

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年12月27日(27.12.2012)



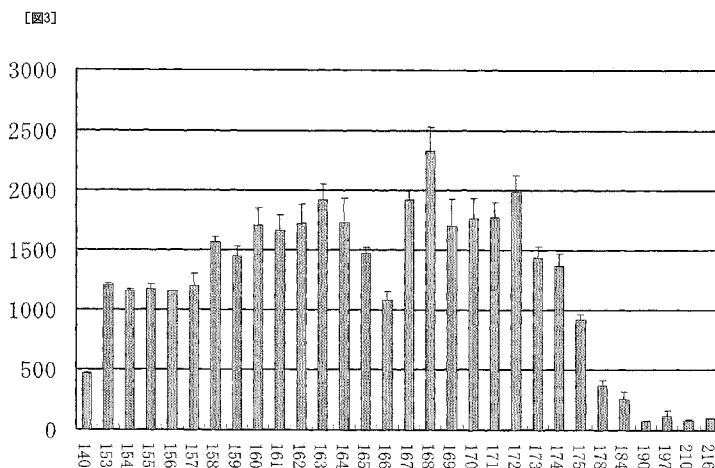
(10) 国際公開番号
WO 2012/176853 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) A61P 19/08 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/065911
- (22) 国際出願日: 2012年6月21日(21.06.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-137279 2011年6月21日(21.06.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 協和発酵キリン株式会社(Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町1丁目6番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 柿谷 誠 (KAKITANI Makoto). 山脇 健吾 (YAMAWAKI Kengo).
- (74) 代理人: 濱田 百合子, 外(HAMADA Yuriko et al.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁目7番13号 虎ノ門イーストビルディング10階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: PROTEIN COMPRISING TRUNCATED FORM OF EXTRACELLULAR DOMAIN PROTEIN OF FRIZZLED 2, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING BONE DISEASES WHICH COMPRISES SAID PROTEIN

(54) 発明の名称: Frizzled 2の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質、および該蛋白質を含有する骨疾患治療用医薬組成物



(57) Abstract: The present invention provides: a protein comprising a truncated form of an extracellular domain protein of Frizzled 2, which has a higher secretion activity than that of a known protein comprising an extracellular cysteine-rich domain of Frizzled 2 in a cell that is producing the protein and also has a bone-mass-increasing activity equivalent to or higher than that of the known protein; or DNA encoding the protein.

(57) 要約: 本発明は、公知のFrizzled 2の細胞外システインリッチドメインを含む蛋白質よりも生産細胞において分泌活性が高く、かつ骨量の増加活性が同等若しくは高い、Frizzled 2の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質または該蛋白質をコードするDNAを提供する。

WO 2012/176853 A1

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

**F r i z z l e d 2 の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質、
および該蛋白質を含有する骨疾患治療用医薬組成物**

技術分野

[0001] 本発明は、公知の F r i z z l e d 2 の細胞外システインリッチドメインを含む蛋白質に比べ、生産細胞における分泌性（以下、生産性ともいう）が高く、および／または骨量の増加活性を有する新規 F r i z z l e d 2 の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質、および該蛋白質を含有する骨疾患治療用医薬組成物に関する。

[0002] 本発明はまた、公知の F r i z z l e 2 の細胞外システインリッチドメインを含む蛋白質に比べ、生産細胞における分泌性が高く、および／または骨量の増加活性を有する新規 F r i z z l e d 2 の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質、および該蛋白質を含有する骨疾患治療用医薬組成物の製造方法に関する。

[0003] 本発明はさらに、公知の F r i z z l e d 2 の細胞外システインリッチドメインを含む蛋白質に比べ、生産細胞における分泌性が高く、および／または骨量の増加活性を有する新規 F r i z z l e d 2 の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質、および該蛋白質を含有する骨疾患治療用医薬組成物を用いた骨疾患の治療方法に関する。

[0004] この知見は、F r i z z l e d 2 の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質の生産細胞の作製、および該蛋白質を投与したマウスの特性解析から見出された。

背景技術

[0005] 超高齢化社会を迎え骨粗鬆症人口は増加し、それに起因する骨折が社会的に大きな問題となっている。特に大腿骨頸部骨折および椎体骨折は、寝たきり状態を招くことにより、クオリティーオブライフを大幅に低下させ、介護

または入院治療等による社会的および医療経済的負担の増加を招いている（非特許文献1、2）。

[0006] また骨粗鬆症は、高齢期における死亡率に大きな関連性のあることが近年明らかにされてきた（非特許文献3、4）。このような背景から骨粗鬆症の予防および治療は克服すべき重大な課題となっている。

[0007] 骨粗鬆症（骨基質量と石灰化量との比率が保たれたままで骨量が減少した状態）には原発性骨粗鬆症と続発性（二次性）骨粗鬆症がある。前者は従来、閉経後骨粗鬆症または老人性骨粗鬆症といわれた病態を指す。後者は他の疾患によって骨代謝に変化を来し骨粗鬆症の病態を呈したものを指し、原因別に内分泌性、栄養性／代謝性、炎症性、不動性、薬物性、血液疾患、先天性、その他の疾患によるものに分類される。

[0008] 上記分類において、内分泌性には、副甲状腺機能亢進症、甲状腺機能亢進症、性腺機能低下症、クッシング症候群、成長ホルモン欠乏症、糖尿病、アジソン病またはカルシトニン欠損症等がある。

[0009] 栄養性／代謝性には、慢性消耗性疾患、るいそう、重症肝疾患（特に原発性胆汁性肝硬変）、胃切除、壊血病、吸収不良症候群（セリアック病を含む）、低リン血症、慢性腎疾患、特発性高Ca尿症、ヘモクロマトーシス、アミロイドーシス、肥満細胞腫、ナトリウム過剰摂取、カルシウム摂取不足またはビタミンD、A過剰症等がある。炎症性には、関節リウマチ、傍関節性（炎症性サイトカインによる骨吸収亢進）またはサルコイドーシス等がある。

[0010] また、不動性には、全身性、臥床安静、麻痺、局所性または骨折後等がある。薬物性には、ステロイド（免疫抑制薬として炎症性疾患に広く用いられている。ステロイドで治療する疾患には、膠原病、喘息、炎症性腸疾患または臓器移植等がある。骨喪失はこの療法の重篤な副作用である）、メトトレキサート、ヘパリン、ワーファリン、抗ケイレン薬、リチウムまたはタモキシフェン等がある。

[0011] 血液疾患には、多発性骨髄腫、リンパ腫、白血病、血友病または慢性溶血

性疾患等がある。先天性には、骨形成不全症、マルファン症候群、クラインフェルター症候群、先天性骨髄性ポルフィリアまたは嚢胞性線維症等がある。

[0012] その他の疾患によるものには、慢性閉塞性肺疾患、肝疾患、腎疾患、関節リウマチ、妊娠、高酸素血症またはHIV感染症等が続発性骨粗鬆症の原因疾患として挙げられている（非特許文献5）。

[0013] 上記疾患の中でも原発性骨粗鬆症に加え社会的に大きな影響のある骨疾患として、変形性関節症、関節リウマチ、悪性腫瘍または腎疾患に伴う骨疾患等が挙げられている。変形性関節症は運動器領域で最も多い疾患であり、日本の罹患者は1,000万人ともいわれ、高齢化に伴い患者数は増加し続けることが予想されている。重度の関節障害は人工関節置換手術による治療が行われているが、疾病レベルが中等度以下の症状に対する根本的な治療方法は報告されていないのが現状である（非特許文献6）。

[0014] 関節リウマチは多発性関節炎を主体とする慢性かつ進行性の炎症性疾患であり、関節滑膜の増殖から次第に周囲の軟骨または骨が侵され、関節の破壊と変形に至ることの多い疾患である。抗リウマチ薬（メトトレキサート）による治療では関節破壊の進行を十分に抑制できないことが報告されており、腫瘍壊死因子（TNF） α を標的とした生物学的製剤は関節破壊抑制効果が有意に表れることから画期的な薬剤と考えられている。しかしながらその使用にあたって日和見感染、結核（肺外結核）またはニューモシスチス肺炎等の発症率が増加することが副作用として懸念されている（非特許文献7）。

[0015] 悪性腫瘍に伴う骨疾患として、主に悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症と骨転移が挙げられる。高カルシウム血症は食欲不振と利尿をきたし、脱水症状とそれによる腎機能不全を伴う。骨転移は特に乳がん、前立腺がんおよび肺がん患者に多く認められる。骨転移自体が致命的となることは少ないが、骨痛、病的骨折または神経麻痺等を引き起こす原因となるため患者のQOLを著しく低下させることが多く、骨転移のコントロールは臨床上的重要な課題となっている（非特許文献8）。これら悪性腫瘍に伴う骨疾患の治療にはビ

スフォスフォネート製剤が用いられているが副作用による問題点が指摘されている。

[0016] 腎疾患に伴う骨疾患のうち、腎臓組織障害が原因となって骨が障害される病態を腎性骨異栄養症と呼ぶ。腎透析患者における骨疾患は、主に二次性副甲状腺機能亢進症に起因する。副甲状腺機能亢進を原因とするPTH濃度増加と、例えば、骨形成蛋白質（bone morphogenetic protein；BMP）7の不十分な産生により、腎性骨異栄養症が進行する。透析患者において骨の副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone；PTH）に対する反応性が低下する 경우가多く、PTH濃度が慢性的かつ顕著に増加すると、線維性骨炎（高い骨回転）が発症するが、PTH濃度が基準範囲に維持されると無形成骨症（低い骨回転）となる。

[0017] 線維性骨炎が重症化するとコラーゲン線維が不規則に形成され、非結晶性燐酸カルシウムとして石灰化し、粗線維骨（woven bone）が形成されることにより、骨形成は亢進するものの骨は折れやすくなる。線維性骨炎治療の基本は副甲状腺ホルモンの分泌抑制であり、カルシウム摂取と活性型ビタミンDの投与が中心となる。

[0018] 但し慢性腎臓病（CKD）、特に透析患者の場合には食物または水分の制限等様々なコントロールが必要であり、また二次性副甲状腺機能亢進症が進行すると逆に高カルシウム血症も問題となる。また活性型ビタミンDもその処方にあたっては、常に腎機能（血清クレアチニン値）と血清カルシウム値をモニターする等の細心の注意が必要とされている。

[0019] 活性型ビタミンD製剤の長期連用と過剰投与に伴うもの、または副甲状腺摘出術（PTX）後の副甲状腺ホルモンの抑制によっても無形成骨症は発症する。無形成骨症は線維性骨炎よりも骨折率が高く、高カルシウム血症、血管または他の軟部組織の石灰化を誘導することから適切な治療法が求められているが、無形成骨の病態として、骨吸収も骨形成も抑制された低回転骨の状態であり、確立された治療法がないのが現状である（非特許文献9）。

[0020] 骨のリン若しくはカルシウムの取り込み能の低下（低代謝回転骨）または

貯蔵能力の低下（高代謝回転骨）によって引き起こされる高リン血症あるいは高カルシウム血症は異所性（血管）石灰化の原因の一つとして考えられている。慢性腎不全患者、特に透析患者では、死因の40%以上が心血管系合併症によるものであり、血管石灰化を伴う動脈硬化が重要な病態として注目されている。慢性腎不全患者における高度の進展した石灰化病変に対する治療はいまだ困難で予後不良である（非特許文献10）。

[0021] よって、原発性骨粗鬆症に加え、変形性関節症、関節リウマチ、悪性腫瘍、腎疾患に伴う骨疾患または骨疾患に伴う血管石灰化に対してさらに有効に作用し、副作用の少ない薬剤の開発が望まれている。

[0022] 骨代謝は骨芽細胞と破骨細胞の働きのバランスによってコントロールされていると考えられており、骨を壊す作用が骨を作る作用を上回った時に、骨粗鬆症が生じる（非特許文献11）。特に閉経後の女性は、骨を保護する役割を担う女性ホルモンの分泌が低下し、その結果として、骨芽細胞の骨形成能の低下と破骨細胞の骨吸収活性の亢進が認められ、骨粗鬆症の症状を呈する可能性が高い（非特許文献12、13）。

[0023] そのためエストロゲン製剤が用いられているが、その使用によって血栓症および乳がんの危険性が増すことが明らかとなり適応は制限されつつある。また、選択的エストロゲン受容体モジュレーターの使用においては深部静脈血栓症の危険性が増大することが報告されている（非特許文献14）。

[0024] 現在、破骨細胞の骨吸収活性を抑制する薬剤としてカルシトニンまたはビスフォスフォネート等が使用されている。カルシトニンは破骨細胞表面に発現するカルシトニン受容体と結合することによって破骨細胞の不活性化を誘導することが知られており、骨粗鬆症のみではなく高カルシウム血症または骨 P a g e t 病等にも臨床応用されている。

[0025] しかしながら骨折抑制効果に対する有効性は明らかではなく、カルシトニン投与によってその受容体発現がダウンレギュレーションされることが報告されている（非特許文献14、15）。ビスフォスフォネートは強力な骨吸収抑制作用を示し、日本においてもアンドロネートまたはリセドロネート等

のアミノ基含有ビスフォスフォネートは骨粗鬆症治療薬の主流である。これらビスフォスファネート製剤はファルネシル二リン酸合成酵素を阻害することによって脂質蛋白質のプレニル化を阻害し、骨吸収機能の抑制と破骨細胞のアポトーシスを誘導する（非特許文献16）。

[0026] しかしながらビスフォネート製剤の問題点として、2008年FDAから重度の骨格・関節・筋肉の疼痛発生の警告が発令された。また、歯科治療後に長期間（2～3年以上）使用したとき顎骨壊死が発生する等の副作用が報告されている（非特許文献17）。

[0027] 上記以外の新しい骨吸収抑制剤として抗RANKL抗体が期待されている。抗RANKL抗体は更に関節リュウマチの関節破壊抑制剤または多発性骨髄腫治療剤としての適応も期待され臨床開発が進められている。

[0028] しかしながら、RANKL/RANK経路は、樹状細胞の生存と維持に重要との報告（非特許文献18）またはRANKおよびRANKL欠損マウスではリンパ節の形成不全が引き起こされるとの報告（非特許文献19、20）から、抗RANKL抗体製剤の免疫系への影響が懸念される。

[0029] 2008年AMGEN社より抗RANKL抗体製剤（デノスマブ）の臨床試験において一部感染症発症率の増加が報告された。また2009年の抗RANKL抗体製剤の臨床試験結果から、ビスフォスフォネート製剤と同様、顎骨壊死の発生が副作用として報告された。

[0030] 骨芽細胞を活性化する骨形成促進剤として唯一PTHを用いた間歇投与治療が行われているが（Eli Lilly社、テリパラチド）、海綿骨骨量増加活性に比べ皮質骨骨厚増加活性が余り高くない点ではビスフォスフォネート製剤等他の治療剤と変わらないため、骨折予防効果はあまり高くないと考えられる。

[0031] 更にPTHに関して、旭化成ファーマ社（日本）より、動悸、頻脈若しくは血圧降下等の副作用またはラット長期投与試験で骨肉種が認められた等の問題点が報告され、欧米においても1.5～2年以上の継続的使用は認められておらず、癌患者への適応は禁止されているため癌骨転移抑制または癌に

よって引き起こされる高カルシウム血症（腫瘍細胞が産生する副甲状腺ホルモン関連ペプチドが原因となる腫瘍随伴体液性高カルシウム血症または局所性骨溶解性高カルシウム血症）の治療等にPTHを用いることは不可能である。

[0032] よって、閉経後の女性を含む骨芽細胞の骨形成能の低下または破骨細胞の骨吸収活性の亢進が原因によって生じる骨粗鬆症、高カルシウム血症、骨Paget病、骨転移抑制、関節リュウマチの関節破壊抑制または多発性骨髄腫に対してさらに有効に作用し、副作用の少ない薬剤の開発が望まれている。

[0033] この他、骨粗鬆症とは異なり石灰化のプロセスのみが阻害されることによって引き起こされる骨疾患として骨軟化症およびクル病が知られている。骨は、コラーゲン等よりなる基質層が、ハイドロキシアパタイトの沈着により石灰化されることによって形成されるが、該石灰化が障害され、類骨が増加した状態が骨軟化症であり、小児期に発症した場合は、クル病と呼ばれる。

[0034] 症状としては、手足の痛み、関節痛、腰痛若しくは背中での痛み等、骨または関節の痛みが起き、歩行障害に至り、骨折しやすい状態に陥る。小児の場合、発育障害、O脚等手足の変形または鳩胸等が認められる。一般的な治療方法として、食事療法に加え、ビタミンD、カルシウム剤またはリン製剤が用いられるが変形による機能障害が強い場合、手術が唯一の対処療法である。よって、骨軟化症またはクル病に対して更に有効な薬剤の開発が望まれている。

[0035] 先に述べたように骨は常に骨芽細胞と破骨細胞の働きのバランスによってコントロールされリモデリングが行われている組織であるため、折れにくい丈夫な骨を作るには単に骨量が増加すればよいとは限らない。

[0036] 例えば、大理石骨病（非特許文献21）、骨ページェット病（非特許文献22）またはカムラチ・エンゲルマン病（CED）（非特許文献23、24）等の遺伝性疾患ではそれぞれ異なる原因から骨形成と骨吸収のバランスが異常となり、骨量の増加が観察されながらも骨強度は却って低下することが

知られている。

- [0037] 材料力学的に骨強度を決める因子には更に骨密度に代表される量的因子の他に、海綿骨の連結性、皮質骨の厚み若しくは多孔率、または断面モーメント等の形状因子、あるいは石灰化若しくは骨疲労等の質的因子が挙げられる（非特許文献25）。それ故、骨量を増加させるばかりではなく、骨強度向上に役立つ有効な薬剤の開発が原発性骨粗鬆症または続発性（二次性）骨粗鬆症の治療において望まれている。
- [0038] 近年、骨形成促進薬の創薬標的として、Wnt/LRPシグナル制御機構に関与する因子が注目されている。Wntは分子量が約4万のパルミチン酸による脂質修飾を受けた分泌性糖タンパクであり、哺乳類では19種類が存在すると考えられている。Wntの受容体としては7回膜貫通型受容体であるFrizzledが10種類、1回膜貫通型受容体であるLRP5/6の2種類が報告されている（非特許文献26）。
- [0039] Wntが結合すると考えられているFrizzled受容体ファミリー分子の細胞外領域には保存された10個のシステインを含むシステインリッチドメイン [cysteine-rich domain (CRD)] と呼ばれる領域が存在する。これら10個のシステインのうち最もN末端側に位置するシステインと最もC末端側に位置するシステインに挟まれた領域のみをCRDとする場合（非特許文献27）またはその前後の配列も含んでCRDとする場合（R&D systems）がある。マウスFrizzled8のCRDを用いた結晶構造解析においてCRDはホモダイマー構造を取ることが報告された（非特許文献28）。
- [0040] Wntシグナルは、canonical-Wntシグナル経路、non-canonical Wntシグナル経路としてSmall G結合タンパクを介するPCP (Planar Cell Polarity) 経路、3量体Gタンパクを介するCa²⁺経路の少なくとも3種類が存在すると考えられているが、骨代謝と関連した研究はcanonical-Wntシグナル経路が最も進んでおり、Wntは骨形成に対し促進的に作用すると考えら

れている（非特許文献29）。そのため、近年、本シグナル経路を阻害する内在性因子の働きをコントロールすることによって骨疾患治療に応用する試みがなされている。

[0041] Sclerostinは、当初BMPのアンタゴニストと考えられていたが、その後の研究でLRP5/6に直接結合することによってシグナル経路を阻害する因子であることが報告された（非特許文献30）。Sclerostinをノックアウトしたマウスにおいて顕著な骨密度増加が示され（非特許文献31）、現在欧米でSclerostin中和抗体のPhase I試験が行われており（AMG785、Amgen & UCB）、今後の展開が注目されている。

