

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02002/022683

発行日 平成16年1月22日(2004.1.22)

(43) 国際公開日 平成14年3月21日(2002.3.21)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 N 15/09
C 0 7 K 14/47
C 0 7 K 16/18
C 0 7 K 19/00
C 1 2 N 5/06

F I

C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 K 14/47
C 0 7 K 16/18
C 0 7 K 19/00
G O 1 N 33/53 Y

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 45 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2002-526933(P2002-526933)	(71) 出願人	000253503
(21) 国際出願番号	PCT/JP2001/007919		麒麟麦酒株式会社
(22) 国際出願日	平成13年9月12日(2001.9.12)		東京都中央区新川二丁目10番1号
(31) 優先権主張番号	特願2000-277352(P2000-277352)	(74) 代理人	100091096
(32) 優先日	平成12年9月12日(2000.9.12)		弁理士 平木 祐輔
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100096183
(81) 指定国	AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, C N, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW	(72) 発明者	渡会 浩志
			群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内
		(72) 発明者	山口 泰範
			群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規樹状細胞膜分子及びその用途

(57) 【要約】

本発明は、ヒト樹状細胞(DC)の成熟化に伴い発現が顕著に上昇する配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する単離されたヒト樹状細胞膜分子およびその変異体、それらをコードするDNA、ならびに、膜分子または変異体を用いて樹状細胞を分離または検出する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する単離されたヒト樹状細胞膜分子、あるいは該アミノ酸配列において 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入および/または付加を含む、免疫応答を制御し得るその変異体。

【請求項 2】

細胞外ドメインに相当する配列番号 1 の 29 ~ 465 位のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載の変異体。

【請求項 3】

配列番号 1 の 29 ~ 465 位のアミノ酸配列を有する蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質 10
である、請求項 2 に記載の変異体。

【請求項 4】

他の蛋白質がヒト由来である、請求項 3 に記載の変異体。

【請求項 5】

配列番号 1 の 29 ~ 465 位のアミノ酸配列を有する蛋白質とヒト IgG1Fc ドメインとの融合蛋白質である、請求項 3 に記載の変異体。

【請求項 6】

T 細胞の増殖および活性化を抑制する作用を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のヒト樹状細胞膜分子またはその変異体。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のヒト樹状細胞膜分子またはその変異体をコードする DNA またはその相補体。 20

【請求項 8】

配列番号 1 のアミノ酸配列またはその部分配列をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 7 に記載の DNA またはその相補体。

【請求項 9】

配列番号 1 の 29 ~ 465 位のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 7 に記載の DNA またはその相補体。

【請求項 10】

配列番号 2、配列番号 7 および配列番号 8 からなる群から選択される塩基配列を有する、 30
請求項 7 に記載の DNA またはその相補体。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のヒト樹状細胞膜分子もしくはその変異体またはそれらの断片と特異的に免疫結合する抗体あるいはその断片。

【請求項 12】

前記ヒト樹状細胞膜分子の細胞外領域を認識することを特徴とする、請求項 11 に記載の抗体またはその断片。

【請求項 13】

ポリクローナル抗体、ペプチド抗体またはモノクローナル抗体である、請求項 11 または 12 に記載の抗体またはその断片。 40

【請求項 14】

前記断片が $F(ab')_2$ である、請求項 11 ~ 13 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項 15】

T 細胞の増殖および活性化を亢進する作用を有する、請求項 11 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項 16】

T 細胞と樹状細胞との細胞比率に応じて T 細胞の増殖を亢進または抑制する特徴を有する、請求項 11 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項 17】

B細胞によるIgM産生を抑制する活性を有する、請求項11～14のいずれか一項に記載の抗体またはその断片。

【請求項18】

請求項11～17のいずれか一項に記載の抗体またはその断片を用いてヒトまたは他の動物由来の成熟樹状細胞を分離する方法。

【請求項19】

請求項11～17のいずれか一項に記載の抗体またはその断片を用いて成熟樹状細胞を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、ヒト樹状細胞(Dendritic Cell; 以下DCともいう)、特に成熟樹状細胞に発現する膜分子、該膜分子をコードするDNA、該膜分子に対する抗体、ならびに該抗体を用いた成熟DC分離法および成熟DC検出法に関する。

発明の背景

自己免疫疾患の発症には(i)遺伝的背景、(ii)組織炎症反応のため遊離された本来免疫系にさらされることのなかった自己抗原の曝露や、ウイルス・細菌などの炎症反応から派生する局所環境、すなわち活性化されたT細胞の認識ペプチドの相同性によるいわゆる交差反応性T細胞の活性化などからくる局所環境の変化、さらには(iii)細胞膜上での副刺激分子(costimulatory molecule)の異常発現によるトレランスの破綻が起こり誘導された自己反応性T細胞の存在、などからなる要素が関わっている

と想定される。正常組織の刺激を受けていない抗原提示細胞は、自己抗原を提示していたとしても副刺激分子の発現が制御されているため、T細胞はアナジーに陥っており活性化されず自己寛容が維持されている。しかし、免疫異常状態においては過剰あるいは継続する副刺激分子の発現異常により自己反応性T細胞の活性化が生じた結果、自己免疫疾患が生じるのではないかと可能性が示唆されている。特にCD28/CD152とCD80/CD86間で生じるシグナルはT細胞活性化のコントロールに重要かつユニークな働きをしており、このシグナルを調節することによる免疫治療がマウス実験モデルにおいて試行され、実際ヒトに対する治験も行なわれ始めている。

樹状細胞(DC)は、生体内では骨髄に存在するCD34陽性細胞を前駆細胞として分化・成熟し、抗原提示細胞(APC)として、免疫応答の誘導、維持、拡大、調節において重要な役割を担っていることが知られている。1990年代に入って、DCを前駆細胞からサイトカインで分化・誘導できるようになり、大量のDCを扱えるようになって分子・細胞・生体レベルにおいてDCの免疫応答における役割の重要性が明らかになってくると共に、免疫制御の標的として注目されるようになった。

これまでの生物学的研究成果から、ヒト単球(Monocyte; Moともいう)をGM-CSF及びIL-4存在下で培養することによりDC(monocyte-derived DC; mo-DCともいう)を誘導することが可能であることが明らかとなっている[J. Leucocyte Biol.、59巻、208-218頁(1996年)]。このin vitro分化誘導系は人工的な部分があるものの、実際にDCとしての機能を有することが明らかとなってきた。DCの重要な機能は、抗原の細胞内への取り込み作用(食作用)及びその抗原の情報をT細胞に伝えてT細胞を刺激活性化することである。また、DCは分化の段階によって未成熟DC(Immature DC)と成熟DC(Mature DC)の二つに分別することができる。未成熟DC内に取りこまれた抗原は細胞内でプロセッシングを受け、抗原由来のペプチドとしてDC表面のMHCクラスII分子上に提示される。CD4陽性の抗原特異的ヘルパーT細胞は、抗原受容体で抗原由来のペプチドとMHCクラスII分子の複合体を認識し、共刺激分子からの刺激なども加わり、感作、活性化される。また、DCによりMHCクラスII分子を介してCD8陽性の細胞傷害性T細胞(CTL)も刺激、活性化される。食作用は未成熟mo-DCで強く、成熟mo-DCでは弱くなる。T細胞への抗原提示能は、それに関与するCD40、CD8

10

20

30

40

50

0、CD86、MHCクラスI分子、MHCクラスII分子の発現の程度と一致して、未成熟mo-DCでは弱く、成熟mo-DCになると強くなる。

ところで、抗原取込能から抗原提示能という機能変化に伴って細胞表面上に提示される膜分子の変化が起こることは想像に難くないが、この成熟化(maturation)の過程でどのような事象が起こっているかを考えた場合に、細胞膜表面上に新たに発現した分子の発現はすべてmRNAの発現から起こるとは限らないという事実が存在する。例えば未熟な(Immature)段階から発現が見られるHLA-DRが成熟化に伴ってmRNA及びタンパク質の発現量の変化をほとんど伴わずに細胞内から細胞膜表面上に移動(translocation)するということが知られている。また、実際のmRNAの発現量とタンパク質の発現量を比較した場合にほとんど相関がない場合や、mRNAは発現しているのにタンパク質として翻訳されていない場合も存在する[Biochem. Biophys. Res. Commun.、231巻、1-6頁(1997年)]。これまで遺伝子側からは増幅可能なこと、大量に解析することが可能なこと、ハンドリングが容易なこと、数々の手法が編み出せることなどから精力的に解析がなされてきたが、実際に発現しているタンパク質の変化を追うことができれば、そのような変化は細胞内の事象をよりよく反映しており現実に近いものということができるといえるのも事実である。

DCに関しては、上述の知見に加えて、DCにいくつかのサブセットが存在することも明らかになっているが、そのようなサブセットは未成熟、成熟で機能が異なることが知られている。しかしサブセット間でのそのような機能の違いが何に起因するのか、その答えは得られていない。少なくとも細胞内シグナリングに関与すると考えられる膜分子、特にDCの成熟化に伴って発現する膜分子、の解明が待たれるところである。

前述のように、生体内に存在する強力なAPCであるDCは活性化刺激に伴い成熟化すると、B7ファミリーに属するCD80/CD86を高発現することが知られている。自己免疫疾患との関わりについては、例えば慢性関節リウマチの関節液や乾癬の病巣部組織内、アレルギー性接触性皮膚炎の皮膚組織に存在するDCはCD80/CD86が異常発現になっていることが知られている。

CD28は、ナイーブT細胞の活性化を強力に増強させる特徴を有する。このCD28によるシグナルの存在によりIL-2の産生及びIL-2レセプターの発現が増強され、増殖反応が亢進し、結果的にT細胞の様々なエフェクター機能が増強されることになる。CD28シグナルはIL-2だけでなくIL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , TNF- α , GM-CSFなど様々なサイトカイン産生も増強させる。またCD40リガンドのようなT細胞活性化抗原やIL-8, RANTESなどのケモカイン発現にも関与している。CD80あるいはCD86のCD28への結合がCD4陽性T細胞のTh1あるいはTh2への分化誘導に関与していることを示す多くの報告がある。しかし、CD80はTh1、CD86はTh2といったような一面的なものではなく、ナイーブCD4陽性T細胞の分化方向の決定は、CD28およびCD152シグナル以外にも抗原あるいはAPCそのものから規定されてくる様々な因子によって影響を受けると考えられる。しかしながら、CD28シグナルが特にナイーブT細胞のTh2分化・活性化において他の分子の機能によって代償されない重要な役割を担っていることが、(i)CD28ノックアウトマウスにおけるTh2サイトカイン依存性の免疫グロブリンであるIgG1, IgG2bの選択的産生障害[Science、261巻、609-612頁(1993年)]や(ii)DO11-10TCRトランスジェニックマウスCD4陽性T細胞とCD80/CD86ダブルノックアウトマウス由来APCによる抗原刺激によるTh2分化の選択的阻害[J. Immunol.、161巻、2762-2771頁(1998年)]などの結果から裏付けられている。また、CD28シグナルのもうひとつの重要な役割として、bcl-xLのようなサバイバル因子の発現を増強させ、抗原刺激を受けた後のT細胞のアポトーシスを抑制することが挙げられる。

CD28が恒常的にT細胞に発現しているにもかかわらず、組織細胞においてCD80/CD86の発現が制御されているために、たとえ自己抗原に反応するT細胞が存在しても過剰な免疫反応が起こらないような仕組みになっている。このトレランス誘導システムが

10

20

30

40

50

破綻した場合には、自己免疫疾患やアレルギー疾患等の様々な疾患が引き起こされる可能性を秘めている。脾臓β細胞にCD80あるいはCD86を強制発現させただけでは脾臓への炎症性リンパ球浸潤は認められるが、自己免疫性糖尿病であるインスリン依存性糖尿病(1DDM)の発症には至らず、主要組織適合抗原複合体(MHC)クラスII分子、TNF-α、あるいは自己抗原としてのウイルスタンパク質をCD80とともに発現させてはじめてβ細胞の破綻を伴う1DDMを発症させることができる。このことはCD28-CD80/CD86シグナルに加え、T細胞レセプター(TCR)シグナルの強化を促すような環境下に置かれてはじめて自己免疫疾患が発症する可能性が示唆されている。いくつかのヒト臓器特異的自己免疫疾患においてCD80/CD86の発現がDCやマクロファージのようなプロフェッショナルAPCにおける発現が報告されている。このように正常組織のAPCにおいては制御下にあるCD80/CD86が、疾患局所においては異常発現している例が数多く見つかってきており、自己免疫疾患との関連が示唆されている。

10

現在、自己免疫疾患の治療は副作用の多い非特異的な免疫抑制剤が中心である。副刺激(costimulation)阻害では、抗原特異的な抑制及び投与終了後における持続効果があり、投与期間短縮による副作用の軽減や感染症防御免疫反応の維持が期待できる。免疫系細胞の相互作用や機能が明らかになっていくのにしたがってより効果的な治療が行なわれることが期待される。活性化T細胞に発現がみられるCD28ファミリーの分子としてICOS(inducible T cell co-stimulator)やPD-1が見つかってきている。これらはそれぞれB7ファミリーに属するB7-H2、B7-H1がそのリガンドであることが明らかとなり、複数のB7ファミリーとCD28ファミリーを介したAPCによるT細胞に対する副刺激作用の差異の解明が待たれるところである。

20

本発明者らは、DCの機能発現に重要となるDCの成熟化に着目し、DCの成熟によって発現量が上昇する膜分子の同定を中心とした探索研究を、プロテオミクス(Proteomics)によるDCの成熟により発現が調節される膜分子の網羅的同定を基に実施してきた。プロテオミクスとは、タンパク質について、遺伝子のゲノミクス(Genomics)に対応した言葉であり、タンパク質の大規模研究を行うものである。タンパク質の発現量、翻訳後の修飾や相互作用などの性質を研究し、例えば正常細胞とがん細胞において発現タンパク質レベルで何が起きているか、細胞内ネットワークやプロセスなどの全体的な生物学的情報を得るものである。

30

DCに特異的に存在する膜分子が同定されるならば、該膜分子に対する抗体の作製や、医療分野での該抗体の利用が可能となるだろう。

本発明の目的は、強力なAPCである成熟DC上に発現している本分子を標的としてDCの機能制御による自己免疫疾患等を制御することである。

また、該分子は成熟DCなどのAPCに発現し、T細胞活性化に関わる分子と予想されることから、該分子を特異的に認識する抗体を使用して成熟DC等のAPCを分離する方法、および検出する方法を提供することである。

発明の概要

本発明者らは、DCの成熟化により発現が調節される膜分子を探索研究した結果、未成熟DCと成熟DCとの間で、成熟DC特異的に発現がみられる新規膜分子を同定し、この分子がDCの成熟化に伴い、そのタンパク質レベルでの発現が顕著に上昇することを今回見出した。この膜分子は従来知られているB7ファミリーに属する4種の分子(B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2)とホモロジーを有していることが明らかとなった。これまで知られているB7ファミリーに属する4種の分子間のホモロジーは細胞外ドメインについてアミノ酸一致で25%前後であり、本膜分子と最もホモロジーの高い分子は細胞外ドメインについてB7-H1で31%であった。また本膜分子はB7ファミリーに特徴的な2つのイムノグロブリン(Ig)ドメインの2つの繰り返し構造を有し、計4つのIgドメインからなることが推定されており、立体構造の保持に必須のS-S結合に関わるCys残基の位置が保存されていた。これらのことから本膜分子は、新規の副刺激分子

40

50

であることが予想された。

最近の研究成果から 1) DC は不均一な細胞集団でありいくつかのサブセットが存在すること [*Stem Cells*、15 巻、409 - 419 頁 (1997 年)]、2) DC サブセットは T 細胞活性化において異なる機能 (アポトーシス誘導、T 細胞の Th1, Th2 への分化誘導など) をもつこと [*Science*、283 巻、1183 - 1186 頁 (1999 年)]、3) DC を介して免疫応答を制御することが可能であること (DC 療法、DC 特異的な薬剤、抗体、サイトカインなど)、が明らかになってきた。

