

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-90524

(P2018-90524A)

(43) 公開日 平成30年6月14日(2018.6.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	2G045
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04	4B063
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D	4C085
A61P 43/00 (2006.01)	A61K 39/395 N	4H045
A61P 29/00 (2006.01)	A61P 43/00 IO5	
審査請求 未請求 請求項の数 11 OL (全 21 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-234717 (P2016-234717)

(22) 出願日 平成28年12月2日 (2016.12.2)

(71) 出願人 504137912

国立大学法人 東京大学
東京都文京区本郷七丁目3番1号

(74) 代理人 230104019

弁護士 大野 聖二

(74) 代理人 100173185

弁理士 森田 裕

(74) 代理人 100119183

弁理士 松任谷 優子

(74) 代理人 100149076

弁理士 梅田 慎介

(72) 発明者 倉島 洋介

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大
学法人東京大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 線維化関連分子に対する抗体およびその医療応用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 線維化関連分子に対する抗体およびその医療応用の提供。

【解決手段】 CHL1タンパク質に結合する抗体又は前記抗体の抗原結合性断片であって、前記CHL1タンパク質の粘膜固有層ならびに粘膜下層の非免疫系、及び非上皮系の非血球系細胞への結合を中和する、前記抗体又は、前記抗体の抗原結合性断片。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

C H L 1 タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片であって、C H L 1 タンパク質の粘膜固有層ならびに粘膜下層の非免疫系および非上皮系の非血球系細胞への結合を中和する、抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 2】

C H L 1 タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片であって、抗体が、
(1) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 および配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 を有する重鎖可変領域と、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 および配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 を有する軽鎖可変領域とを有する抗体であるか、または

(2) 上記 (1) と C H L 1 タンパク質に対する結合に関して競合する抗体である、抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 3】

抗体が、(3) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを有する抗体、または、(4) 上記 (3) と C H L 1 タンパク質に対する結合に関して競合する抗体である、請求項 2 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む、組織または臓器の線維化を治療または予防することに用いるための医薬組成物。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む、組織または臓器における線維芽細胞の活性を抑制することに用いるための医薬組成物。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む、炎症組織の炎症治癒を促進することに用いるための医薬組成物。

【請求項 7】

組織において炎症の有無を分析する方法であって、前記組織における C H L 1 タンパク質の存在を決定することを含む、方法。

【請求項 8】

C H L 1 タンパク質の有無を検出することが、C H L 1 タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片を用いて行われる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

C H L 1 タンパク質の有無を検出することが、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載された抗体またはその抗原結合性断片を用いて行われる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

C H L 1 タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片を含む、組織における炎症の有無を診断することに用いるための、診断薬。

【請求項 11】

C H L 1 タンパク質を含む、線維化誘導性非血球系細胞の検出用プローブ。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、線維化関連分子に対する抗体およびその医療応用に関する。

【背景技術】**【0002】**

炎症は、組織損傷の修復過程として必要である。しかしながら、組織の修復後に炎症が

10

20

30

40

50

消えない場合が存在する。そのような炎症においては、線維芽細胞が活性化され、コラーゲンの排出量が高まっており、組織の線維化を引き起こすリスクがある。

【 0 0 0 3 】

組織の線維化は不可逆的であり治療ができないため、線維化は未然に防ぐことが大切である。従って、線維化を診断する手法や線維化を予防する手法に対するニーズが存在する。

【 0 0 0 4 】

CHL1は、脳神経細胞の接着因子であるL1に類似する細胞接着分子として知られている（非特許文献1）。しかし、その生理的機能はほとんど知られていない。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 5 】

【 非特許文献 1 】 MH Wei et al., Hum. Genet. 103 (39: 355-364, 1998

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

本発明は、線維化関連分子に対する抗体およびその医療応用を提供する。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

本発明者らは、炎症の急性期および慢性期特異的に発現する因子としてCHL1を同定した。本発明者らは、CHL1は線維芽細胞の膜表面に提示されていること、分泌されて粘膜固有層ならびに粘膜下層の筋線維芽細胞などの非免疫系および非上皮系の非血球系細胞に結合することを明らかにした。また、本発明者らは、抗CHL1抗体が、炎症の急性期における線維芽細胞による組織修復を遅延させること、炎症の慢性期においては過剰なコラーゲン産生や線維芽細胞の活性を抑制できることを見出した。さらに本発明者らは、CHL1が炎症の急性期のみならず慢性期にも発現が持続することを見出し、炎症急性期が過ぎてからの抗CHL1抗体の投与は、コラーゲンの沈着と線維芽細胞の活性化の抑制を引き起こすことを見出した。

【 0 0 0 8 】

すなわち、本発明によれば以下の発明が提供される。

[1] CHL1タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片であって、CHL1タンパク質の粘膜固有層ならびに粘膜下層の非免疫系および非上皮系の非血球系細胞への結合を中和する、抗体またはその抗原結合性断片。

[2] CHL1タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片であって、抗体が、(1) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR2および配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を有する重鎖可変領域と、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2および配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を有する軽鎖可変領域とを有する抗体であるか、または

(2) 上記 (1) とCHL1タンパク質に対する結合に関して競合する抗体である、抗体またはその抗原結合性断片。

[3] 抗体が、(3) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを有する抗体、または、(4) 上記 (3) とCHL1タンパク質に対する結合に関して競合する抗体である、上記 [2] に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

[4] 上記 [1] ~ [3] のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む、組織または臓器の線維化を治療または予防することに用いるための医薬組成物。

[5] 上記 [1] ~ [3] のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む、組織または臓器における線維芽細胞の活性を抑制することに用いるための医薬組成物。

10

20

30

40

50

[6] 上記 [1] ~ [3] のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合性断片を含む、炎症組織の炎症治癒を促進するために用いるための医薬組成物。

[7] 組織において炎症の有無を分析する方法であって、前記組織における C H L 1 タンパク質の存在を決定することを含む、方法。

[8] C H L 1 タンパク質の有無を検出することが、C H L 1 タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片を用いて行われる、上記 [7] に記載の方法。

[9] C H L 1 タンパク質の有無を検出することが、上記 [1] ~ [3] のいずれかに記載された抗体またはその抗原結合性断片を用いて行われる、上記 [7] に記載の方法。

[1 0] C H L 1 タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片を含む、組織における炎症の有無を診断するために用いるための、診断薬。

[1 1] C H L 1 タンパク質を含む、線維化誘導性非血球系細胞の検出用プローブ。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 9 】

【図 1】図 1 は、マイクロアレイを用いた発現解析の結果を示す図である。図中「Fibro」は線維芽細胞を表し、「Mac」はマクロファージを表し、「BM Mac」は骨髄マクロファージを表し、「B」は B 細胞を表す。また、図中「正」は、正常の線維芽細胞を表し、「急」は急性炎症を誘発した線維芽細胞を表し、「慢」は、慢性炎症を誘発した線維芽細胞を表す。図 1 では、図の右側に示された遺伝子の発現が示されている。

【図 2】図 2 は、C h l 1 遺伝子の各種細胞における発現量を示す図である。

【図 3】図 3 は、C H L 1 が炎症時に細胞膜上に発現することを示す図である。

【図 4】図 4 は、炎症の慢性期における C H L 1 タンパク質の発現およびヒトクローン病大腸検体における C H L 1 タンパク質の発現を示す図である。

【図 5】図 5 は、C H L 1 ノックアウト (C H L 1 K O) マウス由来線維芽細胞における組織損傷の修復に対する影響を示す図である。

【図 6】図 6 は、デキストラン硫酸ナトリウム (D S S) による腸炎モデルにおける C H L 1 の役割を示す図である。図 6 A は、D S S による腸炎モデルの体重回復を指標として腸炎の修復能が C H L 1 K O マウスにおいて低下することを示す。図 6 B は、ヘマトキシリンエオジン染色による大腸組織像を示す。図 6 B では、C H L 1 K O マウスでは上皮細胞の再形成の遅延がみられる。図 6 C は、大腸線維芽細胞における平滑筋アクチンの発現により線維芽細胞の活性化度合いが C H L 1 K O マウスにおいて低下しており、上皮細胞下への線維芽細胞の配備が遅延することを示す。図 6 C では、炎症組織における上皮細胞 (E p C A M で染色される) および線維芽細胞 (a S M A で染色される) の集積能が C H L 1 K O マウスにおいて低下していることが示されている。