[0042] 別のcanonical-Wntシグナル阻害因子として知られているDKK1（Dickkopf-1）の中和抗体も作製され、多発性骨髄腫細胞（MM）移植SCIDマウスにおける骨密度低下阻害が見出され（非特許文献32）、中和抗体（BHQ880、Novartis）を用いた臨床試験が行われている。

[0043] また、WntのDecoy受容体と考えられFrizzledの細胞外ドメインとアミノ酸配列相同性の高いsFRP（soluble frizzled-related protein）は、Wntシグナルを負に制御していると考えられており（非特許文献33）、sFRP1のノックアウトマウス大腿骨においては海綿骨量の増加が報告されている（非特許文献34）。このような状況からsFRP1阻害剤の研究開発（Wyeth社）も進められている。

[0044] Frizzled7はWntリガンドと結合し、そのシグナルを伝達する受容体の一つとして同定されており（非特許文献35、36）、Frizzled7細胞外システインリッチドメイン（保存された10個のシステインのうち最もN末端側に位置するシステインと最もC末端側に位置するシステインに挟まれた領域のみをCRDとした場合）のアミノ酸配列はマウスとヒトで種差はなく100%一致している。本分子の作用として個体の発生分化

への関与（非特許文献37）および肝臓細胞増殖への関与（非特許文献38）が報告されている。

[0045] また、本分子の発現様式として、マウス小腸または大腸におけるクリプト基底部に限局された発現パターン（非特許文献39）、各種がん細胞における発現向上（非特許文献40）、成体マウス由来組織における発現解析より脾臓を除く各組織（脳、眼球、心臓、腎臓、肝臓、肺、精巣）における発現が報告されている（非特許文献35）。また、胎児ヒト由来組織における発現解析より、脳と肝臓を除く組織（肺、腎臓）における発現が、成人ヒト由来組織における発現解析より、強い発現が骨格筋でやや強い発現が心臓で、弱い発現が脳、胎盤と腎臓で、発現が検出されなかった組織として肺、肝臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、睾丸、卵巣、小腸、大腸が報告されている（非特許文献41）。

[0046] Frizzled受容体の可溶性受容体である細胞外システインリッチドメインは、Wntと結合しその作用を阻害すると考えられており、インビトロ実験系においてFrizzled7細胞外システインリッチドメイン（保存された10個のシステインのうち最もN末端側に位置するシステインと最もC末端側に位置するシステインに挟まれた領域およびその前後の配列を含む）とFcとの融合体（R&D Systems）がWnt3aによる細胞質 β -catenin安定化を阻害することが報告されている（非特許文献42）。

[0047] Frizzled7はがん細胞において発現向上が認められることから腫瘍治療のターゲット分子として注目されている（特許文献2、非特許文献43）。例えばFrizzled7の細胞外ドメインを発現するベクターが導入された大腸がん細胞はコントロールベクター導入大腸がん細胞に比べXenograft腫瘍細胞移植系において増殖阻害が観察され（非特許文献44）、腫瘍治療の創薬標的としての可能性が示唆された。

[0048] Frizzledは上記のように10種類のファミリー分子が報告されているがFrizzled7と細胞外システインリッチドメインの一次配列相

同性がとりわけ高い分子として *Frizzled 1* と *Frizzled 2* が報告されている（保存された 10 個のシステインのうち最も N 末端側に位置するシステインと最も C 末端側に位置するシステインに挟まれた領域のみを CRD とした場合、非特許文献 22）。

[0049] これら分子のシステインリッチドメイン（保存された 10 個のシステインのうち最も N 末端側に位置するシステインと最も C 末端側に位置するシステインに挟まれた領域のみを CRD とした場合）における *Frizzled 7* とのアミノ酸相同性は、ヒト・マウスどちらにおいても、*Frizzled 1*、*Frizzled 2* に対してそれぞれ 91%、93% と極めて相同性が高い。

[0050] また *Frizzled 7* と同様 *Frizzled 1* および *Frizzled 2* は共にシステインリッチドメイン（保存された 10 個のシステインのうち最も N 末端側に位置するシステインと最も C 末端側に位置するシステインに挟まれた領域のみを CRD とした場合）のマウスとヒト由来アミノ酸配列に種差はなく 100% 一致している。

[0051] *Frizzled 1* と *Frizzled 2* も共に *Frizzled 7* と同様、*Wnt* と相互作用することが報告されており、*Frizzled 1* においては *Wnt 3a* と相互作用することでアミロイドペーターペプチドによって引き起こされる海馬ニューロンの破壊を保護することが報告されている（非特許文献 45）。

[0052] また *Frizzled 1* の発現様式として成人ヒト由来組織における発現解析より、強い発現が心臓、胎盤、肺、腎臓、すい臓、前立腺、卵巣で報告されている。また、胎児由来組織における発現解析より、強い発現が肺と腎臓で報告されている（非特許文献 41）。

[0053] *Frizzled 1* と *Frizzled 2* は共に大腸がんまたは乳がんが発現レベルが向上することから、癌化との関連が示唆されており、腫瘍治療のターゲット分子として注目されている（特許文献 1、非特許文献 46、47）。更に、*Frizzled 1* においてはその遺伝子破壊マウスのフェノ

タイプに何ら変化が認められないことが報告された（非特許文献48）。

[0054] 超高齢化社会を迎え、骨粗鬆症、変形性関節症、関節リウマチおよび悪性腫瘍に伴う骨疾患並びにそれらに関連する骨疾患の治療が社会的にも益々重要な課題となり、骨疾患治療剤の開発研究が広く精力的に行われている。

[0055] 柿谷らは、Frizzled 1、Frizzled 2またはFrizzled 7由来の細胞外システインリッチドメインを含む蛋白質が骨量増加および骨強度増加に促進的かつ特異的に作用することを見出した（特許文献3）。しかし、さらなる生産細胞における分泌性（生産性）および活性向上が課題として残っている。

先行技術文献

特許文献

[0056] 特許文献1：国際公開第2008/061013号

特許文献2：国際公開第2008/031009号

特許文献3：国際公開第2010/038756号

非特許文献

[0057] 非特許文献1：Tosteson, A. N., et al., *Osteoporos Int.*, 12, 1042-1049 (2001)

非特許文献2：Yoh, K., et al., *J. Bone Miner. Metab.*, 23, 167-173 (2005)

非特許文献3：Nguyen, N. D., et al., *J. Bone Miner. Res.*, 22, 1147-1154 (2007)

非特許文献4：Muraki, S., et al., *J. Bone Miner. Metab.*, 24, 100-104 (2006)

非特許文献5：骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会，骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン2006年版，ライフサイエンス出版（日本）（2006）

非特許文献6：Nanpey, A. & Hashimoto, J., *The Bone*, 22, 3, 109-113 (2008)

- 非特許文献7: Soen, S. , The Bone, 22, 3, 103-107 (2008)
- 非特許文献8: Takahashi, S. , The Bone, 22, 3, 115-120 (2008)
- 非特許文献9: Daugirdas, J. T. , et al. , 臨床透析ハンドブック 第4版, メディカルサイエンスインターナショナル (日本) (2009)
- 非特許文献10: 藤生亜由子ら, 臨床透析, 24, 43-50, 日本メディカルセンター (日本) (2008)
- 非特許文献11: Cohen, M. M. Jr. , American J. Med. Genetics, Part A, 140A, 2646-2706 (2006)
- 非特許文献12: Kousteni, S. , et al. , Cell, 104, 719-730 (2001)
- 非特許文献13: Nakamura, T. , et al. , Cell, 130, 811-823 (2007)
- 非特許文献14: Wada, S. , et al. , Mebio, 25, 8, 89-95 (2008)
- 非特許文献15: Wada, S. & Yasuda, S. , Clin. Calcium, 11, 9, 1169-1175 (2001)
- 非特許文献16: Nakamura, T. , The Bone, 22, 3, 147-151 (2008)
- 非特許文献17: Sanna, G. , et al. , Ann. Oncol. , 16, 1207-1208 (2005)
- 非特許文献18: Theill, L. E. , et al. , Ann. Rev. Immunol. , 20, 795-823 (2002)
- 非特許文献19: Kong, Y. Y. , et al. , Nature, 397, 315-323 (1999)

- 非特許文献20: Dougal l, W. C. , et al. , Genes D
ev. , 13, 2412-2424 (1999)
- 非特許文献21: 堀内篤, CLINICIAN, 47, 401-404 (20
00)
- 非特許文献22: Darosze wska, A. , & Ralston, S.
H. , Nature Clinical Practice Rheuma
tology, 2, 270-277 (2006)
- 非特許文献23: Janssens, K. , et al. , Nature G
enetics, 26, 273-275 (2000)
- 非特許文献24: Tang, Y. , et al. , Nature Medic
ine, 15, 757-765 (2009)
- 非特許文献25: 森諭史, CLINICIAN, 49, 621-626 (20
02)
- 非特許文献26: Tamai, K. , et al. , Nature, 407,
530-535 (2000)
- 非特許文献27: Masiakowski, P. , & Yancopoulos
, G. D. , Curr. Biol. 8, R407 (1998)
- 非特許文献28: Dann, C. E. , et al. , Nature, 412
, 86-90 (2001)
- 非特許文献29: Rawadi, G. & Roman-Roman, S. , Ex
pert Opin. Ther. Targets, 9, 5, 1063-10
77 (2005)
- 非特許文献30: Semenov, M. , et al. , J. B. C. , 28
0, 29, 26770-26775 (2005)
- 非特許文献31: Li, X. , et al. , J. Bone Miner. R
es. , 23, 860-869 (2008)
- 非特許文献32: Yaccoby, S. , Blood. , 109, 2106-
2111 (2007)

- 非特許文献33: Nakanishi, R., et al., *J. Bone Miner. Res.*, 21, 1713-1721 (2006)
- 非特許文献34: Trevant, B., et al., *J. Cell. Physiol.* 217, 113-126 (2008)
- 非特許文献35: Wang, Y., et al., *J. B. C.*, 271, 8, 4468-4476 (1996)
- 非特許文献36: Huang, H-C., & Klein, P. S., *Genome Biology*, 5, 234, 1-7 (2004)
- 非特許文献37: Wheeler, G. N., *Current Biology*, 10, 849-852 (2000)
- 非特許文献38: Matsumoto, K., et al., *Dev. Biol.*, 319, 2, 234-247 (2008)
- 非特許文献39: Gregorieff, A., et al., *Gastroenterology*, 129, 626-638 (2005)
- 非特許文献40: Katoh, M. & Katoh, M., *Int. J. Mol. Med.*, 19, 529-533 (2007)
- 非特許文献41: Sagara, N., et al., *B. B. R. C.*, 252, 117-122 (1998)
- 非特許文献42: Kemp, C. R., et al., *Dev. Dynami cs*, 236, 2011-2019 (2007)
- 非特許文献43: Merle, P., et al., *J. Hepatol.*, 43, 5, 854-862 (2005)
- 非特許文献44: Vincan, E., et al., *Differenti ation*, 73, 142-153 (2005)
- 非特許文献45: Chacon, M. A., et al., *J. Cell P hysiol.*, 217, 215-227 (2008)
- 非特許文献46: Holcombe, R. F., et al., *Mol. Pa thol.*, 55, 220-226 (2002)

非特許文献47: Milovanovic, T., et al., Int. J. Oncology, 25, 1337-1342 (2004)

非特許文献48: Deltagen, Inc., "NIH initiative supporting placement of Deltagen, Inc. mice into public repositories" MGI Direct Data Submission 2005 (<http://www.informatics.jax.org/jawaw2/servlet/WIFetch?page=alleleDetail&key=40116>)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0058] 本発明は上記観点からなされたものであり、生産細胞における高い分泌性を有し、および／または骨量の増加活性に優れた *Frizzled 2* 由来の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質、および該蛋白質を含む医薬組成物を提供することを主な課題とする。

課題を解決するための手段

[0059] 驚くべきことに、本発明者らは、*Frizzled 2* の細胞外領域蛋白質を含む蛋白質に関し、該細胞外領域蛋白質として配列番号 102 で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列を含み、且つ全長が 141 から 175 アミノ酸である該細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質（以下、*Frizzled 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質ともいう）を用いると、生産細胞における分泌性が飛躍的に向上することを見出した。

[0060] 特に、本発明者らは、*Frizzled 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質として、該細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒト Fc 蛋白質との融合蛋白質を用いることにより、該融合蛋白質の生産細胞における分泌性が飛躍的に向上することを見出した。

[0061] さらに、本発明者らは、上記の *Frizzled 2* の細胞外領域蛋白質の

トランケート体を含む蛋白質が、特許文献3に記載の F r i z z l e d 2 の細胞外システインリッチドメインを含む蛋白質と比べ、少なくとも同等またはそれ以上の骨量の増加活性を有することを初めて見出した。

[0062] このような知見に基づいて、前記の F r i z z l e d 2 細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質、および該蛋白質を含有する骨疾患治療用医薬組成物を効率的に取得できることが示された。

[0063] すなわち、本発明は、以下の通りである。

1. 配列番号102で表されるシステインリッチドメイン(CRD)の最小領域配列を含み、且つ全長が141から175アミノ酸である蛋白質。
2. 配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列のC末端に14から48個のアミノ酸が付加された前項1に記載の蛋白質。
3. 配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列のC末端に26から48個のアミノ酸が付加された前項2に記載の蛋白質。
4. 配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列のC末端に32、38、44、または48個のアミノ酸が付加された前項3に記載の蛋白質。
5. 配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列のC末端に少なくとも配列番号1で表されるアミノ酸配列の128番目のVから141番目のLまでのアミノ酸を含むアミノ酸が付加された前項1から4のいずれか1に記載の蛋白質。
6. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の141番目のLの後に、さらに配列番号1で表されるアミノ酸配列の142番目のTから175番目のPまでのアミノ酸から選ばれる任意の長さのアミノ酸が付加された前項5に記載の蛋白質。
7. 配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列のN末端に1から15個のアミノ酸が付加された前項1から6のいずれか1に記載の蛋白質。
8. 配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列の

N末端に付加されるアミノ酸が配列番号1で表されるアミノ酸配列の1番目のQから15番目のFまでのアミノ酸から選ばれる任意の長さのアミノ酸である、前項7に記載の蛋白質。

9. 配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末の1位のアミノ酸であるQから、153番目のA、154番目のG、155番目のG、156番目のT、157番目のP、158番目のG、159番目のG、160番目のP、161番目のG、162番目のG、163番目のG、164番目のG、165番目のA、166番目のP、167番目のP、168番目のR、169番目のY、170番目のA、171番目のT、172番目のL、173番目のE、174番目のH、または175番目のPのいずれか1のアミノ酸までのアミノ酸を含む蛋白質。

10. 化学修飾されている、前項1から9のいずれか1に記載の蛋白質。

11. 前記化学修飾が、1または複数のポリエチレングリコール分子の結合である、前項10に記載の蛋白質。

12. 前記化学修飾が、糖鎖の結合である、前項10に記載の蛋白質。

13. 組換え蛋白質である、前項1から12のいずれか1に記載の蛋白質。

14. 前項1から13のいずれか1に記載の蛋白質と哺乳動物由来免疫グロブリンFc蛋白質またはその変異体との融合蛋白質。

15. 哺乳動物由来免疫グロブリンFc蛋白質が配列番号3で表されるアミノ酸配列からなる、前項14に記載の融合蛋白質。

16. 配列番号72から94のいずれか1で表されるアミノ酸配列からなる融合蛋白質。

17. 前項14から16のいずれか1に記載の融合蛋白質を含有する骨疾患治療用医薬組成物。

18. 前項1から13のいずれか1に記載の蛋白質または前項14から16のいずれか1に記載の融合蛋白質をコードするDNA。

19. 哺乳動物由来免疫グロブリンFc蛋白質をコードするヌクレオチド配列が配列番号4で表されるヌクレオチド配列である、前項18に記載のDN

A。

20. 配列番号42から64のいずれか1で表されるヌクレオチド配列からなるDNA。

21. 前項18から20のいずれか1に記載のDNAを含有する、骨疾患治療用医薬組成物。

22. 上記骨疾患が、骨量、骨密度および骨強度から選ばれる少なくとも1の低下を伴う疾患である、前項17または21に記載の骨疾患治療用医薬組成物。

23. 前項17、21または22に記載の骨疾患治療用医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、骨疾患を治療する方法。

24. 前記哺乳動物がヒトである、前項23の方法。

25. 前記骨疾患が、骨量、骨密度および骨強度から選ばれる少なくとも1の低下を伴う疾患である、前項23または24に記載の方法。

26. 前記骨疾患治療用医薬組成物が、他の骨疾患治療剤と組み合わせて同時にまたは連続的に投与される、前項23から25のいずれか1に記載の方法。

発明の効果

[0064] 本発明のFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質は生産細胞における分泌性が高い。また、本発明のFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質は、特許文献3に記載のFrizzled2の細胞外領域蛋白質のシステインリッチドメインを含む蛋白質と同等またはそれ以上の骨量増加活性を有する。

[0065] よって、本発明により、生産細胞における分泌性が向上し、および／または骨量増加活性を有するFrizzled2由来の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質を効率的に取得することができる。さらに、該蛋白質を用いて、骨量、骨密度および／または骨強度の低下を伴う疾患、例えば骨粗鬆症、変形性関節症、関節リウマチ、悪性腫瘍等に起因する骨疾患、およびそれらに関連する様々な骨疾患または障害を、副作用を引き起こすこと

なく、治療することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0066] [図1]図1はhFZD2(140)-hFcm組換え体発現ベクターを示す。

*は、制限酵素のユニークサイトを示す。

[図2]図2はhFZD2(X)-hFcm組換え体発現ベクターを示す。Xは

153-175、178、184、190、197、210、216および222のいずれか1である。*は、制限酵素のユニークサイトを示す。

[図3]図3はhFZD2(140)-hFcm、hFZD2(153)-hFcmからhFZD2(175)-hFcm、hFZD2(178)-hFcm、hFZD2(184)-hFcm、hFZD2(190)-hFcm、hFZD2(197)-hFcm、hFZD2(210)-hFcm、およびhFZD2(216)-hFcmの培養上清中の濃度を示す。縦軸は培養上清中の濃度(ng/mL)を示す。横軸はhFZD2(X)-hFcmの種類をXの値で示す。

発明を実施するための形態

[0067] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0068] 配列表を除いた本明細書におけるアミノ酸配列中の20種類のアミノ酸残基は、一文字略記で表現することがある。すなわち、グリシン(Gly)はG、アラニン(Ala)はA、バリン(Val)はV、ロイシン(Leu)はL、イソロイシン(Ile)はI、フェニルアラニン(Phe)はF、チロシン(Tyr)はY、トリプトファン(Trp)はW、セリン(Ser)はS、スレオニン(Thr)はT、システイン(Cys)はC、メチオニン(Met)はM、アスパラギン酸(Asp)はD、グルタミン酸(Glu)はE、アスパラギン(Asn)はN、グルタミン(Gln)はQ、リジン(Lys)はK、アルギニン(Arg)はR、ヒスチジン(His)はH、プロリン(Pro)はPである。

[0069] 本発明は、上記のとおり、哺乳動物由来のFrizzled2受容体由来の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質、および該蛋白質をコー

ドするDNAを含むベクターを有効成分として含有する骨疾患治療用医薬組成物を提供する。

[0070] <Frizzled受容体の細胞外領域蛋白質>

本発明のFrizzled受容体は、哺乳動物由来のFrizzled2である。Frizzled受容体は細胞外領域蛋白質を有し、かつ該細胞外領域蛋白質は細胞外システインリッチドメインを有する。Frizzled受容体はリガンドがWntである10種類のFrizzled受容体のうち特に細胞外システインリッチドメイン（以下、「CRD」とも称する）の同一性が高い。

[0071] Frizzled受容体のCRDのN末端側の第1システイン残基からC末端側の第10システイン残基までのアミノ酸配列の同一性は、ヒトおよびマウスの場合、Frizzled7のCRDとFrizzled2のCRDとの間で93%の同一性である。当該領域のアミノ酸配列はヒトとマウスで同一であり、種間で保存性が高い。

