術分野において一般的に知られている方法のいずれかを使用して、MIC-1またはAsp²⁰²-MIC-1に対して作製することができる。あるいは、免疫原性ペプチドを使用して、もしくは必要に応じてウシ血清アルブミンのような担体タンパク質と免疫原性ペプチドを結合させて使用することにより、好適な識別能を有する抗体またはそのフラグメントを作製することができる。かかる免疫原性ペプチドは、未成熟ヒト野生型MIC-1タンパク質の202位を含む範囲にエピトープを含み、また、変異体タンパク質の場合には、未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に相当する位置を含む範囲にエピトープを含む。例えば、Asp²⁰²-MIC-1に対して特異的に結合する抗体は、以下のアミノ酸配列を含む免疫原性ペプチドを使用して作製することができる；Ala-Arg-Asn-Gly-Asp-Asp-Cys-Pro-Leu（配列番号7）。

【0035】

好ましくは、202位または未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に相当する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1タンパク質の存在は、かかるタンパク質と特異的に結合する抗体を使用するイムノアッセイによって判定する。しかしながら、野生型MIC-1および／または202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に相当する位置にヒスチジンを有する変異体に特異的な抗体またはそのフラグメントを使用する場合、あらゆる検出可能な結合の不在または低減した結合レベルが、202位または未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に相当する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1変異体タンパク質の存在の決定因子としてみなすことができる。そのようなアッセイの場合、陽性対照は、サンプル中のMIC-1タンパク質の存在を確認するように実施するのが好ましい(例えば、野生型および変異体MIC-1タンパク質の双方と結合する非特異的抗体またはそのフラグメントを用いたイムノアッセイにより行う)。

【0036】

第1および第2の態様の方法に使用する好ましい身体サンプルは、全血、血清、血漿および尿から採取したサンプルである。組織生検もまた好適でありうる。

【0037】

202位または未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に相当する位置に通常ヒスチジンを有するMIC-1タンパク質についてヘテロ接合性またはホモ接合性である被験者は、反対に、慢性関節リウマチのような炎症性疾患に対しては素因の低減を示すが、前立腺癌のような癌に対しては素因の増大を示すことが理解されるであろう。

【0038】

したがって、第10の態様において、本発明は、ヒト被験者における炎症性疾患および／または癌の診断方法または評価方法を提供し、該方法は、被験者から採取した適切なサンプル中においてMIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にヒスチジンを有するMIC-1変異タンパク質の存在を判定するステップを含むものである。

【0039】

炎症性疾患および／または癌の評価には疾患経過の評価が含まれる。例えば、MIC-1遺伝子型およびMIC-1レベルが癌の再発(例えば、外科的除去手術後の再発)および死亡率の指標となることが見出された。すなわち、野生型MIC-1(および／または202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に相当する位置にヒスチジンを有する変異体)についてホモ接合性である被験者は、ヘテロ接合性被験者またはAsp²⁰²-MIC-1変異体についてホモ接合性である被験者よりも、通常、癌の再発(すなわち、治療後の再発)までに長い期間を有しうる。さらに、野生型MIC-1(および／または202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に相当する位置にヒスチジンを有する変異体)についてホモ接合性である被験者であって、身体サンプル(例えば、血清)中のMIC-1レベルが高い被験者は生存期間の減少を示すことが判明した。同様に、慢性関節リウマチを罹患する被験者であって、Asp²⁰²-MIC-1変異体についてヘテロ接合性であるかまたはホモ接合性である被験者は、野生型MIC-1(および／または202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に相当

する位置にヒスチジンを有する変異体)についてホモ接合性である被験者よりも疾患の程度が重篤であると経験的に考えられることが判明した。

【0040】

第11の態様において、本発明は、ヒト被験者における炎症性疾患および／または癌への素因を評価する方法を提供し、該方法は、被験者から採取した適切なサンプル中においてMIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にヒスチジンを有するMIC-1変異タンパク質の存在を判定するステップを含むものである。

【0041】

さらに本発明は、ヒト被験者における炎症性疾患および／または癌への素因を診断または評価する方法に関し、該方法は、該被験者の遺伝子型を決定(すなわち、MIC-1対立遺伝子構成を評価)するステップを含むものである。かかる方法は、上記したような識別能を有する抗MIC-1抗体を含むイムノアッセイを利用することができ、あるいは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)解析または対立遺伝子間の一塩基の相違を検出する任意の他の技法(Current Protocols in Human Genetics Supplement 21, Chapter 7によってそのような方法の概説のいくつかが示される)を使用するDNAレベルでの評価を含みうる。

【0042】

したがって、さらなる態様において、本発明は、MIC-1に関してヒト被験者の遺伝子型を決定する方法を提供し、該方法は、202位に(例えば、野生型MIC-1の場合)もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に相当する位置にヒスチジンを有するMIC-1タンパク質に対して、または、202位にもしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に相当する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質に対して、該被験者がホモ接合性であるかヘテロ接合性であるかを判定するステップを含むものである。

【0043】

さらに別の態様において、本発明は、ヒト被験者における炎症性疾患および／または癌を診断する方法、あるいは、炎症性疾患および／または癌への素因を評価する方法を提供する。該方法は、MIC-1に関してヒト被験者の遺伝子型を決定

するステップを含むものであり、該ステップは、202位に(例えば、野生型MIC-1の場合)もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に相当する位置にヒスチジンを有するMIC-1タンパク質に対して、または、202位にもしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に相当する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質に対して、被験者がホモ接合性であるかヘテロ接合性であるかを判定することを含むものである。

【0044】

ホモ接合性D6/D6遺伝子型(すなわちこの場合、両方のMIC-1対立遺伝子が未成熟ヒト野生型 MIC-1の202位に相当する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質をコードしている)であると決定された被験者およびヘテロ接合性H6/D6遺伝子型であると決定された被験者は、炎症性疾患を罹患するか、もしくは炎症性疾患への素因を示すことが予想されうる。さらに、かかる被験者は、前立腺癌には罹患しないか、および/または、前立腺への素因を全くもしくはわずかにしか示さないことが予想されうる。反対に、ホモ接合性H6/H6遺伝子型であると決定された被験者は、前立腺癌への素因の増大を示すことが予想されうる。

【0045】

変異体MIC-1対立遺伝子は、試験被験者から採取した任意の好適なサンプル(例えば、頬細胞サンプル)から単離されたDNAまたはRNAを使用して得られたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)産物の配列決定または制限酵素切断解析によって簡便に調べることができる。あるいは、標的とする野生型MIC-1配列または変異MIC-1配列からのみPCR産物が産生されることを確実にするために、MIC-1コード配列の可変領域を標的とするプライマーを使用する高ストリンジェンシー条件下でPCRを行うことができる。

【0046】

ヒトMIC-1(すなわち、「野生型」)および変異体Asp²⁰²-MIC-1のDNA配列およびアミノ酸配列を図3に示す。

【0047】

本明細書中で使用する場合、「未成熟ヒト野生型MIC-1」とは、図3において「MIC-1/H6」として示されるアミノ酸配列を有するMIC-1タンパク質を意味する

。また、「野生型MIC-1」とは、上記タンパク質の成熟形態（すなわち、切断によりリーダー配列が除去されている）を意味する。

【0048】

明細書中を通じて使用する「含む」（comprise、comprisesおよびcomprising）という語は、さらなるステップ、成分、もしくは特性、またはステップ群、成分群、もしくは特性群を含みまたは含むことなく、上記のステップ、成分、もしくは特性、またはステップ群、成分群、もしくは特性群を含むことを意味することを意図するものである。

【0049】

本願明細書に含まれている文献、行為、材料、装置、物質等の全ては、単に本発明の内容を提供するものである。これらの事項のいずれかまたは全てが、本願の各特許請求の範囲における、優先日前にオーストラリアに存在していた本発明に関連する分野における従来技術にもとづく一般的知識または共通した一般的知識の部分を構成するものであるとみなされるものではない。

【0050】

以下の非制限的实施例および添付の図面を参照することにより本発明を以下に説明する。

【0051】

実施例1：妊娠女性におけるMIC-1発現の評価

方法：

血清および羊水サンプル：

血清サンプルを正常な単生児妊娠の健常妊娠女性22人から採取した。試験したいずれの女性も薬物を摂取していなかった。各事例において、妊娠期間は初期妊娠超音波走査により決定した。その後、全ての女性が満期（37～41週）で健常な正常に成長した乳児を正常な経膈分娩により分娩した。血清サンプルは、妊娠10～14週間に6人の女性から、妊娠の26～30週および37～40週間に8人の女性から採取した。この時期は各トリメスターの最後に相当する。各トリメスターに対応するサンプルをプールした後、MIC-1レベルを測定した。また4人の女性からは妊娠30週から分娩までほぼ毎週に連続母体血清サンプルを採取した。またこ

の4人の女性は全て正常な単生児妊娠で健常であり、また妊娠満期に正常経膈分娩により正常な健常乳児を分娩した。さらに、10人の女性から、妊娠15～17週に胎児染色体分析のために羊水穿刺検査を行って、羊水を採取した。全事例において、染色体分析の適応は高齢の母体(>37歳)であった。羊水も同様にプールした後にMIC-1レベルを測定した。

【0052】

胎盤抽出物：

100～150mgの胎盤組織（生理食塩水で4～5回洗浄し、液体窒素で凍結して-80℃で保存した）を1mのリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）中でホモジネートした。ホモジネートを10,000rpmで30秒間遠心し、上清をチューブに移した。総タンパク質をBCA総タンパク質アッセイ（Pierce）を用いて製造業者の指示に従って測定した。0～1000 μg/mlの範囲のBSA溶液を標準溶液として使用した。

【0053】

BeWo細胞培養：

ヒト絨毛癌栄養膜細胞系（BeWo）はATCC（Rockville, MD）から購入した。96ウエルの組織培養プレートに、4.5g/l D-グルコース、110mg/lピルビン酸ナトリウム、0.584g/l L-グルタミン、4mg/l塩酸ピリドキシンおよび1×Nutridoma-SR（Boehringer Mannheim, Germany）を含むダルベッコの改変イーグル培地（DME M；Gibco BRL）250 μl中に1ウエル当たり5000個の上記細胞を接種し、5%二酸化炭素の存在下で37℃にて1～5日間培養した。この時点で、培養プレートを1000rpmで10分間遠心し、上清を取り出し、MIC-1の定量まで-20℃で保存した。

【0054】

MIC-1 mRNA合成の逆転写酵素－ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）分析：

96ウエルプレート中のBeWo単細胞層から、Tri-Pure試薬（Roche）を用いて製造業者により指示される方法で総RNAを単離した。1 μg RNA、poly (T)₁₅プライマーおよび50ユニットのExpand逆転写酵素（Roche）を用いて製造業者が推奨する条件を用いて、総反応量20 μlで逆転写（RT）を行った。RT反応のアリコート5 μlをPfuポリメラーゼ（Promega）および下記のプライマーを用いてPCR反応で増幅した：

MSB-1 (5'-AGGACCTGCTAACCAGGCTGCGGGCCAACCAGAGC-3'; 配列番号5) および

MSB-5 (5'-GGCTAACAAGTCATCATAGGTCTGGAGCGACAC-3'; 配列番号6)

これらはMIC-1の1つのイントロンと隣接するものである。PCR条件は次のとおりとした：最初の変性ステップを95℃にて1分間、続いて、95℃にて30秒、60℃にて30秒、72℃にて2分間を35サイクル行った。RNAを除いたRT反応を陰性対照として用い、MIC-1 pre-pro-MIC/FLAGコード配列 (Bootcovら、1997) を有するプラスミドを陽性対照として実験に含めた。PCR産物は0.8% (w/v) アガロースゲル上で分離させた。

【0055】

MIC-1抗体の作製：

ヒツジ抗MIC-1ポリクローナル抗体 (Pab) 233B3は、国際特許公報W0 97/00958号に記載の方法に従って合成した組換えヒトMIC-1 (rhMIC-1) を完全フロイントアジュバントと共に用いて免疫感作することにより作製した。追加免疫は6ヶ月の期間にわたって行い、最終免疫 (注射) 後10日目にヒツジから採血した。IgG画分に富む正常ヒツジ血清および233B3は、カプリル酸沈降とそれに続く硫酸沈降により調製した。IgG富化233B3画分を233Pと称した。

【0056】

マウス抗MIC-1モノクローナル抗体 (MAb) 分泌ハイブリドーマは、rhMIC-1で免疫したマウスから作製した。ハイブリドーマを、20%FCS (CSL, Melbourne) を添加した、4.5g/l D-グルコース、110mg/l ピルビン酸ナトリウム、0.584g/l L-グルタミン、4mg/l塩酸ピリドキシンを含むDMEM (Gibco BRL) 中で培養した。MAbを回収するために、ハイブリドーマを、Nutridoma-SR (Boehringer Mannheim) を添加した新鮮なDMEM-hiグルコースに7日間移した。培養上清を2000rpmで10分間遠心し、細胞破碎物を除去し、使用まで凍結した。PabおよびMAb調製物の感受性は直接ELISA法により確認した。

【0057】

直接ELISA法：

Maxisorp ELISA 96ウェルプレート (Nunc) は、被覆用バッファー (蒸留水中0.1M 炭酸塩、pH 9.4-9.8) 中の18 ng/ml rhMIC-1または20 ng/ml rhTGF-β1 (R

& D Systems) のいずれかで40℃にて24時間かけて被覆 (100 μ l/ウエル) した。次にプレートを300 μ lの洗浄バッファー (0.05% (v/v) Tween-20 (Sigma)を含有するPBS) で3回洗浄し、非特異的結合を、PBS中1% (w/v) BSA (Boehringer Mannheim) 250 μ lで37℃にて2時間ブロッキングした。抗体希釈液 (1% (w/v) BSAおよび0.05% (v/v) Tween-20を含有するPBS) で500,000倍希釈した抗MIC-1 MAbおよびヒツジPAb 233B3-Pを含有するハイブリドーマ血清不含培地; マウスミエローマ細胞系SP2/0で調整した培養培地; DMEM+Nutridoma; 抗体希釈液で500,000倍希釈したイムノグロブリンG富化正常ヒツジ血清; DMEM+Nutridoma中の200 ng/ml マウスIgG1 (R & D Systems) ; または抗体希釈液単独、をプレートに添加し (100 μ l/ウエル) 、37℃にて1時間インキュベートした。プレートを3回洗浄した後、抗体希釈液で10,000倍希釈したビオチン化ロバ抗ヒツジIgG (Jackson ImmunoResearch) またはビオチン化ヤギ抗マウスIgG (Jackson ImmunoResearch) を100 μ l/ウエルで添加して、37℃にて1時間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、抗体希釈液で2000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートストレプトアビジン (Genzyme) を100 μ l/ウエルでプレートに添加し、37℃にて30分間インキュベートした。プレートを4回洗浄した後、100 μ l/ウエルのペルオキシダーゼ基質 (0.014% H_2O_2 , pH5.0 (Sigma) を含む0.05M リン酸-クエン酸バッファー中の1 mg/ml o-フェニレンジアミンジヒドロクロリド (Sigma)) を添加した。呈色反応を5~15分間にわたり行い、100 μ l/ウエルの4N H_2SO_4 を添加して呈色反応を終結させた。吸光度はマイクロプレートリーダー (Paster Diagnostics) において490nmにて測定した。

【0058】

MIC-1サンドイッチELISA法:

MIC-1サンドイッチELISA法は、抗原捕捉に抗MIC-1マウスMAb、検出にヒツジPAb 233-Pを用いて行った。両抗体の最適濃度は経験に基づいて決定して以下の全試験に使用した。96ウエルのMaxisorp ELISAプレートを、被覆用バッファーで5倍希釈した抗MIC-1 MAb上清 (最終イムノグロブリン濃度は約20ng/mlとした) で40℃にて24時間かけて被覆した。続いてプレートを300 μ lの洗浄バッファーで3回洗浄し、非特異的結合を250 μ lの1% (w/v) BSAのPBS溶液で37℃にて2時間か

けてブロッキングした。次に抗体希釈液で希釈したrhMIC-1標準、組織培養上清、母体血清、胎盤抽出物または羊水をプレートに添加し（100 μ l/ウェル）、37℃にて1時間インキュベートした。プレートを3回洗浄した後、抗体希釈液で5000倍希釈したヒツジPAb 233-Pを100 μ l/ウェルで添加し、37℃で1時間インキュベートした。続いてプレートを3回洗浄し、抗体希釈液で5000倍希釈したビオチン化ロバ抗ヒツジIgGを100 μ l/ウェルで添加し、37℃にて1時間インキュベートした。その後、直接ELISA法を行うためにプレートを発色させた。サンプル中のhMIC-1濃度は、rhMIC-1標準曲線との比較により決定した。この標準曲線におけるrhMIC-1レベルは総タンパク質含量に基づいて決定しているため、絶対量の点では明らかな誤りとなる。しかしながら、本実施例全体にわたって同じ標準を用いたために、本実施例において評価した相対値には差が生じなかった。全サンプルを少なくとも2つの試験（occasion）において3連でアッセイした。結果は、平均値 $\pm$ SDとして表す。MIC-1サンドイッチアッセイの感度は、500 pg/mlまでの量のTGF- β 1およびインヒビンA（いずれもTGF- β スーパーファミリーに属する）を用いて試験することにより評価した。

【0059】

免疫沈降法：

免疫沈降法は、プロテインAセファロースに吸着させた抗MIC-1 MAbを含む0.2 mlのハイブリドーマ用血清不含培地を用いて行った。血清および培地サンプル（1 ml）を上記抗体と共に40℃にて一晩インキュベートした後、1% (v/v) Triton X-100を含有するPBSで5回洗浄した。結合したタンパク質は、非還元ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）-サンプルバッファーを用いて溶出し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）（Laemmli, 1970）とそれに続くヒツジポリクローナル抗体233-Pを用いたイムノブロット分析により分析した。イムノブロット分析は、ポリクローナル抗体233-Pを7000倍希釈して1次抗体として使用し、ロバ抗ヒツジIgG-ビオチンを5000倍希釈して2次抗体として使用した以外は、本質的にBootcovら(1997)により記載された手法に従って行った。

【0060】

結果：

抗MIC-1 PAbおよびMAbの感受性：

ヒツジPAb 233-Pおよびマウス MAbがrhMIC-1に結合する能力は、直接ELISA法により調べた。抗体希釈液で500,000倍希釈したMAbおよびヒツジPAb 233-Pを含む未希釈組織培養上清はいずれも1.8 ngの固定化rhMIC-1と強く結合したことがわかった（図4）。マウスミエローマ細胞系SP2/0で調整した培養培地、未調整培養培地、マウスIgG1、イムノグロブリン富化正常ヒツジ血清、または抗体希釈液単独はいずれもrhMIC-1とは反応しなかった。非被覆ウェルに対する最小のバックグラウンド結合は、試験した全サンプルで観察された。抗MIC-1 MAbまたはポリクローナル抗体233-Pを固定化rhTGF- β 1と共にインキュベートした場合にはいずれにおいても反応は検出されなかった。

【0061】MIC-1サンドイッチELISA法：

10～500 pg/ml の範囲でrhMIC-1を精密に定量することが可能な、抗MIC-1 MAbおよびPAb 233-Pを用いるサンドイッチELISA法を確立した（図5）。ヒト血清および培養培地中に存在する因子がこのサイトカインの測定に及ぼす影響を調べるために、500 pg/mlのrhMIC-1を10%(v/v)正常ヒト血清または10%(v/v) DMEM+Nutridomaのいずれかを含有する抗体希釈液に添加した後、定量した。サンドイッチELISA法は補正值（correct value）5%以内で正確であることがわかった。試験毎の変動は5%未満であった。TGF- β 1およびインヒビンAを用いるサンドイッチELISA法においては、これらの構造的に関連したサイトカインとの交差反応は観察されなかった。