【図 7】図 7 は、粘膜固有層、粘膜下組織の線維化部 (アザン染色青色部 : 図面では暗いグレー) における C H L 1 タンパク質が会合する細胞の局在 (赤 : 図面では明るいグレー) を示す写真 (図 7 左) および細胞の分画 (図 7 右) を示す。図中の矢じりは、線維化が顕著な箇所を示しており、C H L 1 タンパク質が会合する細胞集団と局在が一致していることが示される。

【図 8】図 8 は、R 3 の分画の細胞の一部に対して C H L 1 が結合することを示す図である。C H L 1 は F c タグを有し、図では F c タグが検出されている。

【図 9】図 9 は、C H L 1 タンパク質に対するモノクローナル抗体 3 3 6 抗体が細胞表面に発現した C H L 1 タンパク質を認識することを示す図である。

【図 1 0】図 1 0 は、3 3 6 抗体が、細胞と C H L 1 タンパク質との結合を中和できることを示す図である。

【図 1 1】図 1 1 は、細胞と C H L 1 タンパク質との結合を中和できる 3 3 6 抗体が炎症の急性期における体重の回復を遅延させること (図 1 1 左のグラフ) および腸粘膜の治癒を遅延させること (図 1 1 右の写真) を示す図である。

【図 1 2】図 1 2 は、C H L 1 タンパク質が炎症の慢性期においても線維芽細胞に持続的に発現していることを示す図である。

【図 1 3】図 1 3 は、腸炎モデル (急性および慢性) の排泄物中から C H L 1 タンパク質

10

20

30

40

50

が検出されることを示す図である。

【図14】図14は、炎症慢性期の線維化誘導過程におけるコラーゲンの沈着および線維芽細胞の活性化をCHL1抗体が抑制することを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本明細書では、「対象」とは、哺乳動物であり得、好ましくは、ヒトである。対象は、組織炎症を有する、または組織線維化のリスクがある対象であり得る。

【0011】

本明細書では、「炎症」とは、障害に対する生体組織の防御反応をいう。炎症に関与する組織は、通常、終末血管床、血液および結合組織であると言われており、一連の応答によって原因を除去し、組織を修復する。本明細書では、「急性炎症」または「炎症の急性期」とは、組織の修復に関わる炎症を意味し、「慢性炎症」または「炎症の慢性期」とは、組織の修復の後の炎症を意味する。急性炎症は、臨床的には組織に障害が発生してから7日間程度以内の炎症であると言われ、慢性炎症は、臨床的には7日間を超えて（例えば、月または年の単位で）持続する炎症であると言われている。

【0012】

本明細書では、「線維化」とは、慢性炎症により組織に余剰のコラーゲンが沈着し、組織が硬化することをいう。線維化の過程では、線維芽細胞が分化成熟して筋線維芽細胞となり、活発にコラーゲンを産生・分泌し、その後細胞自体は消失し、線維性結合組織が生じる。線維化の過程は目立たないため、線維化が進行してから線維症が発覚することがあるが、線維症は治療することができない疾患であるため、その予防が重要である。

【0013】

本明細書では、「活性型線維芽細胞」とは、線維芽細胞のうち、定常状態よりもコラーゲン産生能の高まった細胞集団をいい、例えば、筋線維芽細胞を含む集団が挙げられる。活性型線維芽細胞は、炎症の急性期および慢性期において線維芽細胞から生じる。

【0014】

本明細書では、「抗体」は、免疫グロブリンを意味し、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含む。好ましい抗体は、モノクローナル抗体である。抗体の由来は、特に限定されないが例えば、非ヒト動物の抗体、非ヒト哺乳動物の抗体、およびヒト抗体が挙げられる。また、抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体であってもよい。また、抗体は、二重特異性抗体であってもよい。

抗体は、2本の重鎖と2本の軽鎖とが会合した構造を取る。重鎖は、重鎖可変領域（VH）、重鎖定常領域（CH1）、ヒンジ領域、CH2、およびCH3からなり、軽鎖は、軽鎖可変領域（VL）と軽鎖定常領域（CL）とからなる。

【0015】

本明細書では、「抗原結合性断片」とは、抗原への結合性が維持された抗体の一部を意味する。抗原結合性断片は、本発明の抗体の重鎖可変領域若しくは軽鎖可変領域またはその両方を含みうる。抗原結合性断片は、キメラ化またはヒト化されていてもよい。抗原結合性断片としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv（単鎖Fv）、ダイアボディー、sc(Fv)₂（単鎖(Fv)₂）が挙げられる。このような抗体の断片は、特に限定されないが例えば、抗体を酵素で処理して得ることができる。例えば、抗体をパインで消化すると、Fabを得ることができる。あるいは、抗体をペプシンで消化すると、F(ab')₂を得ることができ、これをさらに還元するとFab'を得ることができる。本発明ではこのような抗体の抗原結合性断片を用いることができる。

【0016】

本明細書では、CHL1とは、L1様細胞接着因子（Cell Adhesion molecule L1-like）またはL1細胞接着分子2（L1 Cell Adhesion molecule 2）とも呼ばれる。元々は脳において発現し、知能障害の原因となる分子として知られ、神経細胞のシナプスにおいて機能すると考えられている。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

本明細書では、「抗体 - 薬物コンジュゲート」(ADC)とは、抗体と薬物との結合体を意味する。薬物は、抗体との結合により、標的部位に送達され、送達部位において機能を発揮しうる。ADCにおいては、抗体と薬物はリンカーを介して連結していてもよい。ADCの設計や調製法は、当業者に周知である。

【 0 0 1 8 】

本発明によれば、以下の抗体または抗原結合性のその断片が提供される。

[1] CHL1タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片であって、CHL1タンパク質の線維芽細胞への結合を中和する、抗体またはその抗原結合性断片。

本発明者らによれば、CHL1の線維芽細胞への結合を中和することができる抗体は、炎症の慢性期において組織へのコラーゲンの沈着や線維芽細胞の活性化を抑制することができた。従って、この抗体または抗原結合性断片は、CHL1の線維芽細胞への結合を中和することにより、炎症の慢性期において組織へのコラーゲンの沈着や線維芽細胞の活性化を抑制できると考えられる。ある態様では、この抗体または抗原結合性断片は、CHL1と粘膜固有層ならびに粘膜下層の筋線維芽細胞などの非免疫系および非上皮系の非血球系細胞(この細胞を本明細書では「線維化誘導性非血球系細胞」と呼ぶことがある)との結合を中和する。CHL1の受容体はインテグリン、ピトロネクチンなどの接着分子(Katic J J Neurosci. 2014 Oct 29;34(44):14606-23. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3280-13.2014.)、セロトニン受容体(Kleene R J Cell Sci. 2015 Dec 15;128(24):4642-52. doi: 10.1242/jcs.176941)を含むタンパクと考えられている。

【 0 0 1 9 】

本発明によればまた、

[2] CHL1タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片であって、抗体が、(1)配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR2および配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR3を有する重鎖可変領域と、配列番号5に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、配列番号6に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2および配列番号7に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を有する軽鎖可変領域とを有する抗体であるか、または

(2)上記(1)とCHL1タンパク質に対する結合に関して競合する抗体である、抗体またはその抗原結合性断片が提供される。

【 0 0 2 0 】

本発明によればまた、抗体が、(3)配列番号4に示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と配列番号8に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを有する抗体、または、(4)上記(3)とCHL1タンパク質に対する結合に関して競合する抗体である、上記[2]に記載の抗体またはその抗原結合性断片が提供される。

