

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4160292号  
(P4160292)

(45) 発行日 平成20年10月1日(2008.10.1)

(24) 登録日 平成20年7月25日(2008.7.25)

(51) Int. Cl.

F 1

<b>A 6 1 K 38/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	
<b>A 6 1 K 9/127</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 9/127	
<b>A 6 1 K 48/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	
<b>A 6 1 P 35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 P 43/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00	1 0 5

請求項の数 10 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2001-354282 (P2001-354282)  
 (22) 出願日 平成13年11月20日(2001.11.20)  
 (65) 公開番号 特開2003-155251 (P2003-155251A)  
 (43) 公開日 平成15年5月27日(2003.5.27)  
 審査請求日 平成16年9月8日(2004.9.8)

前置審査

(73) 特許権者 503360115  
 独立行政法人科学技術振興機構  
 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(74) 代理人 100107984  
 弁理士 廣田 雅紀

(72) 発明者 長田 重一  
 大阪府箕面市粟生院4-3-18

審査官 佐久 敬

(56) 参考文献 Nature, 1990年, Vol.343, P.170-173

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤及び除去阻害剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

高プロリン/スレオニン含有ドメインを有するMFG-E8を有効成分とすることを特徴とするマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤。

【請求項2】

(a) 高プロリン/スレオニン含有ドメインを有するMFG-E8を構成するアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ(b)マクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進作用を有するMFG-E8変異体を有効成分とすることを特徴とするマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤。

【請求項3】

高プロリン/スレオニン含有ドメインを有するMFG-E8又はアポトーシス細胞の除去作用を有するそのMFG-E8変異体が、高プロリン/スレオニン含有ドメインを有する組換えMFG-E8又はその組換えMFG-E8変異体であることを特徴とする請求項1又は2記載のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤。

【請求項4】

組換えMFG-E8又は組換えMFG-E8変異体が、組換えヒト若しくはマウスMFG-E8又は組換えヒト若しくはマウスMFG-E8変異体であることを特徴とする請求項3記載のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤。

【請求項5】

組換えMFG-E8又は組換えMFG-E8変異体が、ヒト細胞中での翻訳産物であることを特徴とする請求項3又は4記載のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤。

【請求項6】

MFG-E8又はMFG-E8変異体が、リポソームに封入又は包埋されていることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤。

【請求項7】

請求項1～5のいずれかに記載されたMFG-E8又はMFG-E8変異体をコードするDNAを含む組換えベクターを有効成分とすることを特徴とするマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤。

10

【請求項8】

請求項1～5のいずれかに記載されたMFG-E8又はMFG-E8変異体を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞を有効成分とすることを特徴とするマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか記載の生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤を含有することを特徴とするマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去不全に起因する疾病の治療薬。

【請求項10】

20

請求項1～8のいずれか記載の生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤を含有することを特徴とする生体防御機能増強剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、マクロファージによる生体内でアポトーシスを起こした細胞（以下「アポトーシス細胞」という）の除去促進剤や、マクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去阻害剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

30

生理的な条件下で細胞自らが積極的に惹起するようにプログラムされた細胞死、すなわちアポトーシスは、免疫系において老化した細胞や病態細胞などの生体にとって好ましくない細胞を排除するために生体に備わった機構であることが知られている。このアポトーシスは細胞サイズの急速な縮小と細胞核の変化を特徴とし、アポトーシス細胞は通常アポトーシス小体となり、最終的にはマクロファージ等の食細胞により貪食される。すなわち、まず細胞が縮小して隣接細胞から離れ、核のDNAとタンパク質との複合体であるクロマチンが核膜周辺に凝縮し、核の濃縮が生じると共に細胞表面の微絨毛が消失して平滑化し、大小の突起が出現し、やがてそれらがくびれてちぎれ、膜に包まれた大小の球状のアポトーシス小体に断片化し、これらの小体がマクロファージや隣接する食細胞により貪食除去されることはよく知られている。

40

【0003】

ところで、ガン細胞や悪性腫瘍細胞のような病態細胞の増殖を阻害して、これらの細胞に起因する疾病を治療するものとしては、これまで、アミノプテリン、メトトレキサート、8 アザグアニン、6メルカプトプリン、5フルオロウラシル、1（2テトラヒドロフリル）5フルオロウラシルなどの合成物質、マイトマイシンC、クロモマイシン、プレオマイシンなどの抗生物質、インターフェロン、CSF抑制物質、CBFなどが知られているが、これらはいずれも所定の細胞に作用して、それを壊死すなわちネクローシスを起こさせて病態細胞を排除するものである。ネクローシスは病理的要因によって起こるが、アポトーシスはネクローシスと異なり、病理的要因のみならず多様な生理的要因によっても生じるといわれている。

50

## 【0004】

アポトーシスは、その初期過程において、細胞を構成する細胞膜リン脂質の配列変化を伴い、結果として負電荷のリン脂質であるホスファチジルセリン (phosphatidylserine) の細胞表面へ露出することが報告されている (Immunol. Today, 14: 131-136, 1993, Cirk. Res., 77: 1136-1142, 1995)。この細胞表面の変化がマクロファージや隣接する細胞に認識され、貪食過程が進行すると考えられている。ホスファチジルセリンと選択的に結合するアネキシンVにより前記貪食過程が阻害されることから、アポトーシス細胞の細胞表面にホスファチジルセリンが露出することが貪食機構に重要な役割を果たしているものと考えられている (Biochem. Biophys. Res. Commun., 205: 1488-1493, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 1624-1629, 1996)。また、アネキシンVの標識体を用いて、アポ

10

## 【0005】

他方、脂肪球被膜糖蛋白質 (MFG-E8; milk fat globule-EGF factor8) は、母乳中に多く含まれる乳腺上皮由来の分泌蛋白質としてクローニングされ (Biochem. Biophys. Res. Commun. 254 (3), 522-528, 1999)、その後、他の多くの正常組織やいくつかの腫瘍細胞で強く発現する分泌型糖タンパク質として知られている。MFG-E8は、N末端側から2つのEGF (上皮増殖因子) ドメインと血液凝固因子V, VIIIのC1, C2ドメインとホモロジーのあるドメインで構成されている。MFG-E8はヒト (BA46, lactadherin)、マウス (MFG-E8)、ラット (rAGS)、ブタ (P47)、ウシ (PAS-6, PAS-7) を含め幾つかの哺乳類でそのホモログが報告されており、さら

20

30

## 【0006】

## 【発明が解決しようとする課題】

アポトーシスは生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。アポトーシスを起こしている細胞 (アポトーシス細胞) が分泌する有害な物質から正常細胞を保護するためにも、アポトーシス細胞は速やかにマクロファージによって除去する必要がある。例えば、ガン細胞にアポトーシスを積極的に誘導し、ガンの治療を行うこともできるが、かかる場合であってもアポトーシス細胞を速やかに除去する必要がある。本発明の課題は、マクロファージによって生体内のアポトーシス細胞を速やかに除去することができるアポトーシス細胞の除去促進剤や、マクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去を阻害する除去阻害剤を提供することにある。

40

## 【0007】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、脂肪球被膜糖蛋白質 (MFG-E8-L) が、細胞がアポトーシスへ向かいはじめると細胞表面に露出するホスファチジルセリン (PS) などのアミノリン脂質を認識することで、アポトーシス細胞に特異的に結合し、MFG-E8-Lがマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食作用を促進することや、MFG-E8-Lの点変異誘導体であるD89E変異体がマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食作用を阻害することを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【0008】

すなわち本発明は、(1) 高プロリン/スレオニン含有ドメインを有するMFG-E8

50

を有効成分とすることを特徴とするマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤に関する。

【0009】

また本発明は、(2)(a)高プロリン/スレオニン含有ドメインを有するMFG-E8を構成するアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ(b)マクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進作用を有するMFG-E8変異体を有効成分とすることを特徴とするマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤や、(3)高プロリン/スレオニン含有ドメインを有するMFG-E8又はアポトーシス細胞の除去作用を有するそのMFG-E8変異体が、高プロリン/スレオニン含有ドメインを有する組換えMFG-E8又はその組換えMFG-E8変異体であることを特徴とする上記(1)又は(2)記載のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤や、(4)組換えMFG-E8又は組換えMFG-E8変異体が、組換えヒト若しくはマウスMFG-E8又は組換えヒト若しくはマウスMFG-E8変異体であることを特徴とする上記(3)記載のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤や、(5)組換えMFG-E8又は組換えMFG-E8変異体が、ヒト細胞中での翻訳産物であることを特徴とする上記(3)又は(4)記載のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤に関する。