【0062】妊娠期間中の段階的な妊娠母体血清のMIC-1レベルの増大

プールした血清サンプルを抗体希釈液で1：5～1：20に希釈した後、サンドイッチELISA法によりMIC-1を定量した。プールした正常ヒト血清は、約0.36（ $\pm$ 0.04）ng/mlのMIC-1を含有していることを確認した（図6A）。プールした母体血清においては、MIC-1濃度が妊娠期間の間に顕著に増大することが認められた。第1トリメスターに対応する母体血清サンプルは約6.3（ $\pm$ 0.02）ng/mlのMIC-1を含有し、第2トリメスターには12.24（ $\pm$ 0.54）にまで上昇し、第3トリメス

ターには15.3 (±1.31) ng/mlでピークを示した。

【0063】

免疫沈降法を利用して、妊娠期間におけるプールした母体血清サンプル中のMIC-1の存在を確認した。MIC-1は、抗MIC-1 Mabを用いた免疫沈降法、続いてPAb 23B3-Pを用いたイムノブロット分析により可視化した。ジスルフィド結合した成熟MIC-1ペプチドに対応する1バンド (約25kDa) を第2および第3トリメスターの妊娠血清サンプルにおいてみとめることができる (図6 B、レーン3～4)。最大MIC-1レベルは、第3トリメスターのサンプルにおいてみとめられた。イムノブロット分析の感度が低いために、正常血清または第1トリメスターに相当するサンプルにおいては類似したバンドは観察されなかった (図6 B、レーン1～2)。

【0064】

母体血清MIC-1濃度もまた4人の妊娠女性からの連続サンプルにおいて調べた。妊娠30週において、4人の女性由来の血清全てが約4 ng/mlのMIC-1を含有していた (図7)。母体血清MIC-1レベルは妊娠30週から分娩まで増大することがみとめられた。MHおよびJBと称する検体は、妊娠の最終週においてMIC-1母体血清レベルがわずかに低減していた。

【0065】

MIC-1は羊水中で検出可能である：

母体血清の他、染色体分析を目的として第2トリメスターに10人の女性から採取した羊水をプールし、サンドイッチELISA法によりMIC-1レベルを定量した。プールした羊水サンプルは約13.68 (±0.16) ng/mlのMIC-1を含有することが確認された (図6 A)。プールした羊水の免疫沈降法およびウエスタンブロット分析によって、ジスルフィド結合した成熟MIC-1ペプチドに相当する約25kDaのバンドが明らかとなった (図6 B、レーン5)。

【0066】

MIC-1はヒト胎盤抽出物中で検出可能である：

胎盤が妊娠女性の血清中の循環MIC-1の主な由来源であるかどうかを試験するために、MIC-1の存在について5つのヒト胎盤抽出物をサンドイッチELISA法によ

り調べた。全5つのサンプルは5.04~54ng/mlの濃度範囲でMIC-1陽性であることがわかった(図8)。重要なことは、早産から唯一得られたPL2と称するサンプルの含有するMIC-1レベルが他のサンプルよりもはるかに低かったことである。

【0067】

BeWo培養細胞はMIC-1 RNAを構成的に発現し、成熟MIC-1を分泌する：

高レベルのMIC-1は胎盤抽出物中で検出されたが、胎盤栄養膜細胞系であるBeWoもまたこのサイトカインを産生する可能性があると考えられた。従って、休止状態のBeWo細胞で調整した組織培養培地は、サンドイッチELISA法により分泌MIC-1の存在について試験を行った。BeWo細胞の24時間培養に使用した培地は約21.6 (±2.95) ng/mlのMIC-1を含有していることが確認された(図9A)。5日間のインキュベーション後の培養培地中のMIC-1濃度は約117 (±7.2) ng/mlまで増大した。非刺激BeWo細胞のMIC-1分泌能もまた免疫沈降法およびウエスタンブロット分析により調べた。高レベルで分泌された成熟MIC-1は、約25kDaのバンドとして示されるが、これが5日間にわたりBeWo細胞で調整した培地において観察された(図9B)。55kDaおよび12.5kDaの位置に移動した他のバンドが観察されたが、これはそれぞれMIC-1が不完全にプロセシングされた半二量体(hemidimer)および単量体を表すと考えられる。BeWo細胞に暴露されなかった培養培地は、サンドイッチELISA法または免疫沈降法で試験した場合に検出可能なMIC-1を含有していなかった。

【0068】

RT-PCRを使用して非刺激BeWo細胞におけるMIC-1転写産物の存在を調べた。総RNAを24時間培養したBeWo細胞から抽出し、上述のようにRT-PCRを行った。0.4kbpの単一産物が観察され、これはMIC-1転写産物がBeWo細胞に存在することを示している(図9C)。BeWoまたはプラスミドDNAの不在下では産物が検出されなかった。

【0069】

考察：

実施例1の結果は、MIC-1が母体血清中に大量に存在し、そのレベルは妊娠の進行に伴って実質的に上昇することを示している。

【0070】

妊娠期間の母体血清においてMIC-1レベルの上昇が起こるが、これは発育中の胎児がこのサイトカインに暴露されていることを必ずしも意味するものではない。しかしながら、羊水中でMIC-1が検出されたということは、胎児への暴露についての直接的な証拠を示している。羊水中のMIC-1レベルは第2および第3トリメスターの母体血清中に存在するレベルと匹敵しており、これは正常ヒト血清中に存在するレベルよりもはるかに過剰である。妊娠期間に胎児が大量の羊水を摂取し、また胎児の薄い上皮から羊水を吸収する可能性もある。従って上記知見は、発育中の胎児が高濃度のMIC-1に暴露されていることを示す強力な証拠となる。

【0071】

母体血清MIC-1および羊水MIC-1が胎児または母胎を由来源としているかどうかを調べるために、ヒト胎盤抽出物中のMIC-1を測定し、これにより、その抽出物が大量のMIC-1タンパク質を含有することが確認された。興味深いことに、5つの胎盤抽出物のうち4つに存在するMIC-1量(>18 ng/ml)は、プールされた母体血清および羊水中で検出されたものよりも高かった。免疫組織化学およびin situハイブリダイゼーションを利用することによりMIC-1転写産物およびMIC-1タンパク質が、合胞体栄養細胞層に多量に存在する構造体である胎盤の終末絨毛(terminal villi)に存在することが確認されている(Paralkarら、1998)。従って、このことはBeWoヒト栄養膜細胞系がこのサイトカインを合成し分泌する可能性を示す根拠となる。BeWo細胞はMIC-1転写産物を構成的に発現し、休止状態で多量のMIC-1を分泌する。このような知見は、胎盤内の栄養膜細胞が母体血清および羊水中に存在するMIC-1の主な由来源となることを示唆している。しかしながら、MIC-1転写産物およびMIC-1タンパク質がラットの18日胚における発生中の上皮に局在化するという事実(Paralkarら、1998)は、この胚もまた観察されたMIC-1レベルに寄与している可能性があることを示唆している。

【0072】

妊娠期間におけるMIC-1の正確な役割は未知である。しかしながら、上述した結果および他に報告されている実験結果に基づいた場合、MIC-1は妊娠期間中の

免疫調節的な役割を果たしていると考えられる。例えば、rhMIC-1がLPS活性化マクロファージからの炎症性サイトカインの放出を抑制することが既に報告されている(Bootcovら、1997)。さらに、MIC-1は、正常ヒト非付着性T細胞が枯渇した骨髄細胞からの赤血球および顆粒球/マクロファージ細胞系統の形成を抑制することが知られている(Hromasら、1997)。これらの知見は、MIC-1が炎症の広範なインヒビターであり、単球/マクロファージ系統の発達およびそれらの前炎症媒介物質の産生能力の両者を抑制することを示している。

【0073】

炎症誘発性サイトカイン産生に伴う子宮内炎症は、胎児に対する生体拒絶または未熟児分娩に関連している(Romeroら、1992; Hillierら、1993; Opsjonら、1993)。この点に関して、本発明者は、胎盤および羊水中に存在するMIC-1が子宮内の炎症誘発性サイトカインの産生を抑制することにより妊娠を維持するために作用していると考えている。正常妊娠と比較して早産分娩に由来する胎盤抽出物が含有するMIC-1濃度が低下していたという本実施例の知見は、上記考察を強く支持するものである。

【0074】

実施例2：イムノアッセイによるMIC-1変異体の検出および遺伝子型決定

MIC-1のクローニング過程において、このTGF- β スーパーファミリーのサイトカインには少なくとも2種類の対立遺伝子が存在することがわかった。その後のヒトを対象とした実験においては、2つの対立遺伝子が一般的な集団においてみとめられることが確認された。これらの対立遺伝子は、成熟正常、すなわち「野生型」MIC-1のアミノ酸配列の6位におけるヒスチジン(H6)が6位におけるアスパラギン酸(D6)に変化する点突然変異において異なっている。これは、弱塩基性の芳香族アミノ酸から強酸性の非環式アミノ酸への非保存的置換であることを示している。

【0075】

方法および結果：

抗MIC-1抗体の作製：

抗MIC-1モノクローナル抗体(Mab)を分泌するハイブリドーマは、国際特許公

報W0 97/00958号に記載の方法に従って酵母 (*Pichia pastoris*) で産生させた組換えヒトMIC-1 (rhMIC-1) で免疫したマウスから作製した。ハイブリドーマを、20%FCS (CSL, Melbourne) を添加した、4.5g/l D-グルコース、110mg/l ピルビン酸ナトリウム、0.584g/l L-グルタミン、4mg/l塩酸ピリドキシンを含むDMEM (Gibco BRL) 中で培養した。Mabを回収するために、ハイブリドーマを、Nutridoma-SR (Boehringer Mannheim) を添加した新鮮なDMEM-hiグルコースに7日間移した。培養上清を2000rpmで10分間遠心し、細胞破砕物を除去し、使用まで凍結した。

【0076】

回収したMabに対して、多数かつ種々のMIC-1関連物、MIC-1突然変異体及びMIC-1キメラを用いたウエスタンブロット分析によりエピトープマッピング試験を行った。Mabは全てMIC-1のマウス相同体またはhTGF- β 1のいずれとも交差反応せず、Mabエピトープは全てコンホメーションに依存的であった。種々の抗原との区別可能な交差反応パターンが各Mabについて観察され、このことは、MIC-1表面上には少なくとも5つの免疫原性領域が存在することを示唆している。このMabのうちの2種 (13C4H3および26G6H6) をそれらの高親和性 (それぞれED50の範囲は $1.3\sim 2.5\times 10^{-9}$ Mである) に基づいてさらなる試験のために選択した。

【0077】

Mab 13C4H3は、Asp²⁰²-MIC-1の対応するエピトープの親和性よりもはるかに高い親和性を有する成熟ヒト野生型MIC-1 (すなわち6位がヒスチジン) のアミノ末端 (1-13位) に結合することが見出され、それにより、ヒト野生型MIC-1とAsp²⁰²-MIC-1とを区別することが可能となる。Mab 13C4H3はマウス-ヒトMIC-1キメラ (ヒト配列と異なるアミノ末端 (1-13) のアミノ酸は全てヒトMIC-1の対応するアミノ酸と置き換えられている) を認識することはできなかったため、アミノ末端以外にもヒトとマウスのタンパク質の差異をもたらす他の残基が関与している可能性がある結論付けた。

【0078】

Mab 26G6H6は、MIC-1のいわゆる「フィンガー」の先端部分に近接するエピトープ (成熟ヒト野生型MIC-1の24-37位、56-68位および91-98位の領域内のアミノ

酸を含む) に対して反応することが見出された。Mab 26G6H6は6位にヒスチジンまたはアスパラギン酸を有するMIC-1タンパク質を区別することができなかった。

【0079】

従って、上記の抗体は、イムノアッセイにおいて結合したMIC-1レベルを測定することによってヘテロ接合性個体とホモ接合性個体を検出することが可能である。すなわち、Mab 13C4H3を用いた場合には、H6/H6ホモ接合体では最大結合が観察され、D6/D6ホモ接合体では結合なし（ゼロ）が観察されると予想されるが、中間（例えば50%）レベルの結合は、H6/D6ヘテロ接合体であると予測される。

【0080】

上記抗MIC-1抗体のエピトープ結合特異性は、Fairlieら、2001に詳細に記載されている。

【0081】

26G6H6を用いた総MIC-1の測定：

ELISAプレート (Maxisorb, Nunc) を、多く蒸発することを防ぐよう注意しながら重炭酸バッファーpH 9.4-9.8中1:500の26G6H6 80 µlを用いて4℃にて24時間かけて被覆し、MIC-1濃度測定値に応じてサンプルをサンプルバッファー（1% w/v BSA (Progen) および0.05% v/v Tween (Sigma) を含むPBS (pH7.2)）で3～100倍希釈した。MIC-1の「標準」は、サンプルバッファーで1 µg/ml rhMIC-1（1% BSA w/v、3 mM HCl中）を1000倍希釈した後、8倍希釈（1000 pg/ml～7.8 pg/ml）して調製した。

【0082】

アッセイを以下のとおり行った：

被覆プレートを洗浄バッファー（PBS中0.05% v/v Tween）を用いて300 µl/ウェルで3回洗浄した。ブロッキングは、250 µlの1% BSA w/vと共に21℃にて1時間インキュベートすることにより行った。続いてブロッキングバッファーを除き、その間に洗浄を行わずに100 µl/ウェルの標準またはサンプルを21℃にて1時間かけて添加した。次に、検出抗体である233-Pをサンプルバッファーで25000

倍 (v/v) 希釈し、添加 (100 μ l/ウエル) し、4 $^{\circ}$ Cにて16時間インキュベートした。サンプルバッファーで5000倍 (v/v) 希釈したロバ抗ヒツジビオチン化IgG (Jackson's Laboratories) を21 $^{\circ}$ Cにて1時間かけて100 μ l/ウエルで添加した後、サンプルバッファーで2000倍 (v/v) 希釈したストレプトアビジン-HRPコンジュゲート (Genzyme) と共に (100 μ l/ウエル)、21 $^{\circ}$ Cにて30分間インキュベートした。製造業者が推奨するバッファー中0.4 mg/mlのOPD (Sigma) を100 μ l/ウエルで、7.8pg/mlの標準とゼロの標準とに明らかな差がみとめられるまでインキュベートした。1000pg/mlの標準は少なくとも1より大きいODをしめすことになる。最後に、100 μ l/ウエルの2N H_2SO_4 を用いて反応を停止させた。

【0083】

プレートは490nmで読みとることができ、標準曲線を2つの結合部位の双曲線を用いて作成した。サンプルの値はこの曲線から外挿してもとめた。

【0084】

検出抗体233-Pの添加前からOPDの添加までの各ステップの後にはプレートを30 μ l/ウエルの洗浄バッファーで洗浄した。

【0085】

抗MIC-1 PAbおよびMabの感受性および特異性：

ヒツジPAb 233-PおよびマウスMab 13C4H3のrhMIC-1に対する結合能を直接ELISA法により調べた。抗体希釈液で500000倍希釈したMab 13C4H3およびヒツジPAb 233-Pを含む未希釈組織培養上清の両者が1.8ngの固定化rhMIC-1と強く結合することがわかった。rhMIC-1と、マウスミエローマ細胞系SP2/0で調整した培養培地、未調整培養培地、マウスIgG1、イムノグロブリン富化正常ヒツジ血清または抗体希釈液との間に反応は観察されなかった。非被覆ウエルに対する結合の最小バックグラウンド値は試験した全サンプルについて観察された。13C4H3または233-Pを固定化rhTGF- β 1と共にインキュベートした場合にはいずれにおいても反応は検出されなかった。

【0086】

抗体の特異性は、精製rhMIC-1とMab 13C4H4および26G6H6を用いた免疫沈降法と、その後の種々のMIC-1特異的抗体を用いたイムノブロット分析により調べた

。MIC-1抗体は全て25kDのMIC-1二量体を特異的に認識した。さらに、抗体のプロッキングは、精製rhMIC-1と共に抗体をプレインキュベートすることにより行い、その後ウエスタンブロット分析を行った。この結果、抗体とMIC-1特異的25kDバンドとの相互作用が大幅に低減し、このことは抗体Mab 13C4H4、26G6H6および233-Pの特異性を確証している。更に、試験した上記抗体はTGF- β スーパーファミリーの他のメンバーであるインヒビンを認識しなかった。典型的なアッセイ標準曲線を図10に示す。誤差を示すバー（error bar）は1つの標準偏差を示す。

【0087】

13C4H4を用いたMIC-1遺伝子型の判定：

多数のMIC-1エピトープに対して検出抗体233-Pの親和性が高いほど、13C4H4と比較してH6対立遺伝子とD6対立遺伝子との間に検出されるMIC-1の差は大きくなる。この差は、H6エピトープおよびD6エピトープの13C4H4に対する親和性の差異の関数である。233-Pの存在は、長い時間にわたるインキュベーションにおいて、捕捉抗体13C4H4と結合するD6を次第に低下させる。これらの未結合となった分子は、13C4H4結合部位に対し特異的なポリクローナル抗体のより高い親和性成分と次第に結合することになる。これらの分子は測定されるMIC-1から排除されたことになる。

【0088】

他の作用もまた観察される。すなわち、捕捉抗体との結合から排除されたMIC-1の各分子は、多数の233-P抗体を排除する。これにより、233-PがポリクローナルであるためMIC-1分子の多くの部分と結合する。結果としては、MIC-1と233-Pとの免疫複合体がアッセイから排除されるということである。233-P抗体はバックグラウンド値の主な寄与因子であるため、観察されるMIC-1濃度の差はさらに増大する。ホモ接合性D6/D6遺伝子型の場合には、バックグラウンド染色は、広範な濃度差にわたってゼロ以下の読み取り値が得られる点まで低減する。H6対立遺伝子の場合には、ポリクローナル抗体との結合から遊離するMIC-1の比率は非常に低く、観察されるMIC-1濃度とはさらに大きく異なっている。

【0089】

特定のサンプルにおけるMIC-1濃度およびMIC-1対立遺伝子を判定するために行った2つのサンドイッチ酵素結合免疫吸着アッセイはそれぞれ26G6H6および13C4H4を捕捉抗体として使用している。分析サンプルは、組織培養物（組織培養培地もしくは細胞抽出物）、ヒト血清または血漿、あるいは、液相状態のまたは任意の処理により液相状態に処理された任意のヒトサンプルに由来するものとする。

【0090】

アッセイには、重炭酸バッファーpH9.4-9.8中の13C4H4（1：500）80 μ lを用いて4 $^{\circ}$ Cにて24時間かけて被覆したELISAプレート（Maxisorb, Nunc）を用いた（多くの蒸発を防ぐために注意を払う必要がある）。13C4H4アッセイ濃度で判定したMIC-1測定値に応じて、サンプルをサンプルバッファー（PBS, pH7.2中1% w/v BSA（Progen）、0.05% v/v Tween（Sigma））で3～100倍に希釈した。サンプル濃度は50～150pg/mlとなるようにする必要がある。MIC-1標準（1% BSA w/v, 3mM HCL中の1 μ g/ml組換えMIC-1）をサンプルバッファーで1000倍希釈し、その後8倍希釈を行った（1000pg/ml～7.8pg/ml）。

【0091】

アッセイは以下のとおり行った：

被覆プレートを洗浄バッファー（PBS中0.05% v/v Tween）を用いて300 μ l/ウェルで3回洗浄した。ブロッキングは、250 μ lの1% BSA w/vと共に21 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベートすることにより行った。続いてブロッキングバッファーを除き、その間に洗浄を行わずに100 μ l/ウェルの標準またはサンプルを21 $^{\circ}$ Cにて1時間かけて添加した。検出抗体である233-Pはサンプルバッファーで10000倍（v/v）希釈してから添加し（100 μ l/ウェル）、4 $^{\circ}$ Cにて16時間インキュベートした。サンプルバッファーで5000倍（v/v）希釈したロバ抗ヒツジビオチン化IgG（Jackson's Laboratories）を添加し（100 μ l/ウェル）、21 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベートした後、サンプルバッファーで2000倍（v/v）希釈したストレプトアビジン-HRPコンジュゲート（Genzyme）と共に（100 μ l/ウェル）、21 $^{\circ}$ Cにて30分間インキュベートした。7.8pg/mlの標準とゼロの標準との間に明らかな差がみとめられるまで、製造業者が推奨するバッファー中0.4mg/mlのOPD（Sigma）を100 μ l/

