

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4462964号  
(P4462964)

(45) 発行日 平成22年5月12日(2010.5.12)

(24) 登録日 平成22年2月26日(2010.2.26)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 Z N A A
C 1 2 N	15/02 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 C
C O 7 K	16/28 (2006.01)	C O 7 K	16/28
C O 7 K	16/30 (2006.01)	C O 7 K	16/30
C 1 2 Q	1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68 A

請求項の数 17 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-63301 (P2004-63301)	(73) 特許権者	307010166 第一三株式会社 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号
(22) 出願日	平成16年3月8日(2004.3.8)	(74) 代理人	100146581 弁理士 石橋 公樹
(65) 公開番号	特開2004-290187 (P2004-290187A)	(74) 代理人	100115750 弁理士 矢口 敏昭
(43) 公開日	平成16年10月21日(2004.10.21)	(74) 代理人	100113583 弁理士 北野 範子
審査請求日	平成19年2月22日(2007.2.22)	(74) 代理人	100153039 弁理士 今村 真有
(31) 優先権主張番号	特願2003-63648 (P2003-63648)	(74) 代理人	100160462 弁理士 中村 有希子
(32) 優先日	平成15年3月10日(2003.3.10)	(74) 代理人	100161160 弁理士 竹元 利泰
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
微生物の受託番号	FERM BP-08627		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌特異的抗原を標的とした抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト・オキユロスパニンと特異的に結合し、該蛋白質を発現している細胞に対し抗体依存性細胞傷害活性を持つモノクローナル抗体。

【請求項2】

配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び/又は配列表の配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質と特異的に結合し、該蛋白質を発現している細胞に対し抗体依存性細胞傷害活性を持つモノクローナル抗体。

【請求項3】

マウスハイブリドーマO3B8-2C9-4F3(FERM BP-08627)から産生されることを特徴とする、請求項1又は2に記載の抗体。

【請求項4】

ヒト化されていることを特徴とする、請求項1乃至3のいずれか一つに記載の抗体。

【請求項5】

完全ヒト抗体であることを特徴とする、請求項1乃至2のいずれか一つに記載の抗体。

【請求項6】

IgG抗体であることを特徴とする、請求項1乃至5のいずれか一つに記載の抗体。

【請求項7】

下記の工程1)乃至4)を含む、癌の検出方法：

1) 被験者より採取した検体より、全RNA画分を抽出する工程；

10

20

- 2) 正常人より採取した検体より、全RNA画分を抽出する工程；
- 3) 上記工程1)由来の全RNA画分と上記工程2)由来の全RNA画分における、下記のa)又はb)のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；
- a) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、
- b) 上記a)に記載のポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；
- 4) 上記工程1)由来の全RNA画分と上記工程2)由来の全RNA画分との間における上記工程3)によって測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、上記工程1)に記載の被験者の癌を検出する工程。

10

## 【請求項8】

下記の工程1)乃至3)を含む、癌の検出方法：

- 1) 被験者より採取した検体における、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び/又は配列番号4に示されるアミノ酸配列から成る蛋白質の発現量を測定する工程；
- 2) 正常人から採取した検体における、上記工程1)に記載の蛋白質の少なくともいずれか一つの発現量を測定する工程；
- 3) 上記工程1)で検出された蛋白質の発現量と上記工程2)で測定された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験者の癌を検出する工程。

## 【請求項9】

癌が皮膚癌であることを特徴とする、請求項7又は8に記載の方法。

20

## 【請求項10】

癌がメラノーマであることを特徴とする、請求項7又は8に記載の方法。

## 【請求項11】

ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法が、ノーザンプロット法、ドットプロット法、スロットプロット法、RT-PCR、リボヌクレアーゼ保護アッセイ又はランオン・アッセイであることを特徴とする、請求項7、9又は10のいずれか一つに記載の方法。

## 【請求項12】

ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法が検体由来の相補的DNA群又は該DNA群の各DNAの部分配列からなるDNAで作製された遺伝子チップ又はアレイを用いることを特徴とする、請求項7、9又は10のいずれか一つに記載の方法。

30

## 【請求項13】

蛋白質の発現量の測定方法が、該蛋白質に特異的に結合する抗体又はリガンドを用いることを特徴とする、請求項8乃至10のいずれか一つに記載の方法。

## 【請求項14】

蛋白質の発現量の測定方法が、ウエスタンプロット法、ドットプロット法、スロットプロット法又は固相酵素免疫定量法(ELISA法)であることを特徴とする、請求項8乃至10のいずれか一つに記載の方法。

## 【請求項15】

下記の1)及び2)の少なくとも一つを含む癌の検出用キット：

40

- 1) 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び/又は配列表の配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質に特異的に結合し、該蛋白質を検出するための抗体；
- 2) 上記1)に記載の抗体に結合し得る二次抗体。

## 【請求項16】

癌が皮膚癌であることを特徴とする、請求項15に記載のキット。

## 【請求項17】

癌がメラノーマであることを特徴とする、請求項15に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

50

## 【 0 0 0 1 】

本発明は、癌治療に用いることができる抗体、該抗体を有効成分として含有することを特徴とする癌治療用医薬組成物、癌の検出方法、癌の検出用キットに関する。

## 【背景技術】

## 【 0 0 0 2 】

腫瘍細胞は、細胞の種類に応じて固有な抗原蛋白質（以下、腫瘍関連抗原と記載することがある）を発現することが知られている。そこで、この腫瘍関連抗原をターゲットとして腫瘍に対する新たな治療方法を開発しようとする試みが検討されている。腫瘍関連抗原に対して特異的な抗原 - 抗体反応を示すモノクローナル抗体は、種々の生体免疫反応（抗体依存性細胞性細胞傷害活性(ADCC)、補体依存性細胞傷害活性(CDC)等）を誘導して癌細胞を攻撃し、細胞死を誘導する事が知られているので、腫瘍の治療に有用なモノクローナル抗体が開発されている。

10

## 【 0 0 0 3 】

しかしながら、腫瘍の治療に有用なモノクローナル抗体は、転移性乳癌、急性骨髄性白血病、難治性慢性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫など、幾つかの腫瘍種に限られたものが知られているだけであり、他の腫瘍の治療に用いることができる、モノクローナル抗体の取得が求められていた。

## 【 0 0 0 4 】

腫瘍の治療に有用なモノクローナル抗体を取得するためには、腫瘍細胞で特異的に発現している蛋白質を同定し、該蛋白質を抗原としたモノクローナル抗体を取得することが有用である。

20

## 【 0 0 0 5 】

ヒト・オキュロスパニン（human oculospanin）は、網膜色素上皮及び眼球脈絡膜で発現している遺伝子よりイクスプレスト・シークエンス・タグ（Expressed Sequence Tag: EST）クローンとして取得された蛋白質である（例えば、非特許文献1参照。）。ヒト・オキュロスパニン遺伝子は1068bpのオープン・リーディング・フレームを有し、ヒト・オキュロスパニンは355アミノ酸からなり、DNA配列から推定される分子量は、36.4kDaであるがヒト・オキュロスパニンと腫瘍との関係は明らかとはなっていない。

## 【 0 0 0 6 】

30

【非特許文献1】「モレキュラー・ビジョン（Molecular Vision）」、2002年、第8巻、2 - 5 - 220

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【 0 0 0 7 】

本発明は、癌で特異的に発現する遺伝子を見出し、該遺伝子の発現を検出することによる癌の検出方法、該検出方法に用いる癌検出用キット、該遺伝子の発現産物に特異的に結合し、細胞障害活性を持つ抗体、該抗体を有効成分として含む癌の治療用医薬組成物を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

40

## 【 0 0 0 8 】

本発明者はヒト癌組織で特異的に発現する遺伝子を探索し、機能が不明であった、ヒト・オキュロスパニン（human oculospanin）遺伝子の発現量がメラノーマ細胞で顕著に増加していることを見出し、該遺伝子を用いた癌の検出方法、癌の検出用キット並びに、抗ヒト・オキュロスパニン抗体を含有する、癌治療用医薬組成物を提供し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、

(1) ヒト・オキュロスパニンと特異的に結合し、該蛋白質を発現している細胞に対し細胞障害活性を持つ抗体、

(2) 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び/又は配列表の

50

配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質と特異的に結合し、該蛋白質を発現している細胞に対し細胞傷害活性を持つ抗体、

( 3 ) 細胞傷害活性が抗体依存性細胞傷害活性であることを特徴とする、( 1 ) 又は ( 2 ) に記載の抗体、

( 4 ) 細胞傷害活性が補体依存性細胞傷害活性であることを特徴とする、( 1 ) 又は ( 2 ) に記載の抗体、

( 5 ) 細胞傷害活性が補体依存性細胞性細胞傷害活性であることを特徴とする、( 1 ) 又は ( 2 ) に記載の抗体、

( 6 ) 細胞傷害活性がアポトーシス誘導であることを特徴とする、( 1 ) 又は ( 2 ) に記載の抗体、

( 7 ) モノクローナル抗体であることを特徴とする、( 1 ) 乃至 ( 6 ) のいずれか一つに記載の抗体、

( 8 ) マウスハイブリドーマ O 3 B 8 - 2 C 9 - 4 F 3 ( F E R M B P - 0 8 6 2 7 ) から産生されることを特徴とする、請求項 7 に記載の抗体。

( 9 ) ヒト化されていることを特徴とする、( 1 ) 乃至 ( 8 ) のいずれか一つに記載の抗体、

( 1 0 ) 完全ヒト抗体であることを特徴とする、( 1 ) 乃至 ( 7 ) のいずれか一つに記載の抗体、

( 1 1 ) I g G 抗体であることを特徴とする、( 1 ) 乃至 ( 1 0 ) のいずれか一つに記載の抗体、

( 1 2 ) 下記の工程 1 ) 乃至 4 ) を含む、癌の検出方法：

1 ) 被験者より採取した検体より、全 R N A 画分を抽出する工程；

2 ) 正常人より採取した検体より、全 R N A 画分を抽出する工程；

3 ) 上記工程 1 ) 由来の全 R N A 画分と上記工程 2 ) 由来の全 R N A 画分における、下記の a ) 又は b ) のいずれか一つに記載のポリヌクレオチドの発現量を測定する工程；

a ) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド、

b ) 上記 a ) に記載のポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；

4 ) 上記工程 1 ) 由来の全 R N A 画分と上記工程 2 ) 由来の全 R N A 画分との間における上記工程 3 ) によって測定されたポリヌクレオチドの発現量の差を解析し、上記工程 1 ) に記載の被験者の癌を検出する工程、

( 1 3 ) 下記の工程 1 ) 乃至 3 ) を含む、癌の検出方法：

1 ) 被験者より採取した検体における、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及びノ又は配列表の配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質の発現量を測定する工程；

2 ) 正常人から採取した検体における、上記工程 1 ) に記載の蛋白質の少なくともいずれか一つの発現量を測定する工程；

3 ) 上記工程 1 ) で検出された蛋白質の発現量と上記工程 2 ) で測定された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験者の癌を検出する工程、

( 1 4 ) 癌が皮膚癌であることを特徴とする、( 1 2 ) 又は ( 1 3 ) のいずれか一つに記載の方法、

( 1 5 ) 癌がメラノーマであることを特徴とする、( 1 2 ) 又は ( 1 3 ) のいずれか一つに記載の方法、

( 1 6 ) ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法が、ノーザンプロット法、ドットプロット法、スロットプロット法、R T - P C R、リボヌクレアーゼ保護アッセイ又はランオン・アッセイであることを特徴とする、( 1 2 )、( 1 4 ) 及び ( 1 5 ) のいずれか一つに記載の方法、

( 1 7 ) ポリヌクレオチドの発現量を測定する方法が検体由来の相補的 D N A 群又は該 D N A 群の各 D N A の部分配列からなる D N A で作製された遺伝子チップ又はアレイを用

10

20

30

40

50

いることを特徴とする、(12)、(14)及び(15)のいずれか一つに記載の方法、  
 (18) 蛋白質の発現量の測定方法が、該蛋白質に特異的に結合する抗体又はリガンドを用いることを特徴とする、(13)乃至(15)のいずれか一つに記載の方法、  
 (19) 蛋白質の発現量の測定方法が、ウエスタンブロット法、ドットブロット法、スロットブロット法又は固相酵素免疫定量法(ELISA法)であることを特徴とする、(13)乃至(15)のいずれか一つに記載の方法、  
 (20) 下記の1)乃至3)からなる群から選択される少なくとも一つ以上を含む癌の検出用キット：

1) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを特異的に増幅するための15乃至30塩基長の連続したオリゴヌクレオチドプライマー；  
 2) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、該ポリヌクレオチドを検出するための15ヌクレオチド以上の連続したポリヌクレオチドプローブ；  
 3) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドが固定された固相化試料。

10

(21) 下記の1)及び2)の少なくとも一つを含む癌の検出用キット：

1) 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質及び/又は配列表の配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質に特異的に結合し、該蛋白質を検出するための抗体；  
 2) 上記1)に記載の抗体に結合し得る二次抗体。

20

(22) 癌が皮膚癌であることを特徴とする、(20)又は(21)に記載のキット、

(23) 癌がメラノーマであることを特徴とする、(20)又は(21)に記載のキット、

(24) (1)乃至(11)に記載の抗体の少なくともいづれか一つを含有することを特徴とする、癌の治療用医薬組成物、

(25) 配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列又は該配列の部分配列に相補的なヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを含む癌の治療用医薬組成物、

(26) 癌が皮膚癌であることを特徴とする、(24)又は(25)のいずれか一つに記載の医薬組成物、

(27) 癌がメラノーマであることを特徴とする、(24)又は(25)のいずれか一つに記載の医薬組成物、  
 からなる。

30

【発明の効果】

【0009】

本発明により、ヒト・オキユロスパニンがメラノーマで発現量が顕著に増加していることが見出され、該遺伝子を用いた癌の検出方法、癌の検出用キットが提供され、更に、オキユロスパニンに対する細胞傷害活性を有する抗体、該抗体を含む癌治療用医薬組成物が提供された。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本明細書中において、癌治療効果を有する化合物とは、癌の増殖を抑制する活性、癌を縮小する活性を有する化合物をいう。なお、本明細書中においては、「癌」と「腫瘍」は同じ意味に用いている。本明細書中において、「遺伝子」という語には、DNAのみならずそのmRNA、cDNA及びそのcRNAも含まれるものとする。したがって、本発明における「ヒト・オキユロスパニン遺伝子」には、ヒト・オキユロスパニンのDNA、mRNA、cDNA及びcRNAが含まれる。本明細書中において、「ポリヌクレオチド」という語は核酸と同じ意味で用いており、DNA、RNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含まれている。本明細書中においては、「ポリペプチド」と「蛋白質」は区別せずに用いている。また、本明細書中において、「RNA画分」とは、RNAを含んでいる画分をいう。また、本明細書中において、「細胞」には、動物個体内の細胞、

40

50

培養細胞も含んでいる。本明細書中において、「細胞の癌化」とは、細胞が接触阻止現象への感受性を喪失することや、足場非依存性増殖を示すこと等、細胞が異常な増殖を示すことをいい、このような異常な増殖を示す細胞を「癌細胞」という。本明細書においては、ヒト・オキュロスパニンが有する細胞の癌化活性等と同等の機能を有する蛋白質もヒト・オキュロスパニンという。なお本発明における癌遺伝子 (Oncogene) という語には癌遺伝子の他に癌原遺伝子、前癌遺伝子 (Proto-Oncogene) も含む。

#### 【0011】

本発明における、「細胞傷害」とは、何らかの形で、細胞に病理的な変化をもたらすことをいい、直接的な外傷にとどまらず、DNAの切断や塩基の二量体の形成、染色体の切断、細胞分裂装置の損傷、各種酵素活性の低下などあらゆる細胞の構造や機能上の損傷をいう。本発明における「細胞障害活性」とは上記細胞傷害を引き起こすことをいう。

10

#### 【0012】

本発明において、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、市販のハイブリダイゼーション溶液ExpressHyb Hybridization Solution (クロンテック社製) 中、68 でハイブリダイズすること、又は、DNAを固定したフィルターを用いて0.7 - 1.0 MのNaCl存在下68 でハイブリダイゼーションを行った後、0.1 - 2倍濃度のSSC溶液 (1倍濃度SSCとは150 mM NaCl、15 mM クエン酸ナトリウムからなる) を用い、68 で洗浄することにより同定することができる条件又はそれと同等の条件でハイブリダイズすることをいう。

#### 【0013】

20

##### 1. ヒト・オキュロスパニン

##### (1) ヒト・オキュロスパニン遺伝子の特異的発現の確認

ヒト・オキュロスパニン遺伝子は、ヒト各種細胞株群における遺伝子の発現量の解析の結果、他の組織に比べてメラニン細胞で有意に高い発現量を示し、さらに、正常なメラニン細胞に比べメラノーマにおいて有意に発現量が増加していることが本発明者らによって見出された。例えば、メラニン細胞、リンパ芽球、グリア細胞、上皮細胞の間でヒト・オキュロスパニンの発現量を比較すると、メラニン細胞で有意に発現量が高く、また、正常な皮膚細胞とメラノーマにおけるヒト・オキュロスパニンの発現量を比較すると、メラノーマにおいて顕著に発現量が高いことが、本発明者らによって見出された。したがって、ヒト・オキュロスパニンは細胞の癌化及び/又は癌細胞の増殖に関与していると考えられる。すなわち、ヒト・オキュロスパニンの各細胞、及び/又は各組織における発現量を測定することでヒト・オキュロスパニンの過剰発現に起因して発生する癌化及び/又は癌細胞、の増殖の状態を判定することができる。このような癌としては、例えば、皮膚癌、特にメラノーマを挙げることができるが、ヒト・オキュロスパニンの発現量が他の組織より有意に増殖している癌であれば皮膚癌以外の癌にも適用することができる。

30

#### 【0014】

ヒト・オキュロスパニン遺伝子のオープン・リーディング・フレーム (Open Reading Frame: ORF) のヌクレオチド配列は、配列表の配列番号1に示されており、そのアミノ酸配列は配列表の配列番号2に示されている。ヒト・オキュロスパニンのcDNAは、GenBankにHomo sapiens oculospantin (OCSP), mRNA (アクセッション番号: NM\_031945) として登録されており、GenBankに登録されているcDNAのヌクレオチド配列は、配列表の配列番号3にも示されており、ORFは配列番号3のヌクレオチド番号65乃至1129に示されている。また、GenBankに登録されているヒト・オキュロスパニンのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列は配列表の配列番号4に示されている。なお、ヒト・オキュロスパニンのアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、付加されたアミノ酸配列からなり、ヒト・オキュロスパニンと同等の生物活性を有する蛋白質もヒト・オキュロスパニンに含まれる。

40

#### 【0015】

##### 2. 癌の検出方法

ヒト・オキュロスパニンは癌細胞、特にメラノーマで高い発現が認められるので細胞、

50

特に皮膚細胞の癌化及び／又は癌細胞の増殖に關与していると考えられる。なお、「検体」とは、被験者や臨床検体等から得られた、血液、体液、前立腺、精巢、陰茎、膀胱、腎臓、口腔、咽頭、口唇、舌、歯肉、鼻咽頭、食道、胃、小腸、大腸、結腸、肝臓、胆嚢、膵臓、鼻、肺、骨、軟部組織、皮膚、乳房、子宮、卵巣、脳、甲状腺、リンパ節、筋肉、脂肪組織等の組織又は排泄物等の試料を意味するが、本発明においては皮膚又はリンパ節がより好ましい。

【 0 0 1 6 】

( 1 ) ヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量を利用した癌の検出方法

ヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量を利用した癌の検出方法は、具体的には、以下の工程 1 ) 乃至 4 ) を含む方法である。

- 1 ) 被験者より採取した検体より、全 R N A 画分を抽出する工程；
- 2 ) 正常人より採取した検体より、全 R N A 画分を抽出する工程；
- 3 ) 上記工程 1 ) に記載の全 R N A 画分と上記工程 2 ) に記載の全 R N A 画分におけるヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量を測定する工程；
- 4 ) 上記工程 1 ) 由来の全 R N A 画分と上記工程 2 ) 由来の全 R N A 画分との間における上記工程 3 ) によって測定された遺伝子の発現量の差を解析し、上記工程 1 ) に記載の被験者の癌を検出する工程。

以下、各工程を具体的に説明する。

【 0 0 1 7 】

a ) 工程 1 ) 被験者より採取した検体より、全 R N A 画分を抽出する工程；

検体から全 R N A 画分を抽出するに際しては、適切な実験の倫理基準に適した方法で入手したヒト由来組織を R N A 抽出用の溶媒（例えばフェノール等、リボヌクレアーゼを不活性化作用を有する成分を含むもの）で直接溶解するか又は、該組織の細胞を破壊しないように、スクレーパーで慎重に掻きとるか、もしくはトリプシン等の蛋白質分解酵素を用いて穏やかに組織から細胞を抽出するなどの方法により、細胞を回収した後、速やかに R N A 抽出工程に移行する。

【 0 0 1 8 】

R N A の抽出方法としては、チオシアン酸グアニジン・塩化セシウム超遠心法、チオシアン酸グアニジン・ホットフェノール法、グアニジン塩酸法、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法（Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987), 162, 156-159）などを採用しうるが、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム法が好適である。また、市販の R N A 抽出用試薬（例えば、I S O G E N（ニッポンジーン（株）製）、T R I Z O L 試薬（ギブコ・ビーアールエル社製））等を試薬に添付のプロトコールに従って用いることもできる。

【 0 0 1 9 】

得られた全 R N A 画分は、必要に応じてさらに m R N A のみに精製して用いるのが好ましい。精製方法は特に限定されないが、例えばピオチン化したオリゴ（d T）プローブに m R N A を吸着させ、さらにストレプトアビジンを固定化した常磁性粒子に、ピオチン/ストレプトアビジン間の結合を利用して m R N A を捕捉し洗浄操作の後、m R N A を溶出することにより、m R N A を精製することができる。また、オリゴ（d T）セルロースカラムに m R N A を吸着させて、次にこれを溶出して精製する方法も採用し得る。ただし、本発明の方法のためには、これら m R N A の精製工程は必須ではなく、検出対象のポリヌクレオチドの発現の検出が可能である限りにおいて、全 R N A 画分をその後の工程に用いることもできる。

【 0 0 2 0 】

b ) 工程 2 ) 正常人より採取した検体より、全 R N A 画分を抽出する工程：

本発明において、正常人とは、癌を有さない人を意味する。正常人であるか否かは、ヒト・オキユロスパニンの濃度を測定し、あらかじめ正常人の値として決められている数値範囲に入るか否かで判定することもできるし、ヒト・オキユロスパニンの発現量と、正常人の癌の形成度の相関をあらかじめ調べておくことによって、被験者から採取した検体にお