10

【0010】

また本発明は、(6)MFG-E8又はMFG-E8変異体が、リポソームに封入又は包埋されていることを特徴とする上記(1)~(5)のいずれか記載のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤や、(7)上記(1)~(5)のいずれかに記載されたMFG-E8又はMFG-E8変異体をコードするDNAを含む組換えベクターを有効成分とすることを特徴とするマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤や、(8)上記(1)~(5)のいずれかに記載されたMFG-E8又はMFG-E8変異体を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞を有効成分とすることを特徴とするマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤に関する。

20

【0011】

また本発明は、(9)上記(1)~(8)のいずれか記載の生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤を含有することを特徴とするマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去不全に起因する疾病の治療薬に関する。

30

【0012】

さらに本発明は、(10)上記(1)~(8)のいずれか記載の生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤を含有することを特徴とする生体防御機能増強剤に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤としては、脂肪球被膜糖蛋白質(MFG-E8-L)や、MFG-E8-Lを構成するアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進作用を有するMFG-E8-L変異体を有効成分とするものであれば特に制限されるものではなく、ここでMFG-E8-Lとは長鎖MFG-E8(MFG-E8のロングフォーム)を意味し、例えばマウスMFG-E8-Lとしては配列表の配列番号1に示されるように463アミノ酸残基からなるMFG-E8-Lを挙げることができ、また、マウスMFG-E8-L変異体としては、配列番号1に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進作用を有するMFG-E8-L変異体を挙げることができる。また、上記MFG-E8-LやMFG-E8-L変異体の由来はマウスに限定されるものでなく、ヒト(別名; BA46, lactadherin)、ラット(別名; rAGS)、ブタ(別名; P47)、ウシ(別名; PAS-6, PAS-7)等に由来するMFG-E8-Lや

40

50

MFG-E8-L変異体も用いることができるが、マクロファージによるヒト生体内のアポトーシス細胞の除去促進には、ヒトMFG-E8-Lを特に有利に用いることができる。

【0014】

また、MFG-E8-Lやマクロファージによるアポトーシス細胞の除去促進作用を有するMFG-E8-L変異体としては、組換えMFG-E8-L又は組換えMFG-E8-L変異体、好ましくは、組換えヒトMFG-E8-L若しくは組換えマウスMFG-E8-Lや、組換えヒトMFG-E8-L変異体若しくは組換えマウスMFG-E8-L変異体を有利に用いることができる。これら組換えMFG-E8-Lや組換えMFG-E8-L変異体は、公知の方法により調製することができるが、宿主細胞としてヒト細胞を用いたヒト細胞中での翻訳産物であることが好ましい。MFG-E8-Lの構造の中には、1つのシグナル配列、2つのEGFドメイン（EGF-1及びRGDモチーフを有するEGF-2）、1つの高プロリン/スレオニン含有ドメイン（高P/T含有ドメイン）、2つの因子VIII相同ドメイン（C1及びC2）が存在するが、組換えMFG-E8-L又はマクロファージによるアポトーシス細胞の除去促進作用を有する組換えMFG-E8-L変異体として、RGDモチーフを有するEGF-2ドメイン、高プロリン/スレオニン含有ドメイン、2つの因子VIII相同ドメイン（C1及びC2）を有するものが好ましい。

10

【0015】

また、本発明のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤としては、上述のMFG-E8-Lやマクロファージによるアポトーシス細胞の除去促進作用を有するMFG-E8-L変異体が、リポソームに封入又は包埋されている生体内アポトーシス細胞除去促進剤を挙げることができ、リポソーム膜を構成する脂質としては、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（DDAB）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）等のカチオン性リポソーム膜を好適に例示することができる。また、上記MFG-E8-LやMFG-E8-L変異体を含むリポソーム膜に、アポトーシス細胞に選択的に反応するモノクローナル抗体、例えば後述する抗MFG-E8-Lモノクローナル抗体を結合させ、イムノリポソームとすることもできる。

20

【0016】

さらに、本発明のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤として、上述のMFG-E8-L又はマクロファージによるアポトーシス細胞の除去促進作用を有するMFG-E8-L変異体をコードするDNAを含む組換えベクターを有効成分とする生体内アポトーシス細胞除去促進剤を挙げることができる。上記組換えベクターとしては、MFG-E8-LをコードするDNA、例えば配列番号2に示される塩基配列からなるマウスMFG-E8遺伝子や、MFG-E8-L変異体をコードするDNAを含むベクターであれば特に制限されないが、MFG-E8-L又はMFG-E8-L変異体を宿主細胞内で発現させることができる発現系を含むものが好ましく、例えば、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、より具体的には、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。この発現系は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

30

40

【0017】

本発明のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤として、上述のMFG-E8-L又はマクロファージによるアポトーシス細胞の除去促進作用を有するMFG-E8-L変異体を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞を有効成分とする生体内アポトーシス細胞除去促進剤を挙げることができる。MFG-E8-L又はMFG-E8-L変異体をコードするDNAやかかるDNAを含むベクターなどの上記発現系の宿主細胞への導入は、Davisら（BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986）及びSam

50

brookら (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング (scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。そして、宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真菌細胞や、ドロソフィラS2、スポドプテラSf9等の昆虫細胞や、L細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、BALB/c3T3細胞(ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む)、BHK21細胞、HEK293細胞、Bowes悪性黒色腫細胞等の動物細胞や、植物細胞等を挙げるができるが、ヒト細胞が好ましい。

#### 【0018】

さらにまた、本発明のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤として、MFG-E8-Lやマクロファージによるアポトーシス細胞の除去促進作用を有するMFG-E8-L変異体に対する抗体を挙げるができる。かかる抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げることができ、これらの抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物(好ましくはヒト以外)に、上記MFG-E8-L若しくはMFG-E8-L変異体又はその一部、あるいは実施例に述べられているようにチオグリコレート刺激腹腔マクロファージを抗原として用いて作製することができるが、その中でも抗MFG-E8-Lモノクローナル抗体又は抗MFG-E8-L変異体モノクローナル抗体がマクロファージによるアポトーシス細胞の優れた除去促進作用の点でより好ましい。例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法(Nature 256, 495-497, 1975)、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法(Immunology Today 4, 72, 1983)及びEBV-ハイブリドーマ法(MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R.Liss, Inc., 1985)など任意の方法を用いることができる。さらに、一本鎖抗体をつくるために、一本鎖抗体の調製法(米国特許第4,946,778号)を適用することや、また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウス又は他の哺乳動物等を利用することもできる。

#### 【0019】

本発明の生体内のアポトーシス細胞の除去方法としては、上述のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤を用いる方法であれば特に制限されるものではない。また、本発明のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去不全に起因する疾病の治療薬や生体防御機能増強剤としては、上述のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤を含有するものであれば特に制限されるものではなく、かかるマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去不全に起因する疾病としては、アポトーシス減少に起因する疾患、例えば、各種癌、各種自己免疫疾患、各種ウイルス疾患等を挙げるができる。上記生体内アポトーシス細胞除去促進剤を治療薬や生体防御機能増強剤として用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。またこれら治療薬や生体防御機能増強剤は、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができ、あるいは、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができるが、経口投与の場合は生体内アポトーシス細胞除去促進剤を前述のリボソーム封入・包埋タイプとしておくことが好ましい。そしてまた、本発明のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去不全に起因する疾病の治療方法としては、上記治療薬や生体防御機能増強剤を用いる治療方法であれば特に制限されるものではない。

10

20

30

40

50

## 【0020】

本発明のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去阻害剤としては、MFG-E8-Lを構成するアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去阻害作用を有するMFG-E8-L変異体を有効成分とするものであればどのようなものでもよいが、これらアポトーシス細胞除去阻害作用を有するMFG-E8-L変異体としては、組換えMFG-E8-L変異体、好ましくは組換えヒトMFG-E8-L変異体若しくは組換えマウスMFG-E8-L変異体を有利に用いることができる。これら組換えMFG-E8-L変異体は、公知の方法により調製することができるが、宿主細胞としてヒト細胞を用いたヒト細胞中での翻訳産物であることが好ましい。前記のように、MFG-E8-Lの構造の中には、1つのシグナル配列、2つのEGFドメイン（EGF-1及びRGDモチーフを有するEGF-2）、1つの高プロリン/スレオニン含有ドメイン（高P/T含有ドメイン）、2つの因子VIII相同ドメイン（C1及びC2）が存在するが、アポトーシス細胞除去阻害作用を有するMFG-E8-L変異体として、1つの高プロリン/スレオニン含有ドメイン及び2つの因子VIII相同ドメイン（C1及びC2）を有しRGDモチーフに点変異をもつMFG-E8-L変異体、例えばマウスMFG-E8-Lの89番目のアミノ酸D（アスパラギン酸）がE（グルタミン酸）に置換されたD89E変異体を好適に例示することができる。

