

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2003/020769

発行日 平成17年2月3日(2005.2.3)

(43) 国際公開日 平成15年3月13日(2003.3.13)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 15/02
 A O 1 K 67/027
 A 6 1 K 38/00
 A 6 1 P 17/00
 A 6 1 P 37/06

F 1

C 1 2 N 15/00 C
 A O 1 K 67/027
 A 6 1 P 17/00
 A 6 1 P 37/06
 C O 7 K 14/00

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2003-525039 (P2003-525039)	(71) 出願人	899000079 学校法人慶應義塾
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/008987		東京都港区三田2丁目15番45号
(22) 国際出願日	平成14年9月4日(2002.9.4)	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(31) 優先権主張番号	特願2001-267653 (P2001-267653)	(72) 発明者	角田 和之 東京都新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部内
(32) 優先日	平成13年9月4日(2001.9.4)	(72) 発明者	天谷 雅行 東京都新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	西川 武二 東京都新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部内
(81) 指定国	EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), JP, US		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 天疱瘡モノクローナル抗体

(57) 【要約】

天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有するモノクローナル抗体や、該モノクローナル抗体が特異的に認識する天疱瘡自己免疫疾患治療薬として有用なペプチド等を提供するものである。自己抗原モデルマウスを用いて作製された尋常性天疱瘡モデルマウスの脾細胞中には抗マウスD s g 3抗体産生細胞が存在することから、かかるモデルマウスの脾細胞とマウス骨髄腫細胞をポリエチレングリコールにて細胞融合し、ハイブリドーマを作製し、D s g 3に対するモノクローナル抗体を作製し、その中から、天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有するモノクローナル抗体をスクリーニングし、その可変領域(重鎖・軽鎖)の塩基配列及びアミノ酸配列を決定し、その特異的エピトープ部分を確定する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有することを特徴とする天疱瘡モノクローナル抗体。

【請求項 2】

ヒト及びマウスのデスモグレイン (D s g) 3 に特異的に結合し、ヒトとマウスのデスモグレイン (D s g) 1 とは交叉反応性を示さないことを特徴とする天疱瘡モノクローナル抗体。

【請求項 3】

配列番号 1 又は 2 で示されるアミノ酸配列中の複数の特定のアミノ酸残基を特異的に認識 10
することを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の天疱瘡モノクローナル抗体。

【請求項 4】

複数の特定のアミノ酸残基が、配列番号 1 又は 2 の 3 番目のバリン、7 番目のリジン、8
番目のプロリンの少なくとも 1 つと、5 9 番目のアスパラギン酸であることを特徴とする
請求項 3 記載の天疱瘡モノクローナル抗体。

【請求項 5】

配列番号 4 で示されるアミノ酸配列又はこの配列において 1 もしくは複数のアミノ酸残基
が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒト D s g 3 モノクローナル F
a b 抗体の H 鎖として機能する H 鎖、及び配列番号 6 で示されるアミノ酸配列又はこの配
列において 1 もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列 20
を有し、抗ヒト D s g 3 モノクローナル F a b 抗体の L 鎖として機能する L 鎖を有するこ
とを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の天疱瘡モノクローナル抗体。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の天疱瘡モノクローナル抗体の可変領域からなる抗原結合部
位を含むことを特徴とする抗体フラグメント。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の天疱瘡モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを投
与することにより、天疱瘡病変が誘導されたことを特徴とする天疱瘡自己免疫疾患モデル
動物。

【請求項 8】

請求項 7 記載の天疱瘡自己免疫疾患モデル動物に被検物質を投与し、該モデル動物におけ
る天疱瘡自己免疫疾患の病変の程度及び／又は血清中の抗体価を評価することを特徴とす
る天疱瘡自己免疫疾患治療薬のスクリーニング方法。 30

【請求項 9】

請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の天疱瘡モノクローナル抗体又は請求項 6 記載の抗体フラグ
メントと、被検物質とを接触させ、抗体価及び／又は天疱瘡自己免疫疾患の病変の程度を
評価することを特徴とする天疱瘡自己免疫疾患治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 10】

配列番号 1 ~ 5 のいずれか記載のモノクローナル抗体により特異的に認識されるエピトー
プを含むことを特徴とするペプチド。 40

【請求項 11】

配列番号 1 又は 2 で示されるアミノ酸配列中の複数の特定のアミノ酸残基を含むペプチド
であって、天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有する天疱瘡モノクローナル抗
体が特異的に認識することを特徴とするペプチド。

【請求項 12】

複数の特定のアミノ酸残基が、配列番号 1 又は 2 の 3 番目のバリン、7 番目のリジン、8
番目のプロリンの少なくとも 1 つと、5 9 番目のアスパラギン酸であることを特徴とする
請求項 11 記載のペプチド。

【請求項 13】

天疱瘡モノクローナル抗体が、ヒト及びマウスのデスモグレイン (D s g) 3 に特異的に 50

結合し、ヒトとマウスのデスモグレイン (D s g) 1とは交叉反応性を示さないモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 1又は1 2記載のペプチド。

【請求項 1 4】

天疱瘡モノクローナル抗体が、配列番号 4 で示されるアミノ酸配列又はこの配列において 1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒト D s g 3モノクローナル F a b抗体の H鎖として機能する H鎖、及び配列番号 6 で示されるアミノ酸配列又はこの配列において 1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒト D s g 3モノクローナル F a b抗体の L鎖として機能する L鎖を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 1～1 3のいずれか記載のペプチド。

10

【請求項 1 5】

請求項 1 0～1 4のいずれか記載のペプチドを有効成分として含有することを特徴とする天疱瘡自己免疫疾患の診断薬。

【請求項 1 6】

請求項 1 0～1 4のいずれか記載のペプチドを有効成分として含有することを特徴とする天疱瘡自己免疫疾患の予防・治療薬。

【請求項 1 7】

請求項 1 0～1 4のいずれか記載のペプチドを有効成分として使用することを特徴とする天疱瘡自己免疫疾患の予防・治療方法。

【請求項 1 8】

請求項 1～5のいずれか記載の天疱瘡モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株又はそれらに由来する細胞株。

20

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有する天疱瘡モノクローナル抗体や、天疱瘡自己免疫疾患治療薬として有用な前記天疱瘡モノクローナル抗体が特異的に認識するペプチド等に関する。

背景技術

尋常性天疱瘡 (p e m p h i g u s v u l g a r i s ; P V) は、皮膚及び粘膜の自己免疫水疱形成疾患であり、組織学的には表皮内の水疱形成により特徴付けられ、免疫病理学的にはケラチノサイトの細胞表面に対する I g G 自己抗体により特徴付けられる (S t a n l e y , J . R . P e m p h i g u s . I n D e r m a t o l o g y i n G e n e r a l M e d i c i n e . I . M . F r e e d b e r g , A . Z . E i s e n , K . W o l f f , K . F . A u s t e n , L . A . G o l d e s m i t h , S . I . K a t z , a n d T . B . F i t z p a t r i c k , e d s . M c G r a w - H i l l , N e w Y o r k , 6 5 4 - 6 6 6 (1 9 9 8)) 。臨床的には、尋常性天疱瘡患者は、広範な弛緩性の水疱及びびらんを示す。これらは、あらゆる重層扁平上皮に生じうる。適当な治療を行わなければ、広範囲の皮膚に生じた病巣が体液の漏出又は二次的な細菌感染を引き起こすため、尋常性天疱瘡は致命的となることもある。コルチコステロイドの全身投与及び免疫抑制療法を用いることにより、天疱瘡の予後は改善されているが、治療の合併症による死亡のため、死亡率は依然としてかなり高い。

30

40

尋常性天疱瘡の標的抗原は、最初、ケラチノサイト抽出物の免疫沈降により、1 3 0 k D の糖タンパク質として同定された (J . C l i n . I n v e s t . 7 0 , 2 8 1 - 2 8 8 , 1 9 8 2 , J . C l i n . I n v e s t . 7 4 , 3 1 3 - 3 2 0 , 1 9 8 4) 。その後、尋常性天疱瘡抗原に特異的なアフィニティ精製自己抗体を用いて、ヒト・ケラチノサイト発現ライブラリーを免疫スクリーニングすることにより、尋常性天疱瘡抗原の c D N A が単離された (C e l l , 6 7 , 8 6 9 - 8 7 7 , 1 9 9 1) 。塩基配列の解析により、尋常性天疱瘡抗原は、細胞間接着分子のカドヘリン・スーパー遺伝子ファミリーに属することが示された。尋常性天疱瘡抗原は、デスモソームの膜タンパク質であり (J . C e l l B i o l . 1 2 2 , 4 0 9 - 4 1 5 , 1 9 9 3) 、デスモグレイン 3 (d e s m o g

50

lein3;Dsg3)と名付けられた(Adv. Dermatol. 11, 319-352, 1996)。

Dsg3タンパク質に対するIgG自己抗体が尋常性天疱瘡の病因的役割を示す証拠は多数存在する。第一に、経時的な疾患の活性が、血中抗体力価と相関していることが、間接蛍光抗体法(Br. J. Dermatol. 84, 7-13, 1971)又はELISA(J. Immunol. 159, 2010-2017, 1997、Br. J. Dermatol. 140, 351-357, 1999)により報告されている。第二に、尋常性天疱瘡を患う母親の新生児は、胎盤を介して移行した母親由来のIgGのために一時的に疾患を有する(Pediatrics 78, 1102-1105, 1986)。母親由来のIgGが異化されるにつれ、症状は軽快する。第三に、尋常性天疱瘡患者由来のIgGは、組織培養された皮膚において、補体又は炎症細胞なしに水疱形成を誘導することができる(J. Invest. Dermatol. 67, 254-260, 1976、J. Exp. Med. 157, 259-272, 1983)。第四に、患者の血清由来のIgGを新生マウスに受動移入すると、典型的な組織学的所見を伴う表皮内水疱形成が起こる(N. Engl. J. Med. 306, 1189-1196, 1982)。第五に、患者の血清を、細胞外ドメインからなる組換えDsg3タンパク質(rDsg3)を用いて免疫吸収除去すると、血清の病原性が除去され、新生マウスにおける水疱形成が阻害される(J. Clin. Invest. 94, 59-67, 1994)。最後に、rDsg3でアフィニティ精製された抗体は、抗原性を有し、新生仔マウスにおいて尋常性天疱瘡の組織学的所見を伴う水疱を形成させる(J. Clin. Invest. 90, 919-926, 1992、J. Clin. Invest. 102, 775-782, 1998)。これらの研究から、尋常性天疱瘡は、特に自己抗体生成後の過程に関しては、最もよく特徴が決定された自己免疫疾患の一つとなっている。従って、尋常性天疱瘡は、現在では、自己抗体産出又は自己寛容の破壊の細胞メカニズムを研究するため、また、疾患特異的な治療法を開発するための、臓器特異的自己免疫疾患の良い疾患モデルとされている。

本発明者らは、マウス体内において病原性抗体が産生されないのは、Dsg3タンパク質に対する自己寛容のためであるとの仮説の下、遺伝子ターゲティング技術により作製したDsg3欠損マウスは発生段階で免疫系がDsg3タンパク質に曝されず、Dsg3タンパク質に対する自己寛容を獲得していないとの知見に基づき、尋常性天疱瘡の表現型を示すマウス(PVモデルマウス)の作製方法を開発した(特願平11-91408号及び特願2001-156126号)。すなわち、Dsg3遺伝子が欠損しているマウスを、組換えDsg3タンパク質(rDsg3タンパク質)で免疫し、該免疫されたマウスから脾細胞を調製し、該調製した脾細胞をDsg3タンパク質を有するマウスに移植し、Dsg3タンパク質に反応する抗体の産生又はT細胞の活性化により、尋常性天疱瘡の表現型を示すマウスを作製する方法(特願平11-91408号)や、ナイーブなDsg3遺伝子が欠損しているマウスから調製した脾細胞を 5×10^7 細胞/匹に調整し、Dsg3タンパク質を有するマウスに移植し、Dsg3タンパク質に反応する抗体の産生又はT細胞の活性化により、尋常性天疱瘡の表現型を示すマウスを作製する方法(特願2001-156126号)である。

前記のように、尋常性天疱瘡は細胞間接着分子であるDsg3に対する自己免疫性の水疱形成疾患であり、その発症に関与する病原性を有する自己抗体はポリクローナルで、その個々の自己抗体の病原性については不明である。上記本発明者らが開発したPVモデルマウスは、病原性を有する抗Dsg3抗体によりその表現型を誘導している。そこで抗Dsg3モノクローナルな抗体を作製し、個々のモノクローナル抗体における病原性を解析することにより、尋常性天疱瘡の分子レベルでの発症機序の解明、抗原特異的な抗体除去療法の開発に有用であると考えられるが、現在まで、尋常性天疱瘡病変を誘導できるような病原性を有するモノクローナル抗体は報告されていない。本発明の課題は、尋常性天疱瘡の分子レベルでの発症機序の解明、抗原特異的な抗体除去療法の開発に有用であると考えられる天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有するモノクローナル抗体や、該モノクローナル抗体が特異的に認識する天疱瘡自己免疫疾患治療薬として有用であると考え