ヒト DC サブセットとしては大別して、ミエロイド系 DC とリンパ球系 DC とがある。ミエロイド系 DC には 2 つの分化経路が存在することが示されており [*J. Exp. Med.*、184 巻、695 - 706 頁 (1996 年)]、CD34 陽性の造血幹細胞を GM-CSF と TNF- α で培養する系では CD14 陽性 CD1a 陰性および CD14 陰性 CD1a 陽性の前駆細胞が出現し、前者からは真皮 (dermal) DC、後者からは表皮ランゲルハンス細胞に分化することが知られている。本発明者らが用いた mo-DC は生体内では前者由来の DC と類似しており、ミエロイド系 DC に属すると考えられている。一方、ヒトリンパ球系 DC は、形質細胞様の CD4 陽性 T 細胞が IL-3 存在下で未熟な DC (CD11c 陰性、CD14 陰性) へと分化し、IL-3 と CD40 リガンドの刺激により DC として機能的に成熟することが知られている [*J. Exp. Med.*、185 巻、1101 - 1111 頁 (1997 年)]。また、mo-DC は CD40 リガンドあるいはエンドトキシンによる刺激によりナイーブ T 細胞を Th1 に分化・誘導する機能を有する所謂 DC1 に分化するという報告がある [*Science*、283 巻、1183 - 1186 頁 (1999 年)]。このように本発明者らが用いた mo-DC は少なくとも DC1 に分化し得る一群であることがわかる。また、末梢血には少なくとも 2 つの DC サブセットが存在しており、系統マーカー (CD3、CD19、CD56、CD14) 陰性、HLA-DR 陽性、CD11c 陽性と系統マーカー (CD3、CD19、CD56、CD14) 陰性、HLA-DR 陽性、CD11c 陰性、CD123 強陽性の表現型を示す。それら DC は成熟した後、前者は DC1、後者はナイーブ T 細胞を Th2 に分化・誘導する機能を有する所謂 DC2 であることが知られている [*Blood*、95 巻、2484 - 2490 頁 (2000 年)]。

このように、本膜分子は mo-DC の成熟化に伴い発現が顕著に上昇していることなどの知見から、T 細胞活性化に関連する分子であることが考えられ、免疫応答を制御するための標的分子としても期待される。

一方、抗原をパルスした自己の末梢血 DC を用いた癌ワクチンのパイロットスタディも行なわれており [*Nature Med.*、2 巻、52 - 58 頁 (1996 年)]、本膜分子の成熟 DC での発現の特異性を利用して、特異的抗体を用いてパルス後の DC の成熟化を確認することができる。また、その際の成熟 DC と未成熟 DC との分離、成熟 DC の検出などにも有用である。

上記の知見に基き本発明を要約すると以下ようになる。

(1) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する単離されたヒト樹状細胞膜分子、あるいは該アミノ酸配列において 1 個もしくは複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入および/または付加を含む、免疫応答を制御し得るその変異体。

(2) 細胞外ドメインに相当する配列番号 1 の 29 ~ 465 位のアミノ酸配列を含む上記 (1) に記載の変異体。

(3) 配列番号 1 の 29 ~ 465 位のアミノ酸配列を有する蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質である、上記 (2) に記載の変異体。

(4) 他の蛋白質がヒト由来である、上記 (3) に記載の変異体。

(5) 配列番号 1 の 29 ~ 465 位のアミノ酸配列を有する蛋白質とヒト IgG1Fc ドメインとの融合蛋白質である、上記 (3) に記載の変異体。

(6) T 細胞の増殖および活性化を抑制する作用を有する、上記 (1) ~ (5) のいずれかに記載のヒト樹状細胞膜分子またはその変異体。

(7) 上記 (1) ~ (6) のいずれかに記載のヒト樹状細胞膜分子またはその変異体を

10

20

30

40

50

コードするDNAまたはその相補体。

(8) 配列番号1のアミノ酸配列またはその部分配列をコードするヌクレオチド配列を含む、上記(7)に記載のDNAまたはその相補体。

(9) 配列番号1の29～465位のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、上記(7)に記載のDNAまたはその相補体。

(10) 配列番号2、配列番号7および配列番号8からなる群から選択される塩基配列を有する、上記(7)に記載のDNAまたはその相補体。

(11) 上記(1)～(6)のいずれかに記載のヒト樹状細胞膜分子もしくはその変異体またはそれらの断片と特異的に免疫結合する抗体あるいはその断片。

(12) 前記ヒト樹状細胞膜分子の細胞外領域を認識することを特徴とする、上記(11)に記載の抗体またはその断片。 10

(13) ポリクローナル抗体、ペプチド抗体またはモノクローナル抗体である、上記(11)または(12)に記載の抗体またはその断片。

(14) 前記断片がF(ab')₂である、上記(11)～(13)のいずれかに記載の抗体またはその断片。

(15) T細胞の増殖および活性化を亢進する作用を有する、(11)～(14)のいずれかに記載の抗体またはその断片。

(16) T細胞と樹状細胞との細胞比率に応じてT細胞の増殖を亢進または抑制する特徴を有する、上記(11)～(14)のいずれかに記載の抗体またはその断片。

(17) B細胞によるIgM産生を抑制する活性を有する、上記(11)～(14)のいずれかに記載の抗体またはその断片。 20

(18) 上記(11)～(17)のいずれかに記載の抗体またはその断片を用いてヒトまたは他の動物由来の成熟樹状細胞を分離する方法。

(19) 上記(11)～(17)のいずれか一項に記載の抗体またはその断片を用いて成熟樹状細胞を検出する方法。

本明細書中で使用する本発明の抗体に関する「特異的に免疫結合する」という用語は、本発明の抗体が本膜分子のみが有するエピトープと免疫学的に交差反応し、そのようなエピトープをもたないタンパク質と交差反応しないことを意味する。このようなエピトープは、例えば本発明の膜分子のアミノ酸配列と他のタンパク質のアミノ酸配列とを整列比較することによって、本質的に異なる配列部分(連続する少なくとも5アミノ酸、好ましくは少なくとも8アミノ酸、さらに好ましくは少なくとも15アミノ酸)を選択することによって決定できる。 30

本明細書中で使用する「免疫応答を制御し得る」という用語は、本発明の天然型膜分子と同じまたは実質的に同じかまたはそのレベルを超えるT細胞活性化能を有していてもよいし、あるいは、T細胞の活性化を抑制もしくは阻害する能力を有していてもよいことを意味する。

発明の詳細な説明

以下に本発明をさらに詳細に説明する。

新規膜分子及びそれをコードするDNA

上述したように、本発明は、本膜分子がDCにおいて成熟化に伴って成熟DC特異的に発現がみられるという知見に基いている。 40

本発明のヒト樹状細胞膜分子は、ヒト単球から分化誘導したmo-DCをリポポリサッカライドで刺激し、その可否に基いて成熟DCを得たのち、細胞膜を調製し、その可溶性タンパク質についてコンカナバリンAセファロースクロマトグラフィー、小麦胚アグルチニンセファロースクロマトグラフィー、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動などの手法を用いて膜タンパク質を分画し、LC/MS(特にThermoquest社製LCQ)による微量分析にかけて同定された(後述の実施例1～5参照)。さらにLC/MS法で同定された複数の部分アミノ酸配列に基づくプライマーを合成し、成熟DC由来cDNAライブラリーを鋳型にしてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い本発明の膜分子の遺伝子断片を増幅し取得し、この遺伝子断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーショ 50

ンにより本発明の膜分子の遺伝子を含むクローンを選抜し、その塩基配列（配列番号2）およびアミノ酸配列（配列番号1）を決定した（後述の実施例6参照）。

本発明の新規膜分子は、ハイドロパシープロット解析（J. Exp. Med., 157巻, 105-132頁, 1982年）の結果、525あるいは534アミノ酸残基からなり、具体的には456または465残基からなるシグナル配列及び細胞外領域、24残基の膜貫通領域、45残基の細胞内領域を有していると予測される。さらにホモロジー検索およびモチーフ検索により、細胞外領域は8ヶ所のアスパラギン結合型糖鎖結合部位、8ヶ所のIgドメイン形成に必要なCys残基をもつ4つのIgスーパーファミリーに属する構造を有している。細胞外のIgドメインはN末端からVset, Cset, Vset, Csetからなる構造であり、Vset-Csetという単位が繰り返された構造を有する新規の分子であることが判明した。

10

本発明の膜分子は、遺伝子クローニングおよびDNA組換え技術を利用することによって、大量合成が可能である。そのための一般的な技術として、例えばSambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)やAusubelら, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)に記載されるような標準技術を使用できる。

20

上記標準技術によりヒト成熟DCからmRNAを取り出しcDNAライブラリーを作製する。配列番号3または4に記載された配列に基き合成した特異的プローブを用いて該ライブラリーをスクリーニングし目的のcDNAを得ることができる。あるいは、配列番号3または4の配列に基いて目的分子の成熟配列を含む配列を増幅するためのセンスおよびアンチセンスプライマーを合成し、該cDNAライブラリーを鋳型にしてPCRを行い、目的のcDNAを増幅することができる。PCRは自動サーマルサイクラー（automated thermal cycler）を用いて実施するのがよく、その反応は、耐熱性ポリメラーゼ（Taqなど）、鋳型DNAおよびプライマーの存在下、DNAの変性（例えば94, 15~30秒）、プライマーのアニーリング（例えば55, 30秒~1分）、および4種類の基質（dNTP）の共存下での伸長反応（例えば72, 30秒~10分）を1サイクルとして約25~40サイクル実施し、さらに70~75で5~15分加熱することによって行うことができる。プライマーのサイズは通常少なくとも15ヌクレオチドである。

30

本発明の膜分子をコードするcDNAは、適当な転写／翻訳調節配列を含む発現ベクター（例えばプラスミド、ファージ、コスミド、ウイルスなど）に組み込まれて、適当な宿主細胞（真核または原核細胞）の形質転換またはトランスフェクションまたは形質導入に使用することができる。

転写／翻訳調節配列には、使用する宿主／ベクター系に応じて選択されたプロモーターおよびエンハンサーを含めることができる。プロモーターとして、細菌系では例えばP_L, P_R, P_{trp}, P_{lac}など、酵母系では例えばP_{HO5}, GAP, ADH, AOX1プロモーターなど、動物細胞ではSV40初期プロモーター、レトロウイルスプロモーター、ヒートショックプロモーターなどを挙げることができる。

40

宿主細胞にはエシェリヒア属、バチルス属、シュドモナス属などの原核細胞、サッカロマイセス属、ピチア属などの酵母類、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、チャイニーズハムスター卵巢細胞（CHO）などの動物細胞が挙げられる。その他、昆虫細胞や植物細胞も使用可能である。

発現ベクターは、宿主に応じて種々のものが市販または寄託されており、あるいは文献等の刊行物に記載されており、それらを使用できる。例えば細菌用としてpQE（キアゲン社）、pBluescript II SK+（ストラタジーン社）、pET（ノバジェン社）などである。ベクターによって宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションす

50

る方法として、例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、プロトプラスト法、マイクロインジェクション法などが挙げられる。

形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞は適当な培養培地中で培養されて目的遺伝子を発現させ、産生した本発明の膜分子を培地中から、または宿主細胞中から回収する。細胞から回収する場合には、培養終了後、細胞を遠心分離等により分離し、水性緩衝液に懸濁し、音波処理、フレンチプレス、ダイノミルなどにより細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。膜分子の単離精製は、タンパク質の精製に用いられる一般的方法、例えばゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー、HPLC、電気泳動法、脱塩法、有機溶媒沈殿法などを任意に組合わせて行うことができる。

10

本発明のヒト樹状細胞膜分子およびその変異体は、T細胞の増殖および活性化を抑制する作用を有する（後述の実施例18～21参照）。

変異体

本発明はまた、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するヒト樹状細胞膜分子に加えて、該アミノ酸配列において1個もしくは複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入および/または付加を含む、免疫応答を制御し得るその変異体も提供する。本発明の変異体は、配列番号1に記載のアミノ酸配列、好ましくはその細胞外領域のアミノ酸配列と好ましくは80%以上、特に90%以上、より好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するのがよい。本明細書中で使用する「相同性」という用語は、2つ以上のアミノ酸配列または塩基配列間での配列の同一性または類似性を意味し、配列は例えば対角線図形法や頻度分布法などを含む慣用的方法で比較しうる。

20

天然型膜分子と高い相同性（好ましくは80%以上）を有しかつT細胞の活性化を制御する能力を有している限り、いかなる変異体も本発明の範囲内である。このような変異体は例えば、部位特異的突然変異法、PCR法などを用いて天然型膜分子に対し所望の改変（欠失、置換、挿入および/または付加）を導入することによって製造しうる（上記のSambrookら、およびAusubelら参照）。そのような改変として、例えば保存的アミノ酸間の置換、例えば酸性アミノ酸（アスパラギン酸とグルタミン酸）間、塩基性アミノ酸（リシンとアルギニン）間、疎水性アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、バリンなど）間の置換が挙げられる。

本発明の変異体の例は、細胞外ドメインに相当する配列番号1の29～465位のアミノ酸配列を含む蛋白質である。

30

本発明の変異体の他の例は、配列番号1の29～465位のアミノ酸配列を有する蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質である。他の蛋白質は、好ましくはヒト由来であり、たとえばヒトIgG1 Fcドメインが例示される。

本発明の変異体をヒトまたはマウスなどの他の動物由来のライブラリー等から得る場合には、配列番号2に示される塩基配列に基いてプローブを作製し、中度または高度のストリンジェント条件化でのハイブリダイゼーションの後、高ストリンジェント条件下で洗浄することによって目的の変異体をコードする遺伝子を取り出し、これを適当なベクターに組み込み、発現させることによって目的の変異体を得ることができる。高ストリンジェント条件の例は、0.5M NaHPO₄, 7% SDS, 1mM EDTA, 65℃でのハイブリダイゼーション、その後の0.1×SSC/0.1% SDS, 68℃での洗浄である（上記のAusubelら参照）。ハイブリダイゼーション条件は温度、イオン強度、プライマー長などを適宜選択することによって決定できるが、通常、温度が高いほど、またイオン強度が低いほどストリンジェンシーが高まる。したがって当業者は適するハイブリダイゼーション条件を選択可能である。

40

本発明にはまた、配列番号1のアミノ酸配列またはその部分配列をコードするヌクレオチド配列を含むDNAまたはその相補体も含まれる。具体的には、配列番号1の29～465位のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むDNAまたはその相補体を例示できる。さらに具体的には、そのようなDNAは配列番号2、配列番号7および配列番号8からなる群から選択される塩基配列を有する。

50

さらに本発明には、配列番号 2 に示される塩基配列と好ましくは 80% 以上、特に 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、最も好ましくは 98% の相同性を有する、上記変異体をコードする DNA またはその相補体も包含される。

抗体

B7 ファミリーの性質から推測して成熟 DC、活性化マクロファージ、活性化単球等にも本膜分子の発現が見られることが予想される。この知見を利用することにより活性化抗原提示細胞 (APC) を特異的に認識する本膜分子に対する抗体を得ることができる。

上記の特性を有するいずれの抗体も本発明に包含されるが、目的の抗体を得るための抗原エピトープは、本膜分子のアミノ酸配列 (配列番号 1) において抗原性の高い領域、表在性がある領域、二次構造をとらない可能性のある領域、他のタンパク質 (特に B7 ファミリーの他のタンパク質) とホモロジーがないか又は低い領域から選択されうる。ここで抗原性の高い領域は、Parkerらの方法 [Biochemistry、25 巻、5425 - 5432 頁 (1986 年)] によって推定可能である。表在性がある領域は、例えばハイドロパシーインデックスを計算しプロットすることによって推定可能である。二次構造をとらない可能性のある領域は、例えば、Chou と Fasman の方法 [Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol、47 巻 45 - 148 頁 (1978 年)] によって推定可能である。さらに、特に B7 ファミリーの他のタンパク質とホモロジーがないか又は低い領域は、本膜分子のアミノ酸配列と他のタンパク質のアミノ酸配列との相同性比較によって推定可能である。

上記の手法で推定された本膜分子の部分アミノ酸配列を基に、ペプチド合成法を利用することによって該アミノ酸配列からなるペプチドを合成することができる。目的のペプチドは、例えば、R. B. Merrifield [Science、232 巻、341 - 347 頁 (1986 年)] によって開発された固相ペプチド合成に基いた市販のペプチド合成機を使用して合成し、保護基を脱離後、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等を単独もしくは組合わせた方法により精製する。得られた精製ペプチドはキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) やアルブミンなどのキャリアタンパク質と結合し免疫原として使用することができる。