[0072] Frizzled2のアミノ酸およびヌクレオチド配列の情報は、NCBI（米国）にアクセスすることによって入手可能である。

[0073] Frizzled2（FZD2とも称される）は、ヒト、マウス、ラットまたはアフリカツメガエル等から単離され、配列情報が公開されている。本発明においては、Frizzled2蛋白質または該蛋白質をコードするDNAは、その由来に限定されるものではないが、哺乳動物、例えば、ヒトを含む霊長類、またはマウスを含むげっ歯類等の由来であることが好ましい。

[0074] ヒトまたはマウス由来Frizzled2の配列情報は、例えば、ヒトFrizzled2はアクセッション番号NM_001466.1、NM_001466.2若しくはNP_001457.1等として、またはマウスFZD2はアクセッション番号NM_020510.1、NM_020510.2若しくはNP_065256.1等として、GenBankに登録されている。

[0075] ヒトFrizzled2の細胞外領域蛋白質のアミノ酸配列は以下のとお

りである。

[0076] ヒト *Frizzled 2* の細胞外領域蛋白質のアミノ酸配列（配列番号 1）：

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPRYATLEHPFHCPRVLKVPSYLSYKFLGERDCAAPCEPARP
DGSMFFSQEETFAR

[0077] N末端より16番目のアミノ酸であるCから127番目のアミノ酸Cの部分は、N末端側の第1システイン残基からC末端側の第10システイン残基までの配列であり、細胞外システインリッチドメイン（以下、CRDとも表される）の最小領域配列である（配列番号102）。なお、少なくともCRDの最小領域配列についてはヒトもマウスも同じ配列である。

[0078] 配列番号102：

CQPISIP LCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSP ELRFFLCSMYAPVCTVLEQAI
PPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQIC

[0079] 本発明において、「細胞外システインリッチドメイン（Cysteine-rich domain; CRD）」は、哺乳動物由来の*Frizzled 2* からなる群から選択される*Frizzled* 受容体の細胞外領域蛋白質のN末端側の第1システイン残基から第10システイン残基までのアミノ酸配列を少なくとも含み、かつ、哺乳動物において骨量を増加する能力を有する蛋白質である。

[0080] ここで、「少なくとも含み」とは、細胞外システインリッチドメインが、*Frizzled* 受容体の細胞外領域蛋白質のN末端側の第1システイン残基から第10システイン残基までのシステインリッチドメインの最小領域配列（最小CRD配列）からなっているてもよいし、または、該最小CRD配列のN末端側および／またはC末端側に、骨量を増加する能力を有するかぎり、任意の外来配列が付加していてもよいことを表わす。

[0081] なお、システインリッチドメインの最小領域配列（最小CRD配列）とし

ては、F r i z z l e d 2については配列番号102で表されるアミノ酸配列が挙げられる。また、ここで、「外来配列」は、F r i z z l e d 受容体の細胞外領域蛋白質と無関係の任意の異種蛋白質由来の配列若しくは人工配列、または異種F r i z z l e d 受容体の細胞外領域蛋白質の最小CRD配列以外の部分に由来する配列等を含むことができる。

[0082] あるいは、本発明における細胞外システインリッチドメインは、哺乳動物由来のF r i z z l e d 2からなる群から選択されるF r i z z l e d 受容体の細胞外領域蛋白質のアミノ酸配列において、そのN末端側の第1システイン残基から第10システイン残基までのアミノ酸配列（システインリッチドメインの最小領域配列、または最小CRD配列）を少なくとも含み、かつ、哺乳動物において骨量、骨密度および／または骨強度を増加する能力を有する蛋白質である。

[0083] ここで、「少なくとも含む」とは、F r i z z l e d 受容体の細胞外領域蛋白質のN末端側の第1システイン残基から第10システイン残基までのアミノ酸配列を最小配列とし、該最小配列のN末端側および／またはC末端側に同種F r i z z l e d 受容体の細胞外領域蛋白質由来の配列を適宜延長して含むことができることを表わす。

[0084] 従って、細胞外システインリッチドメインは、上記最小CRD配列から、F r i z z l e d 受容体の細胞外領域蛋白質の最大CRD配列までの任意のアミノ酸配列を含むことができる。

[0085] <F r i z z l e d 受容体の細胞外領域蛋白質のトランケート体>

本発明において「F r i z z l e d 受容体の細胞外領域蛋白質のトランケート体」とは、哺乳動物由来のF r i z z l e d 2の細胞外領域蛋白質のN末端側の第1システイン残基から第10システイン残基までのアミノ酸配列（システインリッチドメインの最小領域配列）を少なくとも含み、かつ、F r i z z l e d 受容体の細胞外領域蛋白質の一部のアミノ酸を有するものである。

[0086] 本発明において、F r i z z l e d 2の細胞外領域蛋白質のトランケート

体とは、配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列を含み、且つ全長が141から175アミノ酸である蛋白質である。Frizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体の全長のアミノ酸数は、141から175個であり、153から175個であることが好ましい。

[0087] より好ましいFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体とは、配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列のC末端にアミノ酸が好ましくは14から48個、より好ましくは26から48個付加された蛋白質である。

[0088] より好ましいFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体とは、前記のいずれか1の蛋白質であって、配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列のC末端に32、38、44、または48個のアミノ酸が付加された蛋白質である。

[0089] さらに好ましいFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体としては、前記のいずれか1の蛋白質であって、配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列のC末端に少なくとも配列番号1で表されるアミノ酸配列の128番目のVから141番目のLまでのアミノ酸を少なくとも含むアミノ酸が付加された蛋白質である。

[0090] さらに好ましいFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体としては、前記のいずれか1の蛋白質であって、配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列のC末端に、配列番号1で表されるアミノ酸配列の141番目のLの後にさらに配列番号1で表されるアミノ酸配列の142番目のTから175番目のPまでのアミノ酸から選ばれる任意の長さのアミノ酸が付加された蛋白質である。

[0091] ここで、「配列番号1で表されるアミノ酸配列の142番目のTから175番目のPまでのアミノ酸から選ばれる任意の長さのアミノ酸が付加される」とは、具体的には、例えば、配列番号1で表されるアミノ酸配列の142番目のTから175番目のPまでのアミノ酸から選ばれる任意の連続するアミノ酸が付加されることをいう。

- [0092] さらに好ましい *Frizzled 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体とは、前記のいずれか 1 の蛋白質であって、さらに配列番号 102 で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列の N 末端に 1 から 15 のアミノ酸が付加された蛋白質である。
- [0093] さらに好ましい *Frizzled 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体とは、前記のいずれか 1 の蛋白質であって、さらに配列番号 102 で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列の N 末端に配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 1 番目の Q から 15 番目の F までのアミノ酸から選ばれる任意の長さのアミノ酸が付加された蛋白質である。
- [0094] ここで、「配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 1 番目の Q から 15 番目の F までのアミノ酸から選ばれる任意の長さのアミノ酸が付加される」とは、具体的には、例えば、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 1 番目の Q から 15 番目の F までのアミノ酸から選ばれる任意の連続するアミノ酸が付加されることをいう。
- [0095] さらに好ましい *Frizzled 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体とは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末の 1 位のアミノ酸である Q から、153 番目の A、154 番目の G、155 番目の G、156 番目の T、157 番目の P、158 番目の G、159 番目の G、160 番目の P、161 番目の G、162 番目の G、163 番目の G、164 番目の G、165 番目の A、166 番目の P、167 番目の P、168 番目の R、169 番目の Y、170 番目の A、171 番目の T、172 番目の L、173 番目の E、174 番目の H、または 175 番目の P のいずれか 1 のアミノ酸までのアミノ酸を含む蛋白質である。
- [0096] さらに好ましい *Frizzled 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体とは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末の 1 位のアミノ酸である Q から、158 番目の G、159 番目の G、160 番目の P、161 番目の G、162 番目の G、163 番目の G、164 番目の G、165 番目の A、167 番目の P、168 番目の R、169 番目の Y、170 番目の A、171

番目のT、172番目のL、173番目のE、または174番目のHのいずれか1のアミノ酸までのアミノ酸を含む蛋白質である。

[0097] より好ましいFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体とは、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末の1位のアミノ酸であるQから、158番目のG、160番目のP、161番目のG、162番目のG、163番目のG、164番目のG、167番目のP、168番目のR、169番目のY、170番目のA、171番目のT、または172番目のLのいずれか1のアミノ酸までのアミノ酸を含む蛋白質である。

[0098] 最も好ましいFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体とは、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末の1位のアミノ酸であるQから168番目のRまでのアミノ酸を含む蛋白質である。

[0099] 驚くべきことに、上述のFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質は、公知のFrizzled2の細胞外システインリッチドメインを含む蛋白質 [例えば、国際公開第2010/038756号 (特許文献3) に記載のもの] に比べ生産細胞における分泌性が向上しまたは同等の活性を有し、かつ少なくとも同等若しくはそれ以上の骨量の増加活性を有する。

[0100] 特にFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体として配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末の1位のアミノ酸であるQから153番目のA、154番目のG、155番目のG、156番目のT、157番目のP、158番目のG、159番目のG、160番目のP、161番目のG、162番目のG、163番目のG、164番目のG、165番目のA、166番目のP、167番目のP、168番目のR、169番目のY、170番目のA、171番目のT、172番目のL、173番目のE、174番目のH、または175番目のPのいずれか1のアミノ酸までのアミノ酸を含む蛋白質を用いた場合、これらのいずれか1のトランケート体を含む蛋白質は、公知のFrizzled2の細胞外システインリッチドメインを含む融合蛋白質 [例えば、国際公開第2010/038756号 (特許文献3) に記

載のもの] に比べ、生産細胞における分泌性が飛躍的に向上し、および／または骨量の増加活性も同等以上であることがわかった。

[0101] さらに *Frizzled 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体として、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末の 1 位のアミノ酸である Q から 158 番目の G、159 番目の G、160 番目の P、161 番目の G、162 番目の G、163 番目の G、164 番目の G、165 番目の A、167 番目の P、168 番目の R、169 番目の Y、170 番目の A、171 番目の T、172 番目の L、173 番目の E、または 174 番目の H のいずれか 1 のアミノ酸までのアミノ酸を含む蛋白質を用いた場合、生産細胞における分泌性の飛躍的向上、および／または骨量の増加活性の点で好ましい。

[0102] さらに、*Frizzled 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体として、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末の 1 位のアミノ酸である Q から 158 番目の G、160 番目の P、161 番目の G、162 番目の G、163 番目の G、164 番目の G、167 番目の P、168 番目の R、169 番目の Y、170 番目の A、171 番目の T、または 172 番目の L のいずれか 1 のアミノ酸までのアミノ酸を含む蛋白質を用いた場合、これらのいずれかのトランケート体を含む蛋白質は、公知の *Frizzled 2* の細胞外システインリッチドメインを含む蛋白質 [例えば、国際公開第 2010/038756 号 (特許文献 3) に記載のもの] に比べ、生産細胞における分泌性がさらに飛躍的に向上し、および／または骨量の増加活性も同等以上であることがわかった。

[0103] 最も好ましくは、*Frizzled 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体として、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末の 1 位のアミノ酸である Q から 168 番目の R のアミノ酸までのアミノ酸を含む蛋白質を用いる場合である。

[0104] なお、本発明において「生産細胞」とは、非限定的に、大腸菌等のエシェリヒア属、バチルス・ズブチリス等のバチルス属若しくはシュードモナス・プチャダ等のシュードモナス属等の細菌、サッカロミセス・セレビスエ若しく

はシゾサッカロミセス・ポンベ等のサッカロミセス属、カンジダ属若しくはピキア属等の酵母、CHO、COS、HEK293、NIH3T3若しくはNSO等の動物細胞、Sf9若しくはSf21等の昆虫細胞、または植物細胞等が挙げられるが、本発明の蛋白質を分泌または生産できるものであればいずれの細胞も用いることができる。

[0105] 本発明において「分泌性の向上」とは、少なくとも生産細胞における発現量が国際公開第2010/038756号（特許文献3）に記載の公知のFrizzled2の細胞外システインリッチドメインを含む蛋白質に比べ高いことを意味する。

[0106] また本発明において、「骨量の増加」は、少なくとも単位骨量の増加を伴うことを意味する。ここで単位骨量とは、組織全体の体積に占める骨梁全体の体積をいい、単位骨量の増加とは骨密度増加をいう。

[0107] また、「骨量の増加」は単位骨量の増加のみならず骨梁幅の増加、骨梁数の増加、および／または骨梁間隔の低下を伴ってもよい。ここで骨梁幅とは骨梁の幅の平均、骨梁数とは単位長当りの骨梁数、骨梁間隔とは隣接した骨梁の距離をいう。

[0108] 本発明において、哺乳動物は、以下のものに限定されないが、霊長類、家畜動物、げっ歯類、有蹄類またはペット動物等を含む。好ましい哺乳動物は、ヒトおよびマウスである。マウスは、細胞外システインリッチドメイン（CRD）のアミノ酸配列、特にN末端側の第1システイン残基からC末端側の第10システイン残基までの最小CRD配列がヒト由来の配列と同一であるという点で重要である。さらに好ましい哺乳動物はヒトである。

[0109] <細胞外領域蛋白質のトランケート体の変異体>

本発明の細胞外領域蛋白質のトランケート体の変異体には、天然の突然変異体および人工変異体のいずれも含まれ、上記細胞外領域蛋白質のアミノ酸配列において、1若しくは複数（好ましくは1若しくは数個）のアミノ酸の置換、欠失または付加を含むか、あるいは、該アミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、例えば93%以上、9

5%以上、97%以上、98%以上または99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、生産細胞における分泌性が向上し、かつ、骨量を増加する能力を有するものである。

[0110] 例えば、前記変異体は、配列番号102、または配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1若しくは複数（好ましくは1若しくは数個）のアミノ酸の置換、欠失または付加を含むか、あるいは、該アミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、例えば93%以上、95%以上、97%以上、98%以上または99%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、生産細胞における分泌性が向上し、かつ、骨量を増加する能力を有するものである。

[0111] 本明細書で使用される「数個」なる用語は、通常、2から10までの任意の整数を指す。好ましくは、それは2～5の任意の整数である。

[0112] 本明細書で使用される「同一性」なる用語は、2つのアミノ酸配列（またはヌクレオチド配列）のアラインメントにおいて、同一のアミノ酸残基数（またはヌクレオチド数）が最大となるように該2つの配列を整列させたときの配列間の一致度を意味し、具体的には、総アミノ酸残基数（または総ヌクレオチド数）に対する同一アミノ酸残基数（または同一ヌクレオチド数）のパーセンテージ（%）で表わされる。FASTAのようにギャップを導入する場合、ギャップの数も総アミノ酸残基数（または総ヌクレオチド数）に加算する。

[0113] 80%以上、好ましくは85%以上の配列同一性を有する蛋白質は、例えばNCBI（米国）、EMBL（欧州）等の配列データベースにアクセスし、例えばBLAST、FASTA等の配列相同性検索プログラムを利用して検索することが可能である [Altschul, S. F. ら (1990) J. Mol. Biol. 15:403-410; Karlin, S. と Altschul S. F. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268等]。

[0114] BLASTは、配列を固定長のワードに区切り、ワード単位で類似する断

片を検索し、これらを類似度が最大になるまで両方向に伸ばして局所的なアラインメントを行い、最後にこれらを結合して最終的なアラインメントを行う方法である。

[0115] また、FASTAは、連続して一致する配列の断片を高速に検索し、それらの断片の中で類似度の高いものに着目して局所的なアラインメントを行い、最後にギャップを考慮した上でこれらを結合しアラインメントを行う方法である。

[0116] 本発明の細胞外システインリッチドメインに変異を導入する場合、Frizzled受容体の細胞外領域蛋白質のN末端側の第1システイン残基からC末端側の第10システイン残基までの配列（最小CRD配列）内の10個のシステイン残基以外のアミノ酸残基に対してのみ、置換、欠失または付加からなる変異を行い、および、天然のジスルフィド結合を破壊せず、かつ天然のコンホメーションを実質的に保持することが好ましい。

[0117] これは、もし細胞外システインリッチドメイン内の天然のジスルフィド結合を破壊し本来のコンホメーションを変化させると、該ドメイン蛋白質が骨量、骨密度および／または骨強度を増加する能力を喪失するかまたは該能力を大きく低減するおそれがあるからである。

[0118] 変異導入法としては、細胞外システインリッチドメインの配列が公知であれば、その配列に基づいて合成した（相補的変異配列を含む）プライマーを使用するPCR法を利用した部位特異的突然変異誘発法が好ましい（Kunkelら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82:488-492; F. M. Ausubelら、Short Protocols in Molecular Biology, 1995, John Wiley & Sons; J. Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press等）。変異導入用キット（例えば、宝酒造製）も市販されているので、指示書に従って変異を導入することもできる。

- [0119] 簡単に説明すると、Kunkelの方法は、細胞外システインリッチドメインをコードするDNAを含むプラスミドを鋳型にし、T4 DNAポリヌクレオチドキナーゼで予め5'末端をリン酸化したプライマー（相補的変異配列を含む）を該鋳型にアニーリングし、DNA合成を行ったのち、T4 DNAリガーゼで末端同士を連結して、目的の変異を含むDNAを精製することを含む。
- [0120] 本発明において、変異は、置換、欠失、付加、挿入、またはその組み合わせを含む。置換は、保存的置換または非保存的置換のいずれでもよいが、細胞外システインリッチドメイン蛋白質のコンホメーションを実質的に変化させないためには保存的置換が好ましい。保存的置換は、構造的（例えば、分岐状または芳香族性等）、電気的（例えば、酸性または塩基性等）、極性または疎水性、等の化学的・物理的性質の類似したアミノ酸間での置換をいう。
- [0121] 分岐状アミノ酸には、バリン、ロイシン、イソロイシンが含まれる。芳香族アミノ酸には、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニンおよびヒスチジンが含まれる。酸性アミノ酸には、グルタミン酸およびアスパラギン酸が含まれる。
- [0122] 塩基性アミノ酸には、リシン、アルギニンおよびヒスチジンが含まれる。極性アミノ酸には、セリン、トレオニン、グルタミン、アスパラギン、チロシン、システイン、グリシンおよびプロリン等が含まれる。疎水性アミノ酸には、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンおよびメチオニン等が含まれる。
- [0123] 欠失は、1若しくは複数のアミノ酸残基を失うことである。付加は、1若しくは複数のアミノ酸残基を蛋白質のN末端またはC末端に結合することである。挿入は、蛋白質の内部に1若しくは複数のアミノ酸残基を結合することである。
- [0124] このうち、欠失と挿入は、細胞外システインリッチドメイン蛋白質のコンホメーションを実質的に変化させないことを前提として行うことができる。

そのために、好ましくは約1～5個程度のアミノ酸残基の欠失または挿入に制限される。

[0125] <細胞外領域蛋白質のトランケート体またはその変異体を含む蛋白質>

上で説明したように、本発明の医薬組成物の有効成分のひとつは、哺乳動物由来のFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体であって、生産細胞における分泌性が向上し、かつ骨量の増加活性を持つもの、または該トランケート体のアミノ酸配列と85%以上の配列同一性を有し、生産細胞における分泌性が向上し、かつ骨量増加活性をもつその変異体、を含む蛋白質である。

[0126] ここで、本発明の「哺乳動物由来のFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体」とは、上記記載のすべての細胞外領域蛋白質のトランケート体を意味する。

[0127] 本発明の「含む」なる表現は、上記細胞外領域蛋白質のトランケート体またはその変異体に、異種ペプチド、ポリペプチドまたは蛋白質を、該ドメインまたはその変異体のN末端またはC末端側に、必要であれば適当なペプチドリンカー（例えば、アミノ酸数1～20）を介して、結合または融合してもよいことを意味する。例えば、そのような異種蛋白質として好ましい例は、哺乳動物由来免疫グロブリンFc蛋白質またはその変異体等が挙げられる。