10

## 【0021】

また、本発明のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去阻害剤としては、前記の生体内アポトーシス細胞除去促進剤の場合におけると同様に、上記MFG-E8-L変異体がりボソームに封入又は包埋されている生体内アポトーシス細胞除去阻害剤や、上記MFG-E8-L変異体をコードするDNAを含む組換えベクターを有効成分とする生体内アポトーシス細胞除去阻害剤や、上記MFG-E8-L変異体を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞を有効成分とする生体内アポトーシス細胞除去阻害剤を挙げることができる。

20

## 【0022】

本発明の生体内のアポトーシス細胞の除去阻害方法としては、上述のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去阻害剤を用いる方法であれば特に制限されるものでなく、また、本発明のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去阻害不全に起因する疾病の治療薬や治療方法も、マクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去阻害剤を利用するものであれば特に制限されるものではない。

30

## 【0023】

本発明の生体内のアポトーシス細胞の検出剤としては、前述のMFG-E8-Lや、マクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進作用を有するMFG-E8-L変異体や、又はこれらに対する抗体や、あるいはマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去阻害作用を有するMFG-E8-L変異体の標識体、すなわち標識化MFG-E8-L、標識化生体内アポトーシス細胞除去促進作用MFG-E8-L変異体、標識化抗MFG-E8-L抗体、標識化抗生体内アポトーシス細胞除去促進作用MFG-E8-L変異体抗体、標識化生体内アポトーシス細胞除去阻害作用MFG-E8-L変異体を有効成分とするものであればどのようなものでもよく、上記標識体としては、上記MFG-E8-L、MFG-E8-L変異体等に、例えば、FITC（フルオレセインイソシアネート）又はテトラメチルローダミンイソシアネート等の蛍光物質や、<sup>125</sup>I、<sup>32</sup>P、<sup>14</sup>C、<sup>35</sup>S又は<sup>3</sup>H等のラジオアイソトープや、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ又はフィコエリトリン等の酵素で標識したものや、Mycタグ、Hisタグ、FLAGタグ、GSTタグなどの従来知られているペプチドタグを結合させたものや、グリーン蛍光タンパク質（GFP）等の蛍光発光タンパク質などを融合させた融合タンパク質を具体的に例示することができる。これら標識体は常法により作製することができ、これら標識体を用いることによって、生体内でアポトーシスを起こしている細胞や組織を検出することができる。また、上記標識体は、アポトーシス細胞・組織の検

40

50

出剤のほか、例えば、Ni-NTAとHisタグの親和性を利用したMFG-E8-L等の精製や、MFG-E8-Lと相互作用するタンパク質の検出や、当該分野の研究用試薬としても有用である。

#### 【0024】

本発明のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進誘導物質又は除去促進抑制物質のスクリーニング方法としては、MFG-E8-L若しくはマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去促進作用を有するMFG-E8-L変異体、又はこれらに対する抗体と、被検物質を接触させ、生体内におけるアポトーシス細胞の除去の程度を評価するスクリーニング方法であれば特に制限されるものではなく、また、本発明のマクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去阻害誘導物質又は除去阻害抑制物質のスクリーニング方法としては、マクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去阻害作用を有するMFG-E8-L変異体と、被検物質を接触させ、生体内におけるアポトーシス細胞の除去阻害の程度を評価するスクリーニング方法であれば特に制限されるものではなく、上記MFG-E8-LやMFG-E8-L変異体等として、それらを発現している細胞も使用することができる。

10

#### 【0025】

また、上記生体内におけるアポトーシス細胞の除去又は除去阻害の程度を評価する方法としては、例えば、インビボやインビトロで、被検物質とMFG-E8-L等の存在下、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食作用を測定・観察し、被検物質が非存在下の対照の場合と比較・評価する方法を具体的に例示することができる。これらスクリーニング方法により得られる、生体内のアポトーシス細胞の除去促進誘導物質や除去阻害抑制物質は、マクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去不全に起因する疾病の治療薬や生体防御機能増強剤として用いる可能性があり、他方、除去促進抑制物質や除去阻害誘導物質は、マクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去阻害不全に起因する疾病の治療薬として用いる可能性がある。そして、生体内のアポトーシス細胞の除去促進誘導物質としては、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ をコードするDNAの発現系やチオグリコール酸塩を、生体内のアポトーシス細胞の除去促進抑制物質としては、MFG-E8-LをコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部を含む発現系を挙げることができる。

20

#### 【0026】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

##### 実施例A [材料と方法]

実施例A-1 (インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 発現マウスNIH3T3形質転換体の樹立) pMXベクター (Exp. Hematol. 24, 324-329, 1996) 中にマウスインテグリン $\alpha_v$ 及び $\beta_3$  cDNAをもつレトロウイルス (J. Cell. Biol. 132, 1161-1176, 1996, J. Cell Biochem. 81, 320-332, 2001) をマウス繊維芽細胞であるNIH3T3細胞株 (ATCC CRL 1658) に感染させ、インテグリン $\alpha_v$ 及び $\beta_3$ を発現するマウスNIH3T3形質転換体を樹立した。

40

#### 【0027】

##### 実施例A-2 (抗体の調製)

モノクローナル抗体を作製するため、 $1.5 \times 10^7$ のチオグリコレート刺激腹腔マクロファージを、4週間間隔でアルメニアンハムスター (Oriental Yeast社製) に皮下注射した。フットパッドに細胞を注入し、最終ブースターとした。膝窩部リンパ節及び鼠径部リンパ節から得られた細胞とマウス骨髄腫細胞P3X63Ag8U1 (ATCC CRL 1597) とを常法により融合させ、HAT培地中でハイブリドーマを選択した。ハイブリドーマの培養上澄液に対して貪食作用分析 (phagocytosis assay) を行い、陽性ハイブリドーマをGIT培地 (Nihon Seiyaku社製) で培養し、プロテインAセファロース (Amersham-Pharmacia社製) で精製し、2422モノクローナル抗体を得た。

50



## 【 0 0 2 8 】

また、マウス M F G - E 8 に対するウサギ抗体をペプチド研究所（大阪府箕面市）で調製した。すなわち、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル（Pierce社製）と共にスカシガイヘモシアニンと結合したペプチド（C N S H K K N I F E K P F M A R ; 配列番号 3）を用いてウサギを免疫した。かかるペプチドを結合させた A F - アミノ - トヨパール（Toyopearl）（Tosoh社製）を使用して、ウサギ血清から抗体をアフィニティー精製した。

## 【 0 0 2 9 】

実施例 A - 3（組換え M F G - E 8 の作製）

組換え M F G - E 8 の作製には、配列番号 2 に示されるマウス M F G - E 8 遺伝子を用いた。pEF-BOS-EXベクター（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3461-3466, 1998）を用いて、C 末端にマーカーペプチドである F L A G を結合させた M F G - E 8 を、常法によりヒト 2 9 3 T 細胞（A T C C C R L 1 5 7 3）中で発現させた。抗 F L A G M 2 アフィニティーゲル（Sigma社製）を用いて、培地中に分泌された M F G - E 8 を精製した。M F G - E 8 - L の構造の中には、1 つのシグナル配列、2 つの E G F ドメイン（E G F - 1 及び R G D モチーフを有する E G F - 2）、1 つの高プロリン / スレオニン含有ドメイン（高 P / T 含有ドメイン）、2 つの因子 VIII 相同ドメイン（C 1 及び C 2）が存在する（図 3 上図参照）。そこで、組換え P C R を利用して、以下の M F G - E 8 - L 変異体をコードする D N A を常法により作製し、上記 pEF-BOS-EXベクターを用いて発現プラスミドを構築した。これら発現プラスミドをヒト 2 9 3 T 細胞中で発現させ、高 P / T 含有ドメインを欠失したスプライズバリエーションである“ M F G - E 8 - S ”や、シグナル配列がインフレームで C 2 ドメインと融合した“ C 2 変異体 ”や、シグナル配列がインフレームで C 1 - C 2 ドメインと融合した“ C 1 C 2 変異体 ”や、C 1 及び C 2 ドメインを欠失した不完全な形態である“ E 1 E 2 P T ”や、R G D モチーフの 8 9 位のアスパルギン酸をグルタミン酸に置換した“ D 8 9 E 変異体 ”を作製した。