さらに、遺伝子組換え本膜分子を免疫原として本膜分子に対するポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体を公知の手法により作製することもできる。この場合、本膜分子、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、または他のタンパク質に関して用いられる「組換え」という用語は、これらのタンパク質が宿主細胞内で組換え DNA によって生産されたものであることを意味する。宿主細胞としては、原核生物 (例えば大腸菌のような細菌) 及び真核生物 (例えば酵母、CHO 細胞、昆虫細胞等) のいずれも使用され得る。

本発明の「抗体」はペプチド抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体いずれでもよい。「抗体」は、マウスまたは他の適した宿主動物を免疫に用いられたタンパク質に特異的に結合するであろう抗体を産生するか、産生するであろうリンパ球を引き出すために、皮下、腹腔内、または筋肉内の経路によって、抗原あるいは抗原発現細胞により免疫化することによって得られる。さらに宿主動物としてはヒト抗体遺伝子のレパトリーを有するトランスジェニック動物に抗原または抗原発現細胞を投与し、所望のヒト抗体を取得してもよい [Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97 巻、722 - 727 頁 (2000 年)、国際公開公報 W096/33735、W097/07671、W097/13852、W098/37757 参照]。そのかわりに、リンパ球を *in vitro* で免疫化してもよい。宿主動物から得られた血清から、抗原に結合する画分を集め、精製することにより、ポリクローナル抗体を取得することができる。また、ハイブリドーマ細胞を形成するために、ポリエチレングリコールのような適当な融合試薬を用いて、リンパ球を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体を作製することができる (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice、59 - 103 頁、Academic press、1986 年)。例えば本発明のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法 [Nature、256 巻、495 頁 (1975 年)] を用いても、組換え DNA 法 (Cabilly ら、米

10

20

30

40

50

国特許 第 4 8 1 6 5 6 7 号)を用いても作製することができる。

抗原タンパク質は本膜分子のタンパク質の全てまたは部分配列をコードする DNA を、大腸菌や酵母、昆虫細胞、動物細胞などで発現させることにより調製することができる。遺伝子組換え本膜分子は、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等を単独もしくは組合わせた方法により精製し、この精製標品を免疫原として用いる。

また、本発明の抗体は、無傷の抗体であってもよいし、あるいは (F a b ')₂ や F a b などの抗体断片であってもよい。

また、定常領域をヒトの定常領域に置き換えたキメラ抗体 (例えばマウス - ヒトキメラ抗体; C a b i l l y ら、米国特許 4 8 1 6 5 6 7 及び M o r r i s o n ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 、 8 9 巻、6 8 5 1 頁 (1 9 8 4 年))、定常領域および超可変領域 (または、C o m p l e m e n t a r y - d e t e r m i n i n g r e g i o n ; C D R) を除く全ての可変領域をヒトの配列に置き換えたヒト化抗体 (C a r t e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 、 8 9 巻、4 2 8 5 頁、1 9 9 2 年及び C a r t e r ら、B i o T e c h n o l o g y 、 1 0 巻、1 6 3 頁、1 9 9 2 年) も本発明の抗体に含まれる。

また、このようにして得られた本発明の抗体に対する抗体、すなわち抗イディオタイプ抗体もまた本発明に含まれる。

このようにして得られた本膜分子に対する各種抗体は、その特徴を生かすことができる様々な用途に使用可能である。本膜分子が成熟 DC に特異的に発現が見られる分子であることを利用して、本抗体を蛍光性物質 (ローダミン、フルオレサミンなど) で標識し、周知の F A C S を用いて目的の DC を検出・分離したり、m o - D C の i n v i t r o での分化を確認することができる。さらに、本膜分子は DC の成熟化に伴って発現量が顕著に上昇するタンパク質であることから、本抗体を用いて F A C S により未成熟 DC と成熟 DC を分離することもできる。本膜分子の検出に関しては、F A C S での検出にとどまるものではない。例えばウェスタンブロッティングにおいて本抗体を 1 次抗体として作用させることにより検出可能であることが予想されるし、タンパク質レベルでの発現確認を行うことができる。また本抗体を固相 (ポリスチレンビーズ、マイクロタイターウエル表面、ラテックスビーズなど) に結合して不均一系で、あるいは均一系で、免疫学的反応を行って相同な膜分子を検出、定量 (蛍光抗体法、E L I S A 、ラジオイムノアッセイなどの方法使用) することができる。この場合、免疫学的反応は競合反応であってもよいし非競合反応であってもよい。また 2 つ以上の抗体 (モノクローンまたはポリクローン) を用いるサンドイッチ法による反応も使用できる。上記における検出、定量のためには、当業界で公知のいずれの免疫学的手法も用いることができる。

その他、本膜分子の機能を評価する用途にも使用可能である。成熟 DC は強力な A P C であり、M H C クラス I I 分子を介した C D 4 陽性の T 細胞を刺激活性化及び M H C クラス I 分子を介した C D 8 陽性細胞障害性 T 細胞を刺激活性化することが知られている。これら機能を制御し得るか否かを確認するために、アロジェニック M L R (M i x e d L e u c o c y t e R e a c t i o n) での機能を抑制しうるか否かの確認、抗原特異的に C T L を誘導した場合にその機能を抑制しうるか否かの確認、さらに DC の抗原提示に関わる分子が否かの確認等の i n v i t r o でのアッセイにも使用可能である。

本発明の抗体はさらに、i n v i v o で免疫応答を制御するために使用することもできる。本発明の膜分子は、前述したとおり、副刺激分子であると予想され、T 細胞活性化に直接あるいは間接的に関わる膜分子であると予想される。後述の実施例 1 8 ~ 2 1 に見られるように、本発明の膜分子は T 細胞の増殖および活性化を抑制する作用を有している。このため、本発明の抗体が本膜分子と細胞上のカウンターレセプターとの結合を阻害する抗体であれば T 細胞の活性化を亢進することが予想される。実際、後述の実施例 2 2 および 2 3 では、該抗体による T 細胞の増殖および活性化が増強されることが確認された。一方、実施例 2 4 においては、自己リンパ球混合試験において、混合する T 細胞と DC との細胞比に応じて、該抗体が T 細胞の増殖を亢進したり、あるいは逆に抑制することが確認

された。このことは本発明の抗体がT細胞の増殖もしくは活性化を亢進または抑制するように作用することを示唆している。さらに実施例25に示されるように、本発明の抗体は、B細胞によるIgM産生を抑制する活性も有することが判明した。このように本発明の膜分子の機能制御可能な抗体を作用させることでDCの機能さらにはT細胞の機能を制御することによって免疫応答を制御し得ることが期待される。

さらには本膜分子および本膜分子のカウンターレセプターの可溶化型分子（すなわち、細胞外領域に相当する分子）およびこれら分子に対する抗体にも免疫応答を制御する活性が期待される。

本発明の抗体類または本膜分子の可溶化型分子を用いて本膜分子のカウンターレセプターを取得することも可能である。可溶化型本膜分子カウンターのレセプターは直接本膜分子に作用し、DC上の本膜分子を介したシグナルを制御し得るし、カウンターのレセプターを発現した細胞のカウンターのレセプターを介したシグナルをブロックし得る。また、本膜分子のカウンターのレセプターと本膜分子の相互作用をモジュレートできる低分子物質や本膜分子のカウンターのレセプター及び本膜分子に関わる細胞内シグナル経路をモジュレートする低分子物質もシグナルの制御に有用である。

本発明の抗体類または本膜分子の可溶化型分子、本膜分子のカウンターのレセプターの可溶化型分子、上記低分子を治療に用いる場合には、例えば癌、自己免疫疾患、臓器移植、感染症、アレルギーなどの疾患の治療に適用可能である。

投与方法および投与剤型は特に制限されないが、静脈、動脈内投与、筋内投与、経口投与、座剤投与などであり、薬学的に許容可能な賦形剤や希釈剤と組合わせて経口用または非経口用に処方することができるが、好ましくは非経口投与である。投与は1日あたり1回かまたは数回に分けて行い、投与量は患者の重篤度、年齢、性別、体重などの条件に応じて決定され、副作用を併発しない範囲である。

実施例

以下に本発明の実施例を記載するが、本発明はこれらの実施例によって限定されないものとする。

実施例1 DCの細胞膜の調製

細胞膜タンパク質の場合、元々発現量が低いこと、またハンドリングが難しいことが挙げられる。これを解決する手段の一つとして、より純度の高い細胞膜を取得する方法を確立することが必要である。細胞膜表面をコートし、これを均一に破碎することで、比重の重くなった細胞膜を密度勾配遠心により取得する方法で純度の高いDC細胞膜を調製した[J. Biol. Chem.、258巻、10062-10072頁(1983年)]。ターゲットとしている膜分子の発現量の少なさとハンドリングの難しさから、大量のヒトDCを集めるためにアフエーシス産物(単核球画分)から単球を分離してmo-DCを大量調製した。LPS(リポポリサッカライド)刺激あり、なしを同数の細胞で実施し、同数(5×10^8 細胞)の未成熟DCと成熟DCを得た。

実施例2 タンパク質の高感度検出とin gel digestion

Mannら[Anal. Chem.、68巻、850-858頁(1996年)]の手法に従って銀染色によりタンパク質を検出した。酵素消化法についてはトリプシンを用いたin gel digestion法[Anal. Chem.、224巻、451-455頁(1995年)]により行い、以下で使用する分析サンプルとした。

実施例3 膜タンパク質の画分

実施例1で得られた細胞膜より界面活性剤を用いて細胞膜タンパク質を可溶化した後、コンカナバリンAセファロースにアプライし、界面活性剤含有緩衝液にて洗浄した。これら素通り画分をConA FTと称した。吸着画分はメチル-alpha-D-グルコピラノシドと界面活性剤を含有した緩衝液で溶出した(ConA EL)。ConA FTは小麦胚アグルチニンセファロースに再度アプライし、界面活性剤含有緩衝液にて洗浄した。これら素通り画分をWGA FTと称した。吸着画分はN-アセチルグルコサミンと界面活性剤を含有した緩衝液で溶出した(WGA EL)。ConA EL、WGA EL、WGA FTを分子同定サンプルとした。これら画分をSDS-PAGEにて展開した

10

20

30

40

50

後、実施例 2 の手法によりタンパク質を検出し、短冊状に切ったゲルをゲル内消化 (i n g e l d i g e s t i o n) して分析サンプルとした。

実施例 4 LC / MS による微量分析

LC / MS (T h e r m o q u e s t 社製 LCQ) を用いて、実施例 3 で得たサンプルを分析した。95% 溶液 A (0.1% ギ酸) および 5% 溶液 B (0.08% ギ酸、80% アセトニトリル) で平衡化した P e p M a p 逆相カラム (内径 0.075 mm × 長さ 150 mm) (LC パッキングス社製) につけ、180 ナノリットル / 分の流速で、5 分洗浄後、67.5 分かけて溶液 B の比率を 50% まで直線的に上げることで順次溶出し MS に導入した。MS に導入されたサンプルは次の繰り返しサイクルでデータ取得を行い、その配列情報を得ることとした。1. F u l l M S S c a n : m / z = 0 ~ 2000 のレンジでの親イオンの分子量の観測。2. Z o o m M S S c a n : F u l l M S S c a n で同定された親イオンの価数の観測。3. M S / M S S c a n : Z o o m M S S c a n で測定された分子に H e ガスをあてた場合に生じる娘イオンの観測。理論的な b , y シリーズとどれだけの本数がどれだけの強度でマッチングするかをスコア化してランクをつける同定法 (S E Q U E S T アルゴリズム) により同定した [アメリカン・ソサイアティ・フォー・マス・スペクトロメトリー、5 巻、976 - 989 頁 (1994 年)]。

実施例 5 本膜分子の同定

実施例 4 の手法により同定された分子のうち、成熟 DC のみから新規分子である本膜分子が同定された。同定対象となったフラグメントは m / z = 1310.8 の 2 価イオンと m / z = 995.8 の 2 価イオンであり、その MS / MS のパターンは本膜分子の部分アミノ酸配列 (26 残基) S P T G A V E V Q V P E D P V V A L V G T D A T L R (配列番号 3) と部分アミノ酸配列 (18 残基) N P V L Q Q D A H S S V T I T P Q R (配列番号 4) に非常に良く帰属された。これら部分配列の n o n - r e d u n d a n t D N A d a t a b a s e に対するホモロジーサーチの結果、これら部分配列を有する塩基配列は他に存在しないことが明らかとなった。

実施例 6 本膜分子の遺伝子クローニング

実施例 5 で同定された 2 つの部分アミノ酸配列をヒトゲノムデータベースに対してサーチを実施したところ、A C 0 2 2 1 8 8 に乗っている遺伝子であることが判明した。さらに本膜分子の遺伝子はゲノム上重複があることが推定され、実施例 5 で同定した部分アミノ酸配列は重複している部分に乗っていることが明らかとなった。そこで、実施例 5 で明らかとなった部分アミノ酸配列に対応する遺伝子配列をもとにプライマーを合成し、成熟 DC c D N A ライブラリーを鋳型として R T - P C R を実施した。プライマーはそれぞれ 20 m e r で、センスプライマー 5' - A C C C C G T G C T G C A G C A G G A T - 3' (配列番号 5) とアンチセンスプライマー 5' - A T C C T G C T G C A G C A C G G G G T - 3' (配列番号 6) を用いた。この結果、約 800 b p の本膜分子の遺伝子断片を取得した。この遺伝子断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションにより本膜分子の遺伝子を含むクローンを選抜し、塩基配列を決定した。推定オープン・リーディング・フレーム (O R F) 構造を配列番号 2 に、推定されるアミノ酸配列を配列番号 1 に示す。

本膜分子の推定アミノ酸配列の一次構造について K y t e と D o o l i t t l e の方法 (J . E x p . M e d . , 157 巻、105 - 132 頁、1982 年) に従い、ハイドロパシープロット解析を行なった (図 1)。その結果、本膜分子は N 末端にシグナル配列を有する I 型の細胞膜貫通タンパク質であることが明らかとなった。本膜分子は 534 アミノ酸残基からなり、ハイドロパシープロット解析結果から、465 残基からなるシグナル配列 (配列番号 1 の 1 ~ 28 位) および細胞外領域 (配列番号 1 の 29 ~ 465 位)、24 残基の膜貫通領域、45 残基の細胞内領域を有していると予想される。さらにホモロジー検索並びにモチーフ検索の結果から細胞外領域は 8 ケ所のアスパラギン結合型糖鎖付加部位、8 ケ所のイムノグロブリン (I g) ドメイン形成に必要なシステイン残基を持つ 4 つのイムノグロブリンスーパーファミリーに属する構造を有していた。また、この細胞外の

10

20

30

40

50

I g ドメインはN末端側からV set、C set、V set、C setという構造であることが類推され、V set - C setという単位では繰り返し構造を取っており、アミノ酸配列に関しても95%のホモロジーを有していた。またこのV set - C setという単位で最もホモロジーの高い分子はB7 - H1 (B7 - homologue 1) でアミノ酸一致で31%であった。細胞外のV set - C setという単位はB7ファミリーに共通する構造であるが、本膜分子のようにB7ファミリーと一次配列でホモロジーを持ったV set - C setという単位が繰り返されている構造を有した分子はこれまで知られていない。

実施例 7 本膜分子に対するペプチド抗体の設計とペプチド合成並びにペプチド抗体作製

本膜分子に対する特異的ペプチド抗体を作製するために本膜分子の推定アミノ酸配列から設計を行なった。まず、Parkerの法則(前述)に従い抗原性の高い部分を選択し、これらの中からChouとFasmanの方法(前述)に基づき表在性がある部分、2次構造を取らない可能性のある部分、さらに糖鎖付加が予想されない部分、システイン残基を含まない部分について、シングルペプチドを合成した。選んだ領域は、以下のアミノ酸位置からなる配列: SPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLR(配列番号1の242~267位)である。これらシングルペプチドを精製し、0.2mg/mlの濃度で1mg/mlのキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に対してコンジュゲートした。このKLH-結合ペプチド(100μg)を免疫原として8回繰り返しウサギに免疫し、ペプチド抗体を作製した。