[0128] しかし、このような異種蛋白質が生体内に投与されると、拒絶反応を引き起こす可能性があるため、それをできる限り回避するためにも、投与する哺乳動物が本来もつ蛋白質を該異種蛋白質として使用することが好ましい。

[0129] 好ましいFc蛋白質は、ヒトへの使用を考慮すると、ヒト免疫グロブリンのFc蛋白質である。また、免疫グロブリンのクラスおよびサブクラスは、以下のものに制限されないが、例えば、IgG、IgD、IgE、IgM、IgA、IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgG4、IgA1またはIgA2等のいずれでもよいが、ヒトに使用するのであれば、ヒト免疫グロブリンのクラスおよびサブクラスを使用す

ることが好ましい。

[0130] Fc蛋白質は、細胞外システインリッチドメインまたはその変異体の生体内 (in vivo) での安定性を向上させることができる。ただし、この場合、Fc蛋白質は、その生物活性による生体内に及ぼす影響を避けるために、例えば抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) および／または補体依存性細胞障害活性 (CDC) 活性等の生物活性を予め低下させることが好ましく、そのために、前記のような生物活性を抑制、低下または喪失させるための変異を導入することが好ましい。

[0131] そのような変異は、哺乳動物由来のFc蛋白質のアミノ酸配列において、例えば、1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1～3個のアミノ酸残基のアミノ酸置換であって、ADCCおよび／またはCDC活性を低下させるような任意のアミノ酸置換であり、具体的には、後述の実施例1に例示されるような置換を含むことができる。

[0132] Fc蛋白質の好適例は、配列番号3で表されるアミノ酸配列を含むヒトIgG1 Fc変異体である。Fc蛋白質の結合位置は、細胞外システインリッチドメインまたはその変異体のN末端側、C末端側のいずれでもよいが、C末端側が好ましい。

[0133] 本発明において好ましい蛋白質は、前記記載のFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒトFc蛋白質との融合蛋白質である。

[0134] 本発明において好ましい蛋白質は、Frizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒトFc蛋白質との融合体を含む蛋白質であって、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末の1位のアミノ酸であるQから、153番目のA、154番目のG、155番目のG、156番目のT、157番目のP、158番目のG、159番目のG、160番目のP、161番目のG、162番目のG、163番目のG、164番目のG、165番目のA、166番目のP、167番目のP、168番目のR、169番目のY、170番目のA、171番目のT、172番目のL、173番目のE、174番目のH、または175番目のPのいずれか1のアミノ酸までのアミノ酸を

含む *F r i z z l e d 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒト *F c* 蛋白質との融合蛋白質である。

[0135] さらに好ましい蛋白質は、*F r i z z l e d 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒト *F c* 蛋白質との融合体を含む蛋白質であって、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末の 1 位のアミノ酸である Q から、158 番目の G、159 番目の G、160 番目の P、161 番目の G、162 番目の G、163 番目の G、164 番目の G、165 番目の A、167 番目の P、168 番目の R、169 番目の Y、170 番目の A、171 番目の T、172 番目の L、173 番目の E、または 174 番目の H のいずれか 1 のアミノ酸までのアミノ酸を含む *F r i z z l e d 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒト *F c* 蛋白質との融合蛋白質である。

[0136] より好ましい蛋白質は、*F r i z z l e d 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒト *F c* 蛋白質との融合体を含む蛋白質であって、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末の 1 位のアミノ酸である Q から、158 番目の G、160 番目の P、161 番目の G、162 番目の G、163 番目の G、164 番目の G、167 番目の P、168 番目の R、169 番目の Y、170 番目の A、171 番目の T、または 172 番目の L のいずれか 1 のアミノ酸までのアミノ酸を含む *F r i z z l e d 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒト *F c* 蛋白質との融合蛋白質である。

[0137] 最も好ましい蛋白質は、*F r i z z l e d 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒト *F c* 蛋白質との融合体を含む蛋白質であって、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の N 末の 1 位のアミノ酸である Q から 168 番目の R のアミノ酸までのアミノ酸を含む *F r i z z l e d 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒト *F c* 蛋白質との融合蛋白質である。

[0138] さらに具体的には、*F r i z z l e d 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒト *F c* 蛋白質との融合蛋白質としては配列番号 72 から 94 のいずれか 1 で表されるアミノ酸配列を含む融合蛋白質である。

[0139] より好ましい *F r i z z l e d 2* の細胞外領域蛋白質のトランケート体と

ヒトFc蛋白質との融合蛋白質としては配列番号77から84および86から93のいずれか1で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質である。

[0140] より好ましいFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒトFc蛋白質との融合蛋白質としては配列番号77、79から83および86から91のいずれか1で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質である。最も好ましいFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒトFc蛋白質との融合蛋白質としては配列番号87で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質である。

[0141] 配列番号72から94のいずれか1で表されるアミノ酸配列を含む融合蛋白質中の細胞外領域蛋白質のトランケート体は、Frizzled2の細胞外領域蛋白質に由来するが、該トランケート体のアミノ酸配列は、骨量を増加する能力を有する限り、上記<細胞外領域蛋白質のトランケート体の変異体>の節に記載したような変異を含んでもよい。

[0142] 驚くべきことに、上述のFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む融合蛋白質は、公知のFrizzled2の細胞外システインリッチドメインを含む融合蛋白質〔例えば、国際公開第2010/038756号（特許文献3）に記載のもの〕に比べ生産細胞における分泌性が向上しまたは同等の分泌性を有し、かつ少なくとも同等若しくはそれ以上の骨量増加活性を有する。

[0143] 特にFrizzled2の細胞外蛋白質のトランケート体を含む融合蛋白質については、そのFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体として配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末の1位のアミノ酸であるQから、153番目のA、154番目のG、155番目のG、156番目のT、157番目のP、158番目のG、159番目のG、160番目のP、161番目のG、162番目のG、163番目のG、164番目のG、165番目のA、166番目のP、167番目のP、168番目のR、169番目のY、170番目のA、171番目のT、172番目のL、173番目のE、174番目のH、または175番目のPのいずれか1のアミノ酸までの

アミノ酸を含む蛋白質を用いた場合、これらのいずれか1のトランケート体を含む融合蛋白質は、公知のFrizzled2の細胞外システインリッチドメインを含む融合蛋白質〔例えば、国際公開第2010/038756号（特許文献3）に記載のもの〕に比べ、生産細胞における分泌性が飛躍的に向上し、および／または骨量の増加活性も同等以上であることがわかった。

[0144] さらに前記融合蛋白質については、そのFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体として、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末の1位のアミノ酸であるQから、158番目のG、159番目のG、160番目のP、161番目のG、162番目のG、163番目のG、164番目のG、165番目のA、167番目のP、168番目のR、169番目のY、170番目のA、171番目のT、172番目のL、173番目のE、または174番目のHのいずれか1のアミノ酸までのアミノ酸を含む蛋白質を有するものを用いた場合、生産細胞における分泌性の飛躍的向上、および／または骨量の増加活性の点で好ましい。

[0145] さらに、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末の1位のアミノ酸であるQから、158番目のG、160番目のP、161番目のG、162番目のG、163番目のG、164番目のG、167番目のP、168番目のR、169番目のY、170番目のA、171番目のT、または172番目のLのいずれか1のアミノ酸までのアミノ酸を含む蛋白質を前記融合蛋白質に用いた場合、これらのいずれかのトランケート体を含む融合蛋白質は、公知のFrizzled2の細胞外システインリッチドメインを含む融合蛋白質〔例えば、国際公開第2010/038756号（特許文献3）に記載のもの〕に比べ、生産細胞における分泌性がさらに飛躍的に向上し、および／または骨量の増加活性も同等以上であることがわかった。

[0146] 最も好ましい融合蛋白質は、配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末の1位のアミノ酸であるQから168番目のRのアミノ酸までのアミノ酸を含むFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒトFc蛋白質との融合蛋白質である。

- [0147] また、実施例に示されるように、配列番号72から94のいずれか1で表されるアミノ酸配列を含む融合蛋白質も上記記載の驚くべき効果を有することがわかった。
- [0148] より好ましいF r i z z l e d 2の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒトFc蛋白質との融合蛋白質としては配列番号77から84および86から93のいずれかの1で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質である。
- [0149] より好ましいF r i z z l e d 2の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒトFc蛋白質との融合蛋白質としては配列番号77、79から83および86から91で表されるアミノ酸配列のいずれか1のアミノ酸配列を含む蛋白質である。最も好ましいF r i z z l e d 2の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒトFc蛋白質との融合蛋白質としては配列番号87で表されるアミノ酸配列のアミノ酸配列を含む蛋白質である。
- [0150] なお、本発明において「生産細胞」とは、非限定的に、大腸菌等のエシェリヒア属、バチルス・ズブチリス等のバチルス属、シュードモナス・プチダ等のシュードモナス属等の細菌、サッカロミセス・セレビスエ若しくはシゾサッカロミセス・ポンベ等のサッカロミセス属、カンジダ属若しくはピキア属等の酵母、CHO、COS、HEK293、NIH3T3若しくはNS0等の動物細胞、Sf9若しくはSf21等の昆虫細胞、または植物細胞等が挙げられるが、本願発明の蛋白質を分泌または生産できるものであればいずれの細胞も用いることができる。
- [0151] 本発明において「分泌性の向上」とは、すくなくとも生産細胞における発現量が国際公開第2010/038756号（特許文献3）に記載の公知のF r i z z l e d 2の細胞外システインリッチドメインを含む融合蛋白質に比べ高いことを意味する。
- [0152] また本発明において、「骨量の増加」は、少なくとも単位骨量の増加を伴う。
- [0153] 本発明においては、上記細胞外領域蛋白質のトランケート体またはその変異体を含む蛋白質は、必ずしも異種ペプチド、ポリペプチドまたは蛋白質と

結合または融合する必要はない。すなわち、本発明における上記蛋白質は、上記 F r i z z l e d 2 受容体の細胞外領域蛋白質の断片であって、前記細胞外領域蛋白質を含む断片であってもよい。このような断片は、骨量、骨密度および／または骨強度を増加する能力を有するかぎり、上記<細胞外領域蛋白質のトランケート体の変異体>の節に記載したような変異を含んでもよい。

[0154] 本発明の上記細胞外領域蛋白質のトランケート体またはその変異体を含む蛋白質は、当該技術分野で慣用の遺伝子組換え技術によって作製しうる。簡単に説明すると、該蛋白質の作製は、本発明の蛋白質をコードする DNA を用意し、この DNA を含む発現ベクターを構築し、該ベクターで原核または真核細胞を形質転換またはトランスフェクションし、得られた細胞の培養から目的の組換え蛋白質を回収することを含む。

[0155] 蛋白質の精製は、蛋白質の慣用の精製法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、有機溶媒沈殿、透析、電気泳動、クロマトフォーカシング、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーまたは HPLC 等を適宜組み合わせることによって実施可能である。

[0156] 上記 DNA またはベクターに関しては、後述の<核酸およびベクター>の節、実施例等に記載しているので、それらを参照することができる。また、遺伝子組換え技術は、F. M. Ausubel ら, Short Protocols in Molecular Biology, 1995, John Wiley & Sons, J. Sambrook ら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press 等に記載されており、本発明のために利用できる。

[0157] 本発明における上記 F r i z z l e d 2 の細胞外領域蛋白質のトランケート体またはその変異体を含む蛋白質は、化学修飾されていてもよい。

[0158] 化学修飾には、非限定的に、例えば、グリコシル化、ペグ (PEG) 化、

アセチル化、アミド化またはリン酸化等が含まれる。特に好ましく利用できる化学修飾は、グリコシル化およびペグ化である。

[0159] ペグ化は、例えば、蛋白質のN末端アミノ基、リシン (L y s) の ϵ アミノ基等のアミノ酸残基に1または複数のポリエチレングリコール (P E G) 分子を結合させることである。一般的には、アミノ酸の遊離アミノ基に P E G分子が結合される。

[0160] P E Gの平均分子量は、以下に限定されないが、約3, 000~約50, 000の範囲で使用可能である。P E Gを蛋白質に結合させるには、P E Gの末端部分に、例えば、カルボキシル基、ホルミル (アルデヒド) 基、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基、アミノ基、チオール基またはマレイイミド基等の活性基を導入し、蛋白質のアミノ基、カルボキシル基、チオール基またはヒドロキシル基等の基と反応させることができる。

[0161] グリコシル化 (糖鎖の結合) は、蛋白質のアスパラギン、セリンまたはトレオニン残基に炭水化物鎖 (即ち、糖鎖) が結合することである。一般に、A s n - X - T h r / S e r (ここで、XはP r o以外の任意のアミノ酸残基である。) の配列を認識して糖鎖の結合が起こる。このような配列をもつように該蛋白質のアミノ酸配列を改変するときは、天然型と異なる位置に糖鎖を導入することもできる。

[0162] 通常、遺伝子組換え技術によって、組換え蛋白質をコードするD N Aを、真核細胞 (酵母細胞、動物細胞、植物細胞等) 中で発現することによって、組換え蛋白質のグリコシル化を起こすことができる。本発明では、糖鎖の構造は特に制限されないものとし、発現のために選択された細胞の種類によって糖鎖構造が異なると考えられる。ヒトにおける使用の場合、ヒト由来細胞、ヒト糖鎖を合成可能な酵母細胞またはチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞等を利用する。

[0163] アセチル化またはアミド化は、主に、蛋白質のN末端またはC末端で行うことが好ましい。これらの反応は、例えば、脂肪族アルコール若しくは脂肪酸等のアルコール類またはカルボン酸類を用いて行うことができる。アルキ

ル部分の炭素数は、例えば、約1～20程度であるが、水溶性を損なわない、無毒性である等の条件を満たす必要がある。

[0164] <核酸およびベクター>

本発明の組成物の有効成分として、上記細胞外領域蛋白質のトランケート体またはその変異体を含む蛋白質をコードする核酸を含むベクターも含まれる。

[0165] 本明細書で使用する「核酸」なる用語には、DNAおよびRNAの両方を含むものとし、DNAにはゲノムDNAまたはcDNAを含み、RNAにはmRNAを含む。

[0166] 細胞外領域蛋白質のトランケート体、その変異体およびそれらを含む蛋白質については、Fc蛋白質との融合蛋白質を含めて、上記<Frizzled受容体の細胞外領域蛋白質のトランケート体>、<細胞外領域蛋白質のトランケート体の変異体>および<細胞外領域蛋白質のトランケート体またはその変異体を含む蛋白質>の各節で説明したとおりであり、それらの節で説明した全ての記載をここでも引用する。したがって、本発明における核酸は、上で説明し具体的に例示した、細胞外領域蛋白質のトランケート体またはその変異体を含む蛋白質をコードするDNAを包含する。

[0167] 具体的には、該DNAはヒトFrizzled2の細胞外領域蛋白質（配列番号1）のアミノ酸配列において、少なくとも、N末端側の第1システイン残基からC末端側の第10システイン残基までのアミノ酸配列からなるCRD最小配列（配列番号102）を含むアミノ酸配列をコードするDNAを包含する。

[0168] 真核細胞での該DNAの発現および発現産物の細胞外への分泌を考慮するならば、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列をさらに含むとよい。シグナル配列の例は、各Frizzled受容体蛋白質由来のシグナル配列、ヒトCD33由来のシグナル配列、ヒト血清アルブミン由来のシグナル配列、ヒトプレプロトリプシン由来のシグナル配列等である。

[0169] より具体的には、本発明のDNAは、以下に記載のものが挙げられる。

[0170] ヒト *Frizzled 2* 細胞外領域蛋白質をコードする DNA (配列番号 2) : CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATC
 CCGCTGTGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAG
 GACGCAGGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCGAAGTGCCTTC
 TTCCTGTGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATC
 TGTGAGCGCGCGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTG
 CGCTGCGAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGA
 GCTCCCGCGCTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTGGC
 CCGGGCGGGCGGGCGCTCCCCCGCGCTACGCCACGCTGGAGCACCCCTTCCACTGCCCGCGCTCCTC
 AAGGTGCCATCCTATCTCAGCTACAAGTTTCTGGGCGAGCGTGATTGTGCTGCGCCCTGCGAACCTGCG
 CGGCCCGATGGTTCCATGTTCTTCTCACAGGAGGAGACGCGTTTTCGCGCGC

[0171] 本発明における DNA は、*Frizzled* 受容体の細胞外領域蛋白質の
 トランケート体を含む蛋白質またはその変異体と、上記定義の異種蛋白質と
 の融合蛋白質をコードする DNA も含まれる。異種蛋白質として好ましい例
 は、哺乳動物由来の免疫グロブリン Fc 蛋白質であり、特にヒト Fc 蛋白質
 が好ましいが、その生物活性 (特に ADCC および CDC) を低下または喪
 失させるように変異を導入することが好ましい。

[0172] 例えば、変異型ヒト IgG1 由来 Fc 蛋白質をコードするヌクレオチド配
 列を配列番号 4 に示す。さらにまた、この変異型ヒト IgG1 由来 Fc 蛋白
 質とヒト由来 *Frizzled 2* 受容体の細胞外領域蛋白質のトランケート
 体を含む蛋白質との融合蛋白質をコードするヌクレオチド配列として好まし
 い配列を、配列番号 42 から 64 に示す。

[0173] また、ヒト由来の *Frizzled 2* の細胞外領域蛋白質の N 末端側の第
 1 シスチン残基から第 10 シスチン残基までのシスチンリッチドメイ
 ン (CRD) のアミノ酸配列 (CRD の最小領域配列) をコードするヌクレ
 オチド配列を以下に例示する。

[0174] 配列番号 103 (ヒト *Frizzled 2* CRD の最小領域配列) :
 TGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTGTGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTG

GGCCACACGAACCAGGAGGACGCAGGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGC
TCGCCC GAACTGCGCTTCTTCCTGTGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGCTGGAACAGGCCATC
CCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAGCGCGCGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTT
CAGTGGCCCCGAGCGCCTGCGCTGCGAGCACTTCCC GCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGC

[0175] 上記融合蛋白質をコードするヌクレオチド配列には、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列をさらに含むことができる。シグナル配列としては、ヒト蛋白質由来のシグナル配列、例えば、ヒト *F r i z z l e d 2* 由来のシグナル配列、ヒト *C D 3 3* 由来のシグナル配列、ヒト血清アルブミン由来のシグナル配列、またはヒトプレプロトリプシン由来のシグナル配列等が挙げられる。

[0176] 上記蛋白質類をコードする DNA ホモログは、ヒト由来の *F r i z z l e d 2* の遺伝子をコードする mRNA から合成した cDNA に基づいて作製したプライマーまたはプローブを使用する周知の技術によって、ヒト以外の他の哺乳動物由来の、該遺伝子を発現することが公知の細胞または組織から調製した cDNA ライブラリーから取得することができる。そのような技術としては、例えば、PCR 法またはハイブリダイゼーション法（例えば、サザン法またはノーザン法等）等が挙げられる。

[0177] PCR 法は、ポリメラーゼ連鎖反応であり、これは、二本鎖 DNA を一本鎖に解離するための変性 (*d e n a t u r i n g*) 工程（約 94~96℃、約 30 秒~1 分）、プライマーを鋳型の一本鎖 DNA に結合するためのアニーリング (*a n n e a l i n g*) 工程（約 55~68℃、約 30 秒~1 分）、DNA 鎖を伸長するための伸長 (*e x t e n s i o n*) 工程（約 72℃、約 30 秒~1 分）からなるサイクルを 1 サイクルとして約 25~40 サイクルを実施する。

[0178] また、変性工程の前に、約 94~95℃ で約 5~12 分の前加熱処理を行い、伸長工程の最終サイクル後に、さらに 72℃ で約 7~15 分の伸長反応を実施することができる。PCR は、市販のサーマルサイクラーにて、耐熱性 DNA ポリメラーゼ [例えば、*A m p l i T a q G o l d* (登録商標)]