## 【 0 0 3 0 】

実施例 A - 4（貪食作用分析）

1 2 週齢の C 5 7 B L / 6 マウスの腹腔内に 3 %（w / v）のチオグリコール酸塩（Sigma社製）を注入した。チオグリコール酸塩で刺激された腹腔マクロファージを 4 日後に回収し、1 0 % の F C S を含んだ D M E M で培養した。貪食作用分析のために、4 週齢から 8 週齢の I C A D - S d m マウス（Genes Dev. 14, 549-558, 2000）の胸腺細胞を、1 0 % の F C S を含んだ D M E M において、1 0 μ M のデキサメタゾンとともに 3 7 °C で 4 時間インキュベーションした。4 8 ウェルの細胞培養プレート上で成長した  $2.5 \times 10^5$  のマクロファージに、胸腺細胞（ $1 \times 10^6$ ）を添加し、1.5 時間貪食させた。かかるプレートからマクロファージを分離し、2.5 μ g / m l のラット抗マウス F c γ 1 I I I / I I 受容体（BD PharMingen社製）の存在下で、4 μ g / m l のフィコエリトリン結合ラット抗マウス M a c - 1 抗体（BD PharMingen社製）を含む F A C S 染色緩衝液（2 % の F C S 及び 0.0 2 % の N a N 3 を含む P B S）を用いて氷上で 3 0 分間のインキュベーションを行った。かかる細胞を 1 % のパラホルムアルデヒドで固定し、0.1 % のトリトン X - 1 0 0 で処理して、1 m M の C o C l 2 及び 0.0 1 % の B S A を含む 1 0 0 m M のカコジル酸塩緩衝液（p H 7.2）1 0 0 μ l 中に懸濁した。1 0 0 単位 / m l の末端デオキシクレオチジル転移酵素（Takara Shuzo社製）及び 2.5 μ M の F I T C 標識 d U T P（Roche Diagnostics社製）を用いて、T U N E L 反応を 3 7 °C で 4 5 分間行い、F A C S キャリバー（Becton-Dickinson社製）を使用したフローサイトメトリーで分析した。

## 【 0 0 3 1 】

また、顕微鏡下での細胞観察によっても、貪食作用を評価した。すなわち、腹腔マクロファージ（ $1 \times 10^5$ 個）又は N I H 3 T 3 細胞（ $2 \times 10^4$ 個）を、0.1 % のゼラチンでコーティングした 8 ウェルの L a b - T e k I I チャンバースライド（Nalge Nunc社製）中で培養し、アポトーシス下の胸腺細胞への貪食作用を上記のとおり進行させた。固定後、Apoptag kit（Intergen社製）を用いて、かかる細胞を T U N E L 反応させ、光学顕微鏡

10

20

30

40

50

で観察した。

#### 【0032】

実施例 A - 5 (MFG - E 8 の同定)

ジメチルピメリミデート (dimethyl pimelimidate) (DMP、Pierce社製) を用いて、2422モノクローナル抗体をプロテインAセファロース (蛋白質 2 mg/ml ベッド容積) に共有結合させた。2422モノクローナル抗体が認識した分子を、マウス P388D1細胞から免疫沈降法で精製した。すなわち、 $2.4 \times 10^9$  の細胞を、RIPA緩衝液 (1%のトリトン X-100、0.1%のSDS、0.5%のデオキシコール酸ナトリウム、150 mMのNaCl、1.5 mMのMgCl<sub>2</sub>、1 mMのEGTA、10%のグリセロール、1 mMの[p-アミジノフェニル]メタンスルホニルフルオライドハイドロクロライド ([p-amidinophenyl] methanesulfonyl fluoride hydrochloride)、1 µg/mlのロイペプチン及び1 µg/mlのペプスタチンを含む50 mMのHepes-NaOH緩衝液 [pH 7.6]) に溶解した。3 mlのヒトIgGセファロースでかかる溶解物をあらかじめ処理し、150 µlの2422モノクローナル抗体-プロテインAセファロースとともに2時間インキュベーションした。0.5 MのNaClを含んだRIPA緩衝液で洗浄した後、0.1%のトリトン X-100を含んだ100 mMのトリエチルアミン (pH 11.5) で、ビーズに結合した蛋白質を溶出し、10%のポリアクリルアミドゲル上での電気泳動により分離し、PVDF膜にプロットした。かかる固定化した蛋白質を還元し、S-カルボキシメチル化し (S-carboxymethylated)、文献 (J. Biochem. (Tokyo) 120, 29-34, 1996) 記載のとおり、アクロモバクタープロテアーゼ I で分解した。かかる膜から解離したペプチドに、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型 (MALDI-TOF) 質量分析を行った。

10

20

#### 【0033】

実施例 A - 6 (固相ELISA及び細胞接着分析)

文献 (Biochemistry 36, 5441-5446, 1997) 記載のとおり、リン脂質と結合したMFG - E 8 に対して固相ELISAを行った。すなわち、リン脂質のメタノール溶液 (3 µg/ml で100 µl) を96ウェルのマイクロタイタープレートに添加し、風乾した。10 mg/mlのBSAを含むPBSでかかるウェルを処理した。MFG - E 8 をウェルに添加し、室温で1時間インキュベーションした。0.05%のツイーン20を含むPBSで洗浄した後、ピオチン化抗FLAG抗体及びペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンを用いて、ウェルに結合したMFG - E 8 をELISAで定量した。ペルオキシダーゼ検出キット (Sumitomo Bakelite社製) で、ペルオキシダーゼ活性を検出した。

30

#### 【0034】

細胞をリン脂質に結合させるMFG - E 8 の能力を分析するため、前述のとおり、リン脂質でコーティングしたマイクロタイタープレートにMFG - E 8 を結合させた。細胞 ( $4 \times 10^4$ ) を含むタイロード緩衝液 (5 mMのHepes-NaOH緩衝液 [pH 7.4]、135 mMのNaCl、5.4 mMのKCl、1.0 mMのMgCl<sub>2</sub>、10 mMのグルコース、及び10 mg/mlのBSA) を各ウェルに添加し、室温で1時間インキュベーションした。励起波長485 nm及び発光 (emission) 波長520 nmに設定した蛍光マイクロプレートリーダー (fluorescent microplate reader) (BioLumin 960、Molecular Dynamics社製) を用いたCyQUANT Cell Proliferation Assay kit (Molecular Probes社製) により、プレートに付着した細胞を定量した。

40

#### 【0035】

実施例 B [結果]

実施例 B - 1 (アポトーシス細胞への貪食作用を増大させるモノクローナル抗体の樹立) カスパーゼ活性化DNアーゼ (CAD) の阻害たんぱく質であるICADのカスパーゼ抵抗変異体を発現している細胞はアポトーシスによってDNAが断片化することはないが、マクロファージに貪食されるとDNAが切断される (Genes Dev. 14, 549-558, 2000)。このシステムを利用して、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食作用について調べた。ICAD - Sdm (短鎖カスパーゼ抵抗性ICAD) マウス由来の胸腺細胞をデキ

50

サメタゾンで4時間処理して、又は無処理のままで、フィコエリトリン結合アネキシンV (BD PharMingen社製)又はFITC結合dUTPを用いたTUNELで染色した。図1 aに示される結果からわかるように、ICAD - Sdmマウスの胸腺細胞をデキサメタゾンで処理したところ、およそ50%の細胞が4時間以内にアネキシンV陽性となったが、TUNELによる染色はされなかった。

#### 【0036】

次に、チオグリコレート刺激マウス腹腔マクロファージを、調製したばかりのICAD - Sdmマウス由来の胸腺細胞又はデキサメタゾンで処理したICAD - Sdmマウス由来の胸腺細胞とともにインキュベーションした。かかる細胞を、フィコエリトリン結合抗Mac - 1抗体で染色し、ついでFITC - dUTPでTUNEL染色した。マクロファージを、調製したばかりの胸腺細胞ではなく、アポトーシス下のICAD - Sdm胸腺細胞と共培養すると、およそ40%のMac - 1<sup>+</sup>細胞(マクロファージ様細胞株の細胞表面抗原Mac - 1発現細胞)がTUNEL陽性となった(図1 b下)。デキサメタゾン処理した胸腺細胞とインキュベーションする30分前に、パフィロマイシン(100nM)をマクロファージに添加した。このように、リソソームの酸化を妨げるパフィロマイシン(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7972-7976, 1988)でマクロファージを処理すると、TUNEL陽性マクロファージの出現が阻害された。なお、図1 b上は、Mac - 1<sup>+</sup>群におけるTUNEL染色のプロフィールを示す。これらの結果より、かかるマクロファージはアポトーシス細胞を特異的に取り込み、その染色体DNAを分解することがわかった。