ウェルでインキュベートした。1000pg/mlの標準は、少なくとも1より大きいODを示すはずである。100 μ l/ウェルの2N H_2SO_4 を用いて反応を停止させた。

【0092】

プレートは490nmで読みとることができ、標準曲線を2つの結合部位の双曲線モデルを用いて作成した。サンプルの値はこの曲線から外挿してもとめた。

【0093】

検出抗体233-Pの添加前からOPDの添加までの各ステップの後にはプレートを30 μ l/ウェルの洗浄バッファーで洗浄した。

【0094】

考察：

MIC-1対立遺伝子を判定するために、13C4H6アッセイから得られたMIC-1濃度の測定値を26G6H6アッセイで測定した総MIC-1濃度で割った。それぞれの対立遺伝子に対するカットオフ比率は、両方のアッセイにおいて使用したホモ接合性H6/H6およびD、ならびにヘテロ接合性（HD）対照により判定した。検定データを以下に示すように入れた。

【0095】

0（ゼロ）未満の比率はホモ接合性D6/D6遺伝子型を、0～0.6はヘテロ接合性を、そして0.7以上の比率はホモ接合性H6/H6を示す。1を超える比率があることに留意されたい。アッセイの動特性のために、ホモ接合性D6/D6タンパク質に関しては、濃度が高い場合にはODが0をはるかに下回ることもある。

【0096】

38人の健常で通院可能な研究者から得られたデータは、表の形式で以下に示す。DNA配列決定により調べたところ、これらのうち18人がMIC-1遺伝子型を有していた。18人の被験者のDNA配列とELISA法により判定した遺伝子型は100%一致していた。さらに95サンプルを分析したが、このサンプルは、48人の20～69歳の男性と47人の17～71歳の女性を含む健常な血液ドナーから得られたものである。ホモ接合性D6/D6遺伝子型を有する被験者が5人、ヘテロ接合性遺伝子型が45人、ホモ接合性H6/H6遺伝子型が45人いた。

【0097】

実施例3：MIC-1遺伝子型を判定するためのレシオメトリックPCR RFLPアッセイ

制限断片長多型（RFLP）アッセイは長年にわたりDNA突然変異分析の主な手法として利用されている。これらのアッセイの中には、より感度が高く簡便な集約型ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）アッセイに取って代わられたものもある。突然変異検出アッセイのその他のものとしては、2つの方法を組み合わせて異なるDNA多型を検出するものがある。MIC-1の場合には、H6-D6対立遺伝子の点突然変異の領域は約90%がGCであるGCリッチ領域である。このことにより、競合的PCRなどの対立遺伝子または遺伝子型の相違を検出する手法を利用することが非常に困難となっている。従って、PCR増幅したDNAセグメントのRFLP分析を利用する必要がある。

【0098】

RFLPアッセイは、DNA配列の相違によりもたらされるDNA制限酵素部位の相違に依存するものである。これらの部位は、通常は固有のものであり、そのため制限酵素消化物を分子量により分離した際に可視化されるバンドのパターンが区別可能な相違を示す。典型的には、このアッセイはアガロースゲルDNA電気泳動を用いて行われる。MIC-1の対立遺伝子の相違する部分の領域内には、CからGへの点突然変異によりもたらされる有用な固有の制限部位はない。このため、臭化エチジウム検出を用いるDNAアガロースゲル電気泳動の特性を利用するRFLPアッセイに新規な改変を加える必要がある。高アガロース濃度（例えば3%）を利用することにより、小さな分子量のDNAバンドについての解像度が向上する。UV光を照射した場合には、臭化エチジウム染色の差異がDNA濃度の差異と比例する。

【0099】

PCRプライマー（5p, 5'GCCGCCGCCGTCGCAGTCGGA3'（配列番号8）；3p, 5'CAGGCGGTGCAGGCTCGTCTTGAT3'（配列番号9））は、消化した際にD6対立遺伝子における共通のAVRII部位が主要産物（147bp）となるような産物を与えるように設計した。H6対立遺伝子の場合には、また別のAVRII部位によって102bpの主要産物がもたらされ、これはDNAアガロースゲル電気泳動の検出限界に近い。残る断片は、アガロースゲル上では可視化するのが困難なより小さな45bpの産物である（図11の制限地図を参照されたい）。

【0100】

方法：ゲノムDNAを用いたPCR：

pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) の標準マスターミックスは、製造業者の推奨に従って、1反応あたり20 μ lの容量で10 pM 5pプライマーおよび3pプライマーの各々1 μ lを含むように調製した。各被験者からのゲノムDNA 100ngを鋳型として使用した。

【0101】

PCR：

変性 94℃にて1分

アニーリング 65℃にて1分

伸長 72℃にて2分

MJ Research PTC-200 Peltierサーマルサイクラーにおいて40サイクル行った。製造業者の説明書に従い、AVA II (New England Biolabs) を用いて3℃にて一晩かけてPCR産物を消化した。

【0102】

3%アガロース ゲル、0.02% w/v 臭化エチジウム、80Vで、別々のバンドが観察されるまで泳動を行った。その後、対照 (DD、HD、HH) に従って遺伝子型を決定した。

【0103】

結果および考察：

図12に示すように、ホモ接合性D6/D6対立遺伝子の場合には、147塩基対の産物のみが可視化される。ヘテロ接合体では2つの産物 (147bpおよび102bp) が3：1の比で現れ、ホモ接合性H6/H6では等量の147bp断片および102bp断片が現れる。ホモ接合性H6/H6とヘテロ接合性対立遺伝子との間での消化産物の比の大きな違いは裸眼で容易に観察することができ、特殊な分析を必要とするものではない。147bp産物と102bp産物にはわずかな強度の違いが観察される。これは、臭化エチジウムのインターカレーションの量の差異によるものである。この作用はさらに、異なる比の小さなDNA消化産物に対する染色強度の差異を増強する。大き

なDNA断片の場合には、この作用はそれほど顕著なものではない。

【0104】

配列決定法により、健常な通院可能な研究者38人のうち18人がMIC-1遺伝子型を有していると判定された。上記PCRから得られた産物はアガロースゲルから精製し、Perkins-Elmer ABI prism DNAシーケンサーを用いて製造業者が推奨するプロトコールに従って配列決定を行った。各被験者において、5pプライマーおよび3pプライマーをそれぞれ用いて、フォーワード方向およびリバース方向の配列決定を行った。

【0105】

ELISA、レシオメトリックPCR RFLPおよびDNA配列決定法から得られた結果を表にまとめた（表1）。DNA配列決定を行った18人の被験者については、これらの方法において結果が100%一致した。さらに21人の被験者は、ELISA法により遺伝子型を判定し、種々の遺伝子型のMIC-1の濃度範囲について13/26の比の範囲であると判定した。

【0106】

【表1】

対立遺伝子 /						
検体 ID	R26	R13	13/26	MIC-1 pg/ml	遺伝子型	DNA 配列
SH	54	15	0.3	270	HD	HD
TL	66	74	1.1	328	HH	HH
AB	50	12	0.2	250	HD	HD
DX	41	9	0.2	205	HD	HD
DF	38	45	1.2	192	HH	HH
AC	124	118	0.9	620	HH	HH
JL	36	6	0.2	179	HD	HD
NX	182	123	0.7	912	HH	HH
TK	37	7	0.2	135	HD	HD
DJ	48	44	0.9	238	HH	HH
GG	45	<0	<0	227	DD	DD
JK	83	21	0.3	414	HD	HD
KW	46	7	0.1	223	HD	HD
WW	58	66	1.1	291	HH	HH
KS	74	71	1	369	HH	HH
RO	838	216	0.3	4190	HD	HD
DB	33	38	1.2	162	HH	HH
GL	40	50	1.2	199	HH	
KM	80	98	1.2	400	HH	
AsB	719	384	0.5	3594	HD	
NR	112	90	0.8	559	HH	
MS	49	69	1.4	243	HH	
CS	49	57	1.2	243	HH	
RL	271	131	0.5	1355	HD	
KIW	44	7	0.2	218	HD	
BS	130	48	0.4	651	HD	
MM	65	21	0.3	324	HD	
JZ	66	27	0.4	332	HD	
ML	209	108	0.5	1046	HD	
MN	44	51	1.2	220	HH	
CH	39	8	0.2	197	HD	
IS	39	47	1.2	196	HH	
LP	42	<0	<0	209	DD	
HL	90	46	0.5	450	DH	
GH	40	14	0.3	201	HD	
LS	37	38	1.1	182	HH	
DS	503	521	1	2516	HH	
PF	113	47	0.4	565	HD	

【0107】

実施例4：慢性関節リウマチ（RA）患者由来のサンプルを用いて行ったELISAアッセイ

以下の方法に従って、RAを罹患する集団から無作為抽出した21個体、および従来の治療に応答を示さなかった非常に重篤なRAを患う9個体に由来する血清サンプルにおいてELISAアッセイを行った。結果は以下の表2に示す。

【0108】

方法：

MIC-1サンドイッチELISA法：

MIC-1サンドイッチELISA法は、抗原捕捉に抗MIC-1マウスMab（13C4H3および26G6H6）、そして検出に標識ヒツジポリクローナル抗体（PAb 233-P）を使用して行った。抗体の最適濃度は経験に基づいて決定して以下の全試験に使用した。96ウェルのMaxisorp ELISAプレートを、被覆用バッファーで5倍希釈した抗MIC-1 MAb上清（最終イムノグロブリン濃度は約20ng/mlとした）で40℃にて24時間かけて被覆した。続いてプレートを300 μ lの洗浄バッファーで3回洗浄し、非特異的結合を250 μ lの1% (w/v) BSAのPBS溶液で37℃にて2時間かけてブロッキングした。次にrhMIC-1標準、組織培養上清、および血清をプレートに添加し（100 μ l/ウェル）、37℃にて1時間インキュベートした。プレートを3回洗浄した後、抗体希釈液で5000倍希釈したヒツジPAb 233B3-Pを100 μ l/ウェルで添加し、37℃で1時間インキュベートした。続いてプレートを3回洗浄し、抗体希釈液で5000倍希釈したビオチン化ロバ抗ヒツジIgGを100 μ l/ウェルで添加し、37℃にて1時間インキュベートした。その後、直接ELISA法を行うためにプレートを発色させた。サンプル中のhMIC-1濃度は、rhMIC-1標準曲線との比較により決定した。

【0109】

【表2】

慢性関節リウマチ	数	少なくとも1のD6対立遺伝子を有する(数)/割合%
無作為選択RA	21	(1)/5%
重篤なRA*	9	(4)/44%

*試験的治療（例えば骨髄移植）が必要な程度に重篤なRA

【0110】

この結果は、D6/D6ホモ接合型およびH6/D6ヘテロ接合型の個体は重篤な慢性関節リウマチ（RA）に対する素因が高いことを示唆している。

【0111】

実施例5：前立腺癌患者由来のサンプルを用いて行ったELISAアッセイ

ELISAアッセイは、前立腺癌患者（前立腺特異的抗原（PSA）が平均レベルを超える28個体とPSAレベルが正常範囲内の41個体）から採取した血清サンプルを用いて、RAに関する実施例4に記載の方法と同様に行った。結果は以下の表3に示

す。

【0112】

【表3】

前立腺癌	数	少なくとも1のD6対立遺伝子を有する(数)/割合%
PSA<11	41	(16)/39%
PSA>11	28	(0)/0%

【0113】

PSAレベルが高かったサンプルのうち、D6/D6ホモ接合体またはH6/D6ヘテロ接合体を示す個体はなかった。この結果は、D6/D6遺伝子型およびH6/D6遺伝子型が前立腺癌の発症に対し防御的である可能性があること、そしてこの腫瘍は他の遺伝子型とより高頻度に関連していることを示している。

【0114】

実施例6：MIC-1および胎児性癌抗原（CEA）

胎児性癌抗原は、大腸癌により産生されるタンパク質の1種であり、腫瘍容積の尺度として一般的に使用されている。このため、CEAは種々の治療に対する応答の尺度としても有用なものとなっている。本発明者は、転移性CRCを患う10人の患者に由来する血清を分析し、そのMIC-1血清レベルを測定した。CEA血清レベルは、慣用されている標準的な研究室における分析法により測定した。MIC-1とCEA血清レベルとの間には有意な正の相関がみられた（図13）。試験した数が小さかった点を考慮すると、これは非常に重要な知見であると考えられる。

【0115】

実施例7：MIC-1および大腸癌

上皮性悪性腫瘍は最も一般的な癌のグループであり、そのため科学的、医学的および経済的に非常に重要である。TGF- β 1サイトカインは中でも顕著に上皮細胞に重要な調節的影響を与える。該サイトカインは、上皮増殖、細胞運動および付着を調節し、また血管形成および免疫調節活性のあることが示されている。TGF- β 1経路の複数の異常が、乳房、大腸および前立腺の悪性腫瘍に関して記載されている。このような異常としては、それらの分泌、受容体発現および受容体後の経路における異常がある。前立腺の場合には、in vitroおよびin vivo細胞系

、ならびに動物試験において、TGF- β 1は、p53依存的および非依存的経路を介して細胞周期の「チェックポイント」およびその後のアポトーシスにおいて機能していることが示されている。TGF- β 1は、正常な前立腺により発現される負の調節を担う増殖因子であると示されているが、前立腺癌の全過程にわたって、その経路の脱調節の結果としてTGF- β 1分泌が上昇する。血小板を枯渇させた血清中で測定したTGF- β 1の血清レベルの増大は、生存率の低減と、疾患のより迅速な進行と関連している。MIC-1は、元々はマクロファージ活性化と関連した高発現に基づいて同定された、TGF- β 1スーパーファミリーから分岐したメンバーである。MIC-1は、TGF- β 1と同様に、正常前立腺において発現され、p53依存的および非依存的に細胞機能に関与している。一方、TGF- β 1とは異なり、循環血管成分により産生されるものではないため、血清または血漿中で容易に測定することが可能である。本実施例は、MIC-1の大腸癌（CRC）における局所的発現と、このサイトカインの血液中への全身性の放出の両方を示す証拠を提供する。得られた結果はまた、血清MIC-1レベルと遺伝子型との相関を、臨床学的ステージおよびCRCの進行と共に示しており、このことは、このサイトカインの測定が臨床的および治療的用途となることを示している。

【0116】

方法

組織サンプル：

St Vincent's Hospital (Sydney) において大腸または直腸の腺癌を外科手術により切除した224人の一連の個体が本研究に登録した。手術前に放射線療法または化学療法を受けた個体はのぞいた。炎症性腸疾患を罹患するか、または家族性腺腫様ポリープ（FAP）もしくは遺伝的非結腸ポリポシス（HNPCC）の既往症がある個体ものぞき、さらには原発性腫瘍を完全には切除できなかった個体ものぞいた。

【0117】

全ての腫瘍からの新鮮で代表的な組織サンプル（500mg）およびそれに対応する正常大腸粘膜を直ちに70℃にて凍結した。男性141人および女性86人（32～93歳、平均66.6±12.4歳）から合計224の新鮮な腫瘍検体をアッセイした。これら

の腫瘍のうち19検体はTNMステージ I であり、22検体はステージIIであり、111検体はステージIIIであり、72検体はステージIVであった。大腸癌および他の悪性腫瘍の家族歴は個体またはその親族にインタビューして調べた。癌の推測される全ての原因および不確定な死因を、死亡証明書およびカルテを入手するかまたは主治医と接触することにより確認した。家族歴を利用することにより、HNPCCについてアムステルダムの診断基準または改変診断基準のいずれかを満たす家系を調べた。

【0118】

腫瘍の組織病理学的分析：

解剖病理科 (St Vincent's Hospital) 内の組織病理学担当者により、全ての腫瘍について独立して腫瘍の組織病理型、ステージおよびサイズを判定した。ミスマッチ修復状態を知らない状態で、腫瘍のグレード、ムチン産生の程度、腫瘍成長パターン、ならびにクローン病様炎症性浸潤、上皮細胞間リンパ球または腫瘍周囲リンパ球の存在をその見込みについて判定した。10%未満の細胞が腺を形成していた腫瘍を高いグレードに分類し（ほとんど区別できない）、50%を超える細胞外ムチンを含む腫瘍はムチン性と分類した。

【0119】

腫瘍成長パターンは、既に公開されている基準に基づいて浸潤性または膨張性のいずれかと判断した。腫瘍周囲のリンパ系反応の程度およびクローン病様のリンパ系反応の程度は、Jassら (1996) の方法に従って分類した。上皮細胞間リンパ球は、光学顕微鏡により、ヘマトキシリンおよびエオシン切片上でリンパ球の形態を有した細胞が完全に腫瘍上皮内にあるようにみられるものとして同定した。これらは、10高倍率視野当たり30個を超える細胞が存在した場合には顕著に存在すると分類した。

【0120】

腫瘍体積は、式 $V = p(L + T) / 4 \times D$ (式中、 V = 体積 (ml)、 L = 縦の寸法 (cm)、 T = 周囲の寸法 (cm)、 D = 腫瘍の奥行き (cm)) を用いて、報告されている腫瘍寸法から評価した。

【0121】

p53およびK-rasの体細胞変化の分析：

K-ras遺伝子のコドン12における第1および第2塩基の突然変異は、既に記載されているようにREMS-PCRを用いて検出した。腫瘍細胞内のp53の蓄積を同定するために、腫瘍組織のパラフィン包埋切片に対し、マウス抗ヒトp53抗体D07 (DAK0) を用いたp53の免疫組織化学分析を行った。間質細胞および正常上皮の染色がなく、腫瘍細胞のうち20%を超えるものが中程度から高程度の強度の核染色を示した場合に、その腫瘍はp53タンパク質の蓄積を示すとみなした。

【0122】

さらに、実施例1に記載のMIC-1 ELISA法を用いてサンプルを分析し、MIC-1レベルおよび遺伝子型を判定した。分散分析、パラメトリックおよびノンパラメトリック相関、カプラン-マイヤー分析、ならびに単純なロジスティック回帰を利用して、MIC-1血清レベルおよび遺伝子型を上記概説したようにまとめた以前のデータと比較した。

【0123】

結果：

MIC-1レベルは、健常血液ドナーから採取した200の正常血清サンプルの分析から決定した正常範囲に基づいて正常群および異常群に層別化した。MIC-1レベルが1050pg/mlを超えた場合にはそれを異常と分類した。統計解析は、血清および上述したように層別化したレベルの両方を用いて行った。パラメトリック検定を用いた場合には血清レベルの対数を用いた。

【0124】

被験者のMIC-1血清レベルが高くなるほど、腫瘍のTNMグレードが高くなった。分散分析を利用したところ (ANOVA)、グレード1とグレード4との間、およびグレード2とグレード4との間に有意差がみとめられた ($p < 0.05$)。TNM腫瘍グレードは、低グレード (TNMグレード1～2) と高グレード (TNMグレード3～4) の2つの群に層別化した。これらの群が有意に異なるかどうかを調べるために、これらの群が等しいという仮説で分散F検定の等値を利用してデータを分析した。その結果これらの群は異なっていた ($p < 0.0001$: $F = 21.01$)。この分散における相違は、高いMIC-1が腫瘍グレードの高さと有意に関連していること

を示している。

【0125】

ANOVAを用いて分析したところ、高く異常なMIC-1レベルを示す個体は転移性疾患を有する可能性が高かった ($p < 0.04$) (図14)。

【0126】

癌により死亡した個体の部分集団を分析したところ、ホモ接合性H6/H6 MIC-1遺伝子型と疾患を患わない生存期間の延長との間に有意な連関があった。また、ヘテロ接合性H6/D6とホモ接合性D6/D6はそれぞれ疾患を患わない生存期間が短かった ($p < 0.02$: 対数順位 (マンテルーコクス)) (図15)。これは遺伝子量の影響を示している。全個体を分析した場合には、MIC-1遺伝子型と診断から再発までの時間との間に類似した関連性がみとめられた。CRCで死亡した被験者に存在するものと同じ遺伝子量の影響が集団全体に存在する。