(Applied Biosystems) 等]、 $MgCl_2$ 、dNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) 等を含有するPCRバッファー中で、センスおよびアンチセンスプライマー (サイズ: 約17~30b、好ましくは20~25b) と鋳型DNAの存在下で行う。増幅されたDNAは、アガロースゲル電気泳動で分離・精製 (臭化エチジウム染色) することができる。

[0179] ハイブリダイゼーションは、約20~100bまたはそれ以上の長さの標識プローブと二本鎖を形成して目的核酸を検出する技法である。選択性を高めるために、一般にストリンジেন্টな条件でハイブリダイゼーションを行うことができる。

[0180] ストリンジেন্টな条件は、例えば約1~5×SSC、室温~約40℃でのハイブリダイゼーション、およびその後の、約0.1~1×SSC、0.1% SDS、約45~65℃での洗浄からなる。ここで、1×SSCは、150mM NaCl、15mM ナークエン酸、pH7.0の溶液を指す。このような条件は、配列同一性が約80%以上、好ましくは85%以上の核酸を検出することを可能にするであろう。

[0181] 上記DNAはベクターに挿入され、本発明の医薬組成物の有効成分である蛋白質の製造のために使用されるか、あるいは、ベクター自体を製剤化して医薬組成物として使用される。

[0182] ベクターとしては、例えば、プラスミド、ファージまたはウイルス等が挙げられる。プラスミドとしては、例えば、非限定的に、大腸菌由来プラスミド (例えば、pRSET、pTZ19R、pBR322、pBR325、pUC118またはpUC119等)、枯草菌由来プラスミド (例えば、pUB110またはpTP5等)、酵母由来プラスミド (例えば、YEp13、YEp24またはYCP50等) またはTiプラスミド等が挙げられる。

[0183] ファージとしては、例えば、λファージ等が挙げられる。さらに、ウイルスベクターとしては、例えば、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス若しくはアデノ随伴ウイルス等の動物ウイル

スベクター、またはバキュロウイルス等の昆虫ウイルスベクター等が挙げられる。

[0184] ベクターは、目的DNAを組み込むためのポリリンカーまたはマルチクローニングサイトを含んでもよく、また、該DNAを発現するためにいくつかの制御エレメントを含むことができる。制御エレメントとしては、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリA付加シグナル、複製開始点、選択マーカ、リボソーム結合配列またはターミネーター等が挙げられる。

[0185] 選択マーカとしては、薬剤耐性遺伝子（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子またはピューロマイシン耐性遺伝子等）または栄養要求性相補遺伝子〔例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子、HIS3遺伝子、LEU2遺伝子またはURA3遺伝子等〕等が挙げられる。

[0186] プロモーターは、宿主細胞に応じて異なる場合がある。宿主細胞としては、例えば、非限定的に、大腸菌等のエシェリヒア属、バチルス・ズブチリス等のバチルス属、シュードモナス・プチダ等のシュードモナス属等の細菌、サッカロミセス・セレビスエ若しくはシゾサッカロミセス・ポンベ等のサッカロミセス属、カンジダ属若しくはピキア属等の酵母、CHO、COS、HEK293、NIH3T3若しくはNSO等の動物細胞、Sf9若しくはSf21等の昆虫細胞、または植物細胞等が挙げられる。

[0187] 大腸菌等の細菌を宿主とする場合、プロモーターとしては、例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、PLまたはPRプロモーター等が挙げられる。

[0188] 酵母を宿主とする場合、プロモーターとしては、例えば、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1プロモーター、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターまたはAOX1プロモーター等が挙げられる。

[0189] 動物細胞を宿主とする場合、プロモーターとしては、例えば、SR α プ

ロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、ヒトCMV初期遺伝子プロモーター、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター、メタロチオネインプロモーターまたは多角体プロモーター等が挙げられる。

[0190] 植物細胞を宿主とする場合、プロモーターとしては、例えば、CaMVプロモーターまたはTMVプロモーター等が挙げられる。

[0191] 形質転換またはトランスフェクションとしては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、アグロバクテリウム法、ウイルス感染法、リポソーム法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法またはリポフェクション法等が挙げられる。

[0192] 形質転換宿主は、細菌、酵母、動物細胞、植物細胞の種類に応じた培養条件で培養され、細胞内または培養液から目的蛋白質を回収する。

[0193] 微生物の培養では、微生物が資化する炭素源、窒素源または無機塩類等を含む培地を使用する。炭素源としては、例えば、グルコース、フラクトース、スクロース若しくはデンプン等の炭水化物、酢酸若しくはプロピオン酸等の有機酸、またはエタノール若しくはプロパノール等のアルコール類が挙げられる。

[0194] 窒素源としては、例えば、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム若しくはリン酸アンモニウム等の無機酸あるいは有機酸のアンモニウム塩、ペプトン、肉エキスまたはコーンステープリカー等が挙げられる。

[0195] 無機物としては、例えば、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅または炭酸カルシウム等が挙げられる。

[0196] 動物細胞の培養では、例えば、DMEM培地またはRPMI 1640培地等が基本培地として用いられ、該基本培地に牛胎児血清(FCS)等を添加した培地が用いられる。

[0197] 目的蛋白質の回収は、上で説明したとおり、蛋白質精製のための慣用手法

、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、有機溶媒沈殿、透析、電気泳動、クロマトフォーカシング、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーまたはHPLC等にて実施する。

[0198] ベクターを治療用を使用する場合には、被験体のゲノムに組み込まれないベクターであって、細胞に感染するが複製が不能にされたウイルスベクターまたは非ウイルスベクター等が好ましい。このようなベクターとしては、例えば、アデノ随伴ウイルスベクターまたはアデノウイルスベクター等が挙げられる。これらのベクターは、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化部位、選択マーカーまたはレポーター遺伝子等を含みうる。

[0199] ウイルスベクターとしては、例えば、*J. Virol.*, 67:5911-5921 (1993), *Human Gene Therapy* 5:717-729 (1994), *Gene Therapy* 1:51-58 (1994), *Human Gene Therapy* 5:793-801 (1994) 若しくは *Gene Therapy* 1:165-169 (1994) 等に記載されているベクター、またはそれらの改良ベクターである。

[0200] 更に、非ウイルスベクターの例は、ヒト人工染色体ベクターであり、これは、ヒト染色体由来のセントロメアおよびテロメアを含む染色体断片から構成されるベクターである。ヒト染色体断片は特に制限されないが、例えば、ヒト14番染色体断片またはヒト21番染色体断片等が含まれる（日本国再表2004/031385号公報、日本国特開2007-295860号公報等）。

[0201] 上記ベクターに、上記定義のDNAを挿入し、被験体の骨部に投与するか、あるいは、被験体から採取した骨部組織若しくは細胞にベクターを導入したのち該被験体の骨部に戻す方法等により、ベクターを被験体に投与することができる。

[0202] <Frizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体を有する蛋白質の製造方法>

本発明により、F r i z z l e d 2の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質の製造方法を提供する。具体的には、上記記載のDNA、ベクター、選択マーカー、プロモーター、宿主細胞、形質転換細胞、微生物の培養（動物細胞の培養を含む）、および目的蛋白質の回収等並びに公知の方法を用いて、F r i z z l e d 2の細胞外領域蛋白質のトランケート体を含む蛋白質を製造することが出来る。

[0203] <医薬組成物>

本発明は更に、上で説明したF r i z z l e d 2の受容体の細胞外領域蛋白質のトランケート体またはその変異体を含む蛋白質、または該蛋白質をコードするDNAを含むベクターを有効成分とする骨疾患治療用組成物を提供する。

[0204] 本発明はまた、前記骨疾患治療用組成物を哺乳動物に投与することを含む、骨疾患を治療する方法を提供する。

[0205] 本発明において、骨疾患は、骨量、骨密度および／または骨強度の低下を伴う疾患であり、例えば、骨粗鬆症、変形性関節症、関節リウマチ、悪性腫瘍、高カルシウム血症、骨ページェット病、大理石骨病、カムラチ・エンゲルマン病、関節症、原発性甲状腺機能亢進症、骨減少症、骨多孔症、骨軟化症、クル病、外傷性骨折または疲労骨折等に起因する骨疾患、およびそれらに関連する様々な骨疾患または障害が挙げられる。

[0206] 悪性腫瘍としては、例えば、破骨細胞腫、骨肉腫または多発性骨髄腫が挙げられる。多発性骨髄腫による骨の痛みは脊髄と肋骨にみられることが多く、運動することにより悪化することがある。同じ部分が持続的に痛む場合は、病的骨折を来している可能性がある。脊椎に病変がある場合は、脊髄圧迫を引き起こす場合がある。

[0207] 多発性骨髄腫では、増殖した腫瘍細胞によってIL-6が放出される。IL-6は破骨細胞を活性化する因子（OAF: osteoclast activating factor）としても知られ、IL-6によって活性化された破骨細胞が骨を吸収・破壊するため、多発性骨髄腫に侵された骨を

レントゲン撮影すると、骨に穴が開いているように見える（打ち抜き像：“punched-out” resorptive lesions）。また、骨の破壊によって血中カルシウム濃度が高まり、高カルシウム血症またはそれに起因する様々な症状が発生する。

[0208] 骨粗鬆症には原発性骨粗鬆症と続発性（二次性）骨粗鬆症が含まれる。原発性骨粗鬆症としては、例えば、閉経後骨粗鬆症または老人性骨粗鬆症が挙げられる。続発性（二次性）骨粗鬆症の原因疾患としては、例えば、内分泌性（例えば、副甲状腺機能亢進症、甲状腺機能亢進症、性腺機能低下症、クッシング症候群、成長ホルモン欠乏症、糖尿病、アジソン病またはカルシトニン欠損症等）、栄養性／代謝性〔例えば、慢性消耗性疾患、るいそう、重症肝疾患（特に原発性胆汁性肝硬変）、胃切除、壊血病、吸収不良症候群（セリアック病を含む）、低リン血症、慢性腎疾患、特発性高Ca尿症、ヘモクロマトーシス、アミロイドーシス、肥満細胞腫、ナトリウム過剰摂取、カルシウム摂取不足またはビタミンD、A過剰症等〕、炎症性〔例えば、関節リウマチ、傍関節性（炎症性サイトカインによる骨吸収亢進）またはサルコイドーシス等〕、不動性（例えば、全身性、臥床安静、麻痺、局所性または骨折後等）、薬物性〔例えば、ステロイド（免疫抑制薬として炎症性疾患に広く用いられている。ステロイドで治療する疾患としては、例えば、膠原病、喘息、炎症性腸疾患、臓器移植等が挙げられる。骨喪失はこの療法の重篤な副作用である）、メトトレキサート、ヘパリン・ワーファリン、抗ケイレン薬、リチウムまたはタモキシフェン等〕、血液疾患〔例えば、多発性骨髄腫、リンパ腫、白血病、血友病または慢性溶血性疾患等〕、先天性（例えば、骨形成不全症、マルファン症候群、クラインフェルター症候群、先天性骨髄性ポルフィリアまたは嚢胞性線維症等）、その他の疾患によるもの〔例えば、慢性閉塞性肺疾患、肝疾患、腎疾患、関節リウマチ、妊娠、高酸素血症またはHIV感染症等〕が挙げられる。

[0209] また、本発明において、骨疾患には石灰化のプロセスのみが阻害されることによって引き起こされる骨疾患も含まれ、例えば、クル病等が挙げられる

。

[0210] 本発明の骨疾患治療用組成物は、骨疾患をもつ哺乳動物、好ましくは骨量、骨密度および／または骨強度の低下を伴う疾患をもつ哺乳動物に投与するとき、骨部に特異的に作用して骨量、骨密度および／または骨強度を増加させ、これによって、少なくとも海綿骨の増加、骨幹の肥厚および増殖等を可能にする。本発明の骨疾患治療用組成物は、骨部に特異的であるゆえに、その他の組織に副作用をほとんどまたはまったく引き起こさないという驚くべき利点を有している。

実施例

[0211] [実施例 1]

1-1. hFZD2-hFc_mの作製

ヒトFrizzled2細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒトIgG1Fcの変異体との融合蛋白質（以下、hFZD2-hFc_m）について、それぞれの細胞外領域蛋白質のアミノ酸長を変えたトランケート体とヒトIgG1Fcの変異体との融合蛋白質を作製した。

[0212] 具体的には、ヒトFrizzled2細胞外領域蛋白質のトランケート体に関して、配列番号1で表されるFrizzled2の細胞外領域蛋白質のN末の1位のアミノ酸から140, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 178, 184, 190, 197, 210, 216または222番目のいずれかのアミノ酸までを有する計31種のFrizzled2細胞外領域蛋白質のトランケート体を作成した。

[0213] 以降各アミノ酸長のヒトFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体とヒトIgG1Fcの変異体の融合蛋白質について、hFZD2(X)-hFc_mと表記し、()内にアミノ酸長を数字で記載することとする。

[0214] 配列番号1（ヒトFrizzled2の細胞外領域蛋白質のアミノ酸配列）

: QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRF
 FLCSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEDG
 APALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPRYATLEHPFHCPVRLKVPSYLSYKFLGERDCAAPCEPA
 RPDGSMFFSQEETFAR

[0215] 配列番号 2 (ヒト *F r i z z l e d 2* の細胞外領域蛋白質をコードする DNA のヌクレオチド配列) : CAGTTCCACGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGACCACGGCTTC
 TGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTGTGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTG
 GGCCACACGAACCAGGAGGACGCAGGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGC
 TCGCCCGAACTGCGCTTCTTCTGTGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATC
 CCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAGCGCGCGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTT
 CAGTGGCCCCGAGCGCCTGCGCTGCGAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAG
 AACCACTCCGAGGACGGAGCTCCCGCGCTACTCACCACCGCGCCGCCGGGACTGCAGCCGGGTGCC
 GGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGCGGGCGGGCGCTCCCCGCGCTACGCCACGCTGGAGCACCCCTTC
 CACTGCCCCGCGCTCCTCAAGGTGCCATCCTATCTCAGCTACAAGTTTCTGGGCGAGCGTGATTGTGCT
 GCGCCCTGCGAACCTGCGCGGCCCGATGGTTCCATGTTCTTCTCACAGGAGGAGACGCGTTTCGCGCGC

[0216] 配列番号 3 (ヒト *I g G 1 F c* の変異体のアミノ酸配列) : AEPRSSDKHTCPPC
 PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY
 TQKLSLSPGK

[0217] 配列番号 4 (ヒト *I g G 1 F c* の変異体をコードする DNA のヌクレオチド配列) : GCCGAGCCTAGGTCTTCAGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCG
 AGGGGGCCCCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTG
 AGGTACACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
 GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
 GCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCGCCGTCTCCAACAAAG
 CCCTCCCAGCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA
 CCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT

ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCCGGGTAATGA

[0218] 1-1-1. pLN1V5ベクターの構築

5'末端にBamHI・NheI・SalIサイトを3'末端にXhoIサイトを持つ(V5タグ+Stop codon)センスオリゴDNA(V5S)およびそれに対するアンチセンスオリゴDNA(V5AS)を合成した。

[0219] V5S : GATCCGCTAGCGTCGACGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCCTCGGTCTCGATTCTACGTGAC(配列番号5)

V5AS : TCGAGTCACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACCGTCGACGCTAGCG(配列番号6)

[0220] 上記合成オリゴDNAを、掛田らの報告[Gene Ther., 12, 852-856(2005)]に記載されたpLN1ベクター上のBamHI-XhoIサイトに導入し、pLN1V5ベクターを構築した。

[0221] 1-1-2. hFZD2(140)-hFc m DNA断片の合成

BHI-kozak-hFZD2-F: CGGGATCCACC ATGCGGCCCGCAGCGCCC(配列番号7)

hFc-NotI-Rv: ATAGTTTAGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACAGG(配列番号8)

[0222] Prime STAR HS DNA Polymerase(日本国タカラバイオ株式会社)を用い添付文書にしたがって反応液を調製し、50μl反応液中に配列番号7および8のプライマー各10pmol加え、鋳型としてhFZD2(140)-hFc m(配列番号9)を用い98℃1分保温した後、98℃10秒、62℃5秒、および72℃1分を1サイクルとして30サイクル増幅し、得られた1218bpの増幅断片を0.8%ゲルで分離回収した。回収されたゲルからQIAquick Gel Extraction Kit(日本国株式会社キアゲン)を用い添付文書にしたがって増幅断片を回収した。

CAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC
 AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG
 ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
 AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG
 AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

[0226] 配列番号 1 O : MRPRALPRLLLPLLLLPAAGPAQFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQ
 TIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFLCSEMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEA
 LMNKFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGNHSEDGAPALAEPRSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCAVSNKALPASIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEV
 ESNQGPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0227] 1-1-4. h F Z D 2 (X) - h F c m (X = 1 5 3 - 1 7 5 , 1 7 8
 , 1 8 4 , 1 9 0 , 1 9 7 , 2 1 0 , 2 1 6 , 2 2 2) D N A 断片の合成
 h F Z D 2 - t (1 5 3) - A v r i l l - R : CGCCTAGGCTCGGCGCCACCCGGGGTG
 CCC (配列番号 1 1)
 h F Z D 2 - t (1 5 4) - A v r i l l - R : CGCCTAGGCTCGGCCCCGGCACCCGGC
 TGC (配列番号 1 2)
 h F Z D 2 - t (1 5 5) - A v r i l l - R : CGCCTAGGCTCGGCGCCCCGGCACCC
 GGC (配列番号 1 3)
 h F Z D 2 - t (1 5 6) - A v r i l l - R : CGCCTAGGCTCGGCGGTGCCCCGGCA
 CCC (配列番号 1 4)
 h F Z D 2 - t (1 5 7) - A v r i l l - R : CGCCTAGGCTCGGCGGGGTGCCCCG
 GCA (配列番号 1 5)
 h F Z D 2 - t (1 5 8) - A v r i l l - R : CGCCTAGGCTCGGCACCCGGGGTGCCC
 CCG (配列番号 1 6)
 h F Z D 2 - t (1 5 9) - A v r i l l - R : CGCCTAGGCTCGGCGCCACCCGGGGTG
 CCC (配列番号 1 7)
 h F Z D 2 - t (1 6 0) - A v r i l l - R : CGCCTAGGCTCGGCGGGCCACCCGGG