実施例 8 本膜分子の命名と推定構造予測

本膜分子は、構造的にIgスーパーファミリーの中でもB7ファミリーに属することから、BRIGHT(B7 Related Ig Superfamily Homologue Transmembrane Molecule)と命名した。また、BRIGHTは、マウスカウンターパートのアミノ酸配列予測並びに後述の実施例10におけるN末端アミノ酸配列分析から、534アミノ酸残基から構成されるI型膜蛋白質で、28残基のシグナル配列、437残基の細胞外領域、24残基の膜貫通領域、45残基の細胞内領域を有していると予想された。

実施例 9 ペプチド抗体の精製並びにウエスタン解析による評価

実施例7に記載の免疫したウサギの抗血清は配列番号1の242~267位に記載するペプチドに対する力価が20000倍以上に上昇した。本抗血清をProtein Gセファロース(Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いてIgGのみを特異的に結合させ、PBSにより洗浄後、0.1Mグリシン塩酸(pH2.8)により結合したIgG溶出した。溶出液は1Mトリス塩酸(pH7.5)を加えることで速やかに中和した。中和したIgGフラクションは濃縮後、Superdex 200pg(内径10mm×長さ300mm)(Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによりPBSに置換し、精製標品とした。得られたペプチド抗体標品を用いて、可溶化型組換え体BRIGHT(実施例11に記載)並びに単球由来DCであるmo-DCを用いたウエスタン解析を実施した。4/20グラジエントゲル(第一化学薬品製)を用いて還元条件で煮沸(95、5分)したサンプルをゲル1枚あたり25mAの定電流で1.5hr泳動後、PVDf膜にゲル1枚あたり150mAの定電流で1hr転写した。転写PVDf膜はブロックエース(雪印社製)などでブロッキング後、本ペプチド抗体を1次抗体として2μg/mlの濃度で、二次抗体としてHRP conjugated anti rabbit IgG(DAKO社製)を用いて反応させ、SuperSignal(Pierce社製)等のHRP発色試薬を用いることでBRIGHTを検出できることが明らかとなった。単球由来DC(mo-DC)では成熟化に依存的に発現が上昇する100kDa付近にブロードなバンドとして検出された。(図2参照)

実施例 10 CHO細胞によるBRIGHT可溶化型組換え体の産生

BRIGHT可溶化型組換え体について次の(i)、(ii)の2種類についてCHO細胞にて発現させた。(i)BRIGHT細胞外ドメイン(配列番号1の29-465位)

とヒトIgG1Fcドメインをフュージョン蛋白質として発現させたもの(BRIGHT-Igと称する)。(ii)BRIGHT細胞外ドメイン(配列番号1の29-465位)を発現させたもの(BRIGHT-SFと称する)。動物細胞発現用ベクターpTracerCMV(Invitrogen社製)のBRIGHT-Igの場合にはEcoRIサイトとApaIサイトの間に配列番号7に記す遺伝子を、BRIGHT-SFの場合にはEcoRIサイトとNotIサイトの間に配列番号8に記す遺伝子を組み込み、組換え大腸菌を作成し、大量にプラスミドを調製した。調製したプラスミドをトランスフェクション試薬IT-LT1(Mirus社製)を用いてOpti-MEM培地中でCHO細胞に遺伝子導入を行なった。BRIGHT発現細胞はGFPの発現を指標としたFACS Vantage(Becton Dickinson社製)を用いてシングルセルソートを行なった後、Zeocin(Invitrogen社製)による薬剤耐性クローンを取得した。無血清DF培地中で3日間培養した上清についてペプチド抗体を用いたウエスタン解析により高発現株を取得した。

実施例11 BRIGHT-IgおよびBRIGHT-SFの精製

BRIGHT-Ig:無血清DF培養上清を限外濾過膜(YM10、Millipore社製)を用いて10倍まで濃縮し、ProteinGセファロース(Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いてBRIGHT-Igのみを特異的に結合させ、PBSにより洗浄後、0.1Mグリシン塩酸(pH2.8)により結合したBRIGHT-Ig溶出した。溶出液は1Mトリス塩酸(pH7.5)を加えることで速やかに中和した。中和したBRIGHT-Igフラクションは濃縮後、Superdex 200pg(内径10mm×長さ300mm)(Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによりPBSに置換し、精製標品とした。BRIGHT-Ig標品はSDS-PAGEにおいて非還元条件化200-220kDa、還元条件化100-120kDaのブロードなバンドとして検出される(図3)。

BRIGHT-SF:無血清DF培養上清を限外濾過膜(YM10、Millipore社製)を用いて10倍まで濃縮し、WGAセファロース(Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いてBRIGHT-SFを結合させ、PBSにより洗浄後、PBS+0.1M N-アセチルグルコサミンにより溶出した。溶出液は透析により20mMトリス塩酸(pH8.0)に置換し、陰イオン交換クロマトグラフィーにより分画した。100%溶液A(20mMトリス塩酸(pH8.0))および0%溶液B(20mMトリス塩酸(pH8.0)、0.5M塩化ナトリウム)で平衡化したDEAE-5PW(内径4.6mm×長さ150mm)(東ソー社製)にかけ、1ml/分の流速で、5分洗浄後、50分かけて溶液Bの比率を50%まで直線的に上げるにより順次溶出した。溶出されたBRIGHT-Igフラクションに等量の2.5M硫酸アンモニウムを加え、疎水クロマトグラフィーにより分画した。100%溶液A(20mMトリス塩酸(pH6.8)、1.2M硫酸アンモニウム)および0%溶液B(20mMトリス塩酸(pH6.8))で平衡化したPhenyl-5PW(内径4.6mm×長さ150mm)(東ソー社製)にかけ、1ml/分の流速で、10分洗浄後、50分かけて溶液Bの比率を100%まで直線的に上げるにより順次溶出した。溶出されたBRIGHT-Igフラクションは濃縮後、Superdex 200pg(内径10mm×長さ300mm)(Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによりPBSに置換し、精製標品とした。BRIGHT-SF標品はSDS-PAGEにおいて非還元条件化65-80kDa、還元条件化70-90kDaのブロードなバンドとして検出される。(図4参照)

BRIGHT-IgならびにBRIGHT-SF両組換え体は、抗BRIGHTペプチド抗体を用いたウエスタン解析により特異的に染色が見られること、さらにアミノ酸配列分析装置(Model377、Perkin Elmer社製)を用いたN末端アミノ酸配列分析より、両組換え体とも29位のLeu残基をN末端アミノ酸とするBRIGHTのコードするアミノ酸配列が得られたことから、可溶化型組換え体であることを確認できて

いる。

実施例 1 2 抗 B R I G H T ポリクローナル抗体の作製と精製

B R I G H T - S F (1 0 0 μ g) を免疫原として 8 回繰返しウサギに免疫し、抗 B R I G H T ポリクローナル抗体 (以下、a n t i - B R I G H T p A b と称する) を作製した。免疫したウサギの抗血清は B R I G H T - S F に対する力価が 2 0 0 0 0 0 倍以上に上昇した。本抗血清を P r o t e i n G セファロース (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 社製) を用いて I g G のみを特異的に結合させ、P B S により洗浄後、0 . 1 M グリシン塩酸 (p H 2 . 8) により結合した I g G 溶出した。溶出液は 1 M トリス塩酸 (p H 7 . 5) を加えることで速やかに中和した。中和した I g G フラクシオンは濃縮後、S u p e r d e x 2 0 0 p g (内径 1 0 m m × 長さ 3 0 0 m m) (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 社製) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより P B S に置換し、精製標品とした。

同時にコントロール抗体として正常ウサギより血清を得、同様の精製手順により I g G フラクシオンを調製し、精製標品とした (以下、n o r m a l r a b b i t I g G と称する) 。

実施例 1 3 a n t i - B R I G H T p A b の F (a b ') ₂ フラグメントおよびビオチン標識 a n t i - B R I G H T p A b F (a b ') ₂ フラグメントの調製

実施例 1 2 で得られた a n t i - B R I G H T p A b 並びに n o r m a l r a b b i t I g G をペプシンで消化することにより F (a b ') ₂ フラグメントを得た。2 0 m M 酢酸ナトリウム (p H 4 . 5) 中で a n t i - B R I G H T p A b あるいは n o r m a l r a b b i t I g G を 1 m g / m l 、ペプシンを 0 . 1 m g / m l とし、3 7 ° C で 1 6 時間消化した。この操作により得られた a n t i - B R I G H T p A b の F (a b ') ₂ フラグメント (以下 a n t i - B R I G H T F (a b ') ₂ と称す) あるいは n o r m a l r a b b i t I g G の F (a b ') ₂ フラグメント (以下 n o r m a l r a b b i t I g G F (a b ') ₂ と称す) は濃縮後、S u p e r d e x 2 0 0 p g (内径 1 0 m m × 長さ 3 0 0 m m) (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 社製) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより P B S に置換するとともに未消化並びに他の消化断片、ペプシンを除去し、a n t i - B R I G H T F (a b ') ₂ および n o r m a l r a b b i t I g G F (a b ') ₂ の標品とした。

a n t i - B R I G H T F (a b ') ₂ 並びに n o r m a l r a b b i t I g G F (a b ') ₂ は、ビオチン化試薬を反応させることで標識することができる。1 0 m M H E P E S - N a O H (p H 8 . 5) に置換した a n t i - B R I G H T F (a b ') ₂ あるいは n o r m a l r a b b i t I g G F (a b ') ₂ (2 m g / m l , 1 m l) に 1 0 m M B i o t i n - A C ₅ - S u l f o - O S u (同仁化学製) を 2 μ l 加え、氷冷下、1 時間反応させた後、S u p e r d e x 2 0 0 p g (内径 1 0 m m × 長さ 3 0 0 m m) (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 社製) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより P B S に置換し、ビオチン標識 a n t i - B R I G H T F (a b ') ₂ (以下 a n t i - B R I G H T F (a b ') ₂ - b i o t i n と称す) およびビオチン標識 n o r m a l r a b b i t I g G F (a b ') ₂ (以下 n o r m a l r a b b i t I g G F (a b ') ₂ - b i o t i n と称す) 標品とした。

実施例 1 4 健常人末梢血単核細胞の分離

健常人より採取した末梢血は、凝固しないように C P D 液含有の採血バック (T E R U M O 社製) に採血後、遠心 (6 0 0 G 、室温、5 分) により血漿と血球画分を分離した。血漿を除いた血球画分を P B S で稀釈してから、F i c o l l - P a q u e (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 社製) に重層し、比重遠心 (4 0 0 G 、室温、3 0 分間) により単核細胞を分離した。単核細胞に混入した赤血球は、塩化アンモニウム緩衝液 (0 . 8 3 % N H ₄ C l - T r i s H C l 2 0 m M , p H 6 . 8) で室温 2 分間処理して溶血し、5 % F C S 含有 P B S (以下 P B S - F C S と称す) で単核細胞を洗浄した。この細胞集団を健常人末梢血単核細胞として用いた。

10

20

30

40

50

実施例 15 末梢血単核細胞の *in vitro* 活性化とフローサイトメーターによる B R I G H T の細胞表面上での発現解析

実施例 14 の方法で分離した末梢血単核細胞を 2.5×10^6 個 / ml となるように 10 % FCS を含む RPMI 1640 培地 (GIBCO BRL 社製) に浮遊し、6 ウェル培養皿 (#3046、Falcon 社製) に播種した。培地には最終濃度で、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ PHA (生化学工業製) または、 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ LPS (SIGMA 社製) または、 $50 \text{ ng} / \text{ml}$ 組換え体ヒト GM-CSF (キリンビール社) + $50 \text{ ng} / \text{ml}$ 組換え体ヒト IL-3 (キリンビール社) または、 $5 \text{ ng} / \text{ml}$ PMA (SIGMA 社製) + $250 \text{ ng} / \text{ml}$ Ionomycin (SIGMA 社製) を添加し、2 日間培養した。

末梢血単核細胞または *in vitro* 活性化した末梢血単核細胞を PBS-FCS で洗 10
 浄後、5 % FCS、10 mM EDTA、0.05 % アジ化ナトリウムを含む PBS (以下 PBS-FCS-EDTA- NaN_3 と称す) 1 ml に懸濁した。 $100 \mu\text{g}$ のヒト IgG を添加し、氷冷下、10 分間放置した後、anti-BRIGHT F(ab')₂-biotin $20 \mu\text{g}$ を添加し、氷冷下、30 分間放置した。対照群の細胞には normal rabbit IgG F(ab')₂-biotin $20 \mu\text{g}$ を添加し、氷冷下、30 分間放置した。細胞を PBS-FCS-EDTA- NaN_3 で洗 20
 浄後、PE (Phycoerythrin) 結合ストレプトアビジン (BD pharmingen 社製) を添加し、氷冷下、30 分間放置した。細胞を PBS-FCS-EDTA- NaN_3 で洗浄後、ヒト分化血球に特異的な抗原に対する FITC (fluorescein isothiocyanate) または APC (Alophycocyanine) また 20
 は PerCP 標識抗体すなわち、CD3、CD11c、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56、CD123、HLA-DR に対する抗体 (BD pharmingen 社) を添加し氷冷下、20 分間インキュベーションの後、フローサイトメーター (Becton Dickinson 社) により BRIGHT とヒト分化血球に特異的な抗原の発現を解析した。BRIGHT は末梢血単核細胞中の CD3、CD14、CD19、CD20、CD56 をそれぞれ発現する細胞集団の細胞膜上には発現が認められないが、LPS および組換え体ヒト GM-CSF + 組換え体ヒト IL-3 で活性化した CD14 陽性細胞で発現が認められた。また末梢血単核細胞中の DC1 に分化すると考えられる細胞 30
 集団すなわち系統マーカー (CD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56) 陰性、HLA-DR 陽性、CD11c 陽性細胞においては発現は認められないが、*in vitro* で組換え体ヒト GM-CSF + 組換え体ヒト IL-3 で活性化することによりこの細胞集団での発現の上昇が認められた。(図 5 参照)

実施例 16 ヒト単球由来 DC における B R I G H T の発現分布の解析

健常人末梢血から Ficoll-Paque を用いた密度勾配遠心法により分離した単核細胞を 1×10^8 個 / ml となるように 2 % ヒト血漿を含む PBS (PBS-plasma) に浮遊し、抗ヒト CD14 抗体結合磁性マイクロビーズ (Miltenyi Biotec 社製) を添加し氷冷下、30 分間放置した。細胞を PBS-plasma で洗浄後、マグネットによる磁場内に設置した分離カラム LS+ (Miltenyi Biotec 社製) に供して CD14 陽性細胞を分離した。ヒト単球を含む CD14 陽性細胞を 1×10^6 cells / ml となるように 10 % FCS 含有 RPMI 1640 培地に浮遊 40
 し、 $50 \text{ ng} / \text{ml}$ 組換え体ヒト GM-CSF (キリンビール社) と $100 \text{ ng} / \text{ml}$ 組換え体ヒト IL-4 (R&D systems 社製) を添加し、6 ウェル培養皿 (#3046、Falcon 社製) で培養を行なった。5 日間培養した細胞をヒト単球由来の未成熟 DC (Immature DC) とし、培養 5 日目の細胞に $10 \text{ ng} / \text{ml}$ LPS (SIGMA 社製) を添加してさらに 1 日間培養した細胞をヒト単球由来の成熟 DC (Mature DC) とした。ヒト単球由来 DC の成熟度合いは、HLA-DR と CD86 の発現上昇をフローサイトメトリーで解析することで確認した。

成熟または未成熟のヒト単球由来 DC を PBS-FCS-EDTA- NaN_3 1 ml に懸濁した。 $100 \mu\text{g}$ のヒト IgG を添加し、氷冷下、10 分間放置した後、anti-BRIGHT F(ab')₂ $20 \mu\text{g}$ を添加し、氷冷下、30 分間放置した。対照群の 50