【 0 0 2 1 】

上記(1)や(3)に記載の抗体は、CHL1の粘膜固有層ならびに粘膜下層の筋線維芽細胞などの非免疫系および非上皮系の非血球系細胞への結合を中和できる。これは、CHL1タンパク質の粘膜固有層ならびに粘膜下層の筋線維芽細胞などの非免疫系および非上皮系の非血球系細胞への結合面に抗体が結合し、抗体による立体障害が生じてCHL1タンパク質が線維芽細胞に結合できなくなるためであると考えられる。従って、上記(1)や(3)に記載の抗体と競合する抗体は、同様にCHL1タンパク質の筋線維芽細胞などの非免疫系および非上皮系の非血球系細胞への結合面に結合して立体障害を発生させ、これによりCHL1の筋線維芽細胞などの非免疫系および非上皮系の非血球系細胞への結合を中和できると考えられる。また、必要に応じてCHL1の筋線維芽細胞などの非免疫系および非上皮系の非血球系細胞への結合を中和するか否かを確認してもよいであろう。

【 0 0 2 2 】

本発明によれば、上記(1)または(3)に記載の抗体とCHL1タンパク質に対する結合に関して競合する抗体であって、CHL1の筋線維芽細胞などの非免疫系および非上

皮系の非血球系細胞への結合を中和することができる抗体が提供される。

【0023】

本発明の抗体は、組織または臓器（特に炎症を引き起こした組織または臓器の炎症を引き起こした領域）において、線維芽細胞の活性を低下させる、コラーゲンの産生を低下させる、またはコラーゲンの沈着を抑制することができる。そしてこれにより、本発明の抗体は、組織または臓器（特に炎症を引き起こした組織または臓器の炎症を引き起こした領域）において、組織または臓器の線維化を予防することができる。従って、本発明によれば、本発明の抗体を含む、線維芽細胞の活性を低下させる、コラーゲンの産生を低下させる、またはコラーゲンの沈着を抑制するために用いるための組成物または医薬組成物が提供される。本発明によればまた、本発明の抗体を含む、線維症を治療することに用いるための医薬組成物が提供される。本発明によればまた、本発明の抗体を含む、炎症を引き起こした組織において、組織の線維化を予防することに用いるための医薬組成物が提供される。炎症を引き起こした組織または臓器としては、腸（例えば、小腸および大腸）が挙げられる。本発明の医薬組成物は、慢性炎症を引き起こした組織に対して、組織の線維化を予防しうる。従って、本発明の医薬組成物は、慢性炎症を引き起こした組織に対して、特に組織の線維化が完了する前の慢性炎症を引き起こした組織に対して用いられ得る。従って、ある態様では、本発明の医薬組成物は、慢性炎症を有する対象（特に組織の線維化が完了する前の慢性炎症を有する対象）に対して投与することができる。本発明の医薬組成物は、炎症を引き起こす前の組織または臓器において（すなわち、平常状態の組織または臓器において）、組織または臓器の線維化を予防することに用いるために用いてもよい。本明細書では、「治療」には、症状の悪化を遅らせる、症状の悪化を停止させる、および症状を改善することが含まれる。本明細書では、「臓器」の一部のことを「組織」ということがある。

10

20

【0024】

ある態様では、本発明の医薬組成物は、クローン病、潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患から選択される炎症性疾患を有する対象に対して投与することができる。

【0025】

後述するように、炎症を引き起こしている対象は、組織中、体液中または排泄物中にCHL1を放出している。従って、本発明の医薬組成物は、CHL1陽性である対象に対して投与してもよいであろう。

30

【0026】

本発明の抗体を有効成分として含む医薬組成物または薬剤は、公知の製剤学的方法により製剤化することができる。例えば、本発明の医薬組成物または薬剤は、薬学上許容可能な賦形剤を含んでもよい。賦形剤は、有効成分である本発明の抗体の有効量を対象に与えるために適宜投与されうる賦形剤とすることができる。ある態様では、本発明の医薬組成物または薬剤は、注射剤とすることができ、注射用の賦形剤は、無菌の水性溶液、例えば、リンガー溶液、ハクス溶液または生理食塩水などの薬学的に許容可能な緩衝液、ブドウ糖やその他の補助剤を含む等張液とすることができる。補助剤としては、エタノールなどのアルコール、ポリエチレングリコールなどのポリアルコール、ポリソルベート80などの非イオン性界面活性剤などが挙げられ、製剤化の際に添加することができる。注射用の油性液としては、ゴマ油、ヤシ油および大豆油を用いることができ、補助剤として、安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールを用いることができる。本発明の医薬組成物または薬剤は、注射剤の形で非経口投与（例えば、静脈内投与または胸腔内投与）することができる。

40

【0027】

抗体の作製

抗体は、当業者に周知の方法により作成することができる。すなわち、抗原とアジュバントとを動物に免疫することと、免疫した動物の血漿を得ることによりポリクローナル抗体を得ることができる。あるいは、抗原とアジュバントとを動物に免疫し、免疫した動物からBリンパ球を得て、ミエロームと細胞融合させてハイブリドームを形成させ、所望の

50

抗体を産生するハイブリドーマをクローニングして得てもよい。免疫の工程は、細胞株（例えば、293細胞またはCHO細胞等）に強制発現させ、細胞を動物に免疫してもよい。細胞株に発現させた場合、CHL1タンパク質は細胞表面に暴露するので免疫された動物はCHL1タンパク質に対する抗体を産生する。または、CHL1タンパク質を発現する細胞、好ましくは、CHL1タンパク質を精製して動物に免疫してもよい。

【0028】

キメラ抗体は、本分野において周知の方法により作製することができる。例えば、抗体の定常領域をヒトの抗体の定常領域に置換することにより作製することができる。ヒト化抗体は、例えば、ヒト以外の動物由来の相補性決定領域(CDR)とヒト抗体由来のフレームワーク領域およびヒト抗体由来の定常領域とを含む。ヒト化抗体は、例えば、上記のCDRをヒト抗体に移植して得ることができる。ヒト抗体は、例えば、ヒト抗体を産生する遺伝子改変マウスに抗原を免疫することにより得ることができる。二重特異性抗体は、2つの異なるエピトープまたは抗原に結合することができる抗体であって、当業者に周知の方法で調製することができる。二重特異性抗体は、例えば、2つの異なる抗体を産生する細胞をさらに融合して、ハイブリッドハイブリドーマを作製する方法や、V_H領域とV_L領域を、上記2つの領域間では対を形成できない短いリンカーを介して1本のポリペプチド鎖上で発現させ、別のポリペプチド鎖であって、前記V_H領域とV_L領域と対形成する相補的なV_H領域とV_L領域を有するポリペプチド鎖と複合体を形成させることにより作製できる。

10

【0029】

ある抗体と抗原との結合において競合する抗体は、当業者に周知の競合アッセイなどにより確認することができる。競合アッセイで、例えば、少なくとも20%、好ましくは少なくとも20~50%、さらに好ましくは少なくとも50%、所望の抗体の結合をブロックすることができるならば、同じ抗原に対する結合において競合する抗体とすることができる。競合する抗体は、交差ブロッキングアッセイ、好ましくは、競合ELISAアッセイにより確認することができる。交差ブロッキングアッセイでは、抗原を、例えばマイクロタイタープレート上にコーティングし、ここに候補となる競合抗体存在を添加してインキュベートし、抗原と候補抗体との結合を形成させる。その後、所望の抗体を標識した上でさらにウェルに添加してインキュベートし、洗浄して、所望の抗体の結合量を定量することにより、抗体が競合したか否かを判断することができる。競合する場合には、ウェル中に残存する標識量が少なくなるはずである。

