

(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2018-161125

(P2018-161125A)

(43) 公開日 平成30年10月18日(2018.10.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02 ZNA	4B063
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	4B064
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4C081
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4C084
A61P 37/02 (2006.01)	A61P 37/02	4C085

審査請求 有 請求項の数 41 O L (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-58898 (P2018-58898)
 (22) 出願日 平成30年3月26日 (2018. 3. 26)
 (31) 優先権主張番号 201710183354.8
 (32) 優先日 平成29年3月24日 (2017. 3. 24)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

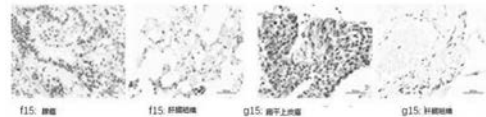
(71) 出願人 518104234
 鄭猛
 中華人民共和国広東省広州市天河直街30号華翰大廈906房
 (71) 出願人 518104245
 林曙光
 中華人民共和国広東省広州市越秀区東川路91号大院
 (74) 代理人 100170896
 弁理士 寺園 健一
 (74) 代理人 100131200
 弁理士 河部 大輔
 (72) 発明者 鄭猛
 中華人民共和国広東省広州市天河直街30号華翰大廈906房

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ヒトADRB3モノクローナル抗体及びその疾患診断と治療における応用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 3アドレナリン受容体(ADRB3)及びそのモノクローナル抗体の、腫瘍(悪性腫瘍)、炎症(慢性全身性炎症)、膿毒症、喘息、糖尿病、多臓器不全症候群、ウイルス感染、高齢化による疾患、貧血、重度の外傷、アレルギー性疾患、悪液質疾患、中毒、自己免疫疾患、器官移植免疫拒絶反応、肺動脈性肺高血圧症、アテローム性動脈硬化症、神経変性疾患、骨粗鬆症等の退行性骨疾患、肥大型心筋症やアルツハイマー病等の疾患治療への応用の提供。



【解決手段】 ADRB3、抗ヒトADRB3モノクローナル抗体、又は抗ADRB3キメラ抗原受容体で改変された細胞を、疾患治療、疾患診断、薬物製造又はバイオマーカーの検出に用いる方法。

【選択図】 図20

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

A D R B 3、抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体、又は抗 A D R B 3 キメラ抗原受容体で改変された細胞を、疾患治療、疾患診断、薬物製造又はバイオマーカーの検出に用いる方法。

【請求項 2】

前記 A D R B 3 は T リンパ球の共抑制シグナル分子である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 A D R B 3 による免疫機能異常は、自己免疫疾患、腫瘍、炎症、病原体感染、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、アルツハイマー病、パーキンソン病、老化、慢性疲労症候群、悪液質、肺動脈性肺高血圧症、高血圧、血栓性疾患、統合失調症、うつ病、依存症、ストレス障害、器官移植免疫拒絶反応、組織変性、線維性疾患、器官機能不全、生殖器及び性的機能不全、再生機能不全の共通の病理学的メカニズムとなる請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記 A D R B 3 は、ヒト免疫機能を調節する薬物を製造するための標的である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 A D R B 3 は、G 0 期細胞、腫瘍細胞、ヒト骨髄由来サプレッサー細胞、リンパ球、調節性 T 細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、好中球、単核 - マクロファージ、血小板、破骨細胞又は小膠細胞を検出するバイオマーカーとして用いられる請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記 A D R B 3 は、腫瘍、炎症、膿毒症、喘息、糖尿病、多臓器不全症候群、ウイルス感染症、高齢化による疾患、アレルギー性疾患、悪液質、中毒性疾患、自己免疫疾患、器官移植免疫拒絶反応、肺動脈性肺高血圧症、急性冠症候群、変形性関節症又は神経変性疾患の診断及び / 又は治療標的である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体は、ヒト組織、細胞中の A D R B 3 タンパク質含有量及び / 又は血液又は脳脊髄液中の可溶性 A D R B 3 タンパク質含有量の検出に用いられる請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体は A D R B 3 の機能調節に用いられる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体は、顆粒球、リンパ球、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞又は単核 - マクロファージの機能調節に用いられる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体は、免疫関連疾患の診断及び / 又は治療に用いられる請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 11】

前記抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体は、ヒト免疫機能を調節する薬物として用いられるか、又はその製造に用いられる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体は、免疫チェックポイント阻害剤の製造に用いられる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体は、悪性腫瘍の診断及び / 又は治療に用いられる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

50

前記抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、抗癌薬及び／又は抗癌ワクチンとして用いられるか、その製造に用いられる請求項1に記載の方法。

【請求項15】

前記抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、腫瘍多剤耐性逆転薬として用いられるか、その製造に用いられる請求項1に記載の方法。

【請求項16】

前記抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、炎症性疾患の診断及び／又は治療に用いられる請求項1に記載の方法。

【請求項17】

前記抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、抗炎症薬として用いられるか、その製造に用いられる請求項1に記載の方法。

10

【請求項18】

前記抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、細菌、ウイルス、真菌、マイコプラズマ、クラミジア又はプリオン感染症の診断及び／又は治療に用いられる請求項1に記載の方法。

【請求項19】

前記抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、自己免疫疾患の診断及び／又は治療に用いられる請求項1に記載の方法。

【請求項20】

前記抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、糖尿病の診断及び／又は治療に用いられる請求項1に記載の方法。

20

【請求項21】

前記抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、中毒性疾患の診断及び／又は治療に用いられる請求項1に記載の方法。

【請求項22】

前記抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、神経変性疾患の診断及び／又は治療の応用に用いられる請求項1に記載の方法。

【請求項23】

前記神経変性疾患は、アルツハイマー病又はパーキンソン病を含むことを特徴とする請求項22に記載の方法。

30

【請求項24】

前記抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、精神病の診断及び／又は治療に用いられる請求項1に記載の方法。

【請求項25】

前記抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、依存症の診断及び／又は治療に用いられる請求項1に記載の方法。

【請求項26】

前記抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、心臓血管・脳血管疾患の診断及び／又は治療の応用に用いられる請求項1に記載の方法。

【請求項27】

前記抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、抗アテローム性動脈硬化症薬の製造に用いられる請求項1に記載の方法。

40

【請求項28】

前記抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、心不全の診断及び／又は治療に用いられる請求項1に記載の方法。

【請求項29】

前記抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、抗血小板薬、抗血栓薬の製造に用いられる請求項1に記載の方法。

【請求項30】

前記抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、抗老化薬の製造に用いられる請求項1に

50

記載の方法。

【請求項 3 1】

前記抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体は、ヒトの肝臓、心筋、膵臓、脳、神経、腎臓、肺又は筋肉組織の再生能力を促進する薬物の製造に用いられる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体は、線維性疾患の診断及び / 又は治療に用いられる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体は、器官移植免疫拒絶反応の予防及び / 又は治療に用いられる請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3 4】

前記抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体は、変形性関節症の診断及び / 又は治療に用いられる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体は、アレルギー性疾患の診断及び / 又は治療に用いられる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体は、生殖器及び性的機能不全性疾患の診断及び / 又は治療に用いられる請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3 7】

前記抗 A D R B 3 キメラ抗原受容体で改変された T リンパ球は、悪性腫瘍、自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化症、炎症性疾患、ウイルス感染、アルツハイマー病又は老化防止の治療に用いられる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記抗 A D R B 3 キメラ抗原受容体で改変されたマクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞は、悪性腫瘍、自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化症、炎症性疾患、ウイルス感染、アルツハイマー病又は老化防止の治療に用いられる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 9】

A D R B 3 活性化作用を有する A D R B 3 抗体、A D R B 3 アゴニスト又は遺伝子組換え技術によるヒト A D R B 3 タンパク質は、白血球成長促進剤の製造に用いられる請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 4 0】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体を製造するポリペプチド断片であって、

ポリペプチドとして、ヒト A D R B 3 全長タンパク質、A D R B 3 タンパク質の N 末端の 1 - 1 5 5 位のアミノ酸残基断片、A D R B 3 タンパク質の C 末端の 1 5 6 - 4 0 8 位のアミノ酸残基断片、A D R B 3 タンパク質における 2 9 6 - 3 1 7 位のアミノ酸残基であるロイシンジッパー断片、A D R B 3 タンパク質における 3 5 1 - 3 6 9 位のアミノ酸残基の核局在化配列、A D R B 3 タンパク質における 1 - 3 6 位のアミノ酸残基の E 1 断片、A D R B 3 タンパク質における 1 0 1 - 1 1 1 位のアミノ酸残基の E 2 断片、A D R B 3 タンパク質における 1 3 4 - 1 5 5 位のアミノ酸残基の I 2 断片、A D R B 3 タンパク質における 3 1 5 - 3 2 6 位のアミノ酸残基の E 4 断片、A D R B 3 タンパク質における 3 4 8 - 4 0 8 位のアミノ酸残基の I 4 断片、3 4 4 - 3 4 9 位のアミノ酸残基断片、1 4 3 - 1 4 8 位のアミノ酸残基の I T I M 1 断片、1 4 0 - 1 4 6 位のアミノ酸残基の I T I M 1 断片、2 0 2 - 2 0 7 位のアミノ酸残基の I T I M 2 断片、1 9 9 - 2 0 4 位のアミノ酸残基の I T I M 2 断片、2 1 2 - 2 1 7 位のアミノ酸残基の I T I M 3 断片を含むが、これらに制限されないことを特徴とするポリペプチド断片。

40

【請求項 4 1】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体であって、

(1) 2 0 1 5 年 9 月 3 日に中国典型培養物寄託センター (C C T C C) に寄託され、

50

寄託番号が CCTCC No: C2015146 であるハイブリドーマ細胞系 5D1 によるモノクローナル抗体；

(2) 2016年12月12日に中国典型培養物寄託センター(CCTCC)寄託され、寄託番号がC2016202のハイブリドーマ細胞系5B8によるモノクローナル抗体；

(3) 2015年9月3日に中国典型培養物寄託センター(CCTCC)に寄託され、寄託番号がCCTCC No: C2015147のハイブリドーマ細胞系4G7によるモノクローナル抗体；

(4) 2016年12月12日に中国典型培養物寄託センター(CCTCC)に寄託され、寄託番号がC2016203のハイブリドーマ細胞系5D9によるモノクローナル抗体；

(5) ハイブリドーマ細胞系5D1、5B8、4G7又は5D9によるモノクローナル抗体の結合特性を有するモノクローナル抗体；

(6) ハイブリドーマ細胞系5D1、5B8、4G7又は5D9によるモノクローナル抗体と結合可能なエピトープ結合とのモノクローナル抗体；

(7) 競合的結合測定においてハイブリドーマ細胞系5D1、5B8、4G7又は5D9によるモノクローナル抗体と競合可能なモノクローナル抗体；

(8) ADRB3を特異的結合可能なウサギモノクローナル抗体、マウス由来モノクローナル抗体、キメラ抗体、完全ヒト由来抗体、単ドメイン抗体、一本鎖抗体、Fab抗体断片、合成抗体；

(9) 下記複数のADRB3抗原とエピトープ結合することで、ADRB3タンパク質活性を調節する抗ADRB3抗体：S212、S239、S349、C110、C189、T65、T140、S191、Y336、Y346、K151、R152、C153、P343、P350、P368、P369、P371、P377、P381、P391、P394、H190、H288、N8、N26、T150、T108、T114、G41、G106、G146、G271、G295、G383、G402、C275、C363、Y145、Y145、Y204、Y214、Y236、Y346(ただし、S:セリン、C:システイン、T:スレオニン、Y:チロシン、K:リシン、R:アルギニン、C:システイン、P:パリン、H:ヒスチジン、N:アスパラギン)；

(10) ADRB3を特異的結合した抗体；から選ばれ、

(10) 抗体は、

(a) 下記重鎖相補性決定領域を含有し、

i) SEQ ID NO: 1、4、7、10と少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する第1相補性決定領域；

ii) SEQ ID NO: 2、5、8、11と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する第2相補性決定領域；

iii) SEQ ID NO: 3、6、9、12と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する第3相補性決定領域；及び

(b) 下記軽鎖相補性決定領域を含有し、

i) SEQ ID NO: 13、16、19、22と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する第1相補性決定領域；

ii) SEQ ID NO: 14、17、20、23と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する第2相補性決定領域；及び

iii) SEQ ID NO: 15、18、21、24と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する第3相補性決定領域；

(c) ヒト化抗体の重鎖可変領域にSEQ ID NO: 25と少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び/又は

(d) ヒト化抗体の軽鎖可変領域にSEQ ID NO: 26と少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、

ことを特徴とする抗ヒトADRB3モノクローナル抗体。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はバイオ医薬品の技術分野に属し、具体的には、免疫調節シグナル伝達経路の技術に関する。より具体的には、抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、抗癌、抗炎症、抗毒素、抗アレルギー、抗ウイルス感染、抗自己免疫疾患、抗悪液質、ショック防止、抗アテローム性動脈硬化症、抗変形性関節症、抗神経変性、抗老化薬の製造における新用途に関する。

【背景技術】

【0002】

人体内の3アドレナリン受容体(Adrenoceptor Beta 3、ADRB3、B3AR、beta3 adrenoceptor、3受容体)はカテコールアミンを媒介する役割を果たす組織受容体の1種であり、Gタンパク質結合型である。従来、ADRB3についての研究は主に体脂肪、血糖と血中脂質のレベル、インシュリン分泌及び作用への影響に注目されている。

【0003】

ADRB3の悪性腫瘍、アテローム性動脈硬化症、アルツハイマー病、炎症、膿毒症、多臓器不全症候群、ウイルス感染、自己免疫疾患、器官移植免疫拒絶反応、老化、骨粗鬆症、重度の外傷、中毒、悪液質等の疾患の分野での作用に関しては、まだ関連研究や報道がなかった。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、ヒトADRB3及びそのモノクローナル抗体の、腫瘍(悪性腫瘍)、炎症(慢性全身性炎症)、膿毒症、喘息、糖尿病、多臓器不全症候群、ウイルス感染、高齢化による疾患、貧血、重度の外傷、アレルギー性疾患、悪液質疾患、中毒、自己免疫疾患、器官移植免疫拒絶反応、肺動脈性肺高血圧症、アテローム性動脈硬化症、神経変性疾患、骨粗鬆症等の退行性骨疾患、肥大性心筋症やアルツハイマー病等の疾患治療における応用を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の上記目的は開示された以下の技術案によって達成される。

【0006】

本発明では、大量の研究及び探索的実験を行ったところ、ADRB3は神経-内分泌-免疫調節ネットワークにおける重要な受容体であり、ADRB3媒介シグナル伝達経路が好中球、リンパ球や腫瘍細胞の増殖及び分化を調節することを見出した。健常な状態では、ADRB3は生体の非特異的免疫と特異的免疫の能力を維持して、外因性病原性微生物や老化した生体組織を除去することで、生体保護及び老化防止の作用を果たす。病理学的な状態では、該シグナル伝達経路の過剰な活性化により、系の慢性炎症を引き起こして、免疫恒常性を破壊する。このような共通メカニズムによれば、ADRB3は複数種の疾患関連に繋がる。ADRB3のモノクローナル抗体は、ADRB3と特異的結合してその活性を調節(遮断又は作動)できるため、炎症、ウイルス感染、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、神経変性疾患、自己免疫疾患、悪性腫瘍や高齢化による疾患等の治療に用いられ得る。すなわち、本質的には、これら疾患の治療メカニズムはいずれもADRB3に関連するものであり、ADRB3を遮断又は作動することによって疾患を予防、調節及び治療する。

【0007】

従って、本発明はADRB3及び抗ADRB3ポリクローナル抗体の以下の応用を開示する。

ADRB3のヒト免疫機能調節における応用。

10

20

30

40

50

A D R B 3 による免疫機能異常は、自己免疫疾患、腫瘍、炎症、ウイルス病原体感染、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、アルツハイマー病、パーキンソン病、老化、慢性疲労症候群、悪液質、肺動脈性肺高血圧症、高血圧、血栓性疾患、統合失調症、うつ病、依存症、ストレス障害、器官移植免疫拒絶反応、組織変性、線維性疾患、器官機能不全、生殖器及び性的機能不全、再生機能不全の共通の病理学的メカニズムとなる。

【 0 0 0 8 】

A D R B 3 のヒト免疫機能を調節する薬物を製造する標的としての応用。

【 0 0 0 9 】

A D R B 3 の、G 0 期細胞、腫瘍細胞、ヒト骨髓由来サプレッサー細胞 (M D S C)、リンパ球、調節性 T 細胞 (T r e g)、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、好中球、単核 - マクロファージ、造血幹細胞、巨核球、リンパ系前駆細胞、骨髓系前駆細胞、骨髓系細胞、血小板、破骨細胞又は小膠細胞を検出するバイオマーカーとしての応用。特に骨髓芽球、前骨髓球、骨髓球、好中球、好酸球、骨髓由来サプレッサー細胞、腫瘍関連マクロファージ、マスト細胞、樹状細胞、調節性 T 細胞、異型リンパ球、T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー細胞 (N K 細胞)、抗原提示細胞、プラズマ細胞、原始リンパ球又は幼若リンパ球を検出するマーカーとしての応用。

10

【 0 0 1 0 】

A D R B 3 の、腫瘍細胞の悪性度、転移予後の評価及び / 又は治療効果検測用のバイオマーカーとしての応用、細胞増殖及び / 又は細胞分化能力を評価するマーカー、及び特異的免疫機能及び / 又は老化程度を評価するマーカーとしての応用。

20

【 0 0 1 1 】

A D R B 3 の、腫瘍、炎症、膿毒症、喘息、糖尿病、多臓器不全症候群、ウイルス感染症、高齢化による疾患、アレルギー性疾患、悪液質、中毒性疾患、自己免疫疾患、器官移植免疫拒絶反応、肺動脈性肺高血圧症、急性冠症候群、変形性関節症又は神経変性疾患の診断及び / 又は治療標的としての応用。

【 0 0 1 2 】

A D R B 3 の、特異的免疫機能を評価するマーカーとしての応用。

【 0 0 1 3 】

A D R B 3 の、T リンパ球の共抑制シグナル分子としての応用。

【 0 0 1 4 】

可溶性 A D R B 3 の生体免疫機能調節における応用。

30

【 0 0 1 5 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、体液可溶性 A D R B 3 の検出・調節における応用。

【 0 0 1 6 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、細胞、組織中の A D R B 3 タンパク質含有量の検出における応用。

【 0 0 1 7 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、免疫プロットティング、蛍光 *i n s i t u* ハイブリダイゼーション技術、免疫沈降、免疫組織化学、エライザ法 (E L I S A)、免疫蛍光、磁気細胞選別、免疫金コロイド検出又はフローサイトメトリー等の免疫学的実験、ヒト血清、組織細胞、人体分泌物又は細胞培養物中の A D R B 3 タンパク質の検出における応用。

40

【 0 0 1 8 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、A D R B 3 機能調節における応用。

【 0 0 1 9 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、ケモカイン、免疫抑制性受容体及び / 又は神経細胞接着分子の機能調節における応用。

【 0 0 2 0 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、免疫関連疾患の診断及び / 又は治療における

50

応用。

【0021】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、免疫チェックポイント阻害剤の製造における応用。

【0022】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、Tリンパ球共抑制機能を調節する薬物の製造における応用。

【0023】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、先天性免疫機能の調節における応用。

【0024】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、補体機能調節における応用。

【0025】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、免疫耐性機能調節における応用。

【0026】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、抗原提示機能調節における応用。

【0027】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、免疫アジュバントによるワクチン機能の促進における応用。

【0028】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、悪性腫瘍の診断及び/又は治療における応用

。 【0029】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、抗癌又は抗腫瘍薬又はワクチンの製造における応用。

【0030】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、乳癌、肺癌、膵臓癌、肝癌、神経膠腫、結腸癌、直腸癌、腎臓癌、膀胱癌、胃癌、食道癌、黒色腫、リンパ腫、前立腺癌、卵巣癌、子宮内膜癌、胆管癌、骨肉腫、甲状腺癌又は白血病の診断及び/又は治療における応用。具体的に、ADRB3抗体で血液、脳脊髄液、胸水や腹水等の体液における可溶性ADRB3を検出することで、疾患を診断できる。

【0031】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、抗腫瘍転移薬の製造における応用。

【0032】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、腫瘍多剤耐性逆転薬の製造における応用。

【0033】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、悪性腫瘍患者の予後判断及び/又は治療効果の監視における応用。

【0034】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、悪液質の診断及び/又は治療における応用。

【0035】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、炎症性疾患の診断及び/又は治療における応用。

【0036】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、抗炎症薬の製造における応用。

【0037】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、細菌、真菌、マイコプラズマ、クラミジア又はプリオン等の病原体感染症の診断及び/又は治療における応用。

【0038】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、淋菌感染症の診断及び/又は治療における応用。

10

20

30

40

50

- 【0039】
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、ウイルス感染症の診断及び／又は治療における応用。
- 【0040】
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、呼吸器ウイルス感染症の診断及び／又は治療における応用。
- 【0041】
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、B型肝炎ウイルス感染症の診断及び／又は治療における応用。
- 【0042】 10
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、エイズの診断及び／又は治療における応用。
- 【0043】
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、抗ウイルスワクチンの製造における応用。
- 【0044】
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、腎炎、肝炎、肺炎、心筋炎又は脳炎の診断及び／又は治療における応用。
- 【0045】
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、内毒素血症の診断及び／又は治療における応用。
- 【0046】 20
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、感染性ショックの診断及び／又は治療における応用。
- 【0047】
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、膿毒症の診断及び／又は治療における応用。
- 【0048】
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、多臓器不全症候群の診断及び／又は治療における応用。
- 【0049】
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、自己免疫疾患の診断及び／又は治療における応用。 30
- 【0050】
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の自己免疫疾患を治療する薬物の製造における応用。
- 【0051】
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、全身性エリテマトーデスの診断及び／又は治療における応用。
- 【0052】
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、関節リウマチの診断及び／又は治療における応用。
- 【0053】 40
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、慢性潰瘍性大腸炎の診断及び／又は治療における応用。
- 【0054】
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、乾癬の診断及び／又は治療における応用。
- 【0055】
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、シェーグレン症候群の診断及び／又は治療における応用。
- 【0056】
抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体の、多発性硬化症の診断及び／又は治療における応用。 50

- 【0057】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、糖尿病の診断及び／又は治療における応用。
- 【0058】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、中毒性疾患の診断及び／又は治療における応用。
- 【0059】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、神経変性疾患の診断及び／又は治療における応用。
- 【0060】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、アルツハイマー病又はパーキンソン病の診断及び／又は治療における応用。 10
- 【0061】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、記憶改善薬の製造における応用。
- 【0062】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、精神病の診断及び／又は治療における応用。
- 【0063】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、統合失調症の診断及び／又は治療における応用。
- 【0064】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、抗うつ薬の製造における応用。 20
- 【0065】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、抗ストレス障害薬の製造における応用。
- 【0066】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、依存症の診断及び／又は治療における応用。
- 【0067】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、抗アルコール薬又は抗薬物依存症薬の製造における応用。
- 【0068】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、抗アンフェタミン中毒又は抗ヘロイン中毒薬の製造における応用。 30
- 【0069】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、心臓血管・脳血管疾患の診断及び／又は治療における応用。
- 【0070】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、抗アテローム性動脈硬化症薬の製造における応用。
- 【0071】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、抗血小板薬、抗血栓薬物の製造における応用。
- 【0072】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、血栓塞栓症を治療する薬物の製造における応用。 40
- 【0073】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、脳、肝、肺、腸、腎臓、心虚血又は再灌流傷害を治療する薬物の製造における応用。
- 【0074】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、脳卒中治療薬の製造における応用。
- 【0075】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、肺塞栓症を治療する薬物の製造における応用。 50

- 【0076】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、抗好中球薬の製造における応用。
- 【0077】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、急性冠症候群の診断及び／又は治療における応用。
- 【0078】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、心不全の診断及び／又は治療における応用。
- 【0079】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、高血圧の診断及び／又は治療における応用。
- 【0080】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、血中脂質調節における応用。 10
- 【0081】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、肺動脈性肺高血圧症の診断及び／又は治療における応用。
- 【0082】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、薬物溶出ステント又は薬物溶出バルーンの製造における応用。
- 【0083】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、高齢化による疾患の診断及び／又は治療における応用。 20
- 【0084】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、抗老化薬の製造における応用。
- 【0085】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、上記疾患の治療薬又は抗顆粒球薬、化学療法薬の増感剤、止血薬、補体部分アゴニスト、免疫アジュバント、二重特異性抗体、分化誘導剤、デアセチラーゼ阻害剤、エラスターゼ阻害剤としての応用、又はそれらの製造における応用。
- 【0086】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、スキンケア、抗皮膚老化又は美容類の化粧品の製造における応用。皮膚老化を遅延させて、皮膚の弾性を回復させ、しぼや色素沈着を減少させる効果がある。 30
- 【0087】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、抗疲労又は睡眠改善、及び抗疲労又は睡眠改善の薬物又は製剤の製造における応用。
- 【0088】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、抗慢性疲労症候群薬物の製造における応用。
- 【0089】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、ヒト組織再生能力を促進する薬物の製造における応用。
- 【0090】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、肝臓再生能力を促進する薬物の製造における応用。 40
- 【0091】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、心筋、肝臓、骨髄、膵臓、脳、神経、腎臓、肺又は筋肉等の組織再生を促進する薬物の製造における応用。
- 【0092】
抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、白血球減少症、好中球減少症、リンパ球減少症、再生不良性貧血、加齢による筋ジストロフィー、加齢黄斑変性症等の疾患の治療における応用。
- 【0093】
 50

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、線維性疾患の診断及び / 又は治療における応用。

【 0 0 9 4 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、肺繊維化、珪肺症の診断及び / 又は治療における応用。

【 0 0 9 5 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、器官移植免疫拒絶反応の予防及び / 又は治療における応用。

【 0 0 9 6 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、器官移植免疫抑制剤の製造における応用。

10

【 0 0 9 7 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、変形性関節症の診断及び / 又は治療における応用。

【 0 0 9 8 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、骨粗鬆症の診断及び / 又は治療における応用。

【 0 0 9 9 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、アレルギー性疾患の診断及び / 又は治療における応用。

【 0 1 0 0 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、抗アレルギー薬物の製造における応用。

20

【 0 1 0 1 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、喘息の診断及び / 又は治療における応用。

【 0 1 0 2 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、生殖器及び性的機能不全性疾患の診断及び / 又は治療における応用。

【 0 1 0 3 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、不妊症の治療における応用。

【 0 1 0 4 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、勃起不全、早漏の治療における応用。

30

【 0 1 0 5 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、キメラ抗原受容体 T 細胞の製造における応用。

【 0 1 0 6 】

抗 A D R B 3 キメラ抗原受容体で改変された T リンパ球の、悪性腫瘍の治療における応用。

【 0 1 0 7 】

抗 A D R B 3 キメラ抗原受容体で改変された T リンパ球の、自己免疫疾患の治療又は治療薬の製造における応用。

【 0 1 0 8 】

抗 A D R B 3 キメラ抗原受容体で改変された T リンパ球の、炎症性疾患の治療又は治療薬の製造における応用。

40

【 0 1 0 9 】

抗 A D R B 3 キメラ抗原受容体で改変された T リンパ球の、アテローム性動脈硬化症の治療又は治療薬の製造における応用。

【 0 1 1 0 】

抗 A D R B 3 キメラ抗原受容体で改変された T リンパ球の、ウイルス感染症の治療又は治療薬の製造における応用。

【 0 1 1 1 】

抗 A D R B 3 キメラ抗原受容体で改変された T リンパ球の、神経変性疾患の治療又は治

50

療薬の製造における応用。

【0112】

抗ADRB3キメラ抗原受容体で改変されたTリンパ球の、老化防止又は抗老化薬の製造における応用。

【0113】

抗ADRB3キメラ抗原受容体で改変されたマクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞の、悪性腫瘍、自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化症、炎症、ウイルス感染、神経変性疾患又は高齢化による疾患の治療又は治療薬の製造における応用。

【0114】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、腫瘍細胞、好中球、単核-マクロファージ、骨髄由来プレッサー細胞、調節性T細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、血小板、リンパ球の増殖及び分化の調節における応用。

10

【0115】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、樹状細胞機能調節における応用。

【0116】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、Bリンパ球機能の調節における応用。

【0117】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、ナチュラルキラー細胞機能の調節における応用。

【0118】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、単核-マクロファージ機能の調節における応用。

20

【0119】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、赤血球機能の調節における応用。

【0120】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、グリア細胞機能の調節における応用。

【0121】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、造血幹細胞機能の調節における応用。

【0122】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、ミトコンドリア機能の調節における応用。

30

【0123】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、リボソーム機能の調節における応用。

【0124】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、核小体機能の調節における応用。

【0125】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、リゾソーム機能の調節における応用。

【0126】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、細胞骨格と細胞移動能力の調節における応用。

【0127】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、細胞微小管機能の調節における応用。

40

【0128】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、細胞接着能力の調節における応用。

【0129】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、遺伝子のエピジェネティックな改変の調節における応用。

【0130】

抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の、アミノ酸アセチル化改変の調節における応用。

【0131】

50

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、細胞自食機能の調節における応用。

【 0 1 3 2 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、細胞解糖の調節における応用。

【 0 1 3 3 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、G 0 期細胞機能の調節における応用。

【 0 1 3 4 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、G 0 期細胞の同定、スクリーニングにおける応用。

【 0 1 3 5 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、細胞周期調節における応用。腫瘍細胞、幹細胞、顆粒球、単核 - マクロファージ及びリンパ球の細胞周期及び有糸分裂機能の調節が含まれる。

10

【 0 1 3 6 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、細胞有糸分裂の調節における応用。

【 0 1 3 7 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、細胞分化及び増殖機能の調節における応用。

【 0 1 3 8 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、アポトーシス調節における応用。

【 0 1 3 9 】

抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体の、コーティング薬物として薬物溶出ステント又は薬物溶出バルーンの製造に用いるときの応用。

20

【 0 1 4 0 】

A D R B 3 活性化作用を有する A D R B 3 抗体、A D R B 3 アゴニスト又は遺伝子組換え技術によるヒト A D R B 3 タンパク質の、白血球成長促進剤の製造における応用。

【 0 1 4 1 】

A D R B 3 タンパク質又はポリペプチドの、骨髄球系の造血を促進する薬物の製造における応用。

【 0 1 4 2 】

本発明はさらに、抗 A D R B 3 抗体に関連する A D R B 3 エピトープを開示し、抗原エピトープとして、S 2 1 2、S 2 3 9、S 3 4 9、C 1 1 0、C 1 8 9、T 6 5、T 1 4 0、S 1 9 1、Y 3 3 6、Y 3 4 6、K 1 5 1、R 1 5 2、C 1 5 3、P 3 4 3、P 3 5 0、P 3 6 8、P 3 6 9、P 3 7 1、P 3 7 7、P 3 8 1、P 3 9 1、P 3 9 4、H 1 9 0、H 2 8 8、N 8、N 2 6、T 1 5 0、T 1 0 8、T 1 1 4、G 4 1、G 1 0 6、G 1 4 6、G 2 7 1、G 2 9 5、G 3 8 3、G 4 0 2、C 2 7 5、C 3 6 3、Y 1 4 5、Y 2 0 4、Y 2 1 4、Y 2 3 6、Y 3 4 6 を含むが、これらに制限されない。本発明に係る抗体は、上記エピトープと結合することで、A D R B 3 機能を調節する作用を果たし、なお、上記エピトープに制限されない。(S : セリン、C : システイン、T : スレオニン、Y : チロシン、K : リシン、R : アルギニン、C : システイン、P : バリン、H : ヒスチジン、N : アスパラギン)。

30

【 0 1 4 3 】

本発明は、抗 A D R B 3 抗体の製造に必要なポリペプチド断片を開示し、ポリペプチドとして、

40

ヒト A D R B 3 全長タンパク質 (1 - 4 0 8 アミノ酸残基)、A D R B 3 タンパク質の N 末端の 1 - 1 5 5 位のアミノ酸残基断片、A D R B 3 タンパク質の C 末端の 1 5 6 - 4 0 8 位のアミノ酸残基断片、A D R B 3 タンパク質における 2 9 6 - 3 1 7 位のアミノ酸残基のロイシンジッパー断片、A D R B 3 タンパク質における 3 5 1 - 3 6 9 位のアミノ酸残基の核局在化配列 (N L S)、A D R B 3 タンパク質における 1 - 3 6 位のアミノ酸残基の E 1 断片、A D R B 3 タンパク質における 1 0 1 - 1 1 1 位のアミノ酸残基の E 2 断片、A D R B 3 タンパク質における 1 3 4 - 1 5 5 位のアミノ酸残基の I 2 断片、A D R B 3 タンパク質における 3 1 5 - 3 2 6 位のアミノ酸残基の E 4 断片、A D R B 3 タン

50

パク質における 348 - 408 位のアミノ酸残基の I 4 断片、344 - 349 位のアミノ酸残基断片、143 - 148 位のアミノ酸残基の I T I M 1 断片、140 - 146 位のアミノ酸残基の I T I M 1 断片、202 - 207 位のアミノ酸残基の I T I M 2 断片、199 - 204 位のアミノ酸残基の I T I M 2 断片、212 - 217 位のアミノ酸残基の I T I M 3 断片を含むが、これらに制限されない。

【0144】

本発明はさらに、抗ヒト A D R B 3 モノクローナル抗体に関する、

(1) 2015 年 9 月 3 日に中国典型培養物寄託センター (C C T C C) に寄託され、寄託番号が C C T C C No: C 2 0 1 5 1 4 6 のハイブリドーマ細胞系 5 D 1 によるモノクローナル抗体;

(2) 2016 年 12 月 12 日に中国典型培養物寄託センター (C C T C C) に寄託され、寄託番号が C 2 0 1 6 2 0 2 のハイブリドーマ細胞系 5 B 8 によるモノクローナル抗体;

(3) 2015 年 9 月 3 日に中国典型培養物寄託センター (C C T C C) に寄託され、寄託番号が C C T C C No: C 2 0 1 5 1 4 7 のハイブリドーマ細胞系 4 G 7 によるモノクローナル抗体;

(4) 2016 年 12 月 12 日に中国典型培養物寄託センター (C C T C C) に寄託され、寄託番号が C 2 0 1 6 2 0 3 のハイブリドーマ細胞系 5 D 9 によるモノクローナル抗体;

(5) ハイブリドーマ細胞系 5 D 1、5 B 8、4 G 7 又は 5 D 9 によるモノクローナル抗体の結合特性を有するモノクローナル抗体;

(6) ハイブリドーマ細胞系 5 D 1、5 B 8、4 G 7 又は 5 D 9 によるモノクローナル抗体と結合可能なエピトープ結合とのモノクローナル抗体;

(7) 競合的結合測定にハイブリドーマ細胞系 5 D 1、5 B 8、4 G 7 又は 5 D 9 によるモノクローナル抗体と競合可能なモノクローナル抗体;

(8) A D R B 3 と特異的結合可能なウサギモノクローナル抗体、マウス由来抗体、キメラ抗体、完全ヒト由来抗体、単ドメイン抗体、一本鎖抗体、F a b 抗体断片、合成抗体;

(9) 下記複数の A D R B 3 抗原とエピトープ結合することで、A D R B 3 タンパク質活性を調節する抗 A D R B 3 抗体: S 2 1 2、S 2 3 9、S 3 4 9、C 1 1 0、C 1 8 9、T 6 5、T 1 4 0、S 1 9 1、Y 3 3 6、Y 3 4 6、K 1 5 1、R 1 5 2、C 1 5 3、P 3 4 3、P 3 5 0、P 3 6 8、P 3 6 9、P 3 7 1、P 3 7 7、P 3 8 1、P 3 9 1、P 3 9 4、H 1 9 0、H 2 8 8、N 8、N 2 6、T 1 5 0、T 1 0 8、T 1 1 4、G 4 1、G 1 0 6、G 1 4 6、G 2 7 1、G 2 9 5、G 3 8 3、G 4 0 2、C 2 7 5、C 3 6 3、Y 1 4 5、Y 1 4 5、Y 2 0 4、Y 2 1 4、Y 2 3 6、Y 3 4 6; 以下を含む但不限于上記エピトープ; そのうち、S: セリン、C: システイン、T: スレオニン、Y: チロシン、K: リシン、R: アルギニン、C: システイン、P: パリン、H: ヒスチジン、N: アスパラギン;

(10) A D R B 3 と特異的結合した抗体から選ばれ、

(10) 抗体は、

(a) 下記重鎖相補性決定領域 (C D R) を含有し、

i) S E Q I D N O: 1、4、7、10 と少なくとも 70% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する第 1 相補性決定領域;

i i) S E Q I D N O: 2、5、8、11 と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する第 2 相補性決定領域;

i i i) S E Q I D N O: 3、6、9、12 と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する第 3 相補性決定領域; 及び

(b) 下記軽鎖相補性決定領域を含有し、

i) S E Q I D N O: 13、16、19、22 と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する第 1 相補性決定領域;

10

20

30

40

50

ii) SEQ ID NO: 14、17、20、23と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する第2相補性決定領域；及び

iii) SEQ ID NO: 15、18、21、24と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含有する第3相補性決定領域；

(c) ヒト化抗体の重鎖可変領域(variable region、V領域)にSEQ ID NO: 25と少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び/又は

(d) ヒト化抗体の軽鎖可変領域にSEQ ID NO: 26と少なくとも70%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0145】

当業者によれば、本明細書に開示されているCDRは変異体を含んでもよく、本明細書に開示されているCDRを異なるフレームワーク領域に復帰突然変異する。通常、個体変異体CDRは本明細書の前記配列とのアミノ酸同一性が少なくとも70%又は80%であり、より典型的には、好ましくは少なくとも75%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらにほぼ100%のように増加している同一性がある。

【0146】

【表 1】

表 1 配列表

配列番号	配列名称	アミノ酸配列
SEQ ID NO:1	CDR1	GFTFSSYG
SEQ ID NO:2	CDR2	ISPGGSYT
SEQ ID NO:3	CDR3	ARRDLDY
SEQ ID NO:4	CDR1	GYTFTSYW
SEQ ID NO:5	CDR2	IYPGNSDT
SEQ ID NO:6	CDR3	TREDYDYDWYFDV
SEQ ID NO:7	CDR1	GYSFTGYG
SEQ ID NO:8	CDR2	INPSTGGT
SEQ ID NO:9	CDR3	ARVLYDYEGSGFAY
SEQ ID NO:10	CDR1	GYSFTGYT
SEQ ID NO:11	CDR2	INPSTGDT
SEQ ID NO:12	CDR3	ARVLYDYEGPGFAY
SEQ ID NO:13	CDR1	QSLLYSDGKTY
SEQ ID NO:14	CDR2	QVS
SEQ ID NO:15	CDR3	LQGTYPHT
SEQ ID NO:16	CDR1	ESVEYYGTSL
SEQ ID NO:17	CDR2	GAS
SEQ ID NO:18	CDR3	QQSRKVRT
SEQ ID NO:19	CDR1	KSLLSHNGNTY
SEQ ID NO:20	CDR2	RMS
SEQ ID NO:21	CDR3	MQHLEYPFT
SEQ ID NO:22	CDR1	KSLLYHSNGLNTY
SEQ ID NO:23	CDR2	RAST
SEQ ID NO:24	CDR3	MQHLEYPFAT
SEQ ID NO:25	ヒ化抗体重鎖V領域	EVQLQQSGSELVKPGASVKISCKASGYSFTGYMNV WVKQSPEKSLEWIGEINPSTGGTTYNQFKAKATLT VDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYC
SEQ ID NO:26	ヒ化抗体重鎖V領域	DIVMTQAAPSPVTPGESVVSISCRSSKSLLSHNGN TYLYWFLQRPQGSPQLLIYRMSNLASGVDPDRFSGS GSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLE

10

20

30

40

【0147】

本発明に係る ADRB3 抗体はさらに、ウサギモノクローナル抗体、マウス由来抗体、キメラ抗体、完全ヒト由来抗体、単ドメイン抗体 (single domain antibody)、一本鎖抗体 (scFv)、二重特異性抗体、Fab 抗体断片、合成抗体 (Synbody) 等を含み、これら抗体の共通点として、ADRB3 を特異的結合できる。抗体生産用の細胞は CHO、SP2/0、BHK-21、Vero 細胞等を含む。