10

20

30

40

50

られるペプチド等を提供することにある。

発明の開示

病原性を有する自己抗体の産生誘導はその自己抗原に対する免疫寛容が存在し困難であった。しかし、自己抗原モデルマウスを用いて作製されたP V（尋常性天疱瘡）モデルマウスの脾細胞中には抗マウスD s g 3抗体産生細胞が存在する。そこで本発明者らは、上記モデルマウス脾細胞とマウス骨髄腫細胞をポリエチレングリコール（P E G）にて細胞融合し、ハイブリドーマを作製し、D s g 3に対するモノクローナル抗体の作製を行い、数多く作製したこれらのモノクローナル抗体の中から、天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有するモノクローナル抗体をスクリーニングし、その可変領域（重鎖・軽鎖）の塩基配列及びアミノ酸配列を決定し、その特異的エピトープ部分を確認し、本発明を完成するに至った。

10

すなわち本発明は、天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有することを特徴とする天疱瘡モノクローナル抗体（請求項1）や、ヒト及びマウスのデスマグレイン（D s g）3に特異的に結合し、ヒトとマウスのデスマグレイン（D s g）1とは交叉反応性を示さないことを特徴とする天疱瘡モノクローナル抗体（請求項2）や、配列番号1又は2で示されるアミノ酸配列中の複数の特定のアミノ酸残基を特異的に認識することを特徴とする請求項1又は2記載の天疱瘡モノクローナル抗体（請求項3）や、複数の特定のアミノ酸残基が、配列番号1又は2の3番目のバリン、7番目のリジン、8番目のプロリンの少なくとも1つと、59番目のアスパラギン酸であることを特徴とする請求項3記載の天疱瘡モノクローナル抗体（請求項4）や、配列番号4で示されるアミノ酸配列又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトD s g 3モノクローナルF a b抗体のH鎖として機能するH鎖、及び配列番号6で示されるアミノ酸配列又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトD s g 3モノクローナルF a b抗体のL鎖として機能するL鎖を有することを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の天疱瘡モノクローナル抗体（請求項5）や、請求項1～5のいずれか記載の天疱瘡モノクローナル抗体の可変領域からなる抗原結合部位を含むことを特徴とする抗体フラグメント（請求項6）に関する。

20

また本発明は、請求項1～5のいずれか記載の天疱瘡モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを投与することにより、天疱瘡病変が誘導されたことを特徴とする天疱瘡自己免疫疾患モデル動物（請求項7）や、請求項7記載の天疱瘡自己免疫疾患モデル動物に被検物質を投与し、該モデル動物における天疱瘡自己免疫疾患の病変の程度及び／又は血清中の抗体価を評価することを特徴とする天疱瘡自己免疫疾患治療薬のスクリーニング方法（請求項8）や、請求項1～5のいずれか記載の天疱瘡モノクローナル抗体又は請求項6記載の抗体フラグメントと、被検物質とを接触させ、抗体価及び／又は天疱瘡自己免疫疾患の病変の程度を評価することを特徴とする天疱瘡自己免疫疾患治療薬のスクリーニング方法（請求項9）や、配列番号1～5のいずれか記載のモノクローナル抗体により特異的に認識されるエピトープを含むことを特徴とするペプチド（請求項10）や、配列番号1又は2で示されるアミノ酸配列中の複数の特定のアミノ酸残基を含むペプチドであって、天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有する天疱瘡モノクローナル抗体が特異的に認識することを特徴とするペプチド（請求項11）や、複数の特定のアミノ酸残基が、配列番号1又は2の3番目のバリン、7番目のリジン、8番目のプロリンの少なくとも1つと、59番目のアスパラギン酸であることを特徴とする請求項11記載のペプチド（請求項12）や、天疱瘡モノクローナル抗体が、ヒト及びマウスのデスマグレイン（D s g）3に特異的に結合し、ヒトとマウスのデスマグレイン（D s g）1とは交叉反応性を示さないモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項11又は12記載のペプチド（請求項13）や、天疱瘡モノクローナル抗体が、配列番号4で示されるアミノ酸配列又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトD s g 3モノクローナルF a b抗体のH鎖として機能するH鎖、及び配列番号6で示されるアミノ酸配列又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残

30

40

50

基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトD s g 3モノクローナルF a b抗体のL鎖として機能するL鎖を有するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項11～13のいずれか記載のペプチド（請求項14）や、請求項10～14のいずれか記載のペプチドを有効成分として含有することを特徴とする天疱瘡自己免疫疾患の診断薬（請求項15）や、請求項10～14のいずれか記載のペプチドを有効成分として含有することを特徴とする天疱瘡自己免疫疾患の予防・治療薬（請求項16）や、請求項10～14のいずれか記載のペプチドを有効成分として使用することを特徴とする天疱瘡自己免疫疾患の予防・治療方法（請求項17）や、請求項1～5のいずれか記載の天疱瘡モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株又はそれらに由来する細胞株（請求項18）に関する。

10

発明を実施するための最良の形態

本発明の天疱瘡モノクローナル抗体としては、尋常性天疱瘡等の天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有するモノクローナル抗体やヒト及びマウスのD s g 3に特異的に結合し、ヒトとマウスのD s g 1とは交叉反応性を示さないモノクローナル抗体であれば特に制限されるものではなく、ここで、天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性とは、被毛の脱毛、体重減少、病理組織学的に基底層直上の水疱形成等の病変を誘導することが可能な病的活性をいう。上記天疱瘡モノクローナル抗体としては、ヒト及びマウスのD s g 3に特異的に結合し、ヒトとマウスのD s g 1とは交叉反応性を示さず、天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有する抗D s g 3モノクローナル抗体や、マウスのD s g 3に特異的に結合し、マウスのD s g 1とは交叉反応性を示さず、天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有する抗D s g 3モノクローナル抗体や、ヒトのD s g 3に特異的に結合し、ヒトのD s g 1とは交叉反応性を示さず、天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有する抗D s g 3モノクローナル抗体が好ましく、また、配列番号1又は2で示されるアミノ酸配列中の複数の特定のアミノ酸残基、例えば、配列番号1又は2の3番目のバリン、7番目のリジン、8番目のプロリンの少なくとも1つと、59番目のアスパラギン酸、を特異的に認識する天疱瘡モノクローナル抗体や、配列番号4で示されるアミノ酸配列又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトD s g 3モノクローナルF a b抗体のH鎖として機能するH鎖、及び配列番号6で示されるアミノ酸配列又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトD s g 3モノクローナルF a b抗体のL鎖として機能するL鎖を有する抗D s g 3モノクローナル抗体を好適に例示することができ、より具体的には、実施例においてA K 2 3と表記されているアイソタイプI g G 1 κ のモノクローナル抗体を挙げることができるが、異なるアイソタイプのモノクローナル抗体や1本鎖抗体であってもよい。

20

30

上記本発明の天疱瘡モノクローナル抗体の製造方法としては、ハイブリドーマ法（Nature 256, 495-497, 1975）、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Immunology Today 4, 72, 1983）及びEBV-ハイブリドーマ法（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985）など任意の方法における慣用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外）にD s g 3タンパク質に対する抗体を産生させる方法を挙げることができるが、この場合、配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるペプチドを用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用することが好ましい。また、配列番号3で示されるH鎖可変領域をコードするDNAや、配列番号5で示されるL鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列情報に基づいて、例えば、公知のヒト化抗体の作製方法（例えば、Nature, 322, 323-327, 1988; Science, 239, 1534-1536, 1988; Protein Engng. 4, 773-783, 1991; Human Antibodies and Hybridoma, 2, 124-134, 1991; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4181-4185, 1991; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289, 1992; J. Immunol

40

50

147, 1149-1154, 1992; Cancer Res. 53, 1-6, 1993) に準じて、組換えDNA技術により、本発明の天疱瘡モノクローナル抗体やヒト化天疱瘡モノクローナル抗体を作製することもできる。

本発明の抗体フラグメントとしては、上記本発明の天疱瘡モノクローナル抗体の可変領域からなる抗原結合部位を含む抗体フラグメントであれば特に制限されるものではなく、かかる抗体フラグメントとしては、モノクローナル抗体をペプシンで消化して得られるF(a b')₂ や、F(a b')₂ を還元して得られるF a b' や、モノクローナル抗体をパインで消化して得られるF a bなどを例示することができる。上記天疱瘡モノクローナル抗体の可変領域としては、配列番号4で示されるアミノ酸配列又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトD s g 3モノクローナルF a b抗体のH鎖として機能するH鎖可変領域や、配列番号6で示されるアミノ酸配列又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトD s g 3モノクローナルF a b抗体のL鎖として機能するL鎖可変領域を具体的に例示することができる。このように、抗体の抗原結合部位を含む一次構造がわかると三次構造を予測することができ、抗体エピトープ部の窪みを塞ぐ物質の分子モデルを構築することが可能になる。本発明の抗体フラグメントは、配列番号3で示されるH鎖可変領域をコードするDNAや、配列番号5で示されるL鎖可変領域をコードするDNAの塩基配列情報に基づいて、あるいは、配列番号4で示されるH鎖可変領域や、配列番号6で示されるL鎖可変領域のアミノ酸配列情報に基づいて、常法により作製することができる。

本発明の天疱瘡モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株又はそれらに由来する細胞株としては、天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有するモノクローナル抗体を産生することができる細胞株であれば特に制限されるものではなく、かかる天疱瘡モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞株は、P Vモデルマウスに内在するD s g 3タンパク質に対する抗体を産生する動物(好ましくはヒト以外)の脾細胞と当該動物由来の骨髄腫細胞とを、常法により細胞融合させ、H A T培地で選択したハイブリドーマの中から、該ハイブリドーマが分泌するモノクローナル抗体が配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるペプチド標識化物に対して特異的に免疫反応することができるものをスクリーニングすること等により作出することができる。また、かかる天疱瘡モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞株又はそれらに由来する細胞株を、インビボ又はインビトロで常法により培養することにより本発明の天疱瘡モノクローナルモノクローナル抗体を生産することができ、例えば、インビボ系においては、マウス又はラット等の齧歯目動物、好ましくはハイブリドーマと由来を同じくする齧歯目動物の腹腔内で培養することにより、またインビトロ系においては、動物細胞培養用培地で培養することにより、天疱瘡モノクローナル抗体を得ることができる。インビトロ系でハイブリドーマを培養するための培地としては、ストレプトマイシンやペニシリン等の抗生物質を含むR P M I 1 6 4 0又はM E M等の細胞培養培地を例示することができる。

本発明の天疱瘡自己免疫疾患モデル動物としては、本発明の天疱瘡モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを投与することにより、天疱瘡病変が誘導されたマウス等の非ヒト動物であれば特に制限されるものではなく、例えば、天疱瘡モノクローナル抗体産生ハイブリドーマをマウス等の腹腔内に注入すると、ハイブリドーマにより産生される天疱瘡モノクローナル抗体により、マウス等の非ヒト動物には、エピトープ特異的に天疱瘡病変が誘導されることになる。かかる天疱瘡病変が誘導された天疱瘡自己免疫疾患モデル動物に被検物質を投与し、該モデル動物における被毛の脱毛、体重減少、病理組織学的に基底層直上の水疱形成等の天疱瘡自己免疫疾患の病変の程度を対照と比較評価することにより、あるいはモデル動物における血清中の抗体価を免疫沈降法やE L I S A等により測定し、対照と比較評価することにより、天疱瘡自己免疫疾患治療薬のスクリーニングをすることができる。上記投与方法としては、特に制限されるものではないが、静注や経口投与を挙げることができる。

本発明の天疱瘡自己免疫疾患治療薬のスクリーニング方法としては、上記天疱瘡自己免疫

10

20

30

40

50

疾患モデル動物を用いる方法の他に、本発明の天疱瘡モノクローナル抗体又は本発明の抗体フラグメントと被検物質とを接触させ、インビボ及び／又はインビトロにおける抗体価を対照と比較評価する方法や、天疱瘡自己免疫疾患の病変の程度を対照と比較評価する方法を挙げることができ、インビボにおける評価方法としては、あらかじめ抗体又は抗体フラグメントを被検物質と接触させたものをマウス等の非ヒト動物に投与するか、あるいは抗体又は抗体フラグメントと被検物質を順不同でマウス等の非ヒト動物に投与して生体内で接触させた後、血清中の抗体価を免疫沈降法やE L I S Aにより測定する方法や、天疱瘡自己免疫疾患の病変の程度を対照と比較評価する方法を挙げることができ、インビトロにおける評価方法としては、抗体又は抗体フラグメントと被検物質とをインビトロで接触させた後、免疫沈降法やE L I S Aにより抗体価を測定し、対照と比較評価する方法を挙げることができ