GTG (配列番号18)

h F Z D 2 - t (1 6 1) - A v r l l - R : CGCCTAGGCTCGGCGCCCGGGCCACCC

GGG (配列番号19)

h F Z D 2 - t (1 6 2) - A v r l l - R : CGCCTAGGCTCGGCGCCCGGGCCA

CCC (配列番号20)

h F Z D 2 - t (1 6 3) - A v r l l - R : CGCCTAGGCTCGGCGCCCGGGCCG

CCA (配列番号21)

h F Z D 2 - t (1 6 4) - A v r l l - R : CGCCTAGGCTCGGCGCCCGGGCCC

GGG (配列番号22)

h F Z D 2 - t (1 6 5) - A v r l l - R : CGCCTAGGCTCGGCAGCGCCCGGGC

CCC (配列番号23)

h F Z D 2 - t (1 6 6) - A v r l l - R : CGCCTAGGCTCGGCGGGAGCGCCCG

CCG (配列番号24)

h F Z D 2 - t (1 6 7) - A v r l l - R : CGCCTAGGCTCGGCCGGGGAGCGCCG

CCG (配列番号25)

h F Z D 2 - t (1 6 8) - A v r l l - R : CGCCTAGGCTCGGCGCGGGGGAGCG

CCG (配列番号26)

h F Z D 2 - t (1 6 9) - A v r l l - R : CGCCTAGGCTCGGCGTAGCGGGGGA

GCG (配列番号27)

h F Z D 2 - t (1 7 0) - A v r l l - R : CGCCTAGGCTCGGCGGCGTAGCGGGG

GGA (配列番号28)

h F Z D 2 - t (1 7 1) - A v r l l - R : CGCCTAGGCTCGGCCGTGGCGTAGCGC

GGG (配列番号29)

h F Z D 2 - t (1 7 2) - A v r l l - R : CGCCTAGGCTCGGCCAGCGTGGCGTAG

CGC (配列番号30)

h F Z D 2 - t (1 7 3) - A v r l l - R : CGCCTAGGCTCGGCCTCCAGCGTGGCG

TAG (配列番号31)

h F Z D 2 - t (1 7 4) - A v r l l - R : CGCCTAGGCTCGGCGTGCTCCAGCGTG

CCGCCGGGCCGGCCAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCA
TCTCCATCCCGCTGTGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGA
ACCAGGAGGACGCAGGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCGAAC
TGCGCTTCTTCTGTGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCC
GCTCTATCTGTGAGCGCGCGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTTCAGTGGCCCG
AGCGCCTGCGCTGCGAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCG
AGGACGGAGCTCCCGCGCTACTCACCACCGCGCCGCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCC
CGGGTGGCCCGGGCGGGCGGGCGCTCCCCCGCGCTACGCCACGCTGGAGCACCCCTTCCACTGCCCGC
GCGTCCTCAAGGTGCCATCCTATCTCAGCTACAAGTTTCTGGGCGAGCGTGATTGTGCTGCGCCCTGCG
AACCTGCGCGGCCCGATGGTTCCATGTTCTTCTCACAGGAGGAGACGCGTTTTCGCGCGCTCTGGATCC
TCACCTGGTCGGTGTGTGCTGCGCTTCCACCTTCTTCACTGTCACCACGTACTIONGGTAGACATGCAGC
GCTTCCGCTACCCAGAGCGGCCTATCATTTTTCTGTGGGCTGCTACACCATGGTGTGGTGGCCTACA
TCGCGGGCTTCGTGCTCCAGGAGCGCGTGGTGTGCAACGAGCGCTTCTCCGAGGACGGTTACCGCACGG
TGGTGCAGGGCACCAAGAAGGAGGGCTGCACCATCCTCTTCATGATGCTCTACTTCTTCAGCATGGCCA
GCTCCATCTGGTGGGTCATCCTGTGCTCACCTGGTTCTTGGCAGCCGGCATGAAGTGGGGCCACGAGG
CCATCGAGGCCAACTCTCAGTACTTCCACCTGGCCGCTGGGCCGTGCCGGCCGTCAAGACCATCACCA
TCCTGGCCATGGGCCAGATCGACGGCGACCTGCTGAGCGGCGTGTGCTTCGTAGGCCTAACAGCCTGG
ACCCGCTGCGGGGCTTCGTGCTAGCGCCGCTCTTCGTGTACCTGTTTCATCGGCACGTCCTTCTCCTGG
CCGGCTTCGTGTGCTCTTCCGCATCCGCACCATCATGAAGCACGACGGCACCAAGACCGAAAAGCTGG
AGCGGCTCATGGTGGCATCGGCGTCTTCTCCGTGCTCTACACAGTGCCCGCCACCATCGTCATCGTT
GCTACTTCTACGAGCAGGCCTTCCGCGAGCACTGGGAGCGCTCGTGGGTGAGCCAGCACTGCAAGAGCC
TGGCCATCCCGTGCCCGGCGCACTACACGCCGCGCATGTGCGCCGACTTCACGGTCTACATGATCAAAT
ACCTCATGACGCTCATCGTGGGCATCACGTGGGCTTCTGGATCTGGTGGGCAAGACGCTGCACTCGT
GGAGGAAGTTCTACACTCGCCTCACCAACAGCCGACACGGTGAGACCACCGTGTGA

[0230] 1-1-5. h F Z D 2 (X) - h F c m , (X = 1 5 3 - 1 7 5 , 1 7 8 ,
1 8 4 , 1 9 0 , 1 9 7 , 2 1 0 , 2 1 6 , 2 2 2) 組換え体発現ベクター
の構築

実施例 1 - 1 - 4 で回収された各 P C R 増幅断片を B a m H I および A v

r l l (日本国ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)で酵素消化し、0.8%アガロースゲルで分離回収した。回収されたゲルから Q l A q u i c k G e l E x t r a c t i o n E x t r a c t i o n K i t (日本国株式会社キアゲン)を用い添付文書にしたがって酵素処理断片を回収した。1-1-3で作製された h F Z D 2 (1 4 0) - h F c m 組換え体発現ベクターを B a m H I および A v r I I にて制限酵素処理して得られるベクターを用意し、上記酵素処理断片をその B a m H I ・ A v r I I サイトに導入し、組換え体発現ベクター (図2) を構築した。

[0231] 以下に h F Z D 2 (X) - h F c m 組換え体の c D N A の開始コドンから終止コドンまでのポリヌクレオチド配列 (1 2 3 0 b p - 1 4 3 7 b p 、配列番号 4 2 - 7 1) および該 c D N A がコードする h F Z D 2 (X) - h F c m のシグナル配列を含んだアミノ酸配列 (4 0 9 アミノ酸 - 4 7 8 アミノ酸、配列番号 7 2 - 1 0 1) を示す。

[0232] 尚、ポリヌクレオチド配列中で、N末端より69塩基まではシグナル配列部分を、大文字は h F Z D 2 細胞外領域のトランケート体を、小文字はヒト I g G 1 F c 変異体部分を表す。またアミノ酸配列中で、C末より233アミノ酸までがヒト I g G 1 F c 変異体部分を、それよりN末側は h F Z D 2 細胞外領域蛋白質のトランケート体を表す。なお、アミノ酸配列中にはシグナル配列は記載していない。

[0233] 配列番号 4 2 [h F Z D 2 (1 5 3) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCGCGGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCCGGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCCGCCAGAACCCTCCGAGGACGGAGCTCCC

GCGCTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCgccgagcctaggtcttcagacaaa
 actcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgagggggccccgtcagtccttcttccccca
 aaaccaaggacaccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccac
 gaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccg
 cgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
 aatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctcc
 aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaag
 aaccaggtcagcctgacctgacctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagc
 aatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctc
 tacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcat
 gaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

[0234] 配列番号43 [h F Z D 2 (154) - h F c mのポリヌクレオチド配列
] :

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCCGGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCGAACGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCCGGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCCGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGCTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGgccgagcctaggtcttcagac
 aaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgagggggccccgtcagtccttcttcccc
 ccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagc
 cacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag
 ccgccccgaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgg
 ctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatc
 tccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgacc
 aagaaccaggtcagcctgacctgacctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggag

agcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttc
 ctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatg
 catgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaataga

[0235] 配列番号 44 [h F Z D 2 (155) - h F c m のポリヌクレオチド配列]
] :

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCGCCGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCCGGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGCTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGGCGccgagcctaggtcttca
 gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgagggggccccgtcagtcttctcttc
 cccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtg
 agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca
 aagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggac
 tggctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaacc
 atctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctg
 accaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgg
 gagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttc
 ttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtg
 atgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaataga

[0236] 配列番号 45 [h F Z D 2 (156) - h F c m のポリヌクレオチド配列]
 :

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCGCCGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA

GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCC GAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGGCACCgccgagcctaggtct
 tcagacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgagggggccccgtcagttctctc
 tttcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgctgtggtggtggac
 gtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaa
 acaaagccgcgaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaa
 accatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatccccgggatgag
 ctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgacctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctcc
 ttcttctctacagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc
 gtgatgcatgaggtctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcccgtctccgggtaaatga

[0237] 配列番号 46 [h F Z D 2 (1 5 7) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCGCCGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCC GAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGGCACCCCGgccgagcctagg
 tcttcagacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgagggggccccgtcagttctc
 ctctttcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgctgtggtggtg
 gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc

aagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac
 caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaacaaagccctcccagcctccatcgag
 aaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccccggat
 gagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtg
 gagtgggagagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgccctcccgtgctggactccgacggc
 tccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc
 tccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcccgtgtctccgggtaaata

[0238] 配列番号47 [h F Z D 2 (1 5 8) - h F c m のポリヌクレオチド配列
] :

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCCGGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTAGTGGCCGAGCGCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCCGGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGCTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTgcccagacct
 aggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcactgaagccgagggggccccgtcagtc
 ttctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtg
 gtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataat
 gccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctg
 caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaacaaagccctcccagcctccatc
 gagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccccg
 gatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
 gtggagtgggagagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgccctcccgtgctggactccgac
 ggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctca
 tgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcccgtgtctccgggtaa
 tga

[0239] 配列番号 48 [h F Z D 2 (1 5 9) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCGCGCCGGGCGCGCC
CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTG
TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
CGCGCGCGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
GAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
GCGCTACTCACCACCGCGCCGCGCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGGCACCCCGGGTGGCgcccag
cctaggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacc tgaagccgagggggccccgtca
gtcttctcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcggtg
gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcat
aatgccaagacaaaagccgcgaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtc
ctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaacaaagccctcccagcctcc
atcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcc
cgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatc
gccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc
gacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttc
tcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcccgtgctccgggt
aaatga

[0240] 配列番号 49 [h F Z D 2 (1 6 0) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCGCGCCGGGCGCGCC
CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTG
TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG

CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCC GCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGCC
 gagcctaggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacc tgaagccgagggggcccg
 tcagtcttctcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgc
 gtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtg
 cataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacc
 gtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaacaaagccctcccagcc
 tccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccca
 tcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgacctggtcaaaggcttctatcccagcgcac
 atcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggac
 tccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtc
 ttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccg
 ggtaaataga

[0241] 配列番号 50 [h F Z D 2 (1 6 1) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCGAGCGCCCTGCCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCGGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCC GCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
 gccgagcctaggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacc tgaagccgagggggcc
 ccgtcagtcttctcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcaca
 tgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggag
 gtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc

accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaacaagccctccca
 gcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccc
 ccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggctcagcctgacctgacctgggtcaaaggcttctatcccagc
 gacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctg
 gactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaac
 gtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtct
 ccgggtaaatga

[0242] 配列番号 5 1 [h F Z D 2 (1 6 2) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCGGGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCCGGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCCGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGCTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
 GGCgcccagcctaggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcaccgaagccgagggg
 gccccgtcagctcttctcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtc
 acatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtg
 gaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtc
 ctaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaacaagccctc
 ccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctg
 cccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggctcagcctgacctgacctgggtcaaaggcttctatccc
 agcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtg
 ctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
 aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctg
 tctccgggtaaatga

[0243] 配列番号 5 2 [h F Z D 2 (1 6 3) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCGCGCCGGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGCTACTCACCACCGCGCCGCGCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
 GCGGGCgcccagcctaggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgag
 ggggccccgtcagctcttctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgag
 gtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagtcaactggtacgtggacggc
 gtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagc
 gtctcaccgtctctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaacaagcc
 ctcccagcctccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacc
 ctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcttggtcaaaggttctat
 cccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccc
 gtgctggactccgacggctcttcttctcttacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcag
 gggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcc
 ctgtctccgggtaaatga

[0244] 配列番号 5 3 [h F Z D 2 (1 6 4) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCGCGCCGGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG

CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCC CGGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGGCACCCCGGTGGCCCGGGC
 GGCGGCGGCgcccagcctaggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagcc
 gagggggccccgtcagtccttctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccgaccct
 gaggtcacatgcggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtc
 agcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaacaaa
 gccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtac
 acctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgccctggtcaaaggcttc
 tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcct
 cccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcag
 caggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctc
 tccctgtctccgggtaaatga

[0245] 配列番号54 [h F Z D 2 (1 6 5) - h F c mのポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCCGCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCCGGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGTGCCCCGAACGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCC CGGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGGCACCCCGGTGGCCCGGGC
 GGCGGCGGCgcccagcctaggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaa
 gccgagggggccccgtcagtccttctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccgacc
 cctgaggtcacatgcggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtg
 gacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtg

gtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaac
 aaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtg
 tacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcttggtcaaaggc
 ttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccag
 cctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtgg
 cagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc
 ctctccctgtctccgggtaaata

[0246] 配列番号 55 [h F Z D 2 (1 6 6) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCCGGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCCGCCAGAACCCTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGCTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
 GCGGGCGGGCTCCCgcccagcctaggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacct
 gaagccgagggggccccgtcagctcttctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccgg
 acccctgaggtcacatgcgtgggtggaggctgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtac
 gtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgt
 gtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtctcc
 aacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag
 gtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcttggtcaaa
 ggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacc
 acgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagg
 tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaag
 agcctctccctgtctccgggtaaata

[0247] 配列番号 56 [h F Z D 2 (1 6 7) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCGCGCCGGGCCGGCC
CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTG
TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
CGCGCGCGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
GAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
GCGCTACTCACCACCGCGCCGCGCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
GGCGGCGGGCTCCCCCGccgagcctaggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagca
cctgaagccgagggggccccgtcagcttctcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctcc
cggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactgg
tacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtac
cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaaaggcaaggagtacaagtgcgcccgtc
tccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaacca
caggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtc
aaaggcttctatcccagcagacatgcccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaag
accacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagc
aggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcag
aagagcctctccctgtctccgggtaaatga

[0248] 配列番号 57 [h F Z D 2 (1 6 8) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCGCGCCGGGCCGGCC
CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTG
TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG

CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCC CGGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
 GGCGGCGGCGCTCCCCCGCGCgccgagcctaggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccgtgcca
 gcacctgaagccgagggggccccgtcagttcttcttccccccaaaaccaaggacacctcatgatc
 tcccggacccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaac
 tggtagctggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaaagccgcgaggaggagcagtacaacagcacg
 taccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaaaggcaaggagtacaagtgcgcc
 gtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaa
 ccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctg
 gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactac
 aagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctcttcttctctacagcaagctcaccgtggacaag
 agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacag
 cagaagagcctctccctgtctccgggtaaata

[0249] 配列番号 58 [h F Z D 2 (169) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCGAGCGCCCTGCCCCGCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCGGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGTGCCCCAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCC CGGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
 GGCGGCGGCGCTCCCCCGCGCTACgccgagcctaggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccgtgc
 ccagcacctgaagccgagggggccccgtcagttcttcttccccccaaaaccaaggacacctcatg
 atctcccggacccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttc
 aactggtagctggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaaagccgcgaggaggagcagtacaacagc

acgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgc
gccgtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccga
gaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgc
ctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaac
tacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggac
aagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactac
acgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaata

[0250] 配列番号 59 [h F Z D 2 (1 7 0) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCGGGCGCCGGCC
CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCATCTCCATCCCGCTG
TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
CGCGCGCGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCTGCGCTGC
GAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCCGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
GCGCTACTCACCACCGCGCCGCGCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
GGCGGCGGCGCTCCCCCGCGCTACGCCgccgagcctaggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccg
tgccagcacctgaagccgagggggcccgtcagctcttctcttcccccaaaaaccaaggacaccctc
atgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaag
ttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaac
agcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaag
tgcgccgtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccc
cgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacc
tgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaac
aactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtg
gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccac
tacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaata

[0251] 配列番号 60 [h F Z D 2 (1 7 1) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCGCGCCGGGCCGGCC
CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTG
TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCGAGCGCCTGCGCTGC
GAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
GCGCTACTCACCACCGCGCCGCGCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
GGCGGGCGGCGCTCCCCCGCGCTACGCCACGgcccagacctaggtcttcagacaaaactcacacatgccc
ccgtgcccagcacctgaagccgagggggccccgtcagctctcctcttcccccaaaaaccaaggacacc
ctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtc
aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtac
aacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtac
aagtgcgccgtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaagccaaagggcag
ccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctg
acctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggag
aacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacc
gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaac
cactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaata

[0252] 配列番号 61 [h F Z D 2 (1 7 2) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCGCGCCGGGCCGGCC
CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTG
TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG

CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCC CGGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
 GGCGGCGGCGCTCCCCCGCTACGCCACGCTGgcccagcctaggtcttcagacaaaactcacacatgc
 ccaccgtgccagcacctgaagccgagggggccccgtcagctctcctcttcccccaaaaccaaggac
 accctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgag
 gtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcag
 tacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggag
 tacaagtgcgccgtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaagccaaaggg
 cagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagc
 ctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg
 gagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctc
 accgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgca
 aaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

[0253] 配列番号 62 [h F Z D 2 (1 7 3) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCCGCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCGCCGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCC CGGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
 GGCGGCGGCGCTCCCCCGCTACGCCACGCTGGAGgcccagcctaggtcttcagacaaaactcacaca
 tggccaccgtgccagcacctgaagccgagggggccccgtcagctctcctcttcccccaaaaccaag
 gacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccct
 gagggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggag

cagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaag
gagtacaagtgcgccgtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaa
gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtc
agcctgacctgacctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcag
ccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaag
ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctg
cacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

[0254] 配列番号 63 [h F Z D 2 (1 7 4) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCGGCCGGCCGGCC
CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCATCTCCATCCCGCTG
TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCTGCGCTGC
GAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
GCGCTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
GGCGGCGGCGCTCCCCCGCGCTACGCCACGCTGGAGCACgccgagcctaggtcttcagacaaaactcac
acatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgagggggccccgtcagtccttctcttccccccaaaacc
aaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagac
cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggag
gagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggc
aaggagtacaagtgcgccgtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagcc
aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccag
gtcagcctgacctgacctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggg
cagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagc
aagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggct
ctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

[0255] 配列番号 64 [h F Z D 2 (1 7 5) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCGCGCCGGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGCTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
 GCGGGCGGGCTCCCCCGCTACGCCACGCTGGAGCACCCCgccgagcctaggtcttcagacaaaact
 cacacatgcccaccgtgcccagcaccgaagccgagggggccccgtagtcttcctcttcccccaaaa
 cccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaa
 gaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgataatgccaagacaaagccgagg
 gaggagcagtacaacagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaat
 ggcaaggagtacaagtgccgctctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaa
 gccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaac
 caggtcagcctgacctgacctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaat
 gggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctac
 agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgag
 gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

[0256] 配列番号 65 [h F Z D 2 (1 7 8) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCGCGCCGGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG

CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGGCACCCCGGTGGCCCGGGC
 GGCGGCGGCGCTCCCCCGCGCTACGCCACGCTGGAGCACCCCTTCCACTGCGccgagcctaggtcttca
 gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacc tgaagccgagggggccccgtcagtcttctcttc
 cccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcggtggtggacgtg
 agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca
 aagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggac
 tggctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaacc
 atctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctg
 accaagaaccaggtcagcctgacctgacctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtg
 gagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttc
 ttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtg
 atgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaata

[0257] 配列番号 66 [h F Z D 2 (1 8 4) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCCGCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCCTGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGGCACCCCGGTGGCCCGGGC
 GGCGGCGGCGCTCCCCCGCGCTACGCCACGCTGGAGCACCCCTTCCACTGCCCGCGCTCCTCAAGGTG
 gccgagcctaggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacc tgaagccgagggggcc
 ccgtcagtcttctcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcaca
 tgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggag

gtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc
accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaacaaagccctccca
gcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccc
ccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggctagcctgacctgacctggtcaaaggcttctatcccagc
gacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctg
gactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaac
gtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtct
ccgggtaaata

[0258] 配列番号 67 [h F Z D 2 (1 9 0) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCGGGGCCGGCC
CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCATCTCCATCCCGCTG
TGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCTGCGCTGC
GAGCACTTCCCGGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
GCGCTACTCACCACCGCGCCGCGCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
GGCGGCGGCGCTCCCCCGCTACGCCACGCTGGAGCACCCCTTCCACTGCCCGCGCTCCTCAAGGTG
CCATCCTATCTCAGCTACgcccagccttaggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagca
cctgaagccgagggggccccgtcagctcttctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctcc
cggacccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactgg
tacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtac
cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtc
tccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaacca
caggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggctagcctgacctgacctggtc
aaaggcttctatcccagcagacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaag
accacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagc

agggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcag
 aagagcctctccctgtctccgggtaaatga