細胞にはnormal rabbit IgG F(ab')₂ 20 μgを添加した。細胞をPBS-FCS-EDTA-NaN₃で洗浄後、PE標識抗ウサギIgG抗体F(ab')₂フラグメント(Southern Biotechnology Associates社製)を添加し、氷冷下、30分間放置した。細胞をPBS-FCS-EDTA-NaN₃で洗浄後、フローサイトメーターにより本膜分子の発現を解析した。BRIGHTは、組換え体ヒトGM-CSFと組換え体ヒトIL-4存在下でヒト単球より誘導した未成熟DCの細胞表面上で発現が認められ、またLPS刺激によるDCの成熟に伴い発現の上昇が認められた。(図6参照)

実施例 17 活性化T細胞に発現するBRIGHTカウンターレセプターの解析

BRIGHTは、そのアミノ酸配列が既知のB7ファミリーに属する副刺激分子と相同性が高いことから、機能においても副刺激分子としてT細胞上のカウンターレセプターを介してT細胞の活性化の制御に関わる分子であることが予想される。副刺激分子とそのカウンターレセプターとの結合を解析する方法としては、可溶化型組換え体を用いたカウンターレセプター発現細胞との結合実験が考えられるが、実際ヒトIgG1 Fc領域とCD80またはCD86との可溶化型キメラ蛋白質と、T細胞に発現するカウンターレセプターCD28との結合をフローサイトメーターで検出することができる。実施例10並びに11に記載のBRIGHT-Igを用いてT細胞上のカウンターレセプターの発現解析を行なった。健常人末梢血からFicoll-Paqueを用いた密度勾配遠心法により単核細胞を分離し、Pan T Cellアイソレーションキット(Miltenyi Biotec社製)を用いて、T細胞以外の細胞を除去するネガティブセクション法により純度99%以上のCD3陽性T細胞を調製した。T細胞を活性化する目的で、分離したCD3陽性T細胞を 2×10^6 個/mlとなるように10% FCSを含むRPMI1640培地に浮遊し、5 μg/ml PHA(phytohemagglutinin)(生化学工業製)を添加して、24または48時間培養を行なった。末梢血から分離直後およびPHAにより活性化させたT細胞を回収しPBS-FCSで洗浄後、3% FCS、0.02% アジ化ナトリウムを含むPBS(PBS-FCS-NaN₃)に懸濁し、200 μg/mlまたは50 μg/mlのBRIGHT-Igを添加して4、1時間放置した。対照群として、200 μg/mlまたは50 μg/mlの精製されたヒトIgG1(SIGMA社製)を添加し同様にインキュベーションを行なった。細胞をPBS-FCS-NaN₃で洗浄後、anti-BRIGHT F(ab')₂を添加して4、30分間放置した。さらに、細胞をPBS-FCS-NaN₃で洗浄後、PE標識抗ウサギIgG抗体F(ab')₂フラグメント(Southern Biotechnology Associates社製)を添加し、氷冷下、30分間放置した。細胞を洗浄後、フローサイトメーターによりBRIGHT-IgのT細胞への結合を解析した。BRIGHT-Igは、末梢血より分離直後のCD3陽性T細胞には結合しないが、PHA存在下24時間培養し活性化されたT細胞に結合を示した。一方、PHA存在下48時間の培養を行なったT細胞へのBRIGHT-Igの結合は認められなかった。以上の結果から、BRIGHTカウンターレセプターは活性化されたT細胞上に存在すること、その発現はT細胞活性化初期段階において一過性に上昇することが示唆された。(図7参照)

実施例 18 BRIGHT-IgのT細胞増殖に対する抑制作用

BRIGHTが副刺激分子としてT細胞活性化の制御に関わる分子であるかどうかをin vitroでのT細胞増殖試験を用いて調べた。T細胞の増殖にはT細胞上に発現するT細胞受容体(TCR)を介した刺激が必要であり、生体内ではDCなどの抗原提示細胞が提示する抗原をTCRが認識することでT細胞に増殖シグナルが入る。TCRはT細胞膜上でCD3サブユニット群と複合体を形成しており、TCRからの抗原刺激はCD3サブユニットのリン酸化を介して細胞内へと伝えられる。In vitroにおいてT細胞に抗CD3抗体を作用させるとTCRからの抗原刺激と同様の増殖シグナルを入れられることが知られており、in vitroでのT細胞増殖試験として用いられている。また、同時に抗CD28抗体や可溶化型CD80分子、可溶化型CD86分子を培養系に加えることでCD28分子を介した副刺激分子のT細胞増殖に対する作用を調べることができ

る[J . E x p . M e d . 、 1 7 3 巻、 7 2 1 - 7 3 0 頁、 1 9 9 1 年]。そこで、抗 C D 3 抗体による T 細胞増殖刺激下における B R I G H T の作用、さらには抗 C D 3 抗体に加えて抗 C D 2 8 抗体からの活性化刺激が存在する条件での B R I G H T の T 細胞増殖に対する作用を調べた。具体的には、平底 9 6 ウェル培養皿 (# 1 1 7 2 、 F a l c o n 社製) に 5 0 m M 重炭酸ナトリウム緩衝液 (p H 9 . 0) で段階希釈した抗 C D 3 抗体 (B D p h a r m i n g e n 社製) を 5 0 μ l / ウェルで分注し、 4 、一晩放置することで抗体を培養皿に固相化した。培養皿を洗浄後、 5 0 m M 重炭酸ナトリウム緩衝液 (p H 9 . 0) で希釈した B R I G H T - I g 、対照群として精製ヒト I g G 1 または可溶化型ヒト C D 8 0 (R & D s y s t e m s 社製) を分注して、 3 7 、 4 時間放置して固相化した。抗 C D 2 8 抗体を用いる場合には、抗 C D 3 抗体の固相化後に段階希釈した抗 C D 2 8 抗体の固相化を行ない、その後 B R I G H T - I g の固相化を行なった。抗体および可溶化型分子を固相化した培養皿は、 P B S で洗浄後 T 細胞増殖試験に用いた。T 細胞は、健常人末梢血から単核細胞を分離し、 P a n T C e l l アイスレーションキット (M i l t e n y i B i o t e c 社製) により精製した純度 9 9 % 以上の C D 3 陽性 T 細胞を用いた。 1 0 % F C S を含む R P M I 1 6 4 0 培地 (G I B C O B R L 社製) に浮遊させた T 細胞を、 1 $\times$ 1 0 ⁵ 個 / ウェル / 2 0 0 μ l ずつ上記の固相化培養皿に播種し、 3 7 、 3 日間、 5 % C O ₂ 存在下で培養した。培養 3 日目の培養皿に ³ H チミジン (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 社製) を 0 . 2 5 μ C i / ウェルとなるように添加し、さらに 3 7 、 1 8 ~ 2 0 時間、 5 % C O ₂ 存在下で静置した。 M i c r o 9 6 H a r v e s t e r (S K A T R O N 社製) を用いて、 P r i n t e d F i l t e r m a t A (W a l l a c 社製) へ細胞に取り込まれた ³ H チミジンを回収し、乾燥後 B e t a p ; S c i n t (W a l l a c 社製) によく浸し、パッケージング後、 β 線量を 1 2 0 5 B E T A P L A T E 液体シンチレーションカウンター (W a l l a c 社製) で活性測定した。固相化した B R I G H T - I g は、抗 C D 3 抗体刺激下で増殖する T 細胞に対して、抑制効果を示した。また、抗 C D 3 抗体による増殖刺激に加えて C D 2 8 分子を介した副刺激により T 細胞の増殖を促進させた条件下においても、固相化した B R I G H T - I g は T 細胞の増殖に対して抑制効果を示した。(図 8 参照)

実施例 1 9 B R I G H T の同種異系リンパ球混合培養に対する抑制作用

主要組織適合抗原 (M H C) の異なる同種異系の移植においては、 T 細胞が非自己 (組織不適合) の M H C 分子複合体 (アロ抗原) を認識することで活性化し拒絶反応を引き起こす。ヒトの M H C は H L A (h u m a n l e u k o c y t e a n t i g e n) と呼ばれ、 H L A - A , B , C の属するクラス I 抗原と、 H L A - D P , D Q , D R の属するクラス II 抗原があり、さらにそれぞれの分子が多型性を有するため、ヒトの H L A の組み合わせは数千通り可能となり、他人の間では組織不適合になる可能性がきわめて高くなっている。現在臨床的には臓器移植時の拒絶反応の抑制には、シクロスポリン A や F K 5 0 6 といった免疫抑制剤が用いられているが、これらの免疫抑制剤の問題点は免疫反応を非特異的に抑制してしまうため副作用が強く、また T 細胞に免疫寛容を誘導することができないため、慢性拒絶には効果が弱い。一方、副刺激分子を介するシグナルの制御によって T 細胞に免疫寛容を誘導したり、慢性拒絶を抑制できることがマウスの移植モデルの実験から明らかとなっており [P r o . N a t l . A c a d . S c i . U S A 、 8 9 巻、 1 1 1 0 2 - 1 1 1 0 5 頁、 1 9 9 2 年] [S c i e n c e 、 2 5 7 巻、 7 8 9 - 7 9 2 頁、 1 9 9 2 年] [N a t u r e 、 3 8 1 巻、 4 3 4 - 4 3 8 頁、 1 9 9 6 年]、 B R I G H T を介するシグナルの制御による免疫拒絶反応の抑制や免疫寛容の誘導が期待される。同種異系リンパ球混合培養は、組織適合抗原の異なる (以下便宜上ドナー A、ドナー B という) リンパ球を混合培養することで、アロ抗原に反応する T 細胞の増殖を i n v i t r o において調べる試験であるが、さらに、ドナー A の末梢血から i n v i t r o で誘導した単球由来 D C (m o - D C) とドナー B の末梢血から分離した T 細胞のみを混合培養することでも同様のアロ抗原に対する T 細胞の反応性を調べることができる。そこで、固相化した B R I G H T - I g の存在下において、同種異系の D C と T 細胞を用いた混合

培養を行ない、T細胞のアロ抗原反応性に対するBRIGHTの作用を調べた。具体的には、平底96ウェル培養皿(#1172、Falcon社製)に50mM重炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.0)で段階希釈したBRIGHT-Igまたは対照群として精製ヒトIgG1を50 μ l/ウェルで分注して、37 $^{\circ}$ C、4時間放置して固相化を行なった。可溶化型分子を固相化した培養皿は、PBSで洗浄後混合培養試験に用いた。実施例16に記載の方法に従いドナーAの末梢血より誘導し、LPSで活性化させた単球由来成熟DCを 1×10^5 個/mlとなるように10%ヒト血漿を含むRPMI 1640培地(以下RPMI-10% plasmaと称する)に浮遊させた。また、実施例17に記載の方法に従いドナーBの末梢血より分離した純度99%以上のCD3陽性T細胞を 1×10^6 個/mlとなるようにRPMI-10% plasmaに浮遊させた。単球由来DC浮遊液とCD3陽性T細胞浮遊液各々100 μ lずつをBRIGHT-Igを固相化した96ウェル培養皿上で混合した。また対照群として、混合する前に単球由来DC浮遊液に抗CD80抗体と抗CD86抗体を各々5ng/mlまたは50ng/mlの濃度になるように添加して、30分間静置したものをT細胞浮遊液と混合した。混合した細胞は37 $^{\circ}$ C、4日間、5% CO₂存在下で培養した後、³Hチミジン(Amersham Pharmacia Biotech社)を0.25 μ Ci/ウェルとなるように添加して、さらに37 $^{\circ}$ C、18~20時間、5% CO₂存在下で静置した。Micro96 Harvester(SKATRON社製)へ、Printed Filtermat(Wallac社製)を用いて細胞に取り込まれた³Hチミジンを回収し、乾燥後Betap;Scint(Wallac社製)によく浸し、パッケージング後、 β 線量を1205BETA PLATE液体シンチレーションカウンター(Wallac社製)で活性測定した。固相化したBRIGHT-Igは、濃度依存的にアロ抗原反応性のT細胞の増殖を抑制した。またこのBRIGHTを介した抑制活性は、抗CD80抗体と抗CD86抗体によりCD28を介した副刺激を部分的に抑制した条件においても認められることから、これらの副刺激の経路とは独立してT細胞に作用することが示唆された。(図9参照)

実施例20 BRIGHTによる同種異系リンパ球混合反応におけるサイトカインmRNAの発現抑制

実施例19の結果から、固相化したBRIGHT-Igがアロ抗原反応性のT細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。そこで、同種異系リンパ球混合反応での各種サイトカインmRNA発現に対するBRIGHT-Igの作用を調べた。具体的には、平底24ウェル培養皿(Falcon社 #1147)を用いて、実施例19と同様に4 μ g/mlの濃度でBRIGHT-Igまたは対照群として精製ヒトIgG1の固相化を行なった。実施例16に記載の方法に従いドナーAの末梢血より誘導した単球由来未成熟DCをRPMI-plasmaに浮遊させた。また、実施例17に記載の方法に従いドナーBの末梢血より分離した純度99%以上のCD3陽性T細胞を同様にRPMI-10% plasmaに浮遊させた。0.9 $\times 10^5$ 個/ウェルの単球由来DCと1.2 $\times 10^6$ 個/ウェルCD3陽性T細胞をBRIGHT-Igを固相化した24ウェル培養皿上で混合した。37 $^{\circ}$ C、21時間、5% CO₂存在下で培養した後、プレートより細胞を回収し、ISOGEN-LS(ニッポンジーン社製)を用いてtotal RNAを調製した。GEArray KIT(Super Array社)のプロトコールに従い、ヒトサイトカイン遺伝子特異的なプライマーセットを使用して、total RNA 10 μ gより、[α -³²P]-dCTP(Amersham Pharmacia Biotech社製)存在下でSuperscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase(GIBCO BRL社製)を用いた逆転写反応により、³²P標識cDNAプローブを作製した。BRIGHT-IgまたはヒトIgG1が固相化された混合培養から得たそれぞれの³²P標識cDNAプローブを用いて、ヒトサイトカイン遺伝子特異的なcDNAフラグメントがスポットされたメンブラン(Super Array社)に対して、ハイブリダイゼーションを行なった。メンブランを洗浄後、スポットの放射活性をFujixバイオイメージングアナライザーBAS-2000II(富士写真フイルム社製)にて解析を行なった。それぞれのサイトカイン遺伝子の発現量は、同じメン

プラン上にスポットされた β - a c t i n の放射活性により補正を行なった。すなわち、以下の補正式に従ってそれぞれのサイトカイン m R N A の相対的発現量を算出した。サイトカイン m R N A 相対的発現量 = (サイトカインスポットの放射活性 - バックグラウンドの放射活性) $\div$ (β - a c t i n スポットの放射活性 - バックグラウンドの放射活性)。結果を図 10 に示す。固相化された B R I G H T - I g により、同種異系リンパ球混合反応中の I L - 1 α 、I L - 2、I L - 10、I F N - γ 、T N F - α m R N A 発現の顕著な抑制が認められた。

実施例 2 1 B R I G H T による同種異系リンパ球混合反応におけるサイトカイン分泌の抑制

同種異系リンパ球混合反応における各種サイトカイン分泌に対する B R I G H T - I g の作用を調べた。具体的には、平底 96 ウェル培養皿 (F a l c o n 社 # 1172) を用い、実施例 19 に記載の方法と同様に段階希釈した B R I G H T - I g または対照群として精製ヒト I g G 1 の固相化を行なった。実施例 16 に記載の方法に従いドナー A の末梢血より誘導した単球由来の未成熟 D C を 1.5×10^5 個 / m l となるように R P M I - 10 % p l a s m a に浮遊させた。また、実施例 17 に記載の方法に従いドナー B の末梢血より分離した純度 99 % 以上の C D 3 陽性 T 細胞を 1.5×10^6 個 / m l となるように R P M I - 10 % p l a s m a に浮遊させた。単球由来 D C 浮遊液と C D 3 陽性 T 細胞浮遊液各々 100 μ l ずつを B R I G H T - I g を固相化した 96 ウェル培養皿上で混合した。混合した細胞を 37、3 日間、5 % C O₂ 存在下で培養した後、培養上清を回収した。培養上清中に分泌された I L - 2、I F N - γ 、T N F - α 、I L - 5、I L - 10 をサンドイッチ E L I S A (R & D 社製) により測定した。図 11 に結果を示す。同種異系リンパ球混合反応における I L - 2、I F N - γ 、T N F - α 、I L - 5、I L - 10 の培養上清中への分泌が、B R I G H T - I g の固相化濃度に依存して抑制された。つまり、固相化された B R I G H T - I g が同種異系リンパ球混合反応における上記サイトカイン蛋白質産生においても抑制効果を示すことが明らかとなった。