10

20

30

40

50

けるヒト・オキユロスパニンの発現量を測定することによって被験者が、正常人であるか否かを判定することもできる。正常人よりの全RNA画分の調製は、上記工程1)と同様に行うことができる。

【0021】

c) 工程3)上記工程1)に記載の全RNA画分と上記工程2)に記載の全RNA画分におけるヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量を測定する工程：

ここで、ヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量は配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含むことからなるポリヌクレオチド又は、配列表の配列番号1に示されるヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドの発現量で示される。

10

【0022】

ヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量の測定方法として、固相化試料を用いた測定方法と、その他のいくつかの測定方法について説明する。

【0023】

(a) 固相化試料を用いた測定方法

(i) 固相化試料

固相化試料としては、例えば以下のものが挙げられる。

【0024】

(イ) 遺伝子チップ：

データベース上のEST (expressed sequence tag) 配列又はmRNA配列をもとに合成したアンチセンスオリゴヌクレオチドが固相化された遺伝子チップを用いることができる。このような遺伝子チップとしてはアフィメトリックス (Affymetrix) 社製の遺伝子チップ (Lipshutz, R.J. et al., Nature Genet. (1999) 21, supplement, 20-24) を用いることができるが、これに限定されず、公知の方法に基づき作製してもよい。ヒト細胞由来のmRNAを解析する場合には、ヒト由来のものが好ましく、例えば、アフィメトリックス社製ヒトU95セット又はU133セットを用いることができる。しかしながら、それらに限定されず、例えば近縁種の動物由来のものも使用可能である。

20

【0025】

(ロ) ヒト、全RNAあるいは特定の組織から得た全RNAより作製されたcDNA又はRT-PCR産物が固相化された、アレイ又はメンブレンフィルター：

上記cDNA又はRT-PCR産物は、ヒトのESTデータベース等の配列情報を基に作製されたプライマーで逆転写酵素反応やPCRを実施することによりクローン化されたものである。このcDNAやRT-PCR産物は、あらかじめ腫瘍を有するヒトと腫瘍を有さないヒトの間で発現量の異なる全RNAを、サブトラクション法 (Diatchenki, L, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1996) 93, 6025-6030)、ディファレンシャルディスプレイ法 (Liang, P., et al Nucleic Acids Res., (1992) 23, 3685-3690) などを利用して選択されたものであってもよい。また、アレイやフィルターは市販のもの (例えば、インテリジーン：タカラバイオ社製等) を使用してもよいし、上記cDNAやRT-PCR産物を市販のスポットターで (例えば、GMS 417アレイヤー：タカラバイオ社製等) を用いて固相化することにより作製してもよい。

30

40

【0026】

(ii) プローブの作製と解析

標識プローブは、特定のmRNAクローンではなく、発現している全てのmRNAを標識したものをを用いる。プローブ作製のための出発材料としては精製していないmRNAを用いてもよいが、前述の方法で精製したポリ(A)+RNAを用いることが望ましい。以下に、各種固相化試料を用いた場合の、標識プローブの調製方法と検出、解析方法について説明する。

【0027】

(イ) アフィメトリックス社製遺伝子チップ：

50

アフィメトリクス社製遺伝子チップに添付されたプロトコール（アフィメトリクス社発現解析技術マニュアル）に従ってピオチン標識したcRNAプローブを作製する。次いでアフィメトリクス社製遺伝子チップに添付のプロトコール（発現解析技術マニュアル）に従って、アフィメトリクス社製の解析装置（GeneChip Fluidics Station 400）を用いてハイブリダイゼーション及び解析を行い、アビジンによる発光を検出、解析を行う。

【0028】

（ロ）アレイ：

逆転写酵素反応でポリ（A）<sup>+</sup>RNAからcDNAを作製する際に、cDNAの検出ができるようにcDNAを標識しておくことが必要であり、蛍光色素で標識する場合には、  
10  
蛍光色素（例えばCy3、Cy5など）で標識されたd-UTPなどを加えておくことによりcDNAを蛍光標識する。このとき、メラノーマ細胞由来のポリ（A）<sup>+</sup>RNAと対照細胞由来のポリ（A）<sup>+</sup>RNAをそれぞれ異なる色素で標識しておけば、後のハイブリダイゼーション時には両者を混合して用いることができる。アレイとして例えば、タカラバイオ（株）社の市販アレイを用いる場合、同社のプロトコールに従いハイブリダイゼーション及び洗浄を行って、蛍光シグナル検出機（例えばGMS418アレイスキャナー（タカラバイオ（株）社製）等）で蛍光シグナルを検出後、解析を行う。ただし、使用するアレイとしては市販のものに限定されず、自家製のもの、特別に作製したものでよい。

【0029】

（ハ）メンブレンフィルター：

逆転写酵素でポリ（A）<sup>+</sup>RNAからcDNAを作製する際に、放射性同位元素（例えば、d-CTP等）を加えることにより標識プローブを調製し、常法によりハイブリダイゼーションを行い、例えば、市販のフィルター製マイクロアレイである、アトラスシステム（クロンテック社製）を用いてハイブリダイゼーション及び洗浄を行った後、解析装置（例えば、アトラスイメージ：クロンテック社製等）を用いて検出、解析を行う。  
20

【0030】

前記（イ）乃至（ハ）のいずれに記載の方法も、同一ロットの固相化試料にヒト各組織由来のプローブをハイブリダイズさせる。このとき、使用するプローブ以外のハイブリダイゼーション以外の条件は同じとする。蛍光標識プローブを用いる場合には、それぞれのプローブを異なる蛍光色素で標識しておけば一つの固相化試料に両プローブの混合物を一度にハイブリダイズさせて蛍光強度を読み取ることができる（Brown, P.O. et al. Nature Genet., (1999)21, supplement, p.33 - 37）。  
30

【0031】

（b） その他の測定方法

上記以外の測定方法としてサブトラクションクローニング法（実験医学別冊 新 遺伝子工学ハンドブック、羊土社刊(1996) p.32-35参照）、ディファレンシャルディスプレイ法（基礎生化学実験法4 核酸・遺伝子実験 II.応用編、東京化学同人(2001), p125-128）、レポーター遺伝子を用いた方法（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（例えば、pCAT3-Basicベクター：プロメガ社製を使用。）や -ガラクトシダーゼ（例えば、p-gal-Basic：プロメガ社製を使用。）、分泌型アルカリホスファターゼ（例えば、pSEAP2-Basic：クロンテック社製を使用。）、緑色蛍光蛋白質（green-fluorescent protein）（例えば、pEGFP-1：クロンテック社製を使用。））があるがこれらに限定されない。  
40

工程4）上記工程1）由来の全RNA画分と上記工程2）由来の全RNA画分との間における上記工程3）によって測定された遺伝子の発現量の差を解析し、上記工程1）に記載の被験者の癌を検出する工程。 正常人由来の検体と被験者由来の検体との間でヒト・オキユロスパニンの発現量の差を解析し、ヒト・オキユロスパニンの発現量が有意に増加している検体では癌、特に皮膚癌、更にはメラノーマが存在する可能性が高いと判定することができ、癌を検出することができる。発現量が有意に増加しているとは、例えば、アフ  
50

ィメトリックス社の遺伝子チップを用いて、アィメトリックス社のmicroarray Suite Ver. 3.0を用いて解析した場合、メラノーマ細胞由来の遺伝子のAverage difference値が正常メラニン細胞に比べて有意に増加している場合をいう。

【0032】

また、ヒト・オキユロスパニン遺伝子の濃度を測定し、あらかじめ正常人の値として決められている数値範囲に入るか否かを解析し正常人の値として決められている範囲を超えている場合には癌を有すると判定することで癌を検出することもできるし、ヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量と、正常人の癌の形成度の相関をあらかじめ調べておくことによって、被験者から採取した検体におけるヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量を測定することによって被験者が、正常人であるか否かを判定することもできる。

10

【0033】

(3) ヒト・オキユロスパニンの発現量(蛋白質の発現量)を利用した癌の検出方法  
ヒト・オキユロスパニンの発現量を利用した癌の検出方法は、具体的には、以下の工程1)乃至3)を含む方法である。

- 1) 被験者より採取した検体における、ヒト・オキユロスパニンの発現量を測定する工程：
- 2) 正常人より採取した検体における、上記1)に記載の蛋白質の発現量を測定する工程：
- 3) 上記工程1)で測定された蛋白質の発現量と上記工程2)で測定された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験者の癌を検出する工程。

20

以下、各工程を具体的に説明する。

【0034】

a) 工程1)被験者より採取した検体における、ヒト・オキユロスパニンの発現量を測定する工程：

(a) 検体より蛋白質測定用試料の調製

検体は、必要に応じて高速遠心を行うことにより、不溶性の物質を除去した後、以下のようにELISA/RIA用試料やウエスタンブロット用試料として調製する。

【0035】

ELISA/RIA用試料としては、例えば回収した、皮膚又はリンパ節をそのまま使用するか、緩衝液で適宜希釈したものをを用いる。ウエスタンブロット用(電気泳動用)試料は、例えば、皮膚又はリンパ節の抽出液をそのまま使用するか、緩衝液で適宜希釈して、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動用の2-メルカトルエタノールを含むサンプル緩衝液(シグマ(Sigma)社製等)と混合する。ドット/スロットブロットの場合は、例えば回収した皮膚又はリンパ節の抽出液そのもの、又は緩衝液で適宜希釈したものを、ブロッティング装置を使用するなどして、直接メンブレンへ吸着させる。

30

【0036】

(b) 試料の固相化

上記のようにして得られた試料中の蛋白質を特異的に検出するためには、試料を免疫沈降法、リガンドの結合を利用した方法等によって、沈殿させ、固相化せずに検出することもできるし、そのまま検出する該試料を固相化することもできる。蛋白質を固相化する場合において、ウエスタンブロット法、ドットブロット法又はスロットブロット法に用いられるメンブレンとしては、ニトロセルロースメンブレン(例えば、バイオラッド社製等)、ナイロンメンブレン(例えば、ハイボンド-ECL(アマシャム・ファルマシア社製)等)、コットンメンブレン(例えば、ブロットアブソベントフィルター(バイオラッド社製)等)又はポリビニリデン・ジフルオリド(PVDF)メンブレン(例えば、バイオラッド社製等)等が挙げられる。

40

【0037】

ELISA法/RIA法で蛋白質の検出・定量を行うためには、専用の96穴プレート(例えば、イムノプレート・マキシソープ(ヌンク社製)等)に試料又はその希釈液(例

50

えば0.05% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水(以下「PBS」という)で希釈したものを)を入れて4乃至室温で一晩、又は37で1乃至3時間静置することにより、ウェル内底面に蛋白質を吸着させて固相化する。

【0038】

ヒト・オキユロスパニンに対する抗体は、常法を用いて(例えば、新生化学実験講座1、蛋白質1、p.389-397、1992参照。)、ヒト・オキユロスパニン又はヒト・オキユロスパニンのアミノ酸配列から選択される任意のポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。また、公知の方法(例えば、Kohler and Milstein, Nature 256, 495-497, 1975、Kennet, R. ed., Monoclonal Antibody p.365-367, 1980, Penum Press, N.Y.)に従って、ヒト・オキユロスパニンに

10

【0039】

なお、抗原となるヒト・オキユロスパニンはヒト・オキユロスパニン遺伝子を遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、ヒト・オキユロスパニン遺伝子を発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現したヒト・オキユロスパニンを精製すればよい。

【0040】

(c) ヒト・オキユロスパニンの発現量の測定

ヒト・オキユロスパニンの発現量は、配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質の発現量で示される。

20

【0041】

発現量の測定は、上記抗ヒト・オキユロスパニン抗体を用いてウエスタンブロット法やドット/スロットブロット法等公知の方法を用いて測定することができる。

【0042】

b) 工程2) 正常人より採取した検体における、上記1)に記載の蛋白質の発現量を測定する工程:

正常人より採取した検体におけるヒト・オキユロスパニンの発現量の測定は上記工程1)と同様の方法で行うことができる。

【0043】

c) 工程3) 上記工程1)で測定された蛋白質の発現量と上記工程2)で測定された該蛋白質の発現量の差を解析し、被験者の癌を検出する工程。

30

【0044】

正常人由来の検体と被験者由来の検体との間でヒト・オキユロスパニンの発現量の差を解析し、ヒト・オキユロスパニンの発現量が有意に増加している検体では癌、特に皮膚癌、更にはメラノーマが存在する可能性が高いと判定することができ、癌を検出することができる。

【0045】

また、ヒト・オキユロスパニンの濃度を測定し、あらかじめ正常人の値として決められている数値範囲に入るか否かを解析し正常人の値として決められている範囲を超えている場合には癌を有すると判定することで癌を検出することもできるし、ヒト・オキユロスパニンの発現量と、正常人の癌の形成度の相関をあらかじめ調べておくことによって、被験者から採取した検体におけるヒト・オキユロスパニンの発現量を測定することによって被験者が、正常人であるか否かを判定することもできる。

40

【0046】

3. ヒト・オキユロスパニン遺伝子及びヒト・オキユロスパニンの検定

ヒト・オキユロスパニン遺伝子及びヒト・オキユロスパニンは、ヒトの正常組織の間ではメラニン細胞で発現量が有意に増加しており、更に、正常なメラニン細胞に比べ、メラノーマで発現量が有意に増加している。

【0047】

50

ヒト・オキユロスパニンの機能を調べる方法としては、まず、ヒト・オキユロスパニンを発現している細胞由来のヒト cDNA ライブラリーから、コロニーハイブリダイゼーション法等、公知の方法に従い、完全長 cDNA を取得する。この完全長 cDNA をマウス又はヒト細胞に導入して高発現させ、細胞に影響が生じるか否かを検討する。

【 0 0 4 8 】

cDNA を動物個体内で発現させるためには、得られた完全長 cDNA をウイルスベクターに組み込み、動物に投与する方法が挙げられる。ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス等の DNA ウイルス、又は RNA ウイルスに cDNA を組み込んで導入する方法が挙げられる。なかでも、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスを用いた方法が好ましい。

10

【 0 0 4 9 】

非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法 (DNA ワクチン法)、リボソーム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、なかでも、DNA ワクチン法、リボソーム法が好ましい。

【 0 0 5 0 】

また、培養細胞に対して、完全長 cDNA をヒト、マウス、ラット等由来の筋肉細胞、肝細胞、脂肪細胞、あるいは筋肉細胞、肝細胞、脂肪細胞、皮膚細胞等へ導入し、高発現させ、各標的細胞の有する機能、具体的には、糖や脂質の産生や取り込み、あるいはグリコーゲンの蓄積等の糖脂質代謝を調節する機能、あるいは細胞の形態にどのような影響が現れるかを検討することができる。逆に、試験する遺伝子の全 RNA に対するアンチセンス核酸を、細胞に導入し、各標的細胞の機能や形態にどのような影響が出るかを調べることもできる。

20

【 0 0 5 1 】

完全長 cDNA を動物又は細胞に導入するにあたっては、適当なプロモーター及び形質発現に関わる配列を含むベクターに該 cDNA を組み込み、該ベクターで宿主細胞を形質転換させる。脊椎動物細胞の発現プロモーターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列等を有するものを使用でき、さらにこれは必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Subramani, S. et al., Mol. Cell. Biol., (1981) 1, p. 854-864)、レトロウイルスベクター pLNCX、pLNSX、pLXIN、pSIR (クロンテック (Clontech) 社製)、コスミドベクター pAxCw (タカラバイオ社製) 等が挙げられるが、これに限定されない。該発現ベクターは、ジエチルアミノエチル (DEAE) - デキストラン法 (Luthman, H. and Magnusson, G., Nucleic Acids Res. (1983) 11, p. 1295-1308)、リン酸カルシウム - DNA 共沈殿法 (Graham, F. L. and van der Eb, A. J. Virology, (1973) 52, p. 456-457)、及び電気パルス穿孔法 (Neumann, E. et al., EMBO J. (1982) 1, p. 841-845) などによりサル細胞である COS 細胞 (Gluzman, Y. Cell (1981) 23, p. 175-182, ATCC: CRL - 1650) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞、ATCC: CCL - 61) のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, p. 4126 - 4220)、ヒト胎児腎臓由来 293 細胞 (ATCC: CRL - 1573) 等に取り込ませることができるが、これらに限定されない。かくして所望の形質転換体を得ることができる。

30

40

【 0 0 5 2 】

また、遺伝子操作により、正常動物において、目的とする遺伝子が高発現するようにトランスジェニック動物を作製し、細胞の形態にどのような影響が現れるかを検討することも可能である。逆に、メラノーマを有する動物において、対象とする遺伝子を破壊したノックアウト動物を作製し細胞の状態を判定することができる。

50

## 【 0 0 5 3 】

4 . ヒト・オキュロスパニン遺伝子及び / 又はヒト・オキュロスパニン検出用キット

ヒト・オキュロスパニン遺伝子及び / 又はヒト・オキュロスパニンは、以下の 1 ) 乃至 5 ) からなる群から選択される少なくとも一つ以上を含むキットを用いて検出することができる。

1 ) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを特異的に増幅するための 1 5 乃至 3 0 塩基長の連続したオリゴヌクレオチドプライマー ;

2 ) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドにストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、該ポリヌクレオチドを検出するための 1 5 ヌクレオチド以上の連続したポリヌクレオチドプローブ ;

3 ) 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドが固定された固相化試料 ;

4 ) 配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白質に特異的に結合し、該蛋白質を検出するための抗体 ;

5 ) 上記 4 ) に記載の抗体に結合し得る二次抗体。

## 【 0 0 5 4 】

前記 1 ) に記載のプライマーは、ヒト・オキュロスパニン遺伝子のヌクレオチド配列 ( 配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列 ) に基づき市販のプライマー設計ソフト ( たとえば、Wisconsin GCG package Version 10.2 ) を用いる等、常法により容易に設計し、増幅することができる。このようなプライマーとしては例えば、配列表の配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを増幅するためには配列表の配列番号 5 に示されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドと配列表の配列番号 6 に示されるヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドの組合せを使用することができる。また、前記 2 ) に記載のプローブは、ヒト・オキュロスパニンに特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、1 0 0 乃至 1 5 0 0 塩基長、好ましくは 3 0 0 乃至 6 0 0 塩基長である。これらのプライマーやプローブは、適当な標識によりラベル ( 例えば、酵素標識、放射性標識、蛍光標識等 ) されていてもよく、また、リンカーを付加していてもよい。

## 【 0 0 5 5 】

上記 3 ) に記載の固相化試料は、上記 2 ) に記載のプローブをガラス板、ナイロンメンブレン等の固相に固定することにより作製される。このような固相化試料の作成方法については、既に「 2 . 癌の検出方法」の項の「 ( 1 ) ヒト・オキュロスパニン遺伝子の発現量を利用した癌の検出方法」の項中の「 ( 1 ) 固相化試料を用いた測定方法」の項で説明した通りであり、例えば、遺伝子チップ、cDNA アレイ、オリゴアレイ、メンブレンフィルター等を挙げることができる。

## 【 0 0 5 6 】

本発明のキットには、更に耐熱性 DNA ポリメラーゼ、dNTP ( dATP、dCTP、dGTP、dTTP の混合物 ) 及び緩衝液を含めることもできる。耐熱性 DNA ポリメラーゼとしては Taq DNA ポリメラーゼ、LA Taq DNA polymerase ( 宝酒造社製 )、Tth DNA ポリメラーゼ、Pfu DNA ポリメラーゼなどが例示できる。緩衝液は使用する DNA ポリメラーゼに応じて選ばれ、必要に応じて  $Mg^{2+}$  などが添加されている。

## 【 0 0 5 7 】

前記、4 ) 及び 5 ) に記載の抗体は上記「 2 . 癌の検出方法」の項の「 ( 3 ) ヒト・オキュロスパニンの発現量 ( 蛋白質の発現量 ) を利用した癌の検出方法」の項や「 5 . 抗ヒト・オキュロパニン抗体の製造」の項に記載した方法により作製することができる。該抗体は、適当な標識によりラベル ( 例えば、酵素標識、放射性標識、蛍光標識等 ) されていてもよい。

## 【 0 0 5 8 】

本発明のキットはヒト・オキュロスパニン遺伝子及び / 又はヒト・オキュロスパニンの

10

20

30

40

50

検出に用いることができ、癌の有無の判定や、癌の増殖を抑制する物質のスクリーニングにも用いることができる。

【 0 0 5 9 】

5 . 抗ヒト・オキユロパニン抗体の製造

( 1 ) 抗原の調製

抗ヒト・オキユロパニン抗体を作製するための抗原としては、ヒト・オキユロパニン又はその少なくとも6個の連続した部分アミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいはこれらに任意のアミノ酸配列や担体が付加された誘導体を挙げるることができる。

【 0 0 6 0 】

ヒト・オキユロパニンは、ヒトの腫瘍組織あるいは腫瘍細胞から直接精製して使用することができ、また、ヒト・オキユロパニンを *in vitro* にて合成する、あるいは遺伝子操作により宿主細胞に産生させることによって得ることができる。遺伝子操作では、具体的には、ヒト・オキユロパニンを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、あるいは他の原核生物、又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることによってヒト・オキユロパニンを発現させることにより、該蛋白質を得ることが出来る。ヒト・オキユロパニンの cDNA のヌクレオチド配列は、文献 (Graeme Wistow, Steven L. Bernstein, M. Keith Wyatt, Robert N. Fariss, Amita Behal, Jeffrey W. Touchman, Gerard Bouffard, Don Smith, and Katherine Perterson (2002) Expressed sequence tag analysis of human RPE/choroids for the NEI Bank Project: Over 6000 non-redundant transcripts, npvel and splice variants, Molecular Vision 8:2-5-220) に記載されており、GenBank にアクセス番号 NM\_031945 で登録されており、また、その ORF は配列表の配列番号 1 にも記載されている。ヒト・オキユロパニンの cDNA は例えば、ヒト・オキユロパニンを発現している cDNA ライブラリーを鋳型として、ヒト・オキユロパニン cDNA を特異的に増幅するプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (以下「PCR」という) [Saiki, R. K., et al. (1988) Science 239, 487-49 参照] を行なう、いわゆる PCR 法により取得することができる。

【 0 0 6 1 】

ポリペプチドのイン・ビトロ (*in vitro*) 合成としては、例えばロシュ・ダイアグノスティックス社製のラピッドトランスレーションシステム (RTS) が挙げられるが、これに限定されない。RTS を用いる場合を例に挙げると、目的の遺伝子を T7 プロモーターにより制御される発現ベクターにクローニングし、これを *in vitro* の反応系に添加すると、最初に鋳型 DNA より T7 RNA ポリメラーゼにより mRNA が転写され、その後大腸菌溶解液中のリボソーム等により翻訳が行われ、目的のポリペプチドが反応液中に合成される (Biochemica, 1, 20-23 (2001), Biochemica, 2, 28-29 (2001))。