【0127】

ホモ接合性H6/H6群は疾患を患わない生存期間が長いため、本発明者は、この部分集団内においてMIC-1の正常レベルと異常レベルとを比較して分析した。ホモ接合性H6/H6 MIC-1が異常に高いレベルの個体は、疾患の診断および初期治療から再発までの時間が短かった ($p < 0.03$) (図16)。ヘテロ接合性H6/D6 MIC-1遺伝子型またはホモ接合性D6/D6 MIC-1遺伝子型を示す被験者に関しては、血清MIC-1レベルの正常レベルと異常レベルとの間に、疾患を患わない生存期間について統計学的に有意な差はなかった。このことは、腫瘍の挙動に対してMIC-1遺伝子型が機能的に影響を及ぼしていることを示している。

【0128】

診断からCRCが原因の死亡までの時間に及ぼすMIC-1遺伝子型の影響について全個体を分析した場合、わずかな影響がみとめられた。ホモ接合性D6/D6およびヘテロ接合性H6/D6は、ホモ接合性H6/H6と比較して全体的に生存に関して有利であった。遺伝子量の影響をみとめることはできたが、統計学的有意差には達しなかった。少数のホモ接合性D6/D6被験者しか存在しなかったため、それらを除外した。残った個体をデュークスのステージに従って層別化した。全ての群においてヘテロ接合性H6/D6 MIC-1遺伝子型は生存の有利性が高かった。これは、デュー

クスのステージD群において有意性に達した ($p < 0.05$) (図17)。このことは、よりMIC-1レベルが高くなるデュークスのステージDにおいては全体の腫瘍体積がより大きくなるため、より大きな影響があることに起因すると考えられる。

【0129】

また、相関 z 検定を利用したところ、MIC-1と年齢との間に高い有意な相関があった ($p = 0.0006$: $Z = 3.5$) (図18)。このような傾向は正常集団においてはみとめられなかった。

【0130】

MIC-1レベルと、性別、p53表現型、erb2、mlh1 mlh2または腫瘍体積との間に有意な関係はみとめられなかった。さらに、遺伝子型と比較した場合のMIC-1レベルの有意な相違はなかった。

【0131】

考察：

MIC-1レベルは、腫瘍のTNMステージ、デュークスのステージ、および転移の存在と相関している。このことは、腫瘍体積が大きくなるほどMIC-1レベルが高くなることを示している。腫瘍体積の測定値は、原発腫瘍の体積であって、必ずしも全腫瘍量を有効に表すものではなかった。遺伝子型の影響を考慮した場合、パラドックスがあるように思われる。ホモ接合性H6/H6遺伝子型は、疾患を患わない生存時間の延長と関連すると同時に、全体の生存期間が短いことも関連する。これらの観察結果は、以下の理論により説明できると考えられる。ホモ接合性H6/H6 MIC-1は腫瘍増殖を遅滞させるが、免疫系を阻害する点で負の効果も有する。初期の腫瘍抑制の期間の後、腫瘍は抵抗性を有し、さらに増大した高レベルのMIC-1を産生する。この時点で、免疫系に対する高レベルのMIC-1の有害な影響が明らかに生じ、死亡へのより迅速な進行の一因となる。対照的に、ヘテロ接合性H6/D6およびホモ接合性D6/D6 MIC-1は腫瘍増殖を遅滞させないが、正の影響として免疫系を抑制することもない。従って、疾患がより早く再発しても、免疫抑制は小さい。その結果、腫瘍の制御がより良好であり、そのため全体の生存期間が長くなる。

【0132】

このことは、前立腺癌におけるTGF- β 1の場合とも類似していると考えられる。前立腺腫瘍が成長するに従って、最初はTGF- β 1の増殖の負の影響に対し応答するが、最後にはシグナル伝達経路の種々の変化によりこの腫瘍に対する影響は失われる。これらの変化によって、より迅速な疾患の進行に伴ってTGF- β 1の産生およびそれに付随する免疫抑制が増大する。

【0133】

TGF- β 1レベルの上昇は前立腺癌における全体の生存期間の低減と関連している。TGF- β 1は、前立腺癌に対する細胞性免疫をその用量と関連して低減することが証明されている。MIC-1は最初にマクロファージ活性化について選択されたサブトラクシオンクローニングライブラリーから単離され、このことはMIC-1が細胞性免疫に対する影響を有している可能性があることを示している。D対立遺伝子の存在は生存の高い有利性と関連している。生存の有利性は、HおよびD対立遺伝子が介在する細胞性免疫機能の示差的な変化により媒介されと考えられる。ホモ接合性 H6/H6 MIC-1遺伝子型が存在する場合には、MIC-1血清レベルが上昇するにつれ、他のMIC-1遺伝子型のその血清レベルの変化と同等の変化よりも大きく免疫が抑制される。D対立遺伝子の場合には、免疫抑制が低く、これにより細胞性免疫が腫瘍を抑制した状態に維持することになり、生存の有利性をもたらす可能性がある。この影響がデュークスのステージDにおいてのみ有意であるという理由は2つある。第1に、各群の数が小さいことである。第2に、デュークスのステージDにおけるMIC-1血清レベルが高いほどより大きな影響があるということである。これらの2つの要因が、統計的有意差には達しないが疾患の初期段階にみられるパターンに寄与している。これはTGF- β 1の状況と類似している。2つのTGF- β 1遺伝子のうち一方に機能障害がある動物の場合には、新生物の発生頻度が高くなる。

【0134】

MIC-1の場合には、その機能における遺伝子型の相違のもととなる2つの変異型対立遺伝子があり、作用機構に関する疑問が生じる。MIC-1分子における点突然変異は、TGF- β 1スーパーファミリーの受容体結合部位であることが知られて

いない領域内にある。TGF- β 1と類似した状況は、本発明者が記載しているように、従来は受容体の異常によるものと、受容体後の経路の異常によるものであると考えられている。MIC-1の場合には、D突然変異はプロペプチドから成熟ペプチドとなる切断部位に近接している。対立遺伝子間の機能的相違を説明する他のものとしては、細胞プロセッシングによる干渉とおそらくMIC-1の分泌がある。

【0135】

臨床的には、MIC-1レベルおよび遺伝子型を用いて、再発および死亡への進行の可能性に関して患者を層別化することができる。治療に関して、D対立遺伝子を有する患者はホモ接合性H6/H6 MIC-1による利点があるが、この利点はMIC-1投与の免疫抑制作用により平衡化されと考えられる。この平衡化は、その標的化送達により克服されうる。

【0136】

実施例8：慢性関節リウマチにおけるMIC-1レベルの変化

本発明者はまた、慢性関節リウマチ（RA）を患う個体の2つの群に着目した。1つは、既に治療をうけておりまた疾患が拡大している、RAを患う患者20人からなる無作為選択群である。これらの個体は、1gの静脈内投与メチルプレドニゾン（抗炎症剤）で治療を受けていた。これらの個体を、治療前、ならびに治療後4時間および24時間において評価した。標準的な研究室における手法を用いて、上記の時点において血清C反応性タンパク質（CRP）を測定した。

【0137】

第2の群は、重篤な進行中のRAのために自己幹細胞移植を受けた23人の個体から構成された。これらの個体は、5種の疾患改善薬による治療を既に行ったが、治癒していなかった。幹細胞は顆粒球-コロニー刺激因子を用いた前処置の後に回収した。続いて個体を高用量のシクロホスファミド（化学療法剤）を用いて治療した。次に、自己由来の既に回収済みの幹細胞を注入した。これにより脊髄機能が有効に「レスキュー」された。血液サンプルは、治療の6日前および治療の1.5ヶ月後において採取した。CRPおよび腫瘍壊死因子（TNF）の血清レベルを測定した。

【0138】

全ての個体について、標準的な方法により関節膨張スコアおよび関節圧痛スコアを測定し、健康評価アンケート（HAQ）を行った。これらの測定値は、各時点についてもとめた。

【0139】

血清サンプルは、本発明の標準ELISA法により各時点でMIC-1遺伝子型および血清レベルについて分析した。これらの結果は、上記の変数、および100人の正常血液ドナーからなる正常集団のMIC-1血清レベルと比較した。

【0140】

結果：

対応のある t 検定を利用したところ、RA患者（ $n=43$ ）におけるMIC-1血清レベルは、正常集団（ $n=100$ ）と比較して有意に高かった（RA 平均=893pg/ml、SD=614；正常 平均=406pg/ml、SD=253、 $p<0.0001$ ）（図20）。

【0141】

移植集団においては、移植後1.5ヶ月のMIC-1血清レベルが移植前の血清レベルよりも高かった（対応のある t 検定解析を用いた； $p=0.021$ ）。また、移植後1.5ヶ月において関節膨潤および圧痛スコアならびにHAQもまた有意に低下した（ $p<0.003$ ）ことは注目に値する。CRPおよびTNF血清レベルには有意な変化はなかった（対応のある t 検定）。移植前と移植後1.5ヶ月におけるMIC-1レベルの変化の程度は、1.5ヶ月の時点における関節スコアの変化と正相関していた（ $p=0.006$ ；相関Z検定）。移植後の異常に高いMIC-1血清レベル（ $>1050\text{pg/ml}$ ）はTNFレベルの変化と負の相関を示す（ $p<0.03$ ；マン-ホイットニー-u検定）。移植前のMIC-1血清レベルは移植後のTNF血清レベルと関連しているが、有意性には至っていない（ $p=0.058$ ；ケンドールの相関検定）。その他には有意な関係はなかった。

【0142】

まとめると、上述した傾向は、MIC-1血清レベルが移植後1.5ヶ月における滑膜炎関節機能障害の予測因子であることを示す可能性がある。このデータはまた、MIC-1血清レベルおよびこのレベルの変化が、TNF血清レベルに関連している可能性も示している。TNFは、RAの病理発生に寄与していることが知られるサイトカ

インである。また他にTNFは、再形成する骨髄からのサイトカイン分泌の上昇を示す。

【0143】

無作為選択RA集団において、MIC-1血清レベルと年齢との間に関連性があったが、これは相関Z検定を用いて有意性 ($p=0.064$) には達しなかった。

【0144】

移植群においては、ホモ接合性H6/H6遺伝子型を示す個体は、TNF血清レベルが高く、また移植後の関節膨潤スコアが高かった ($p<0.05$; ANOVA)。これはまた移植前のTNFレベルとも一致するが、統計学的有意性にはわずかに至らなかった ($p=0.058$; ANOVA)。

【0145】

無作為選択RA群においては、HD遺伝子型はびらん性疾患を有する可能性が2倍高かった ($p<0.02$) (図21)。これらのHD遺伝子型の個体はまた、治療前ならびに治療後4および24時間の時点で、C反応性タンパク質 (CRP) レベルが有意に低かった ($p<0.02$; マン-ホイットニーu検定)。びらん性疾患を患う個体はまた3つの時点全てにおいてCRPレベルが低かった ($p<0.05$; マン-ホイットニーu検定) (図22および23)。このことは、MIC-1の遺伝子型が、RAの発症を判定するための機能的役割を果たすことを示唆している。

【0146】

考察：

MIC-1遺伝子型とびらん性疾患との間には明らかに関連性がある。MIC-1遺伝子型はまたRA患者におけるCRP血清レベルの変動と関連している。CRPはRAにおける炎症活性の主要な測定対象の1つである。さらに、正常群と比較してRA患者においてはMIC-1血清レベルが有意に上昇している。MIC-1血清レベルの変化は、TNF血清レベルの変化と関連していると考えられる。またこれらの変化はMIC-1遺伝子型依存的である。TNFは、RAの病理発生において主に機能している別のサイトカインである。これらの相関を組み合わせると、MIC-1がRAの病理発生においてある役割を果たしている可能性があり、個体の所定のMIC-1遺伝子型により疾患過程を予測しうるということがわかる。

【0147】

参考文献

Altman D.J., Schneider S.L., Thompson D.A., Cheng H.L., Tomasi T.B. (1990) A transforming growth factor beta 2-like immunosuppressive factor in amniotic fluid and localisation of the TGF-beta 2 mRNA in the pregnant uterus. *J. Exp. Med.* 172, 1391-1401.

Bogdan C., Nathan C. (1993) Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, IL-4 and M-10. *Annal. NY Acad. Sci.* 685, 713-739.

Bootcov M.R., Bauskin A., Valenzuela S.M., Moore A.G., Bansal M., He C., Zhang H.P., Donnellan M., Mahler S., Pryor K., Walsh B., Nicholson R., Fairlie D.F., Por S.B., Robbins J.M., Breit S.N. (1997) MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the transforming growth factor- β superfamily cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11514-11519.

Caniggia I., Lye S.J., and Cross LC. (1997) Activin is a local regulator of human cytotrophoblast cell differentiation. *Endocrinology* 138, 3976-3986.

Caniggia I., Grisaru-Gravnosky S., Kuliszewsky M., Post M., Lye S.J. (1999) Inhibition of TGF- β 3 restores the invasive capacity of extravillous trophoblasts in pre-eclamptic pregnancies. *J. Clin. Invest.* 103, 1641-1650.

Fairlie, W.D., Russell, P.K., Moore A.G., Zhang H-P., Brown P.K., Breit S.N. Epitope mapping of the Transforming Growth Factor- β superfamily protein, Macrophage Inhibitory Cytokine-1 (MIC-1): Identification of at least five distinct epitope specificities. *Biochemistry*. 2001;40:65-73.

Graham C.H., Lysiak LL, McCrae K.R., Lala P.K. (1992) Localisation of transforming growth factor at the human foetal-maternal interface: role of trophoblast growth and differentiation. *Biol. Reprod.* 46, 561-572.

Hillier S.L., Witkin S.S., Krohn M.A., Watts D.H., Kiviat N.B., Eschenbach D.A. (1993) The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection. *Obstet. Gynecol.* 81, 941-948.

Hromas R., Hufford M., Sutton L, Xu D., Li Y., Lu L. (1997) PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1354, 40-44.

Jass, J.R., Ajioka, Y., Allen, J.P., Chan, Y.F., Cohen, R.J., Nixon, J.M., Radojkovic, M., Restall, A.P., Stables, S.R. and Zwi, L.J. (1996) Assessment of

invasive growth pattern and lymphocytic infiltration. *Histopathology* 28(6), 543-548.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature London* 227, 680-685.

Lang A. K., Searle R.F. (1994) The immunomodulatory activity of human amniotic fluid can be correlated with transforming growth factor- β 1 and transforming growth factor- β 2 activity. *Clin. Exp. Immunol.* 97, 158-163.

Minarni S., Yamoto M., Nakano R. (1992) Immunohistochemical localisation of inhibin/activin subunits in human placenta. *Obstet. Gynecol.* 80, 410-414.

Miyazono K., Ichijo H., Heldin C-H. (1993) Transforming growth factor - β : Latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors* 8, 11-22.

Nusing R.M., Barsig J. (1997) Inflammatory potency of activin A. Effect on prostanoic acid and nitric oxide formation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 407, 243-248.

Opsjon S-L., Wathen N., Tingulstad S., Wiedswang G., Sundan A., Waage A., Austgulen R. (1993) Tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 in normal human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169, 397-404.

Paralkar V.M., Vail A.L., Grasser W.A., Brown T.A., Xu H., Vukicevic S., Ke H.Z., Qi H., Owen T.A., Thompson D.D. (1998) Cloning and characterisation of a novel member of the transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein family. *J. Biol. Chem.* 273, 13760-13767.

Petraglia R., Woodruff T.X., Botticelli G., Botticelli A., Genazzani A.R., Mayo K.E., Vale W. (1993a) Gonadotropin-releasing hormone, inhibin, and activin in human placenta: evidence for a common cellular localisation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74, 1184-1188.

Petraglia R., Anceschi M., Calza L., Garuti G.C., Fusaro P., Giardini L., Genazzani A.K., Vale W. (1993b) Inhibin and activin in human foetal membranes: evidence for a local effect on prostaglandin release. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 542-548.

Petraglia R., Sacerdote R., Cossarizani A., Angioni S., Genazzani A.D., Franceschi C., Muscettola M., Grasso G. (1991) Inhibin and activin modulate human monocyte chemotaxis and human lymphocyte interferon-gamma production. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 72, 496-502.

Petraglia R, Vaughan L, Vale W. (1989) Inhibin and activin modulate the release of GnRH, hCG, and progesterone from cultured human placental cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5114-5117.

Qu L, Thomas K. (1992) Changes in bioactive and immunoactive inhibin levels around human labor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74, 1290-1295.

Roberts A.B., Sporn M.B. (1993) Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor - β . *Growth Factors* 8, 1-9.

Romero R., Mazor M., Sapulveda W, Avila C., Copeland D., Williams J. (1992) Tumour necrosis factor in preterm and term labour. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 166, 1576-1587.

Wahl S.M. (1992) Transforming growth factor beta in inflammation: A cause and a cure. *J Clin. Immunol.* 12, 61-74.

Wallace EM, Riley S.C., Crossley LA., Ritoe S.C., Horne A., Shade M., Ellis R, Aitken D.A., Groome N.P. (1997) Dimeric inhibins in amniotic fluid, maternal serum and foetal serum in human pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 218-222.

当業者であれば、広く記載された本発明の精神または範囲から逸脱することなく、具体的な実施形態に示す本発明に多数の変更および／または改変を行うことは理解できるであろう。従って本発明の実施形態は、全ての点で例示を目的としたものであり限定されないものと考えられる。

【0148】

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、前立腺特異的抗原（PSA）レベルの上昇した50人の被験者由来の血清MIC-1レベルとPSAレベルとの関係を表すグラフを示す。

【図2】

図2は、慢性関節リウマチを罹患する14人の無作為選択した被験者の血清MIC-1レベルを表すグラフを示す。

【図3】

図3は、ヒトMIC-1および変異体Asp²⁰²-MIC-1のアミノ酸配列(A)およびDNA配列(B)を示す。

【図4】

図4は、ヒツジとマウスの抗MIC-1抗血清の感受性を表すグラフを示す。プレートは、1.8ng rhMIC-1、2ng rhTGF- β 1、あるいはコーティングバッファー単独でコーティングした。抗MIC-1マウスモノクローナル抗体(MAb)を含有する培養上清、マウスミエローマ細胞系SP2/0によって調整した培養培地、未調整培養培地(DMEM+Nutridoma)、および抗体希釈液(Ab dil)を希釈せずに評価し、IgGを富化した正常ヒツジ血清およびヒツジポリクローナル抗体233-PをAb dilで500,000倍希釈した。マウスIgG1は20 ng/mlで評価した。

【図5】

図5は、捕捉のための抗MIC-1 MAbおよび検出のためのヒツジポリクローナル抗体233B3-Pを利用するサンドイッチ型ELISA法によって作成された組換えヒトMIC-1標準曲線を示す。

【図6】

図6は、女性の妊娠期における母体の血清および羊水中にMIC-1が存在することを示す実験結果を示す。

図6Aは、サンドイッチ型ELISA法によって測定した、プールされた正常ヒト血清(normal human serum: NHS)、プールされた各妊娠期における母体血清、およびプールされた羊水(amniotic fluid: AF)中のMIC-1濃度の概算値を示すグラフである。

図6Bは、プールされた正常ヒト血清(レーン1)、プールされた各妊娠期における母体血清(レーン2~4)、およびプールされた羊水(レーン5)におけるMIC-1の免疫沈降およびウエスタンブロット分析である。

【図7】

図7は、4名の妊娠女性における母体血清MIC-1濃度を妊娠30週から出産までサンドイッチ型ELISA法によって測定することにより示したグラフである。

【図8】

図8は、サンドイッチ型ELISA法によって測定した、5つの異なるヒト胎盤抽出物中におけるMIC-1濃度の測定結果を示すグラフである。

【図9】

図9は、ヒト栄養膜細胞系統BeWoによるMIC-1の発現および分泌を評価するた

めに実施した実験の結果を示す。

図9 Aは、サンドイッチ型ELISA法によって測定した、培養1日後および5日後におけるBeWo細胞によるMIC-1分泌を示す。

図9 Bは、BeWo細胞によって分泌されたMIC-1の免疫沈降およびウエスタンブロット分析を示す。レーン1：無調整培養培地；レーン2：BeWo細胞によって5日間調整した培養培地。