【0148】

なお、当業者であれば、本発明の前記内容に基づいて、本発明について各種の変化又は

50

修正を行うことができ、これら同等形態がいずれも本願に添付した特許請求の範囲により限定される範囲に属する。

【0149】

具体的に、本発明では、大量の研究を行ったところ、ADRB3及び抗ADRB3モノクローナル抗体は以下の作用を有することを見出した。

本発明は、新規な免疫調節受容体と腫瘍マーカーであるADRB3を開示し、ADRB3の生理機能と疾患の病理学的メカニズムにおける作用を開示するとともに、抗ヒトADRB3モノクローナル抗体及びその応用を開示する。本発明における抗体は、ヒトADRB3のアミノ酸配列に特異的にターゲティングし、ADRB3と特異的結合してその生物学的活性を調節することができる。該抗体は、腫瘍細胞、造血幹細胞、骨髓系前駆細胞、リンパ系前駆細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、好中球、リンパ球や単核・マクロファージの分化及び機能を調節して、抗癌、抗炎症症、腫瘍免疫耐性逆転の作用を果たす。本抗体はさらに、Tリンパ球(T細胞)の分化・成熟を誘導して、アポトーシス能力を回復させて、特異的免疫機能を強化させることもできる。さらに、本抗体は腫瘍細胞の分化を誘導して増殖を阻害し、抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用(ADCC)、補体依存性細胞傷害作用(CDC)及び直接作用(細胞周期の遮断、リボソーム合成の阻害、ミトコンドリア膜電位の低下、アポトーシス誘導、ミトコンドリア自食の阻害、ペントースリン酸経路の阻害、解糖阻害、ケトン体合成減少及び脂代謝低下等のメカニズムを含む)により腫瘍細胞を殺滅する。本発明の抗体は、マウスハイブリドーマ技術を用いて得られてヒト化改変を行ったものである。本発明はこれら抗体の抗原エピトープ及びモノクローナル抗体を生産するためのハイブリドーマ細胞株を開示する。ハイブリドーマ細胞株は、2016年12月12日に武漢大学中国典型培養物寄託センターに寄託されて、寄託番号がCCTCC NO: C2016203及びCCTCC NO: C2016202である5D9と5B8を含むが、これらに制限されず、ハイブリドーマ細胞は、ADRB3モノクローナル抗体を分泌可能である。本発明に係るADRB3抗体「変異体」のアミノ酸配列には、前記配列に対する「保存的」アミノ酸改変が1個又は複数含まれ、好ましくは、抗体フレームワーク及び定常ドメインはヒトフレームワークとヒト定常ドメインである。本発明は該抗体の応用及びその検出キットの開発を開示し、抗ヒトADRB3モノクローナル抗体は、免疫プロッティング、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション技術、免疫沈降、免疫組織化学、エライザ法(ELISA)、免疫蛍光、磁気細胞選別、免疫金コロイド検出やフローサイトメトリー等の免疫学的実験、ヒト血清、ヒト組織細胞、人体分泌物や人細胞培養物中の可溶性ADRB3タンパク質又はADRB3タンパク質断片の定量的及び定性的検出に適用できる。本発明の抗ヒトADRB3モノクローナル抗体は、ADRB3を活性化又は遮断する作用を発揮できる。

【0150】

本発明では、ADRB3は、新規なT細胞共阻害分子(Co-inhibitory Molecule)と腫瘍マーカーであり、免疫細胞の活性化、増殖、分化、アポトーシス及び免疫応答を調節し、免疫阻害性の調節性T細胞(Regulatory T cell、Treg)、骨髓由来サプレッサー細胞(Myeloid-derived suppressor cells、MDSC)、腫瘍浸潤好中球(tumor infiltrating neutrophils、TINs)や多数のタイプの癌細胞に発現可能であることが開示される。ADRB3は、膜性と可溶性の2種の形態があり、組織細胞と体液中のADRB3含有量の検出が治療効果、治療法の適用性の予測や疾患診断に寄与できる。腫瘍細胞のADRB3は、生体の免疫機能阻害を誘導して、T細胞挙動を変えて、T細胞が感作エフェクター細胞に分化して腫瘍を殺滅できないようにする。腫瘍細胞、老化細胞、ウイルスや細菌等の病原体は、リンパ球、顆粒球、単球、樹状細胞、NK細胞を誘導してADRB3を高発現させ、ADRB3媒介シグナル伝達経路を介して抗原提示と免疫細胞の活性化を阻害することによって、腫瘍細胞、老化細胞やウイルス等の病原体が免疫系により認識されず、除去されずに済む。ADRB3抗体は、ADRB3シグナル伝達経路を遮断して、ADRB3が高発現された免疫細胞を除去して、リンパ球の正常機

能を回復させ、免疫系により病原体、癌細胞や老化細胞を認識して除去する。

【0151】

A D R B 3 は、ケモカイン、免疫阻害性受容体及び神経細胞接着分子の機能を備える。A D R B 3 は核小体における腫瘍マーカータンパク質（腫瘍ポリペプチド）と結合し、次に「M H C クラス I 分子 - 腫瘍ポリペプチド - A D R B 3」複合体は癌細胞の表面にディスプレイして、C D 8 + T 細胞と M H C クラス I 分子との結合により C D 8 + T 細胞と癌細胞を直接接触させ、このように、A D R B 3 は癌細胞表面から C D 8 + T 細胞に接着して、A D R B 3 の免疫受容抑制性チロシンモチーフ（immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif、ITIM）で C D 8 + T 細胞を阻害することにより、C D 8 + T 細胞が癌細胞を殺滅できなくなる。

10

【0152】

A D R B 3 は、ナイーブ免疫細胞などの低分化細胞と癌細胞に大量で存在している。A D R B 3 は腫瘍において過剰に発現され、リンパ球の活性化を遮断することで T 細胞による腫瘍への衝撃を阻害する。A D R B 3 は誘導性タンパク質で、正常な細胞に存在する場合が極めて少ないが、病理学的な状態では、腫瘍細胞及び腫瘍微小環境での免疫細胞に存在するものであり、腫瘍増殖の免疫微小環境の形成を促進する。P D - 1 又は C T L A - 4 遺伝子ノックアウトマウスには深刻な自己免疫疾患が発生するが、A D R B 3 遺伝子ノックアウトマウスは癌、アテローム性動脈硬化症、アルツハイマー病や自己免疫疾患に罹患することがなく、寿命が著しく延長している。A D R B 3 抗体は、癌細胞を直接殺滅する機能とともに、免疫チェックポイント阻害剤（Immune Checkpoint Inhibitor、ICI）のような作用を有し、特異的免疫を活性化させることで癌細胞を除去する。化合物阻害剤又は中和抗体で A D R B 3 シグナル伝達経路を遮断すると、腫瘍の成長を効果的に阻害して、増殖期と休眠期にある癌細胞を殺滅し、腫瘍細胞とナイーブリンパ球の分化・成熟を誘導することができる。腫瘍の悪性度を低下させるとともに、免疫細胞の抗癌機能を回復できる。正常なリンパ球と組織細胞にはほぼ A D R B 3 が含まれていないため、本抗体は正常な免疫系と組織へ損傷を与えたりすることがなく、高効率、広域スペクトル、低毒性、特異的な標的を有する抗癌薬と言える。

20

【0153】

交感神経 - 副腎髄質が A D R B 3 を介して免疫機能を調節し、A D R B 3 は神経 - 内分泌 - 免疫ネットワークの恒常性を維持するのに重要なタンパク質であり、疾患と老化は神経 - 内分泌 - 免疫ネットワークの恒常性調節障害による異常な生命活動である。A D R B 3 抗体は、A D R B 3 活性を阻害して、免疫系が改めて腫瘍細胞、病原体で感染された細胞や老化細胞を認識して除去できるようにし、抗癌、抗炎症、再生促進、老化防止の作用を果たす。

30

【0154】

本発明では、A D R B 3 は、新規なリンパ球阻害分子であり、3 個の免疫受容抑制性チロシンモチーフ（ITIM）を有し、ITIM アミノ酸配列は、以下のとおりであることが開示される。ITIM 1：（143）L R Y G A L（148）又は（143）L R Y G T L（148）又は（140）L R Y R A V（146）；ITIM 2：（202）I P Y A L L（207）又は（202）M P Y V L L（207）又は（199）V P Y A L L（204）；ITIM 3：（212）S F Y L P L（217）。A D R B 3 は、T 細胞、N K 細胞及びマクロファージの分化・成熟と自己認識を阻害することによって、T 細胞、N K 細胞及びマクロファージが老化したり損傷したりした細胞を除去できなくなるばかり、正常な細胞に免疫キラーを及ぼす。リンパ球の自然免疫阻害分子、たとえば C D 2 8 ファミリータンパク質と異なり、A D R B 3 は疾患により発現を誘発されるものである。健常な状態では、リンパ球膜に少量の A D R B 3 が存在する。腫瘍、ウイルス感染、自己免疫疾患等の病理学的な状態では、自然免疫細胞（たとえば好中球）又は腫瘍細胞はリンパ球が A D R B 3 を大量発生するように誘導し、A D R B 3 が細胞質を貫通して核に入り、遺伝子発現を調節してリンパ球表現型を変え、阻害性リンパ球の増殖を促進して、特異的免疫を阻害して疾患の発展を促進する。A D R B 3 によるリンパ球への免疫阻害

40

50

作用により、フィードバックとして自然免疫細胞、特に好中球とマクロファージの活性が強化されて、生体を炎症状態にする。腫瘍、ウイルスはリンパ球のA D R B 3発現を誘導して、リンパ球のアポトーシスを阻止し、死亡したリンパ球は免疫系にとって危険信号になり、死亡した免疫細胞は静止状態にある抗原提示細胞 (a n t i g e n - p r e s e n t i n g c e l l、A P C) を活性化状態に変換して、更に提示抗原がT細胞を活性化させて、抗癌と病原体除去の作用を果たす。A D R B 3抗体は、A D R B 3を高発現させた顆粒球、マクロファージ及びリンパ球のアポトーシスを誘導して、危険信号を送信し、特異的免疫系を活性化させて、リンパ球の抗癌機能を回復させる。A D R B 3抗体は、正常なリンパ球を損傷せずに誘導性A D R B 3を含有する「病原性」リンパ球を特異的に除去し、リンパ球の正常な死亡とアポトーシスを回復させ、免疫系を正常にして、自己免疫の発生を回避する。

10

【0155】

本発明では、過剰に発現された又は機能が強化されたA D R B 3により癌、炎症、自己免疫疾患や老化が引き起こされることが開示される。過剰に活性化されたA D R B 3は、天然免疫による特異的免疫の調節に干渉を与えて、リンパ球の分化が阻害されて機能できないナイーブ細胞になり、低分化リンパ球が外来性組織と自己組織を認識できないため、腫瘍細胞は免疫から逃がされて自己免疫疾患を引き起こす。A D R B 3シグナル伝達経路を遮断すると、免疫を正常に回復させて、T細胞で癌細胞と老化細胞を除去して、自己免疫損傷を回避することができる。A D R B 3は天然免疫と特異的免疫をリンクする重要なものであり、好中球、NK細胞及びマクロファージによる先天性免疫応答を強化させて、リンパ球の増殖を刺激する。本発明者は、マウス乳癌ウイルスを有するM M T V - P y V TマウスからA D R B 3遺伝子を除去すると、乳癌が発生することはなく、A D R B 3遺伝子ノックアウトマウスは寿命が長くなり、自己免疫疾患や癌に罹患することがなく、外因性腫瘍細胞もその体内で成長できず、A D R B 3遺伝子ノックアウトマウスの血清中の炎症性因子、たとえばI L - 4、I L - 6のレベルが著しく低下し、原始顆粒球と幼若顆粒球の数が減少されることを見出した。本発明者はヒトA D R B 3を遮断するモノクローナル抗体を開発し、腫瘍、炎症及び自己免疫疾患の治療に用いる。A D R B 3抗体は、マウスの特異的抗腫瘍応答を強化させて、全身性炎症を軽減させる。A D R B 3抗体を4 T 1乳癌細胞担癌マウスの治療に用いると、同所移植腫瘍の増殖と遠隔転移が阻害され、好中球、M D S C及びT r e gが減少し、樹状細胞の抗原提示能力が高まり、補体、NK細胞及びC D 8 + T細胞の抗癌活性が活性化されて、好中球 - リンパ球比 (N L R) が低下して、抗癌と抗炎症の作用が発揮される。A D R B 3抗体は、インビトロでヒトリンパ球の分化を刺激して、抗癌活性を有するC D 8 + T細胞の発生を誘導する。

20

30

【0156】

本発明は天然免疫と特異的免疫を調節する新規なメカニズムを開示し、すなわち、交感神経 - 副腎髄質がまず顆粒球と単核 - マクロファージにおける構成的発現されたA D R B 3を活性化させることで自然免疫細胞を活性化させ、次にリンパ球によるA D R B 3の誘導性発現を促進してリンパ球の活性化を阻害する。不安、抑鬱等の高レベルの心理的ストレスがA D R B 3を介して生体の免疫機能を低下させて、癌、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、アルツハイマー病等の疾患に罹患するリスクを高める。A D R B 3の異常な活性化により、天然免疫と特異的免疫系の障害が発生して、具体的には、好中球をはじめ、骨髄系細胞が過剰に活性化されるのに対して、リンパ球が活性化できず、好中球の数も白血球に占める百分率も高くなり、N L Rが高まり、生体の慢性全身性炎症の原因となる。A D R B 3媒介免疫障害は、自己免疫疾患、炎症、腫瘍、ウイルス感染、アテローム性動脈硬化症、アルツハイマー病及び老化の共通の病理学的メカニズムである。腫瘍の病理学的プロセスは最も典型的であり、早期の上皮内癌段階では、A D R B 3は主に局所組織における好中球とマクロファージを活性化させて、炎症性因子のレベルを向上させ、癌組織が局所で浸潤性増殖をしているが、A D R B 3の活性が連続的に向上すると、顆粒球、脾臓、肝臓、腫瘍細胞のいずれも可溶性A D R B 3を分泌して、NK細胞とリンパ球によるA D R B 3の発現を誘導できるようになる。リンパ球におけるA D R B 3は、エピジェネテ

40

50

イックな改変を変えて、NK細胞とリンパ球の分化・成熟を阻害し、血液における循環腫瘍細胞を除去できず、腫瘍の遠隔転移を招く。従来 of 癌免疫療法では、リンパ球媒介の特異的免疫機能を高めることは主な手段であり、自然免疫細胞を調節するのに好適な標的がなく、それにより、抗癌効果が低く、自己免疫疾患を生じさせ易い。ADRB3抗体は、好中球、マクロファージによるNK細胞とリンパ球への阻害作用を解消して、NK細胞とリンパ球による腫瘍免疫認識を回復できる。

【0157】

死亡したリンパ球が最大の免疫機能を発揮できるため、リンパ球の正常な死亡又はアポトーシスの回復は癌免疫療法の重点となる。従来 of 癌免疫療法では、T細胞の増殖を促進して、Tアポトーシスを防止することが一般的であり、早期では効く可能性があるが、再発率が高く、且つ深刻な自己免疫を引き起こす。本発明では、癌免疫療法の新手段、すなわちT細胞死亡の誘導が提供されて、T細胞の死亡数について調節が求められる。ADRB3抗体は、最初から小用量で投与し、過剰なADRB3抗体による正常T細胞への障害を避けるように、腫瘍が縮小して又は好中球の数が $1,000/mm^3$ 未満になると、減量又は停用する。

10

【0158】

ADRB3は、T細胞、B細胞、マクロファージ、NK細胞、樹状細胞及び腫瘍細胞膜に存在するものであり、阻害シグナルを組み込んで、リンパ球の活性化を調節する。癌細胞、T細胞及び樹状細胞の表面と細胞内にコーン状の「ADRB3サブタイプ」構造が大量存在しており、「ADRB3サブタイプ」は免疫細胞と腫瘍細胞の接着界面を維持して、それらをしっかり結合させる。コーン状のADRB3複合体は細胞膜で発生して、細胞質を貫通して、細胞核まで延びており、1本の通路になり。細胞外の物質、たとえば神経伝達物質、病原体等が該通路を介して細胞核に入って、DNA複製と遺伝子発現を調節して、細胞の分化と増殖に影響を及ぼす。ADRB3抗体は免疫細胞と腫瘍細胞の接着を破壊して、腫瘍細胞によるT細胞への阻害を遮断する。ADRB3は免疫シナプスの形成とシグナル伝達を調節して、ほかの免疫シグナル分子(たとえばB7/CD28、PD-L1/PD-1)を集めてシグナルを伝達する。ADRB3シグナル伝達経路は、細胞内に阻害シグナルを伝達して、T細胞とNK細胞の活性化について負の調節作用を果たす。ADRB3は、それぞれ初期T細胞の一次応答段階、活性化段階、記憶T細胞の二次応答段階において重要な負の調節作用を果たす。ADRB3遺伝子を高発現させたエフェクターT細胞は抗アポトーシス能力を有するため生き残り、記憶T細胞になるまで生育する。ADRB3は、CD4⁺T細胞の増殖を促進して、Tregの活性を高め、CD8⁺T細胞の活性化を阻害することによって、リンパ球による癌細胞、病原体で感染された細胞及び老化細胞の除去を阻害して、悪性腫瘍、アテローム性動脈硬化症、自己免疫疾患、アルツハイマー病や老化を引き起こす。

20

30

【0159】

本発明者により、ADRB3は抗原プロセッシング及び提示過程に関与して、生体の免疫認識と免疫応答を調節することが見出された。ADRB3はAPCとリンパ球との接触部位に集まることが、細胞間接着複合体の安定化に役立ち、樹状細胞、マクロファージ及び顆粒球のリンパ球への粘着を促進する。APC中のADRB3が処理抗原に関与することにより、処理済みの腫瘍抗原情報が失われてリンパ球により認識できなくなる。ADRB3は以下のメカニズムによって抗原処理過程を調節する。[1]、ADRB3はアセチラーゼの機能を有し、抗原情報のアセチル化修飾を調節するものであり、アセチル化修飾を行われた腫瘍抗原は抗原性を保持できず、T細胞を活性化させることができない。[2]、ADRB3は、APC中の抗原情報が含まれたエンドサイトーシス小胞の自食を促進する。ADRB3がリゾソームの成熟を促進して、抗原を含有するエンドサイトーシス小胞がリゾソームと融合して、エンドサイトーシス小胞の自食性分解を早めて、腫瘍の抗原情報を除去し、特異的免疫系による腫瘍の免疫認識と応答を阻害する。[3]、APC、たとえば樹状細胞、マクロファージ及びB細胞には、ADRB3は、オートファゴソームに外被された外膜を介してMHCクラスII分子に接着されて、「ADRB3:ポリペプチド:M

40

50

H C クラス II 分子」複合体を形成し、該複合体は A P C の表面に提示されて、次に C D 4⁺ T 細胞に直接接触して、T 細胞応答を阻害する。

【0160】

癌患者の腫瘍細胞、リンパ球及び顆粒球のいずれにも A D R B 3 の発現量が著しく増加して、T 細胞の活性化に必須な第 2 シグナルシステムが阻害され、T 細胞は免疫応答不全になり、腫瘍の免疫逃避。

A D R B 3 は細胞膜、リゾソーム、ミトコンドリア、リボソーム、細胞核や核小体等の細胞小器官に局在化されて、所在する細胞小器官の機能を調節する。A D R B 3 は、細胞質で合成した後、迅速に核に輸送し且つ核質間で往来できる特性を有し、胞核と細胞質の間で輸送キャリアとして働くとともにシグナル伝達を行い、D N A 複製と遺伝子発現を調節する。核内の A D R B 3 は G 0 期細胞の増殖期への発展を促進し、癌細胞における A D R B 3 が一般的に細胞核に位置することは、A D R B 3 による癌細胞増殖への促進を示唆する。細胞膜と細胞質 A D R B 3 の核への輸送能力を遮断することにより、癌細胞の増殖を阻害できる。

【0161】

A D R B 3 遺伝子発現とタンパク質の局在化は悪性度の異なる腫瘍細胞に有意な差異がある。悪性度の低い癌細胞では、A D R B 3 の発現量が少なく、大部分が細胞核に局在化されて、細胞膜には少ない。悪性度の高い癌細胞では、A D R B 3 の発現量が多く、細胞核、細胞質及び膜に分布して、免疫細胞と接触して免疫阻害作用を発揮させることに役立つ。腫瘍患者では、A D R B 3 は以下の経路を介してリンパ球を阻害する。[1]、A D R B 3 は、A P C のリンパ球への阻害シグナルの伝達を誘導する。[2]、腫瘍細胞膜における A D R B 3 はリンパ球に直接接触して阻害する。[3]、腫瘍細胞は可溶性 A D R B 3 又は A D R B 3 を含むエキソソームをシグナル分子として分泌して、リンパ球を調節する。A D R B 3 抗体は A D R B 3 による免疫阻害機能を拮抗でき、癌患者の免疫不全 T 細胞とともに培養することで、T 細胞の不全状態を解消して T 細胞の機能を回復させ、癌治療作用を果たす。

【0162】

A D R B 3 は、細胞の増殖を刺激して分化を阻害することができ、悪性腫瘍細胞、骨髄系細胞、リンパ球、N K 細胞、樹状細胞及び造血幹細胞の増殖に対して重要な役割を果たす。本発明では、A D R B 3 が細胞増殖能力を評価する「増殖マーカー」であり、A D R B 3 が多いほど、細胞の増殖能力が高まることが開示されている。従来、一般的に使用されている増殖マーカーは M c m、K i - 6 7 及び P C N A であり、この 3 種類のタンパク質はいずれも G 0 期細胞に発現できず、G 1 中期以降しか発現できず、「診断ギャップ」が存在するという欠点がある。A D R B 3 は、G 1 早期を含む増殖期全体と G 0 期のいずれにも発現可能であるので、より全面的且つ正確に細胞の増殖能力を反映できる。A D R B 3 を基礎及び臨床研究、薬物スクリーニング、人間疾患の動物モデルの評価、老化、幹細胞、ストレス、腫瘍、再生、細胞周期、G 0 期のメカニズムの研究に用いることは、患者予後の判断、診断、治療指導のために有効な手段である。

【0163】

A D R B 3 は細胞分化能力を評価する「分化マーカー」であり、A D R B 3 が多いほど、細胞の分化能力が悪い。癌細胞の場合、A D R B 3 が多いほど、分化程度が低く、悪性度が高い。A D R B 3 は、分化誘導薬物を研究するための標的タンパク質である。

【0164】

A D R B 3 は、初期 T 細胞に存在して、交感神経を介して直接調節して初期 T 細胞の死亡を防止する。このように、一部の機能がなくて自体細胞に対して殺滅作用を有する初期 T 細胞が生存して、自己免疫疾患の原因となる。T 細胞 A D R B 3 の含有量検出は、特異的免疫系の機能の重要な指標としてもよい。T 細胞は、A D R B 3 含有量が多いほど、抗原認識機能が低下して、正常な組織細胞を損害しやすく、A D R B 3⁺ T 細胞は自己免疫を引き起こす犯罪者と言える細胞である。

【0165】

本発明は、T細胞の増殖と分化を調節する新しいメカニズムを開示し、すなわち、交感神経 - 副腎髄質系により造血幹細胞と末梢免疫器官T細胞のADRB3を活性化させることによって、T細胞の増殖を刺激して分化を阻害する。ADRB3は、G0期の造血幹細胞とT細胞が細胞周期に入って有糸分裂を行うように促進する。健全な状態では、ADRB3シグナル伝達経路は免疫耐性を維持する。病理学的な状態では、過剰に活性化されたADRB3によって、成熟T細胞が脱分化又は分化転換して特異的免疫機能を失い、腫瘍の免疫逃逸、自己免疫、アレルギー反応等を招いてしまう。

【0166】

本発明では、脾臓と肝臓の特異的なNK細胞、マクロファージ、好中球及びリンパ球の発生分化がADRB3調節ネットワークに依存することが開示される。活性が異常なADRB3は脾臓におけるマクロファージ及びリンパ球の機能を阻害し、老化した血液細胞、病原体や異物を除去できなくなり、人体が老化していく。ADRB3抗体は、脾臓による老化・損傷の血液細胞の除去能力を回復させて、老化を遅延させる。

10

【0167】

ADRB3は、肝臓造血免疫組織の発生分化を調節して、肝臓での顆粒球、リンパ球、マクロファージ、NK細胞及びリンパ球の発生を促進し、天然免疫細胞の肝臓への富化を促進する。ADRB3シグナル伝達経路の活性が亢進した状態では、肝臓の造血機能が向上して、好中球の発生が増加し、炎症、自己免疫疾患や癌が起こる。正常な肝細胞において、大部分のADRB3は細胞質に分布し、少部分は細胞核に位置する。肝炎患者の肝細胞質でのADRB3含有量が向上し、ADRB3は肝細胞のリボソーム機能を高めて、肝臓によるC反応性タンパク質、補体、凝固因子の合成を促進し、全身性炎症反応が重篤化される。ADRB3は、肝臓中の炎症性細胞の浸潤を刺激して、ADRB3を高発現させた顆粒球、リンパ球、マクロファージ及びNK細胞の肝組織での数がいずれも有意に増加する。肝癌及び肝硬変患者は、肝細胞中のADRB3含有量が増加しており、主に細胞核に分布し、肝臓中のADRB3⁺顆粒球、ADRB3⁺マクロファージの数が増える。肝臓中のADRB3⁺顆粒球とADRB3⁺マクロファージは、転移巣を形成する環境に必要な細胞として働き、ADRB3抗体は乳癌細胞の肝転移を阻害する。ADRB3抗体は肝臓の造血・免疫機能を回復させて、肝臓炎症を抑制して、肝繊維化を減少し、肝炎や肝硬変の治療に利用できる。

20

【0168】

ADRB3によるT細胞の増殖と分化の調節メカニズムは以下のとおりである。[1]、カテコールアミンによりG0期T細胞膜におけるADRB3が活性化されて、P62/mTOR/AKTシグナル伝達経路が活性化され、Ki-67、CDK3、Cyclin D1等のタンパク質の合成が増えて、成熟したT細胞が「脱分化」して、増殖期に入るように誘導する。[2]、T細胞膜における活性化されたADRB3は陥入して細胞に取り込まれた後、細胞質に二量体を形成して、ロイシンジッパードメインを露出させ、微小管に沿って核内に輸送されて、核DNAに結合される。細胞質におけるADRB3はc-Mycとヘテロ二量体を形成して、プロモーター領域に結合されたE-box構造により遺伝子に対して転写活性化調節を行う。[3]、ADRB3は、アセチラーゼの機能を有し、核小体H3ヒストンアセチル化修飾を追加することで、細胞のエピジェネティック状態を変化させて、高度に圧縮されたクロマチンを解けるものであり、増殖関連の遺伝子転写に寄与する。

30

40

【0169】

細胞の有糸分裂が終了した後、ADRB3はユビキチン化により分解されて、新生T細胞が徐々に分化して成熟する。ADRB3の分解が制限されると、ナイーブADRB3^{bright}T細胞(ADRB3強陽性のT細胞)が分化して成熟することができず、生体は特異的免疫機能の欠損状態になる。ADRB3抗体は、ナイーブT細胞膜上のADRB3のリガンド結合ドメインをブロックさせて、カテコールアミンによるADRB3の活性化を競合的に阻害し、リンパ球が増殖期からG0期に入って成熟するまで生育するように誘導する。

50

【0170】

本発明では、リンパ球のADRB3発現量が特異的免疫機能と老化程度を評価する指標であることが開示されており、リンパ球のADRB3発現量が高いほど、特異的免疫機能は低下して、生体の老化程度は高く、死亡するリスクは高い。

【0171】

本発明では、血液中のリンパ球ADRB3含有量を検出することによって早期癌患者をスクリーニングすることが開示される。健常者の場合、成熟リンパ球はADRB3を発現させるか少量で発現され、発現量が好中球より少ない。腫瘍細胞と顆粒球はリンパ球のADRB3発現を誘導させて、リンパ球の活性化を阻害する。リンパ球のADRB3発現量が好中球の発現量に近く又は好中球の発現量を超え、且つ、細胞核と核小体に蓄積されると、該細胞はADRB3^{bright}リンパ球になり、細胞が分化しておらず又は脱分化を大なって、抗癌機能を失うことを示す。ADRB3抗体を用いて、末梢血中のADRB3高発現を伴うKi-67陰性(ADRB3^{bright}Ki-67⁻)リンパ球を検出することは、身体検査の指標として、早期癌患者のスクリーニングに用いられ得る。ADRB3^{bright}Ki-67⁻リンパ球がリンパ球全数の10%以上を占めると、がん罹患リスクの高い集団又は早期癌患者であることが分かる。末梢血50%以上のリンパ球がADRB3高発現を伴うKi-67陽性(ADRB3^{bright}Ki-67⁺)であると、ナイーブリンパ球が分化して成熟することができず、特異的免疫機能が深刻に損なわれ、癌が進行期に入ったことが分かる。

【0172】

本発明では、ADRB3は腫瘍マーカー(tumor marker)であり、正常な細胞に比べて、癌細胞のADRB3発現量が有意に増加することが開示される。ADRB3発現量は重症度、腫瘍の大きさ又は段階と関連性がある。体液のADRB3濃度の変化が治療効果に繋がり、濃度が低下すると、治療効果があることが示される。疾患再発の場合、ADRB3のレベルは著しく高くなり、ADRB3濃度検出により再発が予測できる。腫瘍組織におけるADRB3発現量検出外、ADRB3抗体は尿液、喀痰、腹水、胸水、脳脊髄液、気管支肺胞洗浄液に落脱した細胞のADRB3発現量も検出でき、普通の人向けの癌スクリーニング及び癌患者の診断に適用できる。

【0173】

本発明では、腫瘍組織中のADRB3融合遺伝子とADRB3遺伝子の突然変異、欠失、挿入、重複、染色体転位再編成等の検出が、腫瘍患者治療の指導に対して重要な参照価値があることが開示される。

【0174】

ADRB3は、造血幹細胞、リンパ系前駆細胞とリンパ球(B細胞、T細胞)、骨髄系前駆細胞と骨髄系細胞(赤血球、顆粒球、単球、巨核球)、NK細胞、腫瘍細胞、破骨細胞、小膠細胞には発現量が比較的高い。特に骨髄芽球、前骨髄球、骨髄球、好中球、好酸球、骨髄由来サプレッサー細胞、腫瘍関連マクロファージ(Tumor-associated macrophages、TAM)、マスト細胞、樹状細胞(DC)、異型リンパ球(abnormal lymphocyte)、Treg、プラズマ細胞、原始リンパ球及び幼若リンパ球のいずれにもADRB3高発現が見られる。本発明では、ADRB3は骨髄系細胞とナイーブリンパ球の抗原マーカーであり、人体内のADRB3は主に骨髄系細胞に発現され、成熟リンパ球にはADRB3が含まず又は少量で含まれているが、ナイーブリンパ球ではADRB3発現が高まることが開示される。リンパ球と好中球におけるADRB3が過剰に活性化されることにより、免疫監視と免疫防御が阻害されて、複数種の疾患の原因となる。ADRB3は、骨髄系前駆細胞とリンパ系前駆細胞の分化を阻害して、癌細胞、ウイルスやほかの病原性微生物に抵抗する防御メカニズムを弱める。癌細胞、病原性微生物及び老化細胞は、好中球とリンパ球のADRB3シグナル伝達経路を活性化させて、成熟した好中球とリンパ球を刺激して脱分化(dedifferentiation)させて、低分化のナイーブ又は原始細胞にして、免疫系の監視、防御、調節作用に悪影響を与える。ADRB3抗体は、ADRB3の免疫阻害機能を遮断して、腫瘍

細胞、骨髄系前駆細胞及びリンパ系前駆細胞の分化を誘導し、成熟した好中球とリンパ球の脱分化を遮断してリンパ球、NK細胞、単核-マクロファージ、樹状細胞、好中球及び補体系の正常機能を回復させる。

【0175】

細胞分化障害は、ほとんどの疾患、たとえば腫瘍、心臓血管疾患、炎症和老化の発生を引き起こす根本原因である。腫瘍の本質が細胞分化の機能不全であるため、癌細胞の分化能力回復が腫瘍治療のキーと言える。本発明者により、ADRB3は分化調節用の重要なタンパク質であり、ADRB3が遮断されると、腫瘍細胞の分化能力が回復して、正常又は正常に近い細胞に分化されることが見出される。

【0176】

リンパ球分化障害による機能低下は、悪性腫瘍と自己免疫疾患が発生する原因である。心筋細胞、ニューロン等の分化障害は、心不全と神経変性疾患の発生に繋がる。重要な臓器の分化機能障害は老化を引き起こす重要な要素である。本発明者は老化と疾患発生メカニズムに関する「二次分化障害打撃」仮説を提出しており、細胞分化欠陥により不全な細胞が発生して疾患を引き起こすことは、一回目の「分化障害打撃」である。免疫系が正常な場合、不全な細胞を除去して生体を疾患から守ることができるが、免疫細胞の分化に障害が発生して、生体の免疫機能欠陥を引き起こし、免疫細胞が一回目の「分化障害打撃」による腫瘍細胞、老化細胞や不全な細胞を除去できなければ、二回目の「分化障害打撃」が発生して発症することになる。本発明者は、心筋梗塞後、壊死性心筋に大量のADRB3高発現炎症性細胞が浸潤して、心臓幹細胞の成熟型心筋細胞への分化を阻害して、不完全な分化を引き起こし、ナイーブ心筋細胞と成繊維細胞が発生して、心筋リモデリングと心不全の原因となることを見出した。ADRB3遺伝子ノックアウトマウス(ADRB3^{-/-}マウス)の左冠動脈前下行枝を結紮して、心筋梗塞後の心不全モデルを作り、ADRB3野生型マウスと比較したところ、ADRB3^{-/-}マウスの左室駆出率(LVEF)が有意に上昇し、心筋リモデリングが著しくない。若いADRB3^{-/-}マウス(10~30週齢)に比べて、老年マウス(70週齢)のほうはLVEFが有意に低下せず、一部の70週齢のADRB3^{-/-}マウスのLVEFは10週齢のマウスよりも高かった。本発明者はApo EとADRB3の二重遺伝子ノックアウトマウスを構築して、高脂肪飼料で飼育したところ、Apo EとADRB3二重遺伝子ノックアウトマウスではアテローム性動脈硬化症のプラーク数がApo Eノックアウトマウスより遥かに少ないことを見出した。二重遺伝子ノックアウトマウスは、学習と記憶能力がApo Eノックアウトマウスより優れて、寿命も有意に延長している。本発明者により、ヒト腫瘍組織にADRB3を高発現させた顆粒球、マクロファージ及びリンパ球が大量浸潤しており、これら炎症性細胞は癌細胞に直接接触してADRB3を放出するように、癌細胞でのADRB3の大量発現を誘導して、癌細胞の分化障害を深刻にして、癌細胞の悪性度を向上させ、遠隔転移と薬剤耐性を発生させることを見出された。前記のとおり、ADRB3遺伝子をノックアウトするか、又は中和抗体でADRB3を遮断することによって、組織細胞と免疫細胞の分化機能を回復させて、二次「分化障害打撃」を回避し、人体の免疫細胞で病原性微生物、癌細胞や損傷した組織細胞を除去し得る。

【0177】

本発明では、ADRB3は細胞融合(cell fusion)を誘発し、ADRB3アゴニストと遺伝子組換え技術によるヒトADRB3タンパク質薬物は細胞融合を促進するための誘導剤として、体細胞ハイブリダイゼーション、動物や植物の遠隔ハイブリダイゼーション育種、リンパ球ハイブリドーマやモノクローナル抗体の製造に用いられることが開示される。ロイシンジッパー(leucine zipper)ドメインを有するADRB3は、独立した生物膜を近づけて膜を一体化させることができ、異なる種類の細胞同士生物膜融合を促進することで組織・器官の形成を促進する。ミトコンドリア等の細胞小器官の形成、原核細胞から真核細胞へ、単細胞生物から多細胞生物への進化過程において、ADRB3は重要な役割を果たす。ADRB3は、異なるタンパク質の融合を促進し、たとえば、前骨髄球白血病に関連するPML-RAR融合タンパク質の形成が促進

10

20

30

40

50

できる。A D R B 3 遺伝子はほかのガン原遺伝子と融合すると、腫瘍の発展を促進する。A D R B 3 媒介細胞融合により染色体が不安定になり、細胞融合に起因する中心体の過剰（3個以上）が三又は四極の有糸分裂又は分裂時間の延長を引き起こす。本発明者により、A D R B 3 が中心体の数を増やして、多倍体の形成を促進することが見出される。A D R B 3 媒介細胞融合は、腫瘍の形成に寄与し、マクロファージ、好中球又はリンパ球は高いA D R B 3 融合能力を利用して、腫瘍細胞融合に重要な役割を果たす。A D R B 3 は顆粒球と癌細胞の融合を誘導して、癌細胞の異質性と表現型の不安定性を高め、親よりも悪性のある細胞を発生させて、腫瘍の転移を加速させ、癌細胞に薬剤耐性を発生させる。ウイルス（たとえば、ヒトパピローマウイルス、B型及びC型肝炎ウイルス、HTLV-1、EBV）媒介細胞融合過程に、A D R B 3 は重要な役割を果たす。A D R B 3 抗体は、

10

【0178】

本発明者は、活性化されたA D R B 3によって、細胞が脱分化して、遺伝子発現プロファイルとエピジェネティックな改変が変わり、細胞表現型が変換することを見出した。A D R B 3 は、ロイシンジッパードメインを有するものであり、DNA及びRNAとの結合能力を持つとともに、各種の転写因子の二量又は多量体化も媒介し得る。A D R B 3 は、ほかの転写因子とオリゴマーを形成して、遺伝子のプロモーターに結合して、標的遺伝子の転写を活性化又は阻害する。細胞膜における活性化されたA D R B 3 は陥入して細胞質に入り、ホモ又はヘテロ二量体を形成し、アセチルトランスフェラーゼの機能を有するA D R B 3 は3000個余りの遺伝子（約ゲノムの12%）のプロモーターに結合して、核小体ヒストンのアセチル化状態を調節し、細胞増殖に関連する遺伝子転写を促進して、腫瘍細胞、リンパ系前駆細胞及び骨髄系前駆細胞の増殖を刺激して分化・成熟を阻害する。

20

【0179】

本発明は、細胞核中にA D R B 3分子を高発現させたリンパ球を開示し、該タイプのリンパ球は骨髄系細胞のマーカータンパク質 - ミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase、MPO) を発現させず又は低発現させ、骨髄系細胞へ分化する能力を持っている。本発明者は、該タイプの細胞をMPO^{dim} / - A D R B 3⁺リンパ球と命名し、該タイプのリンパ球はリンパ系前駆細胞又は原始リンパ球である。MPO^{dim} / - A D R B 3⁺リンパ球の増殖と分化がA D R B 3により調節され、A D R B 3活性又は発現量が向上する場合、該タイプのリンパ球は骨髄系細胞へ分化して、MPOの発現増加が見られ、細胞核に顆粒球様の変化が起こり、核型が長円状、分葉状、不規則状である。A D R B 3 は、MPO^{dim} / - A D R B 3⁺リンパ球の骨髄系細胞への分化を誘導してリンパ球を減少させることで、好中球とマクロファージの数を増やして、T細胞枯渇を招く。

30

【0180】

MPO^{dim} / - A D R B 3⁺リンパ球は、免疫阻害機能を有し、交感神経系がA D R B 3で該タイプの細胞を調節して、天然免疫と適応免疫のバランスを維持する。健常者の体内では、MPO^{dim} / - A D R B 3⁺リンパ球の数が少ないものの、癌、アルツハイマー病、ウイルス性肝炎、自己免疫疾患の患者や高齢者の末梢血、脾臓、肝臓や骨髄には大量で存在している。MPO^{dim} / - A D R B 3⁺リンパ球は、癌細胞の増殖を刺激し、且つその活性には広いスペクトルがあるので、乳癌、膵臓癌、肺癌、結腸癌、神経膠腫、黒色腫、白血病、肉腫等のいずれに対しても増殖促進作用を示す。MPO^{dim} / - A D R B 3⁺リンパ球は、肝炎ウイルス、エイズウイルス等のウイルスの感染と複製を促進する。A D R B 3抗体はMPO^{dim} / - A D R B 3⁺リンパ球の機能を阻害して、骨髄系細胞への分化転換を遮断し、成熟リンパ球への分化を促進する。

40

【0181】

本発明では、A D R B 3は末梢血と骨髄におけるCD4又はCD8単陽性T細胞のCD4⁺CD8⁺共陽性 (double positive、DP) T細胞への脱分化を誘導し、DPTアポトーシスを阻害するとともにDPT細胞の増殖を促進し、その血液中含有量を向上させることが開示される。高齢者、ウイルス感染、腫瘍、自己免疫疾患の患者で

50

は、末梢血CD4⁺CD8⁺DPT細胞は有意に増加する。ADRB3抗体は、DPT細胞の増殖を遮断することでその数を減少させ、DPT増加による疾患や老化の治療に適用できる。

【0182】

本発明では、ADRB3はCD8⁺T細胞の骨髓系細胞におけるMDS Cと好中球への系間分化転換(trans-differentiation)を促進することが開示される。ADRB3は体内のCD8⁺T細胞の数を減少させて、CD8⁺T細胞枯渇を招く一方、Treg、MDS C及び好中球の血液、骨髓、脾臓やリンパ節内での比率と数を増加して、全身性炎症を引き起こす。

【0183】

本発明では、ADRB3は新規な細胞表面分子であり、B細胞の増殖、分化、アポトーシス及び免疫応答を調節し、B細胞とプラズマ細胞の細胞質と細胞膜で発現されることが開示される。

【0184】

本発明はプラズマ細胞の同定方法を開示し、すなわち、ADRB3抗体を用いて免疫蛍光又は免疫組織化学を行い、ADRB3がリンパ球の細胞質中に大量蓄積すると、該細胞がプラズマ細胞である。ADRB3は、B細胞とプラズマ細胞の活性に影響を与え、関連する表面マーカータとえばCD19の合成を増加して、プラズマ細胞による自己抗体の合成を増加する。ADRB3抗体は、B細胞による免疫グロブリンの発生を阻害して、自己抗体の合成を減少させるものであり、自己免疫疾患の治療に有用である。