【 0 0 6 2 】

原核細胞の宿主としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) や枯草菌 (*Bacillus subtilis*) などが挙げられる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質転換させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコンすなわち複製起点と、調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させる。また、ベクターとしては、形質転換細胞に表現形質 (表現型) の選択性を付与することができる配列を有するものが好ましい。

【 0 0 6 3 】

例えば、大腸菌としては K12 株などがよく用いられ、ベクターとしては、一般に pBR322 や pUC 系のプラスミドが用いられるが、これらに限定されず、公知の各種菌株、及びベクターがいずれも使用できる。

【 0 0 6 4 】

プロモーターとしては、大腸菌においては、トリプトファン (*trp*) プロモーター、ラクトース (*lac*) プロモーター、トリプトファン・ラクトース (*tac*) プロモーター、リポプロテイン (*lpp*) プロモーター、ポリペプチド鎖伸張因子 Tu (*tufB*) プロモーター等が挙げられ、どのプロモーターも目的のポリペプチドの産生に使用することができる。

## 【 0 0 6 5 】

枯草菌としては、例えば 2 0 7 - 2 5 株が好ましく、ベクターとしては p T U B 2 2 8 (Ohmura, K. et al. (1984) J. Biochem. 95, 87-93) などが用いられるが、これに限定されるものではない。枯草菌の - アミラーゼのシグナルペプチド配列をコードする D N A 配列を連結することにより、菌体外での分泌発現も可能となる。

## 【 0 0 6 6 】

真核細胞の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母などの細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞である C O S 細胞 (Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175-182、A T C C C R L - 1 6 5 0)、マウス繊維芽細胞 N I H 3 T 3 (A T C C C N o . C R L - 1 6 5 8) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (C H O 細胞、A T C C C C C L - 6 1) のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4126-4220) 等がよく用いられているが、これらに限定されない。

10

## 【 0 0 6 7 】

脊椎動物細胞の発現プロモーターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、R N A のスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列等を有するものを使用でき、さらにこれは必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、サイトメガロウイルス初期プロモーターを有する p C D N A 3 . 1 (インビトロジェン社製)、S V 4 0 の初期プロモーターを有する p S V 2 d h f r (Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol. 1, 854-864) 等が挙げられるが、これに限定されない。

20

## 【 0 0 6 8 】

宿主細胞として、C O S 細胞あるいは N I H 3 T 3 細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、S V 4 0 複製起点を有し、C O S 細胞あるいは N I H 3 T 3 細胞において自立増殖が可能であり、さらに、転写プロモーター、転写終結シグナル、及び R N A スプライス部位を備えたものを用いることができる。該発現ベクターは、D E A E - デキストラ法 (Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res. 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム - D N A 共沈殿法 (Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) Virology 52, 456-457)、及び電気パルス穿孔法 (Neumann, E. et al. (1982) EMBO J. 1, 841-845) などにより C O S 細胞、あるいは N I H 3 T 3 細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として C H O 細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、抗生物質 G 4 1 8 耐性マーカーとして機能する n e o 遺伝子を発現し得るベクター、例えば p R S V n e o (Sambrook, J. et al. (1989) : "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) や p S V 2 n e o (Southern, P. J. and Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Gene t. 1, 327-341) などをコ・トランスフェクトし、G 4 1 8 耐性のコロニーを選択することにより、目的のポリペプチドを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

30

## 【 0 0 6 9 】

上記のようにして得られる形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内、又は細胞外に目的のポリペプチドが産生される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば、上記 C O S 細胞であれば、R P M I 1 6 4 0 培地やダルベッコ変法イーグル培地 (以下「D M E M」という) などの培地に、必要に応じウシ胎児血清などの血清成分を添加したものを使用できる。

40

## 【 0 0 7 0 】

上記培養により、形質転換体の細胞内又は細胞外に産生される組換え蛋白質は、該蛋白質の物理的性質や化学的性質などを利用した各種の公知の分離操作法により分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えば、通常の蛋白質沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー (ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラ

50

フィー（HPLC）などの各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せなどを例示できる。また、発現させる組換え蛋白質に6残基からなるヒスチジンを繋げることにより、ニッケルアフィニティーカラムで効率的に精製することができる。上記方法を組合せることにより容易に高収率、高純度で目的とするポリペプチドを大量に製造できる。

## （2） 抗ヒト・オキユロスパニンモノクローナル抗体の製造

ヒト・オキユロスパニンと特異的に結合する抗体の例として、ヒト・オキユロスパニンと特異的に結合するモノクローナル抗体を挙げることができるが、その取得方法は、以下に記載する通りである。

### 【0071】

モノクローナル抗体の製造にあたっては、一般に下記のような作業工程が必要である。すなわち、

- （a）抗原として使用する生体高分子の精製、
- （b）抗原を動物に注射することにより免疫した後、血液を採取しその抗体価を検定して脾臓摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、
- （c）骨髓腫細胞（以下「ミエローマ」という）の調製、
- （d）抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、
- （e）目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、
- （f）単一細胞クローンへの分割（クローニング）、
- （g）場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育、
- （h）このようにして製造されたモノクローナル抗体の生理活性、及びその結合特異性の検討、あるいは標識試薬としての特性の検定、等である。

### 【0072】

以下、モノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用することもできる。

### 【0073】

#### （a）抗原の精製

抗原としては、前記したような方法で調製したヒト・オキユロスパニン又はその一部を使用することができる。また、ヒト・オキユロスパニン発現組換え体細胞より調製した膜画分、又はヒト・オキユロスパニン発現組換え体細胞自身、さらに、当業者に周知の方法を用いて、化学合成した本発明の蛋白質の部分ペプチドを抗原として使用することもできる。

### 【0074】

（b）抗体産生細胞の調製 工程（a）で得られた抗原と、フロインドの完全又は不完全アジュバント、又はカリミヨウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物は公知のハイブリドーマ作製法に用いられる動物を支障なく使用することができる。具体的には、たとえばマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等を使用することができる。ただし、摘出した抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点から、マウス又はラットを被免疫動物とするのが好ましい。また、実際に使用するマウス及びラットの系統は特に制限はなく、マウスの場合には、たとえば各系統 A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、C57BR、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、R III、SJL、SWR、WB、129 等が、またラットの場合には、たとえば、Low、Lewis、Sprague、Dawley、ACI、BN、Fischer等を用いることができる。これらのマウス及びラットは例えば日本クレア、日本チャールスリバー、日本SLC、The Jackson Laboratories等実験動物飼育販売業者より入手することができる。このうち、後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスでは BALB/c 系統が、ラットでは low 系統が被免疫動物として特に好ましい。また、抗原のヒトとマウスでの同一性を考慮し、自己抗体を除去する生体機構を低下させたマウス、すなわち自己免疫疾患マウ

10

20

30

40

50

スを用いることも好ましい。なお、これらマウス又はラットの免疫時の週齢は、好ましくは5～12週齢、さらに好ましくは6～8週齢である。

【0075】

ヒト・オキユロスパニン又はこの組換え体によって動物を免疫するには、例えば、Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology Vol.1. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987)、Kabat, E.A. and Mayer, M.M., Experimental Immunology, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964)等に詳しく記載されている公知の方法を用いることができる。これらの免疫法のうち、この発明において好適な方法を具体的に示せば、たとえば以下のとおりである。すなわち、まず、抗原である膜蛋白画分、もしくは抗原を発現させた細胞を動物の皮内又は腹腔内に投与する。ただし、免疫効率を高めるためには両者の併用が好ましく、前半は皮内投与を行い、後半又は最終のみ腹腔内投与を行うと、特に免疫効率を高めることができる。抗原の投与スケジュールは、被免疫動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、抗原投与回数3～6回、投与間隔2～6週間が好ましく、投与回数3～4回、投与間隔2～4週間がさらに好ましい。投与回数を過度に増やすと抗原を浪費し、また投与間隔を広げすぎると動物の老化による細胞の低活性化を招くために好ましくない。また、抗原の投与量は、動物の種類、個体差等により異なるが、一般には、0.05～5 ml、好ましくは0.1～0.5ml程度とする。追加免疫は、以上の通りの抗原投与の1～6週間後、好ましくは2～4週間後、さらに好ましくは2～3週間後に行う。この追加免疫の時期が6週間目より遅すぎるか、あるいは1週間目より早すぎると追加免疫の効果が少ない。なお、追加免疫を行う際の抗原投与量は、動物の種類、大きさ等により異なるが、一般に、例えばマウスの場合には、0.05～5 ml、好ましくは0.1～0.5 ml、さらに好ましくは0.1～0.2 ml程度とする。不必要の大量投与は免疫効果を低下させるだけでなく、被免疫動物にとっても好ましいものではない。

【0076】

上記追加免疫から1～10日後、好ましくは2～5日後、さらに好ましくは2～3日後に被免疫動物から抗体産生細胞を含む脾臓細胞又はリンパ球を無菌的に取り出す。なお、その際に抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給源として用いれば、以後の操作の効率を高めることができる。ここで用いられる抗体価の測定法としては、RIA法、ELISA法、蛍光抗体法、受身血球凝集反応法など種々の公知技術があげられるが、検出感度、迅速性、正確性、及び操作の自動化の可能性などの観点から、RIA法又はELISA法がより好適である。

本発明における抗体価の測定は、例えばELISA法によれば、以下に記載するような手順により行うことができる。まず、精製又は部分精製した抗原をELISA用96穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係な蛋白質、例えばウシ血清アルブミン(以下「BSA」という)により覆い、該表面を洗浄後、第一抗体として段階希釈した試料(例えばマウス血清)に接触させ、上記抗原に試料中のモノクローナル抗体を結合させる。さらに第二抗体として酵素標識されたマウス抗体に対する抗体を加えてマウス抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することにより、抗体価を算出する。これらの脾臓細胞又はリンパ球からの抗体産生細胞の分離は、公知の方法(例えば、Kohler et al., Nature, 256, 495, 1975; Kohler et al., Eur. J. Immunol., 6, 511, 1977; Milstein et al., Nature, 266, 550, 1977; Walsh, Nature, 266, 495, 1977)に従って行うことができる。例えば、脾臓細胞の場合には、細胞を細切してステンレスメッシュで濾過した後、イーグル最小必須培地(MEM)に浮遊させて抗体産生細胞を分離する一般的な方法を採用することができる。

【0077】

(c) 骨髄腫細胞(以下、「ミエローマ」という)の調製

細胞融合に用いるミエローマ細胞には特段の制限はなく、公知の細胞株から適宜に選択して用いることができる。ただし、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を

10

20

30

40

50

考慮して、その選択手続が確立している H G P R T (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 欠損株を用いるのが好ましい。すなわち、マウス由来の X63-Ag8 (X63)、NS1-Ag4/1 (NS1)、P3X63-Ag8.U1 (P3U1)、X63-Ag8.653 (X63.653)、SP2/0-Ag14 (SP2/0)、MPC11-45.6TG1.7 (45.6TG)、FO、S149/5XX0、BU.1 等、ラット由来の 210.RSY3.Ag.1.2.3 (Y3) 等、ヒト由来の U266AR (SKO-007)、GM1500・GTG-A12 (GM1500)、UC729-6、LICR-LOW-HMy2 (HMy2)、8226AR/NIP4-1 (NP41) 等である。これらの H G P R T 欠損株は例えば、American Type Culture Collection (ATCC) 等から入手することができる。

#### 【 0 0 7 8 】

これらの細胞株は、適当な培地、例えば 8 - アザグアニン培地 [ R P M I - 1 6 4 0 培地にグルタミン、2 - メルカプトエタノール、ゲンタマイシン、及びウシ胎児血清 (以下「FCS」という) を加えた培地に 8 - アザグアニンを加えた培地]、イスコフ改変ダルベッコ培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium ; 以下「IMDM」という)、又はダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium ; 以下「DMEM」という) で継代培養するが、細胞融合の 3 乃至 4 日前に正常培地 [例えば、10% FCS を含む A S F 1 0 4 培地 (味の素 (株) 社製)] で継代培養し、融合当日に  $2 \times 10^7$  以上の細胞数を確保しておく。

(d) 細胞融合 抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合は、公知の方法 (Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987)、Kabat, E.A. and Mayer, M.M., Experimental Immunochimistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) 等) に従い、細胞の生存率を極度に低下させない程度の条件下で適宜実施することができる。そのような方法は、例えば、ポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電気的刺激を利用する物理的方法等を用いることができる。このうち、上記化学的方法の具体例を示せば以下のとおりである。すなわち、高濃度ポリマー溶液としてポリエチレングリコールを用いる場合には、分子量 1500 ~ 6000、好ましくは 2000 ~ 4000 のポリエチレングリコール溶液中で、30 ~ 40、好ましくは 35 ~ 38 の温度で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを 1 ~ 10 分間、好ましくは 5 ~ 8 分間混合する。

#### 【 0 0 7 9 】

##### (e) ハイブリドーマ群の選択

上記細胞融合により得られるハイブリドーマの選択方法は特に制限はないが、通常 H A T (ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン) 選択法 [Kohler et al., Nature, 256, 495 (1975); Milstein et al., Nature 266, 550 (1977)] が用いられる。この方法は、アミノプテリンで生存し得ない H G P R T 欠損株のミエローマ細胞を用いてハイブリドーマを得る場合に有効である。すなわち、未融合細胞及びハイブリドーマを H A T 培地で培養することにより、アミノプテリンに対する耐性を持ち合わせたハイブリドーマのみを選択的に残存させ、かつ増殖させることができる。

#### 【 0 0 8 0 】

##### (f) 単一細胞クローンへの分割 (クローニング)

ハイブリドーマのクローニング法としては、例えばメチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法等の公知の方法を用いることができる [例えば Barbara, B.M. and Stanley, M.S. : Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Company, San Francisco (1980) 参照]。このクローニング法としては、プレートの 1 ウェルに 1 個のハイブリドーマが含まれるように希釈して培養する限界希釈法、軟寒天培地中で培養しコロニーを回収する軟寒天法、マイクロマニピレーターによって 1 個ずつの細胞を取り出し培養する方法、セルソーターによって 1 個の細胞を分離する「ソータクローン」などが挙げられる。これらの方法のうち、特に限界希釈法が好適である。この方法では、マイクロプレートにラット胎児由来繊維芽細胞株、あるいは正常マウス脾臓細胞、胸腺細胞、腹水細胞などのフィーダー (feeder) を接種しておく。一方、あらかじめハイブリドーマを 0

、2～0.5個/0.2mlになるように培地中で希釈し、この希釈したハイブリドーマの浮遊液を各ウェルに0.1mlずつ入れ、一定期間毎（例えば3日毎）に約1/3の培地を新しいものに交換しながら2週間程度培養を続けることによってハイブリドーマのクローンを増殖させることができる。

【0081】

抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によるクローニングを2～4回繰返し、安定して抗体価の認められたものを抗ヒト・オキユロスパニンモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。このようにしてクローニングされたハイブリドーマ株のひとつは、O3B8-2C9-4F3と命名され、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに2004年2月17日付けで、寄託番号FERM BP-08627として寄託されている。

【0082】

(g) ハイブリドーマ培養によるモノクローナル抗体の調製

このようにして選択されたハイブリドーマは、これを培養することにより、モノクローナル抗体を効率よく得ることができるが、培養に先立ち、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすることが望ましい。このスクリーニングにはそれ自体既知の方法が採用できる。

【0083】

本発明における抗体価の測定は、例えばELISA法によれば、以下に記載するような手順により行うことができる。まず、精製又は部分精製したヒト・オキユロスパニン、もしくはヒト・オキユロスパニンを発現させた細胞をELISA用96穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係な蛋白質、例えばウシ血清アルブミン（以下「BSA」という）により覆い、該表面を洗浄後、第一抗体として段階希釈した試料（例えばマウス血清）に接触させ、上記抗原に試料中の抗ヒト・オキユロスパニン抗体を結合させる。さらに第二抗体として酵素標識されたマウス抗体に対する抗体を加えてマウス抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することにより、抗体価を算出する。なお、このようなスクリーニングは、上記のようにハイブリドーマをクローニングした後で行ってもよいし、その前に行ってもよい。

【0084】

以上の通りの方法によって得たハイブリドーマは、液体窒素中又は80℃以下の冷凍庫中に凍結状態で保存することができる。

【0085】

クローニングを完了したハイブリドーマは、培地をHT培地から正常培地に換えて培養される。大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、あるいはスピナー培養で行われる。この大量培養における上清を、ゲル濾過等、当業者に周知の方法を用いて精製することにより、本発明の蛋白質に特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることができる。また、同系統のマウス（例えば、上記のBALB/c）、あるいはNu/Nuマウスの腹腔内にハイブリドーマを注射し、該ハイブリドーマを増殖させることにより、本発明のモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。腹腔内に投与する場合には、事前（3～7日前）に2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン（2,6,10,14-tetramethylpentadecane）（プリスタン）等の鉱物油を投与すると、より多量の腹水が得られる。たとえば、ハイブリドーマと同系統のマウスの腹腔内に予め免疫抑制剤を注射し、T細胞を不活性化した後、20日後に $10^6 \sim 10^7$ 個のハイブリドーマ・クローン細胞を血清を含まない培地中に浮遊（0.5ml）させて腹腔内に投与し、通常腹部が膨満し、腹水にたまるところでマウスより腹水を採取する。この方法により、培養液中に比べて約100倍以上の濃度のモノクローナル抗体が得られる。

【0086】

上記方法により得たモノクローナル抗体は、例えばWeir, D.M.: Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978

10

20

30

40

50

）に記載されている方法で精製することができる。すなわち、硫酸塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等である。これらの方法のうち、硫酸塩析法を3～4回、好ましくは3～6回繰り返すことによって、モノクローナル抗体を精製することが可能である。しかしこの方法では精製モノクローナル抗体の収率が極めて低くなる。そのため、硫酸分画法を1～2回行った粗精製モノクローナル抗体について、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、アフィニティークロマトグラフィー法等から選ばれた少なくとも1種類、好ましくは2種類の方法を行うことによって、高純度に精製されたモノクローナル抗体を高収率で得ることができる。硫酸塩析法と他法との組合せ及び順序としては、a)硫酸塩析法 - イオン交換クロマトグラフィー法 - ゲル濾過法、b)硫酸塩析法 - イオン交換クロマトグラフィー法 - アフィニティークロマトグラフィー法、c)硫酸塩析法 - ゲル濾過法 - アフィニティークロマトグラフィー法等を例示することができるが、高純度でかつ高収率にモノクローナル抗体を得るためには、上記c)の組合せが特好ましい。

10

【0087】

精製の簡便な方法としては、市販のモノクローナル抗体精製キット（例えば、M A b T r a p G IIキット；ファルマシア社製）等を利用することもできる。

かくして得られるモノクローナル抗体は、ヒト・オキュロspanに対して高い抗原特異性を有する。

【0088】

20

（h）モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの決定は以下のように行うことができる。まず、同定法としてはオクテルロニー（Ouchterlony）法、E L I S A法、又はR I A法が挙げられる。オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。一方、E L I S A法又はR I A法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに第二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。また、さらに簡便な方法として、市販の同定用のキット（例えば、マウスタイパーキット；バイオラッド社製）等を利用することもできる。

30

【0089】

さらに、蛋白質の定量は、フォーリンロウリー法、及び280nmにおける吸光度 $[1.4(OD_{280}) = \text{イムノグロブリン} 1 \text{ mg/ml}]$ より算出する方法により行うことができる。（3）ヒト化抗ヒト・オキュロspan抗体の作製

免疫グロブリンG（以下、単に「I g G」という。）は、分子量約23000の軽ポリペプチド鎖（以下「軽鎖」という。）、分子量約50000の重ポリペプチド鎖（以下「重鎖」という。）各2本ずつから構成される。重鎖、軽鎖とも約110残基からなる、アミノ酸配列が保存されている領域の繰り返し構造を持ち、これらはI g Gの3次元構造の基本単位（以下、「ドメイン」という。）を構成する。重鎖及び軽鎖は、それぞれ連続した4個、及び2個のドメインから構成されている。重鎖、軽鎖いずれにおいても、アミノ末端のドメインは他のドメインに比べ各抗体分子間でのアミノ酸配列の変異が大きく、このドメインは可変ドメイン（variable domain：以下、「Vドメイン」という。）と呼ばれる。I g Gのアミノ末端においては、重鎖、軽鎖のVドメインが相補的に会合し可変領域を形成している。これに対し、残余のドメインは、全体として定常領域を形成する。定常領域は、各動物種に特徴的な配列を有し、例えば、マウスI g Gの定常領域はヒトI g Gの定常領域とは異なっているため、マウスI g Gはヒトの免疫系によって異物として認識され、その結果、ヒト抗マウス抗体（Human Anti Mouse Antibody：以下「H A M A」という。）応答が起こる（シュロッフら、Cancer Res., 45, 879-85 (1985)参照）。従って、マウス抗体はヒトに繰り返し投与することはできない。このような抗体をヒトに投与するためには、抗体の特異性を保持したままH A M A応答を起こさないように抗体分子を修

40

50

飾する必要がある。

【0090】

X線結晶構造解析の結果によれば、一般に、このようなドメインは3本から5本の鎖からなる逆平行シートが二層重なり合った長円筒状の構造をとる。可変領域では、重鎖、軽鎖のVドメインそれぞれにつき各3個のループが集合し、抗原結合部位を形成する。この各ループは相補性決定領域 (complementarity determining region: 以下、「CDR」という。) と呼ばれ、アミノ酸配列の変異が最も著しい。可変領域のCDR以外の部分は、一般に、CDRの構造を保持する役割を有し、「フレームワーク」と呼ばれる。カバトらは、重鎖、軽鎖の可変領域の一次配列を多数収集し、配列の保存性にに基づき、それぞれの一次配列をCDR及びフレームワークに分類した表を作成した (カバトラ、SEQUENCE S OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No.91-3242, E.A. Kabat et al. 参照)。また、各フレームワークは、アミノ酸配列が共通の特徴を有する複数のサブグループに分類された。さらに、ヒトとマウスの間で対応するフレームワークが存在することも見いだされた。

10

【0091】

このようなIgGの構造的特徴に関する研究から以下のヒト化抗体の作製法が考案された。

【0092】

研究初期の段階では、マウス由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体が提案された (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6851-6855, (1984) 参照)。しかし、そのようなキメラ抗体は、依然として、多くの非ヒトアミノ酸残基を含むので、特に長期間投与した場合にはHAM A 応答を誘導しうる (Begentら Br. J. Cancer, 62, 487, (1990) 参照)。