図9 Cは、未刺激のBeWo細胞によるMIC-1発現の逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)解析を示す図である。レーン1：24時間培養したBeWo細胞からの全RNAに関するRT-PCR；レーン2：陰性対照(RNAを含まず)；レーン3：陽性PCR対照。

【図10】

図10は、サンドイッチ型ELISA法によるMIC-1の典型的標準曲線を示す(rhMIC-1、7.8~1000 pg/ml、すなわち、8回2倍希釈した)。

【図11】

図11は、野生型 MIC-1およびAsp²⁰²-MIC-1 DNA配列におけるAvaIIに対する制限酵素切断部位を示す。

【図12】

図12は、示された遺伝子型で標識している6名の被験者のゲノムPCRの消化産物を示す。また、これらはDNA配列決定法により確認した。3%アガロースゲル上で臭化エチジウムと一緒に電気泳動を行った。45塩基対のPCR産物が、矢印で示したホモ接合体H6中に見られる。

【図13】

図13は、転移性結腸直腸癌を罹患する10名の患者におけるMIC-1レベルとCEAレベルとを比較したグラフを示す。

【図14】

図14は、転移性結腸直腸癌と非転移性結腸直腸癌におけるMIC-1レベルを比較したグラフを示す。誤差を示す棒は標準誤差を示す。

【図15】

図15は、結腸直腸癌で死亡した患者の診断から再発までの時間についてカブ

ランシーメイヤープロットを示す。測定した時間は月数で表す。

【図16】

図16は、ホモ接合性のH6/H6患者における診断から再発までの時間についてカプランメイヤープロットを示す。測定した時間は月数で表す。

【図17】

図17は、デュークスのステージDのCRCにおける診断から再発までの時間についてカプランメイヤープロットを示す。測定した時間は月数で表す。

【図18】

図18は、年齢に関するMIC-1の単純回帰プロットを示す。

【図19】

図19は、233-Pを用いたMIC-1の免疫組織化学を示す。A. 前立腺癌；B. 腸癌；C. 乳癌；D. リウマチ滑液。矢印はMIC-1を染色した領域を表す。右側のパネルは、IgGを富化した正常ヒツジ血清で染色したそれぞれの対照である。

【図20】

図20は、MIC-1をサンドイッチ型ELISA法によって測定した時の、RA患者のMIC-1レベルと正常被験者のMIC-1レベルとを比較したグラフを示す。

【図21】

図21は、2つの最も一般的な遺伝子型であるホモ接合型(H6/H6)およびヘテロ接合型(H6/D6)の中で、びらん性（黒色）RAと非びらん性（白色）RAとの割合を示すグラフを示す。

【図22】

図22は、びらん性RAの有無で比較したCRPのグラフを示す。

【図23】

図23は、ホモ接合型(H6/H6)(HH)およびヘテロ接合型(H6/D6)(HD)遺伝子型を比較したCRPを示すグラフを示す。

【配列表】

Sequence Listing:

<110> St Vincent's Hospital Sydney Limited

5 <120> Diagnostic assay and method of treatment involving
macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1)

<160> 9

10 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 308
<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 1
Met Pro Gly Gln Glu Leu Arg Thr Leu Asn Gly Ser Gln Met Leu Leu
1 5 10 15
20 Val Leu Leu Val Leu Ser Trp Leu Pro His Gly Gly Ala Leu Ser Leu
20 25 30
25 Ala Glu Ala Ser Arg Ala Ser Phe Pro Gly Pro Ser Glu Leu His Ser
35 40 45
Glu Asp Ser Arg Phe Arg Glu Leu Arg Lys Arg Tyr Glu Asp Leu Leu
50 55 60
30 Thr Arg Leu Arg Ala Asn Gln Ser Trp Glu Asp Ser Asn Thr Asp Leu
65 70 75 80
Val Pro Ala Pro Ala Val Arg Ile Leu Thr Pro Glu Val Arg Leu Gly
85 90 95
35 Ser Gly Gly His Leu His Leu Arg Ile Ser Arg Ala Ala Leu Pro Glu
100 105 110
40 Gly Leu Pro Glu Ala Ser Arg Leu His Arg Ala Leu Phe Arg Leu Ser
115 120 125
Pro Thr Ala Ser Arg Ser Trp Asp Val Thr Arg Pro Leu Arg Arg Gln
130 135 140
45 Leu Ser Leu Ala Arg Pro Gln Ala Pro Ala Leu His Leu Arg Leu Ser
145 150 155 160
Pro Pro Pro Ser Gln Ser Asp Gln Leu Leu Ala Glu Ser Ser Ser Ala
165 170 175
50 Arg Pro Gln Leu Glu Leu His Leu Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg
180 185 190
Arg Arg Ala Arg Ala Arg Asn Gly Asp Asp Cys Pro Leu Gly Pro Gly
195 200 205
55 Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly
210 215 220

	Trp	Ala	Asp	Trp	Val	Leu	Ser	Pro	Arg	Glu	Val	Gln	Val	Thr	Met	Cys
	225					230					235					240
5	Ile	Gly	Ala	Cys	Pro	Ser	Gln	Phe	Arg	Ala	Ala	Asn	Met	His	Ala	Gln
					245					250					255	
	Ile	Lys	Thr	Ser	Leu	His	Arg	Leu	Lys	Pro	Asp	Thr	Val	Pro	Ala	Pro
				260					265					270		
10	Cys	Cys	Val	Pro	Ala	Ser	Tyr	Asn	Pro	Met	Val	Leu	Ile	Gln	Lys	Thr
			275					280						285		
	Asp	Thr	Gly	Val	Ser	Leu	Gln	Thr	Tyr	Asp	Asp	Leu	Leu	Ala	Lys	Asp
		290					295					300				
15	Cys	His	Cys	Ile												
	305															
20																
	<210> 2															
	<211> 308															
	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
25																
	<400> 2															
	Met	Pro	Gly	Gln	Glu	Leu	Arg	Thr	Leu	Asn	Gly	Ser	Gln	Met	Leu	Leu
	1				5					10					15	
30	Val	Leu	Leu	Val	Leu	Ser	Trp	Leu	Pro	His	Gly	Gly	Ala	Leu	Ser	Leu
				20					25					30		
	Ala	Glu	Ala	Ser	Arg	Ala	Ser	Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Glu	Leu	His	Thr
			35					40					45			
35	Glu	Asp	Ser	Arg	Phe	Arg	Glu	Leu	Arg	Lys	Arg	Tyr	Glu	Asp	Leu	Leu
		50					55					60				
	Thr	Arg	Leu	Arg	Ala	Asn	Gln	Ser	Trp	Glu	Asp	Ser	Asn	Thr	Asp	Leu
40		65				70					75					80
	Val	Pro	Ala	Pro	Ala	Val	Arg	Ile	Leu	Thr	Pro	Glu	Val	Arg	Leu	Gly
					85					90					95	
45	Ser	Gly	Gly	His	Leu	His	Leu	Arg	Ile	Ser	Arg	Ala	Ala	Leu	Pro	Glu
				100					105					110		
	Gly	Leu	Pro	Glu	Ala	Ser	Arg	Leu	His	Arg	Ala	Leu	Phe	Arg	Leu	Ser
			115					120					125			
50	Pro	Thr	Ala	Ser	Arg	Ser	Trp	Asp	Val	Thr	Arg	Pro	Leu	Arg	Arg	Gln
		130					135					140				

	Leu Ser Leu Ala Arg Pro Gln Ala Pro Ala Leu His Leu Arg Leu Ser	
	145 150 155 160	
5	Pro Pro Pro Ser Gln Ser Asp Gln Leu Leu Ala Glu Ser Ser Ser Ala	
	165 170 175	
	Arg Pro Gln Leu Glu Leu His Leu Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg	
10	180 185 190	
	Arg Arg Ala Arg Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly	
	195 200 205	
15	Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly	
	210 215 220	
	Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys	
	225 230 235 240	
20	Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln	
	245 250 255	
	Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro	
25	260 265 270	
	Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr	
	275 280 285	
30	Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp	
	290 295 300	
	Cys His Cys Ile	
	305	
35	<210> 3	
	<211> 927	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 3	
	atgcccgggc aagaactcag gacgctgaat ggctctcaga tgetcctggt gttgctgggtg 60	
	ctctcgtggc tgccgcatgg gggcgccctg tctctggccg aggcgagccg cgcaagtttc 120	
	ccgggaccct cagagttgca caccgaagac tccagattcc gagagttgag gaaacgctac 180	
45	gaggacctgc taaccaggct gcgggccaac cagagctggg aagattcgaa caccgacctc 240	
	gtcccgggcc ctgcagtcgc gatactcacg ccagaagtgc ggctgggatc cggcgggccac 300	
	ctgcacctgc gtatctctcg ggcgcgccctt cccgaggggc tccccgaggc ctcccgccctt 360	
	caccgggctc tgttcgggct gtccccgacg gcgtcaaggc cgtgggacgt gacacgacct 420	
	ctgcggcgctc agctcagcct tgcaagaccc caggcgcccg cgtgcacctt gcgactgtcg 480	
50	ccgcccggct cgcagtcgga ccaactgctg gcagaatctt cgtccgcacg gccccagctg 540	
	gagttgcact tgcggccgca agccgcccagg gggcgccgca gagcgctgc gcgcaacggg 600	
	gaccactgtc cgtcggggcc cgggctgtgc tgccgtctgc acacgggtccg cgcgtcgtcg 660	
	gaagacctgg gctggggccga ttgggtgctg tcgccacggg aggtgcaagt gaccatgtgc 720	
	atcggcgcggt gcccgagcca gtccggggcg gcaaacatgc acgcgcagat caagacgagc 780	
55	ctgcacccgc tgaagcccga caccgtgcca gcgccctgct gcgtgcccgc cagctacaat 840	
	cccatgggtg tcattcaaaa gaccgacacc ggggtgtcgc tccagacctt tgatgacttg 900	
	ttagccaaag actgccactg catatga 927	
	<210> 4	
60	<211> 927	

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 5 atgcccgggc aagaactcag gacgctgaat ggctctcaga tgctcctggt gttgctgggtg 60
 ctctcgtggc tgccgcatgg gggcgccctg tctctggccg aggcgagccg cgcaagtttc 120
 ccgggaccct cagagttgca ctccgaagac tccagattcc gagagttgag gaaacgctac 180
 gaggacctgc taaccaggct gcgggccaac cagagctggg aagattcgaa caccgacctc 240
 gtcccgccc ctgcagtcg gatactcac ccagaagtgc ggctgggatc cggcgccac 300
 10 ctgcacctgc gtatctctcg ggccgcccctt cccgaggggc tcccggaggc ctcccgccctt 360
 caccgggctc tgttcgggct gtcccgcagc gcgtcaaggt cgtgggacgt gacacgaccg 420
 ctgcggcgctc agctcagcct tgcaagaccc caggcgcccg cgtgcacct gcgactgtcg 480
 ccgcgcgcgt cgcatcgga ccaactgctg gcagaatctt cgtccgcag gccccagctg 540
 gagggtgact tgcggccgca agccgcccagg gggcgccgca gagcgctgc gcgcaacggg 600
 15 gacgactgtc cgctcgggccc cggcgctgtc tgccgtctgc acacgggtccg cgcgtcgctg 660
 gaagacctgg gctgggcccga ttgggtgctg tcgccacggg aggtgcaagt gaccatgtgc 720
 atcggcgcggt gcccgagcca gttccgggag gcaaacatgc acgcgcagat caagacgagc 780
 ctgcacctgc tgaagccga caccgtgcca gcgcctctgt gcgtgcccgc cagctacaat 840
 cccatggtgc tcattcaaaa gaccgacacc ggggtgtcgc tccagacctg tgatgacttg 900
 20 ttgccaag actgccactg catatga 927

<210> 5
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

30 <400> 5
 aggacctgct aaccaggctg cgggccaacc agagc 35

35 <210> 6
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

40 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

45 <400> 6
 ggctaacaag tcattcatagg tctggagcga cac 33

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Ala Arg Asn Gly Asp Asp Cys Pro Leu
 1 5

55 <210> 8
 <211> 21
 60 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

5

<400> 8
gccgccgccg tcgcagtcgg a 21

10

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15

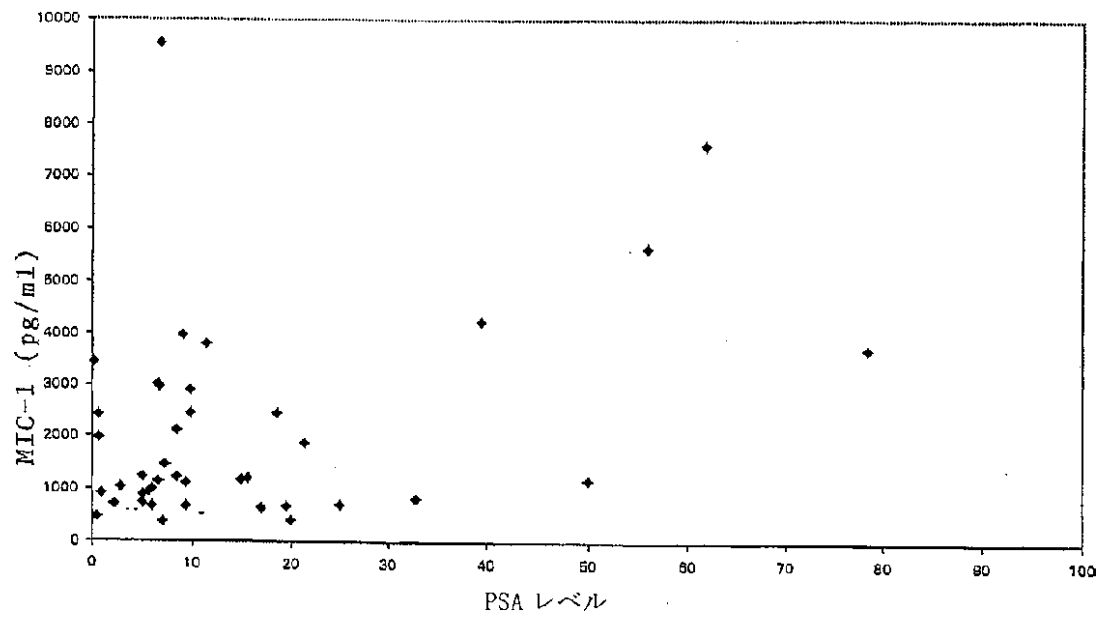
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 9
caggcgggtgc aggcctcgtct tgat 24

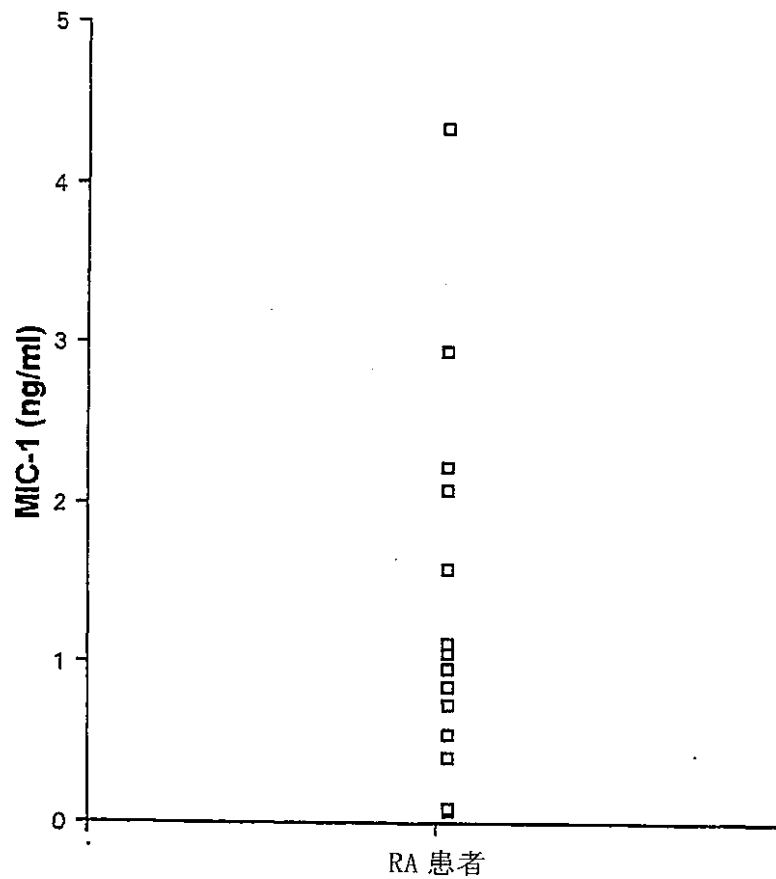
20

【図1】

PSA と比較した血清 MIC-1



【図2】

慢性関節リウマチを罹患する 14 名の無作為抽出した
患者から得られたデータ

【図3A】

A

完全長 MIC-1 の 202 位に H6 または D6 置換を有する
cDNA クローン由来の MIC-1 タンパク質のアラインメント
(成熟 MIC-1 の 6 位)

		10		20		30		40																																	
1	M	P	G	Q	E	L	R	T	L	N	G	S	Q	M	L	L	V	L	L	V	L	S	W	L	P	H	G	G	A	L	S	L	A	E	A	S	R	A	S	F	MIC-1/D6
1	M	P	G	Q	E	L	R	T	L	N	G	S	Q	M	L	L	V	L	L	V	L	S	W	L	P	H	G	G	A	L	S	L	A	E	A	S	R	A	S	F	MIC-1/H6
		50		60		70		80																																	
41	P	G	P	S	E	L	H	S	E	D	S	R	F	R	E	L	R	K	R	Y	E	D	L	L	T	R	L	R	A	N	Q	S	W	E	D	S	N	T	D	L	MIC-1/D6
41	P	G	P	S	E	L	H	T	E	D	S	R	F	R	E	L	R	K	R	Y	E	D	L	L	T	R	L	R	A	N	Q	S	W	E	D	S	N	T	D	L	MIC-1/H6
		90		100		110		120																																	
81	V	P	A	P	A	V	R	I	L	T	P	E	V	R	L	G	S	G	G	H	L	H	L	R	I	S	R	A	A	L	P	E	G	L	P	E	A	S	R	L	MIC-1/D6
81	V	P	A	P	A	V	R	I	L	T	P	E	V	R	L	G	S	G	G	H	L	H	L	R	I	S	R	A	A	L	P	E	G	L	P	E	A	S	R	L	MIC-1/H6
		130		140		150		160																																	
121	H	R	A	L	F	R	L	S	P	T	A	S	R	S	W	D	V	T	R	P	L	R	R	Q	L	S	L	A	R	P	Q	A	P	A	L	H	L	R	L	S	MIC-1/D6
121	H	R	A	L	F	R	L	S	P	T	A	S	R	S	W	D	V	T	R	P	L	R	R	Q	L	S	L	A	R	P	Q	A	P	A	L	H	L	R	L	S	MIC-1/H6
		170		180		190		200																																	
161	P	P	P	S	Q	S	D	Q	L	L	A	E	S	S	S	A	R	P	Q	L	E	H	L	R	P	Q	A	A	R	G	R	R	R	A	R	A	R	N	G	MIC-1/D6	
161	P	P	P	S	Q	S	D	Q	L	L	A	E	S	S	S	A	R	P	Q	L	E	L	H	L	R	P	Q	A	A	R	G	R	R	R	A	R	A	R	N	G	MIC-1/H6
		210		220		230		240																																	
201	D	H	C	P	L	G	P	G	R	C	C	R	L	H	T	V	R	A	S	L	E	D	L	G	W	A	D	W	V	L	S	P	R	E	V	Q	V	T	M	C	MIC-1/D6
201	D	H	C	P	L	G	P	G	R	C	C	R	L	H	T	V	R	A	S	L	E	D	L	G	W	A	D	W	V	L	S	P	R	E	V	Q	V	T	M	C	MIC-1/H6
		250		260		270		280																																	
241	I	G	A	C	P	S	Q	F	R	A	A	N	M	H	A	Q	I	K	T	S	L	H	R	L	K	P	D	T	V	P	A	P	C	C	V	P	A	S	Y	N	MIC-1/D6
241	I	G	A	C	P	S	Q	F	R	A	A	N	M	H	A	Q	I	K	T	S	L	H	R	L	K	P	D	T	V	P	A	P	C	C	V	P	A	S	Y	N	MIC-1/H6
		290		300																																					
281	P	M	V	L	I	Q	K	T	D	T	G	V	S	L	Q	T	Y	D	D	L	L	A	K	D	C	H	C	I												(配列番号1)	MIC-1/D6
281	P	M	V	L	I	Q	K	T	D	T	G	V	S	L	Q	T	Y	D	D	L	L	A	K	D	C	H	C	I												(配列番号2)	MIC-1/H6