20

30

【0030】

線維芽細胞とCHL1タンパク質との結合を中和できる抗体は、筋線維芽細胞などの非免疫系および非上皮系の非血球系細胞に対してCHL1と結合において競合するか否かにより確認することができる。例えば、後述する実施例に記載されるように、CHL1タンパク質にタグ（例えば、Fcタグ）を結合させた融合タンパク質を筋線維芽細胞などの非免疫系および非上皮系の非血球系細胞に結合させると、前記タグに結合する抗体により細胞へのCHL1タンパク質の結合を検出することができる。この結合を、例えば、少なくとも20%、好ましくは少なくとも20~50%、さらに好ましくは少なくとも50%、CHL1の筋線維芽細胞などの非免疫系および非上皮系の非血球系細胞に対する結合をブロックすることができるならば、筋線維芽細胞などの非免疫系および非上皮系の非血球系細胞とCHL1タンパク質との結合を中和できる抗体とすることができる。

40

【0031】

本発明の別の側面では、組織において炎症の有無を分析（または検査）する方法であって、前記組織におけるCHL1タンパク質の存在（有無）を決定することを含む方法が提供される。本発明者らによると、CHL1タンパク質は炎症組織において高発現を示した。本発明者らによると、CHL1タンパク質は炎症を有する組織から分泌され、個体の体液、特に排泄物中から検出できた。従って、組織におけるCHL1タンパク質の有無を決定するとは、炎症組織中のCHL1タンパク質の存在を決定することに加えて、炎症組織から分泌された、体液中または排泄物中のCHL1タンパク質の存在を決定することも含

50

む。

【0032】

本発明のある態様では、CHL1タンパク質の存在は、CHL1に結合する抗体を用いて検出することができる。ある態様では、抗体は、本発明の抗体であり得る。また、別のある態様では、CHL1タンパク質の存在は、CHL1のmRNA量を測定することにより決定することができる。mRNA量は、サザンブロッティング、定量的PCR等の当業者に周知の方法により測定することができる。

【0033】

本発明のある側面では、組織における炎症の有無を診断することに用いるための診断薬または診断キットであって、CHL1タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片を含む診断薬または診断キットが提供される。診断キットは、診断薬に加えて他の追加の構成を備えていてもよく、炎症の診断方法を解説する説明書を備えていてもよい。本発明のある側面では、組織における炎症の有無を診断することに用いるための検査薬または検査キットであって、CHL1タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片を含む検査薬または検査キットが提供される。検査キットは、検査薬に加えて他の追加の構成を備えていてもよく、炎症の検査方法を解説する説明書を備えていてもよい。

10

【0034】

本発明のある側面では、CHL1タンパク質は、筋線維芽細胞などの非免疫系および非上皮系の非血球系細胞に対して結合する。従って、CHL1タンパク質は、筋線維芽細胞を検出することに用いることができる。例えば、CHL1タンパク質にタグを結合させ、またはさせずに、CHL1タンパク質を筋線維芽細胞を含む細胞画分と接触させると、CHL1タンパク質は筋線維芽細胞に結合する。フローサイトメトリーにより、CHL1タンパク質が表面に結合した細胞を検出することにより筋線維芽細胞を検出することができる。また、フローサイトメトリーにより、CHL1タンパク質が表面に結合した細胞をゲートすることにより、筋線維芽細胞を濃縮または単離することができる。このように、本発明のある側面では、CHL1タンパク質を含む、筋線維芽細胞などの線維化誘導性非血球系細胞の検出用プローブが提供される。本発明のある態様では、CHL1タンパク質を含む、筋線維芽細胞を濃縮することまたは単離することに用いるための組成物が提供される。ここで「濃縮」とは、筋線維芽細胞などの線維化誘導性非血球系細胞の全細胞に対する割合を上昇させることを意味し、「単離」とは、筋線維芽細胞などの線維化誘導性非血球系細胞を他の細胞から実質的に単離することを意味する。本発明では、このようにして検出用プローブを用いて濃縮または単離された線維化誘導性非血球系細胞を含む細胞集団をも提供する。検出用プローブを用いて濃縮または単離された線維化誘導性非血球系細胞を含む細胞集団は、例えば、CHL1と粘膜固有層ならびに粘膜下層の非免疫系および非上皮系の非血球系細胞との相互作用の抗体等による中和の検出に用いることができる。

20

30

【0035】

本発明のある側面では、炎症組織における線維化をその必要のある対象において予防する方法であって、前記対象に本発明の抗体を投与することを含む、方法が提供される。本発明のある側面では、炎症組織の有無をそれを有している対象または有している可能性がある対象において診断する方法であって、前記組織におけるCHL1タンパク質の存在を決定することを含む、方法が提供される。本発明のある側面では、筋線維芽細胞を濃縮または単離する方法であって、CHL1タンパク質を含むプローブを筋線維芽細胞を含む細胞画分と接触させることと、CHL1タンパク質と結合した細胞を結合しなかった細胞から分離することとを含む、方法が提供される。

40

【0036】

本発明のある側面では、線維芽細胞の活性を低下させる、コラーゲンの産生を低下させる、またはコラーゲンの沈着を抑制することに用いるための組成物または医薬の製造における本発明の抗体の使用が提供される。本発明のある側面では、炎症組織における線維芽細胞の活性を抑制することに用いるための医薬の製造における本発明の抗体の使用が提供される。本発明のある側面では、組織における炎症の有無を診断することに用いるための

50

診断薬または診断キットの製造のための、CHL1タンパク質に結合する抗体の使用が提供される。

【実施例】

【0037】

実施例1：活性化線維芽細胞におけるマイクロアレイ分析

本実施例では、活性化線維芽細胞において遺伝子発現が変動している因子を同定する。

【0038】

(A) COL1a2-GFP tg/+ C57Bl/6マウス(東海大学医学部稲垣教授より寄与)を用いて未処理正常(図中では、「正」と略すことがある)、デキストラン硫酸ナトリウム水溶液(株式会社医学生物学研究所MBL)2.25-2.5%の自由飲水(5日間)後のday7-10(図中では、「急」と略すことがある)、急性腸炎を2週間の間隔で3回反復したday70-90(図中では「慢」と略すことがある)にマウスを解剖し、大腸粘膜固有層細胞をエチレンジアミン四酢酸、Collagenase処理により単離した。得られた細胞に対して、抗体染色を行いセルソーター(FACS AriaIII BD)で細胞ソーティングを行った。

【0039】

常法により、線維芽細胞(COL1a2-GFP陽性CD45陰性Podoplanin陽性)、マクロファージ(CD45陽性F480陽性CD11b陽性)B細胞(CD45陽性CD19陽性B220陽性)、およびRecombinant Mouse M-CSF(carrier-free)(Biolegend:576404)により誘導したC57Bl/6マウス由来の骨髄マクロファージ(BM Mac)をそれぞれ分取した。

【0040】

本実施例で用いた抗体は以下の通りであった。

10

20

【表 1】

提供元	抗体名	製品番号
BioLegend	DyLight 649 Donkey anti-rabbit IgG	406406
CSTjapan	Vimentin XR rabbit mAb (Alexa Fluor® 647 conjugate)	9856S
BioLegend	Alexa Fluoro 647 anti-mouse CD326(EpCAM)	118211
Life Technologies	Goat anti human IgG(H+L) secondary antibody, Alexa 647 conjugate	A21445
Biolegend	APC goat anti-Rat IgG	405407
ebioscience	F(ab) anti-mouse IgG eFluor660	50-4010
BD	APC rat anti-mouse Ly6c	560595
Biolegend	APC anti-mouse podoplanin	127410
Biolegend	APC anti-mouse F4/80	123115
Biolegend	FITC anti mouse IgG2a	407105
Biolegend	FITC anti-mouse Ly-6C	128006
BD	FITC-Rat anti-mouse CD103	557494
Biolegend	PE anti-mouse podoplanin	127407
Biolegend	PE anti-mouse F480	123110
Sigma	Anti-Actin, α -Smooth Muscle - Cy3™ antibody, Mouse monoclonal clone 1A4, purified from hybridoma cell culture	C6198-100UL
Biolegend	PE anti-mouse sca1	108107
Biolegend	PE anti-mouse CD146	134703
BioLegend	PECy7 anti-mouse CD146	134714
BD	PECy7 rat anti-mouse CD45	552848
Biolegend	APC/Cy7 anti-mouse F480	123118
Biolegend	APC/Cy7 anti-mouse CD45	103115
Biolegend	APC/Cy7 anti-mouse CD4	100414
Biolegend	Pacific Blue anti-mouse CD19	115523
Biolegend	Pacific Blue Anti-mouse CD11b antibody	101224
Biolegend	Pacific Blue Anti-mouse CD45 antibody	103126
Biolegend	Pacific Blue anti-mouse CD90,2	105324