【0185】

本発明では、ADRB3はパターン認識受容体(pattern recognition receptor、PRR)であり、機能として、[1]調節作用；[2]補体活性化阻害；[3]貪食と自食；[4]免疫細胞の活性化と炎症性シグナルの伝達の起動作用を備える。ADRB3と病原体関連分子パターンとの相互認識と作用は天然免疫応答を開始させるキーとなる。ADRB3は、細菌のリポ多糖(LPS)、リポタンパク質(BLP)、ペプチドグリカン(PGN)、酵母菌のマンナン等を認識し得る。ADRB3は、ほかのパターン認識受容体(たとえばToll受容体、スカベンジャー受容体、マンノース受容体及びC型レクチン)の活性とシグナル伝達を調節する。ADRB3は、NK細胞、マクロファージ、好酸球、好中球やマスト細胞等で媒介した天然免疫応答を調節する。ADRB3は前炎症反応の重要な受容体であり、パターン認識受容体を調節することで、細菌、真菌及びウイルス成分を認識するものであり、病原体による細胞感染過程に重要な役割を果たす。ADRB3は、病原体の細胞での生存を可能し、メカニズムについては、1. ADRB3は、細胞内のウイルス、細菌又は寄生虫等の病原体の複製と放出を促進する自食を促進する。2. ADRB3は活性酸素種の発生を減少させるが、活性酸素種の遊離基が外因性病原体を殺滅できる。3. 細胞膜ADRB3は細菌、真菌、ウイルス、寄生虫等の病原体の接着、融合及び侵入を媒介し、ADRB3はウイルス-宿主細胞間の膜融合にとって重要な融合タンパク質である。病原体が宿主細胞に入ると、ADRB3の支援下で安全障壁-液泡(vacuole)を形成し、リゾソームによる消化から保護される。ADRB3抗体は細胞内の細菌、真菌、ウイルス、寄生虫等の病原体を除去できる。

【0186】

非特異的免疫(天然免疫)はすべての免疫保護能力の基礎となり、特異的免疫(適応性免疫)応答を開始させて、それにも関与する。血液中の可溶性ADRB3の含有量を、非特異的免疫系機能の重要な指標とすることが可能である。現在の免疫治療薬は一般的に特異的免疫細胞に対するもので、大量存在する非特異的免疫細胞を無視するため、免疫治療による有効率を低下させる。本発明に係るADRB3抗体は、非特異的免疫と特異的免疫細胞の機能を同時に調節して、免疫系を正常に回復させることができ、免疫系障害に起因する疾患の治療に利用し得る。

【0187】

本発明では、ADRB3は造血幹細胞の増殖を調節するものであり、体内の造血幹細胞

10

20

30

40

50

の再生能力を高めて、骨髄を刺激して造血を促進できることが開示される。A D R B 3 の幹細胞表面での発現が、接着因子の分布と数に影響を与える。A D R B 3 抗体は、骨髄中の造血幹細胞と細胞外マトリックスの結合強度を変えることにより、造血幹細胞を末梢血に進入させ、造血幹細胞を分離して収集し、末梢血造血幹細胞移植に用いることが可能である。

【0188】

本発明では、A D R B 3 は、骨髄球系造血を調節する主なサイトカインであり、顆粒球系造血前駆細胞に作用してその増殖、分化を促進し、且つ、顆粒球系最終分化細胞である末梢血好中球の数を増やして機能を高めることが開示される。A D R B 3 は顆粒球、単核 - マクロファージの成熟を刺激して、成熟細胞の末梢血への放出を促進するとともに、マクロファージ及び噬酸性顆粒球の複数種の機能を促進できる。A D R B 3 アゴニスト及び遺伝子組換え技術によるヒトA D R B 3 タンパク質薬物は、白血球成長促進剤として、腫瘍放射線治療又は化学療法後の白血球減少症の予防・治療、骨髄造血機能障害及び骨髄異形成症候群の治療、白血球減少により発生可能な感染合併症の予防、及び感染による好中球減少の回復加速に有用である。適応症：1．骨髄移植の場合、好中球数の増加を促進する。2．抗腫瘍化学療法薬による好中球減少症の予防及び好中球減少症の持続期間短縮；急性リンパ球白血病。3．骨髄異形成症候群の好中球減少症。4．再生不良性貧血の好中球減少症。5．先天性及び原発性好中球減少症。6．免疫抑制療法（腎移植）に続発する好中球減少症。7．肝不全。

10

【0189】

A D R B 3 は、骨髄造血を調節して、血液の赤血球成長を促進する。A D R B 3 アゴニストと遺伝子組換え技術によるヒトA D R B 3 タンパク質薬物は、赤血球成長促進剤として、貧血症の治療に利用できる。A D R B 3 アゴニスト、A D R B 3 活性化作用を有するA D R B 3 抗体及びA D R B 3 組換えタンパク質因子は、運動中の体の酸素運搬能力を改善して、スポーツのパフォーマンスを向上させ、損傷組織を修復するものであり、アスリートの訓練や負傷後のリハビリに用いられ得る。

20

【0190】

本発明では、A D R B 3 は新規な炎症性因子であり、自己分泌と傍分泌の方式で前炎症効果を発揮させ、A D R B 3 シグナル伝達経路は、全身性感染と自己免疫疾患の病理学的プロセスを調節する。A D R B 3 シグナル伝達経路は、好中球、マクロファージ、リンパ球と腫瘍細胞におけるP62、Elastase、HK2、GAPDH、Cyclin D1、P21、P16、P27、Ras、CDK3、CDK4、Rb、Ki-67、mTOR、Rictor、c-Myc、Rheb、PI3K、AKT、Tubulin、Actin、VEGF、TRAF6、PD-L1、ZAP70、P53、Interleukin 6 (IL-6)、IL-10、IL-4、IL-5、IL-2、MPO、IFN-、GM-CSF、C反応性タンパク質、アセチルトランスフェラーゼTip60、TGF- やTNF等のタンパク質分子を調節する。

30

【0191】

本発明では、A D R B 3 は、骨髄由来サプレッサー細胞(MDSC)のバイオマーカーであり、MDSCに高発現されて、MDSCの成長生育がA D R B 3 に依存することが開示される。A D R B 3 はMDSC増殖を促進し、A D R B 3 抗体はMDSC機能を阻害して、薬剤耐性を発生させたり再発したりする腫瘍患者を治療する。

40

【0192】

本発明では、Ki-67とA D R B 3 は、悪性腫瘍患者のMDSC、リンパ球、単核 - マクロファージ及び好中球において同時に発生して、Ki-67とA D R B 3 共陽性(Ki-67⁺ A D R B 3⁺)顆粒球の数が腫瘍患者の予後不良と正相関になり、該タイプの細胞は原始又はナイーブ顆粒球であり、T細胞のナイーブT細胞への逆分化を誘導する能力を持っていることが開示される。A D R B 3 とKi-67はともに顆粒球細胞質に局在化され、A D R B 3 は顆粒球のリボソーム機能を高めて、Ki-67とほかの細胞成長因子の合成を促進する。顆粒球はKi-67と成長因子を放出して、G0期のリンパ球と

50

腫瘍細胞が増殖期に入るように刺激する。Ki-67⁺ ADRB3⁺ 顆粒球は悪化のマーカー細胞であり、数が連続して増加し、患者の転移又は再発を高精度で示唆する。

【0193】

本発明は新規好中球を開示し、このような細胞は ADRB3 分子を大量で発生して分泌するものであり、 ADRB3⁺ 顆粒球と命名され、該タイプの細胞は生体の天然免疫を阻害して、リンパ球の成熟を調節する。腫瘍患者、ウイルス又は細菌感染者の体内では、 ADRB3⁺ 顆粒球の含有量と百分率が有意に増加する。腫瘍患者、特に慢性顆粒球白血病患者の脾臓は ADRB3⁺ 顆粒球の発生が活発に行われる器官であり、脾臓由来の ADRB3⁺ 顆粒球は腫瘍の発展や転移を促進する可能性がある。化学療法後の腫瘍患者の脾臓、骨髄及び末梢血において、白血球中の ADRB3⁺ 顆粒球の比率が著しく高くなり、 ADRB3⁺ 顆粒球は、G0 期の腫瘍細胞が増殖期に入ることを促進して、癌再発を引き起こす。脾動脈にカテーテルを留置して ADRB3 抗体を灌注することは、 ADRB3⁺ 顆粒球を標的に殺滅して、腫瘍転移を防止することができる。

10

【0194】

ADRB3⁺ 顆粒球は、腫瘍細胞を接着して携帯することで遠隔転移を引き起こす。 ADRB3 は好中球の死亡を遅延させて、好中球の組織での濃度を低下させる。 ADRB3 は、リボソームの機能を向上させて、好中球の合成を刺激し、炎症性因子と成長因子を放出して、血管新生を誘導し、炎症性反応を深刻にする。 ADRB3 は、ミトコンドリアの機能を保護して、活性酸素種の発生を減少させ、顆粒球又はマクロファージにより貪食される寄生虫、細菌やウイルス等の細胞内での生育と増殖を可能にし、それは病原体の免疫逃避メカニズムの 1 種である。血液中 ADRB3⁺ 顆粒球は、リンパ球への接着又は ADRB3 を血液へ放出する等の方式で、リンパ球の ADRB3 高発現を誘導して、リンパ球の脱分化を引き超し、特異的免疫不全を発生させる。

20

【0195】

健常者の場合は、好中球の表面足突起が少なく、 ADRB3 含有量が癌患者の顆粒球よりも遥かに少ない。癌患者の場合は、顆粒球の足突起が増えて、 ADRB3 は微小管と微小線維を調節することで顆粒球の足突起形成を促進する。 ADRB3 は顆粒球の足突起接着を促進して、リンパ球を捕獲し、リンパ球を誘導して抗癌活性を失わせる。腫瘍患者の血液には、リンパ球と腫瘍細胞を接着して捕獲するための好中球細胞外トラップネット (NETs) が大量存在している。 ADRB3 は NETs の主な組成成分であり、 NETs 中の腫瘍細胞が ADRB3 でリンパ球を阻害し、 NETs は腫瘍とリンパ球の間の介在環境である。 ADRB3 抗体は NETs 形成を阻害する。

30

【0196】

アテローム性動脈硬化症のプラーク形成過程に、 ADRB3 は、顆粒球が血管内皮細胞へ接着して、さらに内皮下へ移行して NETs を形成することを促進し、 NETs はリンパ球とマクロファージを接着して、サイトカイン IL-6 を分泌し、免疫細胞のアテローム性動脈硬化病変部での集まりを広げて、慢性炎症反応を引き起こし、脂肪線条プラークを形成する。 ADRB3 は、顆粒球とプラークにおける泡沫細胞との融合を促進し、泡沫細胞が増殖と移動能力を付与されて、プラークが血管壁に沿って延びている。 ADRB3 は好中球と泡沫細胞におけるエラスターゼ (Elastase) を活性化させて、血管壁組織へ放出し、エラスターゼは、血管壁中層にあるエラスチンとコラーゲンを消化する。血管の弾力性が血管の正常な生理機能を維持するための重要な特性であり、主にエラスチン繊維により提供され、 ADRB3 はエラスチンの分解を促進するため、血管の弾力性を低下させて、動脈壁の肉厚を増加して硬くして、内腔を狭くし、動脈硬化、肺動脈性肺高血圧症、高血圧の原因となる。肺、心臓等の弾力性に富んだ組織には豊かなエラスチンが含まれ、肺、心臓エラスターゼは主に好中球とマクロファージに由来するものであり、 ADRB3 は好中球とマクロファージにおけるエラスターゼの放出を促進して、肺、心臓の弾力性を低下させ、組織構造を破壊して、肺気腫、気管支拡張症、喘息、肺繊維化、拡張型心筋症、心室肥大等を招く。本発明では、 ADRB3 抗体は、エラスターゼ阻害剤として、顆粒球エラスターゼの活性と放出を阻害して、エラスターゼ亢進に起因する疾患を治

40

50

療することができ、膵臓炎、肺気腫、肺動脈性肺高血圧症、喘息、心筋病、心室肥大、肝硬変、脳虚血、脳出血、外傷性脳損傷が含まれるが、これらに制限されないことが開示される。

【0197】

A D R B 3 は、好中球の活性化、凝集、浸潤を引き起こし、炎症反応の発生・発展にとって重要なステップである。脳、肝、肺、腸、腎臓、心臓等の複数種の器官の虚血/再灌流傷害の過程において、A D R B 3 は、好中球の虚血領域での組織微小血管の内皮細胞表面への接着を促進して、毛細血管を塞いで、no-reflow現象を発生させ、組織への血液供給を減少させる。好中球は微小血管内に凝集すると同時に、炎症性メディエーターとタンパク質分解酵素を放出し、炎症性メディエーターはより多くの好中球を凝集させて、炎症反応過程を自己増殖可能な悪循環にし、タンパク質分解酵素はほぼすべての白血球の細胞外マトリックス成分を分解して、完全な細胞を攻撃し、内皮細胞を脱落させて、微小血管の透過性を向上させ、このように、血液と組織の間のバリアが深刻に破壊されて、肺水腫、脳浮腫等を引き起こし、組織損傷を深刻にして、虚血性壊死を発生させる。A D R B 3 抗体は、好中球の活性を弱めて、虚血再灌流後の壊死組織の範囲を減少させて、虚血領域での微小血管機能の回復を高める。本発明では、A D R B 3 抗体を脳、肝、肺、腸、腎臓、心臓虚血/再灌流傷害の治療に用いることが開示される。

10

【0198】

組織中の好中球は、老化細胞を貪食後、崩解、脱顆粒を行って、細胞内のA D R B 3を放出する。A D R B 3 は可溶性受容体になりG 0期の組織細胞に取り込まれて、核小体へ移動し、核小体機能を向上させて、リボソームの大、小サブユニットの合成を促進する。A D R B 3 は、各種のG 1期に必要なRNA(たとえばU3 snRNA)とタンパク質(たとえばサイクロン、サイクリンキナーゼ等)を付加的に合成して、G 0期の細胞のG 1期への発展を活性化させる。G 0期は細胞が分化する時期であるため、A D R B 3によりG 0期の細胞が増殖期に入ることを促進することは、細胞が脱分化能力を失うことを意味する。組織中のA D R B 3濃度が高すぎると、細胞増殖を連続して刺激して、新生細胞の分化を阻害し、発癌を誘導する。顆粒球は解糖を経由してエネルギーを取得し、A D R B 3は好中球解糖を維持するのに重要なタンパク質である。腫瘍細胞は、A D R B 3を高発現させるもので、細胞の代謝パターンが解糖を主にするように変更される。本発明では、A D R B 3抗体は腫瘍細胞の解糖を阻害できることが開示される。

20

30

【0199】

腫瘍組織に浸潤している好中球が解糖して大量の乳酸を発生させ、A D R B 3によるモノカルボン酸トランスポーター(MCT)の活性化により乳酸が外部へ排出されて、腫瘍の周囲環境に大量の乳酸を含ませる。A D R B 3は、SLC16A3遺伝子のプロモーターと結合して、MCT4発現を増加させて、乳酸の膜貫通輸送を促進する。高濃度の乳酸は、腫瘍のエネルギーになる上、細胞傷害性T細胞とNK細胞の活性を阻害して、腫瘍細胞の免疫逃避を可能にする。腫瘍細胞外の酸性環境は細胞外マトリックスの分解とリモデリングを促進して、癌細胞の侵襲や転移に有利である。A D R B 抗体は乳酸排出に干渉を与えて、腫瘍細胞外の酸性微小環境を中和する。膿毒症等の炎症状態では、カテコールアミンは好中球とリンパ球におけるA D R B 3を作動させることで、血液中の乳酸を増加し、患者の予後不良の原因となる。本発明では、A D R B 抗体はMDS C、好中球及びリンパ球による乳酸排出を阻害して、高乳酸血症と乳酸アシドーシスを治療することが開示される。A D R B 抗体はH⁺/K⁺-ATP酵素を阻害して、胃酸分泌を遮断する。十二指腸潰瘍、胃潰瘍、逆流性食道炎、ヘリコバクターピロリ感染を治療することができる。

40

【0200】

老化細胞、腫瘍細胞、内毒素、細菌、ウイルス等は、顆粒球とリンパ球中のA D R B 3遺伝子発現を向上させて、血液中のA D R B 3⁺顆粒球、A D R B 3⁺リンパ球の数及び可溶性A D R B 3的濃度を向上できる。膿毒症患者では、血管内皮細胞、好中球及びリンパ球はA D R B 3を発生させて血へ放出し、また、血液中のA D R B 3は好中球を活性化させて、サイトカインを爆発的に分泌し、制御できない炎症反応を引き起こし、多臓器不

50

全症候群を招いてしまう。腫瘍患者では、A D R B 3 + リンパ球と可溶性 A D R B 3 は腫瘍の遠隔転移を促進する。高齢者の場合は、A D R B 3 は組織再生を制限して、新生細胞の分化を阻害し、新生細胞が機能細胞になるまで生育できず、このような不完全な再生は体の老化を促進するか、又は腫瘍を誘発させる。

【0201】

生理状態では、A D R B 3 は、好中球、マクロファージ及びリンパ球による老化・死亡細胞の除去を促進すると同時に、組織・器官における G 0 期にある細胞が増殖期に入り、有糸分裂を経て子孫細胞を発生させることを促進し、新生細胞の A D R B 3 発現レベルが低く、改めて G 0 期に入り機能細胞になるまで分化し、それによって、死亡細胞の分補充し、このような過程は「完全再生」である。新生細胞は正常な組織・器官機能を維持して、生体の老化を防止するために、成熟するまで分化することが必要である。有糸分裂後に新生した細胞内の A D R B 3 活性が亢進することが原因で、新生細胞が G 0 期に入ることができず、細胞分化が阻害されて成熟に生育できない場合、このような過程は「不完全再生」になり、老化と腫瘍の原因でもある。本発明者により、高齢者の血液、脳脊髄液中の可溶性 A D R B 3 含有量も活性も若者より高く、過剰に活性化された A D R B 3 により「不完全再生」が発生して、老化組織・器官の修復ができなくなることが見出された。A D R B 3 抗体は、不完全再生を阻害して、完全再生を回復させ、老化防止作用がある。

10

【0202】

血中の A D R B 3 濃度が日、月、年を周期として変動して、細胞のストレス、代謝、増殖又は分化を調節し、生体再生に有利である。血中 A D R B 3 濃度の周期的変動の維持は再生調節のキーである。血液中の A D R B 3 濃度の変動曲線が消えると、A D R B 3 濃度に応じて調節することになる。A D R B 3 が過量に発生して放出される場合（たとえば腫瘍又は炎症）、A D R B 3 抗体を投与することで A D R B 3 の活性を低下させ、正常レベルに回復させる。A D R B 3 濃度が低すぎると、A D R B 3 アゴニストを投与することで A D R B 3 の活性を向上させる。A D R B 3 を活性化又は過剰発現させることで、細胞の有糸分裂を促進して、組織再生を開始させ、A D R B 3 を遮断することにより新生細胞の分化を維持して、新生細胞を成熟した機能細胞にして、組織・器官の機能を回復させる。A D R B 3 抗体は心臓、肝臓、骨髄、膵臓、脳、末梢神経、腎臓、肺や筋肉等の組織の再生を調節する。A D R B 3 機能が低下した血液、脳脊髄液及び組織中の A D R B 3 の濃度と活性を回復させることにより、細胞を増殖して、老化防止作用を果たすことができる。

20

30

【0203】

本発明では、A D R B 3 抗体は、組織再生を促進して、再生機能不全による疾患を治療することができ、白血球減少症、好中球減少症、リンパ球減少症、再生不良性貧血、慢性肉芽腫症、白血球接着欠陥症、B 細胞欠損症、X 連鎖低ガンマグロブリン血症、T 細胞欠損症、重症複合免疫不全症、補体欠損症、火傷、非治癒創傷、サルコペニア、加齢による筋ジストロフィー、骨粗鬆症、加齢黄斑変性症、老人性難聴やほかの高齢化による疾患等が含まれるが、これらに制限されない。

【0204】

炎症は生体の免疫応答の重要な一部であり、慢性炎症は致癌、アルツハイマー病やほかの認知症、心臓血管疾患、骨関節炎、うつ病等の疾患を引き起こすことがあり、90%以上の非伝染性加齢性疾患が慢性炎症に関わる。最初段階の炎症が好中球に引き起こされることであり、A D R B 3 シグナル伝達経路は好中球の活性化過程に重要な作用がある。A D R B 3 遺伝子ノックアウトマウスが大量の内毒素に抵抗して膿毒症の発生を遅延させて、膿毒症による死亡を減少させることから、膿毒症は A D R B 3 シグナル伝達経路の活性化に繋がることが確認された。活性化された A D R B 3 は各種の炎症性メディエーターを発生させるための「ゲート」として働き、「トリガー」のような作用により炎症性メディエーターのカスケード反応をトリガーする。炎症性因子としての A D R B 3 は好中球、リンパ球、好酸球、単核 - マクロファージリリース M P O、E l a s t a s e、I L - 1、I L - 6、V E G F 等の炎症性因子を促進できる。炎症性因子の増加は逆に A D R B 3 の活性化を刺激させて、炎症を拡大させる。

40

50

【0205】

A D R B 3 は、好酸球、好塩基球とリンパ球によるヒスタミン、ロイコトリエン、血小板活性化因子等の発生と放出を促進して、平滑筋収縮、毛細血管拡大及び透過性強化を発生させ、腺分泌物を増やして、局所又は全身性アレルギー反応を引き起こす。本発明では、A D R B 3 抗体は、マスト細胞膜を安定化させて、脱顆粒を抑制し、リンパ球の形質転換及びインターロイキン2の発生を阻害し、表皮ランゲルハンス細胞の数を低下させ、血小板凝集を阻害して、赤血球の変形能力を高め、細胞の分裂と増殖を阻害する作用を有することが開示される。A D R B 3 抗体は、アレルギー性疾患、アレルギー性接触性皮膚炎の治療に用いられ得る。

【0206】

本発明では、可溶性A D R B 3は血清学的腫瘍マーカーであり、血液又はその他の体液中の可溶性A D R B 3の濃度を監視して、悪性腫瘍の早期診断、予後判断、治療応答及び再発監視にとって重要な価値があることが開示される。本発明者によって、血液、脳脊髄液、胸水、腹水等の体液には、細胞膜外のすべてのドメインを含んでリガンドとは結合能力があり可溶性A D R B 3 (s o l u b l e A D R B 3、s B 3) として命名されるA D R B 3 が存在することが見出された。腫瘍細胞は、A D R B 3 を発生して血へ放出し、血液中のA D R B 3 含有量を増加する。腫瘍患者の血中s B 3 含有量が健常者より高く、腫瘍再発患者の血液中のs B 3 が治療寛解状態にあった患者より高く、高レベルs B 3 腫瘍患者の生存率が低レベル者より低い。s B 3 は、NK細胞、T細胞及び単球に結合されて、免疫を阻害して、腫瘍が免疫監視から逃避することを可能にする。s B 3 は、循環腫瘍細胞の活性向上に有利であり、A D R B 3 抗体はA D C C 効果を利用して循環腫瘍細胞を除去できる。

【0207】

治療用途以外、抗ヒトA D R B 3 モノクローナル抗体はさらに、ヒトA D R B 3 E L I S A 検出試薬、可溶性A D R B 3 酵素結合検出試薬、金コロイド検出試薬等の開発にも用いられ得る。血液、唾液、尿液、脳脊髄液、胸水や腹水等の体液中のs B 3 含有量の検出は、膿毒症、心臓血管疾患、アルツハイマー病、腫瘍、自己免疫疾患の診断及び治療効果評価に利用できる。血清中のs B 3 は、膿毒症、心筋梗塞、自己免疫疾患や悪性腫瘍等の疾患の診断指標及び病状監視マーカーとして利用できる。血液とほかの体液中のs B 3 含有量の検出により、寿命及び5年内の死亡率が予測でき、s B 3 濃度が高いほど、死亡リスクが高まる。血液中のs B 3 含有量を低下させることにより、老化を遅延できる。

【0208】

A D R B 3 は、補体を活性化させる典型的な経路及び替代経路を低下させることで、細菌、ウイルス、腫瘍を宿主による免疫応答から逃逸させる。A D R B 3 は、補体C 3、C 5、C 8、C 9 発現を減少させて、膜攻撃複合体 (M e m b r a n e A t t a c k C o m p l e x、M A C) の形成を阻害し、腫瘍細胞が補体攻撃から逃避するようにする。A D R B 3 を構成的及び誘導的に発現させることによって、腫瘍及びウイルス感染細胞はM A C 集合を制限して、自体を補体に起因する有害な破壊から保護できる。本発明では、A D R B 3 抗体は、補体系を活性化させて、補体C 3、C 5、C 8、C 9 発現量を向上させ、M A C 集合を促進し、腫瘍細胞の溶解を開始させて、病原性微生物と溶解感染細胞を除去し、悪性腫瘍、ウイルス感染、淋菌感染等の治療に用いられ得ることが開示される。

【0209】

本発明では、A D R B 3 は炎症マーカーであり、A D R B 3 レベルの変化が局所・全身性炎症を反映できることが開示される。可溶性A D R B 3 (s B 3) は細胞表面にあるA D R B 3 がタンパク質にて分解されて脱落した可溶性細胞外成分であり、循環中にs B 3 のレベルと好中球のA D R B 3 が並行して変化するため、血清中のs B 3 の検出が好中球機能監視の指標とされ得る。A D R B 3 抗体は、炎症抑制作用を有し、様々な病原性微生物、たとえば真菌、細菌、ウイルス、マイコプラズマ、クラミジア、スパイラル体、原虫や寄生虫感染による疾患の治療に効く。炎症は腫瘍のリスク因子であり、A D R B 3 による炎症は感染又は自己免疫疾患を腫瘍まで発展させて、腫瘍細胞がさらに大量のA D R B

10

20

30

40

50

3 とほかのプロ炎症性因子を分泌して、炎症反応を深刻にし、遠隔転移を促進して、患者の死亡を早める。腫瘍微小環境での免疫細胞、たとえば好中球、T r e g 及びマクロファージ等は腫瘍の発展を促進する。腫瘍細胞の分泌する A D R B 3 は、血液や腫瘍の局所組織での A D R B 3 含有量を増加し、走化性顆粒球、リンパ球及びマクロファージ等の炎症性細胞が腫瘍組織へ移動したり、浸潤したりする。炎症と腫瘍細胞のいずれも、慢性炎症の維持、腫瘍発展促進、腫瘍に対する免疫監視阻害にとって重要な作用がある A D R B 3 を活性化できる。A D R B 3 は、炎症と腫瘍を繋がる重要な過程であり、炎症と腫瘍の間でポジティブフィードバックループを形成して、炎症と腫瘍の相互促進を発生させる。A D R B 3 抗体は、炎症と腫瘍の悪循環連鎖を遮断して、炎症性細胞の腫瘍部位への動員を阻害し、腫瘍微小環境での炎症反応を軽減させて、抗炎症と抗癌の2重作用を発揮させる。

10

【0210】

腫瘍は、A D R B 3 を血液へ放出して好中球を活性化させて、T細胞媒介特異的免疫応答を弱め、悪液質を発生させる。癌細胞中の A D R B 3 は免疫阻害細胞、たとえば M D S C や T r e g の増殖を誘導して、細胞傷害性Tリンパ球(C T L)とナチュラルキラー細胞(N K)による抗腫瘍免疫応答を阻害し、癌細胞の免疫殺滅からの逃避が可能になり、腫瘍増殖と転移を促進させる。腫瘍中の A D R B 3 は、正常な内皮前駆細胞を腫瘍組織へ動員して、新生血管形成を促進する。A D R B 3 抗体は、腫瘍微小環境における免疫阻害細胞と腫瘍細胞の A D R B 3 発現と活性を阻害するものであり、腫瘍の炎症環境を軽減させることで腫瘍免疫作用を高めるとともに、腫瘍細胞の増殖に対する直接阻害が可能であり、悪性腫瘍や悪液質の治療に適合する。

20

【0211】

A D R B 3 抗体の軽鎖・重鎖配列決定結果に基づいて、本発明では、抗 A D R B 3 キメラ抗原受容体で改変されたT細胞は、A D R B 3 を発現させた腫瘍細胞以外、腫瘍微小環境での癌促進炎症性細胞を除去して、その他キメラ抗原受容体T細胞免疫治療法(C A R - T)による治療効果を高めることができ、C A R - T 治療が失敗した腫瘍患者に適用できることが開示される。癌細胞、顆粒球、T細胞及びマクロファージは、C A R - T 細胞の脱分化を誘導して、C A R - T 細胞の抗癌活性を失わせる。A D R B 3 抗体は、C A R - T 細胞の分化状態を維持して、C A R - T による癌細胞への殺滅能力を高めることができる。該キメラ抗原受容体は、マウス抗ヒト A D R B 3 の一本鎖抗体、C D 8 ヒンジ領域及び膜貫通領域、C D 1 3 7 (4 - 1 B B と呼ばれる) の細胞内シグナル領域、C D 3 の胞内シグナル構造を直列接続してなる。抗 A D R B 3 C A R - T 細胞は、腫瘍細胞と腫瘍内環境での癌促進炎症性細胞(好中球、T r e g 及びマクロファージ)を殺滅でき、腫瘍細胞が A D R B 3 を発現させなくても、抗 A D R B 3 C A R - T 細胞は腫瘍環境細胞を阻害することにより抗癌作用を果たすことができ、汎用型 C A R - T 細胞として、悪性腫瘍、自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化症、炎症、ウイルス感染、神経変性疾患たとえばアルツハイマー病や高齢化による疾患の治療に用いられ得る。

30

【0212】

本発明では、抗 A D R B 3 キメラ抗原受容体で改変されたマクロファージ、樹状細胞、N K 細胞及び顆粒球は、腫瘍細胞と老化細胞を除去して、悪性腫瘍、自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化症、炎症、ウイルス感染、神経変性疾患や高齢化による疾患の養子免疫療法に用いられ得ることが開示される。

40

【0213】

本発明は C R I S P R / C a s 9、T A L E N 及び Z F N 技術により A D R B 3 遺伝子を削除、添加、活性化又は阻害する、A D R B 3 に基づく遺伝子治療を開示する。老化防止及び悪性腫瘍、自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化症、炎症、ウイルス感染、アルツハイマー病や高齢化による疾患を治療できる。A D R B 3 標的に基づく遺伝子治療の適応症は A D R B 3 抗体の適応症と同様である。

【0214】

本発明では、A D R B 3 は新規な単球表面分子であり、単核 - マクロファージの分化と

50

増殖を調節して、単球のM1マクロファージへの分化を誘導し、特に腫瘍関連マクロファージの活性を調節することが開示される。

【0215】

本発明は、ADRB3分子を大量で発生して分泌し、ADRB3⁺マクロファージと命名されて、生体の天然免疫を阻害する新規なマクロファージを開示する。

【0216】

本発明では、ADRB3は新規な赤血球表面分子であることが開示される。

【0217】

本発明では、ADRB3は新規な巨核球と血小板表面分子であることが開示される。

【0218】

本発明では、ADRB3は新規なNK細胞表面分子であることが開示される。

【0219】

本発明では、ADRB3は新規な樹状細胞表面分子であることが開示される。

【0220】

本発明では、ADRB3遺伝子は細胞増殖に関連するガン原遺伝子(proto-oncogene)であり、大部分の癌では重要な駆動因子になることが開示される。膵臓癌、乳癌、肺癌、結腸直腸癌、肝癌、黒色腫、リンパ腫や白血病等の悪性腫瘍細胞では、ADRB3は異常に高発現される。ADRB3遺伝子は、主に増幅と染色体転位再編成の方式で活性化される。ADRB3遺伝子の融合、過剰発現及び突然変異のいずれによっても、ADRB3タンパク質障害が引き起こされることがあり、異常なADRB3タンパク質は、PI3K/AKT/mTOR、RAS/MAPK、Jak/Stat、TGF-β/Smad、ErbB/HER、Wnt/Hedgehog/Notch等を含む、下流にある複数の発がん性シグナル経路を活性化させる。

【0221】

本発明では、ADRB3は腫瘍転移を促進し、ADRB3抗体は腫瘍転移を遮断して、遠隔転移が起こった進行癌患者の治療に適用できることが開示される。ADRB3は、腫瘍細胞の移動能力を向上させることにより血液へ侵入させ、腫瘍細胞と好中球の間の強度作用を高めて腫瘍転移を促進する。循環腫瘍細胞はADRB3を大量発現させ、腫瘍細胞はADRB3を介して顆粒球、マクロファージに接着して、顆粒球、マクロファージに連れてほかの位置に運ばれて転移する。腫瘍転移は腫瘍自体の侵襲能力に依存するだけでなく、前転移ニッチ(pre-metastatic niche)の形成にも密接に関係する。前転移ニッチの構築は、循環器系まで侵襲している腫瘍細胞が遠隔転移巣部位に付着して生存し、増殖し最終的に転移癌を形成できるか否かを決定する。血液中の顆粒球とマクロファージが組織に入ると、ADRB3因子を放出して、腫瘍細胞の生存に適する微小環境を構築する。循環腫瘍細胞の分泌する可溶性ADRB3タンパク質は、骨髄前駆体細胞が動員されて遠隔特定器官や組織に移植して前転移ニッチを構成し、循環腫瘍細胞を特定部位へ動員して転移巣を形成するように誘導できる。

【0222】

腫瘍細胞でのADRB3レベルの向上が、転移速度増加、再発及び死亡率を含む不良な臨床結果に繋がる。腫瘍組織におけるADRB3含有量の検出は、悪性腫瘍の診断、予後や治療効果評価に利用できる。血液における可溶性ADRB3の濃度が高くなることは、腫瘍発展加速又は再発、患者予後の不良を示すことになる。

【0223】

本発明では、ADRB3は、細胞核小体内の重要な構造タンパク質であり、核小体機能を維持するのに重要な役割を果たすことが開示される。ADRB3は、G0期細胞の核小体内に蓄積されて、リボソームの大、小サブユニットの合成を促進し、遺伝子サイレンシング、細胞老化、細胞周期調節に関与する。ADRB3は、Ki-67遺伝子の発現とタンパク質の合成を促進して、休眠したG0細胞を活性化させて増殖期に入るようにする。ADRB3抗体は、腫瘍細胞の核小体の機能と構造を阻害する。ADRB3は、G0、G1、S及びG2期細胞の核小体に存在して、休眠期(G0)と増殖期の切り替えを促進し

10

20

30

40

50

て、有糸分裂を促進する。A D R B 3 は、G 0 期と増殖期にある細胞の核小体の機能及び構造を調節するものの、G 0 期と増殖期にある細胞の核小体における A D R B 3 の立体配置が異なり、露出された抗原エピトープも異なるため、異なる細胞周期にある核小体中の A D R B 3 を検出するのに、異なる A D R B 3 抗体の使用が必要である。本発明では、異なる A D R B 3 ポリペプチド断片を用いて A D R B 3 抗体を製造し、A D R B 3 タンパク質の N 末端の断片（第 1 - 155 位アミノ酸残基）で免疫された抗体は、増殖期にある細胞核小体中の A D R B 3 を検出でき、A D R B 3 タンパク質の中間ドメイン断片（第 100 - 300 位のアミノ酸残基）で免疫された抗体は休眠期にある細胞の核小体中の A D R B 3 を検出できる。免疫組織化学、免疫蛍光やフローサイトメトリー等の検出には、抗原エピトープが A D R B 3 の N 末端のポリペプチドであるモノクローナル抗体は増殖期細胞の検出に適用でき、抗原エピトープが A D R B 3 の中間ドメインであるモノクローナル抗体は G 0 期細胞の検出に適用できる。

10

【0224】

本発明では、A D R B 3 は G 0 期細胞マーカーであり、A D R B 3 を発現させた G 0 期細胞しか細胞周期に改めて入ることができないことが開示される。化学療法薬によっては、癌再発の根本原因と考えられる G 0 期癌細胞を殺滅することができない。循環腫瘍細胞と播散した腫瘍細胞は、原始の成長微小環境が欠乏することにより休眠状態に誘導される。A D R B 3 抗体は、G 0 期癌細胞を特異的に殺滅して、G 0 期癌細胞が増殖期（たとえば G 1 期）に入ること防止し、再発や薬剤耐性を発生させた悪性腫瘍患者の治療に用いられる。A D R B 3 抗体は、G 0 期循環腫瘍細胞を除去するものとして、癌細胞転移の予防に用いられる。

20

【0225】

A D R B 3 の細胞核での分布状態が細胞周期の段階に密に関連する。G 0 期と増殖期にある細胞核小体において A D R B 3 の分布が異なり、核小体に A D R B 3 が大量蓄積されることは G 0 期細胞が増殖期に入ることについてマーカーイベントである。A D R B 3 が K i - 67 陰性細胞の核小体に蓄積されることは、該細胞が G 0 期から G 1 期に入ろうとすることを示している。本発明では、A D R B 3 抗体を用いて免疫蛍光実験を行い、核小体での A D R B 3 輝点を検出されることにより、増殖能力を有する G 0 期細胞（図 1 中、右上にある細胞は増殖能力を有する G 0 期細胞である）を同定できることが開示され、同定基準は以下のとおりである。（1）、細胞核小体での A D R B 3 が塊状に凝集して、2 ~ 6 個の輝点を形成し、輝点が所在する部位の D A P I 染色が陰性であり、A D R B 3 輝点の周辺にヘテロクロマチン又は高度に圧縮されたクロマチン（D A P I 染色強陽性）が存在する。（2）、細胞核中に K i - 67 が発現されていない。

30

【0226】

A D R B 3 が細胞核に散在している場合、細胞は G 0 期から増殖期（細胞周期の G 1、S 又は G 2 期）に入ったことを示し、このとき、A D R B 3 は、核受容体と転写因子として、遺伝子発現を調節する。本発明では、A D R B 3 はアセチラーゼ活性を有し、核小体中のヒストンのアセチル化を調節し、特に H 3 ヒストンの 9、14、18、27、56 番目のリシンのアセチル化を増加することが開示される。アセチルトランスフェラーゼ T i p 60 は A D R B 3 により染色体上に動員されて、ヒストン H 4 K 5、H 4 K 12 等のリシン部位のアセチル化を行うことができる。本発明では、A D R B 3 抗体は、アセチラーゼ阻害剤として、アセチル化修飾に関する疾患の治療に用いられることが開示される。

40

【0227】

核小体の構造と機能の完全性が癌細胞の活性にとって大切なことであり、A D R B 3 は G 0 期腫瘍細胞の核小体の機能と構造を維持するものであり、ストレス能力を高め、腫瘍細胞が不都合な環境でも生存し続けることに役立つ。適切な環境では、A D R B 3 は休眠した G 0 期細胞を刺激して G 1 期に入るようにして、細胞を脱分化させて、腫瘍の悪性度を向上させる。A D R B 3 抗体は核小体の機能を破壊して、G 0 期腫瘍細胞のエネルギー代謝を弱め、G 0 期腫瘍細胞が細胞周期に入ることが阻害して、G 0 期細胞の老化、アポトーシスを誘導する。

50

【0228】

G0期細胞の核小体以外、ADRB3はG1、S及びG2期細胞の核小体にも少量で存在する。細胞が糸分裂期に入ったとき、核小体が分裂して、ADRB3は中心体位置に位置して、紡錘体の形成を促進する。ADRB3は各細胞周期に幅広く分布しているため、有糸分裂に対して重要な調節作用を果たす。ADRB3抗体は増殖期癌細胞の殺滅にも適用できる。

【0229】

核小体は、複数種のウイルスの複製、転写場所である。ADRB3抗体は核小体の機能を阻害して、ウイルス複製を遮断し、ウイルス感染症の治療に用いられ得る。

【0230】

ADRB3は、有糸分裂期細胞の紡錘体の両極又は中心体に存在して、微小管の発生を調節して、キネトコア機能を高め、姉妹染色体の分離を促進する。本発明では、ADRB3は、微小管関連タンパク質(microtubule associated protein)であり、分裂期細胞の紡錘体形成を促進するものであり、ADRB3抗体は、腫瘍細胞の微小管に対する阻害により抗癌作用を果たすことが開示される。ADRB3は分子モーター(molecular motor)の機能を持っており、細胞内の物質、たとえばオートファゴソーム、リポフスチン等の輸送を調節する。ADRB3抗体は腫瘍細胞の物質搬送を遮断することにより、オートファゴソームとリポフスチンが除去できず細胞内に蓄積されて、腫瘍細胞老化を早める。

【0231】

ADRB3は、腫瘍細胞のミトコンドリア外膜に局在化されて、ミトコンドリア膜電位を正常に維持し、ミトコンドリア融合を促進する。本発明では、ADRB3抗体は、腫瘍細胞の解糖と酸化リン酸化を弱めて、ATP発生を阻害することが開示される。ADRB3抗体は、ミトコンドリア膜貫通電位を破壊して、ミトコンドリアによる活性酸素種の発生を促進し、リポフスチン等の過酸化物を増加することで、アポトーシスを引き起こす。ADRB3抗体は、腫瘍細胞リゾソームの成熟を阻害して、損傷したミトコンドリアやほかの代謝廃棄物たとえばリポフスチンの除去を阻害する。

【0232】

本発明では、ADRB3は、ミトコンドリアの自食を促進するとともに、オートファゴソームとリゾソームとの膜融合を促進してオートリゾソームを形成し、オートファゴソームの除去を促進することが開示される。ADRB3は、オートファゴソーム前駆体膜に局在化されて、オートファゴソーム膜を延長させて完全なオートファゴソームを形成する。ADRB3は、オートファゴソームの二層膜間腔による水素イオンリザーバの形成を促進して、V-ATPaseによるATPの生産を駆動し、それはG0期細胞の主なエネルギー発生方式であり、細胞が酸素ガスを必要とせずに低代謝の休眠状態を維持できる。ADRB3抗体又はADRB3阻害剤たとえばSR59230Aは、自食を遮断して、ミトコンドリアのオートファゴソームの除去を阻害し、オートファゴソーム、損傷したミトコンドリアやリポフスチン等の代謝廃棄物を細胞内に蓄積させて、細胞老化又はアポトーシスを促進することができる。自食遮断以外、ADRB3抗体は老化関連遺伝子p16INK4/p53/p63発現を増加して、SIRT1を減少させ、癌細胞老化を促進することも可能である。