本発明のペプチドとしては、前記本発明のモノクローナル抗体により特異的に認識されるエピトープを含むペプチドであれば特に制限されるものではなく、配列番号1又は2で示されるアミノ酸配列中の複数の特定のアミノ酸残基、例えば、配列番号1又は2の3番目のバリン、7番目のリジン、8番目のプロリンの少なくとも1つと、59番目のアスパラギン酸、を含むペプチドであって、天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有する天疱瘡モノクローナル抗体、好ましくはヒト及びマウスのD s g 3に特異的に結合し、ヒトとマウスのD s g 1とは交叉反応性を示さないモノクローナル抗体や、配列番号4で示されるアミノ酸配列又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトD s g 3モノクローナルF a b抗体のH鎖として機能するH鎖、及び配列番号6で示されるアミノ酸配列又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトD s g 3モノクローナルF a b抗体のL鎖として機能するL鎖を有するモノクローナル抗体が特異的に認識するペプチドの他、D s g 3を特異的に認識する抗体とD s g 3分子上のエピトープとの関係がD s g 1にも基本的に共通することから、D s g 1の上記D s g 3のエピトープに相当するペプチドを挙げることができ、かかる本発明のペプチドは、通常、合成ペプチドであり、これらペプチドは、そのアミノ酸配列情報や、該ペプチドをコードするDNAの塩基配列情報に基づいて、常法により作製することができる。これら本発明のペプチドの中でも、天疱瘡自己免疫疾患の病態を顕著に改善しうる治療薬として有用なペプチドが特に好ましい。

上記本発明のペプチドは、前記A K 2 3等の天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有する天疱瘡モノクローナル抗体のエピトープと考えられることから、本発明のペプチドを有効成分として含有するものは、天疱瘡自己免疫疾患の診断薬や、天疱瘡自己免疫疾患治療薬・予防薬として有用である。かかる本発明のペプチドエピトープを用いて、単一エピトープに対する抗体価を測定できるようなsingle e p t o p e E L I S Aを構築できれば、病勢に対する絶対評価ができるE L I S Aスコアを得ることができ、重症度判定等の天疱瘡自己免疫疾患の診断に大きく役立つことになる。また、このエピトープに対する自己抗体を特異的に除く、あるいはその抗体を産生するB細胞を特異的に除去することにより、重症型の天疱瘡に対する有効な治療法の開発が期待される。上記本発明の天疱瘡自己免疫疾患予防・治療薬には、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、p H緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。またこれら予防若しくは治療剤は、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。

また、本発明のペプチドを、天疱瘡自己免疫疾患予防・治療用の機能性食品素材又は食品の有効成分とすることもできる。かかる食品素材又は食品としては、ヨーグルト、ドリンクヨーグルト、ジュース、牛乳、豆乳、酒類、コーヒー、紅茶、煎茶、ウーロン茶、スポーツ飲料等の各種飲料や、プリン、クッキー、パン、ケーキ、ゼリー、煎餅などの焼き菓

子、羊羹などの和菓子、冷菓、チューインガム等のパン・菓子類や、うどん、そば等の麺類や、かまぼこ、ハム、魚肉ソーセージ等の魚肉練り製品や、チーズ、バター等の乳製品や、みそ、しょう油、ドレッシング、マヨネーズ、甘味料等の調味料や、豆腐、こんにゃく、その他佃煮、餃子、コロッケ、サラダ等の各種総菜を挙げることができる。

以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例A [方法と材料]

A-1 (rDsg3抗原蛋白の作製とELISA)

文献(J. Immunol., 159, 2010-2017, 1997)記載のとおり
 10 作製したバキュロウイルスベクター、pEVmod-Dsg3-His及びpEVmod-Dsg1-His、並びにpEVmod-mouseDsg3-His及びpEVmod-mouseDsg1-Hisを用いた。これら組換えバキュロウイルスを昆虫細胞High Five (invitrogen社製)に感染させ、組換え蛋白ヒトDsg3-His及びDsg1-His、並びに組換え蛋白マウスDsg3-His及びDsg1-Hisを培養液中よりそれぞれ回収した。また、これら組換え蛋白の精製はNi-NTAカラムを用いて行った。これら精製された組換え蛋白をELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)プレートにそれぞれコートし、抗Dsg3モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清を各ウェルに50µlずつ入れ、文献(J. Clin Invest, 105, 625-631, 2000)記載のと
 20 おりにELISA法を実施した。抗体価が中等度のPVモデルマウス1血清を陽性コントロール、正常マウス血清の1血清を陰性コントロールとして選択した。波長450nmにて吸光度を測定し(Bio-rad, Hercules, CA, USA)、次式で計算しIndex表示した。

$$\text{Index} = \{ \text{OD} (\text{検体}) - \text{OD} (\text{陰性コントロール}) \} / \{ \text{OD} (\text{陽性コントロール}) - \text{OD} (\text{陰性コントロール}) \} \times 100$$

A-2 (培養マウス角化細胞PAM212を用いた Living cell staining)

培養マウス角化細胞PAM212 (Cancer research, 40, 4694-4703, 1980)を8ウェルのChamber slide (Nalge Nunc International, USA)にて培養した。培養液を30倍希釈したPVモデルマウス血清あるいはハイブリドーマ培養上清に置換し、37℃、5%CO₂インキュベーターにて30分間培養した。氷上にてPBSで洗浄(3回)後、100%メタノールを加え-20℃で20分間固定した。PBSで洗浄(3回)後、100倍希釈したFITC標識ヤギ抗マウスIgG (DAKO A/S, Glostrup, Denmark)を加え、室温で30分反応後PBSで洗浄(3回)し、蛍光顕微鏡(Eclipse E800, NIKON Corp. Tokyo, Japan)にて検鏡した。

A-3 (PVモデルマウスの作製)

Dsg3ノックアウト(-/-)マウス(The Jackson laboratory, Bar Harbor, Maine, USA)は129/SV(H-2^b)とC57BL/6J(H-2^b)の遺伝子背景を有するマウスを使用した。レシピエントマウスとして用いたRag (Recombinase activating gene) 2^{-/-}マウス(Taconic Farms, Germantown, New York USA) (Shinkai, Y. et al.: RAG-2 deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. Cell, 68:855-867, 1992.)はB6.SJL-ptpr^cに10代戻し交配したマウスを使用した。Dsg3^{-/-}マウスの免疫は初回、組換えマウスDsg3-His (5µg/mouse)と完全フロイントアジュバントを皮下に注射した。初回免疫より7、14日後に組換えマウスDsg3-His (5µg/mouse)と不完全フロイントアジュバントを腹腔内に注射した。さらに21日後とマウス脾細胞移植4日前に組換
 50

えマウスDsg3-His (5 μ g/mouse) 単独を腹腔内に注射し免疫した。Dsg3^{-/-}マウス脾細胞 1×10^7 をPBS (Phosphate Buffered Saline) 500 μ l中に懸濁し、Rag2^{-/-}マウス尾静脈より静注した。脾細胞移植30日後に肉眼的な被毛の脱毛と血清学的にレシピエントマウス血清を採取し、マウスDsg3-Hisを抗原としたELISA法と Living cell stainingにて抗マウスDsg3抗体産生を確認した。

A-4 (モノクローナル抗体の作製)

肉眼的な表現型及び抗Dsg3抗体を有するPVモデルマウスの脾細胞とマウス骨髓腫細胞株P3を1:5に調整し、ポリエチレングリコール4000を用いて細胞融合を行った。細胞融合終了後、プレート当たり 1×10^7 の細胞をHAT (hypoxanthine aminopterin thymidine) 培地-10%HCF (hybridoma cloning factor) (IGEN International, Inc., Gaithersburg, MD, USA.) 中に懸濁し96ウェル平底プレートに100 μ l/ウェルで分注した。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培養器中で10~14日間培養した。コロニー陽性のウェルより培養上清50 μ lを採取し、マウスDsg3を用いたELISAにて1次スクリーニングを実施した。1次スクリーニング陽性のハイブリドーマを、培養マウス角化細胞PAM212を用いたliving cell stainingにて2次スクリーニングを行った。陽性クローンを24ウェルプレート中でHT (hypoxanthine thymidine) 培地-5%HCFにて培養した。最終的に培養液をRPMI1640培地-10%ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum: FBS, Hyclone, Utah, USA) にて培養した。それらのハイブリドーマを96ウェルプレート (Coaster, New York, USA) にウェル当たり1細胞に調整し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培養器中で培養した。10~14日後、コロニー陽性のウェルの培養上清をマウスDsg3を用いたELISAとliving cell stainingにてスクリーニングし、計3回のクローニングを行い、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを樹立した。アイソタイプはマウスモノクローナル抗体アイソタイプングキット (Iso Stori p, Roche, Mannheim, Germany) を用いて決定した。

A-5 (間接蛍光抗体法)

C57B1/6Jマウス口蓋粘膜、肝臓及びヒト皮膚をOCTコンパウンド (SAKURA, USA) で包埋後、凍結し5 μ m厚で薄切し基質を作製した。各ハイブリドーマ培養上清を室温で1時間反応後、PBSで洗浄 (3回) し、100希釈FITC標識ヤギ抗マウスIgG (DAKO A/S, Glostrup, Denmark) を室温にて60分反応後、PBSにて洗浄 (3回) し、蛍光顕微鏡にて検鏡した。

A-6 (免疫沈降法と免疫ブロット法)

各モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ培養上清200 μ lとマウスDsg3-His 20 μ gを混合し、振盪しながら室温で1時間反応させた。次にプロテインG (Protein G sepharose 4 fast flow: Amersham pharmacia biotech, buckinghamshire, England) を10 μ l加え4 $^{\circ}$ Cで1晩反応させた。反応後遠心し、沈殿に50 μ lのSDSを加え2分間煮沸した。各サンプルを7.5%電気泳動用均一ゲルプレート (マルチゲル7.5: Daiishi pure chemicals, Tokyo, Japan) にて泳動後PVDF膜に転写しブロッキングした。次に100倍希釈した抗6 \times ヒスチジン抗体 (R&D systems, Inc. Minneapolis, USA) を室温で1時間反応させた後、TBS (Tris buffered saline) にて洗浄 (3回) し、次いで1000倍希釈アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG (Alkaline phosphatase-goat anti-mouse IgG, Zymed, San Francisco, CA, USA) を室温で1時間反応させた後TBSにて洗浄 (3回) し、発色させた。

A-7 (モノクローナル抗体の精製)

10

20

30

40

50

RPMI 1640培養液中でハイブリドーマを大量培養し、培養上清を以下のごとくプロテインAカラムにて濃縮精製した。培養上清に3MのNaCl及び50mMのTris-Cl (pH8.0)を加えて遠心した後、0.45 μ mのフィルターにて濾過した。組換えプロテインA 5ml (HiTrap rProteinA FF:Amersham pharmacia biotech, buckinghamshire, England)を充填したカラムにて抗体を結合させ、3MのNaClを含む50mM Tris-Cl (pH8.0)にてカラムを洗浄し、1MのCH₃COONa (pH5.0)にて抽出した。抽出後、脱塩カラム HiTrap Desalting (Amersham pharmacia biotech, buckinghamshire, England)にて緩衝液をPBSに交換し、蛋白濃度はOD280 (1.4OD=1mg/ml)で測定した。 10

A-8 (落葉状天疱瘡患者血清の濃縮)

臨床的、病理組織学的に落葉状天疱瘡 (PF:Pemphigus foliaceus)の特徴を有し、血清学的に間接蛍光抗体法及びELISA法にてPFと診断された1患者血清を選択した。患者血清は40%飽和硫酸アンモニウム (SAS:Saturated Ammonium Sulfate)にて蛋白を沈殿させ、遠心後沈殿をPBSに溶解し100倍量のPBSにて緩衝液を交換した(3回)。さらにCentriprep (Millipore, MA, USA)にて10倍濃度(20mg/ml)に濃縮した。

A-9 (モノクローナル抗体の病原性の確認)

モノクローナル抗体の病原性の確認は、新生仔マウスへの抗体の移入と、Rag2^{-/-}免疫不全マウスへのハイブリドーマの接種により行った。まず、モノクローナル抗体と同時に移入したPF患者血清(20mg/ml)は、5 μ l、10 μ l、20 μ lを単独で移入し、肉眼的、病理組織学的に水疱の形成が認められない量を決定した。同様にETA (Exfoliative toxin A)を用いて(Nature Medicine, 6, 1275-1277, 2000)、それ単独では病変を誘導しない程度の量を決定した。新生仔マウスへの移入は、モノクローナル抗体単独(30~300 μ g/150 μ l/mouse)とモノクローナル抗体と病変を誘導しない量のPF患者血清(1mg/5 μ l/mouse)の同時移入(計150 μ l/mouse)と、モノクローナル抗体とそれ単独では病変を誘導しない程度のETA(計150 μ l/mouse)の3種類の組み合わせで実施した。150 μ lの注射液を生後24時間以内のICR (Sanky o labo service, Tokyo, Japan)、体重1.6~1.8gの新生仔マウスの肩胛骨間にインスリン用シリンジポンプを用いて皮下注射した。注射後18~24時間で断頭し組織を採取した。皮膚と頭部の切片は10%PBS緩衝ホルマリンで病理組織検査用に固定した。病理組織学的には、採取した1匹のマウスあたり作製した病理切片数と切片中の水疱形成数(断端部、連続部)をカウントした。免疫不全マウスを用いた病原性の確認はRag2^{-/-}マウスを用いて行った。生後4週齢以上のRag2^{-/-}マウス腹腔内に500 μ lのプリスタン(2, 6, 10, 14-Tetramethyl-pentadecane, Wako, Osaka, Japan)を注射し、1週間後に 1×10^7 以上のハイブリドーマを接種した。接種後7~10日で肉眼的な被毛の脱毛、免疫組織学的に直接蛍光抗体法にて口蓋粘膜、足底部皮膚での抗体の沈着、および病理組織学的に口蓋部での水疱形成の有無を検討した。 30 40