10

20

30

40

【 0 0 4 1 】

その後、TRIZOL (Thermo Fisher Scientific)、SuperScript VIL0 (Thermo Fisher Scientific)を用いてRNA精製を行った。製品添付の製造者マニュアルに従って、得られたRNAをAgilent遺伝子発現マイクロアレイを用いて分析した。マイクロアレイで用いた試薬は以下の通りであった。

【 0 0 4 2 】

【表 2】

Agilent 品番	品名
G4852A	SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイキット 8x60K
5190-2305	Low Input Quick Amp Labeling Kit (1 color)
5188-5242	Gene Expression Hybridization kit
5188-5282	RNA Spick In Kit (1 color)
5188-5327	Gene Expression Wash pack
G2534-60014	8x60K アレイフォーマット用ガasketスライド

10

【 0 0 4 3 】

結果は、図 1 に示される通りであった。図 1 に示されるように、炎症を誘発させた急性期および慢性期の線維芽細胞においてのみ強発現する因子として Chl 1 を同定できた。

【 0 0 4 4 】

実施例 2 : Chl 1 の組織特異的発現の検証

次に、Chl 1 の発現を各種組織または細胞を用いて確認した。

【 0 0 4 5 】

(B) 上記同様に腸管上皮 (EpCAM陽性CD45陰性)、線維芽細胞 (COL1a2-GFP陽性CD45陰性Podoplanin陽性)、マクローファージ (F480陽性 CD11b陽性)、CD4陽性T細胞、B細胞 (CD19陽性B220陽性)、大腸粘膜固有層細胞 (whole colon cell) を単離し、それぞれの細胞からTRIZOL (Thermo Fisher Scientific/ Invitrogen: 15596018) を用いてRNAを精製し、次いでVIL0 (Thermo Fisher Scientific/ Invitrogen: 11755500) で逆転写を行い、Chl1の発現解析をUniversal Probe Library (ロシュ・ライフサイエンス) を用いて行ったLightCycler (商標) 480システム (ロシュ・ライフサイエンス)。Gapdhとの発現比較を示す(n=3)。結果は、図 2 に示される通りであった。

20

【 0 0 4 6 】

図 2 に示されるように、Chl 1 は、線維芽細胞において、特に急性期および慢性期の炎症を誘発した線維芽細胞において高発現を示した。このことから、Chl 1 は、急性および慢性炎症のマーカーとして好ましく用い得ることが示唆された。

30

【 0 0 4 7 】

実施例 3 : Chl 1 の発現部位の同定

本実施例では、Chl 1 が細胞膜上に発現することを示した。

【 0 0 4 8 】

(C) 正常(day0)の野生型C57Bl/6マウスおよびCHL1ノックアウトマウス (D. Montag Leibniz, Institute for Neurobiology, Germanより供与)、デキストラン硫酸ナトリウム水溶液による炎症急性期(day10-15)のC57Bl/6マウスの大腸粘膜固有層細胞を単離しCHL1発現についてAnti-Mouse CHL-1/L1CAM-2 Monoclonal Antibody (R&D Systems)およびAPCヤギ抗ラットIgG (Biolegend: 405407) を用いてフローサイトメトリー解析FACS Calibur (BD)を行った。ポドプラニン陽性線維芽細胞上に発現しているCHL1の発現を示した。結果は図 3 に示される通りであった。

40

【 0 0 4 9 】

図 3 に示されるように、正常型 (Day0) およびCHL1ノックアウト (KO) のフローサイトメトリー解析結果と比較して、急性期 (Day10-15) では、CHL1の細胞表面での発現が確認された。このことからChl 1 は炎症時に細胞膜上に発現することが明らかとなった。

【 0 0 5 0 】

(D) 次に、慢性炎症を誘発させたマウス大腸組織およびヒトクローン病大腸検体を用いてChl 1 の発現を確認した。

【 0 0 5 1 】

50

COL1a2-GFP tg/+ C57Bl/6マウスの正常および慢性腸炎時の大腸をそれぞれ回収後4%PFAで固定し、次いで10%および20%スクロースにて置換を行った。得られた組織から凍結組織切片作製用包埋剤（ティシュー・テック O.C.T. コンパウンド）を用いて凍結組織を作製した。凍結組織から薄切切片を作製し、Anti-Mouse CHL-1/L1CAM-2 Monoclonal Antibody (R&D Systems)、Goat anti human IgG (H+L) secondary antibody, Alexa 647 conjugate (Life Technologies: A21445)、およびDAPI（核）を用いて染色を行い蛍光顕微鏡（Keyence）で観察した。

【 0 0 5 2 】

ヒトクローン病大腸検体および健常人の検体（大阪大学消化器内科飯島英樹先生より供与）については下記プロトコルに準じて行った。

1. Retrieval A (BD: 550524)を用いて賦活化
2. Anti-human Fcblock (ebio 14-9161-73 mouse IgG2a)でブロッキング（室温30分）
3. 1次抗体として抗ヒトCHL1ウサギポリクローナル抗体 (abcam: ab106269)による一晩のインキュベーション（低温室）100uL/slides
4. 緩やかな震とう条件におけるPBSを用いた5分間×2回の洗浄
5. 2次抗体として抗ウサギAlexa 594α抗体（Biolegend:406405）による一晩のインキュベーション（低温室）100uL/slides
6. 緩やかな震とう条件におけるPBSを用いた5分間×2回の洗浄
7. DAPIによる染色（室温20分間、100uL/slides）
8. 緩やかな震とう条件におけるPBSを用いた5分間×2回の洗浄
9. Fluoremountによる封入

【 0 0 5 3 】

結果は図4に示される通りであった。図4上に示されるように、慢性期（図4上の右パネル）では、粘膜固有層および粘膜下層に存在するI型コラーゲン産生細胞（Col1）においてCHL1分子が強く発現していた。一方で正常組織（図4上の左パネル）では、CHL1分子の発現はほとんど認められなかった。

【 0 0 5 4 】

次に、炎症検体における免疫応答を確認した。結果は図4下に示される通りであった。図4下に示されるように、ヒトクローン病大腸検体（クローン病検体番号CD-13およびCD-68）でのCHL1蛋白質の発現が確認された。一方で健常人（HV-70）での発現は観察できなかった。この結果から、クローン病大腸検体では、組織全体にわたってCHL1タンパク質の蓄積が確認できた。

【 0 0 5 5 】

実施例4：損傷筋繊維の修復におけるCHL1の役割

本実施例では、CHL1の生理機能を調査した。

【 0 0 5 6 】

急性腸炎を呈した野生型（WT）およびCHL1 KOマウスより大腸粘膜固有層細胞を上記方法で単離し、下記表に示される組成を有する培地で培養し、接着細胞を回収し大腸上皮細胞下筋線維芽細胞を得た。

【 0 0 5 7 】

【表3】

	メーカー	濃度
GlutaMAX™ Supplement	GIBCO	×1
Recombinant Murine EGF	Peptotech	20ng/ml
apo-Transferrin from Human	ナカライテスク	10μg/ml
Insulin from bovine pancreas	Sigma	0.25U/ml

【 0 0 5 8 】

WTおよびCHL1 KOマウス由来の大腸上皮細胞下筋線維芽細胞を6 cm dishに播種したのち

10

20

30

40

50

、100 μL ピペットチップの先端を用いて、細胞に傷をつける scratch assay を行った。開始前、14時間後、19時間後の細胞の回復の様子を観察した。結果は図5に示される通りであった。