【0233】

通常の場合では、細胞内のオートファゴソームの分解速度が非常に高いため、オートファゴソームの検出が困難である。ADRB3抗体又はADRB3阻害剤は、自食誘導剤として、オートファゴソームの分解を遅延させ、自食研究のためのツール薬物として利用し得る。

【0234】

本発明では、ADRB3抗体は、ペントースリン酸経路を遮断して、癌細胞のDNA複製を阻害することが開示される。

【0235】

10

20

30

40

50

本発明では、A D R B 3 抗体は、細胞中のリボソーム合成を遮断して、腫瘍細胞のタンパク質合成能力を低下させることが開示される。

【0236】

本発明では、A D R B 3 抗体は、癌細胞のストレス反応を遮断して、癌細胞の放射線治療、化学療法に対する耐性発生を防止することが開示される。A D R B 3 抗体は、癌細胞の酸化ストレス能力を低下させて、腫瘍細胞がオキシドールと活性酸素種を除去できなくなることが開示される。

【0237】

A D R B 3 は、以下のメカニズムを利用して癌細胞の増殖と転移を促進する。(1)、P 5 3 タンパク質の分解を促進して、アポトーシスを阻害する。(2)、ミトコンドリアの自食、解糖及び酸化的リン酸化を促進して、ミトコンドリア外膜における電圧依存性アニオンチャンネル(V D A C)を調節し、ヘキソキナーゼ2(H K 2)、G A P D Hを活性化させる。(3)、G 0 期の核小体機能を高めて、リボソーム合成を促進する。(4)、リソソーム外膜におけるH⁺-A T P a s eとV D A Cを活性化させて、リソソーム内の加水分解酵素の活性を維持する。(5)、C y c l i n D 1 / C D K 3 / C D K 4 発現を向上させて、R bリン酸化を増加する。(6)、紡錘体の形成を促進して、リン酸化C E N P - Aを増加する。(7)、A M P K、S I R T 1及びmT O Rで媒介したストレス経路を活性化させて、癌細胞のストレス能力を高める。(8)、好中球とM D S Cの増殖を促進して、調節性樹状細胞と腫瘍関連マクロファージの活性を高め、T細胞とN K細胞の抗癌機能を阻害する。(9)、好中球、リンパ球及び腫瘍細胞によるI L - 6、V E G FやT G F等の炎症性因子の合成を促進する。(10)、走化性内皮細胞、成繊維細胞、巨核球、リンパ球、顆粒球等が腫瘍組織へ浸潤して、新生血管の形成を促進する。(11)、循環腫瘍細胞が血管内皮細胞に接着して、内皮を貫通して組織間隙に入り、転移巣を形成することを促進する。(12)、P - 糖タンパク質の活性を向上させて、癌細胞に薬剤耐性を発生させる。

10

20

【0238】

A D R B 3 は、免疫細胞(好中球、単核 - マクロファージ、リンパ球)と腫瘍細胞に存在するものであり、炎症促進と癌促進の2重機能を兼ね備える。A D R B 3 は、免疫細胞の癌促進作用を強化させて、癌細胞の炎症促進作用を向上させ、炎症と腫瘍が互いに促進されて、悪循環になる。A D R B 3 抗体は、免疫細胞と腫瘍細胞における共通の重要なシグナル分子にターゲティングして、腫瘍環境での免疫阻害細胞に干渉するとともに、腫瘍細胞を阻害して、炎症及び腫瘍の発展を効果的に遮断できる。

30

【0239】

本発明では、抗ヒトA D R B 3 モノクローナル抗体は、広域スペクトル抗癌薬であり、癌細胞、リンパ球又は好中球にA D R B 3 の高度過剰発現(免疫組織化学A D R B 3 陽性)又は遺伝子増幅(蛍光*i n s i t u* ハイブリダイゼーション検出により実証)が発生した腫瘍にA D R B 3 モノクローナル抗体を適用する場合、臨床的な治療効果が最も高いことが開示される。治療できる悪性腫瘍としては、悪性リンパ腫(ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫)、急性白血病、慢性白血病、混合系統白血病、悪性組織球症、多発性骨髄腫、頭頸部扁平上皮癌、甲状腺癌、鼻咽頭癌、中咽頭癌、肺癌、膵臓癌、乳癌、食道癌、胃癌、肝癌、胆管癌、結腸直腸癌、皮膚癌、湿疹様癌(P a g e t 病)、基底細胞癌、扁平上皮細胞癌、黒色腫、神経神経膠腫、星状細胞腫、神経膠芽細胞腫、網膜芽細胞腫、神経芽細胞腫、膀胱癌、腎臓癌、卵巣癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、前立腺癌、骨肉腫、平滑筋肉腫、消化管間質腫瘍、繊維肉腫、悪性線維性組織球腫、脂肪肉腫、横紋筋肉腫、血管肉腫、悪性胸腺腫、傍腫瘍性神経症候群及び悪液質が含まれるが、これらに制限されない。

40

【0240】

A D R B 3 モノクローナル抗体は、免疫チェックポイント阻害剤による免疫関連有害事象を治療することができ、免疫媒介性肺炎、免疫媒介性結腸炎、免疫媒介性肝炎、免疫媒介性下垂体炎、腎不全と免疫媒介性腎炎、免疫媒介性甲状腺機能亢進や甲状腺機能低下症

50

が含まれるが、これらに制限されない。

【0241】

本発明に係る抗体は、キャリアとしてそれぞれ細胞傷害性薬物（メトトレキサート、アドリアマイシン、ビンクリスチン等）、放射性同位元素（ I^{131} 、 I^{125} 、 In^{111} 等）又は生物毒素（ジフテリア毒素、リシン等）と架橋して、悪性腫瘍に対する目標指向療法を行うことができる。本発明に係る抗体は、化学療法薬の増感剤として、化学療法の治療効果を向上させ、化学療法薬について薬剤耐性が生じた患者を治療することもできる。本発明における抗ヒトADRB3モノクローナル抗体の剤型と製造方法について特に制限がなく、本分野で一般的に使用されている製法によって、注射剤、外用剤、吸入剤、普通の経口投与剤型、カプセル、顆粒剤、徐放剤、噴霧剤、エアロゾル剤等の各種剤型として調製できる。

10

【0242】

ADRB3は、血小板と好中球を活性化させるため、血液を高凝固、高炎症性の状態にする。ADRB3は血小板活性化のマーカーであり、血小板、内皮細胞及び白血球の間の相互作用を媒介して、癌細胞キャリアとして転移を促進する可能性がある。本発明では、抗ヒトADRB3モノクローナル抗体は、血小板と好中球の活性を阻害して、血小板の凝集を阻害し、血栓形成を防止し、血栓塞栓症の予防と治療に効き、このような疾患としては、パーナード・スーリエ症候群、フォンビルブランド病、血小板無力症、血小板増加症、深部静脈血栓症、末梢血管塞栓症、肺塞栓症、脳塞栓症、網膜動脈閉塞症、急性亜急性末梢動脈血栓症、網膜中心静脈閉塞症、血液透析シャントによる凝固、手術過程に生じた血栓形成、心臓カテーテル検査、溶血性や外傷性ショック及び播種性血管内凝固（DIC）を合併した敗血症ショックが含まれるが、これらに制限されないことが開示される。

20

【0243】

本発明では、ADRB3モノクローナル抗体は、止血薬として、流血又は止血減少を必要とする各種の治療シナリオ、たとえば、外科、内科、婦人科、眼科、耳鼻咽喉科、口腔科等の臨床部門での出血及び出血性疾患に利用できることが開示される。血友病、血小板減少症、紫斑病、鼻出血、歯茎の出血等の病症に利用できる。

【0244】

アテローム性動脈硬化症（AS）は、慢性炎症に密接に関連して、過剰に活性化されたマクロファージ、好中球及びリンパ球に起因する炎症はASプラークの不安定性を引き起こす要因である。ADRB3は、アテローム性動脈硬化症の発生や形成したプラークの不安定性を引き起こす。ADRB3はマクロファージ、好中球、リンパ球及び血管内皮細胞が接着してプラークに入り、プラークが炎症を発生させて割れ、心筋虚血または壊死の重篤化を引き起こし、臨床的に、不安定狭心症と急性心筋梗塞が発生する。ADRB3を豊富に含んだマクロファージ、顆粒球及びリンパ球は急性冠症候群（ACS）を引き起こす「犯罪者」細胞である。ADRB3は、APCの動脈壁でのT細胞への抗原提示を促進して、局所でのT細胞の活性化と炎症性サイトカインの生産を発生させて、慢性炎症を介して、泡沫細胞の形成を誘導することで、アテローム性動脈硬化症を促進する。ADRB3は、アテローム性動脈硬化症に対する独立予測因子であり、末梢血可溶性ADRB3レベルと冠状アテローム性動脈硬化症の重篤度が正相関を示している。ADRB3は以下のメカニズムによりACSを引き起こす。1、炎症性細胞の血管内皮への接着を促進して、内皮を損傷し、低密度リポタンパク質コレステロール（LDL-C）を内皮へ堆積させて、プラークを形成する。2、血小板、マクロファージ、T細胞及び好中球を活性化させることで、血液を高凝固、高炎症の状態にする。3、プラーク内の血管新生を促進する。4、顆粒球、T細胞のプラークへの浸潤を促進して、プラークに炎症を発生させる。5、MMPを活性化させて、プラークの線維性キャップを分解する。6、ADRB3は顆粒球、マクロファージ及び内皮細胞のLDLR、スカベンジャー受容体を増加して、細胞によるLDL-Cとカイロミクロンの貪食を刺激して泡沫細胞にする。7、ADRB3はマクロファージのペントースリン酸経路を活性化させて、ヌクレオチドを合成してマクロファージ増殖を促進する戊糖とコレステロールの合成に関与してLDL-Cの濃度を増加してマク

30

40

50

ロファージによるLDL-C貪食を促進する、強還元剤であるNADPHとを大量発生させる。8、溶質キャリア(solute carrier, SLC)スーパーファミリーがコレステロールを輸送するための重要なタンパク質であり、ADRB3はマクロファージでのSLC16A3発現を増加して、マクロファージによるLDL-C摂取を促進する。9、ADRB3は肝細胞のリポソーム機能を向上させて、肝臓によるC反応性タンパク質、凝固因子、超低密度リポタンパク質(VLDL)の合成を促進して、血管炎症反応を深刻にする。10、ADRB3は、単球のM1マクロファージへの分化を促進して、コレステロールへの貪食を増加して泡沫細胞を形成する。

【0245】

本発明では、抗ヒトADRB3モノクローナル抗体を用いて心臓血管・脳血管疾患を製造することが開示され、この心臓血管・脳血管疾患としては、冠状アテローム性動脈硬化症性心疾患、急性冠症候群、心筋梗塞、アテローム性動脈硬化症、冠動脈ステント内再狭窄、大動脈解離、慢性肺性心疾患、原発性高血圧、高脂血症、心不全、心筋繊維化、心筋炎、ウイルス性心筋炎、原発性心筋症、拡張型心筋症、肥大性心筋症、狭窄性心筋症、リウマチ性心疾患、リウマチ性心臓弁疾患、感染性心内膜炎、先天性心疾患、不整脈、心房細動、心室頻拍、心室フラッター、心室細動、アダムス・ストークス症候群、心臓及び腎臓再灌流傷害、一過性脳虚血発作(TIA)、脳卒中、癲癇、認知症、脳出血、くも膜下出血、脳梗死、脳動脈瘤、脳動静脈奇形が含まれるが、これらに制限されない。

10

【0246】

本発明者により、ラパマイシンが血管内皮細胞と平滑筋細胞でのADRB3発現量を増加して、ラパマイシン薬物溶出ステントの術後再狭窄の原因となることが見出された。本発明では、ADRB3抗体による、冠動脈インターベンション後の再狭窄とステント内再狭窄の治療が開示される。ADRB3抗体は、コーティング薬物として、新型薬物溶出ステントや薬物溶出バルーンの生産に用いられ得る。

20

【0247】

本発明では、可溶性ADRB3は急性冠症候群の診断と心臓血管疾患予後予測用の新指標であることが開示される。可溶性ADRB3の測定は、冠状動脈性心疾患の早期診断の分子マーカーとされてもよく、可溶性ADRB3レベルの上昇は冠状動脈性心疾患を示す要因の1つであり、血液中のADRB3レベルの上昇に伴い、ACS発症リスクも有意に高くなり、心臓血管疾患予後が悪くなる。急性冠症候群患者の末梢血中の可溶性ADRB3レベルが安定狭心症患者より高く、血液中の可溶性ADRB3レベルはACS診断用の重要な指標であり、ACS患者の血液中のADRB3⁺顆粒球とADRB3⁺リンパ球の数のいずれも増加する。

30

【0248】

本発明では、抗ヒトADRB3モノクローナル抗体は、広域スペクトル抗炎症薬及び免疫阻害剤であり、全身性炎症反応及び組織損傷を軽減させることができ、炎症性疾患、アレルギー性疾患や自己免疫疾患の治療に用いられ得ることが開示され、この疾患としては、上気道感染症、気管支炎、肺炎、肺気腫、喘息、グルコルチコイド耐性喘息、好酸球増加症、特発性好酸球増多症候群、アレルギー性鼻炎、間質性肺炎、肺間質線維症、慢性閉塞性肺疾患、原発性肺動脈性肺高血圧症、結合組織病関連肺動脈性肺高血圧症、肺繊維化、特発性肺線維症及び嚢胞性線維症、肺サルコイドーシス、珪肺、肺損傷、急性呼吸窮迫症候群、呼吸不全、胸膜炎、結核病、内毒素血症、敗血症性ショック、中毒性ショック症候群、敗血症、膿毒症、膿毒性ショック、内毒素性ショック、アナフィラキシー、多臓器不全症候群、播種性血管内凝固、火傷、急性重症肝炎、急性肝不全、慢性肝炎、ウイルス性肝炎、肝硬変、肝性脳症、原発性硬化性胆管炎、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、胆嚢炎、膵臓炎、慢性胃炎、消化性潰瘍、消化管ストレス潰瘍、ストレス性消化管出血、糖尿病、湿疹、接触性皮膚炎、神経性皮膚炎、脳炎、脳膜炎、脊髄炎、ギランバレー症候群、多発性硬化症、緑内障、感染性多発根神経炎、視神経炎、視神経乳頭炎、糖尿病性網膜症、虹彩異色虹彩毛様体炎、ブドウ膜炎、交感性眼炎、網膜静脈閉塞、視神経脊髄炎、脱髄疾患、結膜炎、角膜炎、強膜炎、ドライアイ、白内障、黄斑変性症、加齢黄斑変

40

50

性症、破傷風、生殖器疣贅、淋病、生殖器ヘルペス、梅毒、乾癬、単純性皰瘡疹、白斑、色素性乾皮症、太田母斑、肝斑、帯状ヘルペス、体部白癬や股部白癬、手足白癬、湿疹、アレルギー性皮膚炎、にきび、脂漏性皮膚炎、脱毛、脂漏性脱毛症、精神的ストレスによる脱毛症、円形脱毛症、神経性脱毛症、若白髪、関節リウマチ、変形性関節症、骨粗鬆症、全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、サルコイドーシス、強直性脊椎炎、赤痢、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群、シェーグレン症候群、痛風、混合結合組織病、重症筋無力症、内臓リーシュマニア症、シャーガス病、アメーバ性肝膿瘍、小児粘膜皮膚リンパ節症候群、血管炎、全身性血管炎、原発性小血管炎、肉芽腫性血管炎、閉塞性血栓性血管炎、発作性夜行性ヘモグロビン尿症、巨細胞性動脈炎、毛管内増殖性糸球体腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎、ループス腎炎、糸球体腎炎、尿細管萎縮及び間質性線維化、腎盂腎炎、腎炎性ネフローゼ症候群、腎不全、多発性嚢胞腎、尿路感染症、骨盤内炎症性疾患、卵管炎、前立腺炎、多発性硬化症、ベーチェット病、天疱瘡、類天疱瘡、皮膚筋炎、蜂巣炎、急性化膿性脳膜炎、マラリア、アルツハイマー病、レビー小体型認知症、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、ギランバレー症候群、川崎病、甲状腺炎橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、甲状腺機能亢進症、移植片対宿主病、同種移植拒絶反応、筋症、筋变性、筋ジストロフィー、毛細血管拡張性運動失調症、慢性肉芽腫症、リンパ節炎、再生不良性貧血、自己免疫性溶血性貧血、アレルギー性紫斑病、血小板減少性紫斑病、骨髄線維症、骨髄異形成症候群、白血球接着欠陥症、B細胞欠損症、T細胞欠損症、重症複合免疫不全症、補体欠損症、リソソーム蓄積症、ムコ多糖症、ムコ脂質蓄積症、ヘリコバクターピロリ感染、ブルセラ症、梅毒、レプトスピラ症、バング病、トキソプラズマ症、包虫症、住血吸虫症、腸チフ、黒熱病、フィラリア症が含まれるが、これらに制限されない。

10

20

【0249】

本発明では、ADRB3抗体は、淋菌の薬剤耐性に対して逆転作用を有するため、薬剤耐性淋病を治療できることが開示される。

【0250】

本発明では、可溶性ADRB3は、上記炎症性疾患の予後を予測する新指標であり、血液中のADRB3レベルの上昇に伴い、予後が悪くなることが開示される。

【0251】

ADRB3は、ヒト免疫不全ウイルス、肝炎ウイルス、エボラウイルス、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、パピローマウイルス、単純ヘルペスウイルス、EBウイルス及び狂犬病ウイルスの複製を促進する。ADRB3抗体は、ウイルス複製を阻害して、ウイルス除去を促進する。HIVが細胞を感染すると、元々細胞質に分布しているADRB3の膜上への蓄積を誘導して、CD4⁺T細胞を走化させて、T細胞をADRB3が富化した領域に接着させる。ADRB3によるシナプスを介して、HIVは宿主細胞 - CD4⁺T細胞に移動する。

30

【0252】

本発明では、抗ヒトADRB3モノクローナル抗体は、広域スペクトルの抗ウイルス薬であり、ウイルス感染症の治療に用いられることが開示され、上記ウイルス感染症としては、重症急性呼吸器症候群、感染性非定型肺炎、後天性免疫不全症候群、B及びCウイルス性肝炎、インフルエンザ、麻しん、尋常性疣贅、生殖器疣贅（コンジローマ）、ヒトT細胞白血病ウイルス感染、単純ヘルペスウイルス感染に起因する新生児ヘルペス、生殖器ヘルペス、ウイルス性髄膜炎、レンチウイルス脳炎及び脳症、ヒトプリオン病、クロイツフェルト病、Kurub病、亜急性硬化性汎脳炎、ウイルス性心筋炎、手足口病、EBウイルス感染、感染性単核球症、ウイルス性出血熱、流行性出血熱、デング出血熱、エボラ出血熱、帯状ヘルペス、特発性血小板減少性紫斑病及び狂犬病が含まれるが、これらに制限されない。

40

【0253】

ADRB3モノクローナル抗体の抗ウイルス作用に基づいて、本発明では、ADRB3遺伝子で予防用抗ウイルスワクチンを製造し、ADRB3全長タンパク質とポリペプチド

50

断片を用いて治療用抗ウイルスワクチンを製造し、生体の特異的細胞免疫と体液性免疫応答を誘導することにより、ウイルスを除去又は調節する目的を達成させることが開示される。

【0254】

本発明では、ADRB3抗体は、抗原提示細胞を活性化させて、T細胞免疫応答を刺激し、ワクチンの免疫効果を高めることが開示される。ワクチン接種前後、ADRB3抗体を投与することによって、抗原提示細胞の数を増加して、それにより、抗原を効果的に捕獲して、処理しT細胞へ提示することができる。本抗体は、免疫アジュバントとして、抗原性の弱い物質による生体の特異的免疫応答の誘導を強化させて、遺伝子組換えワクチンの免疫原性を向上させ、新型B型肝炎、流感ウイルス、HIV遺伝子組換えワクチンの開

10

【0255】

本発明では、ADRB3抗体は、移植器官後免疫系に生じた各種の拒絶反応を阻害して、器官移植後の拒絶反応の予防・治療に用いられることが開示される。

【0256】

ADRB3シグナル伝達経路におけるタンパク質に基づき、本発明では、ADRB3抗体は、P62、HK2、GAPDH、VEGF、Cyclin D1、CDK3、CDK4、Rb、Ki-67、mTOR、Rictor、AKT、Tubulin、TRAF6、PD-L1、P53、P63、IL-2、IL-6、IL-10、TGF及びTNFシ

20

【0257】

本発明では、ADRB3抗体は、骨髄芽球、前骨髄球、骨髄球の増殖を阻害して、CD4⁺T細胞、Treg及び骨髄由来サブレッサー細胞のアポトーシスを促進し、組織での顆粒球、マクロファージ及びリンパ球の浸潤を減少して、炎症反応に起因して老化、器官不全や悪性腫瘍の原因となる組織傷害を軽減させることが開示される。

【0258】

本発明では、ADRB3抗体は、生体の細菌内毒素耐性を高めることができ、解熱や毒血症を緩和させる作用に優れることが開示される。重度の外傷、膿毒症性、内毒素血症、感染性ショック、多臓器不全症候群を治療できる。ADRB3抗体は、急性化膿性感染症

30

【0259】

ADRB3は溶質キャリアスーパーファミリーの調節とATP結合カセットスーパーファミリーの遺伝子発現に関与して、薬物と有毒物質の吸収、分布や除去等の過程に影響を与える。本発明では、ADRB3抗体は、中毒、たとえば酸中毒、高乳酸血症、尿毒症、有機リン中毒、アルコール中毒、バルビツール酸系中毒、重金属（鉛、水銀、砒素、タリウム等）中毒、細菌毒素（破傷風毒素、ジフテリア毒素、ボツリヌス菌毒素等）中毒等を治療できることが開示される。可溶性ADRB3は、上記中毒性疾患の予後を予測するための新指標として、血液中のADRB3レベルが上昇すると、予後が悪くなる。

40

【0260】

本発明では、ADRB3抗体は、mTORシグナル、特にmTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1)の活性を阻害するものであり、老化関連性疾患の治療や老化防止に有用であることが開示される。視床下部中のmTORC1タンパク質は血圧調節のための重要な因子であり、過度の活性化により血圧の上昇を引き起こし、ADRB3抗体はmTORC1を阻害することで血圧降下作用を果たす。

【0261】

シナプス (synapse) は2つのニューロン間又はニューロンとエフェクター細胞の間が相互に接触して、情報を伝達するための部位である。シナプス機能阻害とシナプス

50

喪失が認知機能低下に強く関連している。アルツハイマー病の早期段階では、A D R B 3 はシナプス間のシグナル伝達を阻害し、最近記憶力減退が現れる。本発明者により、アルツハイマー病患者の脳脊髄液において、可溶性A D R B 3の濃度が正常レベルより高く、それによって、神経の炎症を引き起こして、患者の記憶力減退を招くことが見出された。A D R B 3抗体はアルツハイマー病に起因する記憶喪失を逆転し得る。

【0262】

小膠細胞 (microglia) は、中枢神経系の免疫細胞であり、中枢神経系における損傷神経、プラーク及び感染性物質を除去する。A D R B 3 は小膠細胞中に発現され、正常な活性を有するA D R B 3シグナル伝達経路は、小膠細胞の増殖を促進して、小膠細胞の機能を維持し、神経成長因子を増やして、神経組織再生を促進する。病理学的な状態では、活発なA D R B 3シグナル伝達経路は、過量の小膠細胞を活性化させて、小膠細胞の脱分化による機能喪失を引き起こし、神経毒性を発生させて、ニューロンのシナプス可塑性を低下させ、神経変性疾患の発症メカニズムについて重要な役割を果たす。本発明では、抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、学習及び記憶能力を高めて、神経再生を促進し、神経疾患を治療できることが開示され、上記疾患としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、癲癇、毛細血管拡張性運動失調症、ギランバレー症候群、ウシ海綿状脳症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン舞蹈病、ウィルソン病、トゥレット症候群、脆弱X症候群、Lambert Eaton筋無力症候群、後天性ニューロミオトニア、辺縁系脳炎、自己免疫性脳炎、抗NMDA受容体脳炎、視神経脊髄炎、橋本脳症、ループス脳症、ウイルス性脳炎、錐体外路疾患、急性出血性白質脳炎、びまん性硬化症、脱髄疾患、小脳萎縮、原発性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症、対麻痺、脊髄損傷、脊髄空洞症、脊髄炎等が含まれるが、これらに制限されない。

10

20

【0263】

本発明では、A D R B 3抗体は、神経系の炎症反応を阻害して、ストレス状態による不安又は抑鬱を緩和させることが開示される。A D R B 3抗体は精神病を治療するものであり、上記精神病としては、統合失調症、統合失調感情障害、妄想精神病、てんかんに起因する精神障害、双極性感情障害、うつ病、自閉症、強迫性障害、拒食症、神経性過食症、パニック障害、境界性人格障害、感染性精神病、身体疾患に起因する精神病、中毒性精神病（一酸化炭素中毒、農薬中毒）、アルツハイマー病、アルコール中毒性精神病、脳外傷性精神病、神経症、慢性疲労症候群等が含まれるが、これらに制限されない。

30

【0264】

本発明では、A D R B 3抗体はアルコールや毒品（たとえば、ヘロイン、メタンフェタミン、モルフィン、大麻やコカイン等）に起因する中毒を治療できることが開示される。

【0265】

A D R B 3 は、骨リモデリング過程に重要な作用を果たし、破骨細胞中に発現されて、骨吸収を調節するものである。A D R B 3 遺伝子ノックアウトによりマウスの骨質を増加できる。本発明では、A D R B 3抗体は破骨細胞を阻害して骨形成を促進でき、骨退行変性関連の疾患治療に利用でき、前記骨退行変性としては、骨粗鬆症、変形性関節症、退行性関節炎、骨折治癒遅延又は非治癒骨折、大腿骨頭壊死、大腿骨頭すべり症、大腿骨頸部異常、多発性骨端異形成症、古い骨折、化膿性関節炎、骨髓炎、痛風、軟骨石灰化症等が含まれることが開示される。

40

【0266】

本発明における異なるハイブリドーマ細胞株により生じた抗ヒトA D R B 3モノクローナル抗体は、機能が異なり、一部のハイブリドーマ細胞株たとえば5 B 8、5 D 1により生じた抗体は、A D R B 3を遮断して、A D R B 3活性を低下できる。別のハイブリドーマ細胞株たとえば4 G 7、4 F 7等により生じた抗体は、A D R B 3を活性化させて、A D R B 3活性を向上できる。A D R B 3活性化作用を有するA D R B 3抗体とアゴニストたとえばB R L 3 7 3 4 4は、幹細胞の未分化状態を維持することができ、培地に添加して幹細胞、胚性幹細胞、造血幹細胞の培養に用いられ得る。また、誘導多能性幹細胞の生産と培養にも有用である。

50

【0267】

A D R B 3 抗体を細胞培養板に外被して、リンパ球培養を行うことができる。本抗体を用いて、免疫磁気ビーズ細胞選別試薬、エライザ実験 (E L I S A) 試薬、蛍光結合抗体、H R P 結合抗体又はその他のタグタンパク質結合抗体を製造できる。

【0268】

細胞膜以外、A D R B 3 タンパク質は細胞質と細胞核にも存在。腫瘍細胞内の A D R B 3 の大部分が細胞核に存在し、好中球内の A D R B 3 が主に細胞質に存在し、A D R B 3 は局在化によって、露出された抗原エピトープが異なり、同一次抗体は局在化の異なる A D R B 3 との親和力も異なる。本発明では、A D R B 3 タンパク質の N 末端と中部の断片ポリペプチドで動物を免疫して得る抗体は、腫瘍細胞の A D R B 3 と結合しやすく、腫瘍細胞の標識に利用でき、A D R B 3 タンパク質の C 末端のポリペプチド断片で免疫して得た抗体は、顆粒球細胞質における A D R B 3 と結合しやすく、顆粒球の標識に利用できることが開示される。

10

【0269】

本発明では、A D R B 3 遺伝子を用いて予防用腫瘍ワクチンを製造し、A D R B 3 全長タンパク質とポリペプチド断片を用いて治療用腫瘍ワクチンを製造し、生体の特異的細胞免疫と体液免疫応答を誘導することにより、腫瘍を除去又は調節する目的を達成させることが開示される。本発明では、A D R B 3 抗体がプラズマ細胞の抗体発生能力を高めることが開示される。

【0270】

本発明では、A D R B 3 モノクローナル抗体とほかの腫瘍又はウイルス特異抗原との組換え融合タンパク質を製造して、抗腫瘍及び抗ウイルスの免疫応答を誘導することが開示される。ほかの腫瘍又はウイルス特異抗原としては、ヒト前立腺特異抗原 (P S A)、前立腺酸性ホスファターゼ (P A P)、 α -フェトプロテイン、癌胎児性抗原、突然変異した *r a s* 遺伝子コードタンパク質、*c - m y c* 遺伝子産物、糖タンパク質抗原 (C A) 5 0、C A 1 5 2 3、C A 7 2 2 4、C A 5 4 9、サイトケラチン 1 9、扁平上皮細胞関連抗原 (S C C)、C 反応性タンパク質、P D - 1、P D - L 1、H I V タンパク質、B 型及び C 型肝炎ウイルスタンパク質等が含まれるが、これらに制限されない。

20

【0271】

本発明では、A D R B 3 モノクローナル抗体を用いて、血漿分離、血液透析、腹膜透析等の技術により血液、腹水又はその他の体液において過剰に活性化された A D R B 3 を減少させることによって、炎症、膿毒症、腫瘍、心不全や悪液質を治療することが開示される。高齢者の血液中 A D R B 3 の減少により、老化を遅延できる。A D R B 3 抗体で患者の血液、胸水、腹水又はその他の体液中の好中球、リンパ球、M D S C、T r e g 及び M 2 単球を吸着して、免疫吸着治療を行うことができ、治療適応症は A D R B 3 モノクローナル抗体の適応症と同様である。

30

【0272】

正常な活性を有する A D R B 3 の再生促進の生理学的機能を利用して、A D R B 3 活性が低下した場合に、血液、脳脊髄液、心臓、脳、末梢神経、脊髄、肝臓、膵臓、腎臓、筋肉等の組織における A D R B 3 含有量と活性を適切に向上させることにより、組織再生を促進して、老化関連性疾患や外傷に起因する損傷たとえば対麻痺を治療する。A D R B 3 活性亢進の場合は、A D R B 3 活性を低下させた抗体で再生を促進すべきである。

40

【0273】

生殖道の炎症は不妊症に繋がり、精漿 A D R B 3 検出が男性生殖道炎症の特異的指標である。本発明者は、A D R B 3 遺伝子ノックアウト老齢マウスの繁殖力が正常な高年齢マウスより高く、A D R B 3 抗体を投与した雌マウスの 1 回あたりの産子数が正常な雌マウスより多いことを見出した。A D R B 3 抗体は、雄マウスの精漿エラストラーゼレベルを低下させて、A D R B 3 抗体が生殖道炎症を阻害することを示している。C h I P - c h i p の結果から分かるように、A D R B 3 は卵、精子の運動性に関連する多数の遺伝子、たとえば I Z U M O 1、T S S K 3、T S S K 6、T S K S 等の発現を調節できる。A D R B

50

3抗体は、卵、精子の運動性を向上でき、不妊症、勃起不全、早漏、性機能障害を治療できる。

【0274】

A D R B 3 がエラスターゼ活性を向上できるため、本発明では、A D R B 3 抗体はスキンケア類化粧品の製造に用いると、皮膚老化を遅延させて、皮膚の張りを回復させ、しぼを減少して、色素沈着を低減させる効能を有することが開示される。

【発明の効果】

【0275】

従来技術に比べて、本発明は、下記有益な効果を有する。

本発明から明らかなように、A D R B 3 は、神経 - 内分泌 - 免疫調節ネットワークにおける重要な受容体であり、複数種のシグナル伝達経路を媒介することができ、媒介したシグナル伝達経路は好中球、リンパ球や腫瘍細胞等の増殖と分化を調節できる。健常な状態では、A D R B 3 は、生体の非特異的免疫と特異的免疫の能力を維持して、外因性病原性微生物や老化した生体組織を除去し、生体保護及び老化防止の役割を果たす。病理学的な状態では、該シグナル伝達経路の過剰な活性化によりシステム慢性炎症が発生して、免疫恒常性が損なわれる。A D R B 3 のモノクローナル抗体は、A D R B 3 と特異的に結合してその活性を調節（遮断又は作動）できるため、炎症、悪性腫瘍、ウイルス感染、心臓血管・脳血管疾患（たとえば、アテローム性動脈硬化症）、糖尿病、神経変性疾患（たとえば、アルツハイマー病）、自己免疫疾患、高齢化による疾患、膿毒症、喘息、内毒素血症、感染性刺激、多臓器不全症候群、急性化膿性感染症、再生機能不全による疾患、淋菌感染、貧血、重度の外傷、アレルギー性疾患、悪液質疾患、中毒性疾患、器官移植免疫拒絶反応、悪液質疾患、肺動脈性肺高血圧症、急性冠症候群、骨退行変性、肥大性心筋症、M D S C 関連性疾患や精神病等、複数種の疾患の治療に利用でき、重要な薬用価値及び応用の将来性が期待できる。

10

20

【図面の簡単な説明】

【0276】

【図1】A D R B 3 (B 3 A R) タンパク質はG 0 期 (K i - 6 7 陰性) ヒト乳癌 M C F 7 細胞の核小体において高発現された。増殖期細胞 (K i - 6 7 陽性) の細胞核にも A D R B 3 は存在するものの、核小体での分布が少ない。

【図2】A D R B 3 タンパク質はG 0 期 (N u c l e o l i n 陰性) M C F 7 細胞の核小体において高発現された。

30

【図3】A D R B 3 タンパク質はM C F 7 細胞の核小体 (F i b r i l l a r i n 陽性) において高発現された。

【図4】A D R B 3 タンパク質はG 0 期 M C F 7 細胞 (H 3 K 9 A C 陰性) の核小体に蓄積している。

【図5】B r d u 陰性 (非 S 期) の M C F 7 細胞核には、大量の A D R B 3 タンパク質が存在する。

【図6】A . A D R B 3 は M C F 7 細胞核と核小体に蓄積されている。B . A D R B 3 は融合細胞の複数の細胞核に存在する。

【図7】A D R B 3 は G 0 期 (K i - 6 7 陰性) ヒト肺癌 A 5 4 9 細胞の核小体において高発現され、増殖期細胞 (K i - 6 7 陽性) 核における発現量が比較的少ない。

40

【図8】A D R B 3 は G 0 期 (N u c l e o l i n 陰性) ヒト膵臓癌 C F P A C 1 細胞の核小体において高発現され、増殖期細胞 (N u c l e o l i n 陽性) の核小体における発現量が比較的少ない。

【図9】A D R B 3 はヒト黒色腫 A 3 7 5 細胞の核小体 (F i b r i l l a r i n 陽性) において高発現された。

【図10】A D R B 3 はヒト膵臓癌 P A N C 1 細胞のミトコンドリア外膜に局在化されている。

【図11】A D R B 3 は M C F 7 細胞の紡錘体の両極の中心体に局在化されている。

【図12】A D R B 3 は A 5 4 9 細胞の紡錘体の両極と赤道に局在化されている。

50

【図13】A. ADRB3はヒト肝癌HepG2細胞の微小管に局在化されている。B. ADRB3はヒト膵臓癌PANC1細胞の微小管、細胞核及びミトコンドリアに局在化されている。

【図14】A. ADRB3はヒト神経膠腫A172細胞の紡錘体の両極に局在化されている。B. ADRB3はMCF7多倍体細胞の中心体位置に局在化されている。

【図15】ADRB3はMCF7細胞のリゾソームに局在化されている。

【図16】A. ADRB3はG0期細胞膜におけるタンパク質のチロシンリン酸化を増加することにより、HER2/EGFR/薬物ポンプ等の膜タンパク質のチロシンリン酸化を促進して膜タンパク質を活性化させる可能性がある。B. ADRB3は、G2後期MCF7細胞核に大量で蓄積しており、この際、DNA複製が完了し、染色体が形成されており、核小体と核膜が消えた。

【図17】A. ADRB3は、G2後期MCF7細胞の中心体に存在して、微小管形成中心の形成を促進する。B. ADRB3は、MCF7細胞の液泡外膜に存在して、液泡形成を促進する。

【図18】乳癌組織と隣接組織におけるADRB3発現模式図である。ADRB3は病理学的グレード3の乳癌組織に高発現された。各列が1名の患者についてのモデルであり、上方にある2つのサンプルは癌組織、下方にある2つは隣接組織である。

【図19】142例の乳癌患者のKaplan-Meier生存曲線であり、縦座標が累積生存率、横座標が生存時間(月)を示す。癌組織ADRB3陰性患者(negative)の生存率が陽性者(positive)より有意的に高く、 $P = 0.025$ である。

【図20】肺癌組織と隣接組織におけるADRB3発現模式図である。右1と右2は1名の肺扁平上皮癌患者(g15)の隣接組織と癌組織である。右3と右4は1名の肺腺癌患者(f15)の隣接組織と癌組織である。

【図21】112例の肺癌患者のKaplan-Meier生存曲線であり、縦座標が累積生存率、横座標が生存時間(月)を示す。癌組織ADRB3弱陽性患者の生存率が強陽性患者著より有意的に高く、 $P = 0.038$ である。1は弱陽性、2は強陽性を示す。

【図22】膵臓癌組織と隣接組織におけるADRB3発現模式図である。

【図23】129例の膵臓癌患者のKaplan-Meier生存曲線であり、縦座標が累積生存率、横座標が生存時間(月)を示す。癌組織ADRB3陰性患者(0)の生存率が陽性者(1)より有意的に高く、 $P = 0.019$ である。

【図24】90例の結腸癌組織と隣接組織におけるADRB3の発現模式図であり、左図は癌組織である。

【図25】90例の結腸癌組織と隣接組織におけるADRB3の発現状況であり、癌組織でのADRB3発現は正常結腸組織($P = 0.0001$)より有意的に高い。

【図26】A. 50歳以上の肝癌患者の癌組織におけるADRB3発現量が隣接組織より有意的に高く、 $P = 0.04$ である。B. 162例の肝細胞肝癌患者のKaplan-Meier生存曲線であり、縦座標が累積生存率、横座標が生存時間(月)を示す。癌組織ADRB3陰性患者(0)の生存率が陽性者(1)より有意的に高く、 $P = 0.038$ である。

【図27】A. 健常者の骨髓塗抹標本についてADRB3とMPO染色を行った結果、ADRB3は好中球(MPO陽性)において高発現された。B. 好中球内のADRB3はコーン状構造として細胞核に埋め込まれる。C. コーン状のADRB3複合体は細胞膜で発現して、細胞質を貫通し、細胞核まで延びて、1本の通路を形成する。

【図28】グラノサイト(組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子)を注射した健常者の骨髓塗抹標本についてのADRB3とMPO染色である。リンパ球はADRB3を誘導的に発現させた。

【図29】同一の急性Bリンパ球白血病の患者の治療前と治療後の寛解(CR)をした骨髓塗抹標本についてのADRB3とKi-67染色であり、上図は治療前である。治療前に比べて、治療後の寛解した顆粒球と白血病細胞中のADRB3発現が低下した。

【図30】A. 急性Bリンパ球白血病の治療後再発患者の骨髓塗抹標本についてのADRB

10

20

30

40

50

B3とMPO染色であり、ADRB3は顆粒球と白血病細胞に高発現されており、ADRB3がBリンパ球癌化を誘導することを示す。B・ADRB3は顆粒球とリンパ球との接触部位に集まり、細胞間接着複合体の安定性に有利であり、阻害性免疫シナプスの形成を促進する。C・リンパ球の細胞質と細胞核におけるADRB3はコーン状構造を形成する。

【図31】急性Bリンパ球白血病の治療後再発患者の骨髓塗抹標本についてのADRB3とKi-67染色である；顆粒球にはADRB3とKi-67が高発現されており、このような顆粒球はMDS Cであり、病状の発展を促進する。

【図32】急性単球白血病(M5)患者の治療後の寛解した骨髓塗抹標本のADRB3とMPO染色である。

【図33】急性骨髓性白血病患者の治療後の寛解した骨髓塗抹標本についてのADRB3とKi-67染色である。ADRB3は増殖期顆粒球(Ki-67陽性)において高発現されている。

【図34】A・免疫マウスに使用される異なるADRB3ポリペプチド。B・western blotにより抗体の特異性を検出する。

【図35】抗体軽鎖の核酸とタンパク質配列である。

【図36】抗体重鎖の核酸とタンパク質配列である。

【図37】ADRB3抗体はインビトロモインビボもMCF7細胞を殺滅できる。A・ADRB3モノクローナル抗体は、MCF7乳癌細胞の活性を低下させた。B・ADRB3抗体は、ヌードマウスMCF7乳癌細胞移植腫瘍の増殖を阻害し、縦座標が移植腫瘍体積(立方ミリメートル)、横座標が細胞接種後の日間、B3 Abが抗体群を示す。C・ADRB3抗体はMCF7移植腫瘍ヌードマウスの脾臓指数を向上させた。D・ADRB3抗体は、ヌードマウスMCF7移植腫瘍cyclin D1、リン酸化Rb、CDK3及びIL-6の発現を減少させて、CDK3活性を低下させた。