20

【0093】

ヒトに対しHAM A 応答を発現する可能性のある、非ヒトは乳動物由来のアミノ酸残基を更に少なくする方法として、CDR部分のみをヒト由来の抗体に組み込む方法が提案された (Nature, 321, 522-525, (1986) 参照) が、一般に、抗原に対する免疫グロブリン活性を保持するにはCDRのみの移植では不十分であった。

【0094】

一方、チョッチアらは、1987年、X線結晶構造解析データを用い、  
(i) CDRのアミノ酸配列中には、抗原に直接結合する部位とCDR自体の構造を維持する部位とが存在し、CDRの取り得る三次元構造は、複数の典型的なパターン (カノニカル構造) に分類されること、  
(ii) カノニカル構造のクラスは、CDRのみならずフレームワーク部分の特定の位置のアミノ酸の種類によって決定されること、を見いだした (J. Mol. Biol., 196, 901-917, (1987) 参照)。

30

【0095】

この知見に基づき、CDR移植法を用いる場合、CDRの配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植する必要性が示唆された (特表平4-502408号参照)。

40

【0096】

一般に、移植すべきCDRを有する非ヒト哺乳動物由来の抗体は「ドナー」、CDRが移植される側のヒト抗体は「アクセプター」と定義されるが、本発明もこの定義に従うことにする。

【0097】

CDR移植法を実施する際に考慮すべき点は、可能な限りCDRの構造を保存し、免疫グロブリン分子の活性を保持することにある。この目的を達成するため：

- (i) アクセプターは、いずれのサブグループに属するものを選択すべきか；
- (ii) ドナーのフレームワークからいずれのアミノ酸残基を選択すべきかの2点に留意する必要がある。

50

## 【 0 0 9 8 】

クィーンらは、ドナーのフレームワークのアミノ酸残基が、以下の基準の少なくともひとつに該当する場合、CDR配列とともにアクセプターに移植するデザインの方法を提唱した（特表平4-502408号参照）：

- (a) アクセプターのフレームワーク領域中のアミノ酸がその位置において稀であり、ドナーの対応するアミノ酸がアクセプターの前記位置において普通である。
- (b) 該アミノ酸がCDRのひとつのすぐ近くである。
- (c) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3以内に側鎖原子を有し、そして抗原と又はヒト化抗体のCDRと相互作用することができると予想される。

## 【 0 0 9 9 】

本発明の抗ヒト・オキユロスパニンモノクローナル抗体の重鎖又は軽鎖をコードするDNAは、上記抗ヒト・オキユロスパニンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを調製し、該mRNAを逆転写酵素でcDNAに変換してから、該抗体の重鎖又は軽鎖をコードするDNAをそれぞれ単離することにより得られる。

## 【 0 1 0 0 】

mRNAの抽出にあたっては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法なども採用しうるが、グアニジン・チオシアネート・塩化セシウム法が好適である。細胞からのmRNAの調製は、まず全RNAを調製し、該全RNAからオリゴ(dT)セルロースやオリゴ(dT)ラテックスビーズ等のポリ(A)<sup>+</sup>RNA精製用担体を用いて精製する方法、又は細胞ライセートから該担体を用いて直接精製する方法により実施できる。全RNAの調製方法としては、アルカリシヨ糖密度勾配遠心分離法 [Dougherty, W. G. and Hiebert, E. (1980) *Virology* 101, 466-474参照]、グアニジンチオシアネート・フェノール法、グアニジンチオシアネート・トリフルオロセシウム法、フェノール・SDS法等も採用し得るが、グアニジンチオシアネート及び塩化セシウムを用いる方法 [Chirgwin, J. M., et al. (1979) *Biochemistry* 18, 5294- 5299参照] が好適である。

## 【 0 1 0 1 】

上記のごとくして得られたポリ(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型として、逆転写酵素反応により一本鎖cDNAを合成した後、この一本鎖cDNAから二本鎖cDNAを合成することができる。この方法としてはS1ヌクレアーゼ法 [Efstratiadis, A., et al. (1976) *Cell* 7, 279-288 参照]、グブラー-ホフマン法 [Gubler, U. and Hoffman, B. J. (1983) *Gene* 25, 263-269 参照]、オカヤマ-バーグ法 [Okayama, H. and Berg, P. (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2, 161-170 参照]等を採用し得るが、本発明においては、一本鎖cDNAを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応（以下「PCR」という） [Saiki, R. K., et al. (1988) *Science* 239, 487-49 参照]を行なう、いわゆるRT-PCR法が好適である。

## 【 0 1 0 2 】

このようにして得られた二本鎖cDNAをクローニングベクターに組み込み、得られた組換えベクターを大腸菌等の微生物に導入して形質転換させ、テトラサイクリン耐性あるいはアンピシリン耐性等を指標として形質転換体を選択することができる。大腸菌の形質転換は、ハナハン法 [Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557-580 参照]、すなわち塩化カルシウムや塩化マグネシウム又は塩化ルビジウムを共存させて調製したコンピテント細胞に、該組換えDNAベクターを加える方法により実施することができる。なお、ベクターとしてプラスミドを用いる場合は、上記の薬剤耐性遺伝子を有することが必要である。また、プラスミド以外のクローニングベクター、例えばラムダ系のファージ等を用いることも可能である。

## 【 0 1 0 3 】

上記により得られた形質転換株から、目的の抗ヒト・オキユロスパニンモノクローナル抗体の各サブユニットをコードするcDNAを有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。なお、上記RT-PCR法により目的のcDNAを特異的に増幅した場合は、これらの操作を省略することが可能である。

## 【 0 1 0 4 】

## ( a ) ポリメラーゼ連鎖反応を用いる方法

目的蛋白質のアミノ酸配列の全部又は一部が解明されている場合、該アミノ酸配列の一部に対応するセンスストランドとアンチセンスストランドのオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応 [ Saiki, R. K., et al. (1988) Science 239, 487-49 参照 ] を行ない、目的の抗ヒト・オキユロスパニン抗体重鎖あるいは軽鎖サブユニットをコードする DNA 断片を増幅する。ここで用いる鋳型 DNA としては、例えば抗ヒト・オキユロスパニンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの mRNA より逆転写酵素反応にて合成した cDNA を用いることができる。

## 【 0 1 0 5 】

このようにして調製した DNA 断片は、市販のキット等を利用して直接プラスミドベクターに組み込むこともできるし、該断片を  $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$  あるいはビオチン等で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーション又はプラークハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択することもできる。

## 【 0 1 0 6 】

例えば、本発明の抗ヒト・オキユロスパニンモノクローナル抗体の各サブユニットの部分アミノ酸配列を調べる方法としては、電気泳動やカラムクロマトグラフィーなどの周知の方法を用いて各サブユニットを単離してから、自動プロテインシークエンサー ( 例えば、島津製作所 ( 株 ) 製 PPSQ-10 ) 等を利用してそれぞれのサブユニットの N 末端アミノ酸配列を解析する方法が好適である。

## 【 0 1 0 7 】

上記のごとくして得られた目的の形質転換株より、抗ヒト・オキユロスパニンモノクローナル抗体蛋白質の各サブユニットをコードする cDNA を採取する方法は、公知の方法 [ Maniatis, T., et al. (1982) in "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY. 参照 ] に従い実施できる。例えば細胞よりベクター DNA に相当する画分を分離し、該プラスミド DNA より目的とするサブユニットをコードする DNA 領域を切り出すことにより行うことが可能である。

## 【 0 1 0 8 】

## ( b ) 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

目的蛋白質のアミノ酸配列の全部又は一部が解明されている場合 ( 該配列は、複数個連続した特異的配列であれば、目的蛋白質のどの領域のものでもよい )、該アミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し ( この場合、コドン使用頻度を参考に推測されるヌクレオチド配列、又は考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列のいずれも採用でき、また後者の場合イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる )、これをプローブ (  $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$  あるいはビオチン等で標識する ) として、形質転換株の DNA を変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られたポジティブ株を選別する。

## 【 0 1 0 9 】

このようにして得られる DNA の配列の決定は、例えばマキサム - ギルバートの化学修飾法 [ Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980) in "Methods in Enzymology" 65, 499-576 参照 ] やジデオキシヌクレオチド鎖終結法 [ Messing, J. and Vieira, J. (1982) Gene 19, 269-276 参照 ] 等により実施することができる。

## 【 0 1 1 0 】

また近年、蛍光色素を用いた自動塩基配列決定システムが普及している ( 例えばパーキンエルマー・ジャパン社製シーケンサーロボット "CATALYST 800" 及びモデル 373A DNA シーケンサー等 )。

## 【 0 1 1 1 】

こうしたシステムを利用することで、DNA ヌクレオチド配列決定操作を能率よく、かつ安全に行うことも可能である。このようにして決定された本発明の DNA の各ヌクレオチド配列、及び重鎖及び軽鎖の各 N 末端アミノ酸配列データから、本発明のモノクローナ

10

20

30

40

50

ル抗体の重鎖及び軽鎖の全アミノ酸配列を決定することができる。

【0112】

イムノグロブリンの重鎖及び軽鎖は、いずれも可変領域及び定常領域からなり、可変領域はさらに相補性決定領域（以下「CDR」と記す；重鎖・軽鎖ともに各3か所）及びそれらに隣接するフレームワーク領域（重鎖・軽鎖ともに各4か所）からなる。

【0113】

このうち、定常領域のアミノ酸配列は、抗原の種類に関係なく、イムノグロブリンサブクラスが同一である抗体間では共通である。一方、可変領域、特にCDRのアミノ酸配列は各抗体に固有のものであるが、数多くの抗体のアミノ酸配列データを比較した研究によれば、CDRの位置やフレームワーク配列の長さは、同じサブグループに属する抗体サブユニットの間ではほぼ類似していることが知られている [Kabat, E. A., et al. (1991) in "Sequence of Proteins of Immunological Interest Vol. II": U.S. Department of Health and Human Services参照]。従って、例えば抗ヒト・オキキュロスパニンモノクローナル抗体の抗体の重鎖及び軽鎖の各アミノ酸配列とそれら公知のアミノ酸配列データとを比較することにより、各アミノ酸配列におけるCDRやフレームワーク領域及び定常領域の位置を決定することができる。なお、FRH<sub>1</sub>、すなわち重鎖の最もN末端側のフレームワーク領域の鎖長については、通常（30アミノ酸）より短いことがあり、例えば、該フレームワーク領域が最小18アミノ酸である例などが知られている [前出 Kabat et al. 参照]。このことから本発明の抗体においては、抗ヒト・オキキュロスパニン抗体としての機能を損なわない限りにおいて、重鎖のN末端のフレームワーク領域の鎖長を18アミノ酸以上30アミノ酸以下とするが、好適には30アミノ酸である。

【0114】

なお、上記のようにして決定された軽鎖又は重鎖のそれぞれのCDRと同じアミノ酸配列、もしくはその中の連続した部分アミノ酸配列を有するペプチドを、人為的な修飾操作を施して該CDRが抗ヒト・オキキュロスパニン抗体分子中で形成する立体構造に近付けることにより、単独でヒト・オキキュロスパニンに対する結合活性を付与せしめることが可能である [例えば、米国特許第5331573号公報参照]。したがって、そのように修飾された、CDRと同じアミノ酸配列、もしくはその中の連続した部分アミノ酸配列を有するペプチドも、本発明の分子に包含される。

【0115】

アミノ酸配列中の任意の一つもしくは二つ以上のアミノ酸を欠失させた改変体を作製するにあたっては、カセット変異法 [岸本利光、“新生化学実験講座2・核酸III 組換えDNA技術” 242-251参照]などに従うことができる。

【0116】

このような各種のDNAは、例えばフォスファイト・トリエステル法 [Hunkapiller, M., et al. (1984) Nature 310, 105-111参照]等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンは、それ自体が公知であり、その選択も任意でよく、例えば使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定することも可能である。これらヌクレオチド配列コドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的変異導入法（サイトスペシフィック・ミュータジェネシス） [Mark, D.F., et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5662-5666参照]等に従うことができる。

【0117】

また、あるDNAが本発明の抗ヒト・オキキュロスパニンモノクローナル抗体の重鎖又は軽鎖をコードするDNAとハイブリダイズするか否かは、例えば、該DNAを、ランダムプライマー法 [Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) Anal. biochem. 132, 6-13参照] やニックトランスレーション法 [Maniatis, T., et al. (1982) in "Molecular Cloning A laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY. 参照]等に従い [ - <sup>32</sup>P ] dCTP等で標識したプローブDNAを用いて、以下に記載するような実験を行うことにより調べることができる。

## 【0118】

まず調べようとするDNAを、例えばニトロセルロース膜やナイロン膜等に吸着させ、必要に応じてアルカリ変性等の処理を行ってから、加熱あるいは紫外線等により固相化させる。この膜を、 $6 \times \text{SSC}$  ( $1 \times \text{SSC}$ は $0.15 \text{ M}$  塩化ナトリウム、 $0.015 \text{ M}$  クエン酸三ナトリウム溶液)と $5\%$  デンハート溶液、 $0.1\%$  ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含むプレハイブリダイゼーション溶液に浸し、 $55^\circ\text{C}$ で4時間以上保温してから、先に調製したプローブを同様のプレハイブリダイゼーション溶液に最終比活性 $1 \times 10^6 \text{ cpm/ml}$ となるように加え、 $60^\circ\text{C}$ で一晩保温する。その後、膜を室温下で $6 \times \text{SSC}$ で5分間の洗浄する操作を数回繰り返し、さらに $2 \times \text{SSC}$ で20分間洗浄してから、オートラジオグラフィーを行う。

10

## 【0119】

上記のような方法を利用して、任意のcDNAライブラリー又はゲノムライブラリーから、本発明のヒト化抗ヒト・オキユロスパニン抗体の重鎖又は軽鎖をコードするDNAとハイブリダイズするDNAを単離することができる[Maniatis, T., et al. (1982) in "Molecular Cloning A laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY. 参照]。

## 【0120】

上記のごとくして得られる各DNAを、それぞれ発現ベクターに組み込むことにより、原核生物又は真核生物の宿主細胞に導入し、それらの宿主細胞で各遺伝子を発現させることが可能である。発現方法は上記「5. 抗ヒト・オキユロスパニン抗体の製造」の項の「(1) 抗原の調製」の項に記載した方法と同一の方法によって行うことができる。

20

## 【0121】

形質転換体の細胞内又は細胞外に生産される、抗ヒト・オキユロスパニン抗体蛋白質を含む画分は、該蛋白質の物理的性質や化学的性質等を利用した各種公知の蛋白質分離操作法により、分離・精製することができる。かかる方法としては、具体的には例えば通常の蛋白質沈澱剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の各種クロマトグラフィー、透析法、及びこれらの組合せ等を採用できる。

## 【0122】

抗ヒト・オキユロスパニンマウスモノクローナル抗体をヒト化するためには、決定されたCDR配列全体及びFR配列の一部のアミノ酸残基をヒト抗体へ移植するように、可変領域のアミノ酸配列を設計する必要がある。この設計は、以下の方法に従う。

30

## 【0123】

従来、ヒト化のデザインを行う場合、アクセプターのサブグループの選択指針としては、a)天然のアミノ酸配列を有する公知のヒト抗体の重鎖、軽鎖の天然の組合せをそっくりそのまま用いる、

b)重鎖、軽鎖が属するサブグループとしての組合せは保存するが、重鎖、軽鎖としては、それぞれ異なるヒト抗体に由来し、ドナーの重鎖、軽鎖のアミノ酸配列と同一性が高いアミノ酸配列、又は、コンセンサス配列を用いる、

40

のいずれかが選択されている。本発明においても、上記の指針に従うことができるが、これらと異なる方法として、

c)サブグループの組合せを考慮することなく、ドナーのFRと最も同一性の高い重鎖、軽鎖のFRをヒト抗体の一次配列のライブラリーの中から選択する、

という方法を採用することも可能である。これらの選択法により、ドナー及びアクセプター間での、FR部分のアミノ酸の同一性を少なくとも $70\%$ 以上とすることが可能となる。この方法を採用することにより、ドナーより移植するアミノ酸残基の数をより少なくすることが可能となり、HAM A応答誘導を減少させることができる。

## 【0124】

また、抗体分子の一次配列より三次構造を予測する操作(以下、この操作を「分子モデ

50

リング」という)はその予測精度に限界があり、そのドナーが属するサブグループにおいて稀にしか出現しないアミノ酸残基の役割を十分に特定することができない。クィーンらの方法に従い、かかる位置においてドナー、アクセプターのいずれのアミノ酸残基を選択すべきかを判断することは一般に困難である。c)の選択法によれば、このような判断をする機会を著しく減少することができる。

【0125】

本発明者らは、ドナーのCDRの構造及び機能を維持するために重要なドナーのFR由来のアミノ酸を同定するための新規な方法を提供することによって、このヒト化の方法をさらに改良している。

【0126】

軽鎖、重鎖それぞれのヒトアクセプター分子が選択された後、ドナーのFRより移植するアミノ酸残基を選択する方法は、以下に記載する通りである。

【0127】

ドナーとアクセプターのアミノ酸配列を並べ、両者のFRの対応する位置でアミノ酸残基が異なっていた場合、どちらの残基を選択すべきかを決定する必要があるが、この選択においては、ドナー由来のCDRの三次元構造を損なわないよう選択を行う必要がある。

【0128】

クィーンらは前述の特表平4-502408号において、FR上のアミノ酸残基が、以下の要件の少なくともひとつに該当する場合、CDR配列とともにアクセプターに移植する方法を提唱した：

- 1) アクセプターのヒトFR領域中のアミノ酸がその位置において稀であり、ドナーの対応するアミノ酸がアクセプターの前記位置において普通である；
- 2) 該アミノ酸がCDRのひとつのすぐ近くである；
- 3) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3以内に側鎖原子を有し、そして抗原と又はヒト化抗体のCDRと相互作用することができると予想される。

【0129】

ここで2)で示された残基はしばしば3)の性質を示すことより、本発明ではこの2)の要件を削除し、別に新たに2種の要件を設ける。すなわち、本発明では、CDRと共に移植すべきドナーのFR上のアミノ酸残基については：

- a) アクセプターのFR中のアミノ酸がその位置において稀でありドナーの対応するアミノ酸が当該位置において普通であるか；
  - b) 該アミノ酸が三次元構造モデルにおいて、CDRの構成アミノ酸原子と抗原又は移植すべきCDRループとの相互作用が予想されるか；
  - c) 当該位置がカノニカルクラス決定残基であるか；
  - d) 当該位置が重鎖と軽鎖の接触面を構成するか、
- である場合に、ドナーのFRから当該アミノ酸残基を移植することにする。

【0130】

a)の要件では、前述したカバトの表に従い、同一サブクラスの抗体について当該位置で90%以上の頻度で見いだされるアミノ酸を「普通」、10%未満の頻度で見いだされるアミノ酸を「稀」と定義する。

【0131】

c)の要件では、「当該位置がカノニカルクラス決定残基であるか」否かについては、前述したチョッチアの表に従い、一義的に決定することができる。

【0132】

b)、d)の要件については、予め抗体可変領域の分子モデリングが必要となる。分子モデリング用ソフトウェアとしては、市販のものならいずれのものも採用し得るが、好適には、AbM(オックスフォード・モレキュラー・リミティッド社製)を使用することができる。

【0133】

10

20

30

40

50

分子モデリングの予測精度には一定の限界があるので、本発明においては、種々の抗体の可変領域のX線結晶解析の実験結果を参照することにより、分子モデリングから得られる構造予測の確からしさを2段階に区別する。

【0134】

本発明においては、A b M等の分子モデリング用ソフトウェアによって構築されたところの可変領域の3次元構造において、2原子間の距離が、各々のファンデルワールス半径の和に0.5を加えた値より短いとき、当該2原子間はファンデルワールス接触していると推定した。主鎖及び側鎖のアミド窒素、カルボニル酸素など極性の原子間距離が平均の水素結合距離である2.9に0.5を加えた距離より短い場合は、その間に水素結合が存在すると推定した。さらに、相反する電価を持つ原子間が、2.85に0.5を加えた距離より短い場合は、その間にイオン対が形成されているものと推定した。

10

【0135】

一方、種々の抗体の可変領域のX線結晶構造解析の実験結果から、サブグループと無関係に、高頻度にCDRとの接触が見いだされるFR上の位置として、軽鎖では、1、2、3、4、5、23、35、36、46、48、49、58、69、71、88番の位置、重鎖では、2、4、27、28、29、30、36、38、46、47、48、49、66、67、69、71、73、78、92、93、94、103番の位置が特定される(数字はいずれも前出力バトらの文献において定義されるアミノ酸番号を表わす。以下において同じ)。分子モデリングと同じ基準を適用した場合、これらの位置のアミノ酸残基は、公知の抗体可変領域の3分の2においてCDRのアミノ酸残基との接触が認められる。これらの知見に基づき、b)の「該アミノ酸が三次元構造モデルにおいて、CDRの構成アミノ酸原子が抗原又は移植すべきCDRループとの相互作用が予想される」とは、以下の要件を意味する。

20

【0136】

分子モデリングにおいて、FRとCDRとの接触の可能性が予見されたFRの位置が、X線結晶解析により実験的にFRとCDRとの接触が高頻度に検出される位置のいずれかに一致する場合は、ドナーのアミノ酸残基の移植を優先する。それ以外の場合は、この要件b)は考慮しない。

【0137】

d)の「当該位置が重鎖と軽鎖の接触面を構成する」とは、以下の要件を意味する。種々の抗体の可変領域のX線結晶解析の実験結果から、軽鎖においては、36、38、43、44、46、49、87、98番目のアミノ酸残基、重鎖においては、37、39、45、47、91、103、104番目のアミノ酸残基が、高頻度に重鎖-軽鎖間接触をすることが認められている。分子モデリングにおいて、重鎖-軽鎖間接触の可能性が予見され、その位置が上述の位置のいずれかに一致する場合は、ドナーのアミノ酸残基の移植を優先する。それ以外の場合は、この要件d)は考慮しない。

30

【0138】

本発明のヒト化抗ヒト・オキユロスパニン抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードするDNAは、以下に記載する方法で製造することができる。

【0139】

例えば、60乃至70ヌクレオチドの、該DNAの部分ヌクレオチド配列からなる複数のポリヌクレオチド断片を、センス側及びアンチセンス側において互い違いになるように化学合成し、その後各ポリヌクレオチド断片をアニーリングし、DNAリガーゼにより結合し、所望のヒト化抗ヒト・オキユロスパニン抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードするDNAを有するDNAを得ることができる。

40

【0140】

別の方法として、アクセプターの可変領域の全アミノ酸配列をコードするDNAをヒトリンパ球より分離し、CDRをコードする領域に当業者に周知の方法でヌクレオチド置換を行うことにより、制限酵素切断配列を導入する。対応する制限酵素で該領域を切断した後、ドナーのCDRをコードするヌクレオチド配列を合成し、DNAリガーゼにより結合