#### 【0037】

このプロセスを仲介する物質を同定するため、チオグリコレート刺激マウス腹腔マクロファージを用いて、アルメニアンハムスターを免疫し、ハイブリドーマを調製した。特定の抗体(2422モノクローナル抗体)が、貪食作用を促進することがわかった。すなわち、12µg/mlの正常ハムスターIgG、又は2422モノクローナル抗体の存在下又は非存在下で貪食作用を分析した。Mac - 1<sup>+</sup>群におけるTUNEL染色のFACSのプロフィールを図1 cに示す。数字は、Mac - 1<sup>+</sup>群におけるTUNEL陽性細胞の比率を示す。これらの結果から、2422モノクローナル抗体の存在下で、アポトーシス細胞を取り込むマクロファージの比率が44%から57%に上昇することがわかった。また、光学顕微鏡(x400)で観察したところ、図1 dに示されるように、2422モノクローナル抗体の存在下では、アポトーシス細胞を取り込むマクロファージの数だけではなく、1つのマクロファージが取り込むアポトーシス細胞の数も増大することがわかった。

#### 【0038】

実施例B - 2(2422モノクローナル抗体認識蛋白質の同定)

2422モノクローナル抗体により認識される蛋白質を同定するため、チオグリコレート刺激腹腔マクロファージ及びマクロファージ細胞株P388D1をビオチンで表面標識し、2422モノクローナル抗体により認識される蛋白質の免疫沈降を行った。ストレプトアビジン - ペルオキシダーゼを用いて免疫沈降物のウェスタンブロットを行ったところ、図2 aに示されるように、72kDa及び56kDaのバンドが現れた。図2 aからわかるように、P388D1細胞株は腹腔マクロファージよりも豊富にかかる蛋白質を発現するため、P388D1細胞の大規模な培養を行い、2422モノクローナル抗体を用いて細胞溶解物からかかる抗体が認識する蛋白質をアフィニティー精製し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、PVD F膜に移してPonceau-Sで染色した。結果を図2 bに示す。図2 b中の矢印は、蛋白質配列分析にかけた蛋白質及びプロテインAセファロースから解離したIgGを示す。72kDa及び56kDaの蛋白質から作製したペプチドの質量分析を行ったところ、それらがマウスMFG - E8であることがわかった(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8417-8421, 1990、Biochem. Biophys. Res. Commun. 254. 522-528, 1999)。

#### 【0039】

マウスMFG - E8配列を有するプライマーを用いて、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT - PCR)により、マウス腹腔マクロファージからcDNAの2つのクラス(MFG -

10

20

30

40

50

E 8 - L 及び M F G - E 8 - S ) を単離した。次に、チオグリコレート刺激腹腔マクロファージ及び P 3 8 8 D 1 細胞由来の全 R N A ( 7 . 5  $\mu$  g ) を、1 . 5 % のアガロースゲル上での電気泳動で分離し、<sup>32</sup>P 標識マウス M F G - E 8 c D N A を使用したノーザンハイブリダイゼーションで分析した ( 図 2 c 上図 ; 図 2 c 下図では、フィルターを 0 . 0 5 % ( w / v ) のメチレンブルーで染色している。 ) ノーザンプロット分析によって、チオグリコレート刺激腹腔マクロファージ及び P 3 8 8 D 1 において M F G - E 8 m R N A が豊富に発現していることがわかった。これに対し、休止期の腹腔マクロファージ及び胸腺細胞では、M F G - E 8 m R N A がほとんど検出されなかった。J 7 7 4 A . 1 及び B A M 3 など他のマクロファージ細胞株、並びに繊維芽細胞系 N I H 3 T 3 は、M F G - E 8 m R N A をほとんど発現していなかった ( 図 2 c ) 。

10

#### 【 0 0 4 0 】

チオグリコレート刺激腹腔マクロファージ及び P 3 8 8 D 1 由来の全 R N A ( 0 . 3  $\mu$  g ) を R T - P C R で分析した。図 2 d 右図は、M F G - E 8 m R N A の一部分を示す概略図である。矢印は、使用したプライマーの位置を示す：センスプライマーは A T G C A G G T C T C C C G T G T G C T ( 配列番号 4 : P 1 )、アンチセンスプライマーは G C G G A A T C T G T G A A T C A G C ( 配列番号 5 : P 2 ) である。アガロースゲル電気泳動により、P C R 産物を分離した。R T - P C R 分析により、チオグリコレート刺激腹腔マクロファージ中の M F G - E 8 m R N A が主に長鎖 ( M F G - E 8 - L ) をコードするのに対し、P 3 8 8 D 1 細胞が発現するのは圧倒的に短鎖 ( M F G - E 8 - S ) であることがわかった。そこで、チオグリコレート刺激腹腔マクロファージ及び P 3 8 8 D 1 を 4 8 時間培養した。細胞溶解物と培養上澄液を 2 4 2 2 モノクローナル抗体で免疫沈降し、ウサギ抗 M F G - E 8 抗体を用いてウェスタンプロットを行った。結果を図 2 e に示す。図 2 e 中右側矢印は、M F G - E 8 蛋白質を示す。M F G - E 8 は、N - 末端にシグナル配列を有しているが、推定膜貫通領域は有していないことから、分泌蛋白質であると示唆されている。これら結果に示されているように、チオグリコレート刺激腹腔マクロファージの培養上澄液には、実際、7 4 k D a の M F G - E 8 が大量に含まれている。一方、P 3 8 8 D 1 細胞は、その細胞溶解物中にはかなりの量の M F G - E 8 が含まれているにもかかわらず、無視できる程度の M F G - E 8 しか分泌していなかった。このことは、P 3 8 8 D 1 中で発現した M F G - E 8 が十分に分泌されていないことを示唆している。なお、図 2 e 中 \* で示したバンドは、M F G - E 8 の分解生成物と思われる。

20

30

#### 【 0 0 4 1 】

実施例 B - 3 ( アポトーシス細胞上に露出したアミノリン脂質への M F G - E 8 の結合 ) M F G - E 8 がアポトーシス細胞に結合するかどうかを調べるため、F L A G 結合組換え M F G - E 8 - L ( 図 3 a ) をヒト 2 9 3 T 細胞中で作製し、精製して均一化した。調製したばかりの野生型胸腺細胞 ( 5  $\times$  1 0<sup>5</sup> 個 ) 又はデキサメタゾンで 4 時間処理した胸腺細胞を、0 . 2 5  $\mu$  g / m l の F L A G 結合 M F G - E 8 - L とともに 4 で 3 0 分間インキュベーションし、ついでビオチン化抗 F L A G 抗体及びフィコエリトリン結合ストربتアビジンで二重染色した。固定した後、F I T C - d U T P を用いて細胞を T U N E L 染色し、F A C S で分析した。結果を図 3 b に示す。図 3 b からわかるように、M F G - E 8 - L は単離したばかりの胸腺細胞には結合しないが、デキサメタゾンで処理した胸腺細胞にはしっかりと結合した。かかるデキサメタゾンで処理した胸腺細胞を、M F G - E 8 - L と T U N E L で二重染色すると、M F G - E 8 - L が T U N E L 陽性のアポトーシス細胞に特異的に結合していることがわかる。

40

#### 【 0 0 4 2 】

前記のように、M F G - E 8 - L には、1 つのシグナル配列、2 つの E G F ドメイン、1 つの高プロリン / スレオニン含有ドメイン ( 高 P / T 含有ドメイン )、及び 2 つの因子 V I I 相同ドメイン ( C 1 及び C 2 ) がある。M F G - E 8 - S は、異なる形でスプライシングされた M F G - E 8 m R N A にコードされており、高 P / T 含有ドメインを欠失している。M F G - E 8 - L のどのドメインがアポトーシス細胞への結合に関与しているのかを調べるために、M F G - E 8 - S 及び一連の M F G - E 8 - L 変異体を用いて調べてみ

50

た。胸腺細胞をデキサメタゾンで6時間処理し、種々のMFG-E8誘導体0.25 μg/mlとともにインキュベーションした。胸腺細胞に結合したMFG-E8に対し、FITC標識抗FLAG抗体を用いたFACS分析を行った。結果を図3cに示す。なお、図3c中の点線はMFG-E8非存在下での染色のプロフィールを示す。図3cに示すように、MFG-E8-Lだけではなく、MFG-E8-S、RGDモチーフに点変異をもつD89E、C1ドメインとC2ドメインのみを含むC1C2も、アポトーシス下の胸腺細胞に結合した。