修飾「修飾#1」: 陰影をつけた(黒色で)残基は MIC-1/H6 とは異なる

【図3B】

B 604 位に C→G 置換を有する cDNA クローン由来の
MIC-1 コード領域 DNA のアラインメント

		10	20	30	40	
1	A T G C C C C G G G C A A G A A C T C A G G A C G C T G A A T G G C T C T C A G A	MIC-1/H6				
1	A T G C C C C G G G C A A G A A C T C A G G A C G C T G A A T G G C T C T C A G A	MIC-1/D6				
		50	60	70	80	
41	T G C T C C T G G T G T T G C T G G T G C T C T C G T G G C T G C C G C A T G G	MIC-1/H6				
41	T G C T C C T G G T G T T G C T G G T G C T C T C G T G G C T G C C G C A T G G	MIC-1/D6				
		90	100	110	120	
81	G G G C G C C C T G T C T C T G G C C G A G G C G A G C C G C G C A A G T T T C	MIC-1/H6				
81	G G G C G C C C T G T C T C T G G C C G A G G C G A G C C G C G C A A G T T T C	MIC-1/D6				
		130	140	150	160	
121	C C G G G A C C C T C A G A G T T G C A C A C C G A A G A C T C C A G A T T C C	MIC-1/H6				
121	C C G G G A C C C T C A G A G T T G C A C A C C G A A G A C T C C A G A T T C C	MIC-1/D6				
		170	180	190	200	
161	G A G A G T T G C G G A A A C G C T A C G A G G A C C T G C T A A C C A G G C T	MIC-1/H6				
161	G A G A G T T G C G G A A A C G C T A C G A G G A C C T G C T A A C C A G G C T	MIC-1/D6				
		210	220	230	240	
201	G C G G G C C A A C C A G A G C T G G G A A G A T T C G A A C A C C G A C C T C	MIC-1/H6				
201	G C G G G C C A A C C A G A G C T G G G A A G A T T C G A A C A C C G A C C T C	MIC-1/D6				
		250	260	270	280	
241	G T C C C G G C C C C T G C A G T C C G G A T A C T C A C G C C A G A A G T G C	MIC-1/H6				
241	G T C C C G G C C C C T G C A G T C C G G A T A C T C A C G C C A G A A G T G C	MIC-1/D6				
		290	300	310	320	
281	G G C T G G G A T C C G G C G G C C A C C T G C A C C T G C G T A T C T C T C G	MIC-1/H6				
281	G G C T G G G A T C C G G C G G C C A C C T G C A C C T G C G T A T C T C T C G	MIC-1/D6				
		330	340	350	360	
321	G G C C G C C C T T C C C G A G G G G C T C C C C G A G G C C T C C G C C T T	MIC-1/H6				
321	G G C C G C C C T T C C C G A G G G G C T C C C C G A G G C C T C C G C C T T	MIC-1/D6				
		370	380	390	400	
361	C A C C G G G C T C T G T T C C G G C T G T C C C C G A C G G C G T C A A G G T	MIC-1/H6				
361	C A C C G G G C T C T G T T C C G G C T G T C C C C G A C G G C G T C A A G G T	MIC-1/D6				
		410	420	430	440	
401	C G T G G G A C G T G A C A C G A C C T C T G C G G C G T C A G C T C A G C C T	MIC-1/H6				
401	C G T G G G A C G T G A C A C G A C C T C T G C G G C G T C A G C T C A G C C T	MIC-1/D6				
		450	460	470	480	
441	T G C A A G A C C C C A G G C G C C C G C G C T G C A C C T G C G A C T G T C G	MIC-1/H6				
441	T G C A A G A C C C C A G G C G C C C G C G C T G C A C C T G C G A C T G T C G	MIC-1/D6				
		490	500	510	520	
481	C C G C C G C C G T C G C A G T C G G A C C A A C T G C T G G C A G A A T C T T	MIC-1/H6				
481	C C G C C G C C G T C G C A G T C G G A C C A A C T G C T G G C A G A A T C T T	MIC-1/D6				

修飾「修飾 # 1」: 陰影をつけた (黒色で) 残基は MIC-1/H6 とは異なる

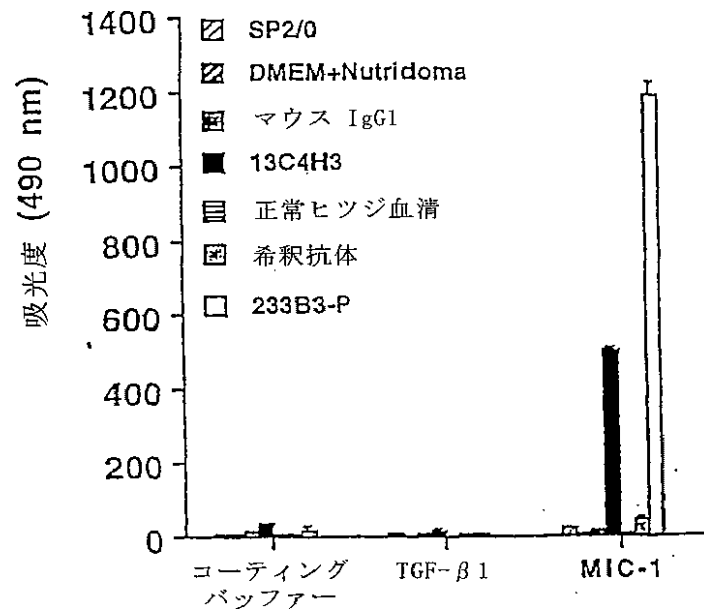
【図3B-1】

B 続き

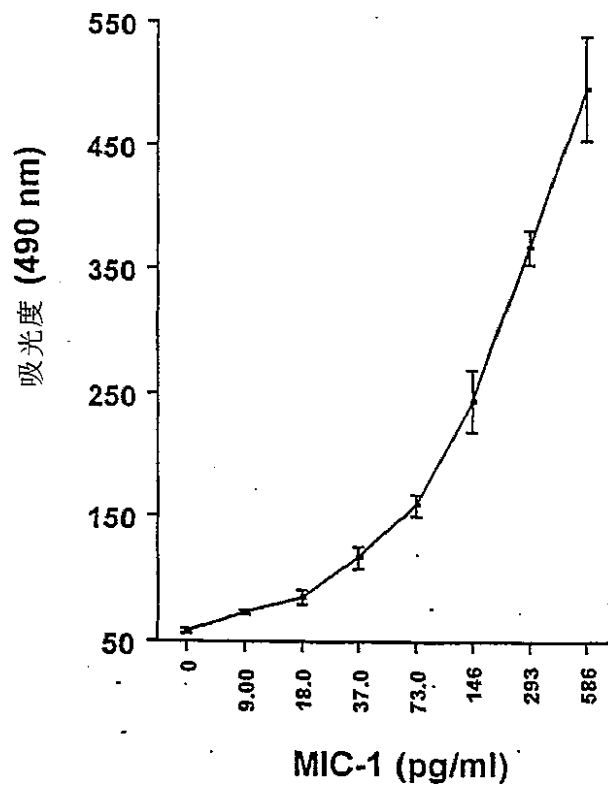
521	C G T C C G C A C G G C C C C A G C T G G A G T T G C A C T T G C G G C C C G C A	530	540	550	560	MIC-1/H6
521	C G T C C G C A C G G C C C C A G C T G G A G T T G C A C T T G C G G C C C G C A					MIC-1/D6
561	A G C C G C C A G G G G G C G C C G C A G A G C G C G T G C G C G C A A C G G G	570	580	590	600	MIC-1/H6
561	A G C C G C C A G G G G G C G C C G C A G A G C G C G T G C G C G C A A C G G G					MIC-1/D6
601	G A C C A C T G T C C G C T C G G G C C C G G C C C G T T G C T G C C G T C T G C	610	620	630	640	MIC-1/H6
601	G A C C A C T G T C C G C T C G G G C C C G G G C G T T G C T G C C G T C T G C					MIC-1/D6
641	A C A C G G T C C G C G C G T C G C T G G A A G A C C T G G G C T G G G C C G A	650	660	670	680	MIC-1/H6
641	A C A C G G T C C G C G C G T C G C T G G A A G A C C T G G G C T G G G C C G A					MIC-1/D6
681	T T G G G T G C T G T C G C C A C G G G A G G T G C A A G T G A C C A T G T G C	690	700	710	720	MIC-1/H6
681	T T G G G T G C T G T C G C C A C G G G A G G T G C A A G T G A C C A T G T G C					MIC-1/D6
721	A T C G G C G C G T G C C C G A G C C A G T T C C G G G C G G C A A A C A T G C	730	740	750	760	MIC-1/H6
721	A T C G G C G C G T G C C C G A G C C A G T T C C G G G C G G C A A A C A T G C					MIC-1/D6
761	A C G C G C A G A T C A A G A C G A G C C T G C A C C G C C T G A A G C C C G A	770	780	790	800	MIC-1/H6
761	A C G C G C A G A T C A A G A C G A G C C T G C A C C G C C T G A A G C C C G A					MIC-1/D6
801	C A C G G T G C C A G C G C C C T G C T G C G T G C C C G C C A G C T A C A A T	810	820	830	840	MIC-1/H6
801	C A C G G T G C C A G C G C C C T G C T G C G T G C C C G C C A G C T A C A A T					MIC-1/D6
841	C C C A T G G T G C T C A T T C A A A A G A C C G A C A C C G G G T G T C G C	850	860	870	880	MIC-1/H6
841	C C C A T G G T G C T C A T T C A A A A G A C C G A C A C C G G G T G T C G C					MIC-1/D6
881	T C C A G A C C T A T G A T G A C T T G T T A G C C A A A G A C T G C C A C T G	890	900	910	920	MIC-1/H6
881	T C C A G A C C T A T G A T G A C T T G T T A G C C A A A G A C T G C C A C T G					MIC-1/D6
921	C A T A T G A	(配列番号3)				MIC-1/H6
921	C A T A T G A	(配列番号4)				MIC-1/D6

修飾 '修飾 # 1': 陰影をつけた (黒色で) 残基は MIC-1/H6 とは異なる

【図4】



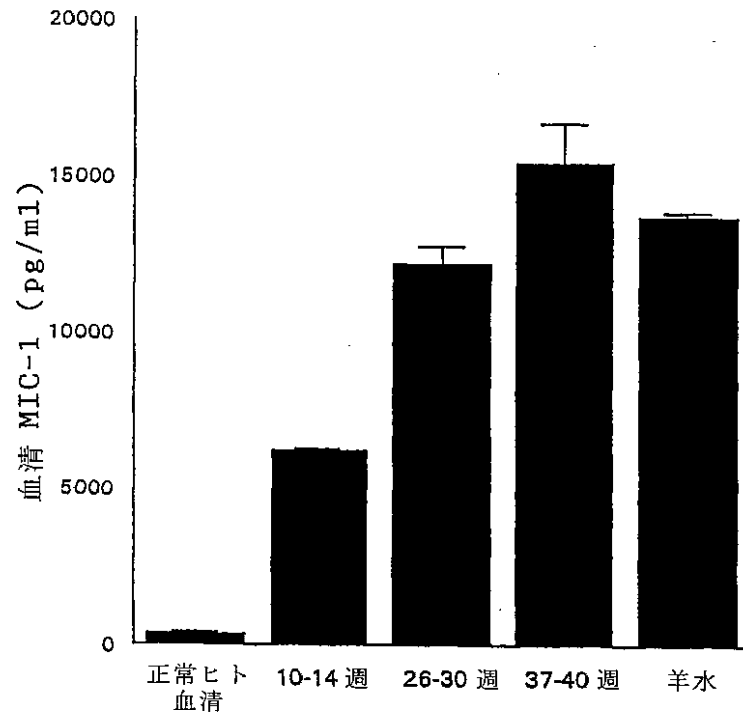
【図5】



【図6】

A

プール血清中 MIC-1 濃度と妊娠期に関するデータ

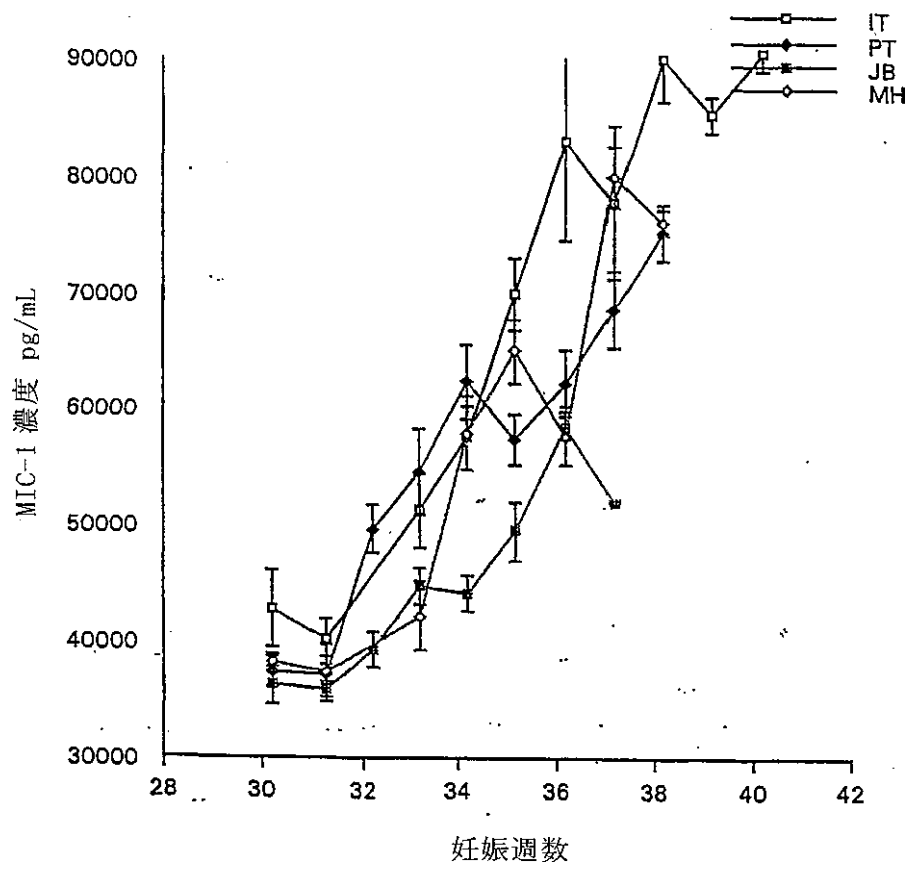


B



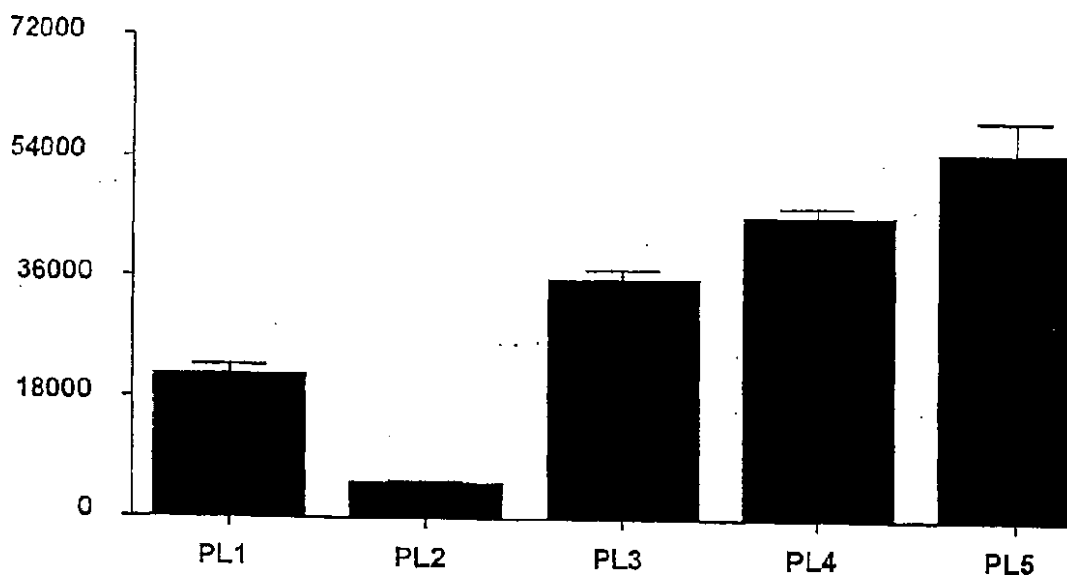
【図7】

各妊娠期における経時的血清中濃度概算値



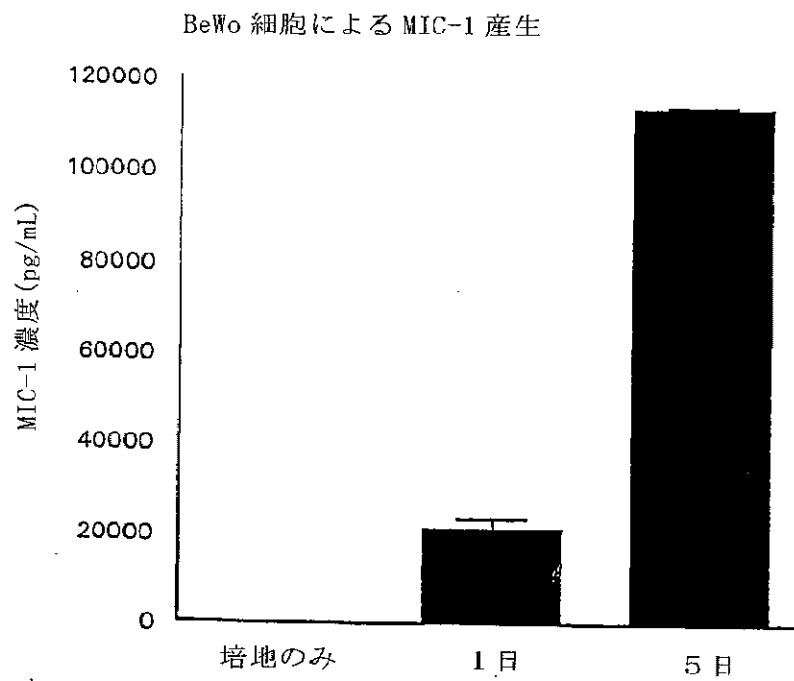
【図8】

MIC-1 濃度 (pg/mL)