50

して、所望のヒト化抗ヒト・オキユロスパニン抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードするDNAを得ることができる。

【0141】

さらに、本発明では、好適には以下に述べるオーバーラップ・エクステンション・PCR法（ホルトンら、Gene, 77, 61-68, (1989) 参照）に従い、所望のヒト化抗ヒト・オキユロスパニン抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードするDNAを得ることができる。

【0142】

すなわち、接続を所望する2種のアミノ酸配列をそれぞれコードする2種のDNAを、便宜的に(A)及び(B)とする。(A)の5'側にアニールする20乃至40ヌクレオチドのセンスプライマー（以下、このプライマーを(C)とする。）及び(B)の3'側にアニールする20乃至40ヌクレオチドのアンチセンスプライマー（以下、このプライマーを(D)とする）を化学合成する。さらに、(A)の3'側の20乃至30ヌクレオチドと(B)の5'側20乃至30ヌクレオチドを連結した、キメラ型のセンスプライマー（以下、このプライマーを(E)とする）及びこれに相補的なアンチセンスプライマー（以下、このプライマーを(F)とする）を合成する。(A)を含む適当なベクターDNA

を基質にして、センスプライマー(C)及びキメラ型アンチセンスプライマー(F)を用いたPCRを行うことにより、(A)の3'末端に(B)の5'末端側20乃至30ヌクレオチドが付加したDNAを得ることができる（この新たに得られたDNAを(G)とする）。同様に、(B)を含む適当なベクターDNAを基質にして、アンチセンスプライマー(D)及びキメラ型センスプライマー(E)を用いたPCRを行うことにより、(B)の5'末端に(A)の3'末端側20乃至30ヌクレオチドが付加したDNAを得ることができる（この新たに得られたDNAを(H)とする）。このようにして得られた(G)と(H)は、(G)の3'側40乃至60ヌクレオチドと(H)の5'側40乃至60ヌクレオチドにおいて相補的なヌクレオチド配列を保持している。増幅された(G)及び(H)を混合してPCRを行った場合、1回目の変性反応で(G)と(H)は1本鎖になり、その後のアニリング反応で殆どのDNAは元に戻るが、一部のDNAについては相補的なヌクレオチド配列領域でアニリングするヘテロDNA 2本鎖を形成する。その後の伸長反応で、突出した1本鎖部分が修復され、(A)と(B)が連結したキメラ型のDNA（以下、このDNAを(I)とする。）を得ることができる。さらにこの(I)を基質として、センスプライマー(C)とアンチセンスプライマー(D)を用いPCRを行うことにより、(I)を増幅することができる。本発明では、抗ヒトヒト・オキユロスパニンマウスモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖のCDR領域をコードするDNA及びヒト免疫グロブリンIgGのFR領域をコードするDNA、さらには、ヒト免疫グロブリンIgGの分泌シグナルをコードするDNAを、それぞれケース・バイ・ケースにより(A)及び(B)として上記の連結反応を行うことができる。

【0143】

なお、所望アミノ酸に対するコドンは、それ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる。これらヌクレオチド配列コドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス(site specific mutagenesis) (Mark, D. F., et al.(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5662-5666参照)等に従うことができる。したがって、各プライマーを化学合成する際に、予め点突然変異を導入するように各プライマーを設計することにより、所望の抗ヒト・オキユロスパニン抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードするDNAを得ることができる。

【0144】

このようにして得られた本発明の各DNAをそれぞれ発現ベクターに組み込むことにより、原核生物又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらベクターに適当なプロモーター及び形質発現に関わる配列を導入することにより、各々の宿

10

20

30

40

50

主細胞において各遺伝子を発現させることが可能である。

【0145】

上記方法により、容易に高収率、高純度で組換え抗ヒト・オキユロスパニン抗体を製造できる。

【0146】

(4) 抗ヒト・オキユロスパニン完全ヒト抗体の作製

完全ヒト抗体とは、ヒト染色体由来の抗体の遺伝子配列のみを有するヒト抗体を意味する。抗ヒト・オキユロスパニン完全ヒト抗体は、ヒト抗体のH鎖とL鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法 (Tomizuka, K. et al., *Nature Genetics*, 16, p.133-143, 1997.; Kuroiwa, Y. et al., *Nuc. Acids Res.*, 26, p.3447-3448, 1998.; Yoshida, H. et al., *Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10*, p.69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999.; Tomizuka, K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 722-727, 2000.等を参照。) や、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法 (Wormstone, I. M. et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43(7), p.2301-8, 2002; Carmen, S. et al., *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 1 (2), p.189-203, 2002; Siriwardena, D. et al., *Ophthalmology*, 109(3), p.427-431, 2002等参照。) によって取得することができる。

【0147】

このようにして作製される組換え抗ヒト・オキユロスパニン抗体がヒト・オキユロスパニンと特異的に結合することを確認する方法としては、例えば、マウス免疫時に抗体価の評価を行う場合と同様のELISA法が好適である。

【0148】

6. 抗ヒト・オキユロスパニン抗体を含有する医薬

上述の「5. 抗ヒト・オキユロパニン抗体の製造」の項に記載された方法で得られる抗ヒト・オキユロスパニン抗体の中から、ヒト・オキユロスパニンの生物活性を中和する抗体又はヒト・オキユロスパニンを発現する癌細胞を特異的に傷害する抗体を得ることができる。これらの抗体は、生体内でのヒト・オキユロスパニンの生物活性、即ち、細胞の癌化を阻害することから、医薬として、特に癌に対する治療剤として用いることができる。 *in vitro*での抗ヒト・オキユロスパニン抗体によるヒト・オキユロスパニンの生物活性の中和活性は例えば、ヒト・オキユロスパニンを過剰発現している細胞における細胞の癌化の抑制活性で測定することができる。例えば、ヒト・オキユロスパニンを過剰発現しているマウス繊維芽細胞株NIH3T3を培養し、培養系に種々の濃度で抗ヒト・オキユロスパニン抗体を添加し、フォーカス形成、コロニー形成及びスフェロイド増殖に対する抑制活性を測定することができる。 *in vitro*での抗ヒト・オキユロスパニン抗体による癌細胞の傷害活性は例えば、ヒト・オキユロスパニンを過剰発現している細胞に対して抗ヒト・オキユロスパニン抗体の示す抗体依存性細胞障害活性、補体依存性細胞障害活性又は補体依存性細胞性細胞障害活性で測定することができる。例えば、ヒト・オキユロスパニンを過剰発現している293T細胞を培養し、培養系に種々の濃度で抗ヒト・オキユロスパニン抗体を添加し、さらにマウス脾臓細胞を添加して適当時間培養後の、ヒト・オキユロスパニン過剰発現細胞に対する細胞死誘導率を測定することができる。 *in vivo*での実験動物を利用した抗ヒト・オキユロスパニン抗体の癌に対する治療効果は、例えば、ヒト・オキユロスパニンを過剰に発現しているトランスジェニック動物に同ヒト・オキユロスパニン抗体を投与し、癌細胞の変化を測定することができる。このようにして得られたヒト・オキユロスパニンの生物活性を中和する抗体又はヒト・オキユロスパニンを発現する癌細胞を特異的に傷害する抗体は、医薬として特に癌の治療を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断のための抗体として有用である。癌の種類としては、皮膚癌や皮膚癌の一種であるメラノーマを好適に挙げることができるがこれらに限定されない。

## 【0149】

本発明は、治療に有効な量の抗ヒト・オキユロスパニン抗体と薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤及び/又は補助剤を含む医薬組成物も提供する。

## 【0150】

本発明の医薬組成物において許容される製剤に用いる物質としては好ましくは投与量や投与濃度において、医薬組成物を投与される者に対して非毒性のものが好ましい。

## 【0151】

本発明の医薬組成物は、pH、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、色、無菌性、安定性、溶解率、徐放率、吸収率、浸透率を変えたり、維持したり、保持したりするための製剤用の物質を含むことができる。製剤用の物質として以下のものを挙げることができるが、これらに制限されない：グリシン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン等のアミノ酸類、抗菌剤、アスコルビン酸、硫酸ナトリウム又は亜硫酸水素ナトリウム等の抗酸化剤、リン酸、クエン酸、ホウ酸バッファー、炭酸水素、トリス-塩酸(Tris-HCl)溶液等の緩衝剤、マンニトールやグリシン等の充填剤、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)等のキレート剤、カフェイン、ポリビニルピロリジン、 $\beta$ -シクロデキストリンやヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン等の錯化剤、グルコース、マンノース又はデキストリン等の増量剤、単糖類、二糖類やグルコース、マンノースやデキストリン等の他の炭水化物、着色剤、香味剤、希釈剤、乳化剤やポリビニルピロリジン等の親水ポリマー、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン、塩化ベンズアルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロレキシジン、ソルビン酸又は過酸化水素等の防腐剤、グリセリン、プロピレン・グリコール又はポリエチレングリコール等の溶媒、マンニトール又はソルビトール等の当アルコール、懸濁剤、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルビテート20やポリソルビテート80等ポリソルビテート、トリトン(triton)、トロメタミン(tromethamine)、レシチン又はコレステロール等の界面活性剤、スクロースやソルビトール等の安定化増強剤、塩化ナトリウム、塩化カリウムやマンニトール・ソルビトール等の弾性増強剤、輸送剤、希釈剤、賦形剤、及び/又は薬学上の補助剤。これらの製剤用の物質の添加量は、抗ヒト・オキユロスパニン抗体の重量にたいして0.01~100倍、特に0.1~10倍添加するのが好ましい。製剤中の好適な医薬組成物の組成は当業者によって、適用疾患、適用投与経路などに応じて適宜決定することができる。

## 【0152】

医薬組成物中の賦形剤や担体は液体でも固体でもよい。適当な賦形剤や担体は注射用の水や生理食塩水、人工脳脊髄液や非経口投与に通常用いられている他の物質でもよい。中性の生理食塩水や血清アルブミンを含む生理食塩水を担体に用いることもできる。医薬組成物にはpH7.0-8.5のTrisバッファーやpH4.0-5.5の酢酸バッファーやそれらにソルビトールや他の化合物を含むこともできる。本発明の医薬組成物は選択された組成で必要な純度で適当な薬剤として、凍結乾燥品あるいは液体として準備される。抗ヒト・オキユロスパニン抗体を含む医薬組成物はスクロースのような適当な賦形剤を用いた凍結乾燥品として成型されることもできる。

## 【0153】

本発明の医薬組成物は非経口投与用に調製することもできるし、経口による消化管吸収用に調製することもできる。製剤の組成及び濃度は投与方法によって決定することができるし、本発明の医薬組成物に含まれる、抗ヒト・オキユロスパニン抗体のヒト・オキユロスパニンに対する親和性、即ち、ヒト・オキユロスパニンに対する解離定数(Kd値)に対し、親和性が高い(Kd値が低い)ほど、ヒトへの投与量を少なく薬効を発揮することができるので、この結果に基づいて本発明の医薬組成物の人に対する投与量を決定することもできる。投与量は、ヒト型抗ヒト・オキユロスパニン抗体をヒトに対して投与する際には、約0.1~100mg/kgを1~30日間に1回投与すればよい。

## 【0154】

本発明の医薬組成物の形態としては、点滴を含む注射剤、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮

吸収剤などが挙げられる。

【0155】

7. 直接相互作用する物質の探索

本発明の他の一つの態様としては、ヒト・オキユロスパニンの活動を抑制するような物質を得ることを目的とした、該蛋白質の立体構造をベースとしたドラッグデザインの手法を含む。このような手法は、ラショナルドラッグデザイン法として知られており、酵素活性などの機能や、リガンド、コファクター、又はDNAへの結合などを効率よく阻害もしくは活性化させるような化合物の探索に利用されている。この例として、すでに上市されている抗HIV剤であるプロテアーゼの阻害剤がよく知られている。本発明のヒト・オキユロスパニンの三次元構造解析においても、X線結晶解析や核磁気共鳴法といった一般的によく知られている手法が利用できると考えられる。さらに、ヒト・オキユロスパニンの機能を抑制する物質の探索には、コンピュータドラッグデザイン(CADD)を活用した設計も可能である。この例としては、慢性関節リウマチ治療の新たなゲノム新薬として期待されているAP-1の働きを阻害する低分子化合物(国際特許出願公開WO99/58515号)などが知られている。このような方法により、ヒト・オキユロスパニンに直接結合するか、あるいはヒト・オキユロスパニンと他の因子との相互作用を阻害することにより、ヒト・オキユロスパニンの機能を抑制するような物質を得ることができる。

10

【0156】

さらに、他の一つの態様は、本発明のヒト・オキユロスパニンが会合するポリペプチド、すなわちヒト・オキユロスパニンのパートナー蛋白質に関する。すなわち、本発明は、ヒト・オキユロスパニンの活性を調節するパートナー蛋白質のスクリーニング方法に関する。

20

【0157】

このスクリーニング方法の一つの態様は、ヒト・オキユロスパニンに被験蛋白質試料を接触させ、ヒト・オキユロスパニンに結合する蛋白質を選択する工程を含む。このような方法としては、例えば、精製したヒト・オキユロスパニンを用いて、これに結合する蛋白質のアフィニティー精製を行う方法が挙げられる。具体的な方法の一例を示せば、ヒト・オキユロスパニンにヒスチジン6個よりなる配列をアフィニティータグとして融合したものを作製して、これを細胞の抽出液(予めニッケル-アガロースカラムにチャージして、このカラムを素通りした画分)と4で12時間インキュベートし、次いで、この混合物に別途ニッケル-アガロース担体を加えて4で1時間インキュベートする。ニッケル-アガロース担体を洗浄バッファーで十分洗浄した後、100mMイミダゾールを加えることにより、ヒト・オキユロスパニンと特異的に結合する細胞抽出液中の蛋白質を溶出させて精製し、この構造を決定する。このようにして、ヒト・オキユロスパニンと直接結合する蛋白質、及びヒト・オキユロスパニンとの結合活性は持たないが、サブユニットとしてヒト・オキユロスパニンに直接結合する蛋白質と複合体を形成することにより間接的にヒト・オキユロスパニンに結合する蛋白質が精製できる[実験医学別冊、バイオマニュアルシリーズ5「転写因子研究法」pp215-219(羊土社刊)]。

30

【0158】

別の方法としては、ファーウエスタンプロット法[実験医学別冊、「新遺伝子工学ハンドブック」pp76-81(羊土社刊)]や、酵母や哺乳類動物細胞を用いたツーハイブリッドシステム法[実験医学別冊、「新遺伝子工学ハンドブック」pp66-75(羊土社刊)、「チェックメイト・マンマリアン・ツーハイブリッドシステム」(プロメガ社製)]によるクローニングも可能であるが、これらの方法に限定されない。

40

【0159】

このようにして、ヒト・オキユロスパニンと直接もしくは間接的に相互作用するパートナー蛋白質のcDNAが得られれば、ヒト・オキユロスパニンと該パートナー蛋白質との相互作用を阻害する物質の機能的スクリーニングに利用することができる。具体的には、例えば、ヒト・オキユロスパニンとグルタチオンS-トランスフェラーゼとの融合蛋白質を調製して、抗グルタチオンS-トランスフェラーゼ抗体で覆ったマイクロプレートに結

50

合させた後、ビオチン化した該パートナー蛋白質をこの融合蛋白質と接触させ、該融合蛋白質との結合をストレプトアビジン化アルカリホスファターゼで検出する。ビオチン化した該パートナー蛋白質添加の際、被験物質も添加し、融合蛋白質と該パートナー蛋白質との結合を促進あるいは阻害する物質を選択する。この方法では、融合蛋白質に直接作用する物質又は該パートナー蛋白質に直接作用する物質が得られる。

**【 0 1 6 0 】**

融合蛋白質と該パートナー蛋白質との結合が間接的であり、何らかの別の因子を介しているような場合には、例えば該因子を含むような細胞抽出液存在下で、同様に上記アッセイを行う。この場合には、該因子に対して作用するような物質も選択される可能性がある。

10

**【 0 1 6 1 】**

また、得られたパートナー蛋白質が、ヒト・オキユロスパニンの機能を抑制する活性を有している場合には、既に記載したヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現ベクターを応用した試験方法に従って、抗癌剤、例えば、前立腺癌の治療剤として有用な候補物質のスクリーニングを行うことができる。また、得られたパートナー蛋白質が、ヒト・オキユロスパニンの機能を抑制する活性を有している場合には、このような抑制因子をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドは、癌の遺伝子治療に用いることができる。

**【 0 1 6 2 】**

そのようなポリヌクレオチドは、例えば同定された阻害因子のアミノ酸配列を解析し、該アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列からなるオリゴヌクレオチドプローブを合成してcDNAライブラリーやゲノムライブラリーのスクリーニングを行うことにより取得できる。また、ヒト・オキユロスパニンの機能の阻害活性を有するペプチドが、ランダムに合成された人工ペプチドライブラリー由来である場合は、該ペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列からなるDNAを化学合成する。

20

**【 0 1 6 3 】**

遺伝子治療においては、そのようにして得られた阻害因子をコードする遺伝子を、例えばウイルスベクターに組み込んで、該組換えウイルスベクターを有するウイルス（無毒化されたもの）を患者に感染させる。患者体内では抗癌因子が産生され、癌細胞の増殖抑制機能を有するので、癌の治療が可能となる。

**【 0 1 6 4 】**

遺伝子治療剤を細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターを利用した遺伝子導入方法、あるいは非ウイルス性の遺伝子導入方法（日経サイエンス,1994年4月号,20-45頁、実験医学増刊,12(15)(1994)、実験医学別冊「遺伝子治療の基礎技術」,羊土社(1996)）のいずれの方法も適用することができる。

30

**【 0 1 6 5 】**

ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルス又はRNAウイルスに、阻害因子あるいはその変異体をコードするDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。このうち、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスを用いた方法が、特に好ましい。非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

40

**【 0 1 6 6 】**

また遺伝子治療剤を実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入するインビボ（in vivo）法及びヒトからある種の細胞を取り出し体外でDNAを該細胞に導入し、その細胞を体内に戻すエクスピボ（ex vivo）法がある（日経サイエンス,1994年4月号,20-45頁、月刊薬事,36(1),23-48(1994)、実験医学増刊,12(15)(1994)）。

**【 0 1 6 7 】**

50

例えば、該遺伝子治療剤がインビボ法により投与される場合は、疾患、症状等に応じ、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等、適当な投与経路により投与される。またインビボ法により投与する場合は、該遺伝子治療剤は一般的には注射剤等とされるが、必要に応じて慣用の担体を加えてもよい。また、リポソーム又は膜融合リポソーム（センダイウイルス・リポソーム等）の形態にした場合は、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤とすることができる。

【 0 1 6 8 】

配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列又は該配列の部分配列に相補的なヌクレオチド配列は、いわゆるアンチセンス治療に用いることができる。アンチセンス分子は、配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列の一部に相補的な、通常 15 乃至 30 mer からなる DNA、もしくはそのホスホロチオエート、メチルホスホネート又はモルフォリノ誘導体などの安定な DNA 誘導体、2'-O-アルキル RNA などの安定な RNA 誘導体として用いられ得る。そのようなアンチセンス分子を、微量注入、リポソームカプセル化により、あるいはアンチセンス配列を有するベクターを利用して発現させるなど、本発明の技術分野において周知の方法で、細胞に導入することができる。このようなアンチセンス療法は、配列表の配列番号 1 に示されるヌクレオチド配列がコードする蛋白質の活性が増加しすぎることによって引き起こされる病気の治療に有用である。

【 0 1 6 9 】

上記アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む医薬として有用な組成物は、医薬として許容できる担体の混合などの公知の方法によって製造され得る。このような担体と製造方法の例は、Applied Antisense Oligonucleotide Technology (1998 Wiley - Liss, Inc.) に記載されている。アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む製剤は、それ自体あるいは適宜の薬理的に許容される、賦形剤、希釈剤等と混合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤若しくはシロップ剤等により経口的に、又は、注射剤、坐剤、貼付剤、若しくは、外用剤等により非経口的に投与することができる。これらの製剤は、賦形剤（例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトールのような糖誘導体；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、澱粉、デキストリンのような澱粉誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；プルランのような有機系賦形剤；及び、軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体；燐酸水素カルシウムのような燐酸塩；炭酸カルシウムのような炭酸塩；硫酸カルシウムのような硫酸塩等の無機系賦形剤を挙げることができる。）

、滑沢剤（例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩；タルク；コロイドシリカ；ビーズワックス、ゲイ蠟のようなワックス類；硼酸；アジピン酸；硫酸ナトリウムのような硫酸塩；グリコール；フマル酸；安息香酸ナトリウム；DLロイシン；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩；無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類；及び、上記澱粉誘導体を挙げることができる。）

、結合剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、及び、前記賦形剤と同様の化合物を挙げることができる。）

、崩壊剤（例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体；カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルロース類を挙げることができる。）

、乳化剤（例えば、ベントナイト、ビーガムのようなコロイド性粘土；水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウムのような金属水酸化物；ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸カルシウムのような陰イオン界面活性剤；塩化ベンザルコニウムのような陽イオン界面活性剤；及び、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、シヨ糖脂肪酸エステルのような非イオン界面活性剤を挙げることができる。）

、安定剤（メチルバラベン、プロピルバラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブ

10

20

30

40

50

タノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾールのようなフェノール類；チメロサル；デヒドロ酢酸；及び、ソルビン酸を挙げることができる。）、矯味矯臭剤（例えば、通常使用される、甘味料、酸味料、香料等を挙げることができる。）、希釈剤等の添加剤を用いて周知の方法で製造される。

【0170】

本発明の化合物を患者へ導入する方法については、上記に加えてコロイド分散系を用いることができる。コロイド分散系は化合物の生体内の安定性を高める効果や、特定の臓器、組織又は細胞へ化合物を効率的に輸送する効果が期待される。コロイド分散系は、通常用いられるものであれば限定しないが、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、  
10  
ビーズ、及び水中油系の乳化剤、ミセル、混合ミセル及びリポソームを包含する脂質をベースとする分散系を挙げることができ、好ましくは、特定の臓器、組織又は細胞へ化合物を効率的に輸送する効果のある、複数のリポソーム、人工膜の小胞である（Mannino et al., *Biotechniques*, 1988, 6, 682; Blume and Cevc, *Biochem. et Biophys. Acta*, 1990, 1029, 91; Lappalainen et al., *Antiviral Res.*, 1994, 23, 119; Chonn and Cullis, *Current Op. Biotech.*, 1995, 6, 698）。