A-10 (直接蛍光抗体法)

新生仔マウス皮膚、頭部組織切片をOCTコンパウンドにて包埋し、凍結後5 μ m厚で薄切片を作製した。100倍希釈、FITC標識ヤギ抗マウスIgG(DAKO A/S, Glostrup, Denmark)を室温にて60分反応後、PBSにて洗浄(3回)し、蛍光顕微鏡にて検鏡した。

A-11 (Dsg1とDsg3とのドメインスワップ分子の作製)

モノクローナル抗体のDsg3分子上におけるエピトープを解析するために、Dsg1あるいはDsg3の細胞外領域を、それぞれ相当するDsg3あるいはDsg1領域に置換する方法で、ヒトDsg3とヒトDsg1とのドメインスワップ分子を8種類作製した。 50

そのうち、5種類のドメインスワップ分子はN末端領域にDsg3のフラグメントを有するもの(Dsg3¹⁻⁸⁸/Dsg1⁸⁹⁻⁴⁹⁶、Dsg3¹⁻⁶³/Dsg1⁶³⁻⁴⁹⁶、Dsg3¹⁻³⁴/Dsg1³⁵⁻⁴⁹⁶、Dsg3¹⁻²⁶/Dsg1²⁶⁻⁴⁹⁶、Dsg3¹⁻¹⁰/Dsg1¹¹⁻⁴⁹⁶)で、3種類はN末端領域にDsg1のフラグメントを有するもの(Dsg1¹⁻⁸⁷/Dsg3⁸⁷⁻⁵⁶⁶、Dsg1¹⁻⁶⁴/Dsg3⁶⁵⁻⁵⁶⁶、Dsg1¹⁻²⁴/Dsg3²⁵⁻⁵⁶⁶)である。Dsg1及びDsg3の多様な領域に対するcDNAを、pEVmod-PVlg(ジェンバンクアクセッション番号M76482)(J. Clin. Invest. 94, 59, 1994)及びpKS-Dsg1(ジェンバンクアクセッション番号X56654)をそれぞれ鋳型として使用し、表1記載のプライマー(配列番号7~28に示される塩基配列をそれぞれ有するプライマー1~22)を用いてPCRにより増幅した。天疱瘡自己抗体エピトープを小さくするため、C末端にHisタグを含む8種類のドメインスワップキメラ構造物をそれぞれ構築した(図4)。

残基1-87、1-64/1-24、89-496/63-496/26-496/35-496、11-496からなるDsg1断片のPCR産物をそれぞれBglII/AatII、BglII/SpeI、AatII/SalI、SpeI/SalI、NcoI/XhoIで分解した。残基1-88、1-63/1-10、1-34/1-26、87-566/65-566/25-566からなるDsg3断片のPCR産物をそれぞれBglII/AatII、BglII/SpeI、NcoI/EcoRI、AatII/XhoI、SpeI/XhoIで分解した。その結果得られた産物をBglII/XhoIで分解し、発現ベクターpEVmod-His(J. Immunol. 159, 2010, 1997)に結紮した(Dsg3¹⁻⁸⁸/Dsg1⁸⁹⁻⁴⁹⁶、Dsg3¹⁻⁶³/Dsg1⁶³⁻⁴⁹⁶、Dsg3¹⁻²⁶/Dsg1²⁶⁻⁴⁹⁶、Dsg1¹⁻⁸⁷/Dsg3⁸⁷⁻⁵⁶⁶、Dsg1¹⁻⁶⁴/Dsg3⁶⁵⁻⁵⁶⁶、Dsg1¹⁻²⁴/Dsg3²⁵⁻⁵⁶⁶)。また、得られた産物を発現ベクターpQE vector(QIAGEN, Hilden, Germany)に結紮した(Dsg3¹⁻³⁴/Dsg1³⁵⁻⁴⁹⁶、Dsg3¹⁻¹⁰/Dsg1¹¹⁻⁴⁹⁶)。これら発現ベクターに導入されたはドメインスワップキメラ構造物をバキュロウイルス発現系にて分泌型蛋白として発現させ、ドメインスワップ分子を作製した。

表 1

Table 1. Primers used for domain swapped human Dsg molecules

Constructs	Primers for hDsg1		Primers for hDsg3	
	5' primers	3' primers	5' primers	3' primers
Dsg1 ¹⁻²⁴ /Dsg3 ²⁵⁻⁵⁶⁶	primer 1	primer 2	primer 3	primer 4
Dsg1 ¹⁻⁶⁴ /Dsg3 ⁶⁵⁻⁵⁶⁶	primer 1	primer 5	primer 6	primer 4
Dsg1 ¹⁻⁸⁷ /Dsg3 ⁸⁷⁻⁵⁶⁶	primer 1	primer 7	primer 8	primer 4
hDsg3 ¹⁻¹⁰ /hDsg1 ¹¹⁻⁴⁹⁶	primer 9	primer 10	primer 11	primer 12
Dsg3 ¹⁻²⁶ /Dsg1 ²⁶⁻⁴⁹⁶	primer 13	primer 14	primer 15	primer 16
hDsg3 ¹⁻³⁴ /hDsg1 ³⁵⁻⁴⁹⁶	primer 17	primer 10	primer 11	primer 18
Dsg3 ¹⁻⁶³ /Dsg1 ⁶³⁻⁴⁹⁶	primer 19	primer 14	primer 15	primer 20
Dsg3 ¹⁻⁸⁸ /Dsg1 ⁸⁹⁻⁴⁹⁶	primer 21	primer 14	primer 15	primer 22

Primer 1: 5'- gaagatctcctataaatatggactggagttcttcagag -3'

Primer 2: 5'- cggactagtaatttggcgattgggtt -3'

Primer 3: 5'- gccactagtgattaccaagcaaccag -3'

Primer 4: 5'- cctgctcgagcctccctgagtggcct -3'

Primer 5: 5'- cggactagtatattaattcaccagt -3'

Primer 6: 5'- gccactagtatagtcgaccggaggaa -3'

Primer 7: 5'- cgggacgtcttggccattgagttcag -3'

Primer 8: 5'- gccgacgtcgagaaccactatacta -3'

Primer 9: 5'- ctggttgcagcacaatctgagtgaatcttggcaattgggttctttt -3'

Primer 10: 5'- ttaetgcatccagttagctgaga -3'

Primer 11: 5'- gacaaccatgggctcttcccagaactac -3'

Primer 12: 5'- ttccaaacctgcagaatcaagttcgagcagcctgtcgt -3'

Primer 13: 5'- gccactagtgattgtgctgcaaccag -3'

Primer 14: 5'- cttgtcgacatgtacattgtctgataacaaac -3'

Primer 15: 5'- gaagatctcctataaatatgggctcttcccag -3'

Primer 16: 5'- cggactagtaattctggcaattgggtt -3'

Primer 17: 5'- ccaagcaaccagaaaatcacataccgcatctctggagta -3'

Primer 18: 5'- tgetgcgaacttgattctgcagggttggcaatttcacca -3'

Primer 19: 5'- gccactagtatagttgatcgagagtc -3'

Primer 20: 5'- cggactagtattgtaatatctccagt -3'

Primer 21: 5'- gccgacgtcgagaggccttagagtc -3'

Primer 22: 5'- cgggacgtctagctctgggcatttag -3'

10

20

30

50

A-12 (点変異分子の作製)

また、AK23のエピトープを更に詳細に解析するためにDsg3とDsg1のアミノ酸末端1787領域におけるアミノ酸を置換した点変異分子を14種類作製した。そのうち10種類の点変異分子はDsg3分子中のDsg3特異的なアミノ酸をDsg1特異的なアミノ酸に置換したもの(Dsg3-M1、Dsg3-M2、Dsg3-M3、Dsg3-M4、Dsg3-M5、Dsg3-M6、Dsg3-M7、Dsg3-M8、Dsg3-M1-2、Dsg3-M1-2-3)で、4種類はDsg1分子中のDsg1特異的なアミノ酸をDsg3特異的なアミノ酸に置換したもの(Dsg1-M1-2、Dsg1-M1-2-3、Dsg1-M7、Dsg1-M7-8)である(図5)。また、点変異を導入するため、上記Dsg3-M1~M6の6種類については、ユニーク制限サイト除去法(Anal. Biochem. 200, 81, 1992)及びPCRに基づくメガプライマー法(Barik, S. Site-directed mutagenesis b

y double polymerase chain reaction. In PCR protocols, vol. 15, B. A. White, ed. Humana Press, Totowa, p277, 1993) にしたがって、位置指定変異処理を行った。また、残りの8種類については、ツーステップPCR法 (J Invest Dermatol. 107, 539-542, 1996) により位置指定変異処理を行った。これらの処理のために、表2に示される26個の変異プライマー (配列番号29~54に示される塩基配列をそれぞれ有するプライマー23~48を作製した。Dsg3-M1~M6の6種類については、変異原プライマー (5'-GACTTG GTTGAATACT CACCAG-3' ; 配列番号55及びDsg3の細胞外ドメインをコードするプラスミド鑄型 (pEVmod-Dsg3-His) を用いて、変異を内包したメガプライマーを初回のPCRで作製した。この処理により、amp^r 遺伝子中のユニークなScaI制限サイト (AATACT) を除去した (Anal. Biochem. 200, 81, 1992)。2回目のPCRで、全プラスミドを増幅するためにかかるメガプライマーを同一のプラスミド鑄型とともに用いた。DpnI分解後、かかるPCR産物を変換に用いた。すべての変異体を配列決定にかけ、変異の存在を確認するとともに他の変異が導入されていないことを確かめた。上記各PCR産物をBglII/XhoIで分解し、発現ベクターpEVmod-Hisに結紮した (J. Immunol. 159, 2010, 1997)。また、残りの8種類については、Dsg1断片のPCR産物をNcoI/XhoIで分解し、Dsg3断片のPCR産物をNcoI/EcoRIで分解し、発現ベクターpQEV vector (QIAGEN, Hilden, Germany) に結紮した。これら発現ベクターに導入された点変異DNA構造物をバキュロウイルス発現系にて分泌型蛋白として発現させ、点変異分子を作製した。

表 2

Table 2. Primers used for point-mutated human Dsg1/Dsg3 molecules

Constructs	Primers	Amino Acid Change
Dsg3-M1	23	T 25 H, Y 28 C, Q 29 A
Dsg3-M2	24	T 31 N, K 33 Q, I 34 V
Dsg3-M3	25	V 53 I, D 54 N, K 55 Q, N 56 K
Dsg3-M4	26	E 70 V, S 73 F
Dsg3-M5	27	L 75 I, T 77 Y
Dsg3-M6	28	A 83 S, Q 84 M
hDsg3-M1-2	29, 31, 33, 34	T 25 H, Y 28 C, Q 29 A, T 31 N, K 33 Q, I 34 V
hDsg3-M1-2-3	29, 31, 35, 36	T 25 H, Y 28 C, Q 29 A, T 31 N, K 33 Q, I 34 V F 48 Y, V 53 I, D 54 N, K 55 Q, N 56 K
hDsg3-M7	29, 31, 41, 42	V 3 I, K 7 A, P 8 A
hDsg3-M8	29, 31, 43, 44	D 59 E
hDsg1-M1-2	30, 32, 37, 38	H 25 T, C 28 Y, A 29 Q, N 31 T, Q 33 K, V 34 I
hDsg1-M1-2-3	30, 32, 39, 40	Y 48 F, I 53 V, N 54 D, Q 55 K, K 56 N
hDsg1-M7	30, 31, 32, 45	I 3 V, A 7 K, A 8 P
hDsg1-M7-8	30, 32, 45, 46, 47, 48	I 3 V, A 7 K, A 8 P, E 59 D

Primer 23: 5'- gaaacccaattgccaaagattcattcagattgacgagcaaccagaaaaatcacctac -3'

Primer 24: 5'- acttcagattaccaagcaaacagcaagtcacctaccgaatctctggag -3'

Primer 25: 5'- ggccgccttttgaatcttgttattaaccaaaaaactggagatattaacataacag -3'

Primer 26: 5'- gctatagtcgaccgggaggtaactccattctctgatcacatgtcgg -3'