【図38】異なる骨髓ハイブリドーマ細胞株によるADRB3抗体で処理した後、SW1990膵臓癌細胞の活性減少率である。使用される抗体濃度が250ng/mlである。横座標はハイブリドーマ細胞株の番号を示す。

【図39】異なる骨髓ハイブリドーマ細胞株によるADRB3抗体で処理した後、CFPAC1細胞の活性減少率である。使用される抗体濃度が250ng/mlである。横座標はハイブリドーマ細胞株の番号を示す。

【図40】ADRB3抗体はヌードマウスCFPAC1細胞移植腫瘍の体積を減少させた。

【図41】ヌードマウスに接種したヒトCFPAC1膵臓癌細胞移植腫瘍の成長曲線であり、Abは抗体処理群である。ADRB3モノクローナル抗体はCFPAC1細胞移植腫瘍の増殖を阻害した。

【図42】ヌードマウスCFPAC1膵臓癌細胞移植腫瘍重量の棒グラフである。ADRB3モノクローナル抗体は、CFPAC1細胞移植腫瘍の重量を減少させた。

【図43】CFPAC1移植腫瘍ヌードマウスの体重の棒グラフである。ADRB3抗体はCFPAC1移植腫瘍ヌードマウスの体重に影響を与えない。

【図44】ヌードマウスASPC1膵臓癌細胞移植腫瘍である。ADRB3抗体はASPC1細胞移植腫瘍の体積を減少させた。

【図45】ヌードマウスに接種したヒトASPC1膵臓癌細胞移植腫瘍の成長曲線であり、AbはADRB3抗体処理群である。ADRB3モノクローナル抗体はASPC1細胞移植腫瘍の増殖を阻害した。

【図46】ヌードマウスASPC1膵臓癌細胞移植腫瘍の重量の棒グラフである。ADRB3モノクローナル抗体はASPC1細胞移植腫瘍の重量を減少させた。

【図47】ASPC1膵臓癌細胞移植腫瘍ヌードマウスの体重の棒グラフである。ADRB3モノクローナル抗体はASPC1移植腫瘍ヌードマウスの体重に影響を与えない。

【図48】ADRB3モノクローナル抗体によるSW1990移植腫瘍ヌードマウスの治療である。A・ヌードマウスに接種したヒトSW1990膵臓癌細胞移植腫瘍の成長曲線

10

20

30

40

50

であり、A D R B 3モノクローナル抗体はS W 1 9 9 0細胞移植腫瘍の増殖を阻害した。B . A D R B 3モノクローナル抗体はS W 1 9 9 0アポトーシス率を増加した。C . A D R B 3抗体は、S W 1 9 9 0担癌マウスの好中球とN L Rを減少させ、対照群に比べて、* P < 0 . 0 5であった。

【図49】ヌードマウスに接種したヒトA 3 7 5黒色腫細胞移植腫瘍の成長曲線である。A D R B 3モノクローナル抗体はA 3 7 5細胞移植腫瘍の増殖を阻害する。* p = 0 . 0 3 2、# p = 0 . 0 0 5。A bはA D R B 3抗体処理群である。

【図50】A D R B 3モノクローナル抗体によるA 3 7 5移植腫瘍ヌードマウスの治療である。A . A 3 7 5移植腫瘍ヌードマウスの末梢血中のM S D Cフローサイトメトリー。B . A D R B 3抗体はA 3 7 5移植腫瘍ヌードマウスの末梢血中のM S D C数を減少させた。C . 担癌マウス血清E L I S A検出。A D R B 3抗体はI L - 1 0を増加して、I L - 6、V E G F及びM P Oの濃度を減少させ、対照群に比べて、* p < 0 . 0 5であった。

10

【図51】A . ヌードマウスに接種したヒトA 5 4 9肺癌細胞移植腫瘍の成長曲線。A D R B 3モノクローナル抗体はA 5 4 9細胞移植腫瘍の増殖を阻害し、対照群に比べて、* p < 0 . 0 5であった。B . A D R B 3抗体はマウス4 T 1乳癌細胞の肝転移阻害した。

【図52】A D R B 3モノクローナル抗体はヒト肺癌H 1 2 9 9細胞の活性を用量依存的に低下させた。

【図53】A D R B 3モノクローナル抗体はヒト肝癌H e p G 2細胞の活性を用量依存的に低下させた。

20

【図54】A D R B 3モノクローナル抗体はヒト結腸癌H C T 1 1 6細胞の活性を用量依存的に低下させた。

【図55】A D R B 3モノクローナル抗体はヒト前骨髄球性白血病H L - 6 0細胞の活性を用量依存的に低下させた。

【図56】A D R B 3モノクローナル抗体はヒト神経膠腫U 2 5 1細胞の活性を用量依存的に低下させた。

【図57】A D R B 3特異的キメラ抗原受容体で改変されたTリンパ球は、S W 1 9 9 0細胞（左図中、A 1はS W 1 9 9 0である）とH 1 2 9 9細胞（右図C 3）を殺滅できる。

【図58】A D R B 3遺伝子ノックアウトマウスの末梢血中の白血球総量、好中球及び単球のいずれも低下している。W B C : 白血球、n e # : 好中球、l y # : リンパ球、m o # : 単球。

30

【図59】A D R B 3遺伝子ノックアウトマウスのリンパ球百分率は増加し、好中球百分率は低下し、N L Rは低下している。l y % : リンパ球百分率、n e % : 好中球百分率、m o % : 単球百分率。

【図60】A D R B 3遺伝子ノックアウトマウスの筋肉量は増加した。

【図61】A D R B 3遺伝子ノックアウトマウスの骨密度と骨ミネラル含有量のいずれも増加した。

【図62】A . A D R B 3遺伝子ノックアウトマウスの血清サイトカイン検出、R e l a t i v e F l u o r e s c e n c e U n i t s : 相対蛍光単位；対照群に比べて、* P < 0 . 0 5であった。x B . A D R B 3 - / - マウス血清E L I S A検出。A D R B 3 - / - マウス血清I L - 1 0は増加し、I L - 6、V E G F及びM P Oは減少した。

40

【図63】A D R B 3遺伝子ノックアウトマウスの脾臓C D 4 + T細胞、T r e g細胞のフローサイトメトリー。

【図64】A D R B 3遺伝子ノックアウトマウスの心筋C y c l i n D 1免疫組織化学。F V Bマウスは正常対照であった。

【図65】A D R B 3遺伝子ノックアウトマウスの心臓B超音波検査。A D R B 3ノックアウト後、心機能は良好であった。F V Bマウスは正常対照であった。

【図66】4 T 1マウス乳癌細胞はA D R B 3遺伝子ノックアウトマウスの皮下で成長できない。F V Bマウスは正常対照であった。

50

【図67】ADRB3抗体はCDK4、nucleolin、HER2及びp-Rb(Ser780)を減少させて、p16発現を増加した。

【図68】ADRB3抗体はmTOR、p-mTOR(Ser2481)、HK2及びP62を減少させた。Rapamycinはラパマイシン、CQはクロロキンである。

【図69】5D1抗体は、ADRB3、p-Rb(Ser780)及びGAPDHを減少させた。4G7はADRB3、p-Rb(Ser780)を増加した。2種の抗体のいずれもGAPDHとCDK4を低下できる。SRはADRB3阻害剤SR59230Aである。

【図70】5D1抗体はPD-L1、CDK3及びGAPDHの発現を減少させた。

【図71】siRNAでp62阻害後、ADRB3とRab7の発現が減少した。ラパマイシンはADRB3発現を増加させる。p62サイレンシング後、ADRB3はmTOR、Rictor、SIRT1及びADRB3の発現を向上できない。

【図72】ADRB3抗体は、ヌードマウスMCF7移植腫瘍中のmTOR、Rictor、p-AKT(Ser473)、p-4EBP1(T37/46)、HK2、P62、Rab7、SIRT1、ADRB3、VDAC、Rhebの発現を減少させるが、p53発現を増加した。

【図73】ADRB3抗体は、ヌードマウスMCF7移植腫瘍中のHK2、P62、p-mTOR(S2481)、Rictor、IL-6を減少させた。A. 対照群、B. 抗体群。

【図74】ADRB3作動後、下流シグナル伝達経路におけるmTOR、Rictor、4EBP1、CENPA、P62、Drp1、AKT及びAMPK等のタンパク質のリン酸化が増加した。

【図75】ADRB3抗体は、MCF7細胞ミトコンドリアのオートファゴソームの除去を阻害した。

【図76】A. ADRB3抗体はミトコンドリア膜電位を低下させ、その表現としてJC1染色が緑色であった。B. ADRB3抗体はMCF7細胞内の活性酸素種を増加した。

【図77】A. ADRB3抗体は細胞内のリポフスチンを増加した。B. ADRB3抗体はMCF7細胞内の5-CFDA含有量を増加した。

【図78】A. ADRB3抗体は、MCF7細胞内のローダミン123含有量を増加した。B. ADRB3抗体は細胞内のSA-Gal(老化関連ガラクトシダーゼ)を増加した。

【図79】ADRB3抗体は、ヌードマウスMCF7細胞移植腫瘍組織による18F-FDGの取り込みを減少させた。(A)18F-FDG PET走査図。(B)再構成画像での標的組織(T)と隣接正常組織(非標的組織N)のグレイスケール比の棒グラフ。(C)対照群:移植腫瘍に放射性取り込み像が見られ、腫瘍のFDG取り込みが肝臓と類似して、中心壊死がなく、白矢印が移植腫瘍を示す。(D)ADRB3抗体群:移植腫瘍の中間に放射性疎欠陥が見られ、腫瘍のFDG取り込みが肝臓より少なく、中心液化壊死が発生した。(E)ADRB3抗体は、腫瘍組織ATPの発生量を減少させた。(F)ADRB3抗体は腫瘍組織HK活性を低下させた。

【図80】ADRB3抗体群のMCF7細胞移植腫瘍組織の透過型電子顕微鏡写真であり、ADRB3抗体はミトコンドリアクリステの減少と体積膨張を引き起こした。

【図81】ADRB3抗体群のヌードマウスMCF7細胞移植腫瘍細胞において、ミトコンドリアのオートファゴソームが細胞質に蓄積されて、除去されておらず、黒矢印がミトコンドリアのオートファゴソームを示し、白矢印が脂肪滴を示す。

【図82】肺癌胸水細胞塗抹標本のMPO、ADRB3免疫蛍光。A. 肺癌患者胸水に大量の可溶性ADRB3(soluble B3, sB3)が存在しており、顆粒球は脱顆粒によりsB3を血液と組織間隙へ放出することを示す。B. 顆粒球の細胞質に大量のADRB3が存在する。C/D. 胸水においてADRB3を高発現させた顆粒球(MPO+)は肺癌細胞に接着しやすい。E. 胸水に脱落した肺癌細胞はADRB3を高発現させた。

。

10

20

30

40

50

【図 8 3】健常者の末梢血塗抹標本の細胞における A D R B 3 の発現の免疫蛍光検出。A . A D R B 3 は、健常者の好中球において発現され、リンパ球には微量で発現されている。B . A D R B 3 は、ナイーブ又は原始 T リンパ球 (細胞質に大量の C D 4 又は C D 8 のリンパ球が含まれる) において大量発現されている。C . G 2 後期と有糸分裂早期にある細胞には A D R B 3 が高発現され、この期間にある細胞核膜は既に破裂しており、染色体の複製は完了するが、紡錘体が形成されていない。

【図 8 4】A . 乳癌患者の末梢血塗抹標本の A D R B 3 免疫蛍光を行ったところ、顆粒球及び異型リンパ球に大量の A D R B 3 が存在し、右上方は異型リンパ球であり、A D R B 3 が大量で発現されており、細胞核は顆粒球様の変化が起こった。B . 乳癌患者の顆粒球に大量の足突起が発生し、A D R B 3 が足突起に付着している。

【図 8 5】乳癌患者の末梢血塗抹標本の A D R B 3 免疫蛍光。上方はリンパ球であり、A D R B 3 を高発現させ、M P O を微量で発現させた。下方は顆粒球であり、A D R B 3 は顆粒球とリンパ球との接触位置に大量で蓄積して、接着因子のような作用を果たし、免疫シナプスの形成を促進する。顆粒球はリンパ球の骨髄系細胞への分化を誘導した。

【図 8 6】乳癌患者の末梢血塗抹標本の A D R B 3 免疫蛍光。A . 乳癌患者の血液には大量の好中球細胞外ネットワーク (N E T) が形成されて、リンパ球 (M P O 陰性) が N E T に接着している。B . 黄色枠内のリンパ球は M P O ^{d i m} A D R B 3 ^{b r i g h t} として示されて、リンパ系前駆細胞又は原始型リンパ球である可能性がある。

【図 8 7】乳癌患者の血液におけるリンパ球 (黄色枠内) は A D R B 3 と K i - 6 7 を高発現させて、増殖期にあり、脱分化が起こり、ナイーブ又は原始リンパ球である。患者のリンパ球機能は減退して、特異的免疫不全は発生したことを示す。

【図 8 8】乳癌患者の一部のリンパ球は A D R B 3 を高発現させて、K i - 6 7 と M P O を少量で発現させ、ナイーブ又は原始リンパ球である。

【図 8 9】乳癌患者の血液には大量の D N A 断片があり、A D R B 3 は D N A 断片に付着した。

【図 9 0】健常者の末梢血塗抹標本の細胞における A D R B 3 の免疫蛍光検出 - 形質芽球の細胞核が T 細胞より大きく、細胞質内に大量の A D R B 3 が存在する。

【図 9 1】健常者の末梢血塗抹標本の細胞における A D R B 3 の免疫蛍光検出 - 成熟形質細胞の特徴として細胞質に C D 4 又は C D 8 がないが、大量の A D R B 3 が含まれている。

【図 9 2】健常者の末梢血塗抹標本の細胞における A D R B 3 の免疫蛍光検出 - C D 1 9 ⁺ B 細胞膜に A D R B 3 が発現されている。

【図 9 3】A . 緑色蛍光タンパク質 (G F P) を有する A D R B 3 は膵臓癌 S W 1 9 9 0 細胞を殺滅できる。B . A D R B 3 プラスミドマップ。

【図 9 4】A . F l a g タグタンパク質を有する A D R B 3 は M C F 7 細胞核に入ることができない。B . A D R B 3 は M C F 7 細胞の微小管、細胞核及びミトコンドリアに局在化されている。

【図 9 5】C h I P - C h i p 実験チップの走査図である。

【図 9 6】A D R B 3 遺伝子ノックアウトマウスと正常マウスの腹腔に L P S 3 0 m g / k g を注射した各群のマウスの生存曲線である。A D R B 3 ^{- / -} マウスの膿毒症死亡率は低下した。

【図 9 7】A D R B 3 が阻害されると、アデノウイルスは A 5 4 9 肺癌細胞を感染できなくなり、A D R B 3 抗体は m T O R の第 2 4 4 8 部位にあるセリンリン酸化を阻害することで、アデノウイルス感染を阻害する作用を果たす。A . 上列の図はアデノウイルス感染細胞であり、p - m T O R (S e r 2 4 4 8) が有意的に増加して細胞膜に蓄積され、下列の図は A D R B 3 抗体で前処理した細胞であり、アデノウイルス感染を発生させることがない。B . A D R B 3 抗体は p - m T O R (S e r 2 4 4 8) を阻害し、m T O R 下流基質 4 E B P 1 のリン酸化を減少させた。

【図 9 8】A D R B 3 とアデノウイルスのいずれも核小体に局在化され、A D R B 3 はウイルス複製に必要な重要なタンパク質である。

10

20

30

40

50

【図99】B型肝炎患者の肝細胞の細胞質にはADRB3が増加し、ADRB3抗体はHBVによるHepG2細胞の感染を阻害した。

【図100】ADRB3/ApoEダブルノックアウトマウスとApoEノックアウトマウスのアテローム性動脈硬化症プラークの検出。A. ADRB3とApoEダブルノックアウトマウスの大動脈がApoE^{-/-}マウスよりも有意的に太い。B. 大動脈のオイルレッドO染色；C. 血清炎症性因子のELISA検出。

【図101】ADRB3抗体は補体活性化を促進する。A. ADRB3抗体は補体C8とC5R1を増加した。LPSは内毒素であり、補体誘導用の陽性対照とされる。B. C8とB3ARの免疫蛍光検出。

【図102】ADRB3は血小板膜にある。

10

【図103】臍帯血NK細胞はADRB3とCD56を発現させた。

【図104】NK92細胞はADRB3とMPOを発現させた。

【図105】急性心筋梗塞患者の単球はADRB3とKi67を発現させた。(A)G1期細胞であって、Ki67が比較的少ない。(B)G2又はS期であって、Ki67が比較的多い。

【図106】急性冠症候群患者では、心筋トロポニンT(cTnT)陽性者の巨核球のADRB3含有量がcTnT陰性者より高い。(A)cTnT陽性、(B)cTnT陰性。

【発明を実施するための形態】

【0277】

以下、明細書の図面及び実施例を参照しながら、本発明についてさらに詳細に説明したが、前記実施例は本発明を解釈するためのものに過ぎず本発明の範囲を限定するものではない。

20

【0278】

下記実施例に使用された試験方法について、特に断らない限り、いずれも常法である。使用される材料、試薬等について、特に断らない限り、市販品として入手できる試薬及び材料が使用される。

【0279】

実施例1 腫瘍細胞におけるADRB3の局在化の免疫蛍光検出

1、実験方法

乳癌MCF7細胞、肺癌A549細胞、黒色腫A375、膵臓癌CFPAC1細胞、肝癌HepG2細胞、神経膠腫A172細胞を10⁵/ウェルで6ウェルプレートに接種して、内部に無菌カバーガラスを載せて、細胞が付着するまでインキュベートした後、4%ポリオキシメチレンで10min固定して、PBSで3回洗浄した。0.1% Triton X-100で10分間透過して、3%BSAで1hブロッキングさせ、Ki-67/ADRB3/Nucleolin/Fibrillarlin/H3K9AC/BrdU/tubulin/Flag等の抗体(1:100)を滴下し、ミトコンドリア染料としてMitotracker、リゾソーム染料としてLysoTrackerを用いて、細胞固定前にBrdUを添加し、lipofectin 3000でpcDNA3-flag-B3プラスミドを細胞にトランスフェクションした。ウェットボックスを密閉させて、4℃冷蔵庫に入れて1晩インキュベートした。PBSを用いて5min×3リンスして、FITC標識二次抗体(anti-rabbit、1:800)とPE標識二次抗体(anti-mouse、1:800)を滴下し、室温で1hインキュベートして、DAPI 0.5µg/mlで3min染色し、PBSで5min×3リンスして、50%グリセリン/PBSで封入して、レーザー走査共焦点顕微鏡で、5~7個の視野をランダムに観察して撮影し、Fluorchem 8900ソフトウェアを用いて細胞の平均赤色蛍光強度と平均緑色蛍光強度を測定した。

30

40

【0280】

2、実験結果

図1~17に示すように、下記結果は得られた。

(1) Ki67/nucleolin/BrdUで染色したところ、G0期細胞に大量

50

の核小体が存在するが、G0期核小体の組成タンパク質がG1期細胞と異なり、G1期核小体のタンパク質マーカーでG0期細胞の核小体を標識できない。ADRB3は、G0期(Ki-67とNucleolinは陰性である)ヒト乳癌MCF7細胞の核小体において高発現された。図1中、右上にある細胞は増殖能力を有するG0期細胞であった。

(2) ADRB3は、G0期(Ki-67陰性)ヒト肺癌A549細胞の核小体において高発現された。

(3) ADRB3は、G0期(Nucleolin陰性)ヒト膵臓癌CFPAC1細胞の核小体において高発現された。

(4) ADRB3は、ヒト黒色腫A375細胞の核小体(Fibrillarlin陽性)において高発現された。

(5) ADRB3は、ヒト膵臓癌PANC1細胞のミトコンドリア外膜に局在化された。

(6) ADRB3は、A549細胞の紡錘体の両極の中心体と紡錘体の赤道に局在化された。ADRB3は融合細胞の複数の細胞核に存在する。

(7) ADRB3は、ヒト肝癌HepG2細胞の微小管に局在化された。

(8) ADRB3は、ヒト神経膠腫A172細胞の紡錘体の両極の中心体に局在化された。ADRB3は、多倍体細胞の中心体位置に局在化された。

(9) ADRB3は、MCF7細胞のリゾソームに局在化された。ADRB3は、G0期細胞膜におけるタンパク質のチロシンリン酸化を増加して、HER2/EGFR/薬物ポンプ等の膜タンパク質のチロシンリン酸化を促進することで、膜タンパク質を活性化させた。

(10) ADRB3は、G2後期MCF7細胞の中心体に局在化されて、微小管形成中心の形成を促進した。

(11) ADRB3は、MCF7細胞の液泡外膜に存在して、液泡形成を促進した。ATP6V0D1は、液泡型ATP酵素のDサブユニットであり、液泡膜に存在する。ADRB3とATP6V0D1は共局在されており、ADRB3が液泡膜に存在することを示した。

【0281】

実施例2 組織マイクロアレイ免疫組織化学方法による腫瘍組織でのADRB3の発現状況の検出

1、本研究では、計1479例の患者から、異なる組織由来の11種類の腫瘍組織マイクロアレイを用いた。(1)非小細胞肺癌組織42例；(2)生存期間資料のある肺腺癌150例；(3)生存期間にある肺扁平上皮癌150例；(4)生存期間にある肝癌180例；(5)生存期間乳癌170例及び生存期間のない乳癌82例；(6)生存期間にある膵臓癌170例；(7)甲状腺乳頭癌62例；(8)生存期間にある結腸癌90例；(9)生存期間にある腎臓癌90例；(10)生存期間にある食道癌93例；(11)生存期間にある胃癌90例；(12)生存期間にある直腸癌90例；(13)白血病20例。

2、実験ステップ：(1)パラフィン切片：厚み4 μ m。(2)ベーク：65、3h。(3)水和まで脱パラ：キシレン10min \times 3バット、100%-100%-95%-95%-90%-80%-70%アルコールそれぞれ5min、5-10min水和した。(4)抗原賦活化：PH8.0 TRIS-EDTA賦活化液を用いて高圧で賦活化させ、排気弁から排気してから3minかけて、自然冷却させた。(5)3%過酸化水素で10minインキュベートした。(6)PBSで5min \times 3回浸漬洗浄した。(7)10%ヤギ血清で10minブロックした。(8)一次抗体(1:100)を調製した。(9)血清を捨てて一次抗体を加えて、4で1晩放置した。(10)インキュベート終了後、PBSで5min \times 3回浸漬洗浄した。(11)二次抗体を加えて、室温で30minインキュベートした。(12)PBSで5min \times 3回浸漬洗浄した。(13)DABで発色(A液とB液の比率1:50)させて、顕微鏡下で観察したところ、適切に発現されて、バックグラウンドが明瞭になると、終了した。(14)ヘマトキシリンで1min重染色して、温水で15min青染した。(15)グラジエントアルコールによる

10

20

30

40

50

脱水：70% - 80% - 90% - 95% - 95% - 100% - 100%、それぞれ3秒間；(16)キシレン透徹化5min×2バット；(17)ニュートラルバルサムで封入した。

【0282】

3、染色強度判定：

各組織点ごとに6～8個の高倍視野をランダムに観察し、陽性細胞数が5%を超える場合は、染色陽性症例と決定した。弱陽性は淡黄色(+又は1)、中等陽性は淡い茶色(++又は2)、強陽性は濃い茶色(+++又は3)であった。

染色陽性率の判定：

各組織点ごとに6～8個の高倍視野をランダムに観察し、陽性細胞数が5%を超える場合は、染色陽性症例と決定した。弱陽性は淡黄色(+又は1)、中等陽性は淡い茶色(++又は2)、強陽性は濃い茶色(+++又は3)であった。

染色陽性率の判定：

染色強度の異なる3個の視野を高倍率で判読し、各視野ごとに100個の細胞についてランダムに記録して、100個の細胞のうち、陽性細胞が占める百分率をX1%とし、同様に、別の2個の視野での陽性細胞が占める百分率を観察してX2%、X3%とし、該組織点の最終の染色陽性率をX1%、X2%及びX3%の平均値とする。

組織マイクロアレイの各点について採点して、細胞の染色強度と染色細胞が占める面積との両方の積分の和に基づいて判断した。まず染色強度について採点する：0点を無色、1点を淡黄色、2点を淡い茶色、3点を濃い茶色とする。次に陽性細胞が占める百分率について採点する：0点を陰性、<25%を1点、25%～50%を2点、>50%を3点とする。2種の積分を加算して該点でのスコアを得た。

Kaplan-Meier法によって、癌組織中のADRB3陰性と陽性の患者について生存分析を行い、2群の生存曲線を取得した。Log Rank法により統計的検定を行って、比較して各組の生存曲線の分布が同一であるか否かを決定した。

【0283】

4、実験結果

結果は図18～26と表1～3に示される。表1から明らかなように、乳癌組織におけるADRB3発現は正常乳腺組織(P<0.01)よりも有意的に高かった。表2から明らかなように、肺癌組織におけるADRB3発現は正常肺組織(P<0.01)よりも有意的に高かった。表3から明らかなように、膵臓癌組織におけるADRB3発現正常膵臓組織(P<0.01)よりも有意的に高かった。

【0284】

【表2】

表1 228例の乳癌組織と89例の隣接組織でのADRB3の発現状況

乳癌と隣接組織での発現状況					
B3AR	例数	-	+	++	+++
癌	228	18	91	80	39
異なる染色強度の比率		7.9% (18/228)	39.9% (91/228)	35.1% (80/228)	17.1% (39/228)
陽性率		92.1% (210/228)			
隣接	89	61	27	1	0
異なる染色強度の比率		68.5% (61/89)	30.3% (27/89)	1.1% (1/89)	0.00%
陽性率		31.5%(28/89)			

10

20

30

40

50

【 0 2 8 5 】

【 表 3 】

表2 150例の肺癌患者の癌組織と隣接組織でのADRB3の発現状況

B3AR	例数	-	+	++	+++
癌	150	8	63	45	34
		5.3%	42.0%	30.0%	22.7%
総陽性率					94.7%
隣接	150	139	10	1	0
		92.7%	6.7%	0.7%	0.0%
総陽性率					7.3%

10

【 0 2 8 6 】

【 表 4 】

表3 165例の膵臓癌組織と隣接組織でのADRB3の発現状況

B3AR	例数	-	+	++	+++
癌	165	26	84	51	4
		15.8%	50.9%	30.9%	2.4%
総陽性率					84.2%
隣接	165	115	46	4	0
		69.7%	27.9%	2.4%	0.0%
総陽性率					30.3%

20

【 0 2 8 7 】

図18～26と表1～3から、下記実験結果は得られた。

30

(1) ADRB3タンパク質の陽性発現は主に細胞核に局在化され、少量が細胞質と胞膜に存在する。ADRB3は、乳癌組織では、陽性率が92.1%(210/228)であり、そのうち、56.7%が中等、強陽性であった。隣接乳腺組織では、ADRB3の陽性率が31.5%(28/89)であり、中等陽性が3.6%(1/28)を占め、強陽性のものがなかった。乳癌組織におけるADRB3発現は正常乳腺組織(P<0.01)より有意的に高かった。ADRB3発現量は乳癌の悪性度と正の相関を示し、細胞の悪性度向上に伴い、ADRB3は徐々に上昇した。病理学的グレードIの乳癌組織では、陽性率は73.7%(28/38)、グレードIIIの乳癌組織では、陽性率は97.6%(40/41)であり、ADRB3は、病理学的グレードIIIの乳癌組織で高発現されており、グレードIの乳癌組織(P<0.01)より有意的に高かった。ADRB3発現量は乳癌のステージ(AJCC第六版臨床ステージ)に関連し、腫瘍が末期に近づけるほど、ADRB3の発現は強くなった。1期乳癌組織では、ADRB3陽性率は65.0%(13/20)であった。3期乳癌組織では、陽性率は100%(67/67)であった。ADRB3は乳癌患者の生存率を減少させて、乳癌患者のうち、ADRB3陽性発現者の生存期間がいずれも陰性者より有意的に短かった。142例の乳癌患者のKaplan-Meier生存曲線を分析した結果、癌組織ADRB3陰性患者の生存率は陽性者より有意的により高く、P=0.025であった。2組の平均生存時間(mean survival)はそれぞれ154ヶ月と126ヶ月であった。生存率曲線図から分かるように、ADRB3陽性患者の生存率は経時的に徐々に低下し、170ヶ月目にアプローチするとき、生存率は約60%であった。ADRB3陰性患者の生存率低下は陽性者より低速であり

40

50

、170ヶ月目には、生存率はまだ90%以上であった。リスク量の曲線図からも、経時的に延長する傾向も明らかであり、ADRB3陽性患者の死亡リスクは高くなり、170ヶ月目になると、約初期(0ヶ月目)の5倍になった。それに対して、ADRB3陰性患者の死亡リスクは陽性者より低く、170ヶ月目になると、初期の1倍未満であった。癌組織ADRB3とKi67の相関係数は0.296($P=0.02$)であり、顕著な線形正相関関係を持っている。

(2)肺癌組織におけるADRB3発現は正常肺組織($P<0.01$)よりも有意的に高かった。ADRB3発現が多いほど、生存期間は短縮された。Kaplan-Meier生存分析を行った結果、肺癌組織ADRB3弱陽性患者の生存率は強陽性患者よりも有意的に高く、 $P=0.038$ であった。ADRB3弱陽性患者の生存期間中央値は81ヶ月であり、強陽性患者の生存期間中央値は50ヶ月であった。癌組織ADRB3レベルと肺癌の急速悪化は悪い予後に直接繋がる。ADRB3抗体はADRB3の癌での発現を減少させ、肺癌転移患者の治療に利用できる。

(3)膵臓癌組織におけるADRB3発現は隣接組織($P<0.01$)よりも有意的に高く、癌組織ADRB3陰性患者(0)の生存率は陽性者(1)よりも有意的に高く、 $P=0.019$ であった。陰性患者の平均生存時間は43.6ヶ月、陽性患者は29.4ヶ月であった。

(4)結腸癌組織におけるADRB3発現は正常結腸組織($P=0.0001$)よりも有意的に高かった。

(5)肝細胞癌組織におけるADRB3発現量は年齢及び病理学的グレードと正の相関を示し、高齢であるほど、悪性度が高まり、ADRB3タンパク質が多くなる。50歳以上の肝癌患者癌組織におけるADRB3発現量は隣接組織よりも有意的に高く、 $P=0.04$ であった。162例の肝細胞癌患者のKaplan-Meier生存分析結果から分かるように、癌組織ADRB3陰性患者の生存率は陽性者より有意的に高く、 $P=0.038$ であった。ADRB3陰性患者の生存期間中央値は37ヶ月、陽性者の生存期間中央値は25ヶ月であった。

(6)急性リンパ球白血病再発患者では、骨髄顆粒球の細胞質内に密な粗面小胞体が大量含まれ、ADRB3とKi-67が小胞体に付着して、ADRB3とKi-67含有量が著しく増加して、治療寛解者より有意的に高かった。

(7)腎臓癌、甲状腺癌、直腸癌、食道癌や胃癌の癌組織のいずれでのADRB3発現も隣接組織より高かった。

【0288】

実施例3 異なるタイプの白血病患者の骨髄塗抹標本細胞におけるADRB3の発現の免疫蛍光検出

1、実験方法は実施例1と同様である。

2、結果は図27~33に示された。

(1)ミエロペルオキシダーゼ(myeloperoxidase、MPO)は、好中球のマーカータンパク質であり、ADRB3は健常者の好中球に発現されているが、リンパ球には発現されなかった。好中球細胞質内のADRB3はコーン状構造を形成して細胞核に入り、ADRB3による通路が細胞外の物質(たとえばウイルス)の細胞核への進入を促進して、ADRB3を遮断し、ウイルスが細胞核に入ることを阻害した。Bリンパ球白血病患者では、ADRB3は白血病細胞と好中球のいずれにも発現され、ADRB3によるBリンパ球癌化の誘導が示されている。白血病細胞におけるADRB3も細胞核に連通する通路を形成した。

(2)グラノサイト(注射用組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子)を注射した健常者の骨髄塗抹標本についてのADRB3とMPO染色。顆粒球コロニー刺激因子は、一般的に増殖期にある顆粒球の増殖を刺激し、ADRB3が増殖期にある未成熟顆粒球において高発現されることは、ADRB3が顆粒球の増殖を刺激するとともにその分化・成熟を阻害することを示した。顆粒球コロニー刺激因子の作用下で、リンパ球(MPO陰性)でのADRB3の発現は、ADRB3が誘導的に発現されて、リンパ球の増殖と分化を調節する

作用を有することを示した。

(3) 急性Bリンパ球白血病の治療後再発患者の骨髓塗抹標本についてのADRB3及びMPO染色。白血病治療後再発患者の顆粒球と白血病細胞のいずれでも、ADRB3はい高発現であり、大量のADRB3を含有する顆粒球はBリンパ球白血病を再発させる要因であり、ADRB3⁺顆粒球は、G0期の白血病細胞が増殖期に入ることを促進して、再発を引き起こした。治療前に比べて、治療後の急性Bリンパ球白血病患者の顆粒球と白血病細胞におけるADRB3発現は低下した。ADRB3は顆粒球(抗原提示細胞)とリンパ球との接触部位に集まり、細胞間接着複合体の安定性を向上させて、阻害性免疫シナプスの形成を形成した。ADRB3は顆粒球と白血病細胞の融合を誘導して、癌細胞の表現型を変え、癌細胞の悪性度を高めて、癌細胞の薬剤耐性を発生させた。リンパ球内には、ADRB3はコーン状構造になり細胞核に入り、リンパ球のエピジェネティックな修飾と遺伝子発現プロファイルに悪影響を及ぼして、増殖を促進した。

(4) 急性Bリンパ球白血病治療後再発患者の骨髓塗抹標本についてのADRB3とKi-67染色。顆粒球にはADRB3とKi-67が高発現され、2つのタンパク質は細胞質中に共同在化され、それから示されるように、顆粒球リボソームの機能が活発であり、大量の細胞成長因子を合成できる。成長因子を放出することにより、G0期のリンパ球と腫瘍細胞が増殖期に入ることが刺激された。MDSはADRB3とKi-67共陽性顆粒球であり、T細胞、NK細胞等の免疫細胞による白血病細胞とほかの腫瘍細胞の除去を阻害できる。白血病治療後に再発された患者の骨髓及び末梢血では、ADRB3⁺Ki-67⁺顆粒球は著しく増加し、それは、該顆粒球は白血病再発を引き起こすキーであることが示された。

(5) 治療後に寛解した急性単球白血病(M5)の患者の骨髓塗抹標本の顆粒球も白血病細胞もADRB3を発現させた。

(6) ADRB3は、急性骨髓性白血病患者の増殖期にある顆粒球(Ki-67陽性)において高発現された。

【0289】

実施例4 ハイブリドーマ細胞株の製造、ADRB3抗体の精製、抗体配列決定及びヒト化

1、ヒトADRB3タンパク質断片(全長を含む)でマウスを免疫して、使用される抗原エピトープの一部は、図34Aに示されるように、ヒトADRB3全長タンパク質(1-408位のアミノ酸残基)、ADRB3タンパク質のN末端の断片(1-155位のアミノ酸残基)、ADRB3タンパク質のC末端の断片(156-408位のアミノ酸残基)、ADRB3タンパク質におけるロイシンジッパー断片(296-317 aa)、核局在化配列(NLS)(351-369 aa)、E1(ADRB3の1-36位のアミノ酸残基)、E2(ADRB3の101-111位のアミノ酸残基)、I2(ADRB3の134-155位のアミノ酸残基)、E4(ADRB3の315-326位のアミノ酸残基)、I4(ADRB3の348-408アミノ位の酸残基)等を含むが、これらに制限されない。フロイント完全アジュバントを加えて、BALB/cマウスに皮下注射し、初回免疫21日間後、尾静脈からブースター免疫を行った。4日間後、脾細胞懸濁液を製造して骨髓腫細胞SP2/0と細胞融合を行い、HAT選択によりハイブリドーマ細胞を選別して、ハイブリドーマをクローニングし、最終的に、それぞれのADRB3タンパク質断片に複数のハイブリドーマ細胞株を付与し、ADRB3抗体を発生可能なハイブリドーマ細胞株を計30個余りスクリーニングした。エライザ試験(ELISA)、タンパク質免疫ブロッティング(図34B)及び免疫蛍光試験によって抗体の特異性、親和性を検出した。Trizolでハイブリドーマ細胞を溶解した後、RNAを抽出して、抗体の軽鎖配列決定を行った。ヒト化抗体の軽鎖プラスミド(核酸とタンパク質の配列は図35に示されるが、図35に制限されない)と重鎖プラスミド(核酸とタンパク質の配列は図36に示されるが、図36に制限されない)を構築した。BPfection Transfection Reagent、H:L=1:1を用いて、トランスフェクション試薬とプラスミドの比3:1で、HEK293をトランスフェクションして、バイオリアクタ

ーで培養し、大量の抗体を生産した。

マウス腹水からの抗体収集：

10～11週齢のBalb/cマウスに、完全免疫アジュバントを0.1ml/匹で腹腔内注射して、6日間後、ハイブリドーマ細胞を 5×10^6 腹腔内注射して、細胞接種8日間目から、腹水を1日に1回抜き始めた。3000rpmで10min処理して、腹水上澄みを-80℃で保存した。硫酸アンモニウムで濃縮させた後、Protein Gアフィニティークロマトグラフィーカラムにより精製して、抗体精製する標準工法に従って精製溶出を行い、SDS-PAGEで純度同定を行った。定量にはUV定量が使用された。

【0290】

10

実施例5 MTT実験を用いたADRB3モノクローナル抗体の抗癌効果検出

1、実験のステップ：

(1) 対数増殖期にある接着腫瘍細胞をパンクレアチンで消化した後、10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地で5000個/mlの細胞懸濁液を調製し、1ウェルに200 μ l接種するように96ウェル培養板に接種し、37℃、5%CO₂で24h培養した。

(2) 実験群では、濃度の異なるADRB3モノクローナル抗体を含む培地を用い、対照群では、等体積の溶媒を含む培地を用い、1群ごとに3～5個の平行ウェルを設置して、37℃、5%CO₂で4～5d培養した。

(3) 上澄み液を捨てて、新たに調製したMTTを0.5mg/ml含む無血清培地を1ウェルあたりに200 μ l添加した。37℃で4h培養し続けた。上澄みを慎重に捨てて、200 μ l DMSOを加えて、小型超音波振とう装置で均一に混合した後、マイクロプレートリーダーにおいて570nm試験波長、450nm参照波長で光学濃度値を測定した。

20

2、実験結果は図37A～39と図52～56に示された。

ADRB3モノクローナル抗体は、ヒトMCF7乳癌細胞、SW1990及びCFPAC1膵臓癌細胞、A549肺癌細胞、H1299肺癌細胞、HepG2肝癌細胞、HCT116結腸癌細胞、HL-60前骨髄球性白血病細胞、U251神経膠腫細胞の活性を用量依存的に低下させた。対照群に比べて、*P<0.05、#P<0.01であった。

【0291】

30

実施例6 ADRB3モノクローナル抗体によるヌードマウス移植腫瘍増殖の阻害

1、実験方法

5週齢の雌性ヌードマウス1匹ごとに、乳腺に接近する位置にヒト腫瘍細胞又はマウス4T1乳癌細胞を 5×10^6 細胞皮下注射した。ヒト腫瘍細胞にはMCF7、CFPAC1、ASPC1、SW1990、A375、A549細胞が含まれる。8～10日間後、移植腫瘍が約100mm³になると、抗体群と対照群を1群に8匹のようにランダムに分けた。抗体群にADRB3抗体を、3日間おきに、用量範囲1～10mg/kgで腹腔内注射して、腫瘍の長さ、高さ及び幅を測定した。対照群にマウスIgGを腹腔内注射した。対照群の腫瘍体積が動物倫理委員会により許可された最大体積になると、目の周りから採血して、頸椎脱臼でヌードマウスを殺し、移植腫瘍と脾臓を取り、腫瘍重量、脾臓重量及び体重を秤量した。脾臓指数=脾臓重量(mg)/マウス体重(g)から脾臓指数を算出した。

40

2、実験結果は図37、図40～51に示された。

(1) ADRB3モノクローナル抗体は、ヌードマウスMCF7乳癌細胞移植腫瘍の増殖を阻害し、対照群に比べて、*P<0.05、#P<0.01であった。ADRB3抗体群nマウスの脾臓は対照群動物よりも有意的に大きく、ADRB3抗体は脾臓指数を増加して、免疫器官の成熟を促進する機能を有する。移植腫瘍のHE染色から明らかのように、ADRB3抗体は移植腫瘍の好中球浸潤を減少させた。脾臓組織のHE染色を行ったところ、対照群の脾臓内に構造境界が不明瞭で、白脾髄と赤脾髄に対する顕著な境界線が見られず、大量の好中球が観察できる。ADRB3抗体は、脾小節と胚中心を増大して、

50

脾臓での好中球の数を減少させた。免疫組織化学法により分かるように、ADRB3抗体は、移植腫瘍における腫瘍細胞と浸潤性好中球ADRB3、P62、Cyclin D1、MPO、Neutrophil Elastase、p-Rb(S780)、CDK3及びIL-6の発現を減少させて、CDK3の活性を低下させた。