実施例 2 2 a u t o P B M C に対する a n t i - B R I G H T F (a b ')₂ の作用

実施例 14 に記載の方法に従い健常人末梢血単核細胞を調製し、 1×10^8 個 / m l となるように 2 % ヒト血漿を含む P B S (以下 P B S - 2 % p l a s m a と称する) に浮遊し、抗ヒト C D 14 抗体結合磁性マイクロビーズ (M i l t e n y i B i o t e c 社製) を添加し氷冷下、30 分間放置した。細胞を P B S - 2 % p l a s m a で洗浄後、マグネットによる磁場内に設置した分離カラム L S + (M i l t e n y i B i o t e c 社製) に供して C D 14 陽性細胞を分離した。このカラムに吸着しなかった細胞を回収し培養に供した。この画分を C D 14 陰性 P B M C と称する。C D 14 陰性 P B M C を 5 % ヒト血漿入り R P M I 1640 培地 (以下 R P M I - 5 % p l a s m a と称する) に 1.0×10^6 個 / m l の濃度で懸濁し、平底 96 ウェル培養皿 (# 3072、F a l c o n 社製) の各ウェルに 200 μ l ずつ播種し、下記に記す量の a n t i - B R I G H T F (a b ')₂ あるいは n o r m a l r a b b i t I g G F (a b ')₂ を添加した後、37、3 日間ないし 4 日間、5 % C O₂ 存在下で培養した。培養 3 日目ないし 4 日目の培養皿に 100 μ C i / m l の ³ H チミジン (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h 社製) を 10 μ l / ウェルとなるように添加し、さらに 37、14 時間、5 % C O₂ 存在下で静置した。M i c r o 96 H a r v e s t e r (S K A T R O N 社製) を用いて、P r i n t e d F i l t e r m a t A (W a l l a c 社製) へ細胞に取り込まれた ³ H チミジンを回収し、乾燥後 B e t a p ; S c i n t (W a l l a c 社製) によく浸し、パッケージング後、 β 線量を 1205 B E T A P L A T E 液体シンチレーションカウンター (W a l l a c 社製) で活性測定した。

設定した群は (i) a n t i - B R I G H T F (a b ')₂ (1.72 m g / m l) を 10 μ l / ウェルで添加した、(i i) a n t i - B R I G H T F (a b ')₂ (1.72 m g / m l) を 3 μ l / ウェルで添加し、R P M I - 5 % p l a s m a を 7 μ l / ウェルで添加した、(i i i) a n t i - B R I G H T F (a b ')₂ (1.72 m g

/ml)を1 μ l/ウェルで添加し、RPMI-5% plasmaを9 μ l/ウェルで添加した、(iv) normal rabbit IgG F(ab')₂ (1.48 mg/ml)を10 μ l/ウェルで添加した、(v) normal rabbit IgG F(ab')₂ (1.48 mg/ml)を3 μ l/ウェルで添加し、RPMI-5% plasmaを7 μ l/ウェルで添加した、(vi) normal rabbit IgG F(ab')₂ (1.48 mg/ml)を1 μ l/ウェルで添加し、RPMI-5% plasmaを9 μ l/ウェルで添加した、(vii) RPMI-5% plasmaを10 μ l/ウェルで添加した、以上7群である。一群3ウェルずつ同じ条件にした。液体シンチレーションカウンターによる測定値は、同じ条件の3つのウェルの値を平均して、これを各群の実験値とした。

10

この結果、複数の個体に由来する培養細胞において、anti-BRIGHT F(ab')₂ 添加群(i)あるいは(ii)のカウントが対象群である normal rabbit IgG F(ab')₂ 添加群(iv)あるいは(v)よりも顕著に高くなった。このカウントの上昇は添加する anti-BRIGHT F(ab')₂ の量に依存する傾向を示した。よって、ヒト末梢血CD14陰性PBMCでは、anti-BRIGHT F(ab')₂ により細胞増殖活性の増強が得られることが明らかとなった。(図12参照)

実施例23 anti-BRIGHT F(ab')₂ 作用後の健常人末梢血単核細胞のフローサイトメーターによる解析

1.0 $\times$ 10⁶個/mlの濃度でRPMI-5% plasmaに懸濁した細胞懸濁液を、平底48ウェル培養皿(#3078、Falcon社製)の各ウェルに1mlずつ播種し、下記に記す量の anti-BRIGHT F(ab')₂ あるいは normal rabbit IgG F(ab')₂ を添加した後、37 $^{\circ}$ C、9日間、5% CO₂ 存在下で培養した。この細胞を抗CD4-APC標識(BD Pharmingen社製)、抗CD8-FITC標識(BD Pharmingen社製)、抗CD25-PE標識(BD Pharmingen社製)、抗HLA-DR-FITC標識(BD Pharmingen社製)、抗TCR $\alpha\beta$ -PE標識(Beckman Coulter社製)、抗CD56-APC標識(Beckman Coulter社製)、以上の抗体を用いて染色し、FACScalibur(Becton Dickinson社製)にて解析した。設定した群は(i) anti-BRIGHT F(ab')₂ (1.72 mg/ml)を50 μ l/ウェルで添加した、(ii) normal rabbit IgG F(ab')₂ (1.48 mg/ml)を50 μ l/ウェルで添加した、(iii) RPMI-5% plasmaを50 μ l/ウェルで添加した、以上3群である。この結果、(i)の細胞において大型化し顆粒を含む形態をとる細胞(Large granular lymphocyte; LGL)が(ii)や(iii)と比較して多く見られた。この細胞の表面抗原を解析すると、TCR $\alpha\beta$ 陽性細胞が82%、HLA-DR陽性細胞が97%、CD4陽性細胞が68%、CD25陽性細胞が82%となった。以上のことから、anti-BRIGHT F(ab')₂ を添加して培養することによりLGL様の細胞が増え、これらの細胞の多くは活性化CD4陽性T細胞であることが明らかとなった。(図13参照)

20

30

40

実施例24 スーパー抗原により活性化させた自己のリンパ球混合反応試験(auto MLR)における anti-BRIGHT F(ab')₂ の作用

実施例16に記載の方法に従い単球由来DCを調製し、同じ健常人の末梢血から単核細胞を分離し、Pan T Cellアイソレーションキット(Miltenyi Biotec社製)により純度99%以上のCD3陽性T細胞を調製した。この単球由来DCとCD3陽性T細胞を混合しauto MLRを平底96ウェル培養皿(#3072、Falcon社製)を用いて実施した。スーパー抗原の一種であるStaphylococcus Enterotoxins(SEE)を刺激抗原として、最終濃度0.3 ng/mlあるいは0.1 ng/mlあるいは0.03 ng/mlとなるように直接反応系に添加した。T/DCの細胞比を10、20、40とし、T細胞数は1.5 $\times$ 10⁵個/200 μ

50

1 / ウェルとした。DCにanti-BRIGHT F(ab')₂あるいはnormal rabbit IgG F(ab')₂を最終濃度10, 2, 0.4, 0 μg/mlとなるように添加し氷冷下30分間30分反応させ、上記記載量のSEEを加えさらに氷冷下30分間反応させた後、T細胞を加え37、2日間、5% CO₂存在下で培養した。培養3日目ないし4日目の培養皿に100 μCi/mlの³Hチミジン(Amersham Pharmacia Biotech社製)を10 μl/ウェルとなるように添加し、さらに37、14時間、5% CO₂存在下で静置した。Micro 96 Harvester(SKATRON社製)を用いて、Printed Filtermat A(Wallac社製)を用いて細胞に取り込まれた³Hチミジンを回収し、乾燥後Betap; Scint(Wallac社製)によく浸し、パッケージング後、β線量を1205 BETAPLATE液体シンチレーションカウンター(Wallac社製)で活性測定した。

10

この結果、複数の個体に由来する培養細胞において、anti-BRIGHT F(ab')₂添加群のカウントは対象群であるnormal rabbit IgG F(ab')₂添加群と異なる値を示していた。よって、自己のリンパ球混合反応試験において、主にT/DCの細胞比依存的にanti-BRIGHT F(ab')₂によるT細胞に対する作用が見られることが明らかとなった。(図14参照)

実施例 25 DCによるB細胞からのIgM産生に対するanti-BRIGHT F(ab')₂の作用

抗体産生による液性免疫反応の主役であるB細胞の増殖にはDCが関与していることが報告されている[J. Exp. Med., 185巻、941-952頁、1997年]。特にin vitroにおいてはIL-2添加時のIgM産生にはDCとB細胞の直接的な細胞間相互作用が関与していることが知られている。健常人末梢血からLymphoprep(Nycomed社製)を用いた密度勾配遠心法により分離した単核細胞を1×10⁸個/mlとなるように2%ウシ血清を含むPBS(PBS-2% FCS)に浮遊し、抗ヒトCD19抗体結合磁性マイクロビーズ(Miltenyi Biotec社製)を添加し氷冷下、30分間放置した。細胞をPBS-FCSで洗浄後、5% BSA、10 mM EDTAを含むPBS(PBS-BSA-EDTA)に懸濁し、マグネットによる磁場内に設置した分離カラムLS+(Miltenyi Biotec社製)に供してCD19陽性細胞を分離した。また実施例16に記載の方法により単球由来未成熟DCを調製し、50 ng/ml組換え体ヒトTNF-α(Genzyme Techne社製)を添加し、37、3日間、5% CO₂存在下で培養することによりTNF-α成熟DCを分化誘導した。サンプルとして2 μg/ウェル/50 μlのanti-BRIGHT F(ab')₂、normal rabbit IgG F(ab')₂を平底96ウェル培養皿(#3072、Falcon社製)に添加し10% FCSを含むIMDM培地(GIBCO BRL社製)に浮遊させたTNF-α成熟DCを、1×10⁴, 3.3×10³, 1.1×10³, 3.7×10², 0個/ウェル/50 μlずつ播種し、37、30分、5% CO₂存在下で静置した。7500 radのX線照射により増殖を停めたCD40L transfected L cell(2.5×10³個/ウェル/50 μl)とB細胞(2×10⁴個/ウェル/50 μl)、50 unit/ml組換え体ヒトIL-2(Genzyme社製)を添加し、37、15日間、5% CO₂存在下で培養した。この上清中のIgM量をキャプチャー抗体としてrabbit anti-human IgM(DAKO社製)、detection抗体としてperoxidase-conjugated F(ab')₂ fragment of rabbit anti-human IgM(DAKO社製)を用いたサンドイッチELISA法により測定したところ、anti-BRIGHT F(ab')₂は対照群のnormal rabbit IgG F(ab')₂に比べてIgMの産生について抑制傾向を示した。(図15参照)

20

30

40

配列表フリーテキスト

配列番号5 - 人工配列の説明：センスプライマー。

50

配列番号 6 - 人工配列の説明：アンチセンスプライマー。

配列番号 7 - 人工配列の説明：B R I G H T細胞外ドメイン（29 - 465）とヒト I g G 1 F cドメインとの融合タンパク質。

産業上の利用可能性

本発明により、D Cを他の血球系細胞から選択的に高い純度で分離することができるのみならず、成熟D Cと未成熟D Cとの分離も可能とすることから、D C療法への該細胞の供給を可能とする。分離されたD Cは、抗原をパルスしたのち、再び患者に戻すことにより癌ワクチンとして利用するなどの用途が期待される。また、本膜分子に対する抗体あるいは本膜分子の可溶化型分子を用いてD CとT細胞との相互作用を亢進または抑制することで免疫応答を制御し得ることも期待される。

10

本明細書で引用した全ての刊行物および特許出願の全体を参考として本明細書に取り入れるものとする。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kirin Beer Kabushiki Kaisha

<120> New Dendritic Cell Membrane Molecule and Its Uses

10

<130> PH-1297-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2000-277352

20

<151> 2000-09-12

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

30

<211> 534

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala

40

1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln

20 25 30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu

35

40

45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn

50

55

60

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala

10

65

70

75

80

Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe

85

90

95

Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val

20

100

105

110

Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp

115

120

125

Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys

30

130

135

140

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr

145

150

155

160

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val

165

170

175

40

Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr

180

185

190

Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Ile Leu

195

200

205

Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn

210

215

220

Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr Ile Thr Pro Gln

10

225

230

235

240

Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val

245

250

255

Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro

20

260

265

270

Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr

275

280

285

Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly

30

290

295

300

Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln

305

310

315

320

Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly

325

330

335

40

Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val

340

345

350

Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu

355

360

365

Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser

370

375

380

Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln

10

385

390

395

400

Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu

405

410

415

Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala

20

420

425

430

Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp

435

440

445

Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro

30

450

455

460

Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu

465

470

475

480

Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys

485

490

495

40

Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly

500

505

510

Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp

515

520

525

Asp Gly Gln Glu Ile Ala

530

<210> 2

10

<211> 1605

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgctgcgtc ggccgggagcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca 60
 ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggctc ctgaagacc agtggtggca 120
 ctgggtgggca ccgatccac cctgtgctgc tcttctccc ctgagcctgg ctccagcctg 180
 gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct 240
 gagggccagg accaggggcag cgcctatgcc aaccgcacgg cctcttccc ggaccigtct 300
 gcacagggca acgcatccct gaggtgagc cgcgtgcgtg tggcgacga gggcagcttc 360
 acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgccg tcagcctgca ggtggccgct 420
 ccctactcga agccagcat gacctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg 480
 gtgaccaica cgtgtccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat 540
 gggcagggtg tgccctgac tggcaacgtg accacgtgc agatggccaa cgagcagggc 600
 ttgttigatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc 660
 ctggtgcgca acccgtgct gcagcaggat ggcacagct ctgtcaccat cacacccag 720
 agaagcccca caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg acccggtggt ggcctagt 780
 ggcaccgatg ccacctgct ctgtctctc tccccgagc ctggcttcag cctggcacag 840
 ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagtti caccgaaggc 900
 cgggaccagg gcagcgcta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct gctggcacia 960
 ggcaatgcat ccctgaggct gcagcgctg cgtgtggcgg acgagggcag ctccacctgc 1020

20

30

40

ttctgtgagca tccgggattt cggcagcgct gccgtcagcc tgcagggtggc cgctccctac 1080
 tcgaagccca gcatgacctt ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc 1140
 atcacgtgct ccagctaccg gggctaccct gaggtgagg tgttciggca ggatgggcag 1200
 ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttggtt 1260
 gatgtgcaca gcgtcctgcg ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctgggtg 1320
 cgcaaccccg tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctaig 1380
 acatcccccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct cattgcactg 1440
 ctgggtggccc tggctttcgt gtgctggaga aagatcaaac agagctgtga ggaggagaat 1500
 gcaggagctg aggaccagga tggggaggga gaaggctcca agacagccct gcagcctctg 1560
 aaacactctg acagcaaaga agatgatgga caagaaatag cctga 1605

10

<210> 3

<211> 26

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val

1

5

10

15

30

Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg

20

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

40

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr Ile Thr Pro

1

5

10

15

Gln Arg

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:sense primer

<400> 5

20

accccgctgct gcagcaggat

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:antisense primer

<400> 6

atcctgctgc agcacgggt

20

40

<210> 7

<211> 2181

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: a fusion
 protein of BRIGHT extracellular domain (29-465)
 and human IgG1Fc domain