Primer 27: 5'- gaggaactccaagcttcacatctattgicgggctctaaatgcc -3'

Primer 28: 5'- catgtcgggctctaaatagcatgggactagatgtagag -3'

Primer 29: 5'- gacaacctggggcctctcccagaactac -3'

Primer 30: 5'- gcagccatggactggagttcttcagagta -3'

primer 31: 5'- cggactagtgggaacatgggtgtgccagc -3'

primer 32: 5'- ttactgccatccagttagctgaga -3'

primer 33: 5'- ctggttgcagcacaatctgagtgatctggcaattgggttctt -3'

primer 34: 5'- gattgtcctgcaaaccagcaagttacctaccgaatctctggagtgga -3'

primer 35: 5'- atcaattcactccagagatgctggatgtaactgctggttgcagcacaatctgagtgatcttggcaattgggttcttcttggag -3'

primer 36: 5'- cgcactctcggagtaggaattgatcagccacatagggatcttctgcatatcagaaaaactggagatattaacataacagcta -3'

primer 37: 5'- ctgggttgccttggtaatctgaagtaattttggcagttgggtctctct -3'

primer 38: 5'- gattaccaagcaaccagaaaaatctaccgcactctggagtaggaattg -3'

primer 39: 5'- atcgattccactccagagatcggtagtgatcttctgggtgcttggtaatctgaagtaattttggogattgggtctcttga -3'

primer 40: 5'- cgaatctcggagtggaatcagcagccgcttttggaaatcttgggttgcacaaaaactgggtaattataataacatccatag -3'

primer 41: 5'- ctctctcagggcagcggcaaatctgacattcagttt -3'

primer 42: 5'- tgaatggatcaatttgcgctgctgcagagaaggagaa -3'

primer 43: 5'- aaaaactggagaaattaacataacagc -3'

primer 44: 5'- tggatgtaatttctccagtttttgc -3'

primer 45: 5'- tgaatgggtgaagttcgcaaacctgtcgtgaaggtaa -3'

primer 46: 5'- ctccagacagggttttgcgaactcaccattcagttt -3'

primer 47: 5'- aaactggtgatattaataacatcc -3'

primer 48: 5'- atattaatcaccagtttctgatt -3'

10

20

30

40

実施例 B (結果)

B-1 (モノクローナル抗体の反応性)

進行中の病気を抱えている P V モデルマウスは、ケラチノサイトの細胞間接着の欠失を誘導でき、結果として疱疹をもたらす循環抗 D s g 3 I g G 抗体を有している。本発明者らは、この P V モデルマウスを、抗 D s g 3 I g G モノクローナル抗体を開発するための供給源として使用した。本発明者らは、これらのマウスの脾細胞からハイブリドーマ細胞を作製した。まずこれらハイブリドーマ細胞について、バキュロウイルス発現系により得られた組換え型 D s g 3 を用いて E L I S A によりスクリーニングを行い、陽性のクローン

50

について、マウスのケラチノサイトPAM212細胞（図1 a、b、c）を用いた生存ケラチノサイト染色により、さらにスクリーニングを行った。二度目のスクリーニングで、ケラチノサイト細胞表面の未変性（native）Dsg3にインビボで結合可能な抗体を選別し、8個の別個のクローンを単離した（表3）。これらのモノクローナル抗体のアイソタイプはすべてH鎖についてはIgG1であり、L鎖についてはκであった。

モノクローナル抗体の抗原特異性の検討は、組換えDsg蛋白を抗原として用いたELISA法と、マウス各臓器を基質として用いた間接蛍光抗体法及び培養マウス角化細胞PAM212を用いたliving cell stainingにて行った。間接免疫蛍光法により、これらの抗体はすべて、硬口蓋や皮膚といった重層扁平上皮細胞表面には反応したが、肝臓や腸といった単層上皮には反応しなかった。また、これらモノクローナル抗体の染色パターンは、PVモデルマウスの血清又はPV患者の血清の染色パターンと区別できなかった。いくつかのモノクローナル抗体（AK1、15、18、19、20及び23）は、ヒト皮膚又は粘膜と交差反応した。これらの抗体は、Dsg3が発現するヒト上皮の下層及び粘膜の全層を染色した（図1 d、e、f）。ELISAにより、マウスDsg1と交差反応したAK1を除いたすべての抗体が、マウスDsg3の組換え型細胞外ドメインとのみ反応した。免疫蛍光法でヒト組織に交差反応性を示したのも、ELISAによって組換え型ヒトDsg3と反応した。上記表3にはIgG1κであった8クローンについての特徴が示されている。表3中、IIF（間接蛍光抗体法）とELISAにおける（+）は陽性を、（-）は陰性をそれぞれ示し、Ca依存性は、マウスDsg3に対するモノクローナル抗体の反応性をEDTA処理又は未処理で行い、EDTAにより反応性が欠失したものを（+）で表し、また、エピトープについては、AK7、AK9、AK15、AK18及びAK20のエピトープはマウスDsg3のアミノ酸残基により示され、AK19及びAK20はヒトDsg3のアミノ酸残基により示されている。

表3

AKモノクローナル抗体の特異性概要

AK	アイソタイプ	IIF			ELISA				生体 ケラチノサイト 染色	Ca 依存性	病原性 受動伝達 腹水形成	エピトープ
		マウス		ヒト	マウス		ヒト					
		粘膜	肝臓	皮膚	Dsg3	Dsg1	Dsg3	Dsg1				
1	IgG1 κ	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	ND
7	IgG1 κ	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	403-565
9	IgG1 κ	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	403-565
15	IgG1 κ	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	195-402
18	IgG1 κ	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	195-402
19	IgG1 κ	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	87-161
20	IgG1 κ	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	403-565
23	IgG1 κ	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	V3, K7, P6, D59

表3からわかるように、マウス、ヒトの基質を用いた間接蛍光抗体法では、すべてのクローンはDsg3に特異的で、AK7とAK9はマウスDsg3に特異的であった。各種の組み換えDsg蛋白を抗原として用いた上記ELISA法による検討では、AK1は、すべてのDsg（ヒトとマウスのDsg3及びDsg1）に反応が認められた。また、AK7及びAK9は、マウスDsg3にのみ反応が認められた。AK15、AK18、AK19、AK20及びAK23は、マウスとヒトのDsg3に交叉反応性を有するクローンであった。その中のAK20は、ヒトDsg3に対する反応性は低かったが、AK23はヒトDsg3に対する反応性は非常に高かった。培養マウス角化細胞（ケラチノサイト）を用いたliving cell stainingではすべてのクローンがインビボでDsg3に反応性を有するクローンであった。また、AK19及びAK23のみがカルシウ

ム感受性を有するクローンであった。新生マウスを用いた病原性の確認ではAK19とAK23で水疱の形成が確認された。ハイブリドーマのRag2^{-/-}マウスでの腹水形成による病原性の確認では、AK23のみで水疱の形成が確認された。以上の結果より、作製されたモノクローナル抗体の認識するエピトープは単一ではないことが示された。

B-2 (新生マウスにおけるモノクローナル抗体の病原性)

新生仔マウスへのモノクローナル抗体の移入による病原性の確認は、全てのモノクローナル抗体を用いて行った。まず、各モノクローナル抗体を単独で移入した新生仔マウスの皮膚における肉眼的な水疱形成と顕微鏡的な微小水疱形成をヘマトキシリン・エオジン染色標本にて観察した。その結果すべてのモノクローナル抗体において肉眼的な水疱形成は認められなかった。次に、顕微鏡的な微小水疱の形成を検討した。検討項目として1検体中の組織切片数と切片中における断端部と連続部(両断端部を結ぶ連続部位)に認められた基底層直上の水疱形成数をカウントした。その結果AK23を移入したマウスでは総切片数15に対して微小水疱形成数は、断端部6、連続部4、総数10であった。AK19を移入したマウスでは総切片数37に対して微小水疱形成数は、断端部6、連続部7、総数13であった。AK20などその他のモノクローナル抗体を移入したマウスは総切片数18に対して微小水疱形成は、断片部、連続部ともに認められなかった。AK19、AK20及びAK23を用いた場合の結果を表4に示す。

表4

AK23	肉眼的な水疱形成	微小水疱形成		
		切片数	断端部	連続部
AK23-1	0	6	3	0
AK23-2	0	5	2	3
AK23-3	0	4	1	1
sub total	0	15	6	4
total	0	15	10	

AK19	肉眼的な水疱形成	微小水疱形成		
		切片数	断端部	連続部
AK19-1	0	8	3	3
AK19-2	0	8	0	0
AK19-3	0	5	3	3
AK19-4	0	5	0	0
AK19-5	0	6	0	0
AK19-6	0	5	0	1
sub total	0	37	6	7
total	0	37	13	

AK20	肉眼的な水疱形成	微小水疱形成		
		切片数	断端部	連続部
AK20-1	0	4	0	0
AK20-2	0	6	0	0
AK20-3	0	4	0	0
AK20-4	0	4	0	0
sub total	0	18	0	0
total	0	18	0	

上記の所見より、もっとも病原性が強いと思われるAK23及びAK19を中心にさらに受動伝達アッセイを行った(図2)。新生仔マウスへのAK19(図2a)及びAK23(図2b)の単独移入では肉眼的に明らかな水疱の形成は認められなかったが、顕微鏡下、病理組織学的にはヘマトキシリンエオジン染色でPVに特徴的な基底層直上の微小水疱がAK19(図2c)及びAK23(図2d)共に認められた。肉眼的な水疱形成が認められない理由として、皮膚においてはDsg1が共発現しているためにAK23やAK19

によるD s g 3の接着機能障害をD s g 1の接着機能が代償しているためと考え、それ自身では明かな水疱形成を誘導しない微量の抗D s g 1抗体（P F患者血清）を同時に注射したところ、新生仔マウスに広範囲な肉眼的な水疱形成がA K 19（図2 e）及びA K 23（図2 f）共に認められ、病理組織学的にもP Vに特徴的な基底層直上での水疱形成が認められた。さらに、黄色ブドウ球菌が産生するE T AがD s g 1を特異的に分解する事実を利用し、それ自身では明かな水疱形成を誘導しない微量のE T Aを同時に注射したところ、肉眼的に広範囲な水疱をA K 19（図2 g）及びA K 23（図2 h）共に形成し、病理組織学的にもP Vに特徴的な基底層直上の水疱形成を認めた。免疫組織学的には直接蛍光抗体法ですべての組み合わせにおいて基底層直上の表皮角化細胞表面への抗体の沈着が認められた。

10

B-3（免疫不全マウスへのハイブリドーマの移植）

新生マウス皮膚を用いた実験では、前述したように、マウス皮膚にD s g 1が共発現しており、そのD s g 1の接着機能を特異的に障害するためにP F患者血清やE T Aを同時に移入して病原性を確認する必要性があった。そこで、モノクローナル抗体単独使用による病原性を確認するために、8クローンのハイブリドーマを免疫不全マウスの腹腔にそれぞれ接種した後に腹水化させ、その表現型の変化を観察した。抗体が病原性を有すれば口腔粘膜などで水疱が形成されると考えられた（図3）。その結果、A K 23産生性ハイブリドーマを接種したR a g 2^{-/-}マウスでは、口の回り（図3 a）、目の回り（図3 b）及び背中（図3 c）に被毛の脱毛が認められ、7日目から9日目に、目視可能な腹水症の発生が観察される前に急死した。A K 19産生性ハイブリドーマを接種したR a g 2^{-/-}マウスでは、明らかに腹水が形成（図3 d）されているにもかかわらず、被毛の脱毛のような表現型は観察されなかった。直接蛍光抗体法では、硬口蓋粘膜のD s g 3の分布に一致した部位の角化細胞表面へのI g Gの沈着がA K 23（図3 e）及びA K 19（図3 f）共に認められたが、病理組織学的なケラチノサイト細胞間の接着性の減少はA K 23産生性ハイブリドーマを接種したR a g 2^{-/-}マウス（図3 g；硬口蓋、h；皮膚、テロゲン毛クラブ）でのみ観察された。以上の肉眼的、病理組織学的な変化はD s g 3^{-/-}マウスと同様の所見であった。しかし、A K 20、A K 19をはじめとして、A K 23以外のモノクローナル抗体産生性ハイブリドーマを腹腔内に接種したマウスでは、免疫組織学的には足底部皮膚、硬口蓋粘膜にA K 23と同様のI g Gの沈着が認められた。ところが、十分な腹水の貯留が認められたにもかかわらず、肉眼的に被毛の脱毛、体重減少、病理組織学的に基底層直上の水疱形成は認められなかった（表5）。以上の結果よりA K 23は単独で天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有する抗体であることが確認された。

20

30

表5

	免疫組織学的所見		肉眼的所見	
	直接蛍光抗体法	病理組織学所見 基底層直上の水疱形成	被毛脱毛	体重減少
AK23	+	+	+	+
AK19	+	-	-	-
AK20	+	-	-	-