(2) ADRB3抗体は、ヌードマウスCFPAC1膵臓癌細胞移植腫瘍の成長を減少させ、対照群に比べて、* $p < 0.05$ であった。ADRB3抗体は、CFPAC1細胞移植腫瘍の重量を低減させ、CFPAC1移植腫瘍ヌードマウスの体重に影響を与えず、ADRB3抗体は脾臓指数を増加した。HE染色から明らかのように、ADRB3抗体は、移植腫瘍の好中球浸潤を減少させた。免疫組織化学法により分かるように、ADRB3抗体は、移植腫瘍における腫瘍細胞と浸潤性好中球ADRB3、Cyclin D1、Neutrophil Elastase、p-Rb(S780)、p-mTOR(S2481)、Rictor、HK2、CDK3及びIL-6の発現を減少させた。

(3) ADRB3抗体は、ヌードマウスASPC1膵臓癌細胞移植腫瘍の成長を阻害し、対照群に比べて、* $P < 0.05$ であった。ADRB3抗体は、ASPC1細胞移植腫瘍の重量を減少させるが、ASPC1移植腫瘍ヌードマウスの体重に影響を与えない。

(4) ADRB3抗体は、SW1990膵臓癌細胞移植腫瘍の増殖を阻害して、SW1990アポトーシス率を増加し、対照群に比べて、* $P < 0.05$ であった。ADRB3抗体は、担癌マウスの好中球の数と好中球-リンパ球比率(NLR)を低下させ、対照群に比べて、* $P < 0.05$ であった。ADRB3抗体は脾臓指数を増加した。

(5) ADRB3抗体は、A375黒色腫細胞移植腫瘍の増殖を阻害し、対照群に比べて、* $P = 0.032$ 、# $P = 0.005$ であった。ADRB3抗体は、A375移植腫瘍ヌードマウスの末梢血MSDC数を減少させた。HE染色と免疫組織化学法より分かるように、対照群のA375移植腫瘍には大量の好中球が浸潤しており、且つ好中球にPD-L1が高発現され、ADRB3抗体はA375移植腫瘍の好中球浸潤を減少させた。免疫組織化学法より分かるように、ADRB3抗体は、A375移植腫瘍細胞と浸潤している好中球ADRB3、IL-6、MPO、Neutrophil Elastase、PD-L1、p-Rb(Ser 780)、p-mTOR(Ser 2481)、Rictor、HK2及びCDK4の発現を阻害した。抗体治療後、移植腫瘍が浸潤している好中球にはPD-L1発現が無かった。ELISAで血清中の炎症性因子を検出したところ、ADRB3抗体はマウス血清中のIL-10濃度を増加して、IL-6、VEGF及びMPO濃度を減少させた。ADRB3抗体は、ADRB3の発現と活性を特異的に阻害することによって、好中球媒介性炎症反応を阻害して、腫瘍の微小環境を変え、さらに抗癌作用を果たす。

(6) ADRB3抗体は、脾臓指数を増加して、ヒト肺癌A549細胞移植腫瘍の増殖を阻害し、対照群に比べて、* $P < 0.05$ であった。HE染色から明らかのように、ADRB3抗体は移植腫瘍の好中球浸潤を減少させた。免疫組織化学法より分かるように、ADRB3抗体は、移植腫瘍細胞と浸潤性好中球ADRB3、cyclin D1、Neutrophil Elastase、p-Rb(Ser 780)、p-mTOR(Ser 2481)、Rictor、HK2、CDK3及びIL-6の発現を減少させた。

(7) ADRB3抗体は、マウス4T1乳癌細胞移植腫瘍の増殖を減少させて、4T1細胞の肝臓転移を阻害し、対照群では、8匹のマウスはすべて深刻な肝臓転移が発生し、抗体群では、肝臓転移巣が対照群より有意的に少なかった。ADRB3が4T1細胞の肝臓転移を促進するため、ADRB3の遮断により肝臓転移が阻害できる。ADRB3抗体は脾臓指数を増加して、血液の好中球数を減少して、WBCに占めるリンパ球の比率を向上させ、NLRを低下させた。NLRは全身性炎症反応の指標であり、NLRの上昇は腫瘍患者の予後不良に対して独立リスク要因であった。ADRB3抗体によるNLRの低下から、本抗体は炎症を阻害して患者予後を改善できることが分かった。

【0292】

実施例7 ADRB3特異的キメラ抗原受容体で改変されたTリンパ球による、SW1990細胞(A1)とH1299細胞(C3)の殺滅

10

20

30

40

50

1、実験方法

A D R B 3 キメラ抗原受容体は、抗ヒト A D R B 3 の一本鎖抗体、C D 8 ヒンジ領域及び膜貫通領域、C D 1 3 7 (4 - 1 B B と呼ばれる) の細胞内シグナル領域、C D 3 の細胞内シグナル構造を直列接続してなるものである。A D R B 3 モノクローナル抗体の配列決定結果に基づき、キメラ抗原受容体のレンチウイルス発現ベクターを構築して、レンチウイルスをパッケージングした。初代 T 細胞を分離して、上記レンチウイルスで組換え C A R - T 細胞を構築した。標的細胞である S W 1 9 9 0 細胞 (A 1) と H 1 2 9 9 細胞 (C 3) を、5 0 0 0 0 個 / ウェルの濃度で 9 6 ウェルプレートに接種して 1 晩培養し、次に図示したエフェクター / ターゲット比 (E / T) で C A R - T 細胞を加え、6 時間共培養して、遠心後、上澄みを取り、L D H キットで検出した。C A R - T 未添加の標的細胞ウェルを溶解して M a x i m a l l y s i s とし、未溶解ウェルを m i n i m a l l y s i s とした。

10

2、実験結果

H 1 2 9 9 細胞の中央値効果 E / T は 2 : 1、S W 1 9 9 0 細胞の中央値効果 E / T は 2 . 5 : 1 (図 5 7) であった。A D R B 3 キメラ抗原受容体で改変された T リンパ球は、A D R B 3 陽性腫瘍を殺滅することができ、肺癌と膵臓癌の治療に対して有用であった。抗 A D R B 3 C A R - T 細胞は、腫瘍細胞と腫瘍内環境での炎症性細胞 (好中球、T r e g 及びマクロファージ) に対するものであるため、腫瘍細胞に A D R B 3 が発現されなくても、腫瘍環境細胞を阻害することで抗癌作用を果たすことができ、汎用型 C A R - T 細胞と言え、すべての悪性腫瘍や炎症疾患の治療に適用できる。

20

【 0 2 9 3 】

実施例 8 A D R B 3 遺伝子ノックアウトマウス実験

1、実験方法

1 6 週齢の A D R B 3 遺伝子ノックアウトマウスと正常 F V B マウスを雄性としてそれぞれ 1 5 匹準備して、末梢血を採血して血液ルーチン検査、血液生化学を行った。マウス T H 1 7 サイトカイン抗体チップ (Q A M - T H 1 7 - 1、Q u a n t i b o d y (登録商標) A r r a y G l a s s C h i p) で血清サイトカインを検出して、レーザースキャナー A x o n G e n e P i x でシグナルを走査した。骨密度、脂肪及び筋肉含有量を検出した。1 0、3 0、7 0 週齢の A D R B 3 遺伝子ノックアウトマウスをそれぞれ 8 匹準備して、心臓 B スキャン超音波検査により心機能を検出した。末梢血液細胞と脾細胞について、異なるサブタイプの T 細胞とマクロファージの数及び比率をフローサイトメトリーにより検出した。心臓 C D K 3、c y c l i n D 1、p - m T O R (S e r 2 4 4 8)、p - m T O R (S e r 2 4 8 1)、p - 4 E B P 1 (T 3 7 / 4 6) について免疫組織化学的検出を行った。水迷路試験によってマウスの学習記憶能力を研究した。

30

1 2 週齢の A D R B 3 遺伝子ノックアウトマウスと正常 F V B マウスをそれぞれ 1 0 匹準備して、いずれも雌性とし、 10^6 マウス乳癌細胞 4 T 1 を皮下接種して、移植腫瘍形成後、3 日間おきに、腫瘍の長さ、幅及び高さを測定した。マウス乳房腫瘍ウイルスを有する M M T V - P y V T マウスから A D R B 3 遺伝子をノックアウトして、雌マウスの乳癌発生状況を観察した。

2、実験結果は図 5 8 ~ 6 6 に示された。

40

マウスの A D R B 3 遺伝子をノックアウトして、外因性腫瘍細胞の腫瘍形成状況を検出したところ、マウスの体の免疫系が改善されて、癌細胞を殺滅できることが見出された。4 T 1 乳癌細胞は、正常 F V B マウスの体内で腫瘍を形成するが、A D R B 3 - / - マウスでは腫瘍形成が出来なかった。高齢 A D R B 3 - / - マウスの自発腫瘍の発症率が著しく減少された。M M T V - P y V T マウスから A D R B 3 遺伝子をノックダウンした後、雌マウスの乳癌発生率は著しく減少された。A D R B 3 遺伝子ノックアウトマウスは、寿命が延長して、自己免疫疾患と癌に罹患することがない。

(1) A D R B 3 - / - マウスの末梢血好中球は著しく減少して、リンパ球の百分率は低下し、N L R は低下して、赤血球の平均体積は比較的低かった。A D R B 3 は好中球と単球の数を増加するとともに、リンパ球の数に影響を与えることがなく、好中球数の増加

50

によりNLRを低下させて、白血球の総量を向上させた。ADRB3は、好中球と単球の百分率を増加して、リンパ球の百分率を減少させた。

(2) ADRB3^{-/-}マウスの筋肉量は増加した。ADRB3ノックアウトマウスの骨密度と骨ミネラル含有量はいずれも増加した。

(3) ADRB3^{-/-}マウスは、血清中炎症サイトカイン、たとえばIL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-17F、IL-21、IL-22、TGF- β 、MIP-3等を低下させ、IL-10を増加した。ELISAで血清中炎症性因子を検出したところ、ADRB3^{-/-}マウスの血清IL-10濃度は高くなり、IL-6、VEGF及びMPOの濃度は低下した。

(4) ADRB3^{-/-}マウスの脾臓CD4⁺T細胞とTreg細胞はいずれも著しく低下した。 10

(5) ADRB3^{-/-}マウスについて心臓のB超音波検査を行った。その結果、高齢ADRB3^{-/-}マウスの心機能はADRB3野生型高齢マウスより高く、ADRB3^{-/-}マウスの心機能は加齢に伴いしく低下しなかった。対照群に比べて、ADRB3^{-/-}マウスの心筋にはCDK3、cyclinD1発現は増加し、mTORC2/4EBP1経路は活性化されて、心筋細胞のリボソームは増加した。

(6) 腫瘍細胞と顆粒球は、ADRB3を発生させて血液へ放出することでTリンパ球を阻害し、生体の特異的免疫を破壊して、癌細胞成長を促進するものである。ADRB3ノックアウトによる抗癌効果は、免疫系の抗癌活性を高めることによるものである。ADRB3^{-/-}マウスは、好中球とTreg細胞のいずれも減少して、CD8⁺T細胞が増加するため、生体の免疫監視、防御機能が強化された。 20

(7) ADRB3^{-/-}マウスの学習記憶能力はADRB3野生型マウスより高かった。

【0294】

実施例9 異なる濃度のADRB3抗体を用いたMCF-7/A549/SW1990細胞の処理

1、実験方法

異なる濃度のADRB3抗体でMCF-7/A549/SW1990細胞を処理し、対照群では、マウスIgGを用いた。24h後、細胞を溶解して、総タンパク質を抽出した。BCA法でタンパク質の濃度を測定し、タンパク質10 μ gを10%SDS-PAGEで分離した後、タンパク質をPVDF膜に移して、4%スキムミルクで1hブロッキングして、一次抗体をインキュベートし、4 $^{\circ}$ Cで1晩放置して、二次抗体を1hインキュベートし、ECL発色を行い、実験を3回繰り返した。Fluorchem 8900ソフトウェアでタンパク質バンドのグレイスケールを分析して、目的バンドと内部基準バンド(GAPDH又はactin)との比を算出した。ヌードマウス移植腫瘍組織について、免疫組織化学的検出を行って、ADRB3シグナル伝達経路における関連タンパク質mTOR、Rictor、p-AKT(S473)、p-4EBP1(T37/46)、HK2、P62、Rab7、SIRT1、ADRB3、VDAC、Rheb発現を測定した。

2、実験結果は図67~74に示された。

(1) ADRB3抗体は、MCF-7/A549/SW1990細胞CDK4、nucleolin、HER2及びpRbの発現を減少させて、P16発現を増加した。 40

(2) ADRB3抗体は、MCF-7/A549/SW1990細胞Rheb、mTOR、p-mTOR(S2481)、HK2及びP62を用量依存的に減少させた。

(3) ADRB3抗体(5D1)は、MCF-7/A549/SW1990細胞ADRB3、p-Rb(S780)及びGAPDHを減少させた。4G7はADRB3、p-Rb(S780)を増加した。2種の抗体はいずれもGAPDHとCDK4を低下できる。

(4) ADRB3抗体は、MCF-7/A549/SW1990細胞PD-L1、CDK3の発現を減少させた。

(5) siRNAを設計してP62をサイレンシングしたところ、MCF-7/A549/SW1990細胞ADRB3とRab7の発現が減少した。ラバマイシンはADRB 50

3 発現を増加した。P 6 2 発現サイレンシング後、A D R B 3 は m T O R、R i c t o r、S I R T 1 及び A D R B 3 の発現を向上出来なくなった。

(6) A D R B 3 抗体は、ヌードマウス M C F - 7 移植腫瘍における m T O R、R i c t o r、p - A K T (S 4 7 3)、p - 4 E B P 1 (T 3 7 / 4 6)、H K 2、P 6 2、R a b 7、S I R T 1、A D R B 3、V D A C、R h e b を減少させて、P 5 3 を増加した。

(6) A D R B 3 抗体は、ヌードマウス M C F - 7 移植腫瘍における H K 2、P 6 2、p - m T O R (S 2 4 8 1)、R i c t o r、I L - 6 を減少させた。

(8) A D R B 3 作動後、M C F - 7 / A 5 4 9 / S W 1 9 9 0 細胞の下流シグナル伝達経路における m T O R、R i c t o r、4 E B P 1、C E N P A、P 6 2、D r p 1、A K T 及び A M P K 等のタンパク質のリン酸化が増加した。

【 0 2 9 5 】

実施例 1 0 ミトコンドリア自食検出

1、実験方法

最終濃度 2 0 n g / m l の A D R B 3 抗体で M C F - 7 細胞処理し、2 h 又は 8 h 後、細胞を固定して、M i t o t r a c k e r でミトコンドリアを染色し、免疫蛍光により L C 3 I I 発現を検出し、レーザー走査共焦点顕微鏡で観察した。J C - 1 (1 0 u g / m l) で 1 5 m i n 染色して、生きている細胞のまま、共焦点顕微鏡下で観察して、励起光の波長を 5 1 0 n m と 5 8 0 n m とした。R O S 染料 H 2 D C F D A 1 0 u M で、1 5 m i n 染色して、共焦点顕微鏡下で観察した。4 8 8 n m 波長の蛍光を利用して細胞内リポフスチンを観察した。P - 糖タンパク質 (P - g l y c o p r o t e i n、P - g P) 基質 5 - C F D A - A M、1 0 u M で細胞を標識して、励起光波長 5 1 0 n m で、共焦点顕微鏡により観察した。ローダミン 1 2 3 (R h o d a m i n e 1 2 3) で細胞染色を行って、フローサイトメーターを用いて検出した。 - ガラクトシダーゼを用いてその場で染色して、M C F 7 細胞中の - ガラクトシダーゼの発現を検出した。

2、実験結果は図 7 5 ~ 7 8 に示された。

作用時間の延長に伴い、A D R B 3 抗体群では、L C 3 I I 発現は著しく増加した。A D R B 3 抗体は、ミトコンドリアのオートファゴソームの除去を阻害することにより、オートファゴソームを細胞に蓄積させ、A D R B 3 はオートファゴソームの除去を促進して、ミトコンドリア自食過程を順調に発生させた。A D R B 3 抗体は、ミトコンドリア膜電位を低下させ、その表現として J C 1 染色時に緑色になった。A D R B 3 抗体は、細胞内の活性酸素種、リポフスチン及び - ガラクトシダーゼを増加した。A D R B 3 抗体は、自食を遮断して、オートファゴソーム、損傷したミトコンドリアやリポフスチン等の代謝廃棄物を細胞内に蓄積させることで、細胞活性を低下させ、細胞老化又はアポトーシスを促進した。5 - C F D A 染色をしたところ、細胞には大量の糸状シナプスが成長したことが見出され、それによっても細胞老化が示されている。A D R B 3 抗体は、M C F - 7 細胞内の 5 - C F D A とローダミン 1 2 3 の含有量を増加し、それは、A D R B 3 抗体により M C F - 7 細胞の多剤耐性が逆転されることを示した。

【 0 2 9 6 】

実施例 1 1 A D R B 3 抗体による腫瘍組織の糖代謝減少

1、実験方法

A D R B 3 抗体で 5 週間処理後、M C F - 7 担癌マウスごとに、尾静脈から 1 8 F - F D G を 1 ミリキュリー (m C i) 注射して、5 0 分間後、3 % イソフルランと酸素ガス (1 L / m i n) の混合ガスで麻酔し、仰臥位にして P E T / C T 走査を行って、画像を動的に収集し、反復法によって 1 8 F - F D G 腫瘍代謝の現像画像を再建し、F l u o r c h e m 8 9 0 0 ソフトウェアを用いて再建画像における標的組織 (T) と隣接正常組織 (非標的組織 N) とのグレイスケール値を分析して、T / N 値を算出した。移植腫瘍組織を氷で予冷された R I P A 溶解に入れて、高速均質化させて、対応したキットで組織中の A T P 含有量とヘキソキナーゼ (H K) 活性を検出した。

2、実験結果から (図 7 9) 明らかのように、対照群の移植腫瘍部位には放射性取り込

10

20

30

40

50

みが見られ、A D R B 3 抗体群の移植腫瘍部位には放射性が対照群よりも約 60% (0.78 ± 0.44 vs 1.96 ± 0.94、P < 0.01) 減少した。A D R B 3 抗体は、腫瘍組織の A T P 発生量を減少させた。A D R B 3 抗体は、腫瘍組織 H K 活性を低下させた。

【0297】

実施例 12 透過型電子顕微鏡を用いた、移植腫瘍細胞のミトコンドリアとオートファゴソームの観察

1、実験方法

移植腫瘍を 2.5% グルタルアルデヒドに入れて固定し、約 1 mm³ の組織ブロックに切り、透過型電子顕微鏡サンプルを製作した。脱水、浸透、包埋処理を経たサンプルを R e i c h e r t ミクロトームで切片して、70 nm の切片を得て、該切片について、クエン酸鉛溶液と酢酸ウラニル 50% エタノール飽和溶液でそれぞれ 15 min 染色して、F E I (C z e c h R e p u b l i c) 透過型電子顕微鏡で観察した。

2、実験結果

A D R B 3 抗体群は、M C F - 7 細胞移植腫瘍細胞に、ミトコンドリアクリステが減少したり、消失したり、体積が膨張したりする欠陥型ミトコンドリアが大量発生した (図 8 0) 。抗体群では、移植腫瘍細胞のミトコンドリアのオートファゴソームが細胞質に蓄積されて、細胞老化を加速させた。ミトコンドリア外膜の A D R B 3 の遮断によって、ミトコンドリア膜電位が破壊されて、ミトコンドリア構造及び機能が損害されて、細胞質による大量の欠陥型ミトコンドリアの発生が引き起こされる。細胞の自食が正常であれば、欠陥ミトコンドリアは自食により除去された。A D R B 3 の遮断によって、オートファゴソームとリゾソームの融合が破壊されて、オートファゴソームが除去できなくなる。黒矢印はミトコンドリアのオートファゴソーム、白矢印は脂肪滴を示す (図 8 1) 。

【0298】

実施例 13 肺癌胸水細胞の塗抹標本を用いた細胞中の M P O / A D R B 3 発現状況の免疫蛍光検出

1、実験方法

肺癌と確診された患者の胸水を 20 例収集して、容器底部の液体を約 5 ml 遠心管内に吸い取り、2000 rpm で 10 min 処理して、上澄みを捨てて、0.5 ml の余剰液体と沈殿を残し、細いガラス棒を用いて沈殿と液体を均一に混合して、ストローで均一に混合した液体を吸い取って、1 枚に 1 ~ 2 滴滴下するようにスライドガラスに滴下し、ブッシュ法により均一な塗抹標本を作製して、95% アルコールに入れて 15 min 固定し、取り出して乾燥させて、使用に備えた。0.1% T r i t o n X - 100 で 10 min 透過させて、B S A で 1 h ブロッキングし、M P O / A D R B 3 抗体 (1 : 100) を滴下して、ウェットボックスでブロッキングし、4 で 1 晩放置した。F I T C と P E 標識二次抗体を滴下して、室温で 1 h 放置し、D A P I 0.5 ug/ml で 3 min 処理して、50% グリセリン / P B S で封入し、レーザー走査共焦点顕微鏡下で、5 ~ 7 個の視野をランダムに観察して撮影し、F l u o r c h e m 8900 ソフトウェアで細胞の平均赤色蛍光強度と平均緑色蛍光強度を測定した。

2、実験結果 (図 8 2 参照) :

(1) 肺癌患者の胸水に大量の可溶性 A D R B 3 (s o l u b l e B 3 、 s B 3) が存在した。癌細胞と顆粒球は脱顆粒によって s B 3 を血液と組織間隙へ放出したことを示した。

(2) 胸水における顆粒球の細胞質に A D R B 3 が大量存在しており、A D R B 3 を豊富に含む顆粒球は肺癌細胞に接着しやすく、直接接触によって癌細胞の増殖を刺激した。

(3) 胸水に脱落した肺癌細胞は A D R B 3 を高発現させた。

【0299】

実施例 14 健常者と乳癌患者の末梢血塗抹標本の細胞中の A D R B 3 発現の免疫蛍光検出

1、実験方法は実施例 1 と同様である。

2、実験結果

(1) ADRB3は、健常者の好中球とリンパ系前駆細胞において発現された(図83A)。成熟CD4+和CD8+T細胞には少量で発現され、ナイーブ又は原始Tリンパ球(細胞質に大量のCD4が含まれたリンパ球)には大量発現された(図83B)。有糸分裂早期にある細胞ではADR B3が高発現された(図83C)。リンパ球におけるADR B3発現量は顆粒球より少なかった。乳癌患者の末梢血においては、大量の異型リンパ球が発生して、細胞核に顆粒球様の変化が起こり、長円孔状、分葉状、不規則形になり、核型には顆粒球様の変化が起こったリンパ球においては、ADR B3は大量で発現された(図84A)。癌患者の顆粒球では、大量の足突起が発生して、ADR B3は足突起に大量存在している。健常者の顆粒球表面では足突起が少なく、ADR B3含有量は癌患者の顆粒球よりも有意的に減少した(図84B)。

10

(2) 乳癌患者の好中球とリンパ球では、ADR B3とKi-67が大量発現され、腫瘍細胞と

顆粒球は、リンパ球のADR B3発現を誘導して、リンパ球の活性化を阻害した。一部のリンパ球では、ADR B3発現量は顆粒球を超える。ADR B3とKi-67を高発現させたリンパ球は、骨髄系細胞のマーカータンパク質-MPOを少量発現可能であり(図85)、このことは、該タイプの細胞の骨髄系細胞への分化を示し、乳癌患者のリンパ球が脱分化して、ナイーブ又は原始リンパ球になることが示された。ADR B3はT細胞分化を阻害した。

(3) 乳癌患者の血液には大量の好中球細胞外ネットワーク(NET)が存在し、リンパ球はNET中に接着され、ADR B3はNETの主成分(図86)である。それは、Tリンパ球が付近にある微小環境(niche)での顆粒球からのシグナルを受信して、癌細胞と顆粒球ADR B3がNETを形成して、リンパ球を包んで、リンパ球の分化と増殖を調節することを示した。NETは阻害性の免疫環境を作り、リンパ球の抗癌機能を阻害した。

20

(4) 乳癌患者の顆粒球は、ADR B3によってリンパ球に接着した(図85)。健常者の末梢血では、顆粒球とリンパ球の接着が少なく、癌患者の顆粒球とリンパ球の接着はさらに強固且つ頻繁に行われ、癌患者の顆粒球とリンパ球の表面にあるADR B3接着因子のような活性の向上に密に関係している。顆粒球により接着されたリンパ球がMPOを発現させることから、顆粒球のADR B3はリンパ球の脱分化を誘導して、リンパ系前駆細胞又は骨髄系細胞に退化させることを示した。

30

(5) 癌患者のリンパ球では、Ki-67発現量とADR B3発現量は正の相関を示し、ADR B3陽性リンパ球においては、Ki-67発現が見られた(図87)。顆粒球とリンパ球が接触すると、リンパ球にKi-67が発現される場合、該細胞のADR B3含有量は顆粒球より多い。顆粒球又は癌細胞はリンパ球におけるADR B3発現を増加し、ADR B3はリンパ球の脱分化を誘導して、増殖能力を有する原始細胞又は前駆細胞にすることが示された。乳癌患者の一部のリンパ球はADR B3を高発現させて、Ki-67とMPOを少量発現させるものであり、ナイーブリンパ球である(図88)。

(6) 乳癌患者の血液には大量のDNA断片が存在し、ADR B3はDNA断片に付着しており(図89)、DNA断片は癌細胞の複製に核酸原料を提供する。血液中のDNA/ADR B3複合体の含有量が多いほど、癌細胞の増殖能力は強くなり、遠隔転移を発生させやすい。

40

(7) ADR B3は、細胞質内に密な粗面小胞体が大量含まれて、細胞質内に大量のADR B3が存在し(図90)、T細胞より大きいことを特徴とする形質芽球の細胞質において高発現された。細胞質にCD4又はCD8がなくADR B3を大量含むことを特徴とする成熟形質細胞の細胞質内にも大量のADR B3が存在する(図91)。CD19+B細胞膜にはADR B3が発現された(図92)。ADR B3はプラズマ細胞による抗体合成を促進できる。

【0300】

実施例15 ADR B3抗体によるPANC-1膵臓癌アポトーシスの促進

50

1、実験方法

PANC-1を培養して、50 ng/mlのADRB3抗体で12 h処理し、対照群の場合は、マウスIgGを用いた。Annexin V/PI二重染色を行って、フローサイトメーターでアポトーシス率を検出した。

2、実験結果：対照群に比べて、ADRB3抗体は、PANC-1アポトーシス率(45.3 ± 7.3% vs 9.7 ± 3.4%、P < 0.01)を増加した。乳癌MDA231と肺癌H1299細胞は類似結果を取得し、いずれもADRB3抗体はアポトーシスを促進した。

【0301】

実施例16 緑色蛍光タンパク質(GFP)を有するADRB3プラスミドによる膵臓癌SW1990細胞の殺滅

10

1、実験方法

pENTER-ADRB3-GFPベクタープラスミド、pcDNA3/FLAG-ADRB3プラスミドを構築して、膵臓癌SW1990細胞及びMCF7細胞をトランスフェクションし、24 h後、共焦点顕微鏡下で観察した。

2、実験結果：

GFP発現のある細胞であれば、いずれも必ずアポトーシス、具体的には、核濃縮、細胞破壊が起こるが、細胞核内にGFPがなかった(図93)。GFPを有する外因性ADRB3は、細胞核に入ることができず、核膜上に蓄積されて、細胞核の内外物質交換に影響を及ぼして、細胞のアポトーシスを引き起こすことを示した。Flagタグタンパク質を有するADRB3も細胞核に入ることができないが、細胞活性に影響を与えない。ADRB3はMCF7細胞の微小管、細胞核及びミトコンドリアに局在化されている(図94)。

20

【0302】

実施例17 クロマチン共免疫沈降-チップ実験(ChIP-chip)

1、実験方法

50 ng/mlのADRB3抗体で24 h処理し、対照群ではマウスIgGを用いた。10 cmの培養皿(MCF7細胞)に37%ホルムアルデヒドを270 µl加えて、軽く均一に混合して、室温で10分間放置した。1.25 Mチロシンを1 ml加えて、室温で、5分間かけて、ホルムアルデヒド中和した。皿中の混合液を吸い取り、予冷されたPBS/EDTAで細胞を2回洗浄して、protease inhibitor cocktailを含むPBSを1 ml加えて、細胞搔爬で皿底の細胞を搔き取り、1.5 mlの遠心管に収集した。2000 × gで5分間遠心処理して、上澄みを捨てた。収集したサンプルについて専門会社に検出を依頼し、なお、免疫沈降に使用される抗体はADRB3抗体とH3K9AC抗体であった。ADRB3の異なる活性状態下で、ADRB3の全ゲノムでの結合部位とプロモーターにおけるH3K9アセチル化のレベルを分析した。

30

2、実験結果(図95参照)

ADRB3抗体を用いたChIP-chipによって、転写因子ADRB3に特異的に結合されたプロモーター配列(3000個余りの遺伝子のプロモーター)をスクリーニングし、上記遺伝子としては、FABP5(fatty acid-binding protein, epidermal。ADRB3は第8染色体の82191426~82191897塩基に結合された)、FABP4、FABP3、PTPRA(receptor-type tyrosine-protein phosphatase alpha)、PTPRCAP(protein tyrosine phosphatase receptor type C-associated protein)、PTPN7、PTPRZ1(receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta isoform)、PTPRD(receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta isoform)、PTPRR、LILRB2、LILRB4、LILRA4、LILRA3、LILRP2、FES(tyrosine-protein kinase F

40

50

es / Fps)、TUMOR NECROSIS FACTOR - RELATED AP
 OPTOSIS - INDUCING LIGAND RECEPTOR、STAT5B
 、TCL1 (T - cell leukemia / lymphoma protein 1
 A)、CD8A (T - cell surface glycoprotein CD8
 alpha chain)、C8G (補体C8 をコートし、ADRB3は第9染色体の
 139838398 - 139838876塩基に結合された)、C5AR1 (補体C5a
 受容体、ADRB3は第19染色体の47812870 - 47813391塩基に結合さ
 れた)、AKT1 (ADRB3は第14染色体の105260668 - 10526117
 4塩基に結合された)、LDHAL6B (乳酸デヒドロゲナーゼA様タンパク質6Bをコ
 ートし、ADRB3は第15染色体の59497805 - 59498262塩基に結合され
 10
 された)、SLC16A3 (該遺伝子はモノカルボン酸トランスポーターをコードし、乳酸
 の膜貫通輸送を調節する。ADRB3は第17染色体の80185203 - 801865
 85塩基に結合された)、RRP9 (ADRB3は第3染色体の51975065 - 51
 975538塩基に結合され、該遺伝子はU3 small nucleolar RN
 A - interacting protein 2をコードする)、DKC1 (ADRB
 3はX染色体の153989742 - 153990209塩基に結合され、該遺伝子はテ
 ロメアの安定性に関連する)、IZUMO1 (izumo sperm - egg fus
 ion protein 1、ADRB3は第19染色体の49250722 - 4925
 1290塩基に結合された)、TSKS (testis - specific serin
 e kinase substrate、ADRB3は第19染色体の50266261
 20
 - 50266930塩基に結合された)、TSSK6 (testis - specific
 serine / threonine - protein kinase 6)、amylo
 id beta A4 protein isoform d、EDA2R、EDAR
 、PDE10A、PDE12、PDE1C、PDE4A、PDE4B、PDE4C、PD
 E6、PDE7、PDE9多剤耐性関連タンパク質1 (MRP1)、PSPN、brai
 n - derived neurotrophic factor、NGDN、insul
 in - like growth factor II、X連鎖アポトーシス阻害タンパク
 質 (X - linked inhibitor of apoptosis protei
 n、XIAP)、vesicle transport protein SFT2A
 30
 、poly [ADP - ribose] polymerase 1、GPBP1、MY
 L3、GJA9 - MYCBP、INHBC、SEH1L、TNPO2、NUP50、NU
 SAP1、GAR1、DKC1、GTPBP4、NOP56、NEXN、ACVR1、T
 NNT2、KCNQ1、KCNH2、ACTL6A、ATP6V0B、PAX6、DCX
 、TSKS、regulator of telomere elongation h
 elicase 1、PCSK1、PCSK4、LDLRAD1、SCARF1、S1P
 R3、SMG6、DKC1、NOP10、BAD、BCL2、CASP12、CFLAR
 、LAMB3、ITGA2、ITGA7、MMP2、MMP9、RYR3、syntax
 in - 1B、PACRG、transcription factor Dp - 2、t
 ranscription factor MafB、transcription f
 actor E2F8、transcription factor E2 - alpha
 40
 isoform E47、hepatocyte nuclear factor 1
 、mitofusin - 1、FGFR2、FGF16、FGF21、HEY1、HEY2
 、TLE3、TXNIP、RIZ1、IFT140、NPHP3、GATA1、GATA
 D1、BDNF、PDGF、CDY1、CDY2、APP (Amyloid Beta
 Precursor Protein)、PNMT、COMT、ZMIZ2、DNMT1
 、SETDB2、SUV39H1、CEACAM1、CEACAM16、KAZN、CE
 ACAM21、CEACAM5、ENO1、FGF1、FGF4、GREM1、TMC6
 、TMEM43、STK36、IRF1 (interferon regulatory
 factor 1)、WHSC1、IRF3、IRF7、IRF9、cardiotr
 50
 ophin - like cytokine factor 1、tumor prote

in 63 (ADRB3は第3染色体の189349333 - 189349707塩基に結合された)、TPRG1、FKBP5、PRR5 (ADRB3は第22染色体の45063166 - 45063715塩基に結合された)、SETD1B、p16、myb-related protein B (ADRB3は第20染色体の42294360 - 42294625塩基に結合された)、RPL18A、optineurin、bone morphogenetic protein receptor type-1B、prostacyclin receptor (PTGIR)、pentraxin-4、CTBP1、FES、ZAP70、IGSF11、IRF7、KLRC1、TARDBP、MRPL19、MRPL2、MRPL41、MRPS17、MRPS26、RPL14、RPL18A、RPL19、RPS6KL1、atypical chemokine receptor 3、CCL3L1、CCR5、EEF1D、DNMT1、PDE4B、FOXP3 (ADRB3はX染色体の49121975 - 49122469塩基に結合された)、DCANP1、DCST1、DCST2、leukemia inhibitory factor、IL17RB、TRAF6、p62、hexokinase-2 (ADRB3は第2染色体の75059882 - 75060125塩基に結合された)、TCIRG1、HK1、CAMKK2、GAPDH、G1/S-specific cyclin-D3 (ADRB3は第6染色体の42016706 - 42017624塩基に結合された)、Cyclin D1、cyclin-dependent kinase 3 (CDK3、ADRB3は第17染色体の73995762 - 73996227塩基に結合された)、CDK4、CDK15、CDK18、cyclin-dependent kinase 2-associated protein 1、Rb、Ki-67、mTOR、Rictor、AKT、tubulin、Src (proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src)、PD-L1、p53、interleukin 1 (IL-1)、interleukin 6 (IL-6)、IL25、IL27、IL17RB、IL16、LEF1、ADRB3、TGFB1I1、TAB2、LTBP2、RAS、ARHGAP21、TGF-及びTNFが含まれるが、これらに制限されない。

10

20

30

H3K9AC抗体のCHIP-chip結果から明らかなように、ADRB3の結合するCDK3プロモーター領域(第17染色体の73995762 - 73996227塩基)内にあるH3ヒストンのK9はアセチル化修飾された。このことから、ADRB3は、アセチル基をH3K9に転移させるアセチラーゼであることを示した。ADRB3は、標的遺伝子プロモーターでのH3K9のアセチル化レベルを調節することで、標的遺伝子の転写に影響する。ADRB3の神経栄養因子のプロモーターとの結合可能性は、ADRB3が神経栄養因子の発現を調節することを示し、ADRB3抗体はアルツハイマー病、パーキンソン病等の神経変性疾患を治療できることが示された。

【0303】

実施例18 内毒素致死実験

1、実験方法

マウス(正常FVBマウスとADRB3遺伝子ノックアウトマウスそれぞれ10匹)にLPSを30mg/kg腹腔内注射した。注射用水でLPSを溶解して、1mg/mlに調製した。マウスの重量(g)を秤量して、重量*0.03を行って、注射使用量(ml)を算出し、マウスの死亡を観察して、死亡時間を記録し、各群のマウスの生存曲線を作成した。HE染色によって、肝、肺組織の炎症性壊死及び顆粒球浸潤の状況を観察した。腹腔分泌物の細胞塗抹標本について免疫蛍光を行って、好中球を検出した。免疫組織化学的検出によって肝、肺組織IL-6、MPO、Elastaseタンパク質の発現を検出した。

40

2、実験結果

内毒素注射後、マウスの活性は顕著に弱まり、体温は低下し、一部のマウスでは、目から膿液が流れて、膿毒症の病症が現れた。LPS注射後の16時間内、10匹のFVBマウスはすべて死亡し、2匹のADRB3^{-/-}マウスは死亡し、8匹のADRB3^{+/-}

50

マウスは生存した。正常マウスに比べて、ADRB3^{-/-}マウスは膿毒症による死亡率が著しく低下し(図96)、肝、肺組織に発生した炎症性壊死の面積も著しく減少した。2群のマウスの腹部はいずれも大量の膿液が発生して、腹膜炎を伴う膿毒症が生じた。ADRB3遺伝子ノックアウト後の腹膜炎マウスの体内では、腹膜病変部へ動員された好中球の数が著しく減少した。ADRB3^{-/-}マウスの肝、肺組織におけるIL-6、Elastaseタンパク質の発現はすべて著しく低下し、このことから、肝、肺組織の炎症反応と好中球浸潤が阻害されたことが分かった。

【0304】

実施例19 ADRB3抗体によるアデノウイルスとB型肝炎ウイルス(HBV)への細胞感染阻害

10

1、実験方法

A549細胞をカバーグラスに成長させて、ADRB3抗体で30min前処理し、GFPを有するアデノウイルス 10^6 PFU/mlを接種して、37℃インキュベータ内に入れて24時間インキュベートし、対照群にはマウスIgGを用いた。免疫蛍光検出によりリン酸化mTOR(S2448)の発現を検出した。なお、方法は実施例1と同様である。

慢性B型肝炎患者の肝組織モデルを収集して、実施例2と同様な方法によって、免疫組織化学的検出によりADRB3発現を検出した。

HepG2細胞をカバーグラスに成長させて、ADRB3抗体で30min前処理し、HBV 1ml接種して、37℃インキュベータ内に入れて24時間インキュベートし、対照群にはマウスIgGを用いた。4%ポリオキシメチレンで固定して、ウサギ抗-HBc(1:100)を加えてHBcAgを検出し、4℃で1晩放置し、翌日、ヒツジ抗ウサギIgGを加えて、37℃で1時間作用させ、洗浄後、PAP(1:50)を加えて、37℃で1時間インキュベートし、3回洗浄後、DAB発色を行って、顕微鏡検査をした。

20

2、実験結果

(1) ADRB3が阻害された後、アデノウイルスはA549肺癌細胞を感染できなくなった。ADRB3抗体は、mTORの第2448位のセリンのリン酸化を阻害することでアデノウイルス感染を阻害する作用を果たし(図97)、第2448位のセリンのリン酸化はmTORを活性化させて、アデノウイルスの複製と放出を促進する細胞自食を促進する。ADRB3抗体は、mTOR活性化を阻害して自食遮断作用を果たし、それによって、アデノウイルスの複製と放出を阻害した。ADRB3抗体によりADRB3が遮断された後、ウイルスを溶解してウイルス感染を防止可能なC8発現は増加した。

30

(2) ADRB3とアデノウイルスはいずれもA549肺癌細胞の核小体に局在化され、ADRB3はウイルス複製に必要な重要なタンパク質(図98)である可能性がある。アデノウイルスは核小体中のADRB3を活性化させることで、細胞を癌化させた。

(3) B型肝炎患者の肝細胞では、細胞質でのADRB3は健常者より高く、細胞核内にはADRB3発現はほぼなく、細胞質におけるADRB3はリボソーム機能を強化させて、HBV複製に必要なタンパク質の合成に寄与し、細胞質ADRB3と細胞核ADRB3との比は著しく高くなり、この比が高いほど、ウイルス複製は活発であることになり、該比はB型肝炎ウイルス複製を検出するための指標とされることができると示された。HBVは細胞質におけるADRB3を媒介してHepG2細胞に入ってHBV複製を促進する。ADRB3抗体は、HBVによるHepG2細胞の感染を阻害し(図99)、このことから、本抗体はB型肝炎治療への応用が期待できることを示した。

40

【0305】

実施例20 高コレステロール(HCD)食と低コレステロール(LCD)食によるADRB3欠失ApoE^{-/-}マウス(B3^{-/-}ApoE^{-/-})のアテローム性動脈硬化症プラークへの影響の研究

1、実験方法

HCD食によるB3^{+/+}ApoE^{-/-}マウスを対照として、(B3^{-/-}ApoE^{-/-})高コレステロール(HCD)食と低コレステロール(LCD)食によるADRB

50

3欠失ApoE^{-/-}マウスのアテローム性動脈硬化症プラークへの影響を研究した。試験用マウスは、1、B3^{+/+}ApoE^{-/-}マウスの高コレステロール(HCD)食群；2、B3^{-/-}ApoE^{-/-}マウスHCD食群；3、B3^{-/-}ApoE^{-/-}マウスの低コレステロール(LCD)食群；4、B3^{+/+}ApoE^{-/-}マウスHCD食とADRB3抗体治療との複合群に分けられた。8週齢の雄マウスをそれぞれ10匹選択して、高脂肪飼料(トリグリセリド20%、コレステロール1.25%)と普通の飼料で飼育した。ADRB3抗体10mg/kgを6日間おきに1回腹腔内注射投与し、高脂肪飼料で12週間飼育後、大動脈を取り、オイルレッドO染色を行った。4群のマウスの動脈プラークの数と大きさを比較して、HE染色によってプラーク内の炎症性細胞を検出し、免疫組織化学的検出によってプラーク内の炎症性因子の発現を検出し、ELISA検出によって血清中の炎症性因子IL-6、VEGF、IL-10、MPOを検出した。