<400> 7

gaattcgcag ccttccacca cggggagccc agctgtcagc cgccitcacag gaagatgctg 60	10
cgctggcggg gcagccctgg catgggtgtg catgtgggtg cagccctggg agcactgtgg 120	
tcttgccctca caggagccct ggaggtccag gtccctgaag acccagtggg ggcaactgtg 180	
ggcaccgaig ccacctgtg ctgctcctt tccctgagc ctggcttcag ccgggcacag 240	
ctcaacctca tctggcagct gacagatacc aaacagctgg tgcacagctt tgctgagggc 300	
caggaccagg gcagcgccia tgccaaccgc acggccctct tcccgacct gctggcacag 360	
ggcaacgcat ccctgaggct gcagcgctg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc 420	20
tctgtgagca tccgggattt cggcagcgt gccgtcagcc tgcaggtggc cgctccctac 480	
tgaagccca gcatgacctt ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc 540	
atcacgtgct ccagctacca gggctacctt gaggctgagg tgttctggca ggatgggcag 600	
ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tgcagatgg ccaacgagca gggcttgitt 660	
gatgtgcaca gcatcctgcg ggtggtgtg ggtgcaaatg gcacctacag ctgcctggtg 720	
cgcaaccccg tctgcagca ggaigcgcac agctctgtca ccatcacacc ccagagaagc 780	
cccacaggag ccgtggaggt ccaggtccct gaggaccggg tgggtggcct agtgggcacc 840	30
gatgccaccc tgcgtgtct cttctcccc gagcctggct tcagcctggc acagctcaac 900	
ctcatctggc agctgacaga caccaaaccag ctggtgcaca gtttaccga aggccgggac 960	
cagggcagcg cctatgcaa cgcacggcc ctcttcccgg acctgctggc acaaggcaat 1020	
gcatccctga ggctgcagcg cgtgcgtgtg gggacgagg gcagcttcac ctgcttctgt 1080	
agcatccggg atttcggcag cgtgccgtc agcctgcagg tggccgctcc ctactcgaag 1140	
cccagcatga ccctggagcc caacaaggac ctgcggccag gggacacggt gaccatcacg 1200	40
tgctccagct accggggcta ccctgaggct gaggtgttct ggcaggatgg gcagggtgtg 1260	
ccctgactg gcaacgtgac cacgtcgcag atggccaacg agcagggtt gttgatgtg 1320	
cacagcgicc tgcgggtggg gctgggtgcg aatggcacct acagctgcct ggtgcgcaac 1380	

cccgtgctgc agcaggatgc gcacggcict gtcacatca cagggcagcc tatgacattc 1440
 cccccagagt ctagagcaga ctacaaggac gacgatgaca agactagtga caaaactcac 1500
 acatgcccac cgtgcccagc acctgaactic ctggggggac cgtcagictt cctcttcccc 1560
 ccaaaaccca aggacacctt catgatctcc cggacctctg aggtcacatg cgtgggtgtg 1620
 gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 1680
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1740
 gtcttcaccg tcttgacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1800
 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1860
 gaaccacagg tgtacacctt gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1920
 ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgaggagtg ggagagcaat 1980
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 2040
 ttctctata gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca 2100
 tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 2160
 ccgggtaaat gatgagggcc c 2181

10

20

<210> 8

<211> 1463

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30

<400> 8

gaattgcag ccttcacca cggggagccc agctgtcagc cgcctcacag gaagatgctg 60
 cgtcggcggg gcagccctgg catgggtgtg catgtgggtg cagccctggg agcactgtgg 120
 ttctgcctca caggagccct ggaggtcag gtccctgaag acccagtgtt ggcactgtgtg 180
 ggcaccgatg ccacctgtg ctgctccttc tcccctgagc ctggcttcag cctggcacag 240
 ctcaacctca tctggcagct gacagatacc aaacagctgg tgcacagctt tgcagagggc 300
 caggaccagg gcagcgctta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct gctggcacag 360
 ggcaacgcat cctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag ctacacctgc 420
 ttctgtagca tccgggattt cggcagcgt gccgtcagcc tgcaggtggc cgtccctac 480
 tcgaagccca gcatgacctt ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga caggtgacc 540

40

atcacgigct ccagctacca gggctaccct gaggtgagg tgttctggca ggatgggcag 600
 ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tgcagatgg ccaacgagca gggcttgitt 660
 gatgtgcaca gcatcctgcg ggtgggtgtg ggtgcaaatg gcacctacag ctgcttggtg 720
 cgcaaccccg tgctgcagca ggatgcgcac agctcigtca ccatcacacc ccagagaagc 780
 cccacaggag ccgtggaggt ccaggtccct gaggaccggg tggtagccct agtgggcacc 840
 gatgccaccc tgcgtgtctc ctctccccc gagcctggct tcagcctggc acagctcaac 900
 ctcatctggc agctgacaga caccaaacag ctggtgcaca gtctcaccga aggccgggac 960
 cagggcagcg cctatgccaa ccgcacggcc ctctcccg acctgctggc acaaggcaat 1020
 gcatccctga ggtgcagcg cgtgcgtgtg gcggacgagg gcagcttcac ctgcttcgtg 1080
 agcatccggg atttcggcag cgctgccgtc agcctgcagg tggccgctcc ctactcgaag 1140
 cccagcaiga ccttgaggcc caacaaggac ctgcggccag gggacacggt gaccatcacg 1200
 tgctccagct accggggcta cctgaggct gaggtgttct ggcaggatgg gcagggtgtg 1260
 cccctgactg gcaacgtgac cacgtgcag atggccaacg agcagggtt gttgatgtg 1320
 cacagcgtcc tgcgggtgtg gctgggtgcg aatggcacct acagctgcct ggtgcgcaac 1380
 cccgtgtgc agcaggatgc gcacggctct gtcacatca cagggcagcc tatgacattc 1440
 cccccagagt gatgagcggc cgc 1463

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

図 1 は、本膜分子の推定アミノ酸配列の一次構造について K y t e と D o o l i t t l e の方法 (J . E x p . M e d . 、 1 5 7 巻、 1 0 5 - 1 3 2 頁、 1 9 8 2 年) に従って行ったハイドロパシープロットを示す。

図 2 は、実施例 7 のペプチド抗体を用いる可溶化型組換え体 B R I G H T および単球由来 D C (m o - D C) のウエスタン解析の結果を示す。

図 3 は、還元条件および非還元条件下での B R I G H T - I g の S D S - P A G E の結果を示す。

図 4 は、還元条件および非還元条件下での B R I G H T - S F の S D S - P A G E の結果を示す。

図 5 は、末梢血単核細胞の i n v i t r o 活性化とフローサイトメトリーによる B R I G H T の細胞表面上での発現解析の結果を示す。

図 6 は、ヒト単球 D C における B R I G H T の発現分布の解析結果を示す。

図 7 は、活性化 T 細胞に発現する B R I G H T カウンターレセプターの解析結果を示す。

図 8 は、B R I G H T - I g の T 細胞増殖に対する抑制作用を示す。

図 9 は、B R I G H T の同種異系リンパ球混合培養に対する抑制作用を示す。

図 1 0 は、B R I G H T による同種異系リンパ球混合反応におけるサイトカイン m R N A の発現抑制を示す。

図 1 1 は、B R I G H T - I g による同種異系リンパ球混合反応におけるサイトカイン分泌の抑制を示す。

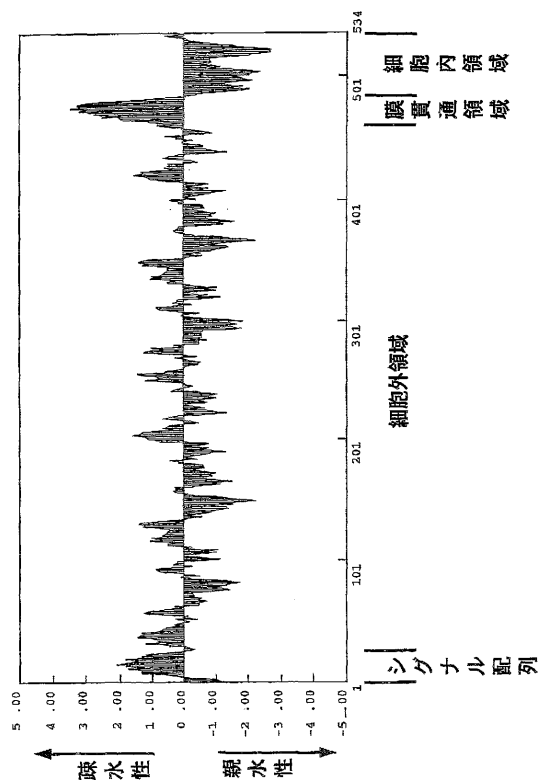
図 1 2 は、ヒト末梢血 C D 1 4 陰性 P B M C における a n t i - B R I G H T F (a b ')₂ による細胞増殖活性の増強作用を示す。

図 1 3 は、a n t i - B R I G H T F (a b ')₂ 作用後の健常人末梢血単核細胞のフローサイトメトリー解析結果を示す。

図14は、スーパー抗原により活性化させた自己のリンパ球混合反応試験 (a u t o M L R) における a n t i - B R I G H T F (a b ') ₂ のT細胞に対する作用を示す。
 図15は、DCによるB細胞からの I g M 産生に対する a n t i - B R I G H T F (a b ') ₂ の抑制作用を示す。

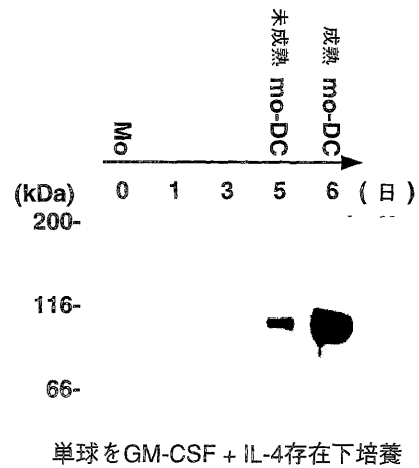
【図1】

図1

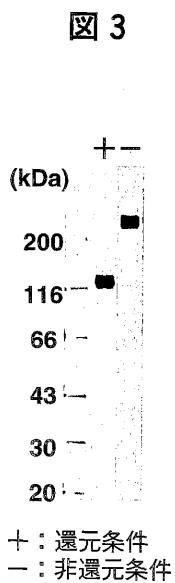


【図2】

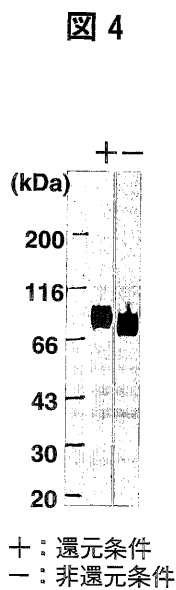
図2



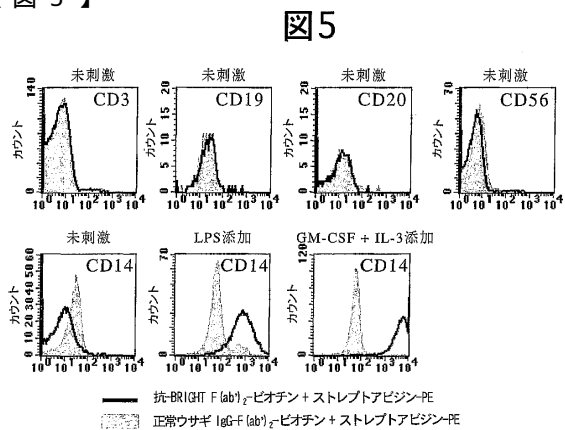
【圖 3】



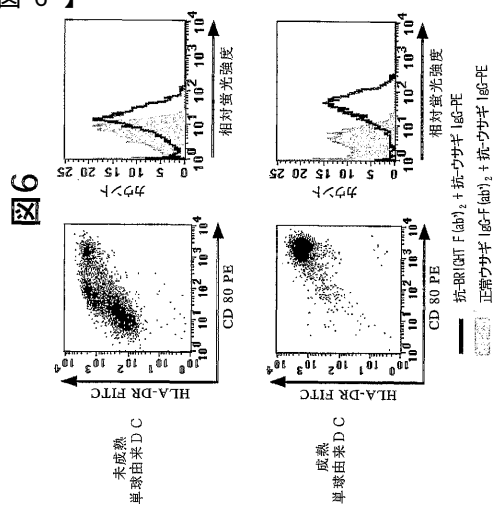
【圖 4】



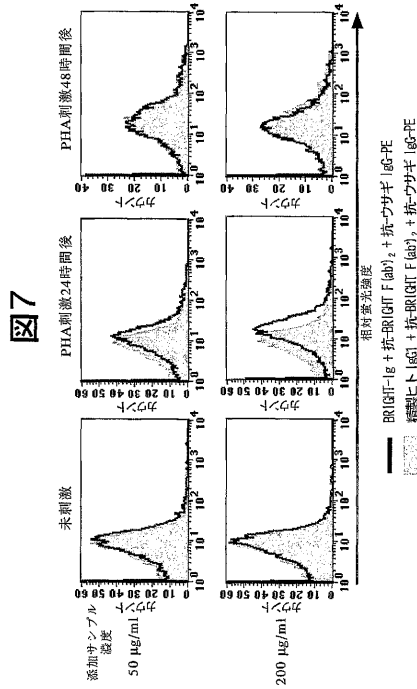
【 図 5 】



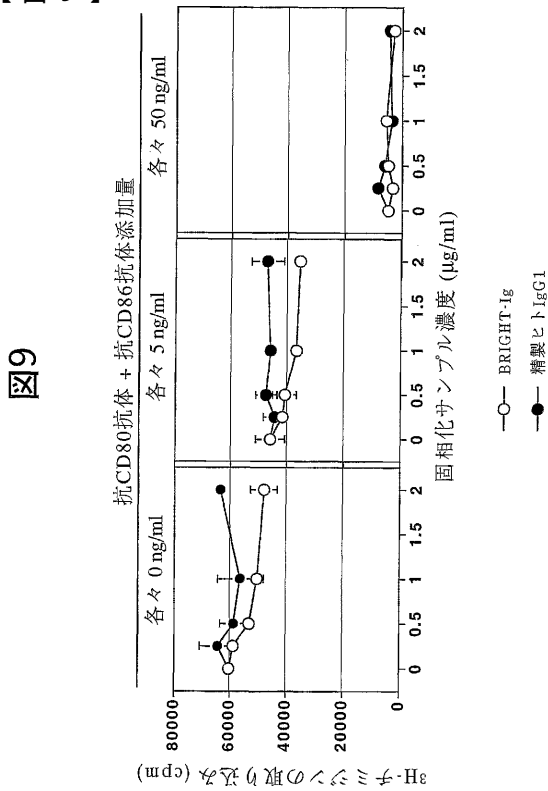
【 図 6 】



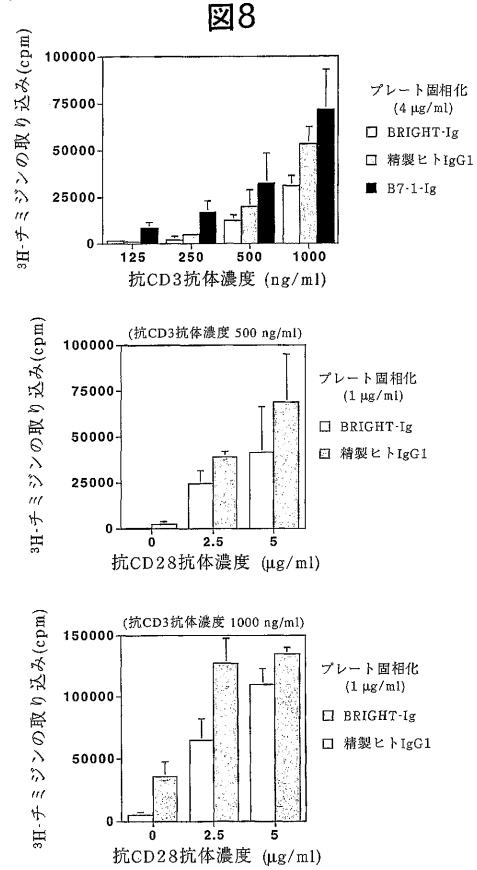
【図7】



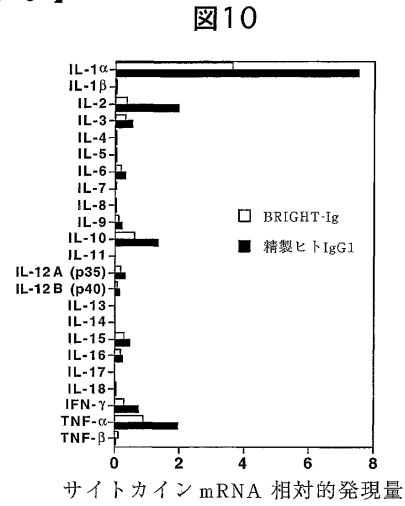
【図9】



【図8】



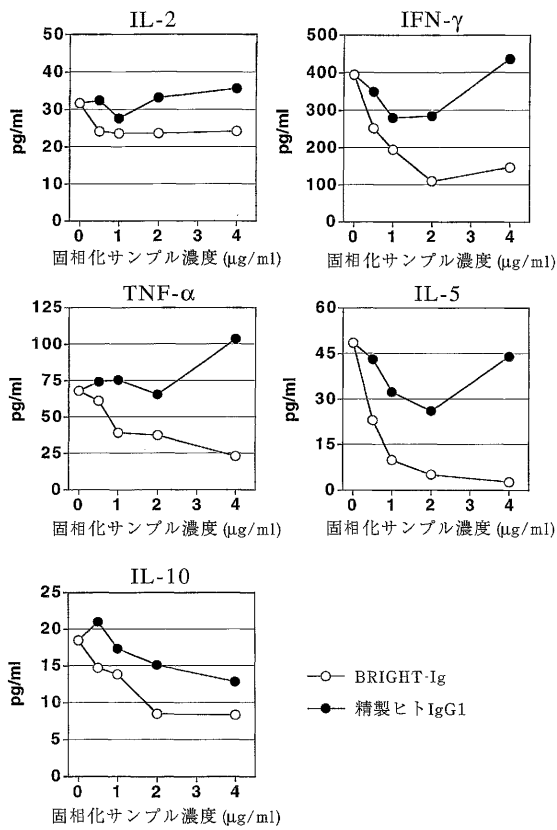
【図10】



$$\text{サイトカイン mRNA 相対的発現量} = \frac{\text{サイトカインスポットの放射活性} - \text{バックグラウンドの放射活性}}{\beta\text{-アクトチンスポットの放射活性} - \text{バックグラウンドの放射活性}}$$