40

A K 23等のモノクローナル抗体（A K）の病原活性を、受動伝達及び腹水形成の観点からさらに生後4週齢以上の成体マウスについても検討した。その解析結果のまとめを表6に示す。モノクローナル抗体を単独、モノクローナル抗体とP F I g Gとの組合せ（A K + P F I g G）又はモノクローナル抗体とE T Aとの組合せ（A K + E T A）を成体マウスに注入し、18～24時間後に肉眼的及び微小水泡が形成されているか観察を行った結果、肉眼的水泡が認められた成体マウスにはP Vの典型的な組織学上の所見が認められた。また、生後4週齢以上のR a g 2^{-/-}マウス腹腔内にハイブリドーマを接種したところ、A K 23産生ハイブリドーマ接種群では接種後7～10日で肉眼的な被毛の脱毛と腹水の形成が認められた。A K 15、A K 19及びA K 20でのマウスの抗体価は、A K 2

50

3でのマウスの抗体価の4倍以上であり、水疱形成誘導能が低い理由が不十分な抗体産生量によるという可能性が否定された。以上のことから、AK1、AK7、AK9、AK15、AK18、AK19及びAK20は、成体マウスにおけるケラチノサイトの細胞間接着の欠損を誘導し、腹水を形成する能力がないことを示している。AK23は、受動伝達及び腹水形成の2つの分析において、典型的なPV表現型で水疱形成を生起したが、AK19は、受動伝達分析においてのみ、PV水疱形成を生起したに過ぎなかった。その他のモノクローナル抗体は、いずれの分析においても病原性を示さなかった。

表6

AK	受動伝達						腹水形成					
	AK単体			AK+PF			Ig ^t		AK+ETA			
	n	IgG	水疱形成	n	肉眼的	n	肉眼的	抗Dsg3	IgG	生体内	PV表現型	
	沈着	微小	肉眼的	水泡	水泡	n	抗体力価	IgG	IgG沈着			
1	7	+	0	0	22	0	ND	10	ND	+	0	
7	4	+	0	0	7	0	ND	10	ND	+	0	
9	5	+	0	0	9	0	ND	10	ND	+	0	
15	5	+	0	0	2	0	ND	2	289.1±3.2	+	0	
18	2	+	0	0	5	0	ND	5	21.1±13.5	+	0	
19	10	+	7	0	12	10	6	2	356.2±10.4	+	0	
20	6	+	0	0	10	0	ND	5	388.8±9.6	+	0	
23	5	+	5	0	7	7	6	6	9	64.5±13.2	+	9

10

20

B-4 (免疫沈降法によるモノクローナル抗体の抗原特異性の検討)

モノクローナル抗体の認識するDsg3上のエピトープを解析するために、バキュロウイルス発現系により得られた、Dsg3、Dsg1の細胞外領域全長を含む分子及びドメインスワップ分子(Dsg3のアミノ酸残基25?566、65?566、87?566、1?88、1?63、1?34、1?26、1?10とその欠失領域をDsg1で置換した8種類のドメインスワッピング分子、Dsg1¹⁻²⁴/Dsg3²⁵⁻⁵⁶⁶、Dsg1¹⁻⁶⁴/Dsg3⁶⁵⁻⁵⁶⁶、Dsg1¹⁻⁸⁷/Dsg3⁸⁸⁻⁵⁶⁶、Dsg3¹⁻⁸⁸/Dsg1⁸⁹⁻⁴⁹⁶、Dsg3¹⁻⁶³/Dsg1⁶³⁻⁴⁹⁶、Dsg3¹⁻³⁴/Dsg1³⁵⁻⁴⁹⁶、Dsg3¹⁻²⁶/Dsg1²⁶⁻⁴⁹⁶、Dsg3¹⁻¹⁰/Dsg1¹¹⁻⁴⁹⁶)を作製し、免疫沈降法による検討を行った。結果を図4に示す。図4には、Dsg3及びDsg1の全細胞外領域(Extracellular domain; EC1-EC5)を有するDsg3-His及びDsg1-Hisの模式図が示され、C末端領域のHis-tagはNi-NTAカラムを用いた蛋白の精製のために用いられたものである。

30

図4からわかるように、AK23、AK20、AK19のいずれもDsg3の全細胞外領域を有するDsg3-Hisに対しては反応性が認められたが、Dsg1の全細胞外領域を有するDsg1-Hisに対する反応は認められなかった。この結果より上記モノクローナル抗体AK23、AK20、AK19はDsg3を特異的に認識する抗体であることが確認された。また、AK23はDsg3¹⁻⁸⁸/Dsg1⁸⁹⁻⁴⁹⁶及びDsg3¹⁻⁶³/Dsg1⁶³⁻⁴⁹⁶分子のみに反応性を有し、AK23の認識するエピトープはDsg3の細胞外領域のN末端より1~63アミノ酸領域に存在し、AK20とAK19の認識するエピトープはDsg3の細胞外領域のN末端より87~566アミノ酸領域、すなわちDsg3アミノ酸残基87よりもC末端側に存在することが確認された。デスモゾームカドヘリンであるDsg3とDsg1は、そのアミノ酸配列の相同性が高いことが知られている。図6には、Dsg3とDsg1のEC1領域におけるアミノ酸配列が、左側をN末端、右側をC末端として、比較して示されている。上記AK23のエピト

40

50

ープを更に詳細に検討するために、D s g 3とD s g 1の細胞外領域のアミノ酸1?87におけるD s g 1、D s g 3特異的なアミノ酸のみを点変異導入した点変異分子を用いて免疫沈降法を行った。結果を図5に示す。図5からわかるように、AK23はD s g 3特異的なアミノ酸25-56領域及び70-84領域をD s g 1特異的なアミノ酸に置換した点変異D s g 3分子(D s g 3-M1、M2、M3、M4、M5、M6、M1-2、M1-2-3)との反応性を保持し、また、D s g 1特異的なアミノ酸25?56領域をD s g 3特異的なアミノ酸に置換した点変異分子(D s g 1-M1-2、M1-2-3)との反応性を失った。これらの結果よりAK23のエピトープはD s g 3のアミノ酸1-87領域中の25-56以外の領域に存在すると考えられた。

そこで、D s g 3のN末端の領域に注目し、アミノ酸、V3、K7、P8のみをD s g 1特異的なアミノ酸に置換した点変異分子D s g 3-M7を用いたところ、その反応性が消失した。また、D s g 1特異的なI3、A7、A8をD s g 3特異的なアミノ酸配列に置換したD s g 1-M7においては、AK23は反応性を獲得することはなかった。これらの結果から、D s g 3のアミノ酸V3、K7、P8はAK23のエピトープに必要ではあるが充分ではないものと考えられた。そこでさらに、D s g 1-M7にD s g 3特異的なアミノ酸D59を加えたD s g 1-M7-8を作製したところ、AK23は反応性を獲得した。以上の結果からAK23の主要なエピトープはD s g 3分子上のアミノ酸V3、K7、P8の少なくとも1つと、D59にて構成されているものと考えられた。なお、D s g 3特異的なアミノ酸D59をD s g 1特異的なアミノ酸E59に変えたD s g 3-M8を用いたところ、その反応性が維持されていた。このことは、D s g 3特異的なアミノ酸D59は、D s g 3分子上のアミノ酸V3、K7、P8の少なくとも1つに依存的に反応性を消失するものと考えられる。

AK23等のモノクローナル抗体のエピトープを特徴づけるため、まず、かかる抗体のD s g 3への結合がカルシウム依存性であるかを調べてみた。組換えマウスD s g 3-Hisを、EDTAを使用又は使用せずに処理し、AK抗体と共に免疫沈降を行なった。EDTA処理により、AK19及びAK23抗体の反応性はなくなったが、他のAK抗体については反応がなくならなかった(表3、図7a)。マウスD s gでコーティングされたELISAプレートをEDTAで処理したところ、同様に、AK19及びAK23は結合しなくなり、他のAK抗体の結合には著しい影響は見られなかった。従って、AK19及びAK23はカルシウム依存性のエピトープを認識し、他のAK抗体はカルシウム非依存性のエピトープを認識すると言える。次に、前述したAK23、AK19等のD s g 3に対する反応性を免疫ブロット法にて検討した。その結果、AK19等は分子量の異なる2種類の蛋白に対する反応が認められた。これに対してAK23ではAK19等で認められた分子量が小さい蛋白と同様の1本のバンドのみが認められた(図7b)。バキュロウイルス発現型により得られた組み換えD s g 3蛋白はその培養上清中にプロ配列を有する不活性型のD s g 3蛋白とプロ配列が切断された活性型のD s g 3蛋白が存在する。AK19のみが認識した分子量が大きい蛋白はプロ配列を有する、不活性型のD s g 3蛋白と思われる。これと比較してAK23は分子量が小さい蛋白のみを認識した。これらの所見はAK23が、プロ配列が除去されたいわゆる活性型のD s g 3蛋白のみを認識していることを示している。プロ配列は蛋白合成過程において分子同士が接着して凝集するのを防ぐために存在していることを考えると、AK23は、D s g 3の接着機能上重要な部位を認識していることが考えられ、前述のエピトープマップの結果と合致するものである。

最近、カドヘリン(C-cadherin)の全細胞外領域の3次元構造が、結晶解析により明らかにされた(Science, 296, 1308-1313, 2002)。カドヘリン分子はN末端のEC1の領域で接着し合い、その接着面を構成するアミノ酸配列が明らかにされた。その報告においてC-cadherinの接着面は、そのN末端領域のアミノ酸1-8、20、23-27、59より構成されていることが確認された。これらの情報を今回AK23のエピトープの結果と考え合わせると、V3、K7、P8、D59は、結果的にそのC-cadherinの接着面を構成するアミノ酸1?8、59(図5の斜線ボックス参照)上に存在することがわかった。これらのことは、AK23がD s g

3分子機能上最も重要なカドヘリン接着面に結合し、その細胞間接着機能を直接障害することにより水疱を形成することを裏付けている。

かかる強い病原性を有するモノクローナル抗体AK23の可変領域（重鎖、軽鎖）の塩基配列を常法により決定した。AK23の可変領域（重鎖、軽鎖）の塩基配列及びそのアミノ酸配列を図8に示す。

産業上の利用可能性

本発明によると、尋常性天疱瘡の分子レベルでの発症機序の解明、抗原特異的な抗体除去療法の開発に有用であると考えられる天疱瘡病変を誘導することが可能な病的活性を有するモノクローナル抗体や、該モノクローナル抗体が特異的に認識する天疱瘡自己免疫疾患治療薬として有用であると考えられるペプチド等を提供することができる。

10

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KEIO UNIVERCITY

<120> PEMPHIGUS MONOCLONAL ANTIBODIES

<130> P10000238

<140>

10

<141>

<150> JP P2001-267653

<151> 2001-09-04

<160> 55

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 63

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Trp Val Lys Phe Ala Lys Pro Cys Arg Glu Gly Glu Asp Asn Ser
 1 5 10 15

30

Lys Arg Asn Pro Ile Ala Lys Ile Thr Ser Asp Tyr Gln Ala Thr Gln
 20 25 30

Lys Ile Thr Tyr Arg Ile Ser Gly Val Gly Ile Asp Gln Pro Pro Phe
 35 40 45

Gly Ile Phe Val Val Asp Lys Asn Thr Gly Asp Ile Asn Ile Thr
 50 55 60

40

<210> 2

<211> 63

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Trp Val Lys Phe Ala Lys Pro Cys Arg Glu Arg Glu Asp Asn Ser

1 5 10 15

10

Arg Arg Asn Pro Ile Ala Lys Ile Thr Ser Asp Phe Gln Lys Asn Gln

20 25 30

Lys Ile Thr Tyr Arg Ile Ser Gly Val Gly Ile Asp Gln Pro Pro Phe

35 40 45

Gly Ile Phe Val Val Asp Pro Asn Asn Gly Asp Ile Asn Ile Thr

50 55 60

20

<210> 3

<211> 347

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

30

<221> CDS

<222> (1)..(345)

<400> 3

cag gtc caa ctc cag cag tct ggg act gaa ctc gtc aag cct ggg gct 48

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

tca gtc aag ctc tcc tgc aag tct tct ggc tac acc ttc acc agc tac 96

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

40

	20	25	30	
tgg ata aac tgg gtg aag cag agg cct gga cag ggc ctt gag tgg att				144
Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile				
	35	40	45	
 gga aat att aat cct agc aat ggt ggt att aac tai aat gag aag ttc				192
Gly Asn Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe				
	50	55	60	10
 aag agt aag gcc aca ctc acg gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac				240
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr				
	65	70	75	80
 atg caa ctc aag agc ctc aca tct gag gac tct gcg gtc tat tat tgt				288
Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys				
	85	90	95	20
 gca agg ggg ggc tat gat ggt tac ccc tgg ggc caa ggc acc acg gtc				336
Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Tyr Pro Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val				
	100	105	110	
 acc gtt tcc tc				347
Thr Val Ser				
	115			30
 <210> 4				
<211> 115				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
 <400> 4				
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala				40
1	5	10	15	