[0259] 配列番号 68 [h F Z D 2 (1 9 7) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCGCCGGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGCTCCC
 GCGCTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
 GCGGGCGGGCTCCCCCGCTACGCCACGCTGGAGCACCCCTTCCACTGCCCGCGCTCCTCAAGGTG
 CCATCCTATCTCAGCTACAAGTTTCTGGGCGAGCGTGATgccgagcctaggtcttcagacaaaactcac
 acatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgagggggcccgcagtccttcttccccccaaaacc
 aaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagac
 cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggag
 gagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggc
 aaggagtacaagtgcgccgtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagcc
 aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccag
 gtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggg
 cagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagc
 aagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggct
 ctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

[0260] 配列番号 69 [h F Z D 2 (2 1 0) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCGCCGGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCCATCTCCATCCCGCTG

TGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCC GAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGTCCC
 GCGCTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
 GCGGGCGGGCTCCCCCGCTACGCCACGCTGGAGCACCCCTTCCACTGCCCGCGCTCCTCAAGGTG
 CCATCCTATCTCAGCTACAAGTTTCTGGGCGAGCGTGATTGTGCTGCGCCCTGCGAACCTGCGCGGCC
 GATGGTTCCgcccagcctaggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagcc
 gagggggccccgtcagtccttctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccgaccct
 gaggtcacatgcggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagtcaactggtacgtggac
 ggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtc
 agcgtctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaacaaa
 gccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtac
 acctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgccctggtcaaaggttc
 tatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcct
 cccgtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcag
 caggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctc
 tccctgtctccgggtaaata

[0261] 配列番号 70 [h F Z D 2 (2 1 6) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGCCCCGCAGCGCCCTGCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCGCGGGCCGGCC
 CAGTTCCACGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCC GAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTCGGTTTTTCAGTGGCCCAGCGCCTGCGCTGC
 GAGCACTTCCCGCGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCGGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGTCCC

GCGCTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
 GGCGGCGGGCTCCCCCGCTACGCCACGCTGGAGCACCCCTTCCACTGCCCGCGCTCCTCAAGGTG
 CCATCCTATCTCAGCTACAAGTTTCTGGGCGAGCGTGATTGTGCTGCGCCCTGCGAACCTGCGCGGCC
 GATGGTTCCATGTTCTTCTCACAGGAGgccgagcctaggtcttcagacaaaactcacacatgcccaccg
 tggccagcacctgaagccgagggggccccgtcagtccttccctcttcccccaaaaaccaaggacaccctc
 atgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaag
 ttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaac
 agcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaag
 tgcgccgtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccc
 cgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacc
 tgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaac
 aactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttccctctacagcaagctcaccgtg
 gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccac
 tacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaata

[0262] 配列番号 7 1 [h F Z D 2 (2 2 2) - h F c m のポリヌクレオチド配列]

:

ATGCGGCCCCGCAGCGCCCTGCCCGCCTGCTGCTGCCGCTGCTGCTGCTGCCCGCCGGGCGGGC
 CAGTTCCACGGGAGAAGGGCATCTCCATCCCGGACCACGGCTTCTGCCAGCCATCTCCATCCCGCTG
 TGCACGGACATCGCCTACAACCAGACCATCATGCCAACCTTCTGGGCCACACGAACCAGGAGGACGCA
 GGCCTAGAGGTGCACCAGTTCTATCCGCTGGTGAAGGTGCAGTGCTCGCCGAACTGCGCTTCTTCCTG
 TGCTCCATGTACGCACCCGTGTGCACCGTGTGGAACAGGCCATCCCGCCGTGCCGCTCTATCTGTGAG
 CGCGCGGCCAGGGCTGCGAAGCCCTCATGAACAAGTTTCGGTTTTTCAGTGGCCCGAGCGCTGCGTGC
 GAGCACTTCCCGGCCACGGCGCCGAGCAGATCTGCGTCCGCCAGAACCACTCCGAGGACGGAGTCCC
 GCGCTACTCACCACCGCGCCGCCCGGGACTGCAGCCGGGTGCCGGGGGCACCCCGGGTGGCCCGGGC
 GGCGGCGGGCTCCCCCGCTACGCCACGCTGGAGCACCCCTTCCACTGCCCGCGCTCCTCAAGGTG
 CCATCCTATCTCAGCTACAAGTTTCTGGGCGAGCGTGATTGTGCTGCGCCCTGCGAACCTGCGCGGCC
 GATGGTTCCATGTTCTTCTCACAGGAGGAGACGCGTTTTCCGCGCGgccgagcctaggtcttcagacaaa
 actcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgagggggccccgtcagtccttccctcttccccca

aaaccaaggacacctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgcggtggtggacgtgagccac
gaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccg
cgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg
aatggcaaggagtacaagtgcgccgtctccaacaaagccctcccagcctccatcgagaaaaccatctcc
aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaag
aaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagc
aatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctc
tacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcat
gaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaata

[0263] 配列番号 7 2 [h F Z D 2 (1 5 3) - h F c m のアミノ酸配列] : QFHGEKG
ISIPDHGFCQPISIP LCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSP ELRFFLCSMYAPV
CTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSE DGAPALLTTAP
PPGLQPGAAEPRSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPASIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV D
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0264] 配列番号 7 3 [h F Z D 2 (1 5 4) - h F c m のアミノ酸配列] :
QFHGEKGISIPDHGFCQPISIP LCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSP ELRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSE DGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGA EPRSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV S
HEDPEVKFNWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPASIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0265] 配列番号 7 4 [h F Z D 2 (1 5 5) - h F c m のアミノ酸配列] :
QFHGEKGISIPDHGFCQPISIP LCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSP ELRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSE DGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGA EPRSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPASIEKT

ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0266] 配列番号 75 [h F Z D 2 (1 5 6) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEEDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTAEPSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPASIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0267] 配列番号 76 [h F Z D 2 (1 5 7) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEEDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPAEPSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPASIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0268] 配列番号 77 [h F Z D 2 (1 5 8) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEEDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGAEPSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPASI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0269] 配列番号 78 [h F Z D 2 (1 5 9) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPELRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEEDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGAEPSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAS

IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0270] 配列番号 79 [h F Z D 2 (1 6 0) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEEDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPAEPRSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPA
SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0271] 配列番号 80 [h F Z D 2 (1 6 1) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEEDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPAEPRSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALP
ASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0272] 配列番号 81 [h F Z D 2 (1 6 2) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEEDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGAEPSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKAL
PASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0273] 配列番号 82 [h F Z D 2 (1 6 3) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEEDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGAEPSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKA

LPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0274] 配列番号 83 [h F Z D 2 (1 6 4) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEGDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAEPSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNK
ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0275] 配列番号 84 [h F Z D 2 (1 6 5) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEGDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAAEPSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSN
KALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0276] 配列番号 85 [h F Z D 2 (1 6 6) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEGDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPAEPRSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVS
NKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0277] 配列番号 86 [h F Z D 2 (1 6 7) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEGDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPAEPSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV

SNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0278] 配列番号 87 [h F Z D 2 (1 6 8) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEGDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPRAEPRSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCA
VSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0279] 配列番号 88 [h F Z D 2 (1 6 9) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEGDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPRYAEPRSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
AVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0280] 配列番号 89 [h F Z D 2 (1 7 0) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEGDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPRYAAEPRSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CAVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0281] 配列番号 90 [h F Z D 2 (1 7 1) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEGDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPRYATAEPRSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY

KCAVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0282] 配列番号 9 1 [h F Z D 2 (1 7 2) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
 CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEEDGAP
 ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPRYATLAEPRSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCAVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0283] 配列番号 9 2 [h F Z D 2 (1 7 3) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
 CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEEDGAP
 ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPRYATLEAEPSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK
 DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCAVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0284] 配列番号 9 3 [h F Z D 2 (1 7 4) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
 CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEEDGAP
 ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPRYATLEHAEPSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCAVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0285] 配列番号 9 4 [h F Z D 2 (1 7 5) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
 CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEEDGAP
 ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPRYATLEHPAEPSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPK
 PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN

GKEYKCAVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0286] 配列番号 95 [h F Z D 2 (1 7 8) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEGDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPRYATLEHPFHCAEPRSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCAVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0287] 配列番号 96 [h F Z D 2 (1 8 4) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEGDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPRYATLEHPFHCPVRLKVAEPRSSDKTHTCPPCPAPEAEGA
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNKEYKCAVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

[0288] 配列番号 97 [h F Z D 2 (1 9 0) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEGDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPRYATLEHPFHCPVRLKVPSYLSYAEPRSSDKTHTCPPCPA
PEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNKEYKCAVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0289] 配列番号 98 [h F Z D 2 (1 9 7) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEGDGAP

ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPRYATLEHPFHCPRVLKVPSYLSYKFLGERDAEPRSSDKTH
TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

[0290] 配列番号 99 [h F Z D 2 (2 1 0) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPRYATLEHPFHCPRVLKVPSYLSYKFLGERDCAAPCEPARP
DGSAPRSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0291] 配列番号 100 [h F Z D 2 (2 1 6) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPRYATLEHPFHCPRVLKVPSYLSYKFLGERDCAAPCEPARP
DGSMMFSQEAERSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPASIEKTISKAKGQ
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0292] 配列番号 101 [h F Z D 2 (2 2 2) - h F c m のアミノ酸配列] :

QFHGEKGISIPDHGFCQPISIPLCTDIAYNQTIMPNLLGHTNQEDAGLEVHQFYPLVKVQCSPFLRFFL
CSMYAPVCTVLEQAIPPCRSICERARQGCEALMNKFGFQWPERLRCEHFPRHGAEQICVGQNHSEDGAP
ALLTTAPPPGLQPGAGGTPGGPGGGGAPPRYATLEHPFHCPRVLKVPSYLSYKFLGERDCAAPCEPARP
DGSMMFSQEETFARAERSSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPASIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFL

YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

[0293] [実施例 2]

2-1. hFZD2 (X) - hFc_m組換え体発現ベクターを用いた配列番号 72-101 の hFZD2 (X) - hFc_mの一過的発現 (X = 140, 153-175, 178, 184, 190, 197, 210, 216, 222)

[0294] 2-1-1. 遺伝子導入用発現ベクター調製

実施例 1-1-3 および 1-1-5 で取得された hFZD2 (X) - hFc_m組換え体発現ベクターを大腸菌 DH5 α に導入し、得られた形質転換体より DNA をプラスミド精製キット (Qiagen plasmid Maxi kit、日本国株式会社キアゲン) を用い調製した。

[0295] 2-1-2. 培養細胞へのベクター導入と分泌発現

Free style 293F 細胞 (日本国インビトロジェン株式会社) を Free style 293 Expression Medium (日本国インビトロジェン株式会社) を用い、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、125 rpm 条件下、細胞密度が 2×10^5 から 3×10^6 cells/mL の範囲内で培養した。培地 1 L を用いて培養した場合、発現ベクター 1 mg に 35 mL の Opti-MEM 1 Reduced Serum Medium (日本国インビトロジェン株式会社) を加えた溶液、および 1.3 mL の 293fectin Transfection Reagent (日本国インビトロジェン株式会社) に 33.7 mL の Opti-MEM 1 Reduced Serum Medium を加えた溶液をそれぞれ調製し、5 分間室温でインキュベートした。インキュベート後この 2 液を混合し、更に約 25 分間室温でインキュベートした。その後、 1×10^9 cells/L の Free style 293F 細胞を含む培地に前記方法で処理された発現ベクターを添加し、3 日間培養した。

[0296] 2-1-3. 培養上清の分泌解析

hFZD2 細胞外領域蛋白質のトランケート体と hFc 変異体との融合蛋

白質の濃度をELISA法によって測定するため、実施例2-1-2で得られた2日目の培養液の上清を一部回収した。Anti-Human IgG (γ -Chain Specific, SIGMA社、商品番号: I3382) を固定化した96wellプレート(コーニング社、Maxi Soap) に評価サンプルないしは標準液[社内精製hFZD2(140)-hFcm組換え体] を加え、室温1時間インキュベートを行った後に、TPBS(-) で3回洗浄操作を行い、ペルオキシダーゼ標識抗体Anti-Human IgG (Fc fragment) Peroxidase conjugate developed in Goat (SIGMA社、商品番号: A0170) を添加し室温で1時間インキュベートを行った。

[0297] その後、TPBS(-) で4回洗浄操作を行った後、スミロン ペルオキシダーゼ発色キット(住友ベークライト株式会社、商品番号: ML-1120T) を用いて発色させ、450nmの吸光度を測定することで培養上清中濃度の測定を行った。

[0298] その結果、hFZD2(140)-hFcmの培養上清中濃度は467.3 \pm 3.1 ng/mLであった。これに対し、hFZD2(153)-hFcmからhFZD2(175)-hFcmの培養上清中濃度は、それぞれ1207.4 \pm 13.8、1153.7 \pm 17.3、1166.5 \pm 43.9、1153.7 \pm 0.0、1194.5 \pm 108.7、1567.9 \pm 46.6、1449.2 \pm 83.1、1707.5 \pm 150.7、1664.5 \pm 130.7、1719.3 \pm 167.4、1921.5 \pm 135.3、1727.8 \pm 206.8、1473.5 \pm 48.7、1076.7 \pm 72.6、1919.1 \pm 81.1、2324.0 \pm 206.4、1698.4 \pm 231.1、1768.4 \pm 166.8、1771.6 \pm 127.5、1987.1 \pm 142.5、1433.0 \pm 93.4、1369.4 \pm 98.5、915.3 \pm 48.5 ng/mLであり、また、hFZD2(178)-hFcm、hFZD2(184)-hFcm、hFZD2(190)-hFcm、hFZD2(197)-hFcm、hFZD2(210)-hFcm

およびhFZD2(216)-hFcmの培養上清中濃度は、それぞれ1370.1±44.6、258.1±58.6、75.3±5.3、115.6±45.2、80.2±5.2、93.2±4.8 ng/mLと、hFZD2(153)-hFcmからhFZD2(175)-hFcmは培養上清中に高濃度であった。

[0299] 図3に、hFZD2(140)-hFcm、hFZD2(153)-hFcmからhFZD2(175)-hFcm、hFZD2(178)-hFcm、hFZD2(184)-hFcm、hFZD2(190)-hFcm、hFZD2(197)-hFcm、hFZD2(210)-hFcm、およびhFZD2(216)-hFcmの培養上清中における濃度のグラフを示す。

[0300] 図3に示すように、hFZD2-hFcm組換え体は細胞外領域蛋白質のアミノ酸長を153に伸ばすことで分泌が向上し、分泌向上は175まで維持されることが示唆された。

[0301] 2-2. hFZD2(X)-hFcm組換え体の精製・調製

2-2-1. 培養上清前処理

実施例2-1-2で得られた培養液の上清を回収し、0.22 μmフィルター(0.22 μm GP Express Membrane 500 mL、日本国日本ミリポア株式会社)で濾過処理を行った後4℃で冷却した。

[0302] 2-2-2. Antibody Affinityクロマトグラフィー

用いた酸性buffer(pH2.7)の組成はホウ酸(ナカライテスク株式会社、MW:61.83)を1.24 g、リン酸水素二ナトリウム・12水(和光純薬工業株式会社、MW:358.14)を7.16 g、クエン酸一水和物(ナカライテスク株式会社、MW:210.14)を4.20 g、塩化ナトリウム(ナカライテスク株式会社、MW:58.44)8.77 gをミリQ水に溶かし、1 N塩酸(和光純薬工業株式会社の12 N塩酸をミリQ水で12倍希釈した溶液)を15.55 mL添加し、ミリQ水で1 Lとしたものである。

[0303] 用いた中性buffer (pH7.3)の組成はホウ酸(ナカライテスク株式会社、MW:61.83)を1.24g、リン酸水素二ナトリウム・12水(和光純薬工業株式会社、MW:358.14)を7.16g、クエン酸一水和物(ナカライテスク株式会社、MW:210.14)を4.20g、塩化ナトリウム(ナカライテスク株式会社、MW:58.44)8.77gをミリQ水に溶かし、5M水酸化ナトリウム溶液(和光純薬工業株式会社の水酸化ナトリウム MW:40.00を10g、ミリQ水で溶かし、50mlにした溶液)を11.7ml添加し、ミリQ水で1Lとしたものである。

[0304] 中和bufferの組成はリン酸二水素ナトリウム・二水和物(関東化学株式会社、MW:156.01)を13.1gとリン酸水素二ナトリウム・12水(和光純薬工業株式会社、MW:358.14)41.5g、塩化ナトリウム(ナカライテスク株式会社、MW:58.44)8.77gをミリQ水に溶かし、1Lとしたものである。

[0305] 前処理された培養上清を中性buffer (pH7.3)で平衡化されたProteinAカラム(Hi Trap ProteinA HP 5ml; 日本国GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社)にアプライした。その後、中性buffer (pH7.3)25ml以上でカラムを洗浄し、次にD-PBS(-)(ナカライテスク株式会社)にNaClを添加しNaCl濃度を1.85Mに調製した緩衝液で25mL以上洗浄し、再度25ml中性buffer (pH7.3)でカラムを洗浄した。

[0306] その後、55%酸性buffer (pH2.7)でカラムを10ml洗浄した。洗浄操作終了後、カラムに酸性buffer (pH2.7)を55%から95%のグラジエントで70ml添加し目的蛋白質を回収した。上記分離精製操作にはAKTAexplorer10sまたはAKTApurifier(日本国GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社)を用いた。使用前にエンドトキシン除去処理を行った。

[0307] 2-2-3. 精製標品調製

実施例 2-2-2 で得られた精製標品中の *buffer* を限外濾過膜 V I V A S P I N 2 0 1 0, 0 0 0 M W C O P E S (日本国ザルトリウス・ステディム・ジャパン株式会社) を用いてサンプルを濃縮した。その後、N A P C o l u m n s (日本国GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社) を用いて D - P B S (-) (ナカライテスク株式会社) に置換した。濃縮置換操作終了後 0. 2 2 μ m フィルター (M i l l e x G V、日本国日本ミリポア株式会社) により濾過処理を行った。

[0308] 蛋白質濃度は A 2 8 0 n m を測定し、比吸光係数より算出した。比吸光係数は次のとおりである。h F Z D 2 (1 4 0) - h F c m は E 1 % 1 c m = 9. 7、h F Z D 2 (1 5 9) - h F c m は E 1 % 1 c m = 9. 4、h F Z D 2 (1 6 5) - h F c m は E 1 % 1 c m = 9. 3、h F Z D 2 (1 7 1) - h F c m は E 1 % 1 c m = 9. 4、h F Z D 2 (1 7 5) - h F c m は E 1 % 1 c m = 9. 5

[0309] 2-3. h F Z D 2 (X) - h F c m 組換え体投与マウスの解析 (X = 1 4 0, 1 5 9, 1 6 5, 1 7 1, 1 7 5)

2-3-1. マウスへの投与

h F Z D 2 (X) - h F c m 組換え体による骨組織に対する生理作用を評価する目的で、マウスへの投与実験を行った。h F Z D 2 (X) - h F c m 組換え体は、マウス (C 5 7 B 6) (日本チャールス・リバー) に投与した。h F Z D 2 (X) - h F c m 組換え体投与群には、h F Z D 2 (X) - h F c m 組換え体を蛋白濃度 0. 1 m g / m L となるように P B S で調製し、各個体に 1 0 m L / k g ずつ、1 0 日に 1 回の頻度で計 3 回、尾静脈内に投与した。

[0310] また、骨組織変化を比較するコントロール群として、P B S を投与する群を設定した。初回投与日を D a y 0 とし、D a y 2 0 まで 1 0 日おきに計 3 回の尾静脈投与を実施した後、D a y 3 0 にマウスを剖検に供した。