#### 【0043】

ところで、アネキシンVは、ホスファチジルセリン(PS)を認識することによってアポトーシス細胞に結合することが知られている(Blood 84, 1415-1420, 1994)。そこで、  
 デキサメタゾンで6時間処理した胸腺細胞を、1.25 μg/mlのMFG-E8-L又は種々の変異体とともにインキュベーションし、フィコエリトリン結合アネキシンVで染色した。結果を図3d示す。図3d中の点線は、MFG-E8非存在下でのアネキシンV染色のプロフィールを示す。図3dからわかるように、アポトーシス下の胸腺細胞をMFG-E8-L又はD89Eで前処理すると、アネキシンVのアポトーシス細胞への結合が大きく阻害された。また、アネキシンVの結合に対するMFG-E8-Lの阻害効果は投与量依存的であり、0.25 μg/mlのMFG-E8-Lで処理すると、アネキシンVの結合が50%阻害された。一方、MFG-E8-S又はC1C2の存在によってアネキシンVのアポトーシス細胞への結合が阻害されることはなかった。このことから、アポトーシス細胞に対するMFG-E8-Sの親和性は、MFG-E8-Lの親和性と比較して  
 かなり低いことがわかる。

#### 【0044】

アネキシンVのアポトーシス細胞への結合に対するMFG-E8-Lの拮抗的作用から、MFG-E8-LがPSに結合することが示唆された。そこで、MFG-E8-Lの各種リン脂質への結合について調べてみた。ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルコリン(PC)又はホスファチジルイノシトール(PI)でコーティングしたマイクロタイタープレートを、段階的に濃度を上昇させたMFG-E8-Lとともにインキュベーションし、ウェルに結合したMFG-E8-Lを、抗FLAG抗体を用いたELISAで定量した。結果を図3eに示す。図3eからわかるように、MFG-E8-Lは、PS又はPEでコーティングしたプレートに飽和状態で結合したが、PC又はPIでコーティングしたプレートにはMFG-E8-Lは有意と  
 されるほど結合しなかった。

#### 【0045】

次に、MFG-E8-Lと同様にアネキシンVのアポトーシス細胞への結合に対して拮抗作用を有する、MFG-E8-Lの点変異誘導体であるD89E変異体についても、ホスファチジルセリンへの結合性について調べてみた。PSでコーティングしたマイクロタイタープレートを、段階的に濃度を上昇させたD89Eの他、MFG-E8-L、MFG-E8-S又はC1C2変異体とともにインキュベーションし、ウェルに結合したMFG-E8を、ELISAで定量した。結果を図3fに示す。図3fからもわかるように、MFG-E8-LのD89E変異体は、野生型MFG-E8-Lと同程度の効率で、PSで  
 コーティングしたプレートに結合したが、PSでコーティングしたプレートに対するMFG-E8-S及びC1C2変異体の親和性は、MFG-E8-Lの親和性の8分の1であった。これらの結果から、MFG-E8-LがそのC1C2ドメインを介してアミノリン脂質を認識できること、及びMFG-E8-Lに存在する高P/T含有ドメインが、これらのリン脂質に対するMFG-E8-Lの親和性に関与していることがわかった。

#### 【0046】

実施例B-4(MFG-E8を介したNIH3T3細胞のアミノリン脂質への結合)

MFG-E8の第2EGFドメインには、細胞接着に関与する細胞膜貫通受容体であるインテグリンファミリーのいくつかのメンバーが認識可能なRGDモチーフが存在する(Cell 69, 11-25, 1992)。そのため、MFG-E8-Lがアミノリン脂質を発現するアポト

10

20

30

40

50

ーシス細胞とインテグリンを発現する貪食細胞との掛け橋の役割を果たすとの可能性について考察した。マウス  $\nu_3$  インテグリンを発現する NIH3T3 形質転換体を、フィコエリトリン結合ハムスター抗マウスインテグリン  $\nu_3$  抗体又はフィコエリトリン結合ハムスター抗マウスインテグリン  $\nu_3$  抗体を使用して FACS で分析した。結果を図 4 a に示す。図 4 a 中の点線は、NIH3T3 親細胞に対する FACS 染色のプロフィールを示す。図 4 a からわかるように、マウス NIH3T3 親細胞は、 $\nu_3$  インテグリンや  $\nu_3$  インテグリンを低レベルで発現するが、 $\nu_3$  及び  $\nu_3$  インテグリン発現ベクターでこの親細胞株を形質転換したところ、 $\nu_3$  インテグリン及び  $\nu_3$  インテグリンの両方を豊富に発現した。

#### 【0047】

FLAG 結合 MFG-E8 を用いた FACS 分析では、MFG-E8-L と NIH3T3 又はその  $\nu_3$  インテグリン形質転換体との間に特異的な結合は見られなかった。そこで、MFG-E8-L がインテグリン発現細胞に結合するのは、かかる細胞がリン脂質に結合された後なのではないかとの可能性について調べてみた。PS 又は PE でコーティングしたマイクロタイターウェルについて、三種類の濃度 ( $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  及び  $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) の MFG-E8-L 又は D89E を用いて、及び、NIH3T3 (3T3/WT) 又は  $\nu_3$  インテグリン発現形質転換体 (3T3/ $\nu_3$ ) を用いて、連続してインキュベーションし、細胞接着アッセイを行った。ウェルに付着した細胞の数を、実施例 A-6 記載の方法で定量した。結果を図 4 b に示す。図 4 b に示すように、NIH3T3 親細胞 (3T3/WT) は、MFG-E8-L の非存在下では PS でコーティングしたプレートに接着しなかった。一方、PS でコーティングしたプレートを MFG-E8-L 存在下でプレインキュベーションしていた場合は、かなりの数の NIH3T3 細胞がウェルに接着した。D89E 変異体は PS でコーティングしたウェルへの NIH3T3 細胞の接着を仲介することができなかった。これは、この MFG-E8-L の効果がその RGD モチーフによるものであることを示している。 $\nu_3$  インテグリンを発現する NIH3T3 細胞 (3T3/ $\nu_3$ ) を標的として使用すると、PS でコーティングしたウェルへの細胞の接着に対する MFG-E8-L の作用は、さらに劇的なものになった。すなわち、無処理のウェル又は D89E で処理したウェルには 20 個の細胞が接着したに過ぎないのに対し、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  の MFG-E8-L で前処理したウェルには約 7000 個の細胞が接着していた。PE に対する MFG-E8-L の結合能力に関しては、PS でコーティングしたウェルの場合と同様の効率で、PE でコーティングしたウェルについても、NIH3T3 細胞形質転換体の接着を助けた。

#### 【0048】

実施例 B-5 (MFG-E8-L によるアポトーシス細胞の取り込み)

次に、NIH3T3 細胞を刺激してアポトーシス細胞を取り込ませることが、MFG-E8-L に可能かどうかを調べてみた。NIH3T3 (3T3/WT) 又は  $\nu_3$  インテグリンを発現するその形質転換体 (3T3/ $\nu_3$ ) を、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  の MFG-E8-L、MFG-E8-S 又は D89E の存在下又は非存在下 (-) で、ICAD-Sdm マウスから調製したばかりの胸腺細胞 (Dex (-)) とともに、又はデキサメタゾンで 4 時間処理した胸腺細胞 (Dex (+)) とともにインキュベーションした。胸腺細胞を 4 個以上取り込んだ NIH3T3 細胞を計数し、NIH3T3 細胞総数 (150 個) に対するこうした細胞の比率を求めた。3 つ一組の実験を少なくとも 2 回行った。その平均値を SD (バー) として図 5 a に示す。図 5 a からわかるように、ICAD-Sdm マウスから調製したばかりの胸腺細胞を NIH3T3 細胞と 2 時間共培養したところ、MFG-E8-L の存在下又は非存在下で、NIH3T3 細胞に付着されたり取り込まれたりする胸腺細胞は皆無であったが、デキサメタゾンで処理した胸腺細胞と NIH3T3 細胞とを共培養した場合は、およそ 6% の NIH3T3 細胞が、それぞれ 4 個以上の胸腺細胞を取り込んでいた。また、MFG-E8-L の存在により、4 個以上の胸腺細胞を内部に取り込んだ NIH3T3 細胞の比率は 23% に上昇した。

#### 【0049】

次に、 $\nu_3$  インテグリンを発現する NIH3T3 細胞形質転換体を、MFG-E8-L

10

20

30

40

50

又はD 8 9 Eの存在下又は非存在下(コントロール)で、アポトーシス下の胸腺細胞とともにインキュベーションし、光学顕微鏡( $\times 200$ )で観察した。結果を図5 bに示す。図5に示されるように、貪食作用に対するMFG-E8-Lの影響は、 $V_3$ インテグリンを発現するNIH3T3形質転換体を貪食細胞として使用する場合にはさらに明白なものとなった。この場合、4個以上の胸腺細胞を取り込んだNIH3T3形質転換体の比率は、MFG-E8-Lを分析混合系に添加すると9%から46%に上昇し、およそ20%の細胞が7個以上の胸腺細胞を内部に取り込んでいた。NIH3T3細胞の貪食活動に対するMFG-E8-SやD89Eの影響は、ほとんどなかった。