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

10

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Tyr Pro Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

20

Thr Val Ser
 115

- <210> 5
- <211> 324
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

30

- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(324)

<400> 5
 gac att cag atg aca cag tct ccc aaa ttc ctg ctt gta tca gca gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

40

gac agg gtt acc ata acc tgc aag gcc agt cag agt gtg agt tai gat 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Asp
 20 25 30

gta gct tgg tai caa cag aag cca ggg cag tct ccg aaa tgg ctg ata 144
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tcc tat gca tcc aat cgc tac aci gga gtc cct gat cgc ttc act ggc 192
 Ser Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

10

agt gga tat ggg tgc gat ttc act ttc acc atc agc act gtg cag act 240
 Ser Gly Tyr Gly Ser Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Thr
 65 70 75 80

gaa gac ctg gca gtt tai ttc tgt cag cag gat tai agc tct ccg tgg 288
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
 85 90 95

20

acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gag ctg aaa cgt 324
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

40

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Asp

	20	25	30	
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile				
	35	40	45	
Ser Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly				
	50	55	60	
Ser Gly Tyr Gly Ser Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Thr				10
	65	70	75	80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp				
	85	90	95	
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg				
	100	105		

<210> 7
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> 30
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer 1

<400> 7
 gaagatctcc tataaalaig gactggagti tcttcagag 39

<210> 8
 <211> 27
 <212> DNA 40
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 2

<400> 8

cggactagia atttggcga tgggtt

27

<210> 9

<211> 27

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 3

<400> 9

gccactagtg attaccaagc aaccag

27

20

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 4

30

<400> 10

cctgctcgag cctccctgag tgcggcct

28

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 5

<400> 11

eggactagtt atattaattt caccagi

27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 6

<400> 12

gccactagta tagtcgaccg ggaggaa

27

20

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 7

<400> 13

cgggacgict tggcccatig agttcag

27

30

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 8

<400> 14

gccgacgtcg agaaaccact tatacia

27

<210> 15

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 9

<400> 15

ctggtttga gcacaatctg agtgaalctt ggcaatiggg tttctttt

48

20

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 10

<400> 16

ttactgcat ccagttagct gaga

24

30

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 11

<400> 17

gacaaccaig gggcicttcc ccagaactac 30

<210> 18

<211> 41

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 12

<400> 18

ttgccaacc ctgcagaatc aagttgcag cagcctgtcg t 41 20

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 13

<400> 19

gccactagtg atlgtgtctgc aaaccag 27

<210> 20

<211> 33

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 14

<400> 20

cttgtcgaca tgtacaligt ctgataacaa atc

33

<210> 21

10

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 15

<400> 21

gaagatctcc tataaatatg gggtcttcc ccag

34

20

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 16

<400> 22

cggactagia atcttgcaa ttgggtt

27

<210> 23

<211> 40

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 17

<400> 23

ccaagcaacc cagaaaaica caaacgcgat ctcggagta

40

<210> 24

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 18

<400> 24

tgctgcgaac ttgattctgc agggttggc aaatttcacc ca

42

20

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 19

<400> 25

gccactagta tagttagatcg agaggtc

27

30

<210> 26

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 20

<400> 26

cggactagtt atgtlaalat ciccagt

27

<210> 27

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 21

<400> 27

gccgaegtgc agaggcctct agagctc

27

20

<210> 28

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 22

<400> 28

cgggacgtct agtccttggg caittag

27

30

<210> 29

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 23

<400> 29

gaaaccaai tgccaagatt caticagatt ggcagcaac ccagaaaac acctac 56

<210> 30

10

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 24

<400> 30

acttcagatt accaagcaaa ccagcaagtc acctaccgaa tcctctggag 49 20

<210> 31

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 25

<400> 31

ggccgccttt tggaatcttt gtlattaacc aaaaaactgg agatattaac ataacag 57

<210> 32

<211> 48

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 26

<400> 32

gciaatagtcg accgggaggt aaticcattc ticcigatca catgtcgg 48

<210> 33

10

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 27

<400> 33

gaggaaactc caagcttcac catctattgt cgggcctctaa atgcc 45 20

<210> 34

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 28

<400> 34

catgtcgggc tctaaatagc atgggactag atgtagag 38

<210> 35

<211> 30

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 29

<400> 35

gacaacatg gggctcttcc ccagaactac 30

<210> 36

10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 30

<400> 36

gcagccatgg actggagttt ctcagagta 30 20

<210> 37

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 31

<400> 37

cggactagtg aggaacatgg gtgtgccagc 30

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 32

<400> 38

tiactgccat ccagttagct gaga

24

<210> 39

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 33

<400> 39

ciggittgca gcacaatcig agtgaatcctt ggcaattggg tttctttt

48

20

<210> 40

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 34

<400> 40

gattgtgctg caaaccagca agttacctac egaatctctg gagtggga

48

<210> 41

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 35

<400> 41

atcaattcct aciccagaga tgcggatgt aacttgcigg ttgcagcac aalcigaglg 60
aatcttggca attgggtttc tttttgag 88

<210> 42

10

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 36

<400> 42

20

cgcatctctg gactaggaal tgalcagcca ccalatggga tctttgtcat taatcagaaa 60
actggagata ttaacataac agcta 85

<210> 43

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 37

<400> 43

ctgggttgct tggtaatctg aagtaattti ggcgattggg ttctcttt 48

<210> 44

40

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 38

<400> 44

gattaccaag caaccagaa aatctaccgc atctciggag taggaattg 49

10

<210> 45

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 39

20

<400> 45

atcgattccc actccagaga ttcggtaggt gattttctgg gtigcttggg aatctgaagt 60

aattttggcg attgggttcc tcttga 87

<210> 46

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer 40

<400> 46

cgaatctcig gagtgggaat cgaacagccg cctttggaa tctttgttgl tgacaaaaac 60

actggtgaaa ttaatataac atccatag 88

40

<210> 47

<211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer 41

<400> 47
 ctctctcgca ggcagcggca aattgatcc attcacgtt 40 10

<210> 48
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> 20
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer 42

<400> 48
 tgaatggatc aaattigccg ctgacctgag agaaggagaa 40

<210> 49
 <211> 29 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer 43

<400> 49
 aaaaacactg gagaaattaa cataacagc 29 40

<210> 50

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer 44

<400> 50
 tgttatgta atttctccag tgittttgtc 30 10

<210> 51
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> 20
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer 45

<400> 51
 tgaatgggtg aagttcgcaa aacctgtcg tgaaggigaa 40

<210> 52
 <211> 40 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Primer 46

<400> 52
 cticacgaca gggttttgcg aacttcaccc attcagttt 40 40

<210> 53

<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Primer 47		
<400> 53		10
aaactggiga tattaatata acalcc	26	
<210> 54		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		20
<223> Description of Artificial Sequence:Primer 48		
<400> 54		
atattaatat caccagtttt ctgatt	26	
<210> 55		
<211> 22		30
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence:Mutagenic primer		
<400> 55		40
gacttgggtg aatactcacc ag	22	

【図面の簡単な説明】

第1図は、本発明の抗D s g 3モノクローナル抗体の間接蛍光抗体法とL i v i n g c e l l s t a i n i n gの結果を示す写真である。

第2は、本発明の抗D s g 3モノクローナル抗体を新生仔マウスへ単独移入したときの結果を示す写真である。

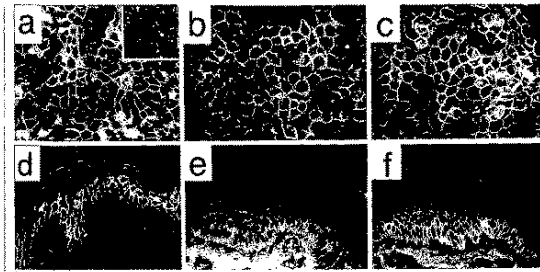
第3図は、本発明の抗D s g 3モノクローナル抗体A K 2 3産生性のハイブリドーマを免疫不全マウスへ接種したときの結果を示す写真である。

第4図は、D s gドメインスワップ分子の構造と、このスワップ分子と本発明の抗D s g 50

3モノクローナル抗体との反応性を免疫沈降法により調べた結果を示す図である。
 第5図は、D s g点変異分子の構造と、この点変異分子と本発明の抗D s g 3モノクローナル抗体との反応性を免疫沈降法により調べた結果を示す図である。
 第6図は、D s g 3とD s g 1のE C 1領域におけるアミノ酸配列の比較を示す図である。
 第7図は、免疫沈降法による、本発明の抗D s g 3モノクローナル抗体と抗原D s g 3との反応結果を示す写真である。
 第8図は、本発明の抗D s g 3モノクローナル抗体A K 2 3の可変領域（重鎖・軽鎖）の塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。

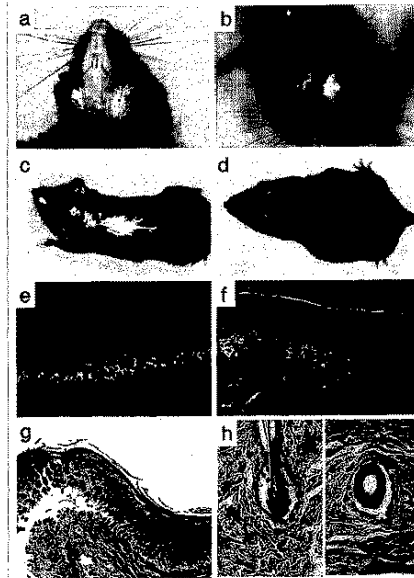
【図 1】

第 1 図



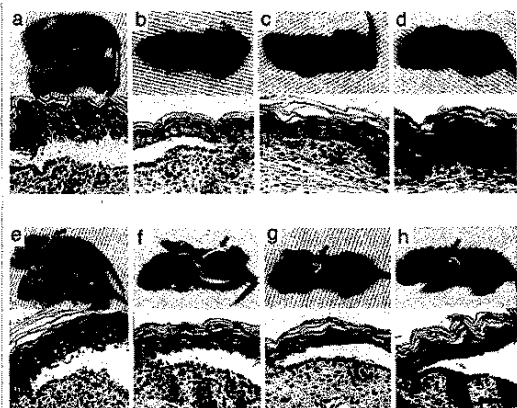
【図 3】

第 3 図

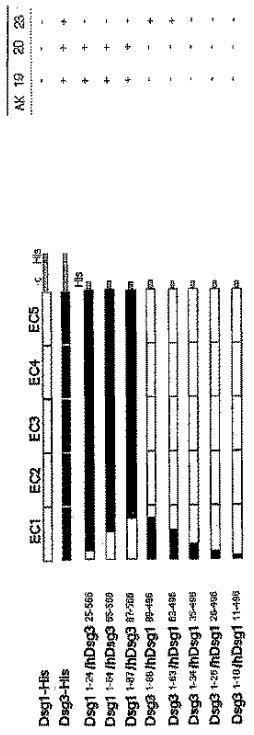


【図 2】

第 2 図

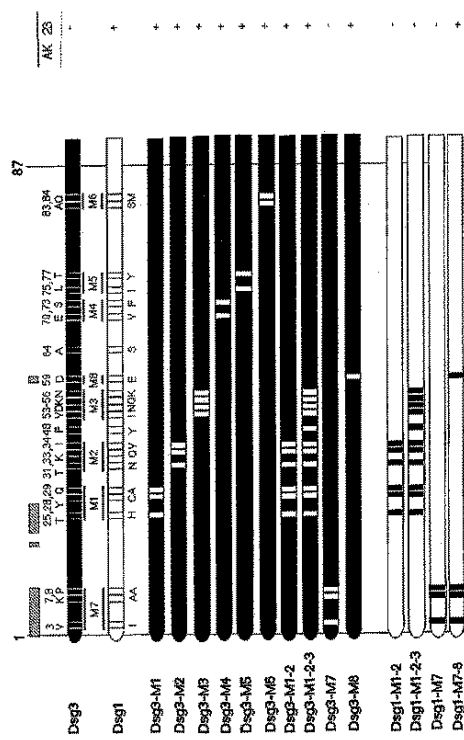


【図 4】



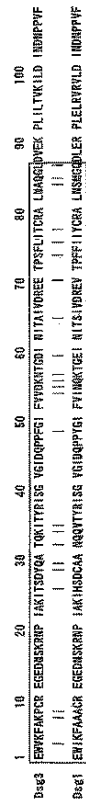
第 4 図

【図 5】



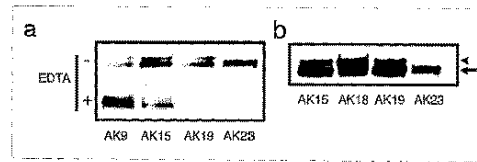
第 5 図

【図 6】



第 6 図

【図 7】



第 7 図

【図 8】

第 8 図

重鎖

```

1 CAGGTCCAAGTGCAGCAGTCTGGGACTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTG 60
1 Q V Q L Q Q S G T E L V K P G A S V K L 20
61 YCCTGCAAGTCTCTGGCTACACCTTCACAGCTACTGGATAAACTGGGTGAAGCAGAGG 120
21 S C K S S G Y T F T S Y W I N W Y K Q R 40
121 CCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTAATCCTAGCAATGGTGGTATTAATAT 180
41 P G Q G L E W I G N I N P S N G G I N Y 60
181 AATGAGAAGTCAAGAGTAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCAGCACAGCCTAC 240
61 N E K F K S K A T L T V D K S S S T A Y 80
241 ATGCAACTCAAGAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGGGGGGC 300
81 M Q L K S L T S E D S A V Y Y C A R G G 100
301 TATGATGGTTACCCCTGGGGCCAAAGGCACACGGTCAACCGTTTCCTC 347
101 Y D G Y P W G Q G T T V T V S 116