10

2、実験結果(図100参照)

高脂肪飼料で3ヶ月飼育後、ApoE^{-/-}マウスは極端に老化して、せむし、脱毛、皮下脂肪、運動機能の喪失等が見られ、B3^{-/-}ApoE^{-/-}マウスは老化特性が著しくなかった。HCD群のB3^{-/-}ApoE^{-/-}マウスとB3^{+/+}ApoE^{-/-}マウスADRB3抗体治療群は、大動脈部位でのプラークの数も面積もB3^{+/+}ApoE^{-/-}マウスより減少し、動脈プラークの面積は80%~90%減少した。ADRB3欠失ApoE^{-/-}マウスでは、硬い安定プラークが発生した。B3^{-/-}ApoE^{-/-}マウスでは、HCD群の血中脂質濃度がLCD群より遥かに高いが、2群の大動脈部位でのプラークの数と面積には差がなかった。HCD群のB3^{+/+}ApoE^{-/-}マウスに比べて、HCD群のB3^{-/-}ApoE^{-/-}マウスとB3^{+/+}ApoE^{-/-}マウスのADRB3抗体治療群は、大動脈部位でのプラークの線維性キャップが厚くなり、CD4⁺T細胞と顆粒球浸潤が減少して、プラーク内の泡沫細胞MPO、Neutrophil Elastase、IL-6、ADRB3、MIFが低下した。B3^{-/-}ApoE^{-/-}マウスは、血清中IL-10濃度が高くなり、IL-6、VEGF及びMPOの濃度が低下した。

20

結論：(1)ADRB3は、アテローム性動脈硬化症のプラーク形成を促進して、プラークを不安定的にして、急性冠症候群の要因の1つである。(2)ADRB3は老化促進に繋がる。

【0306】

30

実施例21 ADRB3モノクローナル抗体による自然発症高血圧ラットの血圧降下

1、実験方法

収縮期血圧が140mmHgより高い14週齢の自然発症高血圧雄ラット(SHR)を、1群に8匹を割り当てるように、ランダムに2群に分けて、6日間おきに腹腔内注射投与し、連続的に6週間投与した。具体的に、群は[1]抗体群：ADRB3抗体10mg/kg；[2]空白対照群：マウスIgG腹腔内注射であった。RBP-1Bラット血圧計で、ラットの意識がはっきりした状態下で、テールカフ法により尾動脈の収縮期血圧と心拍数を間接的に測定し、なお、1週間ごとに、投与前と投与後に尾動脈の収縮期血圧、心拍数を測定し、且つ体重を量り、血圧降下程度=(治療前の収縮期血圧-治療後の収縮期血圧)/治療前の収縮期血圧から血圧降下程度を算出した。6週間投与後、ラットを殺して、開胸して、心臓を迅速に切り取り、心臓を4%のKH液に入れて、心腔内に残留された血液を押し出し、上行大動脈を分離して、大動脈について逆行カニューレ挿入を行った後、Langendorff灌流装置に掛けて、95% O₂と5% CO₂で十分に酸素化されたKH液を用いて、37℃恒温で逆行性灌流を行い、左心房を経てカテーテルバルーンを左心室に挿入して、カテーテルを圧力トランスデューサーに接続し、バルーン内に注水して内圧を40mmHgに上げて一定に保持し、20min事前灌流して、各指標が安定的になると、Pclab生体信号収集システムで各項の心機能指標：左室内圧(LVP)、左室最大収縮期血圧(LVSP)、左心室拡張末期圧(LVEDP)、左室発生圧(LVDP)、左室収縮期血圧の最大上昇速度(+dp/dtmax)、左心室拡張期血圧の最大低下速度(-dp/dtmax)、心拍数(HR)を記録して、冠状動脈の流量(

40

50

CF)を収集して記録した。灌流終了後、心臓を降ろして、ろ紙で拭き干し、大動脈を切り落として、重量を量り、心臓重量/体重(HW/BW)を算出し、心室自由壁と心房を切り落として、左心室(心室中隔を含む)の重量を量り、左心室の肥大程度を左心室重量と体重の比(LVW/BW)として表示した。SPSS19を用いて統計分析を行い、計量データを平均値±標準偏差として表示し、2群間の平均値の比較にはt検定が使用された。

2、実験結果

ADRB3抗体治療群は、血圧がすべて正常血圧範囲内(表4)に低下し、治療前と対照群に比べて有意的に低下した(P<0.01)。ADRB3抗体群は、血圧降下の差と血圧降下程度が対照群に比べて有意的に増加し、差異には有意性がある(P<0.01)。ADRB3抗体による心機能への影響については、表5に示されるように、抗体治療群では、LVEDPは有意に対照群より低く(P<0.05)、HRは対照群に比べて有意に減少し(P<0.05)、心機能改善が明らかであった。各群のラットの心臓重量/体重、左室重量/体重の変化については、表6に示されるように、抗体群HW/BW、LVW/BWはいずれも対照群よりも有意に低く、差異に有意性がある(P<0.05)。ADRB3抗体は、SHR血圧を正常範囲に効果的に低下させ、SHR心機能を改善して、高血圧による左心室肥大を解消した。

10

20

30

40

50

【表5】

表4 自然発症高血圧ラットの治療前後の収縮期血圧変化(mmHg)($\bar{x}\pm s, n=8$)

群別	治療前	治療後	血圧降下差	血圧降下程度(%)
対照群	174.5±12.2	180.5±8.0	-5.5±4.5	-3.6±3.2
抗体群	177.6±4.4	98.5±14.4*#	80.1±12.5#	45.4±8.6#

注：治療前に比べて、* P < 0 . 0 1、対照群に比べて、# P < 0 . 0 1である。

【表6】

表5 自然発症高血圧ラットの心機能($\bar{x}\pm s, n=8$)

群別	LVSP	LVEDP	LVDP	+dp/dtmax	-dp/dtmax	HR	CF
対照群	105±10	36±4	87±16	2765±607	1456±356	202±18	4.4±2.1
抗体群	90±32	22±3*	80±22	1729±759	732±280	152±26	2.4±0.9

注：対照群に比べて、* P < 0 . 0 5であり、LVDP、LVSP、LVEDP、LVDPの単位はmmHg；CF単位はml/minである。

【表7】

表6 自然発症高血圧ラットの心臓重量/体重、左室重量/体重($\bar{x}\pm s, n=8$)

群別	HW/BW (mg/g)	LVW/BW(mg/g)
対照群	5.6±0.2	2.5±0.3
抗体群	4.1±0.3*	1.5±0.2*

注：対照群に比べて較、* P < 0 . 0 5である。

【0307】

実施例22 ADRB3抗体による、ヒト末梢血単球(PBMC)の細胞傷害性T細胞への分化の誘導

1、実験方法

健常者、膵臓癌患者、肝癌患者、肺癌患者及び白血病患者それぞれ5名から、末梢血を3~5ml採血して、Ficoll密度勾配遠心分離法によりPBMCを分離して、5%

ウシ胎仔血清を含むDMEMで培養し、異なる濃度のADRB3抗体で誘導培養を行い、対照群にはADRB3抗体を用いない。それぞれ0、2、4、6、8、10日間誘導培養したとき、細胞を取り、フローサイトメーターでCD4⁺、CD8⁺T細胞及びTreg細胞の定量的分析を行った。溶解誘導後の細胞を遠心処理して細胞の上澄みを得て、MTT法で分化誘導細胞による標的細胞への殺滅効果を検証した。SW1990、MCF-7等の接着腫瘍細胞を標的細胞として、96ウェル培養板に接種した。実験群では、異なる濃度の細胞溶解上澄み、対照群では等体積の溶媒を含む培地を用いて、37℃、5%CO₂で5d培養した。新たに調製してMTTを0.5mg/ml含む無血清培地を1ウェルに200ul加えて、4h培養し続けた。1ウェルの液体を全部吸収させて、200ulのDMSOを添加して、10min振とうさせ、マイクロプレートリーダーにおいて、試験波長570nm、基準波長450nmで光学濃度値を測定した。

10

2、実験結果：

0.5~100ug/mlの用量範囲内で、ADRB3抗体はPBMCのCD8⁺T細胞への誘導分化を促進すると同時に、Treg細胞の比率を低下させた。同等濃度の抗体で6~8日間作用させる場合、誘導後の細胞での抗癌サイトカインの効果が最も高く、最高用量の細胞溶解液は約80%の標的細胞を殺滅できる。ADRB3抗体は、免疫不全のリンパ球を誘導して、機能細胞にして、抗癌作用を発揮させた。

【0308】

実施例23 ADRB3抗体の補体活性化促進

異なる濃度のADRB3抗体でMCF-7、A549、SW1990細胞を処理した。内毒素(LPS)を陽性対照とした。2日間後、細胞タンパク質を収集して、western blot検出によって補体C3、C8とC5受容体(C5R)を検出した。免疫蛍光検出によってC8とB3ARを検出した。

20

実験結果から分かるように、ADRB3抗体は、C3、C8及びC5Rの発現を用量依存的に増加した(図101A)。ADRB3抗体で処理した後、細胞膜上に大量のC8が発生したのに対して、B3ARは消えて、細胞核が濃縮されて、アポトーシスを引き起こした(図101B)。C8は膜攻撃複合体(Membrane Attack Complex、MAC)の形成のために不可欠な重要物質であり、ADRB3抗体はMAC集合を促進して細胞膜に挿入させることで、細胞の破裂、死亡を起こした。

【0309】

実施例24 ADRB3抗体による心臓血管系への作用

研究結果から明らかなように、ADRB3抗体は、程度が異なるが、実験的心筋梗塞又は不整脈等の動物モデルのいずれに対しても抵抗作用を果たす。虚血心筋への酸素供給と需要の不均衡を改善した。ADRB3抗体は、前下行枝結紮によるラット心筋梗塞モデルの心筋虚血程度を軽減させて、冠動脈閉塞後の梗塞範囲を減少させた。ラットにADRB3抗体を腹腔内注射することによって、アコニチンによる不整脈等に対する抑制作用を果たす。ADRB3抗体は、老化心筋細胞を減少させて、心機能を改善した。

30

【0310】

実施例25 ADRB3抗体による血液系への影響

研究結果から明らかなように、ADRB3は血小板膜に存在する(図102)。ADRB3抗体は微小循環を改善して、血小板凝集を阻害し、ラットのインビトロ血栓形成に対して顕著な阻害効果がある。

40

【0311】

実施例26 ADRB3抗体による呼吸器系への影響

研究結果から明らかなように、ADRB3抗体は、灌流モルモットの肺流量を減少させ、気管支収縮作用があり、アセチルコリンによる摘出腸管攣縮に対して鎮痙作用を果たす。

【0312】

実施例27 ADRB3抗体の抗疲労作用

マウスの尾根部に体重5%の鉛シートによる荷重をかけて、水の深さ(30±1)cm

50

、水温 (25 ± 1) の水泳箱に入れて水泳させ、マウスの四肢に運動を保持させた。マウスの水泳開始から死亡までの時間 (m i n) を記録して、マウスの水泳時間とした。結果から明らかなように、A D R B 3 抗体を注射したマウスは氷水での水泳時間が対照群より長く、A D R B 3 抗体は抗疲労作用を有する。

【 0 3 1 3 】

実施例 2 8 A D R B 3 抗体の睡眠改善機能

研究結果から明らかなように、A D R B 3 抗体は、マウスの睡眠潜時を短縮させて、睡眠マウスの数を増加し、閾値用量のペントバルビタールナトリウムを投与したマウスの睡眠時間を顕著に延長させる。

【 0 3 1 4 】

実施例 2 9 A D R B 3 抗体によるアルツハイマー病 (A D) モデルマウスへの治療作用

研究結果から明らかなように、A D R B 3 抗体は、A D マウスの学習記憶を改善して、脳由来神経栄養因子 (B D N F) 遺伝子の発現を向上させ、脳内の A 堆積に起因する老人斑の生成を減少できる。

【 0 3 1 5 】

実施例 3 0 A D R B 3 抗体に備える血中脂質調節作用

研究結果から明らかなように、A D R B 3 抗体を注射することによって、実験的高コレステロール血症に罹患した家ウサギの血中トリグリセリド、総コレステロール、L D L レベルを低下させて、H D L を下げる。プラークを安定化させて、大動脈及び冠状アテローム性動脈硬化症のプラーク形成を減少できる。

【 0 3 1 6 】

実施例 3 1 A D R B 3 抗体による、アデノウイルスと B 型肝炎ウイルス (H B V) の細胞感染の阻害

研究結果から明らかなように、A D R B 3 抗体は、C 5 7 B L マウスに C C L 4 を腹腔内注射した肝硬変モデルの肝臓繊維化程度を軽減させて、肝組織ポータルエリアと胆管周囲への炎症性細胞の浸潤を阻害し、肝硬変に起因する腹水を減少して、肝機能を改善できる。

【 0 3 1 7 】

実施例 3 2 A D R B 3 抗体による B 型肝炎ウイルス (H B V) の複製阻害

A D R B 3 抗体を尾静脈から注射して H B V 遺伝子組換えマウスをトランスフェクションし、注射後の 6 日目、21 日目、1 ヶ月目、3 ヶ月目及び 9 ヶ月目の異なる時間に、眼角静脈から採血して、化学発光法によりマウスの血清中 H B s A g レベルを定量的検出し、P C R で H B V - D N A レベルを検出した。結果から明らかなように、A D R B 3 抗体は、遺伝子組換えマウスの血清 H B s A g と H B V - D N A のレベルを著しく低下できる。

【 0 3 1 8 】

実施例 3 3 A D R B 3 抗体による繁殖能力と性機能向上

A D R B 3 抗体は、マウスの性的能力を向上できる。交配実験結果から分かるように、免疫細胞溶解物は、勃起不全モデルマウスの交配回数を顕著に増加して、交配率を向上させ、交配時間を延長させた。雌マウスの妊娠率、産仔数及び仔マウスの生後生存率を向上させる。

【 0 3 1 9 】

実施例 3 4 A D R B 3 抗体によるループスマウス自己免疫及びその生存時間への影響

研究結果から明らかなように、A D R B 3 抗体は B X S B ループスマウスの生存時間を延長させて、末梢血抗 d s - D N A 抗体及び I g G の発現レベルを低下させ、脾臓や腎臓組織の I F N - 発現を阻害できる。

【 0 3 2 0 】

実施例 3 5 高齢マウスについての治療の研究

10

20

30

40

50

健康な C57BL/6 マウスを雌雄を問わずに選別した。実験用の 2 群である ADRB3 抗体治療群、生理食塩水対照群に分けて、1 群に 10 匹とし、マウスの 12 月齢から治療を開始させた。ADRB3 抗体治療群に ADRB3 抗体を 0.1 mg/回、1 回/週間腹腔内注射して、合計 3 ヶ月治療し、生理食塩水対照群に生理食塩水を注射した。マウス 12、15、18、21 月齢のとき、受動的回避試験、Morris 水迷路試験、オープンフィールド迷路試験及び高架式十字迷路試験など、行動学的試験を行った。

行動学的結果から明らかなように、Morris 水迷路試験では、場所テストでは、生理食塩水対照群のマウスのほうは、逃避潜時が長く、プローブテストでは、生理食塩水対照群のマウスはプラットフォーム区画距離百分率、時間百分率のいずれも減少して、ADRB3 抗体治療群に比べると、有意的な差異がある。

行動学に基づいて不安指標を検出し、オープンフィールド迷路試験の結果から明らかなように、ADRB3 抗体治療群マウスに比べて、生理食塩水対照群マウスは、中央領域距離百分率が著しく減少し、両方向に有意性がある。

高架式十字迷路試験結果から明らかなように、ADRB3 抗体治療群マウスに比べて、生理食塩水対照群は、オープンアーム領域に入る距離の百分率、オープンアームに入る回数の百分率が著しく減少して、両方向に有意差がある。

受動的回避試験の結果から明らかなように、ADRB3 抗体治療群に比べて、生理食塩水対照群は、間違っただ回数が増加して、潜時が短くなった。

HE 染色結果から明らかなように、ADRB3 抗体治療群は、健康な 12 月齢のマウスに近く、脳細胞数が大きく、規則的に配列されており、ニューロン細胞が完全であり、生理食塩水対照群マウスは、明らかなニューロン空胞変性が発生して、細胞が希に配列されている。

【0321】

実施例 36 神経膠腫の治療研究

ヒト神経膠腫 U87 細胞を 6 週齢のヌードマウスの背部皮下に移植して、腫瘍形成後、神経膠腫モデルとした。実験用のため、それぞれ 8 匹を含む 4 群、すなわち、正常対照群、モデル対照群、ADRB3 抗体治療群、Gemcitabine と CD40 抗体の併用療法群に分けた。ADRB3 抗体治療群に ADRB3 抗体を、0.1 mg/回、1 回/5 日間で腹腔内注射して、合計 6 週間治療した。モデル対照群に等量の生理食塩水を腹腔内注射した。

結果から明らかなように、対照群及び Gemcitabine 治療群に比べて、ADRB3 抗体治療群には、肺部転移巣が認められず、対照群のすべての肺部に転移巣が見られ、Gemcitabine 治療群の一部では、転移巣が発生し、ADRB3 抗体治療群の生存期間がほかの群よりも延長している。

【0322】

実施例 37 ラット上皮内膀胱癌の治療研究

N-メチルニトロソウレア (MNU) で誘導してラット上皮内膀胱癌モデルを構築した。実験のため、それぞれ 8 匹を含む 4 群、すなわち、正常対照群、モデル対照群、ADRB3 抗体治療群、Gemcitabine と CD40 抗体の併用療法群に分けた。ADRB3 抗体治療群に ADRB3 抗体を 0.5 mg/回、1 回/5 日で腹腔内注射して、合計 7 週間治療した。モデル対照群に等量の生理食塩水を腹腔内注射した。

結果から明らかなように、ADRB3 抗体治療群の腫瘍の大きさは平均 70% 減少し、連続的に 30 日間治療した後、腫瘍の成長が停止した。

【0323】

実施例 38 マウス白血病の治療研究

ヒト B リンパ性白血病細胞 NALM-6 細胞を尾静脈注射により高度免疫不全 NCG マウスの体内に移植して、マウス白血病モデルを構築した。実験のため、それぞれ 8 匹を含む 4 群、すなわち、正常対照群、モデル対照群、ADRB3 抗体治療群、Gemcitabine と CD40 抗体の併用療法群に分けた。ADRB3 抗体治療群に ADRB3 抗体を 0.1 mg/回、1 回/5 日で腹腔内注射して、合計 5 週間治療した。モデル対照群に

等量の生理食塩水を腹腔内注射した。

結果から明らかなように、他の群に比べて、A D R B 3 抗体治療群は、体重、生存状態及び生存期間のいずれも良好であり、N A L M - 6 細胞の数が有意的に減少して、フローサイトメトリーでT細胞表面マーカーが検出されることから、治療群のTエフェクター細胞の免疫機能が各対照群より高いことが示された。

【0324】

実施例39 マウス糖尿病の治療研究

8週齢の糖尿病マウス(d b / d b m o u s e)を断食させて水を投与した状態を12時間続けた後、内側眼角から採血して、空腹時血糖値(F G B)を促進し、F G B が11.1 m m o l / L より高いものを、それぞれ8匹を含む2群、すなわち、モデル対照群、A D R B 3 抗体治療群にランダムに分けた。A D R B 3 抗体治療群にA D R B 3 抗体を0.1 m g / 回、1回/5日で腹腔内注射して、合計5週間治療した。モデル対照群に等量の生理食塩水を腹腔内注射した。最終回投与後、目の周りから採血して血糖、血中脂質の指標を測定した。

結果から明らかなように、(1)A D R B 3 抗体群では、d b / d b マウスの血糖は低下した($P < 0.01$)。(2)A D R B 3 抗体はd b / d b マウスの総コレステロール、L D L - C 含有量を低下させて、H D L - C 含有量を向上させ、糖尿病マウスの血中脂質レベルの回復に有利であった($P < 0.01$)。

【0325】

実施例40 マウス統合失調症の治療研究

8週齢のC 5 7 B L / 6 雄マウスに、マレイン酸ジゾシルピン(M K 8 0 1) 0.5 m g / k g を腹腔内注射して、統合失調症マウスモデルを構築した。統合失調症の病症と類似した症状である自発運動の亢進(h y p e r l o c o m o t i o n)と常同行動(s t e r e o t y p y)が観察された後、モデル対照群(M K 8 0 1 未注射)、モデル群(M K 8 0 1 注射)及びA D R B 3 抗体治療群(M K 8 0 1 + A D R B 3 抗体注射)に分けた。A D R B 3 抗体治療群にA D R B 3 抗体を0.1 m g / 回、1回/5日で腹腔内注射して、合計5週間治療した。モデル対照群とモデル群に等量の生理食塩水を腹腔内注射した。各群の動物について、オープンフィールド試験とプレパルス抑制テスト(P P I)を行って、各群のマウスの自発運動量と感覚運動ゲーティング機能を評定して比較した。

結果から明らかなように、対照群に比べて、モデル群マウスは、運動量が著しく増加し[運動総距離(1622 ± 146.7) c m v s (5502 ± 432.4) c m ; 自発運動回数(122 ± 16.5)回 v s (332.6 ± 24.3)回 ; いずれも $P < 0.001$]、且つ、P P I に障害が発生しており[78 d B : (35.5 ± 1.6) v s (11.4 ± 2.1) ; 84 d B : (46.2 ± 5.6) v s (17.4 ± 3.6) ; いずれも $P < 0.01$]、モデル群に比べて、A D R B 3 抗体治療群は、運動量が著しく低下し[(2655 ± 331.4) c m、(192.3 ± 17.3)回]、P P I 異常が大幅に改善された。

【0326】

実施例41 A D R B 3 のNK細胞での位置及び機能

妊婦の臍帯血と成人の血塗抹標本について、A D R B 3 とC D 5 6 の二重染色をしたところ、臍帯血NK細胞には大量のA D R B 3 が存在し、臍帯血のリンパ球に微量のA D R B 3 (図103)があり、成人NK細胞にもA D R B 3 が存在することが見出された。成人のリンパ球のA D R B 3 増加は老化に関連する。NK細胞にはA D R B 3 とC D 5 6 の含有量は正の相関を示し、A D R B 3 が多いほど、C D 5 6 は多くなる。C D 5 6 ^{b r i g h t} はナイーブNKであり、A D R B 3 はC D 5 6 を向上させて、NK分化・成熟を阻害した。NK92細胞で細胞塗抹標本を製作して、A D R B 3 とM P O を検出した。その結果、NK92細胞では、A D R B 3 とM P O が高発現された(図104)。A D R B 3 抗体(5 ~ 50 n g / m l)でNK92細胞を処置して2日間後、溶解細胞について、w e s t e r n b l o t 検出を行って、M P O / C D 5 6 タンパク質含有量を測定した。その結果、A D R B 3 抗体はM P O、C D 5 6 タンパク質を用量依存的に低下させた。A

D R B 3 は、N K 細胞を阻害して、N K 細胞による自体正常細胞への攻撃を回避する作用を有する。

【0327】

実施例 4 2 A D R B 3 による単球と巨核球の調節

免疫蛍光によって、健常者と急性心筋梗死患者の末梢血での単球、巨核球中の A D R B 3 分布と含有量を検出した。その結果、急性心筋梗塞患者の単球 (図 1 0 5)、巨核球では、A D R B 3 は大量発現され、健常者よりも有意に高く、増殖期にある単球核内に A D R B 3 がある。

急性冠症候群患者では、心筋トロポニン T (c T n T) 陽性者の巨核球では、A D R B 3 含有量は c T n T 陰性者より高かった (図 1 0 6) 。

動物実験に、B a l b / c マウスに A D R B 3 抗体 (1 m g / k g 体重) を 3 日おきに 1 回腹腔内注射して、2 週間後、マウスの凝固機能を検出した。その結果、A D R B 3 抗体は、血小板数を低減させて、血小板凝集を阻害し、インビトロ血栓に対して顕著な阻害効果がある。

【0328】

実施例 4 3 A D R B 3 融合遺伝子検出

膵臓癌細胞 P a n c - 1、膵臓癌患者癌組織及び隣接正常組織について、エクソン配列決定方法によって、A D R B 3 融合遺伝子を検出した。その結果、A D R B 3 遺伝子は、大量の癌関連遺伝子、たとえば m y c、r a s、s r c、m p o、p m l、H e r 2、e g f r、B 7、C D 8、C D 2 8 等の遺伝子と融合遺伝子を形成した。P a n c - 1 を A D R B 3 抗体で処置すると、A D R B 3 融合遺伝子は有意に減少した。

【0329】

実施例 4 4 A D R B 3 抗体によるヘロイン中毒の治療

S D 成年雄ラットを、ヘロイン中毒群、治療群の 2 群にランダムに分けた。1 日目の 1 0 m g / k g から 1 0 日目の 1 0 0 m g / k g まで、1 日ずつ増量するように、1 日に 3 回に分けてラットにヘロインを皮下注射し、ラットヘロイン中毒モデルを構築した。治療群のラットは、毎日、ヘロイン注射後、A D R B 3 抗体 (5 m g / k g) を腹腔内注射した。ヘロインの最後投与の翌日、塩酸ナロキソン (4 m g / k g) を腹腔内注射して 2 h 後、ラット発生ライジング、激しい震え、歯噛み、ジャンプ、立ち等の禁断症状が発生すると、中毒動物モデルの構築に成功し、禁断症状について採点した後、各群の動物を麻酔して、全脳を取り出し、免疫組織化学法でラット関連脳領域の A D R B 3 タンパク質発現を測定した。

結果から明らかのように、禁断評価スコアとして、ヘロイン中毒群のラットは、 21.7 ± 4.4 、A D R B 3 抗体治療群は 11.7 ± 2.8 であり、2 群間で有意性がある ($P < 0.05$)。ヘロイン中毒群のラットは、A D R B 3 を発現させた陽性ニューロンの数が治療群ラットより有意に減少した ($P < 0.05$)。

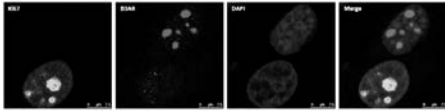
結論：A D R B 3 抗体は、ラットのヘロイン中毒を軽減させることができ、その作用メカニズムがニューロン A D R B 3 シグナル伝達調節に繋がると考えられる。

【0330】

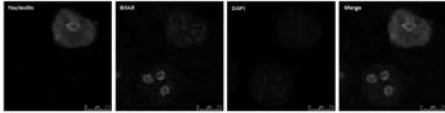
まとめ

以上の結果のとおり、A D R B 3 は、神経 - 内分泌 - 免疫調節ネットワークにおける重要な受容体であり、A D R B 3 媒介シグナル伝達経路が好中球、リンパ球や腫瘍細胞の増殖及び分化を調節するものである。健常な状態では、A D R B 3 は生体の非特異的免疫と特異的免疫の能力を維持して、外因性病原性微生物や老化した生体組織を除去することによって、生体保護及び老化防止作用を果たす。病理学的な状態では、該シグナル伝達経路の過剰な活性化により、系の慢性炎症を引き起こして、免疫恒常性を破壊する。A D R B 3 のモノクローナル抗体が A D R B 3 と特異的に結合してその活性を調節 (遮断又は作動) することができるため、炎症、ウイルス感染、アテローム性動脈硬化症、糖尿病、神経変性疾患、自己免疫疾患、悪性腫瘍及び和高齢化による疾患の治療に適用できる。