#### 【0050】

$V_3$ インテグリンを発現するNIH3T3細胞形質転換体を、段階的に濃度を上昇させたMFG-E8-L又はD89Eの存在下で、アポトーシス下の胸腺細胞と共培養し、4個以上の胸腺細胞を取り込んだ細胞の比率を測定した。3つで一組とした2回の実験で得られた平均数値をSD(バー)でプロットした結果を図5 cに示す。各種濃度のMFG-E8-Lを用いた図5 cに示される結果より、貪食作用を増大させるためのMFG-E8-Lの至適濃度が存在することがわかった。0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下では、MFG-E8-Lは投与量依存的に貪食作用を増大させるが、その濃度を超えると、阻害的な影響が現れる。この阻害作用は、2422モノクローナル抗体の添加によって消滅する。

#### 【0051】

他方、野生型MFG-E8-Lとは異なり、D89E変異体はNIH3T3及びその形質転換体の貪食活動を、広い濃度範囲で阻害する(図5 a及び5 c)。D89Eのこの特性を使って、腹腔マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食に対するMFG-E8-Lの関与について評価した。ICAD-Sdmマウス由来の胸腺細胞をデキサメタゾンで4時間処理し、図5 dに示す濃度のD89Eの存在下で、チオグリコレート刺激腹腔マクロファージと共培養した。反応終了後、フィコエリトリン結合抗Mac-1抗体でかかる細胞を染色し、FITC-dUTPでTUNELを行った。Mac-1<sup>+</sup>細胞群におけるTUNEL陽性細胞のFACSのプロフィールを図5 dに示す。図5 d中の数字は、2つの別個の実験で得られたTUNEL陽性マクロファージの比率を示す。図5 dに示すように、チオグリコレート刺激腹腔マクロファージを、デキサメタゾンで処理したICAD-Sdmマウス由来の胸腺細胞と共培養すると、およそ42%のマクロファージがTUNEL陽性となる。TUNEL陽性細胞の出現及びマクロファージによる胸腺細胞の貪食は、D89Eによって投与量依存的に大きく阻害された。これにより、マクロファージ中に発現したMFG-E8-Lがアポトーシス細胞の貪食に重要な役割を果たしたことがわかる。

#### 【0052】

##### 実施例C[まとめ]

貪食細胞中に発現する多くの蛋白質が、アポトーシス細胞の取り込みに関与する受容体として報告されている(Trends Cell Biol. 8, 365-372, 1998、Cell Death Differ. 5, 551-562, 1998、Nature 407, 784-788, 2000)。しかし、こうした受容体が直接アポトーシス細胞に結合するかどうかは、はっきりとしていなかった。本発明者らはここに、MFG-E8-LがPSやPEなどのアミノリン脂質を認識することで、アポトーシス細胞に特異的に結合することを示した。増殖期又は休止期の細胞の原形質膜内部小葉(inner leaflet)に局在するアミノリン脂質は、細胞がアポトーシスへ向かいはじめると、細胞表面に露出する(J. Immunol. 149, 4029-4035, 1992, Exp. Cell Res. 232, 430-434, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 6349-6354, 1998)。リポソームトランスファー法を用いてPSを発現させた細胞は、貪食細胞により認識され取り込まれる(J. Biol. Chem. 270, 1071-1077, 2001)。これらのことから、露出状態のPSは、「食べる」シグナルとしての基準を満たしていることがわかる。アポトーシス細胞の受容体として挙げられている分子の多くは、PSだけではなくPIにも結合する(Cell Death Differ. 5, 551-562, 1998、J. Biol. Chem. 276, 16221-16224, 1995)。一方、MFG-E8-Lが結合するのはPSとPEだけであり、MFG-E8-Lがアポトーシス細胞を特異的に認識するとの考えを裏付けている。

10

20

30

40

50

## 【0053】

インテグリンは、いくつかのシステムにおけるアポトーシス細胞に対する受容体であると示唆されている (Nature 343, 170-173, 1990、Nature 392, 86-89, 1998)。しかし、 $v_3$ インテグリンも  $v_5$ インテグリンも PS とは結合できないため、こうしたインテグリンがアポトーシス細胞を認識する方法は不明である。MFG-E8-Lによってこのジレンマが解消し、チオグリコレート刺激腹腔マクロファージ中のアポトーシス細胞に対する受容体としてインテグリンが認められるものと思われる。他の貪食細胞がこのシステムを使用しているのか、それとも PSR (Nature 405, 85-90, 2000) や MER (Nature 411, 207-211, 2001) といった他のシステムを使用しているのかについては、さらなる研究を待つ必要がある。

10

## 【0054】

MFG-E8 は本来、乳脂肪小球体 (milk fat globules) の膜中にもっとも豊富に存在する蛋白質の1つとして同定されたものである (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8417-8421, 1990)。授乳や搾乳をしなくなると、乳腺はかなり退縮する (J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 4, 129-136, 1999)。この過程で、大量の上皮細胞がアポトーシスにより死滅する。そして、浸潤したマクロファージや生存上皮細胞により、そうしたアポトーシス細胞を除去して、次回の乳汁分泌に向けて乳腺を再構築できるようにする必要がある (J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 4, 203-211, 1999)。アポトーシス細胞を認識する分子として MFG-E8-L を同定することは、乳汁分泌終了時の乳腺の退縮と再構築の背後にある分子的機構を解明するのに有用である。

20

## 【0055】

## 【発明の効果】

本発明によると、マクロファージによって生体内のアポトーシス細胞を速やかに除去することができるアポトーシス細胞の除去促進剤や、マクロファージによる生体内のアポトーシス細胞の除去を阻害する除去阻害剤を提供することができる。

## 【0056】

## 【配列表】



SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Exclusion activator and exclusion inhibitor of apoptotic cells in vivo

10

<130> A131P18

<140>

<141>

<160> 5

20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 463

<212> PRT

<213> Mus musculus

30

<400> 1

Met Gln Val Ser Arg Val Leu Ala Ala Leu Cys Gly Met Leu Leu Cys

1 5 10 15

Ala Ser Gly Leu Phe Ala Ala Ser Gly Asp Phe Cys Asp Ser Ser Leu

20 25 30

40

Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Leu Thr Gly Gln Asp Asn Asp Ile Tyr

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

Asn Ala Trp Thr Ala Ser Asn Tyr Asp Ser Lys Pro Trp Ile Gln Val  
 195 200 205

Asn Leu Leu Arg Lys Met Arg Val Ser Gly Val Met Thr Gln Gly Ala  
 210 215 220

Ser Arg Ala Gly Arg Ala Glu Tyr Leu Lys Thr Phe Lys Val Ala Tyr  
 225 230 235 240

10

Ser Leu Asp Gly Arg Lys Phe Glu Phe Ile Gln Asp Glu Ser Gly Gly  
 245 250 255

Asp Lys Glu Phe Leu Gly Asn Leu Asp Asn Asn Ser Leu Lys Val Asn  
 260 265 270

20

Met Phe Asn Pro Thr Leu Glu Ala Gln Tyr Ile Arg Leu Tyr Pro Val  
 275 280 285

Ser Cys His Arg Gly Cys Thr Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly Cys Glu  
 290 295 300

30

Leu His Gly Cys Ser Glu Pro Leu Gly Leu Lys Asn Asn Thr Ile Pro  
 305 310 315 320

Asp Ser Gln Met Ser Ala Ser Ser Ser Tyr Lys Thr Trp Asn Leu Arg  
 325 330 335

Ala Phe Gly Trp Tyr Pro His Leu Gly Arg Leu Asp Asn Gln Gly Lys  
 340 345 350

40

Ile Asn Ala Trp Thr Ala Gln Ser Asn Ser Ala Lys Glu Trp Leu Gln  
 355 360 365

Val Asp Leu Gly Thr Gln Arg Gln Val Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly  
 370 375 380

10

Ala Arg Asp Phe Gly His Ile Gln Tyr Val Ala Ser Tyr Lys Val Ala  
 385 390 395 400

His Ser Asp Asp Gly Val Gln Trp Thr Val Tyr Glu Glu Gln Gly Ser  
 405 410 415

Ser Lys Val Phe Gln Gly Asn Leu Asp Asn Asn Ser His Lys Lys Asn  
 420 425 430

20

Ile Phe Glu Lys Pro Phe Met Ala Arg Tyr Val Arg Val Leu Pro Val  
 435 440 445

Ser Trp His Asn Arg Ile Thr Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys  
 450 455 460