【図9】

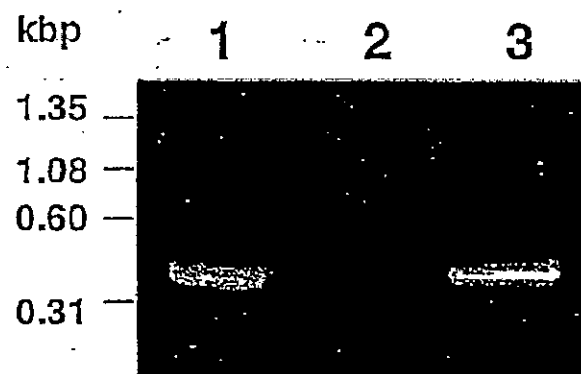
A



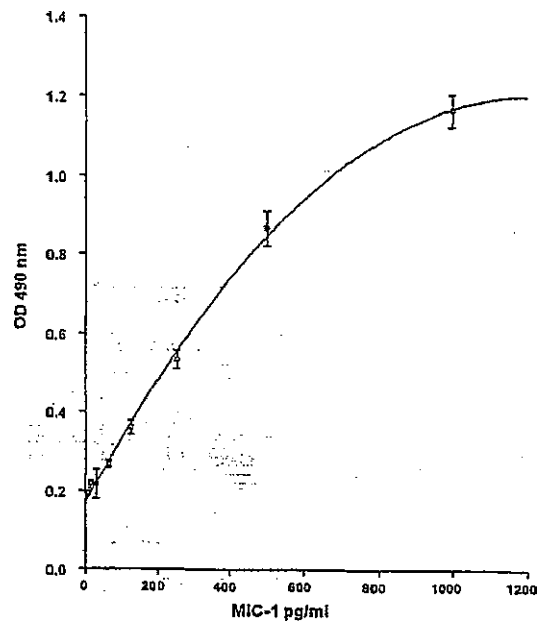
B



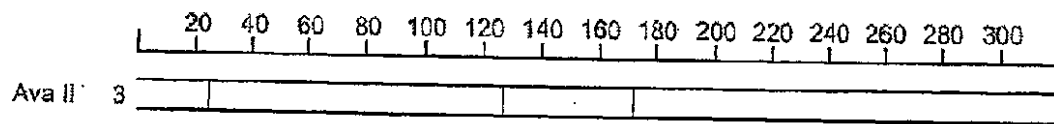
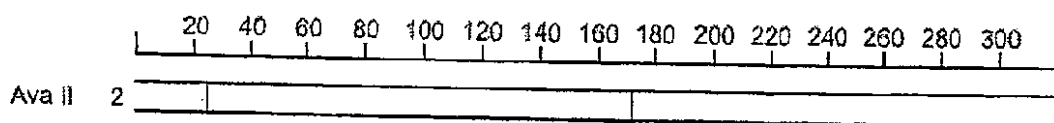
C