【図 1 1】

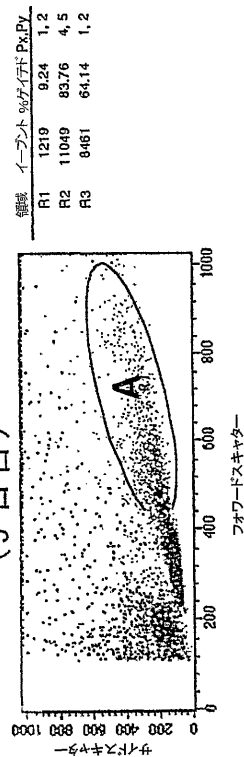
図 11



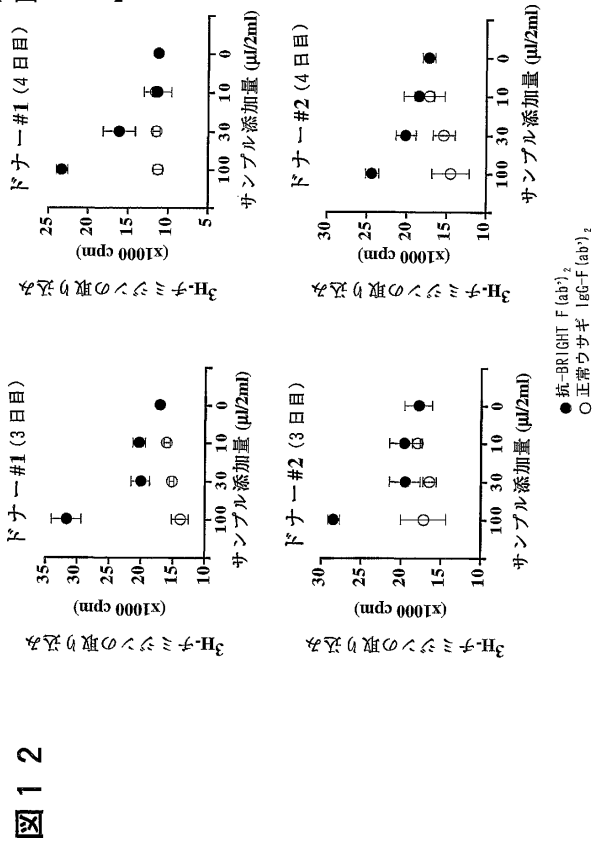
【図 1 3】

図 1 3

抗-BRIGHT
F(ab')₂ 添加
(9日目)



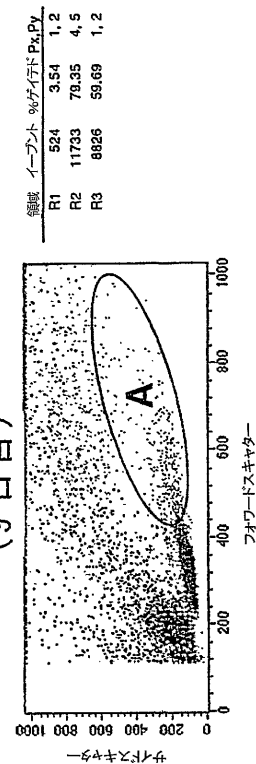
【図 1 2】



【図 1 3】

図 1 3

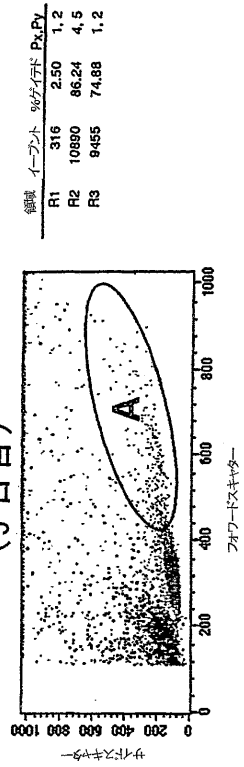
ウサギ IgG
F(ab')₂ 添加
(9日目)



【図 1 3】

図 1 3

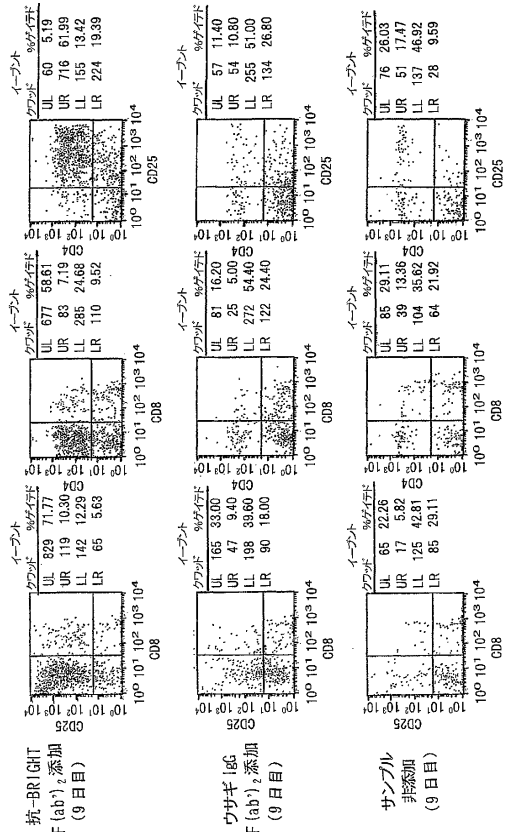
サンプル
非添加
(9日目)



【図 1 3】

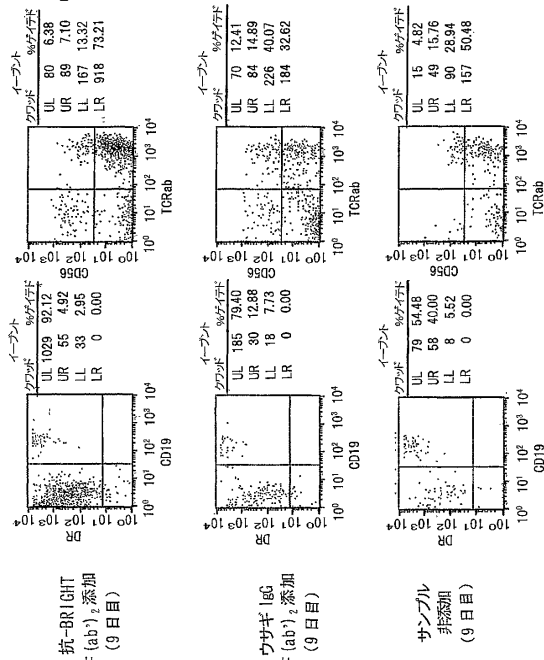
図 1 3

集団 A



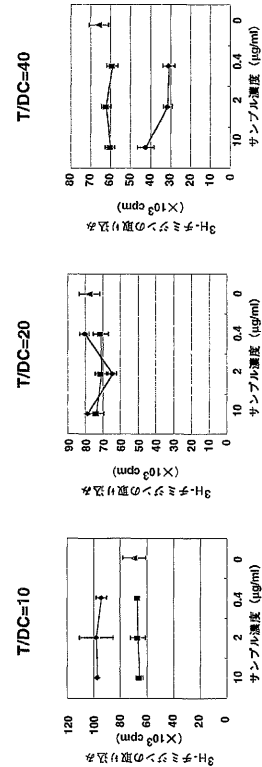
【図 1 3】

集団 A



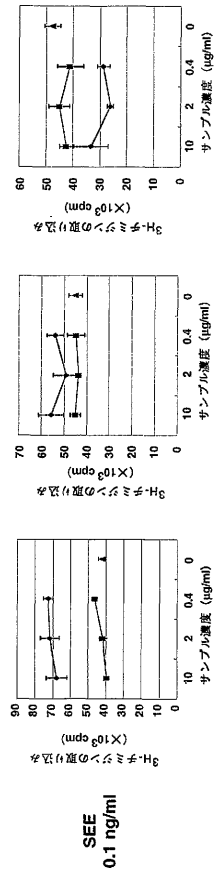
【図 1 4】

図 1 4



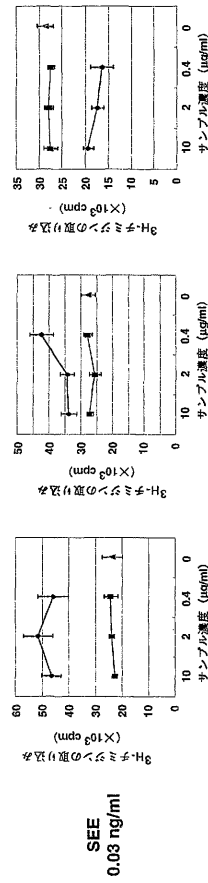
【図 14】

図 14



【図 14】

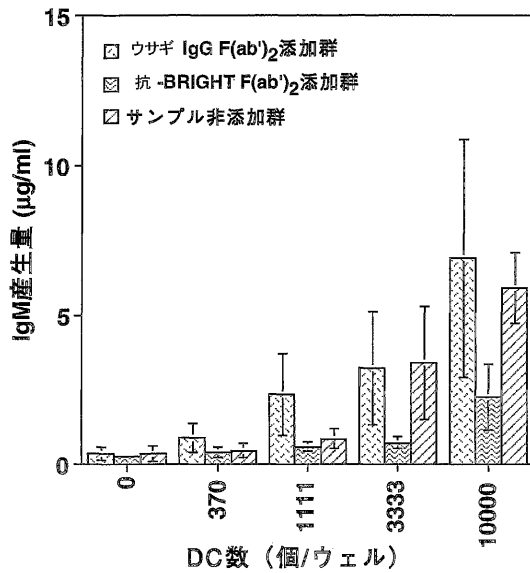
図 14



◆ anti-BRIGHT F(ab')₂
■ 正常ウサギ IgG F(ab')₂
▲ サンプル非添加

【図 15】

図 15



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP01/07919
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18, C12N5/08, G01N33/53		
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 C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18, C12N5/08, G01N33/53		
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) SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 01/18204 A1 (Curagen Corporation), 15 March, 2001 (15.03.01), & AU 20071086 A	1-4, 6-17
P, X	WO 00/68266 A1 (Eli Lilly and Company), 16 November, 2000 (16.11.00), & AU 200046406 A	1-4, 6-17
X	EP 1067182 A2 (Helix Research Institute), 07 July, 2000 (07.07.00) (Family: none)	1-4, 6-17
A	WO 99/46281 A2 (Genentech Inc.), 16 September, 1999 (16.09.99) (Family: none)	1-19
A	EP 873998 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 28 October, 1998 (28.10.98), & JP 11-152300 A	1-19
A	WO 97/45449 A1 (HART, Derek, Nigel, John), 04 December, 1997 (04.12.97), & JP 2000-512490 A	1-19
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 November, 2001 (09.11.01)		Date of mailing of the international search report 20 November, 2001 (20.11.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP01/07919
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 11-1497 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 06 January, 1999 (06.01.99) (Family: none)	1-19
P,A	BIOSIS NO: 200100021432 & Journal of Cell Biology, October, 2000, Vol.151, No.3, pages 673 to 683	1-19
A	BIOSIS NO: 199800302914 & Immunogenetics, May, 1998, Vol.47, No.6, pages 442 to 450	1-19
A	BIOSIS NO: 199799748018 & Journal of Experimental Medicine, (1997), Vol.186, No.6, pages 825 to 835	1-19

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO1/07919	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18, C12N5/08, G01N33/53			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁷ C07K14/47, C12N15/12, C07K16/18, C12N5/08, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
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)			
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
P,X	WO 01/18204 A1 (CURAGEN CORPORATION) 15. 3月. 2001 (15. 03. 01) & AU 20071086 A	1-4, 6-17	
P,X	WO 00/68266 A1 (ELI LILLY AND COMPANY) 16. 11月. 2000 (16. 11. 00) & AU 200046406 A	1-4, 6-17	
X	EP 1067182 A2 (Helix Research Institute) 07. 7月. 2000 (07. 07. 00) ファミリーなし	1-4, 6-17	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 09. 11. 01		国際調査報告の発送日 20.11.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一 (印) 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP01/07919
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 99/46281 A2 (GENENTECH INC) 16. 9月. 1999 (16. 09. 99) ファミリーなし	1-19
A	EP 873998 A (武田薬品工業株式会社) 28. 10月. 1998 (28. 10. 98) & JP 11-152300 A	1-19
A	WO 97/45449 A1 (ハート テレグ ナイゼン シェン) 04. 12月. 1997 (04. 12. 97) & JP 2000-512490 A	1-19
A	JP 11-1497 A (武田薬品工業株式会社) 06. 1月. 1999 (06. 01. 99) ファミリーなし	1-19
P, A	BIOSIS NO: 200100021432 & Journal of Cell Biology, Oct 2000, Vol. 151, No. 3, p. 673-683	1-19
A	BIOSIS NO: 199800302914 & Immunogenetics, May 1998, Vol. 47, No. 6, p. 442-450	1-19
A	BIOSIS NO: 199799748018 & Journal of Experimental Medicine, 1997, Vol. 186, No. 6, p. 825-835	1-19

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I
G 0 1 N 33/53 C 1 2 N 5/00 E

- (72)発明者 日野原 敦
群馬県高崎市宮原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内
- (72)発明者 中川 竜介
群馬県高崎市宮原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内
- (72)発明者 江原 宏美
群馬県高崎市宮原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内
- (72)発明者 今井 直志
群馬県高崎市宮原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内

(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 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 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)	新型树突细胞膜分子及其用途		
公开(公告)号	JPWO2002022683A1	公开(公告)日	2004-01-22
申请号	JP2002526933	申请日	2001-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	麒麟麦酒株式会社		
申请(专利权)人(译)	麒麟麦酒株式会社		
[标]发明人	渡会浩志 山口泰範 日野原敦 中川竜介 江原宏美		
发明人	渡会 浩志 山口 泰範 日野原 敦 中川 竜介 江原 宏美 今井 直志		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K19/00 C12N5/08 C12N15/12 G01N33/53 C12N5/06		
CPC分类号	C07K14/705		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 G01N33/53.Y C12N5/00.E		
优先权	2000277352 2000-09-12 JP		
其他公开文献	JPWO2002022683A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及具有SEQ ID NO : 1表示的氨基酸序列的分离的人树突状细胞膜分子，其随着人树突状细胞（DC）的成熟而表达显著增加，其变体是编码人树突状细胞的DNA。 以及使用膜分子或其变体分离或检测树突状细胞的方法。