30

<210> 2

<211> 1392

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

40

<400> 2

atgcaggctt cccgtgtgct ggccgcgctg tgcggcatgc tactctgccc ctctggcctc 60  
ttcgcccggt ctggtagactt ctgtgactcc agccctgtgccc tgaacgggigg cacctgcttg 120  
acgggccaag acaatgacat ctactgcctc tgccttgaag gcttcacagg ccttgtgtgc 180  
aatgagactg agagaggacc atgctcccca aacccttgcct acaatgatgc caaatgtctg 240  
gtgactttgg acacacagcg tggggacatc ttaccggaat acatctgcca gtgccctgtg 300  
ggctactcgg gcatccactg tgaaacccag accaactact acaacctgga tggagaatac 360  
atgttacca cagccgtccc caatactgcc gtcccacccc cgccccccac ccccgatctt 420  
tccaacaacc tagcctcccg ttgttttaca cagctgggca tggaaagggg cgccattgct 480  
gattcacaga ttccgcctc gtcgtgtgat atgggtttca tgggcttgca gcgctggggc 540  
ccggagctgg ctctctgtgta ccgcacaggg atcgicaatg cctggacagc cagcaactat 600  
gatagcaagc ctggatcca ggigaacctt ctgcggaaga tgcgggtatc aggigtgatg 660  
acgcagggtg ccagccgtgc cgggagggcg gactacctga agaccttcaa ggtggcttac 720  
agcctcgacg gacgcaagtt tgagttcatc caggatgaaa gcgggtggaga caaggagttt 780  
ttgggtaacc tggacaacaa cagcctgaag gttaacatgt tcaaccggac tctggaggca 840  
cagtacataa ggcigtacc cgtttcgtgc caccgcggct gcaccctccg ctctgagctc 900  
ctgggctgtg agttgcacgg atgttctgag cccctgggccc tgaagaataa cacaattcct 960  
gacagccaga tctcagcctc cagcagctac aagacatgga acctgctgctc ttttggctgg 1020  
taccctcact tgggaaggct ggataatcag ggcaagatca atgcttggac ggctcagagc 1080  
aacagtgcca aggaatggct gcaggttgac ctgggcactc agaggcaagt gacaggaatc 1140  
atcaccaggg gggcccgtga ctttggccac atccagtatg tggcgtccta caaggtagcc 1200  
cacagtgatg atggigtgca gttgactgta tatgaggagc aaggaagcag caaggcttc 1260  
cagggcaact tggacaacaa ctcccacaag aagaacatct tggagaaacc ctteatggct 1320  
cgctacgtgc gtgtccttcc agtgtcttgg cataaccgca tcaccttgcg cctggagctg 1380  
ctgggctgtt aa 1392

10

20

30

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

40

**<213> Artificial Sequence****<220>****<223> Description of Artificial Sequence:peptide****<400> 3**

Cys	Asn	Ser	His	Lys	Lys	Asn	Ile	Phe	Glu	Lys	Pro	Phe	Met	Ala	Arg	10
1				5				10				15				

**<210> 4****<211> 20****<212> DNA****<213> Artificial Sequence** 20**<220>****<223> Description of Artificial Sequence:P1****<400> 4**

atgcaggctc	cccggtgtgct	20	30
------------	-------------	----	----

**<210> 5****<211> 20****<212> DNA****<213> Artificial Sequence****<220>** 40**<223> Description of Artificial Sequence:P2****<400> 5**

gcggaaatct	gtgaatcagc	20
------------	------------	----

【図1】アポトーシス細胞への貪食作用を増大させるモノクローナル抗体の樹立に関する実験結果を示す図である。

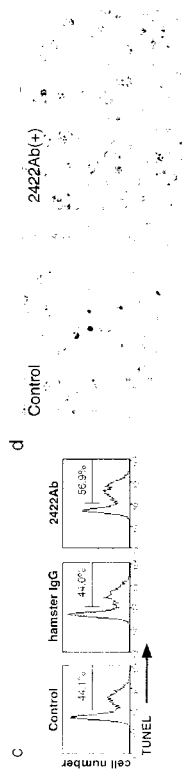
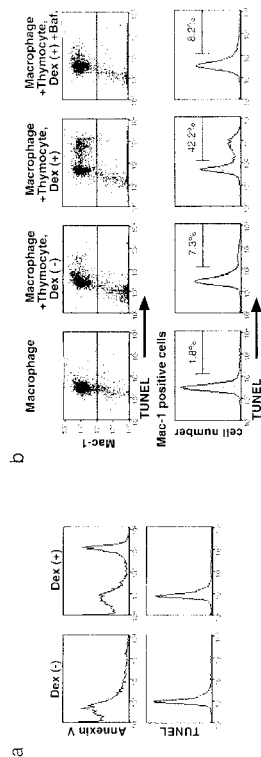
【図2】MFG-E8の同定及びその発現に関する実験結果を示す図である。

【図3】アポトーシス細胞上に露出したアミノリン脂質へのMFG-E8の結合に関する実験結果を示す図である。

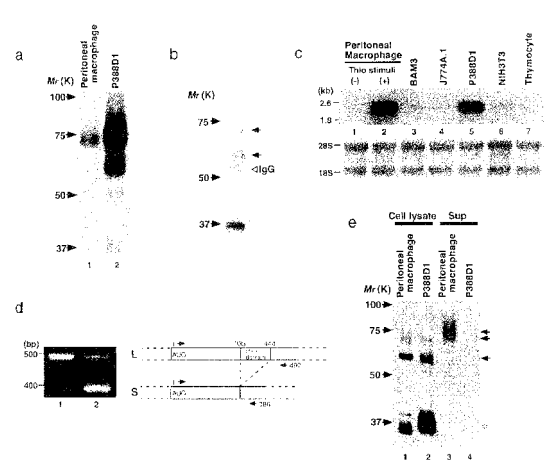
【図4】MFG-E8を介したNIH3T3細胞のアミノリン脂質への結合に関する実験結果を示す図である。

【図5】MFG-E8-Lによるアポトーシス細胞の取り込みに関する実験結果を示す図である。

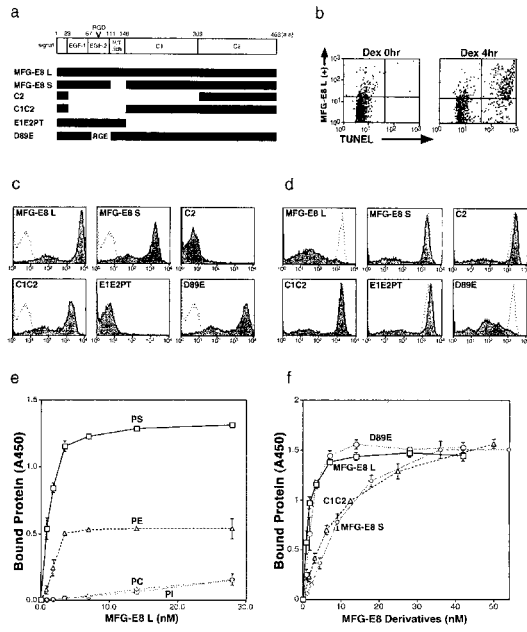
【図1】



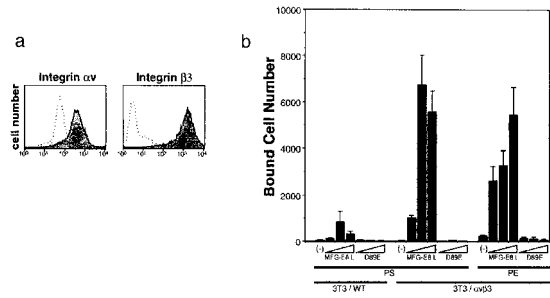
【図2】



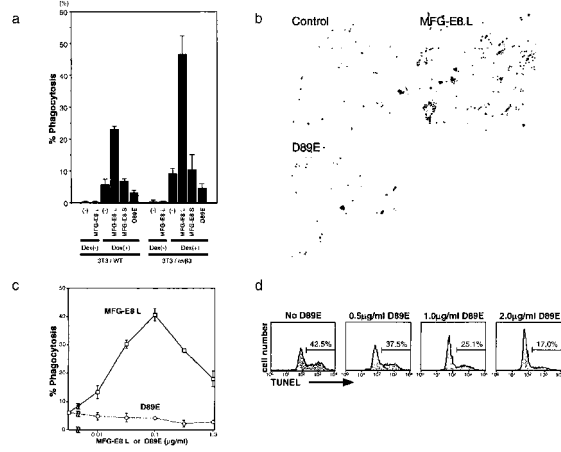
【 3 】



【 4 】



【 5 】





---

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 38/00

A61K 48/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

CAPLUS(STN)

EMBASE(STN)