```

軽鎖

```

1 GACATTCAGATGACACAGTCTCCCAATTCCTGCTTGTATCAGCAGAGACAGGGTTACC 60
1 D I Q M T Q S P K F L L V S A G D R V T 20
61 ATAACCTGCAAGGCCAGTCAAGTGTGAGTTATGATGATGCTTGGTATCAACAGAGCCA 120
21 I T C K A S Q S V S Y D V A W Y Q Q K P 40
121 GGGCAGTCTCCGAAATTCCTGATATCCTATGATCCAATCGCTACACTGGAGTCCCTGAT 180
41 G Q S P K L L I S Y A S N R Y T G V P D 60
181 CGCTTCACTGGCAGTGGATATGGGTCGGATTCACCTTCACCATCAGCACTGTGCAGACT 240
61 R F T G S G Y G S D F T F T I S T V Q T 80
241 GAAGACCTGGCAGTTTATTCTGTGAGCAGGATTATAGCTCCTCCGTGGACGTTCCGTGA 300
81 E D L A V Y F C Q Q D Y S S P W T F G G 100
301 GGCACCAAGCTGGAGCTGAAACGT 324
101 G T K L E L K R 108

```

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/08987
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. ⁷ C07K16/28, C07K14/47, C12N5/20, A61K67/027, A61K38/16, A61P31/12, A61P37/02, A61P43/00, G01N33/564//C12N15/13 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl. ⁷ C07K16/28, C07K14/47, C12N5/20, A61K67/027, A61K38/16, A61P31/12, A61P37/02, A61P43/00, G01N33/564 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/ Y/ A	TSUNODA K. et al., Development of anti-desmoglein 2(Dsg2) pathogenic monoclonal antibody using active disease mouse model for pemphigus vulgaris(EV), J.Invest.Dermatol., 2001, Vol.117, No.2, pages 394, 028	1-3,6,9,10/ 7,8/ 4,5
Y	TSUNODA K. et al., Production of anti-desmoglein 3 mouse monoclonal antibodies using active disease mouse model for pemphigus., J.Invest.Dermatol., 2000, Vol.114, No.4, pages 846, 578	7,8
Y	AMAGAI M. et al., Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus., J.Clin.Invest, 2000, Vol.105, No.5, p.625-31	7,8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 December, 2002 (06.12.02)		Date of mailing of the international search report 24 December, 2002 (24.12.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/08987
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AMAGAI M. et al., Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acantholysis in vivo in neonatal mice., <i>J.Clin.Invest.</i> , 1998, Vol.102, No.4, p.775-82	7, 8
X	JP 8-188540 A (Takeji NISHIKAWA), 23 July, 1996 (23.07.96), Particularly, page 7, right column, lines 1 to 15; sequence No. 1 (Family: none)	10-16
X	AMAGAI M. et al., Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion., <i>Cell</i> , 1991, Vol.67, No.5, p.869-77	10-14
P, X	TSUNOBA K. et al., A pathogenic antidesmoglein 3 monoclonal antibody recognizes the N-terminal adhesive region of desmoglein 3., <i>J.Invest.Dermatol.</i> , July 2002, Vol.119, No.1, pages 228, 125	1-3, 6, 7, 10-14, 18
A		7
A	OHYAMA M. et al., Immunologic and histopathologic characterization of active disease model mouse for pemphigus vulgaris., <i>J.Invest.Dermatol.</i> , Aug. 2001, Vol.117, No.2, pages 459, 416	1-18
A	ISHIKAWA H. et al., Molecular cloning of the mouse desmoglein 3 gene (Dsg3): genomic structure and homology with the human gene., <i>J.Invest.Dermatol.</i> , 1996, Vol.106, No.4, pages 848, 258	4, 5
	FUTEI Y. et al., Use of domain-swapped molecules for conformational epitope mapping of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris., <i>J.Invest.Dermatol.</i> , 2000, Vol.115, No.5, p.829-34	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/08987**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

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

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/08987									
<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int Cl⁷ C07K16/28, C07K14/47, C12N5/20, A61K67/027, A61K38/16, A61P31/12, A61P37/02, A61P43/00, G01N33/564 // C12N5/13</p>											
<p>B. 調査を行った分野 調査を行った最小項資料 (国際特許分類 (IPC)) Int Cl⁷ C07K16/28, C07K14/47, C12N5/20, A61K67/027, A61K38/16, A61P31/12, A61P37/02, A61P43/00, G01N33/564</p>											
<p>最小項資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>											
<p>国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー</th> <th>引用文献名 及び一般の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X/ Y/ A</td> <td>Tsunoda K et al, Development of anti-desmoglein 3 (Dsg3) pathogenic monoclonal antibody using active disease mouse model for pemphigus vulgaris (PV) . . J Invest Dermatol, Aug., 2001, Vol. 117, No. 2, p. 394, 028</td> <td>1-3, 6, 9, 18/ 7, 8/ 4, 5</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Tsunoda K et al, Production of anti-desmoglein 3 mouse monoclonal antibodies using active disease mouse model for pemphigus . . J Invest Dermatol, 2000, Vol. 114, No. 4, p. 546, 579</td> <td>7, 8</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一般の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	X/ Y/ A	Tsunoda K et al, Development of anti-desmoglein 3 (Dsg3) pathogenic monoclonal antibody using active disease mouse model for pemphigus vulgaris (PV) . . J Invest Dermatol, Aug., 2001, Vol. 117, No. 2, p. 394, 028	1-3, 6, 9, 18/ 7, 8/ 4, 5	Y	Tsunoda K et al, Production of anti-desmoglein 3 mouse monoclonal antibodies using active disease mouse model for pemphigus . . J Invest Dermatol, 2000, Vol. 114, No. 4, p. 546, 579	7, 8
引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一般の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号									
X/ Y/ A	Tsunoda K et al, Development of anti-desmoglein 3 (Dsg3) pathogenic monoclonal antibody using active disease mouse model for pemphigus vulgaris (PV) . . J Invest Dermatol, Aug., 2001, Vol. 117, No. 2, p. 394, 028	1-3, 6, 9, 18/ 7, 8/ 4, 5									
Y	Tsunoda K et al, Production of anti-desmoglein 3 mouse monoclonal antibodies using active disease mouse model for pemphigus . . J Invest Dermatol, 2000, Vol. 114, No. 4, p. 546, 579	7, 8									
<p><input checked="" type="checkbox"/> 〇欄の傍にも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に普及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>											
<p>国際調査を完了した日 06.12.02 国際調査報告の発送日 24.12.02</p>											
<p>国際調査機関の名称及びあて先 日本特許庁 (ISA/JPI) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区電気が三丁目4番3号</p>		<p>特許庁審査官 (権限のある職員) 六登 紀子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP02/08987
C (続き)	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Amagai M et al, Use of autoantigen-knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus., J Clin Invest, 2000, Vol. 105, No. 5, p. 625-31	7, 8
Y	Amagai M et al, Antibodies against desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) are present in sera from patients with paraneoplastic pemphigus and cause acantholysis in vivo in neonatal mice., J Clin Invest, 1998, Vol. 102, No. 4, p. 775-82	7, 8
X	JP 8-188540 A, (西川武二)1996.07.23 特にp. 7, 右欄, 第1~15行及び配列番号1 パテントファミリーなし	10-16
X	Amagai M et al, Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion., Cell, 1991, Vol. 67, No. 5, p. 869-77	10-14
P, X	Tsunoda K et al, A pathogenic antidesmoglein 3 monoclonal antibody recognizes the N-terminal adhesive region of desmoglein 3., J Invest Dermatol, July, 2002, Vol. 119, No. 1, p. 228, 126	1-3, 6, 7, 10-14, 18
A	Ohyama M et al, Immunologic and histopathologic characterization of active disease model mouse for pemphigus vulgaris., J Invest Dermatol, Aug., 2001, Vol. 117, No. 2, p. 459, 416	7
A	Ishikawa H et al, Molecular cloning of the mouse desmoglein 3 gene(Dsg3): genomic structure and homology with the human gene., J Invest Dermatol, 1996, Vol. 106, No. 4, p. 848, 258	1-18
A	Futei Y et al, Use of domain-swapped molecules for conformational epitope mapping of desmoglein 3 in pemphigus vulgaris., J Invest Dermatol, 2000, Vol. 115, No. 5, p. 829-34	4, 5

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JPO2/08987
<p>第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)</p> <p>法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</p>	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲17に係る発明は人の身体の治療による処置方法であるから、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p>	
<p>第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)</p> <p>次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期限内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期限内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。</p>	
<p>4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期限内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。</p>	
<p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。</p>	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I		
C 0 7 K 14/00	C 0 7 K 16/18	Z N A	
C 0 7 K 16/18	C 1 2 P 21/08		
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/15	Z	
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/48	N	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z	
G 0 1 N 33/48	G 0 1 N 33/53	N	
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 5/00	B	
G 0 1 N 33/53	A 6 1 K 37/02		

(72)発明者 小安 重夫
東京都新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部内

(注) この公表は、国際事務局（W I P O）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	天疱疮单克隆抗体		
公开(公告)号	JPWO2003020769A1	公开(公告)日	2005-02-03
申请号	JP2003525039	申请日	2002-09-04
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
申请(专利权)人(译)	学校法人庆应义塾		
[标]发明人	角田和之 天谷雅行 西川武二 小安重夫		
发明人	角田 和之 天谷 雅行 西川 武二 小安 重夫		
IPC分类号	C12N15/02 A01K67/027 A61K38/00 A61K38/17 A61P17/00 A61P31/12 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 C07K14/00 C07K16/18 C07K16/28 C12N5/10 C12N5/20 C12N15/13 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/564		
CPC分类号	A61K38/177 A61P17/00 A61P31/12 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/18 C07K16/28 C07K2317/34 G01N33/564 G01N2333/705		
FI分类号	C12N15/00.C A01K67/027 A61P17/00 A61P37/06 C07K14/00 C07K16/18.ZNA C12P21/08 G01N33/15.Z G01N33/48.N G01N33/50.Z G01N33/53.N C12N5/00.B A61K37/02		
优先权	2001267653 2001-09-04 JP		
其他公开文献	JP3817587B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了具有能够诱导天疱疮病变的病理活性的单克隆抗体，用作该单克隆抗体特异性识别的天疱疮自身免疫性疾病的治疗药物的肽等。由于使用自体抗原模型小鼠制备的寻常型天疱疮模型小鼠的脾细胞中存在产生抗小鼠Dsg3抗体的细胞，因此用聚乙二醇处理此类模型小鼠的脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞。细胞融合后，制备杂交瘤，制备针对Dsg3的单克隆抗体，并从可变区（重链/轻链）中筛选出具有能够诱导天疱疮病变的病理活性的单克隆抗体。确定链的碱基序列和氨基酸序列，并确定其特异性表位部分。

Table 1. Primers used for domain swapped human Dsg molecules

Constructs	Primers for hDsg1		Primers for hDsg3	
	5' primers	3' primers	5' primers	3' primers
Dsg1 ¹⁻²⁴ /Dsg3 ²⁵⁻⁵⁶⁶	primer 1	primer 2	primer 3	primer 4
Dsg1 ¹⁻⁶⁴ /Dsg3 ⁶⁵⁻⁵⁶⁶	primer 1	primer 5	primer 6	primer 4
Dsg1 ¹⁻⁸⁷ /Dsg3 ⁸⁷⁻⁵⁶⁶	primer 1	primer 7	primer 8	primer 4
hDsg3 ²¹⁻¹⁰ /hDsg1 ¹¹⁻⁴⁹⁶	primer 9	primer 10	primer 11	primer 12
Dsg3 ¹⁻²⁶ /Dsg1 ²⁶⁻⁴⁹⁶	primer 13	primer 14	primer 15	primer 16
hDsg3 ¹⁻³⁴ /hDsg1 ³⁵⁻⁴⁹⁶	primer 17	primer 10	primer 11	primer 18
Dsg3 ¹⁻⁶³ /Dsg1 ⁶³⁻⁴⁹⁶	primer 19	primer 14	primer 15	primer 20
Dsg3 ¹⁻⁸⁹ /Dsg1 ⁸⁹⁻⁴⁹⁶	primer 21	primer 14	primer 15	primer 22