[0311] 2-3-2. 骨構造解析 (3 次元マイクロフォーカス X 線 C T)

剖検において、左大腿骨を採取し、高分解能マイクロフォーカス X 線 C T

スキャナー（マイクロCT、Scan Xmate-L090、日本国コムスキャンテクノ社）、使用解析ソフト（TRY 3D-BON、日本国ラトックシステムエンジニアリング社）を用いて大腿骨遠位骨幹端部の海綿骨領域の内部構造を非破壊的に観察し、単位骨量（BV/TV）、骨梁幅（Tb.Th）、骨梁数（Tb.N）、骨梁間隔（Tb.Sp）を測定した。その結果を表1に示す。

[0312] [表1]

hFZD2(X)-hFcm	単位骨量 (BV/TV, %) 平均値	骨梁幅 (Tb.Th, μ m) 平均値	骨梁数 (Tb.N, 1/mm) 平均値	骨梁間隔 (Tb.Sp, μ m) 平均値
PBS	18.1 \pm 2.3	24.8 \pm 1.9	7.2 \pm 0.9	114.4 \pm 16.0
140	20.2 \pm 1.3	25.9 \pm 0.9	7.8 \pm 0.4	102.5 \pm 6.8
159	24.0 \pm 2.7	27.4 \pm 1.7	8.7 \pm 0.5	87.3 \pm 7.6
165	22.4 \pm 2.5	26.8 \pm 1.7	8.3 \pm 0.6	93.5 \pm 9.0
171	20.8 \pm 2.9	25.7 \pm 1.9	8.1 \pm 0.6	99.1 \pm 10.4
175	21.3 \pm 2.6	26.0 \pm 2.0	8.1 \pm 0.4	95.5 \pm 7.4

[0313] 表1に示すように、マイクロCTにより、大腿骨遠位骨幹端部海綿骨内部構造を観察した結果、hFZD2(140)-hFcm組換え体投与群の単位骨量（BV/TV）は、20.2 \pm 1.3%であった。これに対し、hFZD2(159)-hFcm、hFZD2(165)-hFcm、hFZD2(171)-hFcm、hFZD2(175)-hFcm組換え体投与群の単位骨量はそれぞれ、24.0 \pm 2.7、22.4 \pm 2.5、20.8 \pm 2.9、21.3 \pm 2.6%と増加していた。また、hFZD2(159)-hFcm、hFZD2(165)-hFcm組換え体投与群では、骨梁幅および骨梁数が増加、骨梁間隔が低下していた。

[0314] これらのことから、大腿骨遠位骨幹端部二次海綿骨部分の単位骨量増加、骨梁幅増加、骨梁数増加、骨梁間隔低下はhFZD2(140)-hFcm組換え体の細胞外領域蛋白質のアミノ酸長を延長することによって引き起こされた可能性が示された（表1）。

[0315] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考と

して本明細書にとり入れるものとする。

[0316] 本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願は、2011年6月21日付けで出願された日本国出願（特願2011-137279）に基づいており、その全体が引用により援用される。

産業上の利用可能性

[0317] 本発明により、生産細胞における分泌性が向上し、かつ骨量増加活性を有するFrizzled2の細胞外領域蛋白質のトランケート体を有する蛋白質を作成できる。また当該蛋白質またはDNAを用いて、効率的に骨疾患に対する医薬組成物を製造することが可能となる。さらに、その医薬組成物を用いた骨疾患に対する治療方法を提供することができる。

配列表フリーテキスト

[0318] 配列番号3：ヒトIgG1Fc変異体のアミノ酸配列

配列番号4：ヒトIgG1Fc変異体をコードするDNAのヌクレオチド配列

配列番号5および6：センスオリゴDNAのヌクレオチド配列

配列番号7および8：プライマーのヌクレオチド配列

配列番号9：融合蛋白質をコードするDNAのヌクレオチド配列

配列番号10：融合蛋白質のアミノ酸配列

配列番号11～40：プライマーのヌクレオチド配列

配列番号42～71：融合蛋白質をコードするDNAのヌクレオチド配列

配列番号72～101：融合蛋白質のアミノ酸配列

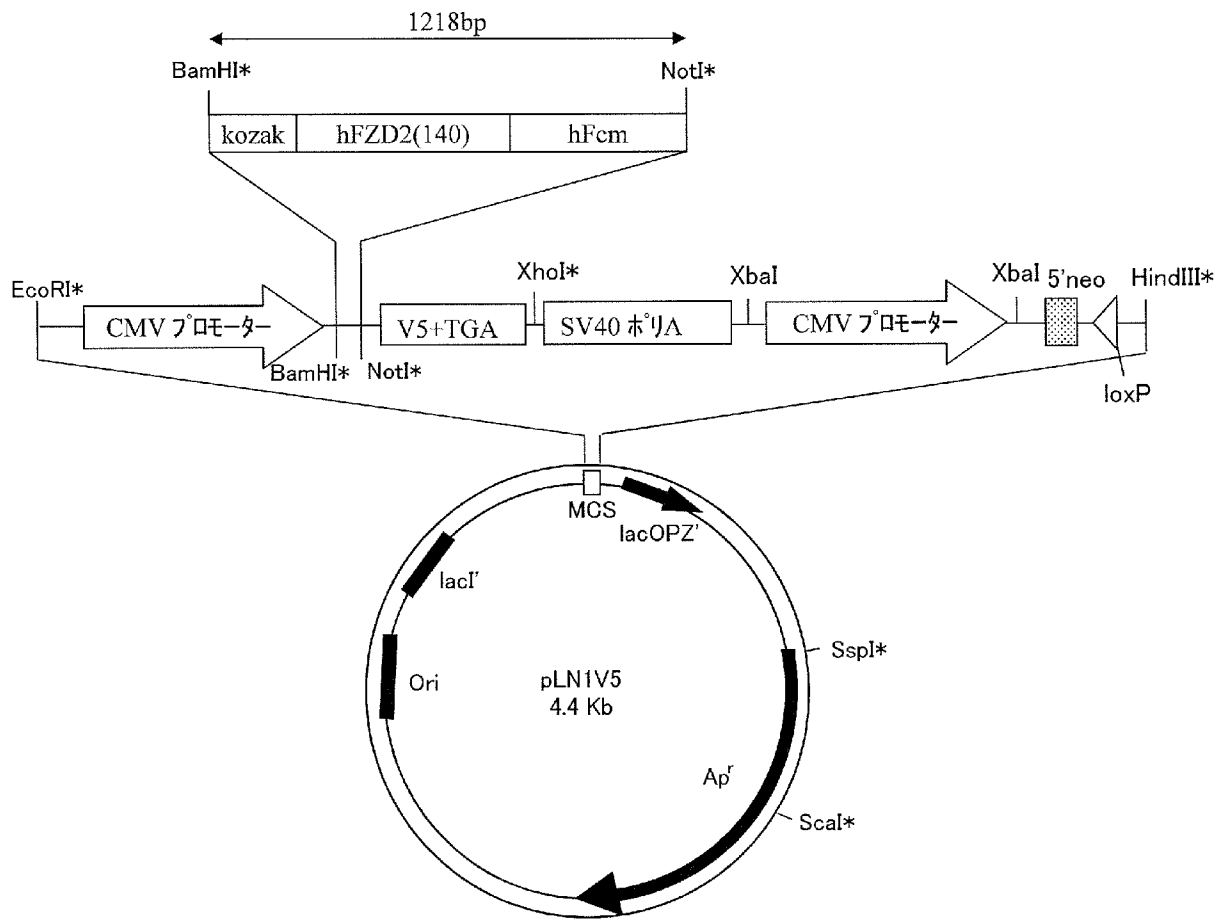
請求の範囲

- [請求項1] 配列番号102で表されるシステインリッチドメイン(CRD)の最小領域配列を含み、且つ全長が141から175アミノ酸である蛋白質。
- [請求項2] 配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列のC末端に14から48個のアミノ酸が付加された請求項1に記載の蛋白質。
- [請求項3] 配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列のC末端に26から48個のアミノ酸が付加された請求項2に記載の蛋白質。
- [請求項4] 配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列のC末端に32、38、44、または48個のアミノ酸が付加された請求項3に記載の蛋白質。
- [請求項5] 配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列のC末端に少なくとも配列番号1で表されるアミノ酸配列の128番目のVから141番目のLまでのアミノ酸を含むアミノ酸が付加された請求項1から4のいずれか1項に記載の蛋白質。
- [請求項6] 配列番号1で表されるアミノ酸配列の141番目のLの後に、さらに配列番号1で表されるアミノ酸配列の142番目のTから175番目のPまでのアミノ酸から選ばれる任意の長さのアミノ酸が付加された請求項5に記載の蛋白質。
- [請求項7] 配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列のN末端に1から15個のアミノ酸が付加された請求項1から6のいずれか1項に記載の蛋白質。
- [請求項8] 配列番号102で表されるシステインリッチドメインの最小領域配列のN末端に付加されるアミノ酸が配列番号1で表されるアミノ酸配列の1番目のQから15番目のFまでのアミノ酸から選ばれる任意の長さのアミノ酸である、請求項7に記載の蛋白質。

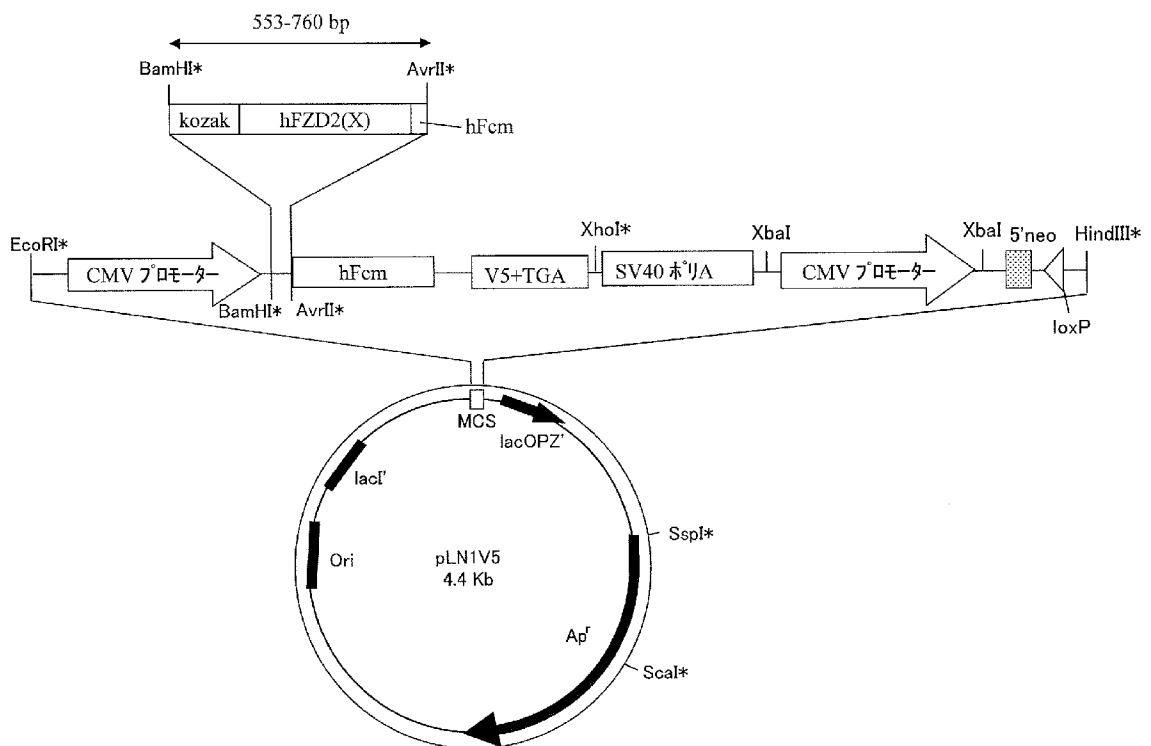
- [請求項9] 配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末の1位のアミノ酸であるQから、153番目のA、154番目のG、155番目のG、156番目のT、157番目のP、158番目のG、159番目のG、160番目のP、161番目のG、162番目のG、163番目のG、164番目のG、165番目のA、166番目のP、167番目のP、168番目のR、169番目のY、170番目のA、171番目のT、172番目のL、173番目のE、174番目のH、または175番目のPのいずれか1のアミノ酸までのアミノ酸を含む蛋白質。
- [請求項10] 化学修飾されている、請求項1から9のいずれか1項に記載の蛋白質。
- [請求項11] 前記化学修飾が、1または複数のポリエチレングリコール分子の結合である、請求項10に記載の蛋白質。
- [請求項12] 前記化学修飾が、糖鎖の結合である、請求項10に記載の蛋白質。
- [請求項13] 組換え蛋白質である、請求項1から12のいずれか1項に記載の蛋白質。
- [請求項14] 請求項1から13のいずれか1項に記載の蛋白質と哺乳動物由来免疫グロブリンFc蛋白質またはその変異体との融合蛋白質。
- [請求項15] 哺乳動物由来免疫グロブリンFc蛋白質が配列番号3で表されるアミノ酸配列からなる、請求項14に記載の融合蛋白質。
- [請求項16] 配列番号72から94のいずれか1で表されるアミノ酸配列からなる融合蛋白質。
- [請求項17] 請求項14から16のいずれか1項に記載の融合蛋白質を含有する骨疾患治療用医薬組成物。
- [請求項18] 請求項1から13のいずれか1項に記載の蛋白質または請求項14から16のいずれか1項に記載の融合蛋白質をコードするDNA。
- [請求項19] 哺乳動物由来免疫グロブリンFc蛋白質をコードするヌクレオチド配列が配列番号4で表されるヌクレオチド配列である、請求項18に記載のDNA。

- [請求項20] 配列番号42から64のいずれか1で表されるヌクレオチド配列からなるDNA。
- [請求項21] 請求項18から20のいずれか1項に記載のDNAを含有する、骨疾患治療用医薬組成物。
- [請求項22] 上記骨疾患が、骨量、骨密度および骨強度から選ばれる少なくとも1の低下を伴う疾患である、請求項17または21に記載の骨疾患治療用医薬組成物。
- [請求項23] 請求項17、21または22に記載の骨疾患治療用医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、骨疾患を治療する方法。
- [請求項24] 前記哺乳動物がヒトである、請求項23の方法。
- [請求項25] 前記骨疾患が、骨量、骨密度および骨強度から選ばれる少なくとも1の低下を伴う疾患である、請求項23または24に記載の方法。
- [請求項26] 前記骨疾患治療用医薬組成物が、他の骨疾患治療剤と組み合わせて同時にまたは連続的に投与される、請求項23から25のいずれか1項に記載の方法。

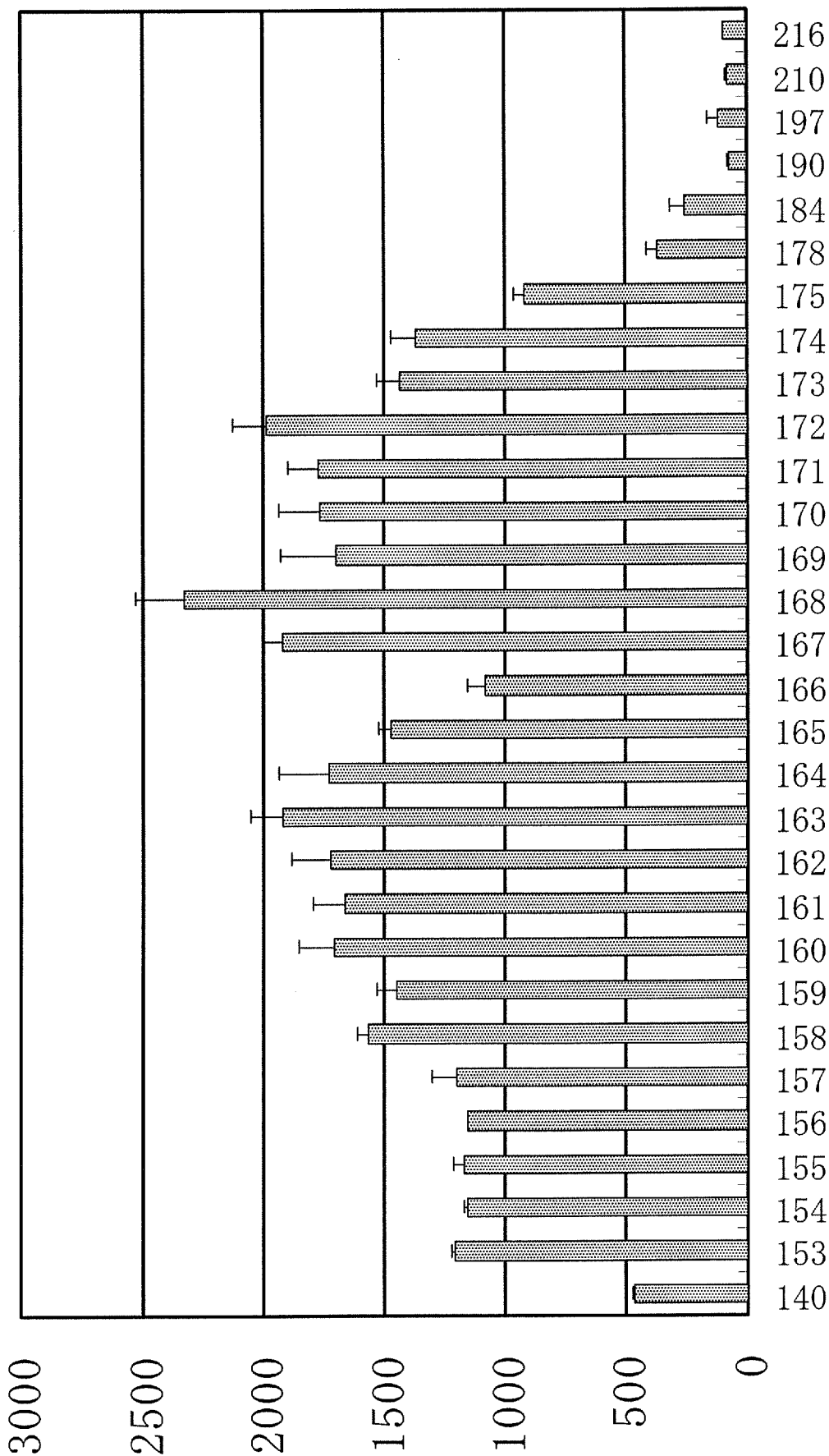
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/065911

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K31/711(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P19/08(2006.01)i, A61P19/10(2006.01)i, C07K14/705(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i

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)

C12N15/09, A61K31/711, A61K38/00, A61K48/00, A61P19/08, A61P19/10, C07K14/705, C07K19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2010/038756 A1 (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.), 08 April 2010 (08.04.2010), particularly, claims 1 to 5; page 23, lines 2 to 20; example 20; paragraph [0074] & EP 2343080 A1	1-8, 10-15, 17-19, 21, 22 9, 16, 20

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 doubts 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
03 August, 2012 (03.08.12)

Date of mailing of the international search report
21 August, 2012 (21.08.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/065911

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 23-26
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 23 to 26 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out a search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K31/711(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P19/08(2006.01)i, A61P19/10(2006.01)i, C07K14/705(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, A61K31/711, A61K38/00, A61K48/00, A61P19/08, A61P19/10, C07K14/705, C07K19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2012年
日本国実用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録実用新案公報	1994-2012年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2010/038756 A1 (協和発酵キリン株式会社) 2010.04.08, 特に、請求項1-5、23頁2-20行、実施例20、[0074]	1-8, 10-15, 17-19, 21, 22
A	& EP 2343080 A1	9, 16, 20

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.08.2012

国際調査報告の発送日

21.08.2012

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉田 知美

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3335

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 23-26 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項23-26は、治療による人体の処置方法に該当するものであり、PCT17(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。