【0059】

図5に示されるように、WTでは、14時間後には既に損傷部位が回復していることが確認されたがCHL1をノックアウトすると回復が大幅に遅延することが明らかとなった。このことからCHL1ノックアウト線維芽細胞は活性が低下していることが示された。

【0060】

さらに、デキストラン硫酸ナトリウム投与による腸炎モデルを用いてCHL1の役割を解析した。具体的には、野生型C57Bl/6マウス(n=4)およびCHL1 KO (n=6)マウスにデキストラン硫酸ナトリウム水溶液(2.25%)を飲水投与により5日間投与し、その後、体重を測定した。また、Day18で大腸を採集しPFA固定後パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオシン染色を行った。さらに、COL1a2-GFP背景のCHL WTおよびCHL KOマウスを作製し、デキストラン硫酸ナトリウム水溶液処理後に抗EpCAM抗体、抗アクチン抗体、モノクローナル抗 - 平滑筋アクチン抗体 - Cy3TM標識 (Sigma C6198-100UL)で大腸組織を染色し観察した。結果は、図6に示される通りであった。

10

【0061】

図6により示されるように、先天的にCHL1を欠損したノックアウトマウスでは、大腸線維芽細胞の活性が低下して、粘膜の治癒に遅れが生じることが観察された(図6BおよびC)。また、CHL1を欠損したノックアウトマウスでは、体重の回復が野生型と比較して遅れた(図6A)。なお、図6Cによると、上皮細胞(EpCAMで染色される)および線維芽細胞(αSMAで染色される)において、これらの組織への集積レベルが低下していることが示されており、この結果は、線維芽細胞の活性の低下によって組織修復が遅延したことをサポートするデータであると言える。

20

【0062】

さらにまた、正常もしくは腸炎を起こしたCOL1a2-GFP tg/+ C57Bl/6マウスの大腸凍結組織をマウスCHL-1タンパク質(Fcタグ)(Sino Biological Inc) - ヤギ抗ヒトIgG(H+L)二次抗体, Alexa 647標識(Life Technologies: A21445)(赤)、およびDAPI(核)で染色し、蛍光顕微鏡(Keyence)で観察した。結果は図7左パネルの写真に示される通りであった。図7に示されるように、CHL1は腸炎を誘発した腸管組織において腸管上皮筋線維芽細胞および線維化が起こる粘膜下組織の局在する細胞に会合した(図7左写真)。

30

【0063】

また、正常C57Bl/6マウスよりCD45陰性EpCAM陰性(すなわち、上皮細胞でも免疫細胞でもない画分)として大腸粘膜固有層細胞を単離し、Podoplanin(gp38)、CD146に対する抗体(Biolegend)で染色をし、R1, R2, R3, R4, R5にゲートした(図7右参照)。R1~R5の画分それぞれに対して、CHL-1タンパク質(Fcタグ)(Sino Biological Inc) - ヤギ抗ヒトIgG(H+L)二次抗体Alexa 647標識(Life Technologies: A21445)を用いてFACS解析を行った。結果は図8に示される通りであった。

【0064】

図8に示されるように、CD45陰性EpCAM陰性の画分をさらにgp38およびCD146でR1~R5にゲートし、それぞれの画分に対してCHL1タンパク質を反応させたところ、R3画分においてCHL1と会合する細胞群が確認された。R3画分は、筋線維芽細胞の画分として知られる。このことからCHL1は筋線維芽細胞に対して機能することが示唆された。

40

【0065】

実施例5：抗CHL1モノクローナル抗体の作製と得られた抗体の機能解析

【0066】

マウスCHL1遺伝子(mChl1)をPhusion(サーモフィッシャーサイエンティフィック:F530L)を用いてPCRを行いpIRES2-EGFPベクターにクローニングした。mChl1-pIRES2-EGFPをY3Ag細胞(ラットマクロファ

50

ージ細胞株)に対してエレクトロポレーション法により遺伝子導入をし、7週令メスもしくはオスのSDラット(日本クレア)4匹にTiter Max Gold(フナコシ:G-1X5)と混合し足蹠および尾根部に免疫をした。3~8回の免疫後に鼠径部リンパ節、腸骨リンパ節を単離しAG8ミエローマ細胞とPEG1500(Roche:10783641001)を用いて細胞融合をした。得られたハイブリドーマについては、BMcondimed H1(Roche:11088947001)を加えた条件下でHAT培地(DSファーマバイオメディカル:16-808-49)、HT培地(DSファーマバイオメディカル:16-809-49)によって選択をした。培養上清を回収しmChl1 pIRES2-EGFPを遺伝子導入したHEK293細胞を培養上清との反応後に、APC goat anti-Rat IgG(Biolegend:405407)を用いてFACS解析により上清内の抗体価を検討した。図9に示されるように、細胞表面上のCHL1タンパク質を認識した。

10

【0067】

上記により得られたハイブリドーマクローン336についてはBalb/cヌードマウス(雌、7週齢、日本クレア社)に約 5×10^6 細胞腹腔投与し腹水を回収した。腹水についてはProtein Gを用いて抗体を精製し、以後の研究に用いた。

【0068】

次に、得られた抗体の活性を評価した。阻害活性については、大腸粘膜固有層細胞を回収後、 2×10^6 細胞をCHL-1タンパク質(Fcタグ)(Sino Biological Inc)50ng/50 μ lと4で30分間反応させ、その際にCHL1抗体(336)1 μ g/50 μ lを添加し、その後ヤギ抗ヒトIgG(H+L)二次抗体, Alexa647コンジュゲート(Life Technologies:A21445)を用いてCHL-1タンパク質の吸着反応への阻害をフローサイトメトリーによって検証した。結果は、図10左の上下パネルに示される通りであった。

20

【0069】

図10左のパネルに示されるように、336抗体の非存在下では、大腸粘膜固有層細胞はCHL1と結合し、細胞表面上のFcタグが抗体により検出できた(図10左上)。一方で、336抗体の存在下では、336抗体により大腸粘膜固有層細胞とCHL1タンパク質との結合が遮断された(図10左下)。同様に、75ngのCHL1-Fc存在下で336抗体は大腸粘膜固有層細胞へのCHL1タンパク質の結合を阻害した(図10右)

30

【0070】

以下では、得られた336抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列と軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。CDR-H1~-H3はそれぞれ、重鎖可変領域のCDR1~3(それぞれ配列番号1~3)を示し、CDR-L1~-L3はそれぞれ、軽鎖可変領域のCDR1~3(それぞれ配列番号5~7)を示す。

【0071】

336抗体の重鎖可変領域には、シグナル配列(MKCRWIIIFLMAVATGVNS)がそのN末端に存在するが以下では記載を省略する。336抗体の軽鎖可変領域には、シグナル配列(MDFRVQIFSFLLVSITVIVSSG)がそのN末端に存在するが以下では記載を省略する。