【0171】

0.2 - 0.4  $\mu\text{m}$ のサイズ範囲をとる単膜リポソームは、巨大分子を含有する水性緩衝液のかなりの割合を被包化し得、化合物はこの水性内膜に被胞化され、生物学的に活性な形態で脳細胞へ輸送される（Fraleley et al., *Trends Biochem. Sci.*, 1981, 6, 77）。  
20  
リポソームの組成は、通常、脂質、特にリン脂質、とりわけ相転移温度の高いリン脂質を1種又はそれ以上のステロイド、特にコレステロールと通常複合したものである。リポソーム生産に有用な脂質の例は、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、スフィンゴ脂質、ホスファチジルエタノールアミン、セレブロシド及びガングリオシドのようなホスファチジル化合物を包含する。特に有用なのはジアシルホスファチジルグリセロールであり、ここでは脂質部分が14 - 18の炭素原子、特に16 - 18の炭素原子を含有し、飽和している（14 - 18の炭素原子鎖の内部に二重結合を欠いている）。代表的なリン脂質は、ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン及びジステアロイルホスファチジルコリンを包含する。

【0172】

リポソームを包含するコロイド分散系の標的化は、受動的又は能動的のいずれかであってもよい。受動的な標的化は、洞様毛細血管を含有する臓器の網内系細胞へ分布しようとするリポソーム本来の傾向を利用することによって達成される。一方、能動的な標的化は、例えば、ウイルスの蛋白質コート（Morishita et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 1993, 90, 8474）、モノクローナル抗体（又はその適切な結合部分）、糖、糖脂質又は蛋白質（又はその適切なオリゴペプチドフラグメント）のような特定のリガンドをリポソームへ結合させること、又は天然に存在する局在部位以外の臓器及び細胞型への分布を達成するためにリポソームの組成を変えることによってリポソームを修飾する手法等を挙げることができる。標的化されたコロイド分散系の表面は様々なやり方で修飾され得る。リポソームで標的したデリバリーシステムでは、脂質二重層との緊密な会合において標的リガンド  
40  
を維持するために、リポソームの脂質二重層へ脂質基が取込まれ得る。脂質鎖を標的リガンドと結びつけるために様々な連結基が使用され得る。本発明のオリゴヌクレオチドのデリバリーが所望される細胞の上に支配的に見出される特定の細胞表面分子に結合する標的リガンドは、例えば、（1）デリバリーが所望される細胞によって支配的に発現される特定の細胞受容体と結合している、ホルモン、成長因子又はその適切なオリゴペプチドフラグメント、又は（2）標的細胞上で支配的に見出される抗原性エピトープと特異的に結合する、ポリクローナル又はモノクローナル抗体、又はその適切なフラグメント（例えば、Fab; F(ab')<sub>2</sub>）、であり得る。2種又はそれ以上の生物活性剤は、単一のリポソーム内部で複合し、投与することもできる。内容物の細胞内安定性及び/又は標的化を高める薬剤をコロイド分散系へ追加することも可能である。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 7 3 】

その使用量は症状、年齢等により異なるが、経口投与の場合には、1回当り下限1mg（好適には、30mg）、上限2000mg（好適には、1500mg）を、注射の場合には、1回当り下限0.1mg（好適には、5mg）、上限1000mg（好適には、500mg）を皮下注射、筋肉注射又は静脈注射によって投与することができる。

## 【実施例】

## 【 0 1 7 4 】

以下、実施例を示してこの発明を詳細かつ具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング（Molecular Cloning）」（Sambrook, J., Fritsch, E.F.及びManiatis, T.著, Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊）に記載の方法により行うか、又は、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

## 【 0 1 7 5 】

## 実施例1 癌細胞で特異的に発現している遺伝子の選別

配列表の配列番号1と部分的に重複するヌクレオチド配列を有するESTプローブ（Affimetrix Genechip HG-133 probe 223795\_\_at：アフィメトリクス社製）について、GeneLogic社製のデータベース（GeneExpress Software System Release 1.4.2）を用いて発現プロファイル解析を行った。

## 【 0 1 7 6 】

各種細胞株内でのヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量を比較した結果、メラニン細胞（メラノサイト：melanocyte）8例は、他の細胞株群、すなわち血球系細胞サンプル12例、グリア細胞株サンプル6例、上皮系細胞サンプル62例と比較して有意に高く転写されていた（順にP値<0.0001、=0.0007、<0.0001 図1上パネル）

次に組織由来サンプルでのヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量を比較した。健常人皮膚サンプル66例、及びメラノーマサンプル33例について転写量を比較したところ、メラノーマサンプルにおいて有意に高く転写されていた（P値<0.0001：図1下パネル）。また、健常人皮膚サンプル66例と、メラノーマサンプルのうち、皮膚組織由来サンプル12例を比較したところ、メラノーマサンプルにおいて有意に高く転写されていた（P値=0.0007：図2上パネル）。

## 【 0 1 7 7 】

一方、健常人皮膚サンプル66例と、メラノーマサンプルのうち、リンパ節組織由来サンプル12例を比較したところ、メラノーマサンプルにおいて有意に高く転写されていた（P値=0.0003：図2下パネル）。

さらに、健常人リンパ節由来サンプル13例と、メラノーマサンプルのうち、リンパ節組織由来サンプル12例を比較したところ、メラノーマサンプルにおいて有意に高く転写されていた（P値=0.0011：図3パネル）。

## 【 0 1 7 8 】

## 実施例2 ヒト・オキユロスパニン遺伝子の取得と発現プラスミドの構築

## a) PCR反応

ヒト・オキユロスパニンcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして5'-CACCATGGAGGAGGGGAGAGGCC-3'（プライマー1：配列表の配列番号5）及び、

5'-GCCCGGGCGGGTTTGGCAGCGG-3'（プライマー2：配列表の配列番号6）

の配列を有するオリゴヌクレオチドを常法に従って合成した。なお、プライマー1はヒト・オキユロスパニン遺伝子の開始コドン上流にKozak配列として4塩基、CACCを付加したオリゴヌクレオチドであり、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至23からなるヌクレオチド配列の5'側に4塩基配列（CACC）付加した塩基配列からなるオリゴヌクレオチドである。このCACC配列は、クローニングベクターpENTR/D-TOPOへ

10

20

30

40

50

の組み込みの際にベクター 3' 末端と相補鎖を形成するため、遺伝子の方向性を保持したベクターへの組み込みを可能としている。プライマー 2 は配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1043 乃至 1065 からなるヌクレオチド配列の相補鎖からなるオリゴヌクレオチドである。

PCR 反応は PLATINUM Pfx DNA Polymerase (インビトロジェン社製) を添付プロトコールに従って用いて行った。具体的には、得られたファーストストランド cDNA 0.1  $\mu$ l に 10 pmol /  $\mu$ l の濃度の合成プライマー 1 と合成プライマー 2 をそれぞれ 1.5  $\mu$ l、10X Pfx Amplification Buffer 5  $\mu$ l、10mM dNTP Mix を 1.5  $\mu$ l、50mM MgSO<sub>4</sub> を 1  $\mu$ l、PLATINUM Pfx DNA Polymerase 0.5  $\mu$ l、10X PCRx Enhancer Solution 10  $\mu$ l、滅菌精製水 28.9  $\mu$ l を添加し、50  $\mu$ l の PCR 反応溶液を作製した。PCR 反応は、Peltier Thermal Cycler TPC-200 DNA Engine (エムジェーリサーチ (MJ Research) 社製) により行った。まず 94 で 2 分加熱した後、引き続き 94 で 30 秒、65 で 2 分の温度サイクルを 5 回、続いて 94 で 30 秒、60 で 40 秒、68 で 1 分 20 秒の温度サイクルを 5 回、続いて 94 で 30 秒、55 で 40 秒、68 で 1 分 20 秒の温度サイクルを 5 回、続いて 94 で 30 秒、50 で 40 秒、68 で 1 分 20 秒の温度サイクルを 35 回繰り返し、最後に 68 で 10 分間保温してから、4 に保存した。目的 cDNA は、反応物を 1.5% のアガロースゲルで電気泳動し、NM\_031945 cDNA (1069 bp) の増幅を確認後、S. N. A. P. UV-Free Gel Purification Kit (インビトロジェン社製) をその添付プロトコールに従って用いることによりアガロースゲルより DNA を精製した。精製された cDNA の濃度は、1D Image Analysis Software Version 3.5 (Kodak Digital Science EDAS 290: コダック社製) を用い、1 kb DNA Ladder (インビトロジェン社製) を濃度標準物にして測定した。

【0179】

b) ヒト・オキュロスパニン cDNA の pENTR/D-TOPO ベクターへのクローニング

pENTR Directional TOPO Cloning Kits (インビトロジェン社製) を添付プロトコールに従って用い、実施例 2a) によって得られた NM\_031945 cDNA を pENTR/D-TOPO ベクターにクローニングした。NM\_031945 cDNA を、キット付属の反応バッファー中で Topoisomerase を結合させてある pENTR/D-TOPO ベクターと混合し室温で 30 分間インキュベートした。得られた反応物を用いて大腸菌 One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli (インビトロジェン社製) を形質転換し、50  $\mu$ g/ml のカナマイシンを含む LB 寒天培地上で培養した。その結果カナマイシン耐性を示して生育してきた大腸菌コロニーを選択して、1 ml の 50  $\mu$ g/ml のカナマイシンを含む液体 TB 培地中で 37 で一晩培養し、Montage Plasmid Miniprep<sub>96</sub> Kit (ミリポア社製) を利用することによりプラスミド DNA を単離精製した。得られたプラスミド DNA について、BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit をその添付プロトコールに従って用いることにより反応を行った後、ABI PRISM 3100 DNA Analyzer (アプライド・バイオシステムズ社製) によりヌクレオチド配列解析を行い、GenBank アクセッション番号 (ACCESSION NO. NM\_031945) に示されるヌクレオチド配列の Open Reading Frame を有する cDNA (配列表の配列番号 1) が、pENTR/D-TOPO ベクターに組み込まれていることを確認した。

【0180】

次に発現用ベクター p cDNA 3.1/DEST40 (インビトロジェン社製) へ GA

10

20

30

40

50

TEWAY<sup>TM</sup>システムを用いて遺伝子の乗せ替えを行った。すなわち、GATEWAY<sup>TM</sup> LR Clonase<sup>TM</sup> Enzyme Mix (インビトロジェン社製) 4  $\mu$ l、LR Reaction Buffer 4  $\mu$ l、pENTR/D-TOPO-NM\_\_031945 0.3  $\mu$ g、pcDNA3.1/DEST40 0.3  $\mu$ gをTEバッファで20  $\mu$ lに調製し、25℃で1時間反応させる。反応後、2  $\mu$ lのProteinase Kを加え、37℃にて10分間反応させる。得られた反応物を用いて大腸菌One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli (インビトロジェン社製)を形質転換し、50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地上で培養した。その結果アンピシリン耐性を示して生育してきた大腸菌コロニーを選択して、100 mlの50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む液体LB培地中で37℃で一晩培養し、Plasmid MAXI Kit (QIAGEN社製)を利用することによりプラスミドDNA (pcDNA3.1-DEST40-NM\_\_031945)を単離精製した。

実施例3 ヒト・オキユロスパニン遺伝子の細胞への導入と発現されたヒト・オキユロスパニン遺伝子産物の確認、及び免疫原としてのヒト・オキユロスパニン発現細胞の膜画分の調製

a) プラスミドpcDNA3.1-DEST40-NM\_\_031945のNIH3T3細胞へのトランスフェクション

実施例2によって得られたプラスミドpcDNA3.1-DEST40-NM\_\_031945をNIH3T3細胞に以下のようにトランスフェクションした。NIH3T3細胞へのトランスフェクションは(株)Invitrogen製のLipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Reagentを用いてリポフェクションにより行った。すなわち、まずNIH3T3細胞を6穴プレートにてセミコンフルエントになるまで増殖させた。細胞を抗生物質の入っていない、10% ウシ胎児血清を含むDMEMで一度洗浄したのち、200  $\mu$ lの抗生物質の入っていない、10% ウシ胎児血清を含むDMEMを加えた。次に1.5 mlエッペンドルフチューブ中に無血清培地(DMEM) 100  $\mu$ lと、上記方法にて回収したプラスミドDNA (pcDNA3.1-DEST40-NM\_\_031945) 2  $\mu$ gを加え、混合した。別の1.5 mlエッペンドルフチューブ中に無血清培地(DMEM) 96  $\mu$ lと、Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Reagent 4  $\mu$ lを加え、混合した。DNA溶液とLipofectamine溶液を混合し、室温にて20分間放置した。その後、DNA-Lipofectamine混合液を細胞に加え、37℃、5% CO<sub>2</sub>下で培養した。4時間後10% ウシ胎児血清を含むDMEM 1 mlを細胞に加え、37℃、5% CO<sub>2</sub>下で一晩培養した。

【0181】

b) プラスミドpcDNA3.1-DEST40-NM\_\_031945のNIH3T3細胞での発現の確認  
このようにして得られた細胞培養物を回収した。cDNAを含まないネガティブコントロール又はpcDNA3.1-DEST40-NM\_\_031945でトランスフェクトして得たNIH3T3細胞をPBS(-)緩衝液((株)Invitrogen製)で洗浄した。細胞をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)用の2-メルカプトエタノールを含むサンプル緩衝液(バイオラッド社製)に溶解し、12.5% ポリアクリルアミドゲル(eパジェル E-T12.5L アトー(株)社製)を用いて、還元条件下でSDS-PAGEを行った。

【0182】

電気泳動後、ポリアクリルアミドゲルからバンドを転写緩衝液(192 mM グリシン、20% メタノール、25 mM トリス)中でゲルメンブレン転写装置(マリソル社製、NP7513)を用いて4℃、120分、200 mAの条件でPolyvinylidene Difluoride(PVDF)メンブレン(ミリポア社製)に転写した。

【0183】

転写後のPVDFメンブレンについて、抗V5タグ抗体((株)Invitrogen製)を用いたウエスタンブロット解析を行った。すなわち、まずPVDFメンブレンをブロックエース((株)雪印製)にて、ブロッキング(室温で30分間を1回)した後、プラス

10

20

30

40

50

チックバッグ（商品名ハイブリバック、コスモバイオ（株）社製）に入れ、抗V5タグ抗体（1000倍希釈）、ブロックエース 5 ml 添加して室温で1時間振とうした。1時間後、メンブレンを取り出し0.05%のツイーン20を含むPBS（以下「0.05% Tween 20 - PBS」という）で洗浄した（室温で15分間を1回、次いで5分間を2回）その後、メンブレンを新しいプラスチックバッグに移し、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体（アマシャム・ファルマシア社製）を0.05% Tween 20 - PBSで5000倍に希釈した溶液30 mlを入れ、を室温で1時間振とうした。1時間後、メンブレンを取り出し、0.05% Tween 20 - PBSで15分間×1回、次いで5分間×4回洗浄した。洗浄後、メンブレンをラップフィルム上に置き、ECLウエスタンプロットティング検出溶液（アマシャム・ファルマシア社製）を用いて、抗V5タグ抗体が結合するバンドの検出を行った（メンブレンをラップフィルム上に置き、ECLウエスタンプロットティング検出溶液に1分間浸した後、X線フィルムを感光させた（1分間））。その結果、抗V5タグ抗体により、pcDNA3.1-DEST40-NM\_\_031945プラスミドDNAを導入して得られたNIH3T3細胞に特異的なバンドが検出された（図4）。

10

#### 【0184】

c) プラスミドpcDNA3.1-DEST40-NM\_\_031945のBALB-3T3細胞へのトランスフェクション

BALB-3T3細胞（American Type Culture Collection No. CCL-163）を、10% ウシ血清（ギブコ社製）（以下「CS」という）を含むダルベッコ変法イーグル培地（以下「DMEM」という：日水製薬（株）社製）を入れた細胞培養用フラトレイ（培養面積500 cm<sup>2</sup>；住友ベークライト（株）社製）3枚中でセミコンフルエントになるまで37、5% 炭酸ガス下で培養した後、pcDNA3.1-DEST40-NM\_\_031945をBALB-3T3細胞にトランスフェクションした。BALB-3T3細胞へのトランスフェクションは（株）Gene Therapy Systems製のGeneporter<sup>TM</sup> 2 Transfection Reagentを用いてリポフェクションにより行った。すなわち、細胞を無血清培地（DMEM）で一度洗浄したのち、500 mlの無血清培地（DMEM）を加えた。次に50 mlファルコンチューブ中にNew DNA Diluent 6 mlと、上記方法にて回収したプラスミドDNA（pcDNA3.1-DEST40-NM\_\_031945）240 μgを加え、混合した。別の50 mlファルコンチューブ中に無血清培地（DMEM）4.8 mlと、Geneporter<sup>TM</sup> 2 Reagent 1200 μlを加え、混合した。DNA溶液とGeneporter<sup>TM</sup> 2溶液を混合し、室温にて20分間放置した。その後、DNA-Geneporter<sup>TM</sup> 2混合液を細胞に加え（4 ml/トレイ）、37、5% CO<sub>2</sub>下で培養した。4時間後 20% ウシ血清を含むDMEM 50 ml/トレイを細胞に加え、37、5% CO<sub>2</sub>下で一晩培養した。

20

30

#### 【0185】

d) 細胞膜画分の調製

上記の方法にて培養した細胞をPBS（-）緩衝液（（株）Invitrogen製）で洗浄する。セルスクレーパー（住友ベークライト（株）社製）を用いて細胞を回収し、5 mM Trisバッファー pH 8.0 7 mlに懸濁する。4にて30分間細胞溶液を放置する。Dounce Type B ホモジェナイザー（30ストローク）にて細胞を破碎する。1000 Gで10分間遠心し、上清を回収する。上清を78000 G 100分間、超遠心分離機（日立（株）製）にて遠心し、沈殿を回収する。シヨ糖密度勾配により、膜画分を濃縮する。すなわち、沈殿を57%シヨ糖 0.25 M Trisバッファー pH 8.0 3 mLに溶解する。超遠心用チューブに移しかえ、その細胞溶液の上へ37.2% 57%シヨ糖 0.25 M Trisバッファー pH 8.0 3 mL、0.25 M 57%シヨ糖 0.25 M Trisバッファー pH 8.0 1.5 mLを重層する。超遠心分離機にて、75500 G 16時間遠心する。チューブ中の溶液を上方より1 mLずつ回収する。各フラクションに10 mLの5 mM Trisバッファー pH 8.

40

50

0を加え、78000G 1時間超遠心し、沈殿を回収する。沈殿に5mM Trisバッファー pH8.0 500 $\mu$ lを加え、Dounce Type B ホモジェナイザー(10ストローク)にて細胞溶液を均一化する。発現確認の項で述べたウエスタンブロッティング法により、細胞膜画分を同定し、免疫原とする。

#### 【0186】

##### 実施例4 マウスの免疫及び細胞融合

##### (4-1) 免疫

実施例3で得られたヒト・オキユロスパニン発現細胞の膜画分溶液 1ml(全蛋白質量; 100 $\mu$ g)を4~10週令のBALB/cマウス雌(日本エスエルシー社より購入)腹腔内に投与した。2週間後、同様の膜画分溶液(20 $\mu$ g蛋白質/マウス)を腹腔内に投与し追加免疫する。

10

#### 【0187】

##### (4-2) 細胞融合

追加免疫3日後のマウスより脾臓を摘出し、これを20mM HEPES緩衝液(pH7.3)、350mg/ml 炭酸水素ナトリウム、0.05mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、50単位/ml ペニシリン、50 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン、300 $\mu$ g/ml L-グルタミン酸を含む無血清RPMI1640培地(10.4g/リットルRPMI1640「ニッスイ」(1):日水製薬(株)社製)(以下「無血清RPMI培地」という)10ml中に入れ、メッシュ(セルストレイナー:ファルコン社製)上でスパテルを用いてつぶす。メッシュを通過した細胞懸濁液を遠心して脾臓細胞を沈澱させた後、この脾臓細胞を無血清RPMI培地で2回洗浄してから、無血清RPMI培地に懸濁して細胞数を測定する。

20

#### 【0188】

一方、10% FCS(ギブコ・ビーアールエル社製)を含むASF104培地(味の素(株)社製)(以下「血清入りASF培地」という)にて、37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガス存在下で細胞濃度が $1 \times 10^8$ 細胞/mlを越えないように培養したミエローマ細胞 NS1(American Type Culture Collection TIB-18)を同様に無血清RPMI培地で洗浄し、無血清RPMI培地に懸濁して細胞数を測定する。

#### 【0189】

$3 \times 10^7$ 個相当のNS1細胞懸濁液と、 $3 \times 10^8$ 個相当の脾臓細胞懸濁液を混合し、遠心後、上清を完全に除去する。以下の細胞融合の操作は、ペレットの入ったプラスチック遠沈管を温水を入れたビーカー中で37 $^{\circ}$ Cに保温しながら実施する。このペレットに、50%(w/v) ポリエチレングリコール 1500(ベーリンガー・マンハイム社製)1mlを、ピペットの先でペレットを攪拌しながらゆっくり添加した後、予め37 $^{\circ}$ Cに加温しておいた無血清RPMI培地1mlを2回に分けてゆっくり添加し、さらに7mlの無血清RPMI培地を添加する。遠心後、上清を除去し、10% FCSを含むヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン培地(以下「HAT培地」という;ベーリンガー・マンハイム社製)10mlを、ピペットの先でゆっくり攪拌しながら添加する。さらに10% FCSを含むHAT培地 20mlを添加した後に、細胞培養用96穴マイクロプレートに100 $\mu$ l/ウェルずつ分注し、37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガス下で培養する。7~8日後、培地が黄色味を帯びたウェルには新しいHAT培地を100 $\mu$ l/ウェルずつ加えた。このようにして得られた融合細胞を、以下に記載する限界希釈法によるスクリーニングに供する。

30

40

#### 【0190】

##### (4-3) 限界希釈

4~10週令のBALB/cマウス雌(日本エスエルシー社より購入)より胸腺を摘出後、メッシュ(セルストレイナー;ファルコン社製)上でスパテルを用いてつぶし、メッシュを通過した細胞を10% FCSを含むヒポキサンチン・チミジン培地(以下「HT培地」という;ベーリンガー・マンハイム社製)で2回洗浄する。マウス1匹分の胸腺細胞を10% FCSを含むHT培地 30mlに懸濁したものをフィーダー細胞液とし

50

た。上記(4-2)で得られた融合細胞を含む培養液を、細胞密度に応じてフィーダー細胞液で10乃至100倍に希釈し、さらに融合細胞の密度が5細胞/ml、1細胞/ml、0.5細胞/mlとなるように、フィーダー細胞液で段階希釈する。このようにして調製した各試料を、細胞培養用96穴マイクロプレートに100 $\mu$ l/ウェルずつ分注し、37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガス下で5日間培養する。