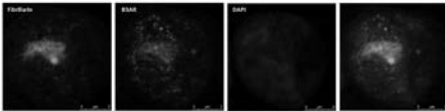
【 図 1 】



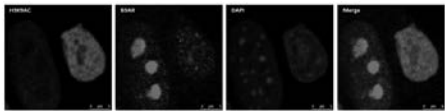
【 図 2 】



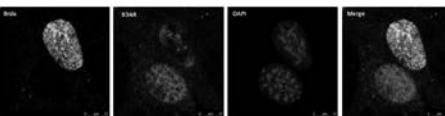
【 図 3 】



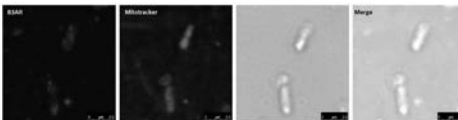
【 図 4 】



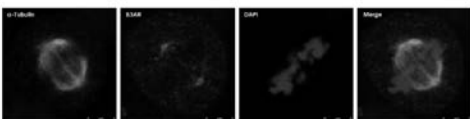
【 図 5 】



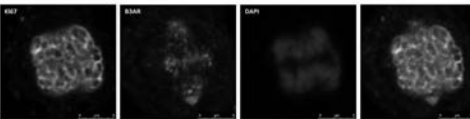
【 図 1 0 】



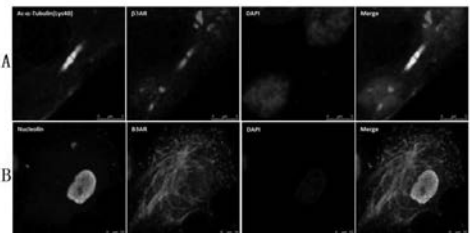
【 図 1 1 】



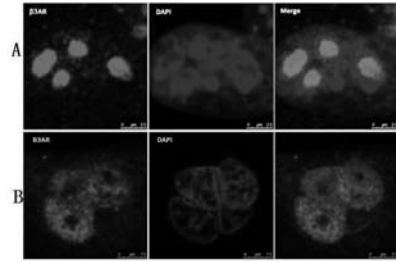
【 図 1 2 】



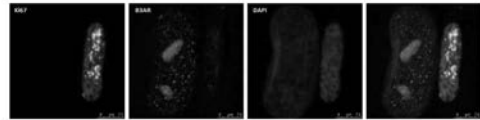
【 図 1 3 】



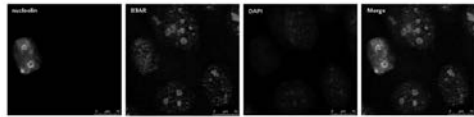
【 図 6 】



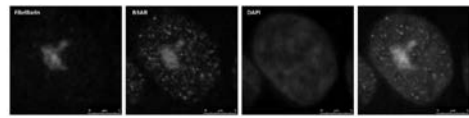
【 図 7 】



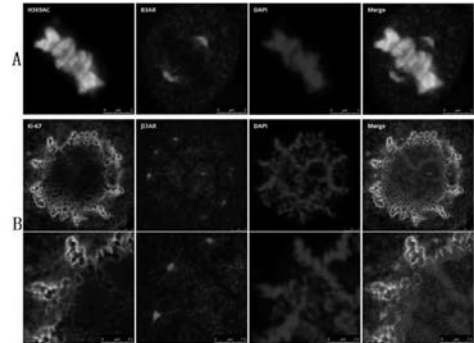
【 図 8 】



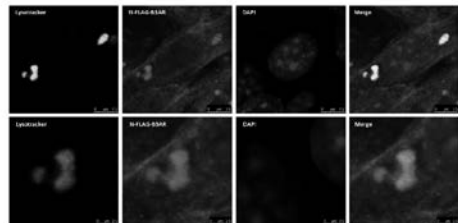
【 図 9 】



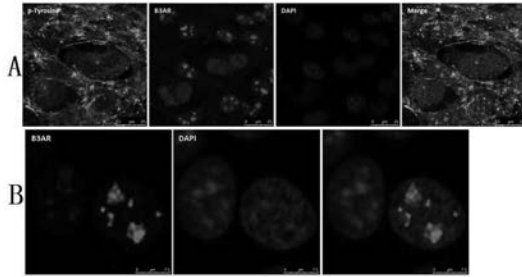
【 図 1 4 】



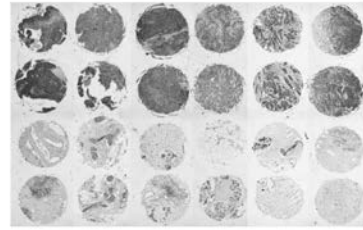
【 図 1 5 】



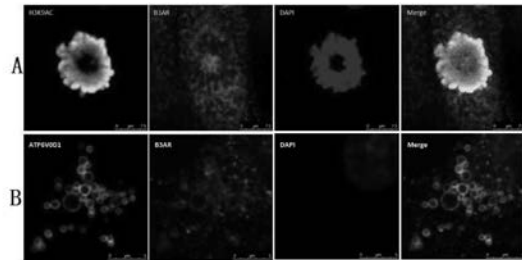
【 図 1 6 】



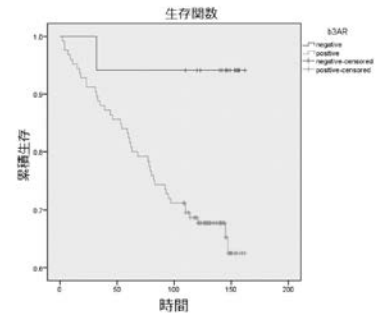
【 図 1 8 】



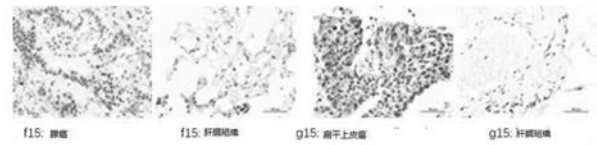
【 図 1 7 】



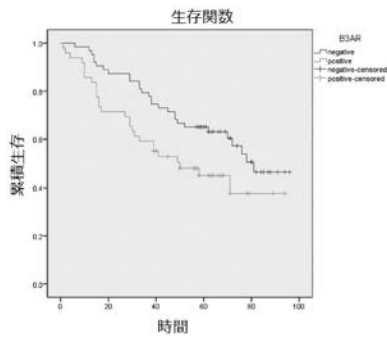
【 図 1 9 】



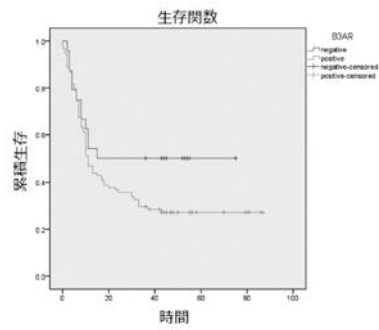
【 図 2 0 】



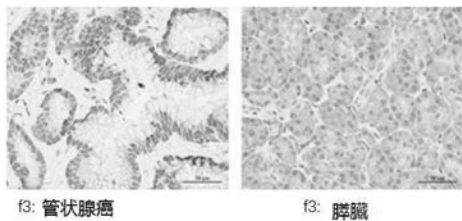
【 図 2 1 】



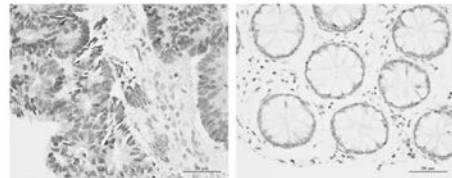
【 図 2 3 】



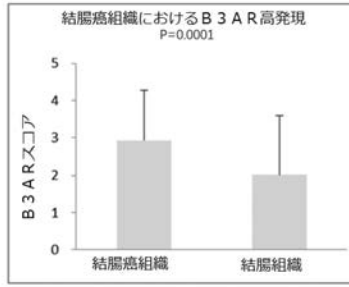
【 図 2 2 】



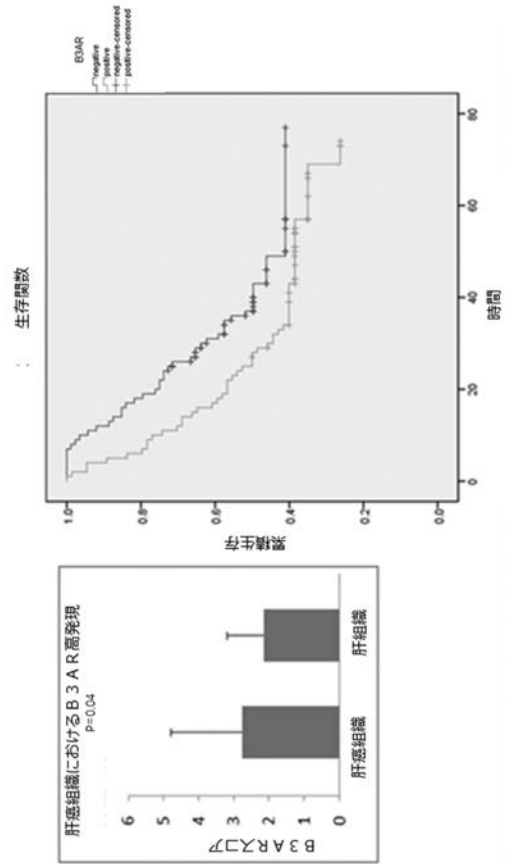
【 図 2 4 】



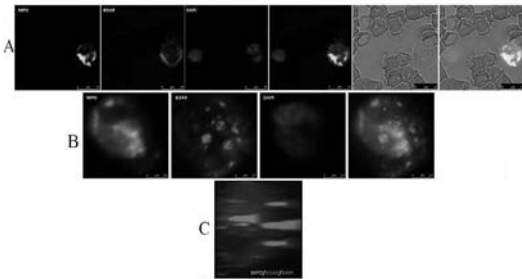
【 図 2 5 】



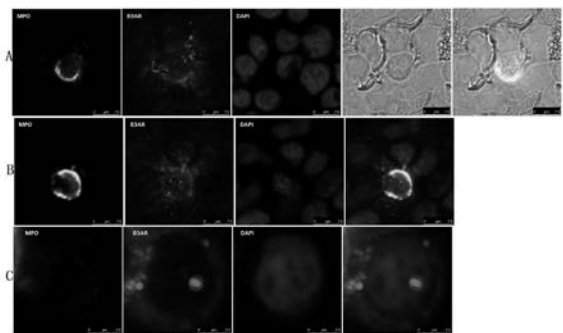
【 図 2 6 】



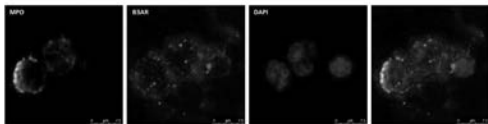
【 図 2 7 】



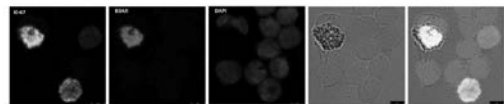
【 図 3 0 】



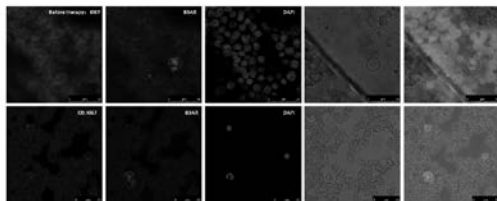
【 図 2 8 】



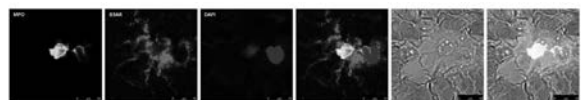
【 図 3 1 】



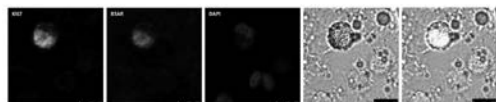
【 図 2 9 】



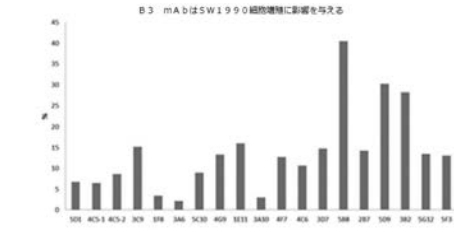
【 図 3 2 】



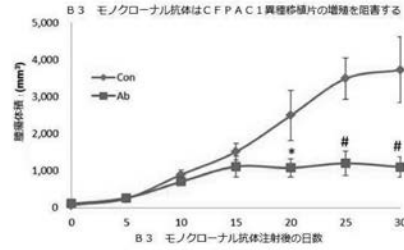
【 図 3 3 】



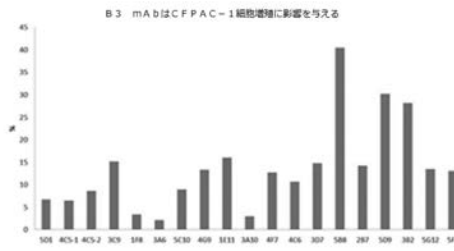
【 図 3 8 】



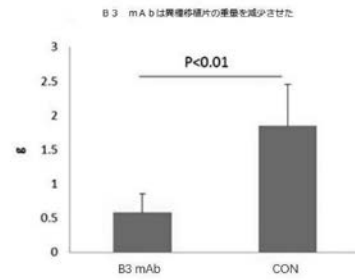
【 図 4 1 】



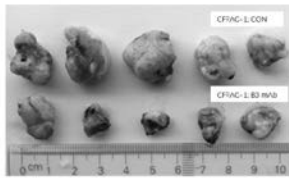
【 図 3 9 】



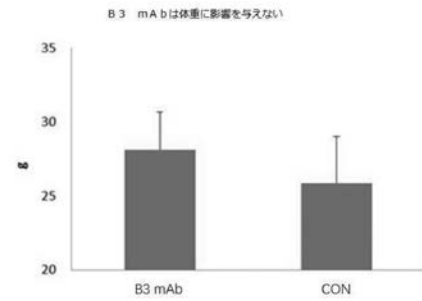
【 図 4 2 】



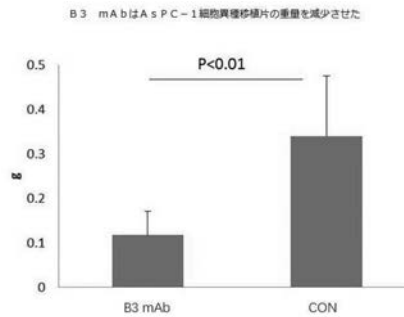
【 図 4 0 】



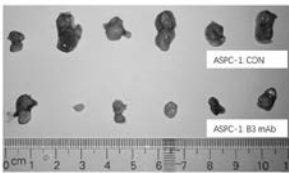
【 図 4 3 】



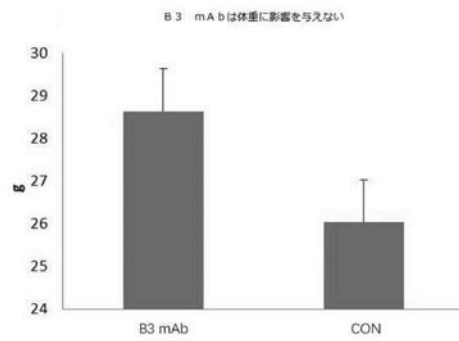
【 図 4 6 】



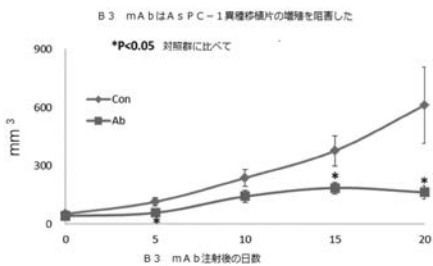
【 図 4 4 】



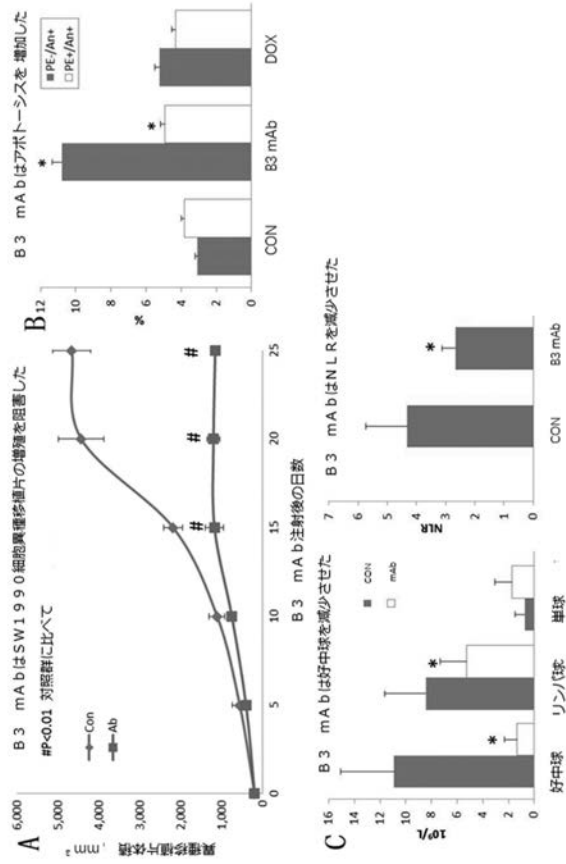
【 図 4 7 】



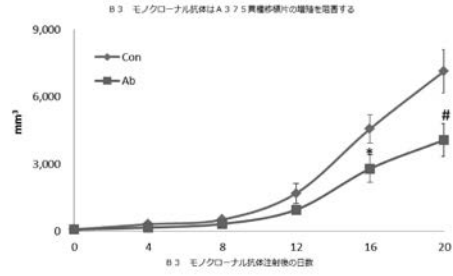
【 図 4 5 】



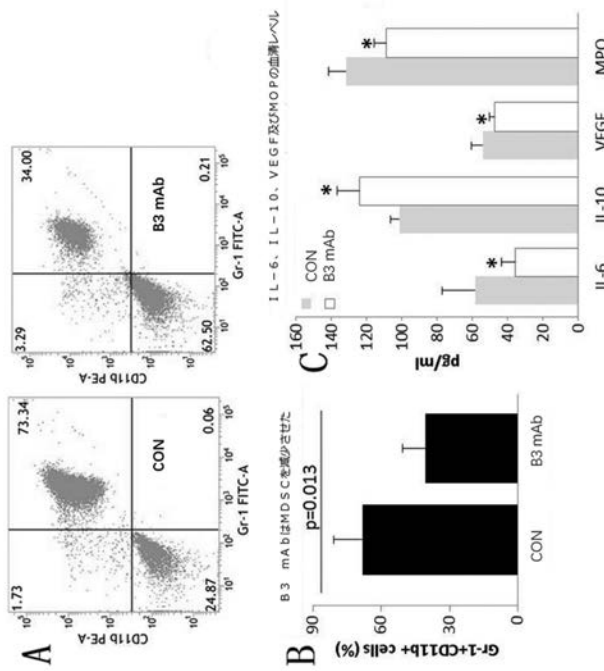
【 図 4 8 】



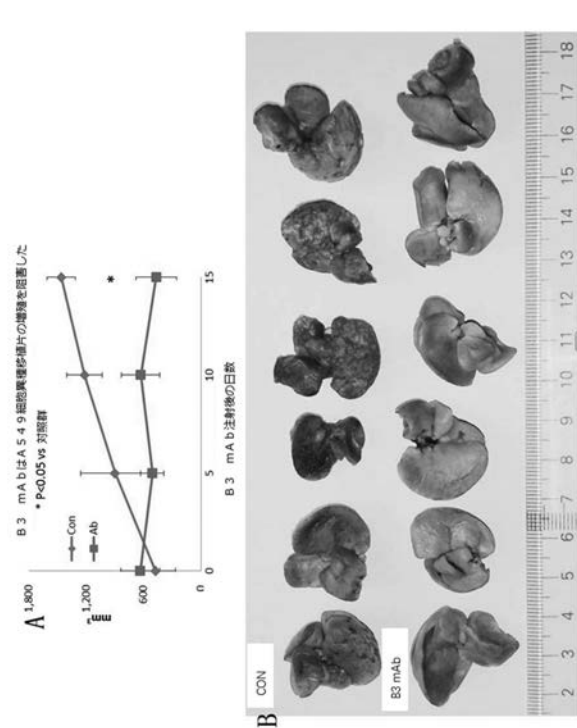
【 図 4 9 】



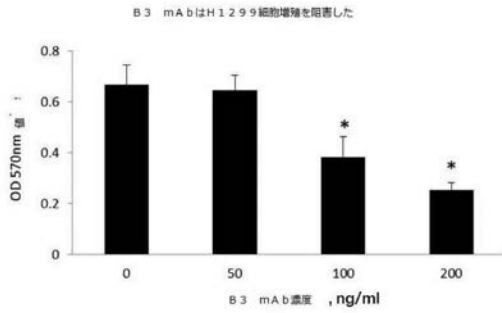
【 図 5 0 】



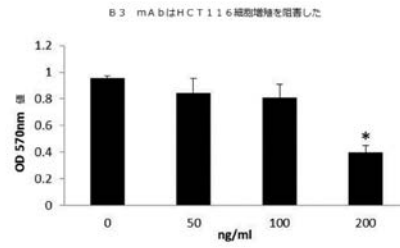
【 図 5 1 】



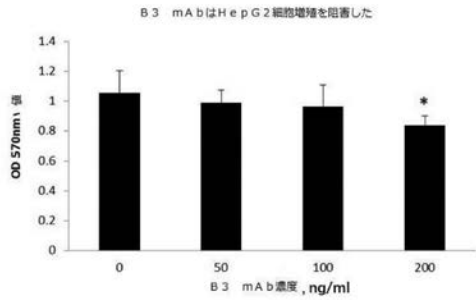
【 図 5 2 】



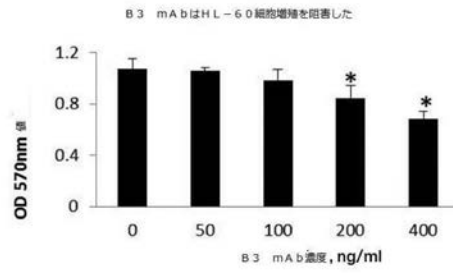
【 図 5 4 】



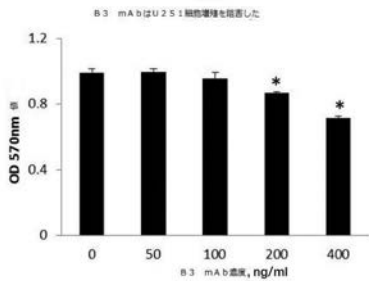
【 図 5 3 】



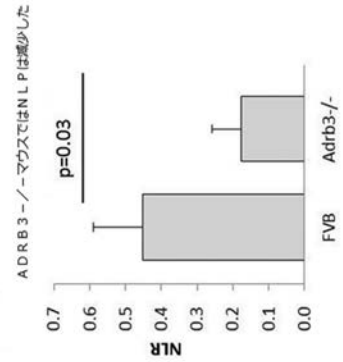
【 図 5 5 】



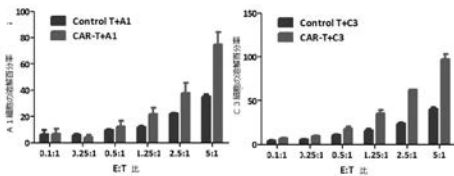
【 図 5 6 】



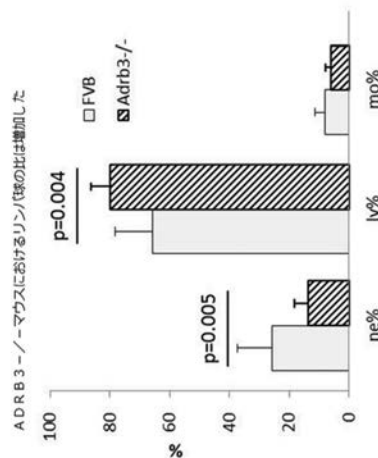
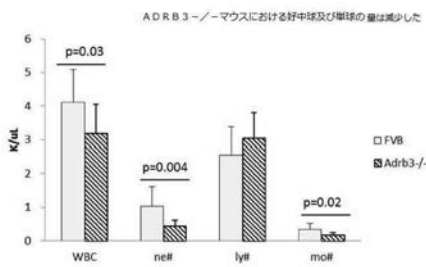
【 図 5 9 】



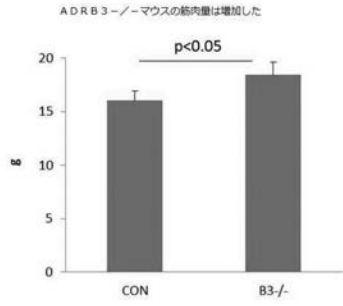
【 図 5 7 】



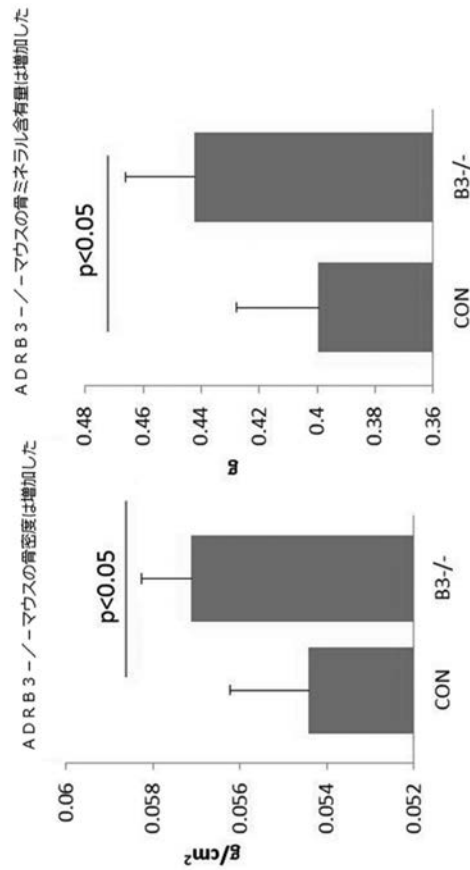
【 図 5 8 】



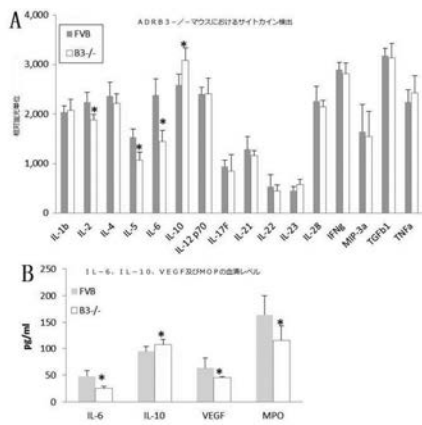
【 図 6 0 】



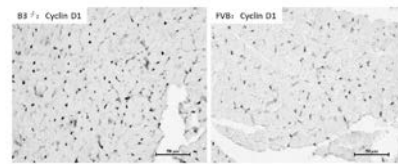
【 図 6 1 】



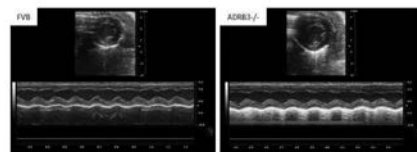
【 図 6 2 】



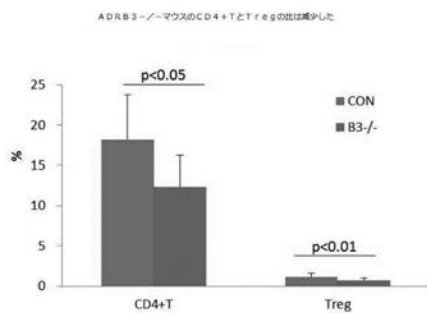
【 図 6 4 】



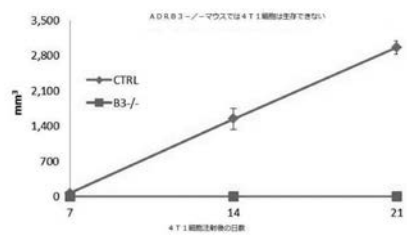
【 図 6 5 】



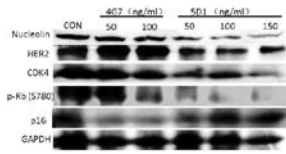
【 図 6 3 】



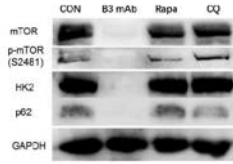
【 図 6 6 】



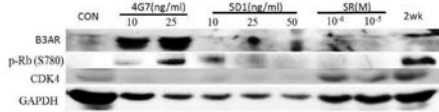
【 6 7 】



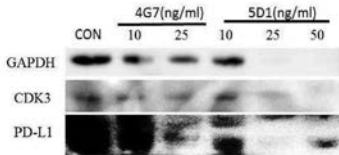
【 6 8 】



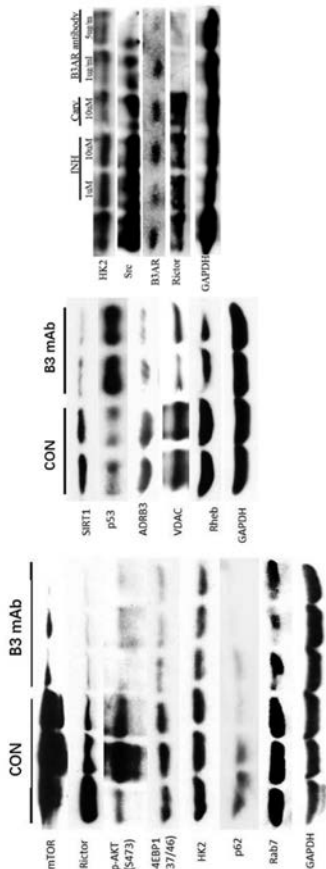
【 6 9 】



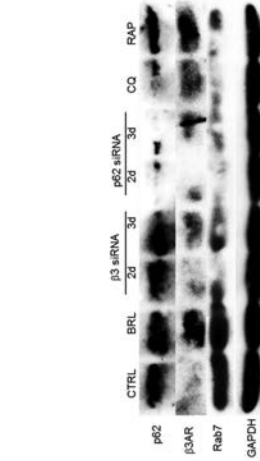
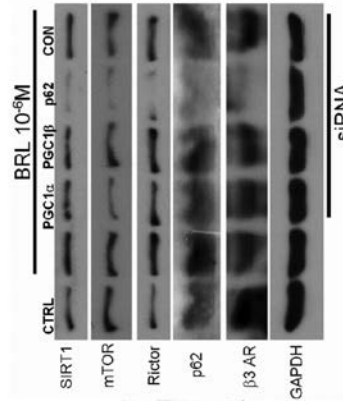
【 7 0 】



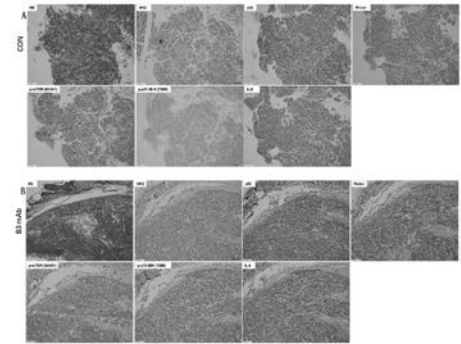
【 7 2 】



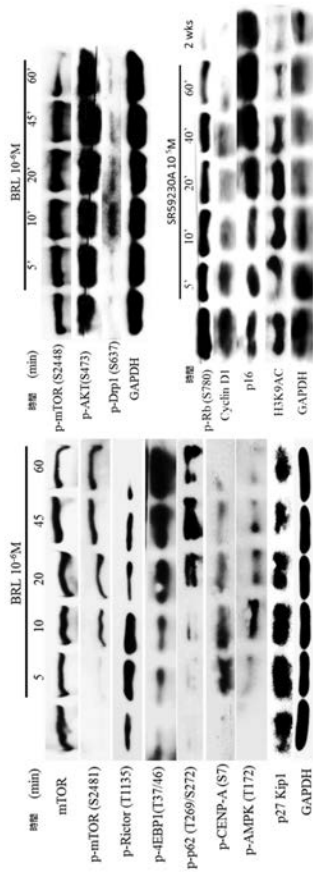
【 7 1 】



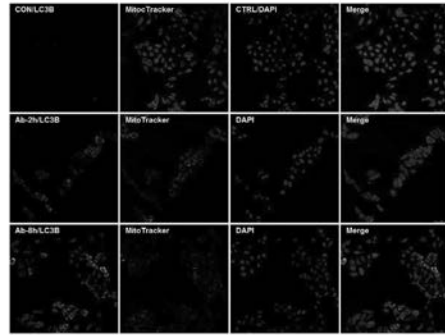
【 7 3 】



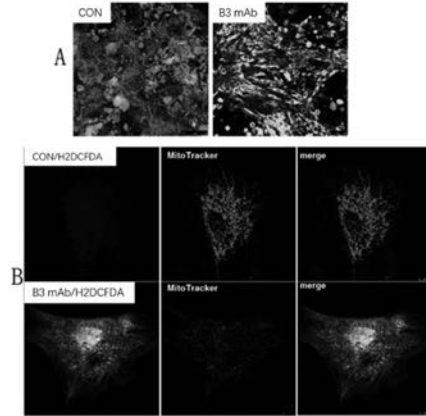
【 図 7 4 】



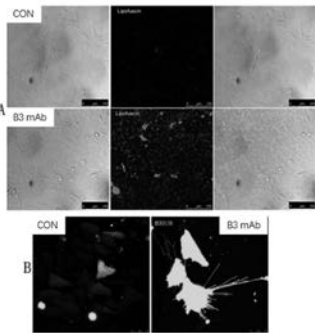
【 図 7 5 】



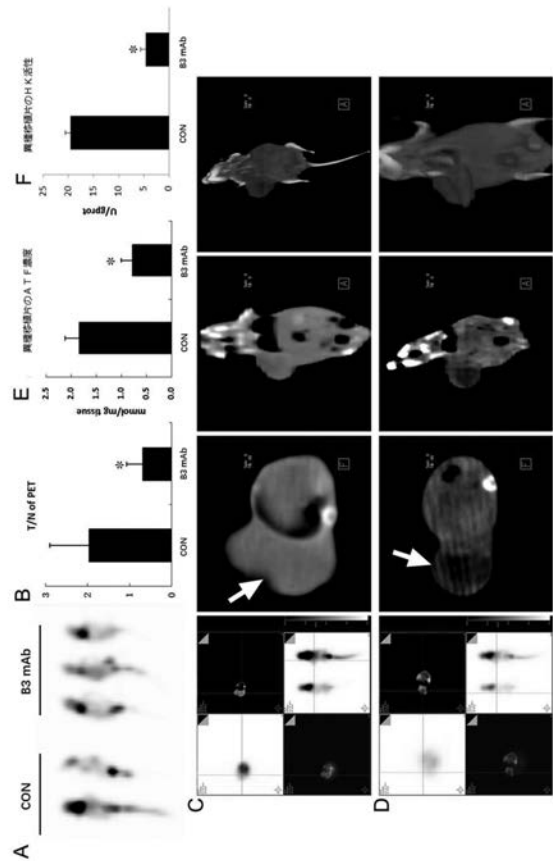
【 図 7 6 】



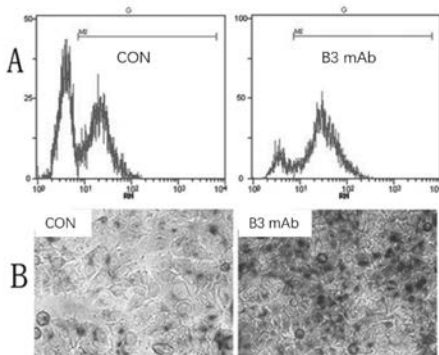
【 図 7 7 】



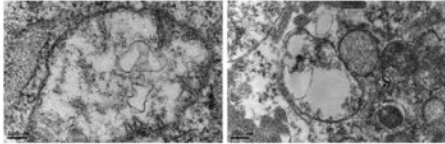
【 図 7 9 】



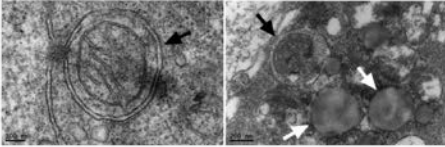
【 図 7 8 】



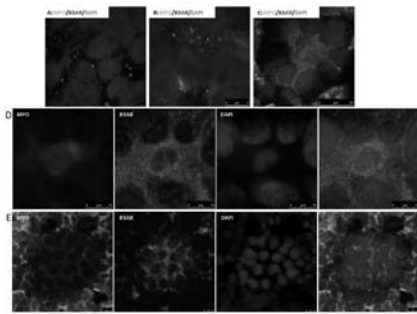
【 図 8 0 】



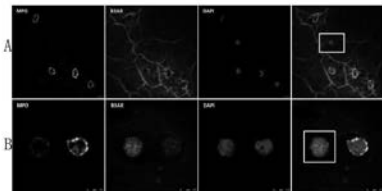
【 図 8 1 】



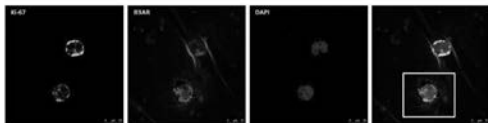
【 図 8 2 】



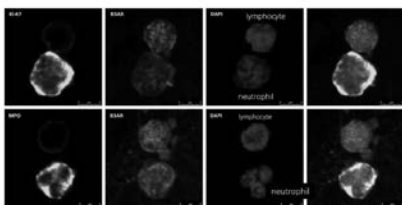
【 図 8 6 】



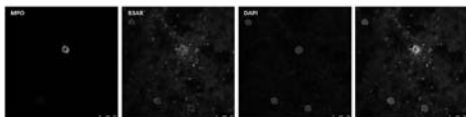
【 図 8 7 】



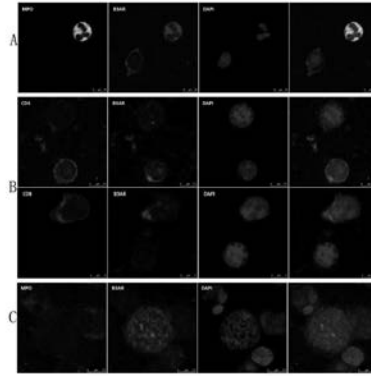
【 図 8 8 】



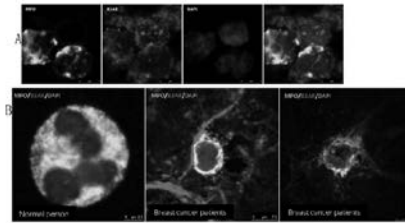
【 図 8 9 】



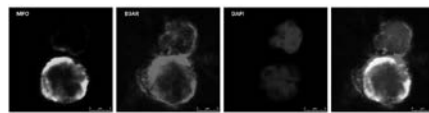
【 図 8 3 】



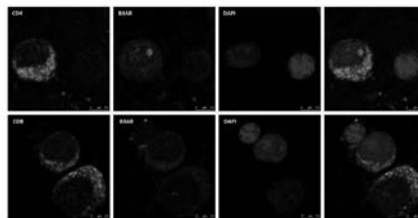
【 図 8 4 】



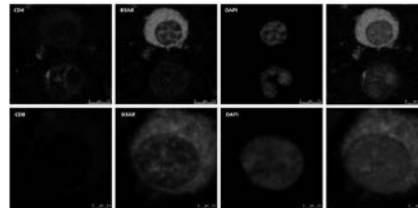
【 図 8 5 】



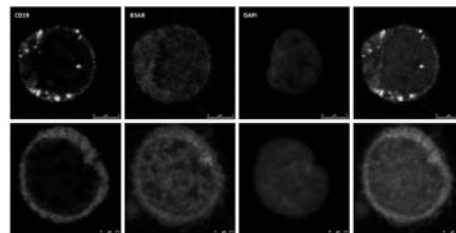
【 図 9 0 】



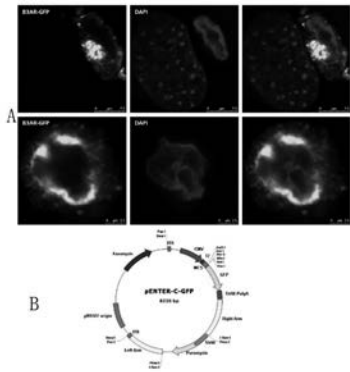
【 図 9 1 】



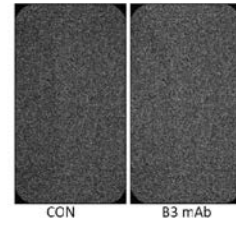
【 図 9 2 】



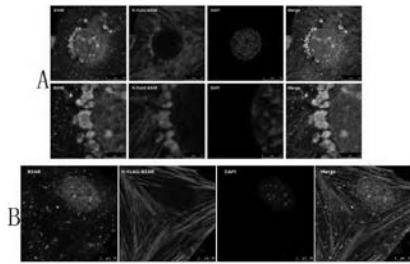
【 図 9 3 】



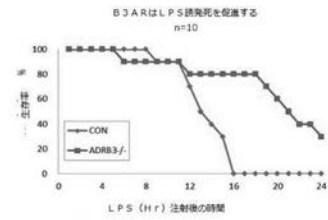
【 図 9 5 】



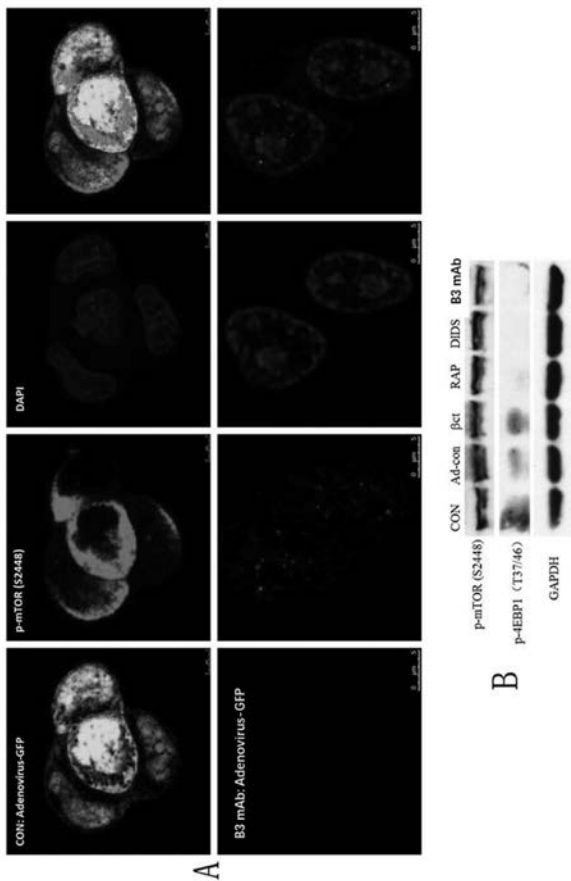
【 図 9 4 】



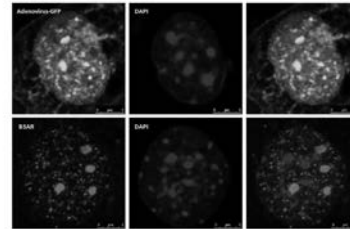
【 図 9 6 】



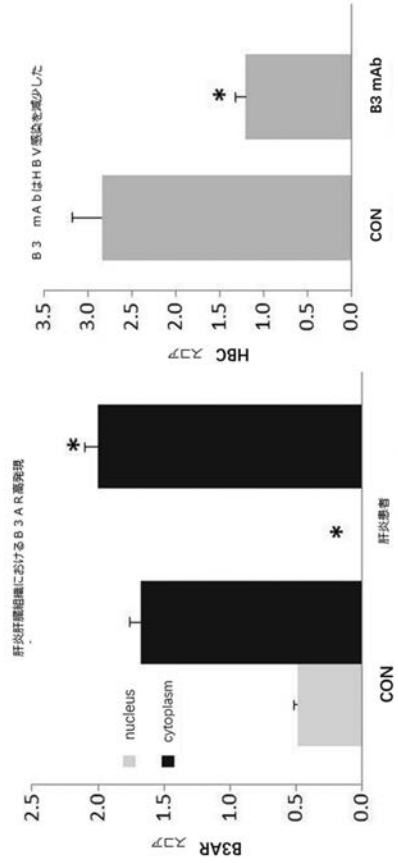
【 図 9 7 】



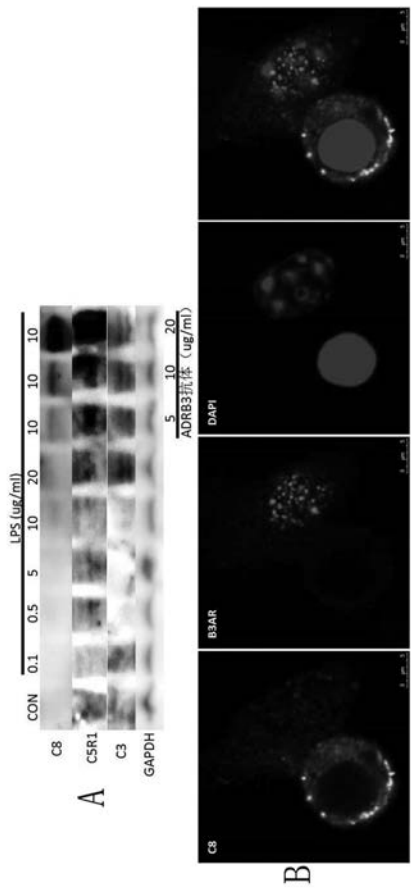
【 図 9 8 】



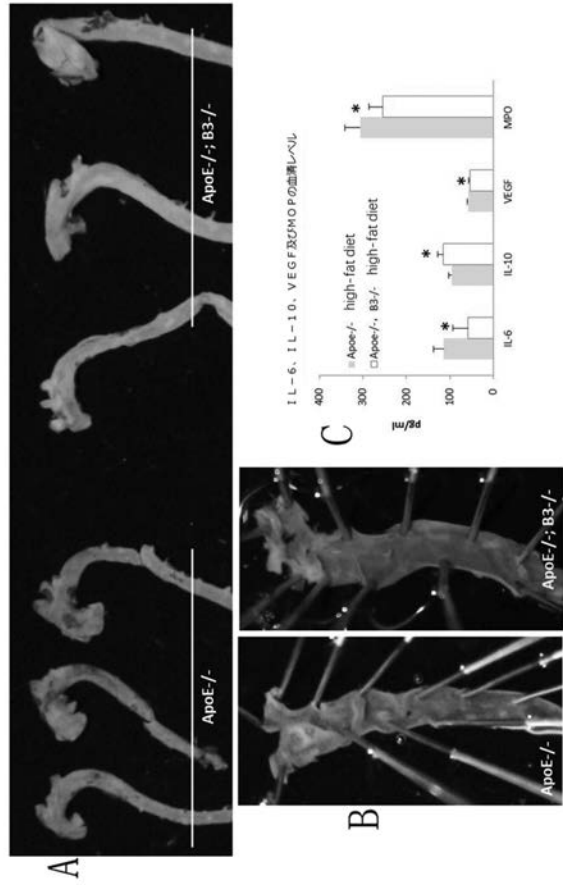
【 図 9 9 】



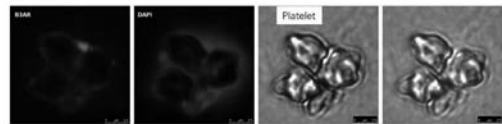
【 図 1 0 1 】



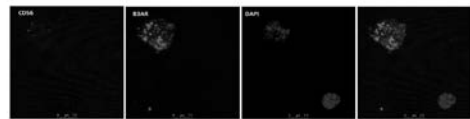
【 図 1 0 0 】



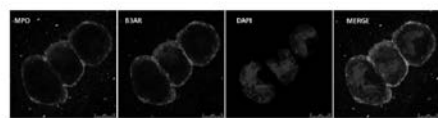
【 図 1 0 2 】



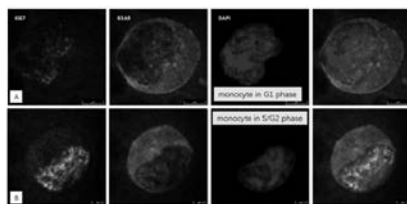
【 図 1 0 3 】



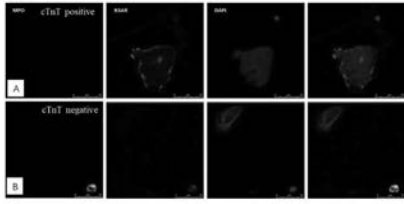
【 図 1 0 4 】



【 図 1 0 5 】



【 図 1 0 6 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 3/02	(2006.01)	A 6 1 P 3/02	
A 6 1 P 7/00	(2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 9/12	(2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 7/02	(2006.01)	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 25/18	(2006.01)	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/24	(2006.01)	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/30	(2006.01)	A 6 1 P 25/30	
A 6 1 P 25/22	(2006.01)	A 6 1 P 25/22	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 15/10	(2006.01)	A 6 1 P 15/10	
A 6 1 P 15/08	(2006.01)	A 6 1 P 15/08	
A 6 1 P 11/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 39/02	(2006.01)	A 6 1 P 39/02	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 31/10	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 33/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 9/04	(2006.01)	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 K 38/02	(2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 K 35/12	(2015.01)	A 6 1 K 38/02	
A 6 1 L 27/36	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 L 27/38	(2006.01)	A 6 1 K 35/12	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 L 27/36	4 0 0
G 0 1 N 33/577	(2006.01)	A 6 1 L 27/38	
G 0 1 N 33/574	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
		C 1 2 N 15/09	Z
		C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 林曙光

中華人民共和国広東省広州市越秀区東川路91号大院

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR77 QS28 QS33

QX01 QX02
4B064 AG27 BJ12 CA10 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13 DA14 DA20
4C081 AB11 AB18 BA12 CD34 EA02
4C084 AA01 AA02 AA07 BA44 MA66 NA14 ZA011 ZA021 ZA051 ZA121
ZA161 ZA181 ZA361 ZA371 ZA421 ZA451 ZA511 ZA541 ZA591 ZA621
ZA811 ZA961 ZB071 ZB081 ZB111 ZB131 ZB151 ZB211 ZB261 ZB321
ZB331 ZB351 ZB371 ZC021 ZC211 ZC351 ZC371 ZC391 ZC521
4C085 AA13 AA14 BB11 CC21 CC23 EE01 GG01
4C087 AA01 AA02 BB64 BB65 NA14 ZA01 ZA02 ZA05 ZA12 ZA16
ZA18 ZA36 ZA37 ZA42 ZA45 ZA51 ZA54 ZA59 ZA62 ZA81
ZA96 ZB07 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZB21 ZB26 ZB32 ZB33
ZB35 ZB37 ZC02 ZC21 ZC35 ZC37 ZC39 ZC52
4H045 AA11 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 EA34 EA50 FA72
FA74 GA26

专利名称(译)	抗人ADRB3单克隆抗体及其在诊断和治疗中的应用		
公开(公告)号	JP2018161125A	公开(公告)日	2018-10-18
申请号	JP2018058898	申请日	2018-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	郑勐 林曙光		
申请(专利权)人(译)	林曙光		
[标]发明人	郑猛 林曙光		
发明人	郑猛 林曙光		
IPC分类号	C12Q1/02 C07K14/705 C07K16/28 C07K16/46 A61P37/02 A61P37/06 A61P35/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P9/10 A61P3/10 A61P25/28 A61P25/16 A61P3/02 A61P7/00 A61P11/00 A61P9/12 A61P7/02 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/30 A61P25/22 A61P43/00 A61P15/10 A61P15/08 A61P11/06 A61P31/12 A61P37/08 A61P39/02 A61P19/02 A61P25/00 A61P31/10 A61P31/04 A61P33/00 A61P9/00 A61P9/04 A61K38/02 A61K39/395 A61K35/12 A61L27/36 A61L27/38 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/574 C12N15/09 C12P21/08		
CPC分类号	C07K14/70571 C07K16/286 C07K16/2869 C07K2317/565 G01N33/577 G01N33/68 A61K2039/505 A61P3/10 A61P15/10 A61P25/18 A61P25/36 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 C07K14/705 C07K14/7051 C07K2317/24 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2319/03 C07K2319/33 G01N33/56966 G01N33/56972 G01N33/57484 G01N33/74 G01N33/9433 G01N2333/70571 G01N2333/726 A61K39/395 C07K14/70517 C07K14/70578 C07K2319/00 G01N33/6893 G01N33/6896		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA C07K14/705 C07K16/28 C07K16/46 A61P37/02 A61P37/06 A61P35/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P9/10.101 A61P3/10 A61P25/28 A61P25/16 A61P3/02 A61P7/00 A61P11/00 A61P9/12 A61P7/02 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/30 A61P25/22 A61P43/00.105 A61P15/10 A61P15/08 A61P11/06 A61P31/12 A61P37/08 A61P39/02 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P25/00 A61P43/00.111 A61P31/10 A61P31/04 A61P33/00 A61P9/00 A61P9/04 A61K38/02 A61K39/395.N A61K35/12 A61L27/36.400 A61L27/38 G01N33/53.D G01N33/577.B G01N33/574.A C12N15/09.Z C12P21/08		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR77 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QX01 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B064/DA14 4B064/DA20 4C081/AB11 4C081/AB18 4C081/BA12 4C081/CD34 4C081/EA02 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA44 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA021 4C084/ZA051 4C084/ZA121 4C084/ZA161 4C084/ZA181 4C084/ZA361 4C084/ZA371 4C084/ZA421 4C084/ZA451 4C084/ZA511 4C084/ZA541 4C084/ZA591 4C084/ZA621 4C084/ZA811 4C084/ZA961 4C084/ZB071 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB151 4C084/ZB211 4C084/ZB261 4C084/ZB321 4C084/ZB331 4C084/ZB351 4C084/ZB371 4C084/ZC021 4C084/ZC211 4C084/ZC351 4C084/ZC371 4C084/ZC391 4C084/ZC521 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB64 4C087/BB65 4C087/NA14 4C087/ZA01 4C087/ZA02 4C087/ZA05 4C087/ZA12 4C087/ZA16 4C087/ZA18 4C087/ZA36 4C087/ZA37 4C087/ZA42 4C087/ZA45 4C087/ZA51 4C087/ZA54 4C087/ZA59 4C087/ZA62 4C087/ZA81 4C087/ZA96 4C087/ZB07 4C087/ZB08 4C087/ZB11 4C087/ZB13 4C087/ZB15 4C087/ZB21 4C087/ZB26 4C087/ZB32 4C087/ZB33 4C087/ZB35 4C087/ZB37 4C087/ZC02 4C087/ZC21 4C087/ZC35 4C087/ZC37 4C087/ZC39 4C087/ZC52 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA34 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	201710183354.8 2017-03-24 CN		

摘要(译)

甲β3肾上腺素受体 (ADRB3) 和单克隆抗体, 肿瘤 (恶性肿瘤), 炎症 (慢性全身性炎症), Umidokusho, 哮喘, 糖尿病, 多器官功能障碍综合征, 病毒感染, 由于老化的疾病, 贫血, 严重创伤, 过敏性疾病, 恶病质的疾病, 中毒, 自身免疫性疾病, 器官移植的免疫排斥反应, 肺动脉高压, 动脉粥样硬化性动脉硬化, 神经变性疾病, 退行性骨疾病, 如骨质疏松症, 提供用于应用到疾病的治疗, 例如肥大性心肌病和阿尔茨海默氏病。 甲ADRB3, 使用抗人ADRB3单克隆抗体, 或用抗ADRB3嵌合抗原受体修饰的细胞, 疾病治疗, 疾病的诊断, 用于检测药物制造或生物标记的方法。 .The 20