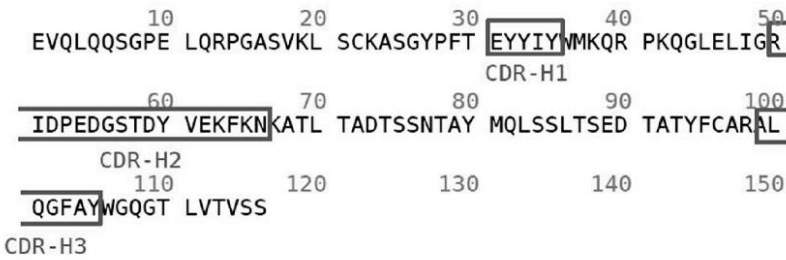
40

【0072】

【化1】

336抗体 重鎖可変領域

重鎖



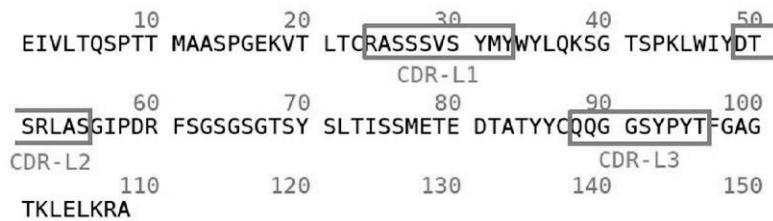
10

【0073】

【化2】

336抗体 軽鎖可変領域

軽鎖



20

【0074】

In vivo 阻害実験については、C57BL/6マウス（日本クレア）雄8週令にデキストラン硫酸ナトリウム水溶液2.25%による腸炎の誘導をし、336抗体（n=4）もしくはコントロール抗体（ポリクローナルラットIgG: BioXcell: BE0094）（n=4）を6日目～10日目にかけて連日250μg/回の腹腔投与を行った。体重変化について毎日16時前後に体重を測定した。11日目に解剖をし、大腸、および大腸HE染色（ヘマトキシリンエオシン染色）について代表的な写真を示す。結果は図11に示される通りであった。

30

【0075】

図11に示されるように、336抗体は、急性期における炎症の回復を遅延させた（図11左グラフ）。また、図11の右下のHE染色の結果も同様に、336抗体は急性期における炎症の回復を遅延させた。このことから、CHL1タンパク質の細胞膜上の受容体への結合を遮断できる抗体は、炎症を抑制できることが明らかとなった。

【0076】

実施例6: CHL1発現量を指標とした炎症の検査

【0077】

C57BL/6野生型マウスにデキストラン硫酸ナトリウム水溶液2.25%～2.5%の反復自由飲水によって慢性腸炎（線維化）を誘導した。10日目～15日目、60日目～70日目、100日目、120日目、130日目における大腸粘膜固有層中の線維芽細胞のCHL1発現についてFACS解析を行った。CHL1発現について抗マウスCHL1/L1CAM-2モノクローナル抗体（R&D Systems）-APCヤギ抗ラットIgG（Biolegend: 405407）を用いてFACS Calibur（BD）によりフローサイトメトリー解析を行った。細胞を血球系マーカーのCD45、線維芽細胞マーカーのポドプラニンに対する抗体で標識したのちに、CD45陰性、ポドプラニン陽性線維芽細胞を選択し、細胞表面上に発現しているCHL1の発現を解析した。結果は図12に示される通りであった。

40

【0078】

50

図12に示されるように、急性炎症の指標となる好中球の浸潤が軽減し且つ、腸炎誘導から60日後の慢性期においても発現が維持されていることが明らかとなった。慢性期におけるCHL1タンパク質の発現は細胞の線維化の指標となり得るものである。

【0079】

デキストラン硫酸ナトリウム水溶液を用いた急性(n=12)、慢性炎症(n=16)を呈しているマウス、ならびに未処理マウス(n=13)から糞便を採集し、糞便中のCHL1量を解析した。下記に実験の手法を示す。

【0080】

1日目

1. 精製された336抗体存在下で4で一晚インキュベートし96ウェルプレートにコーティングする(1μg/mlを100μL/ウェルで添加)

【0081】

2日目

1. 洗浄緩衝液(0.05% tween-PBS)で3回洗浄
 2. ブロッキング緩衝液(1% BSA含有PBS)を添加し(300μL/ウェル)、室温で少なくとも1時間インキュベート
 3. 洗浄緩衝液で3回洗浄
 4. 100μLのサンプル添加(1mg/10μL PBS 4で30分間ボルテックスおよび遠心分離15000rpm(15分)、次いで上清の回収
 一晚

【0082】

3日目

1. 洗浄緩衝液で3回洗浄
 2. ビオチン化336抗体を添加(detection Ab:stock 1mg/ml希釈液: reagent diluent 1% BSA in PBS)(1μg/mlを100μL/ウェルで添加)室温で2時間インキュベート
 3. 洗浄緩衝液で3回洗浄
 4. ストレプトアビジン-HRP(R&D lot#310801/Part#893975)(希釈率1:40で100μL/wells)を添加し2時間インキュベート
 5. 洗浄緩衝液で3回洗浄
 6. HRPの基質を添加(100μL/well)し、45分間インキュベート
 7. 反応停止液(50μL H₂SO₄)添加
 8. 吸光測定(450nm/570nm)

【0083】

結果は図13に示される通りであった。図13に示されるように、急性または慢性線炎のマウス群では通常のマウスよりも糞便中のCHL1量が統計学的に有意に高まっていた。このことから、糞便を用いてもCHL1のタンパク質量を測定することにより炎症の有無を判別することが可能であることが示された。この結果からはまた、CHL1が分泌因子として機能しうることを示している。

【0084】

実施例7：線維化誘導過程におけるCHL1抗体の治療学的意義

本実施例では、急性炎症後の線維化誘導過程におけるCHL1抗体の役割を調べた。

【0085】

デキストラン硫酸ナトリウムの反復自由飲水による腸管線維化マウスにおいて、前記反復飲水を3回目行った後に、体重減少が回復したタイミング(56~66日目)で、336抗体(250μg/投与)を連日腹腔内投与した。コントロール抗体としては、ポリクローナルラットIgG(BioXcell: BE0094)の腹腔内投与を行った。67日目または68日目にマウスを解剖し、大腸組織を回収後にパラフィン薄切切片を作製した。アザン染色もしくは - Smooth Muscle - Cy3™ antibody, Mouse monoclonal clone 1A4, purified

d from hybridoma cell culture (Sigma C6198-100UL) (赤)とDAPI (核:青)染色を行い、コラーゲンの沈着と活性化線維芽細胞・筋線維芽細胞の集積を解析した。結果は図14に示される通りであった。

【0086】

図14に示されるように、CHL1モノクローナル抗体である336抗体は、急性炎症後における組織へのコラーゲン沈着を抑制し、また、線維芽細胞の活性化を抑制した。

【0087】

上記実施例から、CHL1に対する抗体は、CHL1による炎症を抑制することが示された。また、炎症を慢性期において抑制した場合には、コラーゲンの沈着や線維芽細胞の活性化を抑制することができ、これにより、炎症組織の線維化を抑制しうることが明らかとなった。

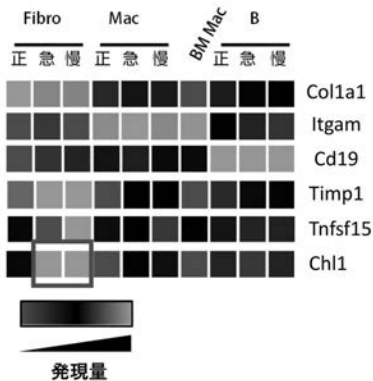
10

【0088】

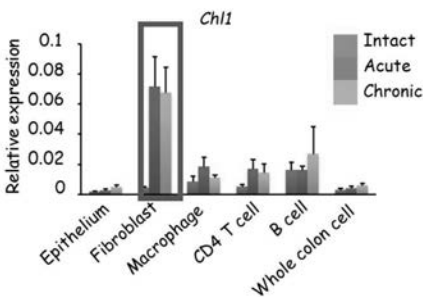
- 配列番号1：336抗体の重鎖CDR1のアミノ酸配列
- 配列番号2：336抗体の重鎖CDR2のアミノ酸配列
- 配列番号3：336抗体の重鎖CDR3のアミノ酸配列
- 配列番号4：336抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列
- 配列番号5：336抗体の軽鎖CDR1のアミノ酸配列
- 配列番号6：336抗体の軽鎖CDR2のアミノ酸配列
- 配列番号7：336抗体の軽鎖CDR3のアミノ酸配列
- 配列番号8：336抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列