#### 【0191】

##### (4-4) 選別

##### (4-4-1) 細胞ELISA

ヒト・オキユロスパニン発現細胞の維持培養は、RPMI1640(インビトロジェン社製)に10%牛胎児血清(Moregate Biotech社製)、20mM HEPES(シグマ社製)、55 $\mu$ M 2-メルカプトエタノール(インビトロジェン社製)を添加した培地(培地)にて、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下で行う。対数増殖期にあるヒト・オキユロスパニン発現細胞を2 $\times$ 10<sup>4</sup>cells/cm<sup>2</sup>で細胞培養用フラスコへまきこみ、3日間培養する。このように調製したヒト・オキユロスパニン発現細胞を全て50mlチューブへ移し、HITACHI himac CF8DLで1000rpm、5分間遠心分離する(遠心分離条件1)。上清を除き、培地でヒト・オキユロスパニン発現細胞を懸濁後、0.4%トリパンブルー溶液(シグマ社製)を使用し、生細胞数を計測する。培地でヒト・オキユロスパニン発現細胞を生細胞10<sup>7</sup>cells/mlに調製し、96穴U底プレートに100 $\mu$ l/wellずつ分注する。96穴U底プレートをHITACHI himac CF8DLで15000rpm、1分間遠心分離し(遠心分離条件2)、上清を200 $\mu$ lチップで抜き取った。96穴U底プレートの側面をたたいてヒト・オキユロスパニン発現細胞を懸濁後、氷中で冷やした培地で10 $\mu$ g/ml、5 $\mu$ g/ml、2.5 $\mu$ g/mlの濃度に調製したハイブリドーマ培養上清を100 $\mu$ l/wellずつ添加する。15分毎に96穴U底プレートをプレートミキサー(フジレビオ社製)で攪拌しながら、4 $^{\circ}$ Cで1.5時間反応させる。反応終了後、96穴U底プレートを遠心分離条件2で遠心分離し、上清を200 $\mu$ lチップで抜き取る。PBS(-)(日水製薬社製)に5%牛胎児血清を添加した溶液(PBS-5%FBS)を200 $\mu$ l/wellずつ添加し、プレートミキサーで攪拌後、遠心分離条件2で遠心分離し、上清を200 $\mu$ lチップで抜き取る。以上の操作をこのあと2回行う。96穴U底プレートの側面をたたいてヒト・オキユロスパニン発現細胞を懸濁後、氷中で冷やしたPBS-5%FBSで500倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体(Kirkegaard & Perry Laboratories社製)を100 $\mu$ l/wellずつ添加し、15分毎に96穴U底プレートをプレートミキサーで攪拌しながら、4 $^{\circ}$ Cで1.5時間反応させる。反応終了後、96穴U底プレートを遠心分離条件2で遠心分離し、上清を200 $\mu$ lチップで抜き取った。PBS-5%FBSを200 $\mu$ l/wellずつ添加し、プレートミキサーで攪拌後、遠心分離条件2で遠心分離し、上清を200 $\mu$ lチップで抜き取る。以上の操作をこのあと2回行う。96穴U底プレートの側面をたたいてヒト・オキユロスパニン発現細胞を懸濁後、室温にしたペルオキシダーゼ用発色基質(ナカライテスク社製)を100 $\mu$ l/wellずつ添加し、プレートミキサーで10分間攪拌する。遠心分離条件2で遠心分離後、上清50 $\mu$ l/wellを96穴平底プレートへ移し、プレートリーダー(1420 ARV0 マルチラベルカウンター、パーキンエルマー社製)で405nmの吸収を測定する。

#### 【0192】

##### (4-4-2) フローサイトメーター

実施例3で取得したヒト・オキユロスパニン発現細胞を、10% FCSを含むRPMI 1640培地中で、37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガス下で培養し増殖させてから、1 $\times$ 10<sup>7</sup>細胞/mlに調製した細胞懸濁液を、U字底96穴マイクロプレート(ヌンク社製)に50 $\mu$ l/ウェルずつ分注し、遠心分離(90 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、10分)する。上清を除去し、上記(4-3)で培養する融合細胞の培養上清を50 $\mu$ l/ウェル加えて攪拌した後、氷上で1時間静置してから、遠心分離(90 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、10分)して上清を除去する。ペレットを100 $\mu$ l/ウェルのフローサイトメーター用緩衝液(5% FCS、0.04%(w/v) アジ化ナトリウムを含むPBS)で2回洗浄した後、500倍希釈したフルオレッセイン-5-イソチオシアネート(Fluorescein-5-isothiocyanate; 以下「FITC」という)標識ヤギ抗マウスIgG抗体IgG画分(オルガノン・テクニカ社製)50 $\mu$ lを二次抗体として加え、氷上で1時間静置する。遠心分離(90 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、10分)

して上清を除去してから、ペレットをフローサイトメトリー用緩衝液 100  $\mu$ l / ウェルで2回洗浄後、3.7% ホルマリン溶液 50  $\mu$ l を添加し、氷上で10分静置することにより細胞を固定する。遠心分離 (90  $\times$  g、4分、10分) して上清を除去してから、再度フローサイトメトリー用緩衝液 100  $\mu$ l / ウェルで洗浄し、ペレットをフローサイトメトリー用緩衝液 100  $\mu$ l / ウェルに懸濁したものをフローサイトメトリー用試料とする。各試料中の細胞のFITC蛍光強度をフローサイトメーター (エピックス・エリート; コールター社製) で測定する (励起波長: 488 nm、検出波長: 530 nm)。その結果、融合細胞培養上清を添加しなかったヒト・オキユロスパニン発現細胞 (FITC蛍光強度約0.3) よりも明らかに高値 (約100 - 1000) のFITC蛍光強度を示した試料に対応する融合細胞を選別する。

10

## 【0193】

## (4-5) クローニング

上記(4-4)で選別される細胞群について、上記(4-3)から(4-4)の一連の工程を5回繰り返すことにより、ヒト・オキユロスパニン発現細胞と結合するが導入前の細胞と結合しない単一の抗体を産生するハイブリドーマを数クローン得る。

## 【0194】

## 実施例5 ヒト・オキユロスパニンモノクローナル抗体の精製

実施例4で作出されるマウス-マウスハイブリドーマを、10% FCSを含むASF培地 1リットル中で、37 $^{\circ}$ C、5% 炭酸ガス下で培養し、 $1 \times 10^6$ 細胞/mlとなるまで増殖させる。培養液を遠心分離 (1000 rpm、2分間) し、上清を捨て、沈澱した細胞を無血清ASF培地で1回洗浄後、無血清ASF培地 1リットルに再懸濁し、37 $^{\circ}$ C、5% 炭酸ガス下で48時間培養する。この培養液を遠心分離 (1000 rpm、2分間) し、上清を回収して透析チューブ (排除限界分子量 12000 - 14000; ギブコ・ビーアールエル社製) に入れ、10倍量の10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) に対して透析する。この透析チューブ内液からのIgGの粗精製を、高速液体クロマトグラフィー装置 (FPLCシステム; ファルマシア社製) を用いて以下に記載する条件で行う:

20

カラム: DEAE - セファロース CL-6Bカラム (カラムサイズ 10 ml; ファルマシア製);

溶媒: 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0)

30

流速: 1 ml / 分;

溶出: 1M 塩化ナトリウムの直線濃度勾配 (0 - 50%、180分)。

溶出液を5mlずつ分画し、各分画中の抗ヒト・オキユロスパニン抗体価を、ヒト・オキユロスパニン蛋白質を用いたELISA法により検定する。まず、実施例3で調製するヒト・オキユロスパニン発現細胞より調製した膜画分溶液をELISA用96穴マイクロプレート中に100  $\mu$ l / ウェル入れ、37 $^{\circ}$ Cで1時間保温した後、この溶液を捨て、各ウェルをPBS - Tween 100  $\mu$ l / ウェルで3回洗浄する。次に2% ウシ血清アルブミンを含むPBS 100  $\mu$ l / ウェルを入れて37 $^{\circ}$ Cで1時間保温する。PBS - Tween 100  $\mu$ l / ウェルで3回洗浄した後に、各溶出分画 100  $\mu$ l を入れて37 $^{\circ}$ Cで1時間保温する。さらに、PBS - Tween 100  $\mu$ l / ウェルで3回洗浄した後に、PBS - Tweenで2000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体 (アマシャム社製) 100  $\mu$ l / ウェルを添加して37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させ、PBS - Tween 100  $\mu$ l / ウェルで3回洗浄する。次に西洋ワサビペルオキシダーゼ基質 (バイオラッド社製) 100  $\mu$ l / ウェルを入れて5分間静置した後、マイクロプレートリーダーで各ウェルの415 nmの吸光度を測定する。

40

## 【0195】

その結果、吸光度の大きかった分画を集め、抗体アフィニティー精製用カラム (ハイトラップ・プロテインGカラム、カラム体積 5 ml; ファルマシア社製) 2本に供与する。カラム内を25 ml / カラムの平衡化緩衝液 (20mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)) にて洗浄した後に、15 ml / カラムの溶出緩衝液 (0.1M グリシン -

50

塩酸 (pH 2.7) ) にて抗体を溶出する。それぞれの溶出液は、1.125 ml の 1 M トリス - 塩酸 (pH 9.0) を入れた試験管内に受け、溶出終了後ただちに遠心管型限外濾過器 (セントリプレップ 10 ; グレースジャパン (株) 製) の上部に入れて、3000 × g、4 で 2 時間遠心した。濾過器下部に回収された濾液を除去後、上部に 15 ml の PBS を加えて、再び 3000 × g、4 で 2 時間遠心する操作を 5 回繰り返す。ただし 5 回目の遠心は濾過器上部内の液量が 0.5 ml になるまで行い、この濾過器上部に残った液を抗ヒト・オキユロスパニン抗体試料とする。

【0196】

実施例 6 細胞傷害活性

生物活性の指標として、抗体依存性細胞傷害活性を測定する。

10

【0197】

ヒト・オキユロスパニン発現細胞 (実施例 3) をトリパンブルー染色法で計数後、10% ウシ胎児血清 (Morganell社製) を含む RPMI 1640 培地 (インビトロジェン社製、以下 RPMI 培地) で  $1 \times 10^6$  cells/ml に調製した。2.5 μl の bis (acetoxymethyl) 2, 2' : 6', 2'' - terpyridine - 6, 6'' - dicarboxylic acid (BATDA 標識試薬、パーキンエルマー社製) を添加後よく攪拌し、37、5% 二酸化炭素存在下 30 分間、途中 5 分間隔で転倒混和しながらインキュベートする。RPMI 培地 10 ml を添加して攪拌後 1500 rpm で 5 分間遠心分離し、この洗浄操作をさらに 2 回繰り返す。このようにして得られた BATDA 標識ヒト・オキユロスパニン発現細胞を RPMI 1640 培地 10 ml に再懸濁し、あらかじめ RPMI 1640 培地で 1 μg/ml に調製した精製マウス抗ヒト・オキユロスパニン抗体 もしくは ハイブリドーマ培養上清を添加して 4 に 30 分間静置した 96 穴丸底マイクロプレートに 50 μl ( $5 \times 10^3$  cells) ずつ播種して 4 でさらに 30 分間静置する。陰性コントロールウェルには精製マウス抗ヒト・オキユロスパニン抗体 もしくは ハイブリドーマ上清の代わりに RPMI 1640 培地を添加する。

20

【0198】

エフェクター細胞は以下のように調製する。あらかじめ 100 ng/ml のマクロファージコロニー刺激因子 (シグマ社製) 存在下で 3 日間培養した J774A.1 細胞 (大日本製薬) をトリパンブルー染色法で計数後、RPMI 培地で  $1 \times 10^6$  cells/ml に調製する。先の 96 穴丸底マイクロプレートに 100 μl ( $1 \times 10^5$  cells) ずつ播種してプレートを 1500 rpm で 5 分間遠心し、37、5% 二酸化炭素存在下 4 時間インキュベートする。陽性コントロールウェルには、BATDA 標識ヒト・オキユロスパニン発現細胞を完全に殺傷するためエフェクター細胞の代わりに 1% Trion X-100 を添加する。4 時間のインキュベート後、各ウェルから 20 μl の培養上清を採取して 96 穴白色プレートに移し、ユーロピウム溶液 (パーキンエルマー社製) 200 μl を添加する。室温で 15 分間振とう後、時間分解蛍光を測定する。

30

各ウェルの細胞死誘導率は以下の計算式より算出する。細胞死誘導率 (%) = (各テストウェルのカウント - 陰性コントロールウェルのカウント) / (陽性コントロールウェルのカウント - 陰性コントロールウェルのカウント) × 100

40

RPMI 1640 培地のみコントロールと比較し、精製マウス抗ヒト・オキユロスパニン抗体若しくはハイブリドーマ上清の添加により、ヒト・オキユロスパニン発現細胞への細胞死の誘導が認められる。

【0199】

実施例 7 免疫原及び抗体検出系抗原としてのヒト・オキユロスパニン発現細胞及びその膜画分の調製

a) プラスミド pEF-DEST51- NM\_031945 の構築

pENTR Directional TOPO Cloning Kits (インビトロジェン社製) を添付プロトコールに従って用い、実施例 2 a) によって得られた NM\_031945 cDNA を pENTR/D-TOPO ベクターにクローニングした。

50

NM\_031945 cDNAを、キット付属の反応バッファー中でTopoisomeraseを結合させてあるpENTR/D-TOPOベクターと混合し室温で30分間インキュベートした。得られた反応物を用いて大腸菌OneShot TOP10 Chemically Competent E. coli (インビトロジェン社製)を形質転換し、50 µg/mlのカナマイシンを含むLB寒天培地上で培養した。その結果カナマイシン耐性を示して生育してきた大腸菌コロニーを選択して、1mlの50 µg/mlのカナマイシンを含む液体TB培地中で37 °Cで一晩培養し、Montage Plasmid Miniprep<sub>96</sub> Kit (ミリポア社製)を利用することによりプラスミドDNAを単離精製した。得られたプラスミドDNAについて、BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kitをその添付プロトコールに従って用いることにより反応を行った後、ABI PRISM 3100 DNA Analyzer (アプライド・バイオシステムズ社製)によりヌクレオチド配列解析を行い、GenBank アクセッション番号 (ACC ESSION NO. NM\_031945 に示されるヌクレオチド配列のOpen Reading Frameを有するcDNA (配列表の配列番号1) が、pENTR/D-TOPOベクターに組み込まれていることを確認した。

10

## 【0200】

次に発現用ベクターpcDNA3.1/DEST40 (インビトロジェン社製)へGATEWAY<sup>TM</sup>システムを用いて遺伝子の乗せ替えを行った。すなわち、GATEWAY<sup>TM</sup> LR Clonase<sup>TM</sup> Enzyme Mix (インビトロジェン社製) 4 µl、LR Reaction Buffer 4 µl、pENTR/D-TOPO-NM\_031945 0.3 µg、pcDNA3.1/DEST40 0.3 µgをTEバッファーで20 µlに調製し、25 °Cで1時間反応させる。反応後、2 µlのProteinase Kを加え、37 °Cにて10分間反応させる。得られた反応物を用いて大腸菌OneShot TOP10 Chemically Competent E. coli (インビトロジェン社製)を形質転換し、50 µg/mlのアmpiシリンを含むLB寒天培地上で培養した。その結果アmpiシリン耐性を示して生育してきた大腸菌コロニーを選択して、100mlの50 µg/mlのアmpiシリンを含む液体LB培地中で37 °Cで一晩培養し、Plasmid MAXI Kit (QIAGEN社製)を利用することによりプラスミドDNA (pcDNA3.1-DEST40-NM\_031945)を単離精製した。

20

30

## 【0201】

同様に発現用ベクターpEF/DEST51 (インビトロジェン社製)へGATEWAY<sup>TM</sup>システムを用いて遺伝子の乗せ替えを行った。すなわち、GATEWAY<sup>TM</sup> LR Clonase<sup>TM</sup> Enzyme Mix (インビトロジェン社製) 4 µl、LR Reaction Buffer 4 µl、pENTR/D-TOPO-NM\_031945 0.3 µg、pEF/DEST51 0.3 µgをTEバッファーで20 µlに調製し、25 °Cで1時間反応させる。反応後、2 µlのProteinase Kを加え、37 °Cにて10分間反応させる。得られた反応物を用いて大腸菌OneShot TOP10 Chemically Competent E. coli (インビトロジェン社製)を形質転換し、50 µg/mlのアmpiシリンを含むLB寒天培地上で培養した。その結果アmpiシリン耐性を示して生育してきた大腸菌コロニーを選択して、100mlの50 µg/mlのアmpiシリンを含む液体LB培地中で37 °Cで一晩培養し、Plasmid MAXI Kit (QIAGEN社製)を利用することによりプラスミドDNA (pEF-DEST51- NM\_031945)を単離精製した。

40

## 【0202】

b) プラスミドpEF-DEST51- NM\_031945のBALB-3T3細胞及び293T細胞へのトランスフェクション

BALB-3T3細胞 (理研clone A31) を、10% ウシ血清 (GIBCO製) (以下「BS」という) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (以下「DMEM」という: SIGMA社製) を入れた細胞培養用150mmDish (培養面積148 cm<sup>2</sup>; IWAKI社製) 330枚中でセミコンフ

50

ルエントになるまで37、5%炭酸ガス下で培養した後、pEF-DEST51-NM\_031945をBALB-3T3細胞にトランスフェクションした。BALB-3T3細胞へのトランスフェクションは(株)Gene Therapy Systems製のGeneporter<sup>TM</sup> 2 Transfection Reagentを用いてリポフェクションにより行った。すなわち、細胞を無血清培地(DMEM)で一度洗浄したのち、20mlの無血清培地(DMEM)を加えた。次に50mlファルコンチューブ中にNew DNA Diluentを0.6mlと、上記方法にて回収したプラスミドDNA(pEF-DEST51-NM\_031945)24μgを加え、混合した。別の50mlファルコンチューブ中に無血清培地(Opti-MEM I;GIBCO社製)0.35 mlと、Geneporter<sup>TM</sup> 2 Reagent 84μlを加え、混合した。DNA溶液とGeneporter<sup>TM</sup> 2溶液を混合し、室温にて20分間放置した。その後、DNA-Geneporter<sup>TM</sup> 2混合液を細胞に加え(1ml/dish)、37、5%CO<sub>2</sub>下で培養した。3時間後10%ウシ血清を含むDMEM 20ml/dishに培地交換して、37、5%CO<sub>2</sub>下で一晩培養した。

10

#### 【0203】

また、プラスミドpEF-DEST51-NM\_031945を293T細胞に以下のように導入した。293T細胞への導入は、LIPOFECTAMINE 2000試薬(Invitrogen社)を用いて行った。293T細胞を2.5×10<sup>5</sup>個/9.2cm<sup>2</sup>の密度でまき込み、37、5%炭酸ガス下で一晩培養した。5mlポリプロピレン製チューブで、10μlのLIPOFECTAMINE 2000試薬と250μlのOPTI-MEM I Reduced-Serum Medium(Invitrogen社)を混合し、室温で5分間反応させた。別の5mlポリプロピレン製チューブで、4μgのプラスミドpEF-DEST51-NM\_031945と250μlのOPTI-MEM I Reduced-Serum Mediumを混合した。LIPOFECTAMINE溶液とDNA溶液を混合し、室温で20分間反応させた。一晩培養した293T細胞の培養上清を除き、2ml/9.2cm<sup>2</sup>の割合で抗生物質が入っていない10%ウシ胎児血清(Moregate社)を含むダルベッコ変法イーグル培地(GIBCO社)を添加した。LIPOFECTAMINE DNA混合液を293T細胞へ添加し、37、5%炭酸ガス下で2日間晩培養した。

20

#### 【0204】

##### c) 細胞膜画分の調製(10L分)

上記の方法にて培養した細胞をPBS(-)緩衝液(大日本製薬(株)製)で洗浄した。セルスクレーパー(IWAKI社製)を用いて細胞を回収し、5mM Trisバッファー pH7.4 230mlに懸濁した。4にて30分間細胞溶液を放置した。Dounce Type B ホモジェナイザー(50ストローク)にて細胞を破碎した。1000Gで10分間、遠心分離機(KUBOTA製)にて遠心し、上清を回収した。

30

#### 【0205】

上清を78000G 100分間、超遠心分離機(BECKMAN製)にて遠心し、沈殿を回収した。沈殿に57%スクロース in Tris Bufferを14ml加え、重層し、78000G、16時間、4でショ糖密度勾配にて遠心し、上層の膜画分を回収した。膜画分に5mM Trisバッファー pH7.4 55mlを加え、78000G、60分、4で遠心し、沈殿を回収した。沈殿に5mM Trisバッファー pH7.4 1500μlを加え、Dounce Type B ホモジェナイザー(10ストローク)にて細胞溶液を均一化した。発現確認の項で述べたウエスタンブロットティング法により、細胞膜画分を同定した。

40

#### 【0206】

##### 実施例8 マウスの免疫及び細胞融合

##### a) 免疫

実施例7で得られたヒト・オキユロスパニン遺伝子発現細胞1×10<sup>7</sup>cellを5週令のBALB/cマウス雌(日本エスエルシーより購入)腹腔内に投与した。2,4,6,8週間後、同様のヒト・オキユロスパニン遺伝子発現細胞(1×10<sup>7</sup>cell/マウス)を腹腔内に投与し追

50

加免疫した。

【0207】

b) 細胞融合

追加免疫4日後のマウスより脾臓を摘出し、これを10mM HEPES緩衝液(pH7.4)、0.02mg/ml 炭酸水素ナトリウム、300µg/ml L-グルタミン酸を含む無血清MEM培地(イーグルMEM培地「ニッスイ」(1):日水製薬(株)社製9.4g/L)(以下「無血清MEM培地」という)10ml中に入れ、21G'の注射針とピンセットを使い脾臓細胞を掻き出した。この細胞懸濁液を遠心して脾臓細胞を沈澱させた後、この脾臓細胞を無血清MEM培地で2回洗浄してから、無血清MEM培地に懸濁して細胞数を測定した。

【0208】

一方、15% FBS(GIBCO社製)、306µg/mlグルタミン酸、0.05mM -メルカプトエタノールを含むミエローマ増殖培地(以下「ME培地」という)にて、37℃、7%炭酸ガス存在下で細胞濃度が $1 \times 10^6$ 細胞/mlを越えないように培養したミエローマ細胞SP2/0を同様に無血清MEM培地で洗浄し、無血清MEM培地に懸濁して細胞数を測定した。