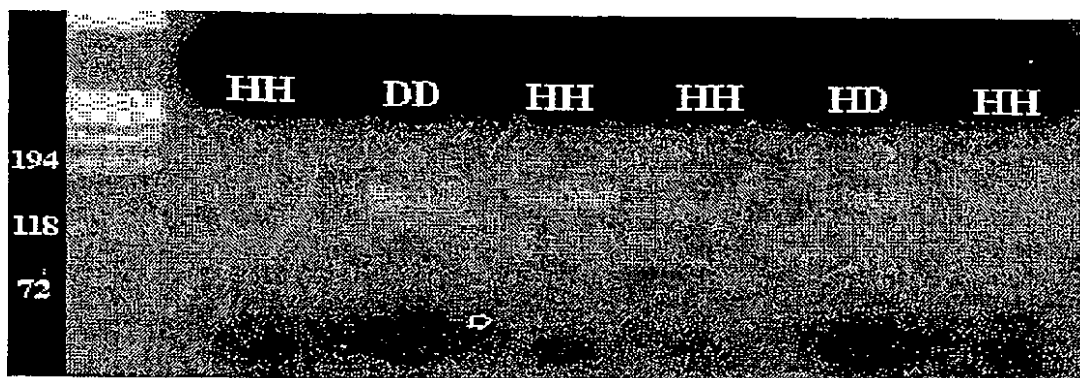
【図10】



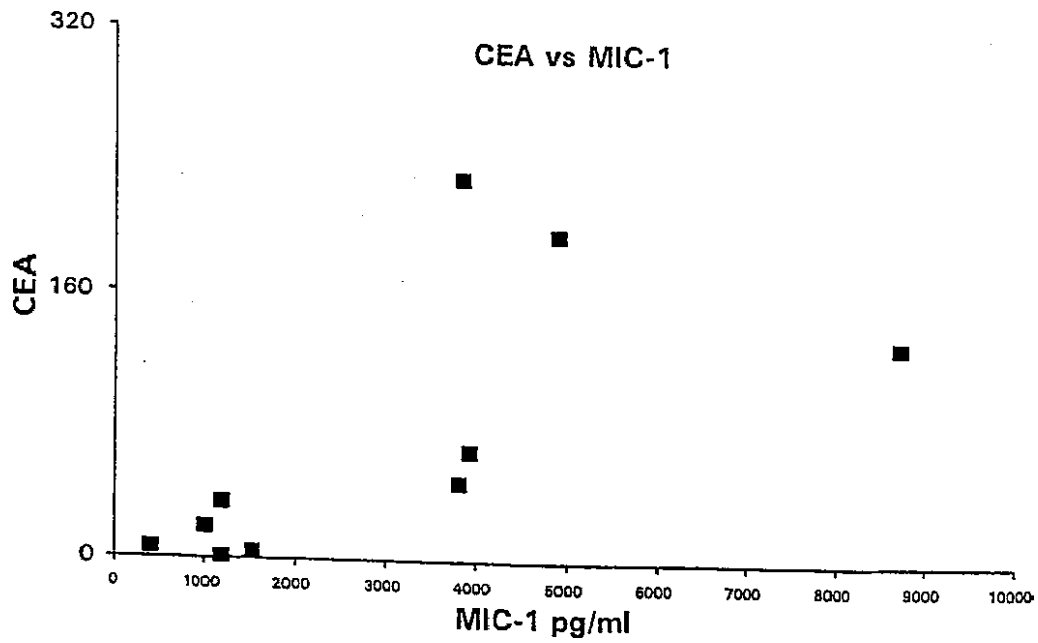
【図11】

H 6 制限マップD 6 制限マップ

【図12】

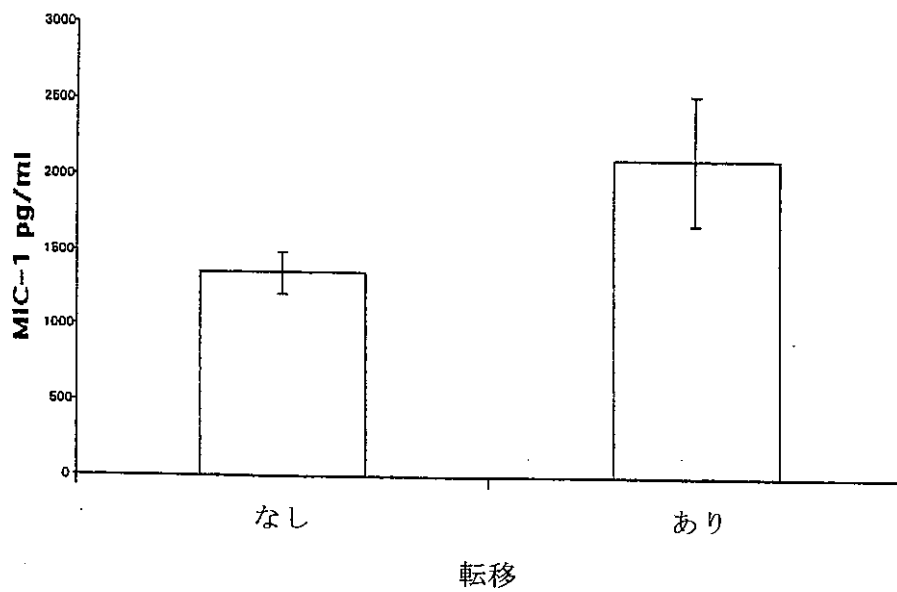


【図13】

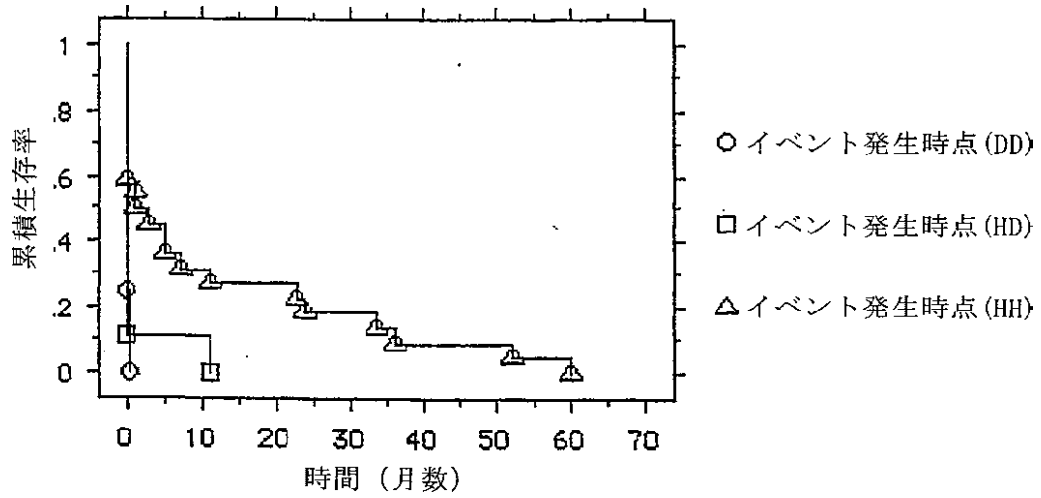


【図14】

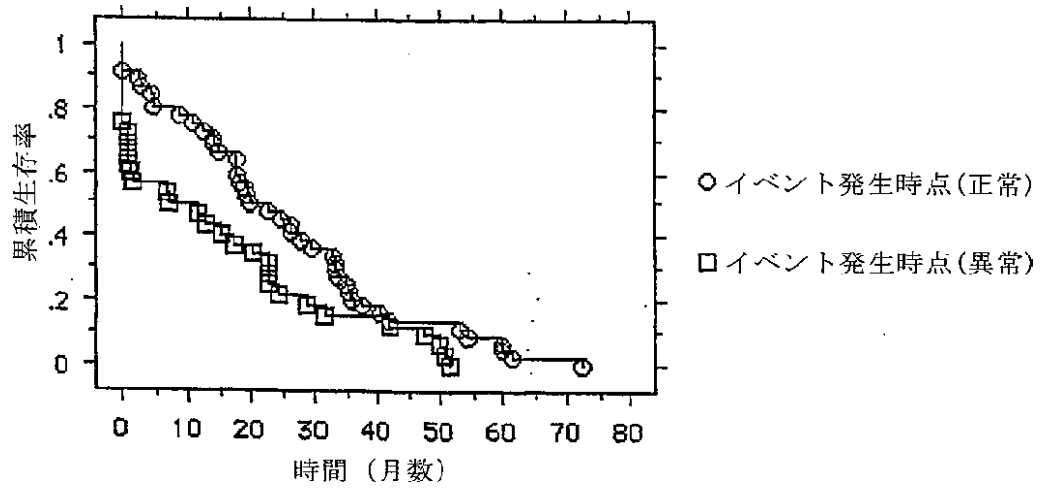
MIC-1 レベル vs 転移の存在



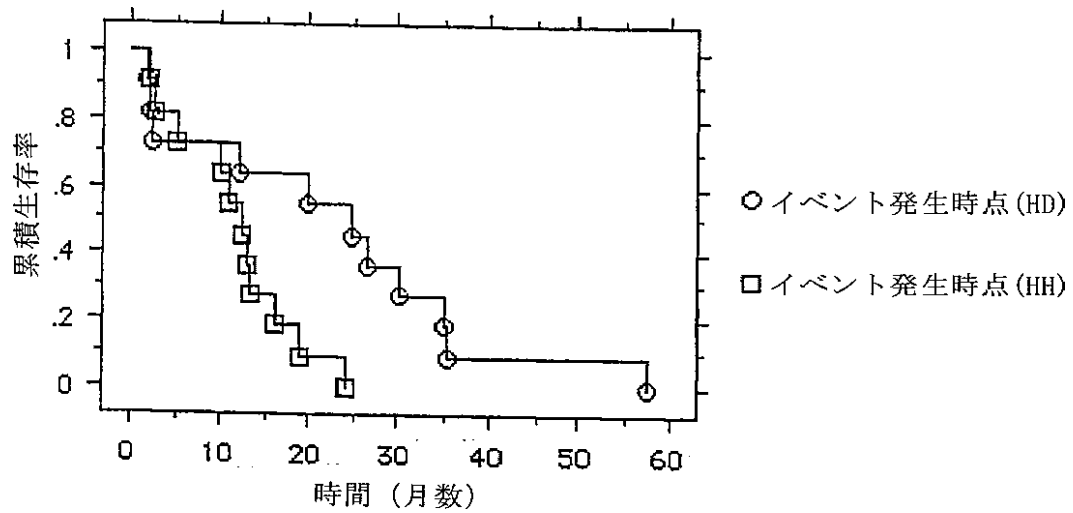
【図15】



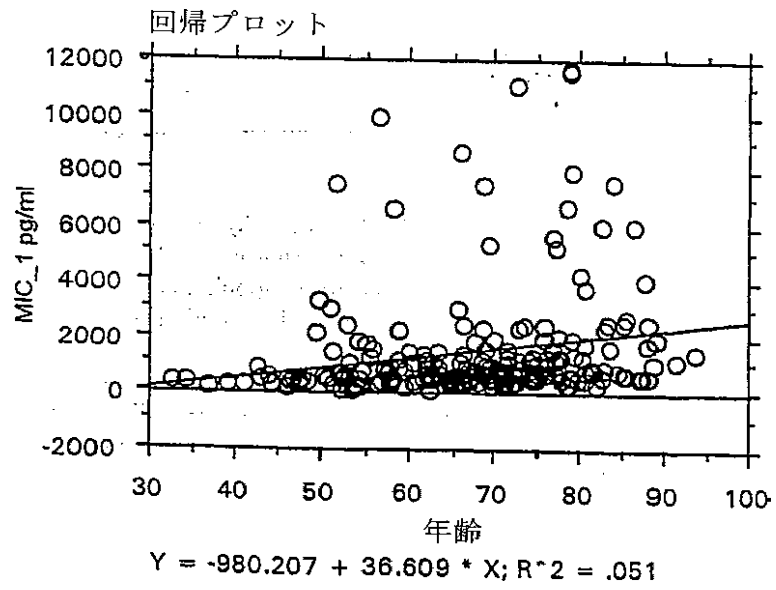
【図16】



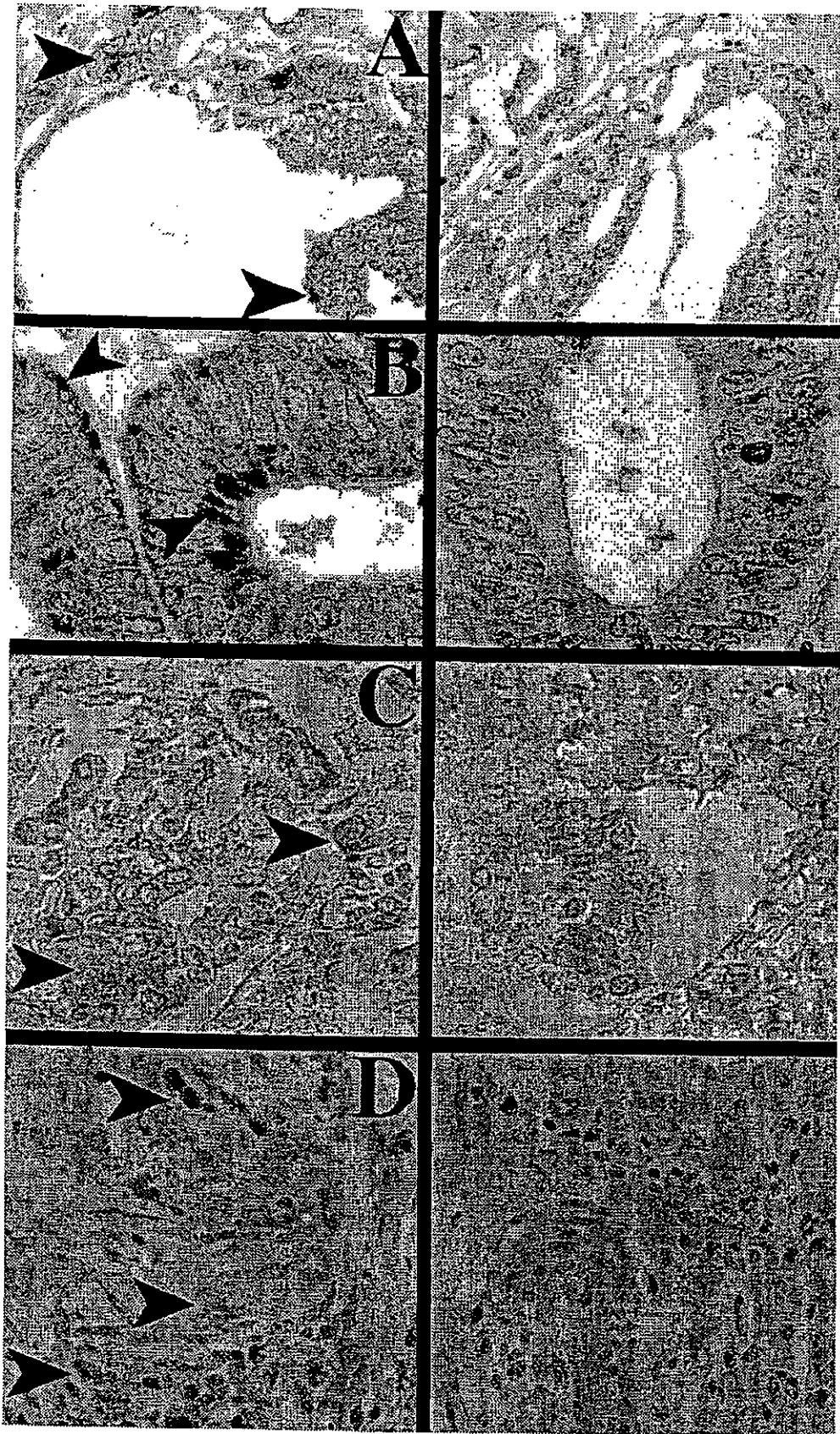
【図17】



【図18】

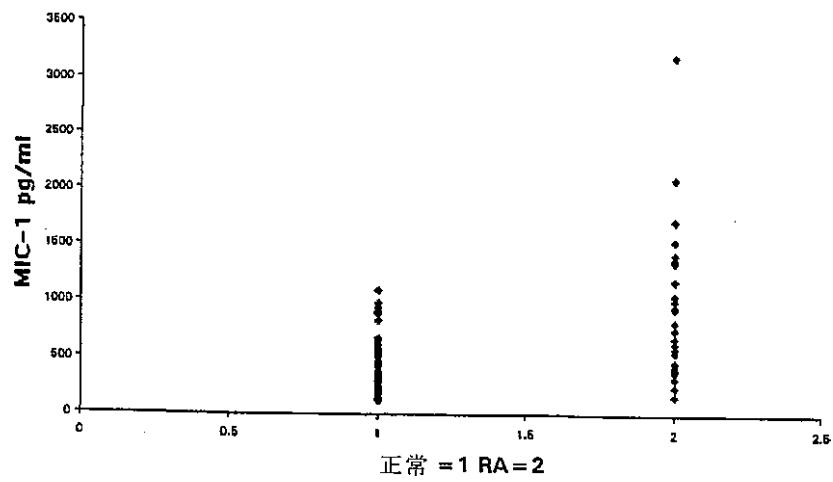


【図19】



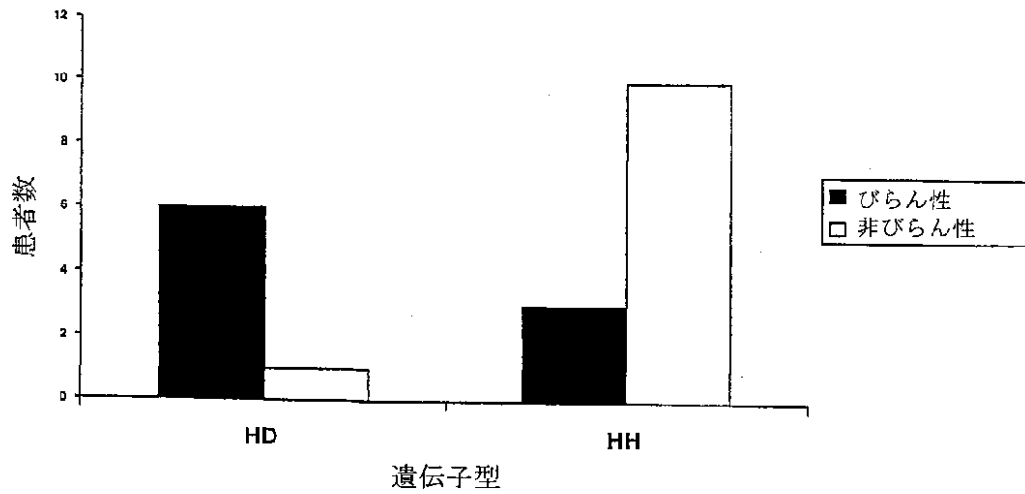
【図20】

正常被験者およびRA被験者におけるMIC-1 レベル

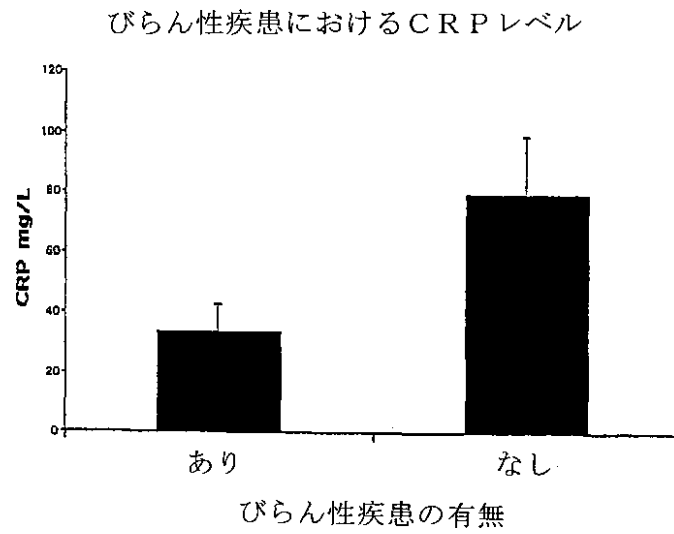


【図21】

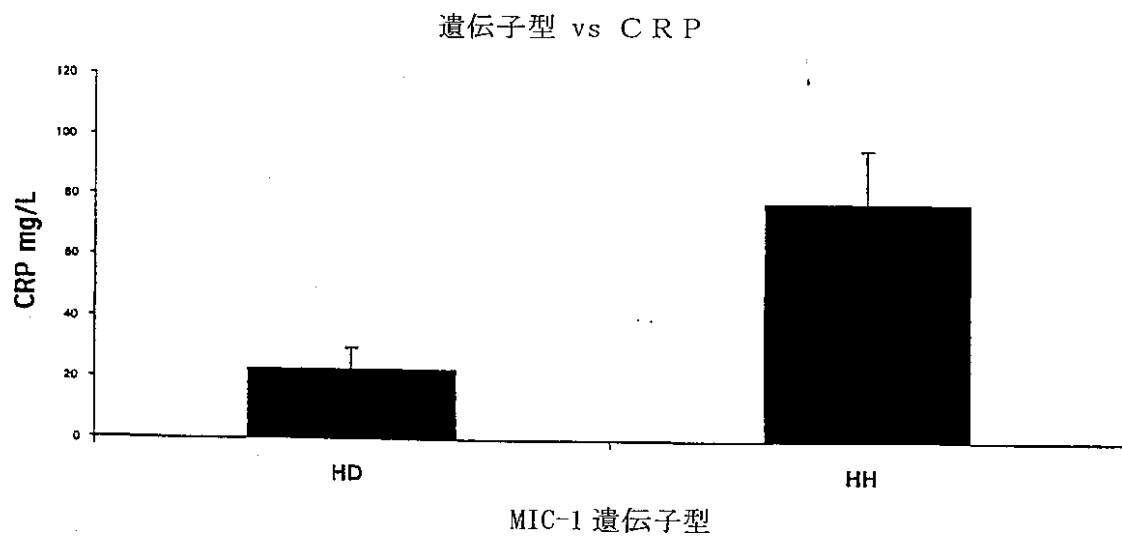
びらん性RA vs 遺伝子型



【図22】



【図23】



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成14年3月8日（2002. 3. 8）

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 流産のリスクおよび／または早産の診断方法であって、以下のステップ：

(i) 既知の妊娠期にある妊娠試験被験者から採取した身体サンプル中に存在するMIC-1の量を測定するステップ；および

(ii) 上記(i)における測定量と、上記試験被験者の既知の妊娠期と実質的に等価な妊娠期にある正常妊娠被験者から採取した等価な身体サンプル中に存在するMIC-1の量または量の範囲を比較するステップ；

を含む上記方法。

【請求項2】 上記身体サンプルが、全血、血清、血漿、羊水、胎盤抽出物、尿および脳脊髄液から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 上記身体サンプルが、血清、羊水、および胎盤抽出物から選択される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 上記身体サンプルが血清由来のサンプルである、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 上記試験被験者が妊娠期の第1トリメスターにあり、該試験被験者の血清中に存在するMIC-1の測定量が4 ng/mL以下であることが流産および／または早産の高リスクの指標となる、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 上記試験被験者が妊娠期の第2トリメスターにあり、該試験被験者の血清中に存在するMIC-1の測定量が8 ng/mL以下であることが流産および／または早産の高リスクの指標となる、請求項4に記載の方法。

【請求項7】 上記試験被験者が妊娠期の第3トリメスターにあり、該試験

被験者の血清中に存在するMIC-1の測定量が12ng/mL以下であることが流産および／または早産の高リスクの指標となる、請求項4に記載の方法。

【請求項8】 上記身体サンプルが羊水由来のサンプルである、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】 上記試験被験者が妊娠期の第2トリメスターにあり、該試験被験者の羊水サンプル中に存在するMIC-1の測定量が10ng/mL以下であることが流産および／または早産の高リスクの指標となる、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 上記身体サンプルが胎盤抽出物由来のサンプルである、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】 上記試験被験者が妊娠期の第3トリメスターにあり、該試験被験者の胎盤抽出物サンプル中に存在するMIC-1の測定量が約18ng/mL以下であることが流産および／または早産の高リスクの指標となる、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 上記試験被験者が妊娠期の第3トリメスターにあり、該試験被験者の胎盤抽出物サンプル中に存在するMIC-1の測定量が約10ng/mL以下であることが流産および／または早産の高リスクの指標となる、請求項10に記載の方法。

【請求項13】 流産および／または早産のリスクを低減させるための妊娠被験者の治療方法であって、該被験者に対し、有効量のMIC-1を、必要に応じて薬学上許容される担体および／または賦形剤と混合させて、投与すること、を含む上記方法。

【請求項14】 上記有効量のMIC-1は、投与されたMIC-1と被験者の胎盤組織中に存在する内因性MIC-1との合計量が15～70ng/mLの範囲に維持される量である、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 上記有効量のMIC-1は、投与されたMIC-1と被験者の胎盤組織中に存在する内因性MIC-1との合計量が30～50ng/mLの範囲に維持される量である、請求項13に記載の方法。

【請求項16】 流産および／または早産のリスクを低減させるための妊娠被験者を治療する方法であって、発現可能なMIC-1コードヌクレオチド配列を含

む組換えアデノウイルスベクターもしくは組換えアデノウイルス関連ベクターを該被験者に投与するステップ；あるいは、適切なプロモーター配列に機能的に連結された線状MIC-1コードDNAを含むリポソームを該被験者に投与するステップ、を含む上記方法。

【請求項17】 胎児異常の診断方法であって、以下のステップ：

(i) 既知の妊娠期にある妊娠試験被験者から採取した身体サンプル中に存在するMIC-1の量を測定するステップ；および

(ii) 上記(i)における測定量と、上記試験被験者の既知の妊娠期と実質的に等価な妊娠期にある正常妊娠被験者から採取した等価な身体サンプル中に存在するMIC-1の量または量の範囲を比較するステップ；

を含む上記方法。

【請求項18】 異常なレベルのMIC-1の発現を特徴とする癌の診断方法または評価方法であって、以下のステップ：

(i) 試験被験者から採取した身体サンプル中に存在するMIC-1の量を測定するステップ；および

(ii) 上記(i)における測定量と、正常被験者から採取した等価な身体サンプル中に存在するMIC-1の量または量の範囲を比較するステップ；

を含む上記方法。

【請求項19】 上記身体サンプルが、血清、血漿、尿、脳脊髄液、滑液、精液または組織生検から選択される、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 上記癌が、前立腺癌、乳癌、大腸癌、直腸癌または膀胱癌である、請求項18または19に記載の方法。

【請求項21】 慢性関節リウマチの診断方法であって、以下のステップ：

(i) 試験被験者から採取した身体サンプル中に存在するMIC-1の量を測定するステップ；および

(ii) 上記(i)における測定量と、正常被験者から採取した等価な身体サンプル中に存在するMIC-1の量または量の範囲を比較するステップ；

を含む上記方法。

【請求項22】 上記身体サンプルが、血清、血漿および滑液から選択され

る、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 身体サンプル中に存在するMIC-1の量を、MIC-1に対する抗体またはそのフラグメントを使用するイムノアッセイまたは免疫組織化学によって測定する、請求項1～12または17～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】 被験者の炎症を治療する方法であって、該被験者に対し、有効量のMIC-1を、必要に応じて薬学上許容される担体および／または賦形剤と混合させて、投与すること、を含む上記方法。

【請求項25】 ヒト被験者における炎症性疾患および／または癌の診断方法または評価方法であって、被験者から採取した適切なサンプル中においてMIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質の存在を判定するステップを含む上記方法。

【請求項26】 ヒト被験者における炎症性疾患および／または癌への素因を評価する方法であって、被験者から採取した適切なサンプル中においてMIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質の存在を判定するステップを含む上記方法。

【請求項27】 ヒト被験者における炎症性疾患および／または癌の診断方法または評価方法であって、被験者から採取した適切なサンプル中においてMIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にヒスチジンを有するMIC-1変異タンパク質の存在を判定するステップを含む上記方法。

【請求項28】 ヒト被験者における炎症性疾患および／または癌への素因を評価する方法であって、被験者から採取した適切なサンプル中においてMIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にヒスチジンを有するMIC-1変異タンパク質の存在を判定するステップを含んでなる上記方法。

【請求項29】 上記炎症性疾患が慢性関節リウマチである、請求項25～28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】 上記癌が前立腺癌である、請求項25～28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項31】 上記サンプル中のMIC-1変異タンパク質の存在を、ヒト野生型MIC-1および／もしくは202位にヒスチジンを有する変異体または202位にアス

パラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質と特異的に結合する抗体、あるいはそのフラグメントを使用するイムノアッセイによって判定する、請求項25～28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】 上記サンプルが、全血、血清、血漿、尿または組織生検から選択される、請求項25～31のいずれか1項に記載の方法。

【請求項33】 MIC-1に関してヒト被験者の遺伝子型を決定する方法であって、MIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にヒスチジンを有するMIC-1タンパク質に対して、または、MIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質に対して、該被験者がホモ接合型またはヘテロ接合型であるかどうかを判定することを含む上記方法。

【請求項34】 ヒト被験者における炎症性疾患および／または癌の診断方法または評価方法、あるいは、ヒト被験者における炎症性疾患および／または癌への素因を評価する方法であって、MIC-1に関してヒト被験者の遺伝子型を決定するステップを含み、該ステップは、MIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にヒスチジンを有するMIC-1タンパク質に対して、または、MIC-1の202位もしくは未成熟ヒト野生型MIC-1の202位に対応する位置にアスパラギン酸を有するMIC-1変異タンパク質に対して該被験者がホモ接合型またはヘテロ接合型であるかどうかを判定することを含むものである、上記方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU01/00456
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. 7:	G01N 33/68, G01N 33/574, C07K 16/24, C12N 15/19, C12Q 1/68, A61K 48/00, A61K 38/19	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
See electronic databases recorded below: Chemical Abstracts, World Patents..		
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)		
Derwent WPAT, JAPIO; STN CAPLUS, MEDLINE; Keywords used.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	WO 99/06445 (The John Hopkins University School of Medicine) 11 February 1999, see page 5, line 24-page 6, line 10 in particular.	1-6, 15, 18-26
X, Y	WO 97/00958 (St. Vincent's Hospital Sydney Limited) 9 January 1997, see page 1, paragraph 1, page 4, line 28 - page 5, line 19 in particular.	1-2, 19-26
P, X, Y	WO 00/70051 (Biopharm Gesellschaft B.E.V.P. MBH) 23 November 2000, see the whole document.	1-2, 19
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 June 2001		Date of mailing of the international search report 22 June 2001
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6283 3929		Authorized officer DAVID HENNESSY Telephone No. (02) 6283 2255

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU01/00456
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J.Biochem., vol. 122, 622-626, Yokoyama-Kobayashi, M. et al. (1997) Human cDNA Encoding a Novel TGF-beta Superfamily Protein Highly Expressed in Placenta; see the abstract in particular.	1-19
X,Y	Gene, vol. 203, 17-26, Lawton, L.N. et al. (1997) Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta, see the abstract and part 3.2 in particular.	1-19
Y	Obstetrics & Gynecology, vol. 81, 941-948, Hillier, S.L. et al. (1993) The Relationship of Amniotic Fluid Cytokines and Preterm Delivery, Amniotic Fluid Infection, Histologic Chorioamnionitis, and Chorioamnion Infection, see the abstract and discussion in particular.	1-19
Y	Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1354, 40-44, Hromas, R. et al. (1997) PLAB, a novel placental bone morphogenic protein, see the abstract and pages 42-43 in particular.	1-19
Y	J. Biol. Chem., vol. 273, issue 22, 13760-13767, Paralkar, V. et al. (1998) Cloning and Characterization of a Novel Member of the transforming Growth Factor-beta/ Bone Morphogenetic Protein Family, see the abstract in particular.	1-19, 23-31, 33-36
P, X, Y	The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, vol.85, no.12, 4781-4788, Moore, A.G. et al. (2000) The Transforming Growth Factor-beta Superfamily Cytokine Macrophage Inhibitory Cytokine-1 is Present in High Concentrations in the Serum of Pregnant Women, see the abstract, discussion and references in particular.	1-19, 23-31, 33-36
X, Y	Journal of Leukocyte Biology, vol. 65, 2-5, Fairlie, W.D. et al. (1999) MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation, see the abstract, introduction, and paragraph regarding the function of MIC-1 in particular.	1-6, 12, 19, 23-24, 26
X,Y	Proc.Natl.Acad.Sci USA, vol. 94, 11514-11519, Boateov, M.R. et al. (1997) MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily, see the abstract and discussion in particular.	1-2, 19, 23-24, 26
P,X,Y	Journal of Neural Transmission; Supplementum 60; Advances in Research on Neurodegeneration, vol. 8; 273-276, Strelau, J. et al. (2000) GDF-15/MIC-1 a novel member of the TGF-beta superfamily, see the summary, page 275, and the references in particular.	1-2, 19
P,X,Y	The Journal of Neuroscience, vol. 20 (23), 8597-8603, Strelau, J. et al. (2000) Growth/Differentiation Factor-15/Macrophage Inhibitory Cytokine-1 Is a Novel Trophic Factor for Midbrain Dopaminergic Neurons In Vivo, see page 8597, second column, the discussion and the references in particular.	1-2, 19
X,Y	Gene, vol. 237, 105-111, Bottnet, M. et al. (1999) Characterisation of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1), see the abstract and part 3.4 in particular.	1-6, 12, 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU01/00456

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	Cell and Tissue Research, vol 297, 103-110, Bottner, M. et al. (1999) Expression of a novel member of the TGF-beta superfamily, growth/differentiation factor-15/macrophage-inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in adult rat tissues, see the abstract and discussion in particular.	1-2, 20-22, 25
A	The EMBO Journal, vol. 19, no. 10, 2212-2220, Bauskin, A.R. et al. (2000) The propeptide of macrophage inhibitory cytokine (MIC-1), a TGF-beta superfamily member, acts as a quality control determinant for correctly folded MIC-1, see the introduction in particular.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/AU01/00456

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report			Patent Family Member			
WO	99/06445	AU	85911/98			
WO	97/00958	AU	61157/96	CA	2225377	EP 833912
WO	00/70051	AU	50671/00			
						END OF ANNEX

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09		A 6 1 K 37/02	
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	A
(81)指定国	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, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	ブラウン, デービッド, アレクサンダー オーストラリア国 エヌエスダブリュ 2026, ボンディ ビーチ, ビーチ ロード 86, フラット 6		
Fターム(参考)	4B024 AA01 AA11 AA12 CA04 EA02 FA02 FA08 HA11 HA17 4B063 QA12 QA19 QQ03 QQ43 QR62 QS25 QS34 4C084 AA02 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 CA18 DA01 DA05 NA14 ZA811 ZB012 ZB111		

专利名称(译)	与巨噬细胞抑制细胞因子-1 (MIC-1) 相关的诊断测定和治疗方法		
公开(公告)号	JP2003532079A	公开(公告)日	2003-10-28
申请号	JP2001578963	申请日	2001-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	圣仙Vin的悉尼医院有限公司		
申请(专利权)人(译)	圣Vinsentsu医院悉尼有限公司		
[标]发明人	ブライトサミュエルノルバート ブラウンデービッドアレクサンダー		
发明人	ブライト,サミュエル,ノルバート ブラウン,デービッド,アレクサンダー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K38/19 A61K48/00 A61P15/06 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/24 C12N15/09 C12N15/19 C12Q1/68 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/195 A61P15/06 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/24 C07K2317/34 C12Q1/6883 C12Q1/6886 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N33/6893 G01N2800/102		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.P A61P15/06 A61P29/00 A61P43/00.111 C12Q1/68.A A61K37/02 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/EA02 4B024/FA02 4B024/FA08 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA12 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ43 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/DA01 4C084/DA05 4C084/NA14 4C084/ZA811 4C084/ZB012 4C084/ZB111		
优先权	2000PQ7037 2000-04-20 AU 2000PQ7465 2000-05-11 AU		
其他公开文献	JP4920851B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了一种诊断流产和/或早产，胎儿异常，癌症（例如前列腺癌）和炎性疾病（例如类风湿性关节炎）的风险的方法。该诊断方法包括测量人体样本中巨噬细胞抑制细胞因子-1 (MIC-1) 的异常水平，或确定MIC-1突变蛋白的存在。此外，本发明公开了用于减少怀孕受试者中流产和/或早产的风险的方法，以及治疗炎性疾病和/或癌症的方法。

検体 ID	B26	B13	13/26	MIC-1 pg/ml	遺伝子型	DNA 配列
SH	54	15	0.3	270	HD	HD
TL	56	71	1.1	328	HL	HL
AB	50	12	0.2	250	HD	HD
DX	41	9	0.2	235	HD	HD
DF	38	45	1.2	192	HH	HH
AC	124	118	0.5	920	HH	HH
JL	35	5	0.2	175	HD	HD
NX	182	123	0.7	912	HH	HH
TK	37	7	0.2	135	HD	HD
UJ	49	44	0.9	238	HH	HH
BC	45	<0	<0	227	DD	DD
JK	83	21	0.3	414	HD	HD
KW	46	7	0.1	228	HD	HD
WW	58	68	1.1	291	HH	HH
SS	74	71	1	359	HH	HH
BD	838	218	0.3	4180	HD	HD
DB	33	38	1.2	162	HH	HH
GL	40	50	1.2	189	HH	HH
EM	80	98	1.2	400	HH	HH
AE	718	384	0.5	3594	HD	HD
NR	112	89	0.8	559	HH	HH
MS	49	69	1.4	243	HH	HH
CS	19	57	1.2	243	HH	HH
RI	221	131	0.5	1825	HD	HD
KW	44	7	0.2	218	HD	HD
BS	130	48	0.4	651	HD	HD
HM	55	21	0.3	324	HD	HD
JZ	66	27	0.4	332	HD	HD
ML	208	188	0.5	1646	HD	HD
MN	44	51	1.2	229	HH	HH
CH	39	8	0.2	197	HD	HD
IS	39	42	1.2	198	HH	HH
LP	42	<0	<0	209	DD	DD
HL	50	48	0.5	450	HH	HH
GH	40	14	0.3	201	HD	HD
LZ	27	35	1.1	182	HH	HH
DS	593	921	1	2516	HH	HH
FE	113	47	0.4	585	HD	HD