20

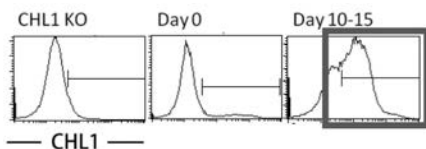
【図1】



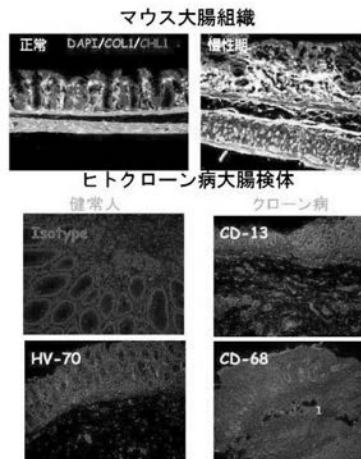
【図2】



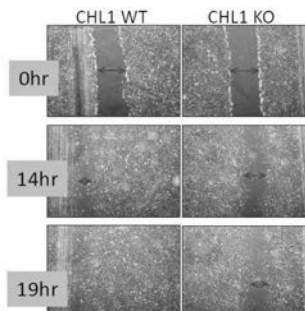
【図3】



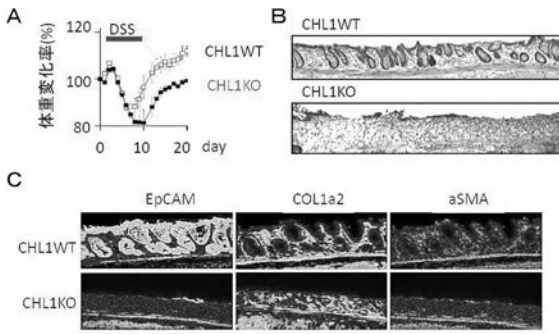
【図4】



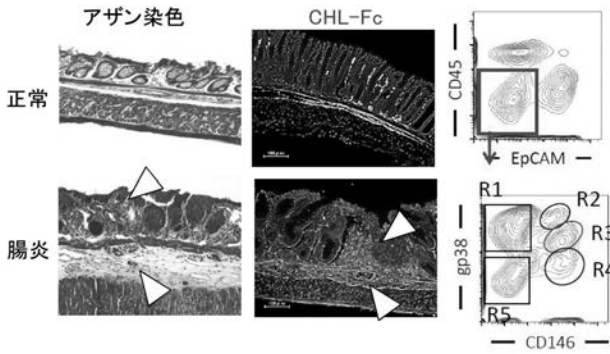
【図5】



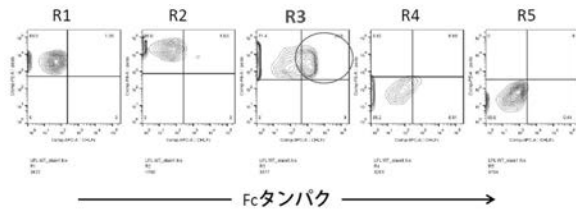
【 図 6 】



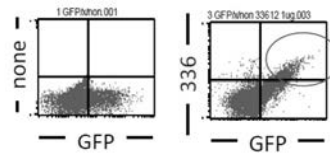
【 図 7 】



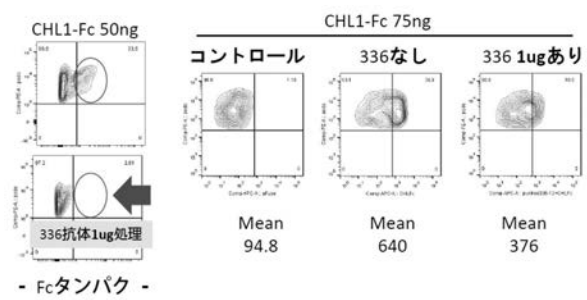
【 図 8 】



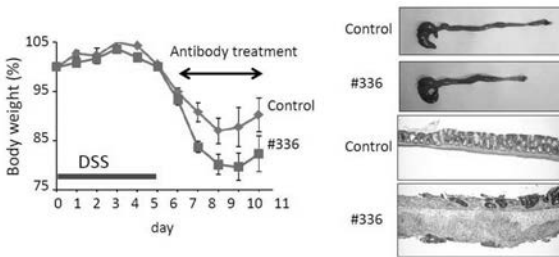
【 図 9 】



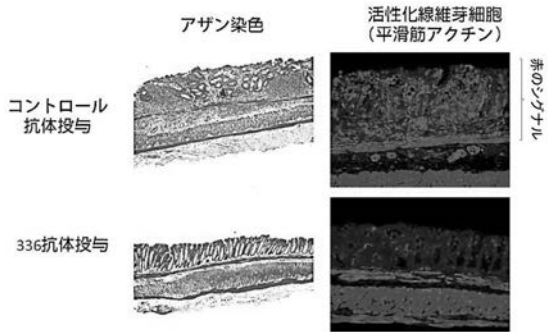
【 図 10 】



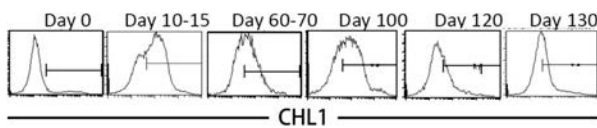
【 図 11 】



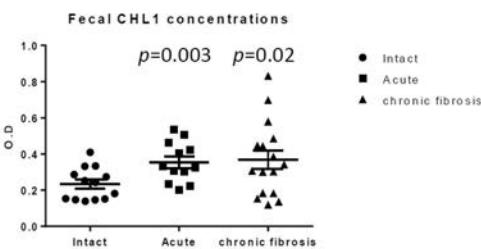
【 図 14 】



【 図 12 】



【 図 13 】



【配列表】

2018090524000001.app

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
G 0 1 N 33/68	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	G 0 1 N	33/68	
		C 1 2 N	15/00	A

(72)発明者 清野 宏

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

Fターム(参考) 2G045 AA25 CB01 DA36 FB03
 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ79 QR48 QR55 QS32 QX02
 4C085 AA13 AA14 EE01
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA22 EA50 FA74

专利名称(译)	抗纤维化相关分子的抗体及其医学应用		
公开(公告)号	JP2018090524A	公开(公告)日	2018-06-14
申请号	JP2016234717	申请日	2016-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人 东京大学		
申请(专利权)人(译)	东京大学		
[标]发明人	倉島洋介 清野宏		
发明人	倉島 洋介 清野 宏		
IPC分类号	C07K16/28 C12Q1/04 A61K39/395 A61P43/00 A61P29/00 G01N33/53 G01N33/68 C12N15/09		
CPC分类号	A61K39/395 A61P29/00 A61P43/00 C07K16/28 C12N15/09 C12Q1/04 G01N33/53 G01N33/68 A61K2039/505 C07K16/2803 C07K2317/565 C07K2317/76 G01N33/6854		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12Q1/04 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P43/00.105 A61P29/00 G01N33/53.D G01N33/68 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS32 4B063/QX02 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	森田 裕 松任谷裕子		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供针对纤维化相关分子的抗体及其医学应用。 解决方案：结合CHL1蛋白或抗体的抗原结合片段的抗体，其中与粘膜固有层和CHL1蛋白和非上皮非造血细胞的粘膜下非免疫系统结合。抗体或抗体的抗原结合片段，其中和。 【选择图表】无

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公開特許公報(A)	(11) 特許出願公開番号 特開2018-90524 (P2018-90524A)
	(43) 公開日	平成30年6月14日(2018.6.14)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	2G045
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04	4B063
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D	4C085
A61P 43/00 (2006.01)	A61K 39/395 N	4H045
A61P 29/00 (2006.01)	A61P 43/00 I O 5	
	審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全21頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号	特願2016-234717 (P2016-234717)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成28年12月2日(2016.12.2)	国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
		(74) 代理人
		弁護士 大野 聖二 100173185
		(74) 代理人
		弁護士 森田 裕 100119183
		(74) 代理人
		弁護士 松任谷 優子 100149076
		(74) 代理人
		弁護士 梅田 慎介 倉島 洋介
		(72) 発明者
		東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】	線維化関連分子に対する抗体およびその医療応用	