【0209】

脾臓細胞の1/5個相当のSP2/0細胞懸濁液と、全脾臓細胞懸濁液を混合し、遠心後、上清を完全に除去した。以下の細胞融合の操作は、ペレットの入ったプラスチック遠沈管を室温で実施した。このペレットに、40%(w/v)ポリエチレングリコール4000(Merck社製)1mlを、遠心管を振りながらゆっくり添加した後、予め37℃に加温しておいた無血清MEM培地9mlを3回に分けてゆっくり添加した。遠心後、上清を除去し、20% FBSを含むヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン培地(以下「HAT培地」という;SIGMA社製) $2.5 \times 10^6$ cells/mlになるように、ピペットの先でゆっくり攪拌しながら添加した。細胞培養用96穴マイクロプレートに100µl/ウェルずつ分注し、37℃、7%炭酸ガス下で培養した。1日後、HAT培地を全wellに100µl添加し、その後も2、3日毎に交換した。このようにして得られた融合細胞を、以下に記載する限界希釈法によるスクリーニングに供した。

【0210】

c) 限界希釈

上記b)で得られた融合細胞を含む培養液を、HT培地(2<sup>nd</sup> cloning以降はHY培地)で細胞の密度が1cell/well(10cells/ml)、5 cells/well(50cells/ml)となるように段階希釈した。こうして調整した各試料をあらかじめ100µlのHY培地を各wellに分注しておいた96wellプレートに、100µl/wellずつ分注し、37℃、7%炭酸ガス下で10日間培養した。

【0211】

d) 選別

d-1) E L I S A

実施例7で取得した細胞膜画分を1µg/mlで50µl/wellずつ96穴EIAプレート(COSTAR社製)へ分注した。1日間4度で放置後、プレート内の抗原液をよく振り捨て、PBS(-)に1%BSAを添加した溶液を80µl/well添加し、プレートシールをし、使用時まで4℃で保存した。使用時に室温に戻し、0.1% Tween20入りPBS(PBS-T)を通したSerawasher(Bio-Tec社製)でプレートを3回洗浄した。一次抗体として細胞融合後10-12日経過した細胞培養上清50µlを加え、室温で一時間静置した。一次抗体反応終了後、PBS-Tで3回洗浄し、PBS-Tに0.5%BSAを添加した溶液(抗体希釈液)で5000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗マウスIgG抗体(BIO SOURCE社製)を50µl/wellずつ添加し、室温で一時間静置した。二次抗体反応終了後、室温に戻したアルカリホスファターゼ用発色基質p-ニトロフェニルリン酸2Na6H<sub>2</sub>O(pNPP、和光純薬工業社製)を1mg/ml濃度でpNPPBuffer(97ml/lジエタノールアミン、0.1g/l MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O PH9.8)に溶解し、100µl/well加えた。プレートリーダー(ナルジェンクインターナショナル社製)で405nm、630nmの吸光度を測定した。

【0212】

d-2) フローサイトメーター

実施例7で取得したHEK293培養細胞を、10% FBSを含むDMEM培地中で、37℃、

10

20

30

40

50

5%炭酸ガス下で培養し増殖させ、トランスフェクション後24時間培養してから、 $2 \times 10^7$ 細胞/mlに調製した細胞懸濁液を、V字底96穴マイクロプレート(Corning社製)に50 $\mu$ l/ウェルずつ分注し、遠心分離(1000 $\times$ g、20、5分)した。上清を除去し、上記c)で培養する融合細胞の培養上清を50 $\mu$ l/ウェル加えて攪拌した後、氷上で0.75時間静置してから、遠心分離(1000 $\times$ g、20、5分)して上清を除去した。ペレットを150 $\mu$ l/ウェルのフローサイトメトリー用緩衝液(5% FBSを含むMEM)で2回洗浄した後、33倍希釈したフルオレッセイン-5-イソチオシアネート(Fluorescein-5-isothiocyanate; 以下「FITC」という)標識ウサギ抗マウスIgG抗体IgG画分(和光純薬工業社製)100 $\mu$ lを二次抗体として加え、氷上で0.75時間静置した。遠心分離(1000 $\times$ g、20、5分)して上清を除去してから、ペレットをフローサイトメトリー用緩衝液150 $\mu$ l/ウェルで2回洗浄し、ペレットをフローサイトメトリー用緩衝液500 $\mu$ l/ウェルに懸濁したものをフローサイトメトリー用試料とした。各試料中の細胞のFITC蛍光強度をフローサイトメーター(FC500; BECKMAN社製)で測定した(励起波長: 488nm、検出波長: 530nm)。その結果、融合細胞培養上清を添加しなかったHEK293 transient発現細胞よりも高値のFITC蛍光強度を示した試料に対応する融合細胞を選別した。

10

## 【0213】

## e) クローニング

上記d)で選別される細胞群について、上記c)からd)の一連の工程を2回繰り返すことにより、HEK293 transient発現細胞と結合するが抗ヒト・オキユロスパニン発現プラスミド導入前の細胞と結合しない単一の抗体を産生するハイブリドーマを数クローン得た。このようにしてクローニングされたハイブリドーマ株のひとつは、O3B8-2C9-4F3と命名され、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに2004年2月17日付けで、寄託番号FERM BP-08627として寄託されている。

20

## 【0214】

## 実施例9 抗ヒト・オキユロスパニンモノクローナル抗体の精製

実施例8で作製されたマウス-マウスハイブリドーマを、 $1 \times 10^6$  cells/mlとなるようHY培地に懸濁し、37、7% CO<sub>2</sub>下で3日間静置した。こうして得られた培養液を遠心分離(1600rpm、5min)し、上清を回収してIgGの粗精製を以下の条件で行った。

結合バッファー: pH7.0 (20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O)

30

溶出バッファー: pH3.0 100mM グリシン-HCl

中和バッファー: pH9.0 1M Tris-HCl

ProteinG担体(Amersiam Biosciences社製を必要量分取し、エタノール除去後、超純水で2回wash、結合バッファーで1回wash後、結合バッファーを加えて、50%ゲルスラリーとした。ハイブリドーマ上清にProteinGゲルスラリーを加え、一昼夜4でrotate後、結合バッファーで3回洗浄した。洗浄後、溶出バッファーを加え、抗体を溶出させた。溶出液は溶出バッファーの1/10量の中和バッファーを入れたチューブ内に受けた。溶出液はサンプルチューブ型限外濾過器(amicon Ultrafree-MC: Millipore社製の上部に入れて、5000 $\times$ g、4、20分間で遠心し、濾過器下部に回収されたる液を除去しつつ、濾過器上部の液量が50 $\mu$ lを下回らないよう溶出液を添加した。溶出液を全て添加した後、PBS(-)を溶出液の3倍分のvolumeを加え、Buffer交換し、この濾過器上部に残った液を抗ヒト・オキユロスパニン抗体試料とした。

40

## 【0215】

## 実施例10 細胞傷害活性

生物活性の指標として、抗体依存性細胞傷害活性を測定した。実施例7で作製されたヒト・オキユロスパニン発現細胞をトリパンブルー染色法で計数後、10%ウシ胎児血清(Moregate社製)を含むRPMI 1640培地(インビトロジェン社製、以下RPMI培地)で $8 \times 10^5$  cells/0.4mlに調製した。Chromium-51(クロム酸ナトリウム、アマシャムバイオサイエンス社製)40 $\mu$ lを添加後、37、5%二酸化炭素存在下、2時間インキュベートした。RPMI培地8mlを添加して攪拌

50

後1500rpmで5分間遠心分離し、この洗浄操作をさらに2回繰り返した。このようにして得られたChromium-51標識ヒト・オキユロスパニン発現細胞をRPMI培地4mlに再懸濁し、あらかじめRPMI培地で5 $\mu$ g/mlに調製した精製マウス抗ヒト・オキユロスパニン抗体50 $\mu$ lを添加した96穴丸底マイクロプレートに50 $\mu$ l(1 $\times$ 10<sup>4</sup> cells)ずつ播種して4で30分間静置した。陰性コントロールウェルもしくはバックグラウンド測定用ウェルには精製マウス抗ヒト・オキユロスパニン抗体の代わりにRPMI培地を添加した。

【0216】

エフェクター細胞は以下のように調製した。すなわちBALB/c-nu/nuマウス(メス・7週齢)より定法に従って脾臓細胞を採取し、トリパンブルー染色法で計数後RPMI培地で1.5 $\times$ 10<sup>7</sup> cells/mlに調製した。先の96穴丸底マイクロプレートに100 $\mu$ l(1.5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells)ずつ播種してプレートを1500rpmで5分間遠心し、37、5%二酸化炭素存在下4時間インキュベートした。陽性コントロールウェルには、Chromium-51標識ヒト・オキユロスパニン発現細胞を完全に殺傷するためエフェクター細胞の代わりに2%TrionX-100を添加した。バックグラウンド測定用ウェルにはエフェクター細胞の代わりにRPMI培地を添加した。4時間のインキュベート後、各ウェルから50 $\mu$ lの培養上清を採取して96穴ルーマプレート(パーキンエルマー社製)に移した。50で一晩乾燥させ、各ウェルのChromium-51量をマイクロプレートシンチレーションカウンター(TopCount NTX、パーキンエルマー社製)で測定した。

【0217】

各ウェルの細胞死誘導率は以下の計算式より算出した。細胞死誘導率(%)=(各テストウェルのカウント-バックグラウンド測定用ウェルのカウント)/(陽性コントロールウェルのカウント-バックグラウンド測定用ウェルのカウント) $\times$ 100

陰性コントロールと比較し、精製マウス抗ヒト・オキユロスパニン抗体の添加により、ヒト・オキユロスパニン発現細胞への細胞死の誘導が認められた(図5)。

【図面の簡単な説明】

【0218】

【図1】上：各種細胞株内でのヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量を示す図。下：健常人皮膚サンプルとメラノーマサンプルにおけるヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量を示す図。

【図2】上：健常人皮膚サンプルと皮膚組織由来メラノーマサンプルにおけるヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量を示す図。下：健常人皮膚サンプルとリンパ節組織由来メラノーマサンプルにおけるヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量を示す図。

【図3】健常人リンパ節由来サンプルとリンパ節組織由来メラノーマサンプルにおけるヒト・オキユロスパニン遺伝子の発現量を示す図。

【図4】ヒト・オキユロスパニン遺伝子産物のNIH3T3細胞での発現を示す図。

【図5】ヒト・オキユロスパニン発現細胞を用いた抗ヒト・オキユロスパニン抗体による抗体依存性細胞傷害活性を示す図。

【配列表フリーテキスト】

【0219】

配列番号5：ヒト・オキユロスパニン増幅用PCRセンスプライマー

10

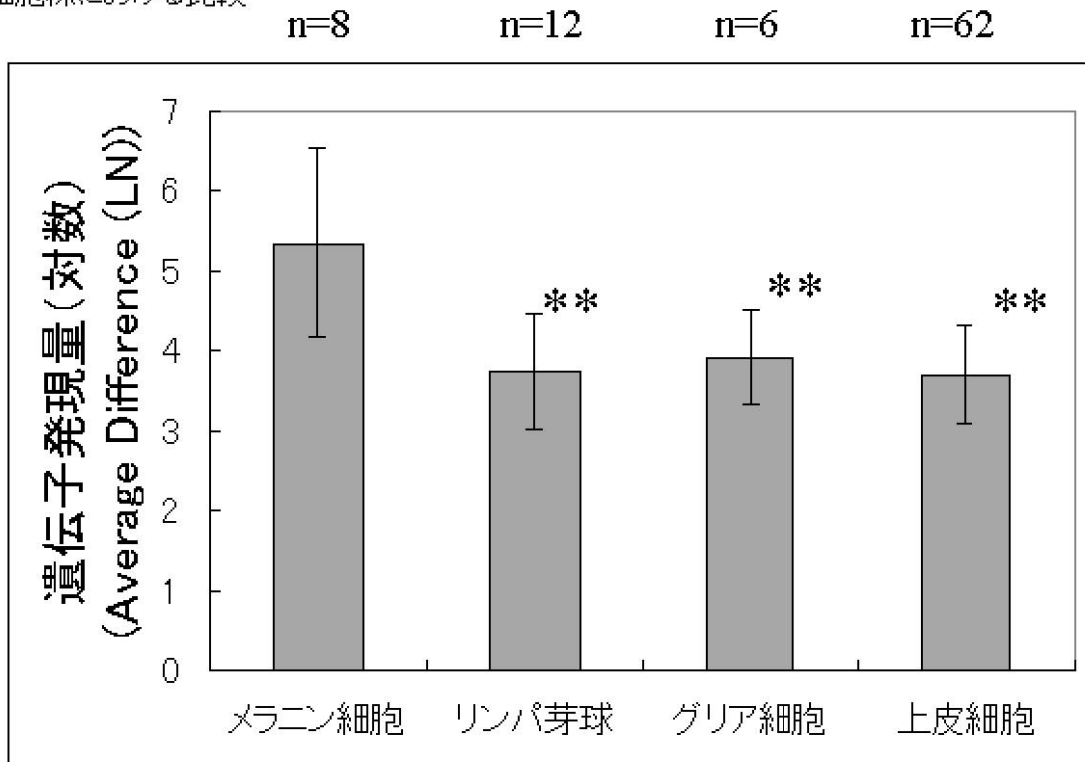
20

30

40

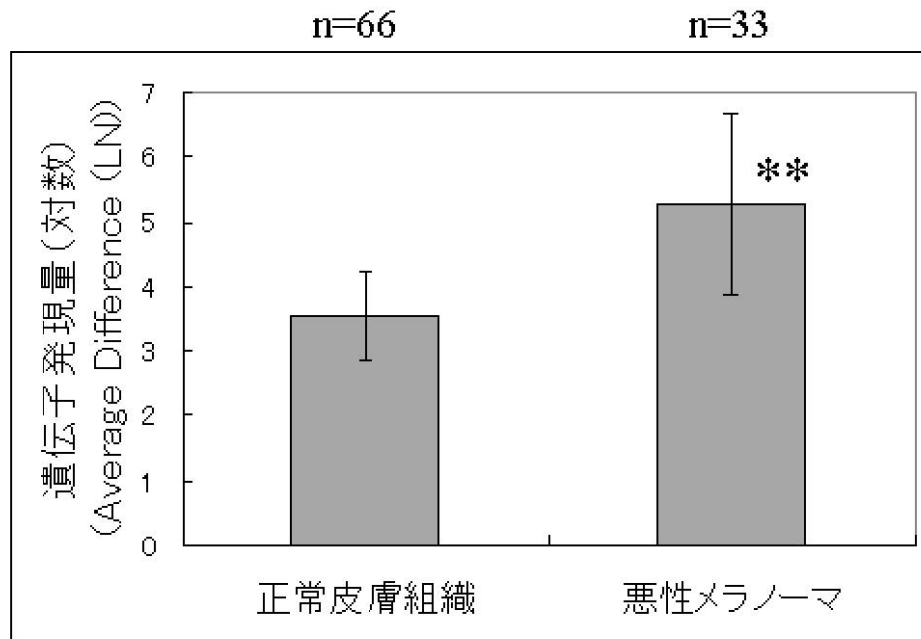
【図1】

細胞株における比較



正常皮膚組織と悪性メラノーマの比較

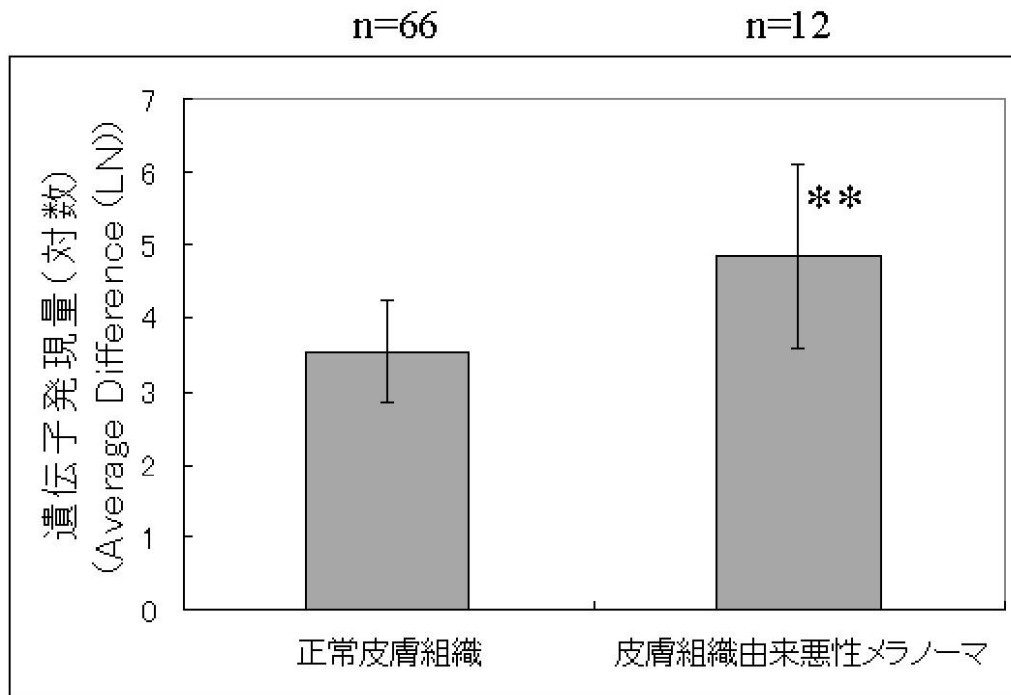
\*\**p*<0.001



\*\**p*<0.001

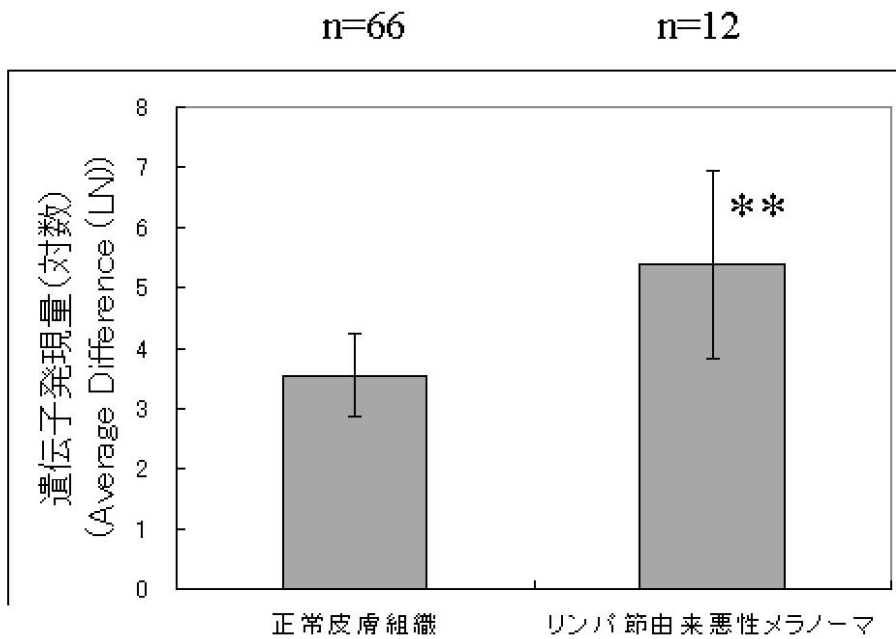
【図2】

正常皮膚組織と皮膚組織由来悪性メラノーマの比較



\*\**p* < 0.001

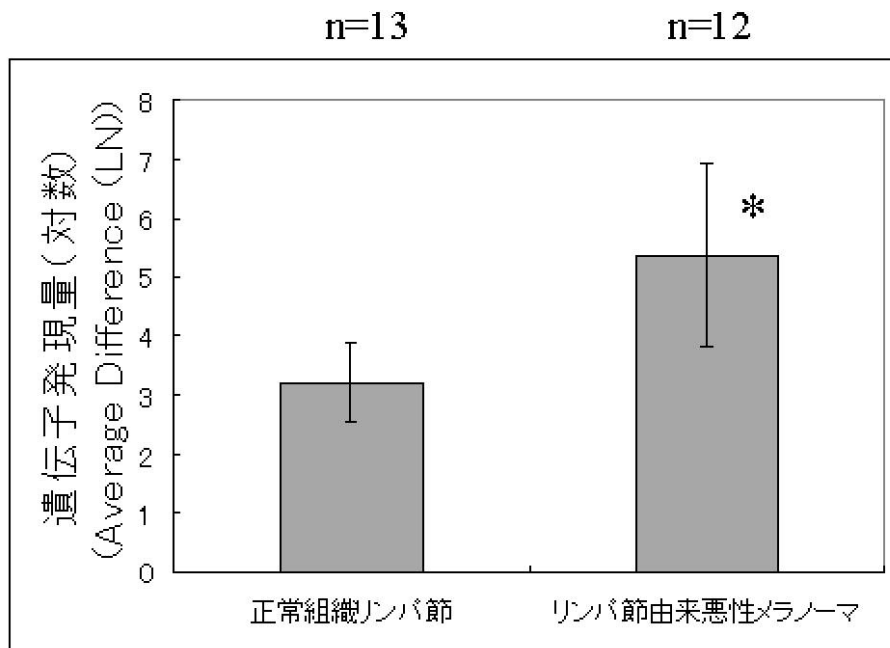
正常皮膚組織とリンパ節由来悪性メラノーマの比較



\*\**p* < 0.001

【図3】

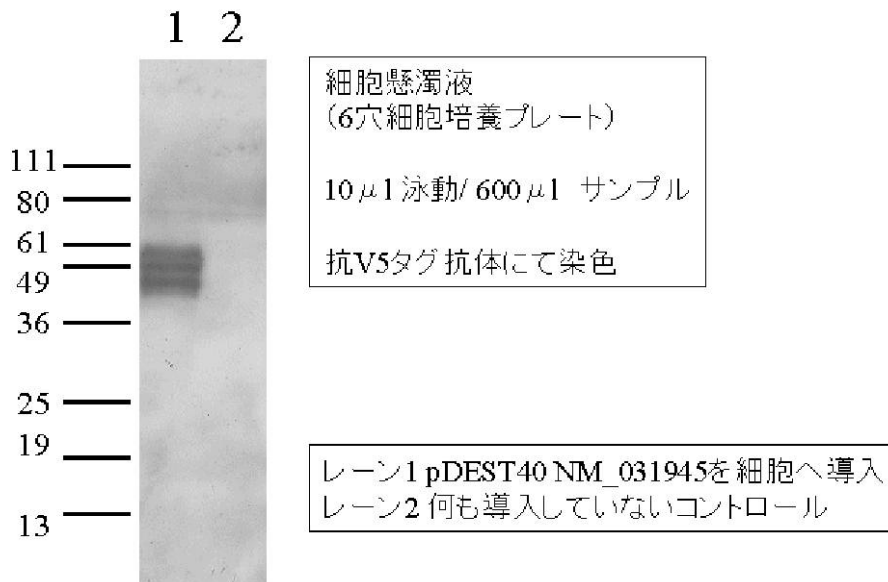
正常組織リンパ節とリンパ節由来悪性メラノーマの比較



\*:  $p < 0.01$

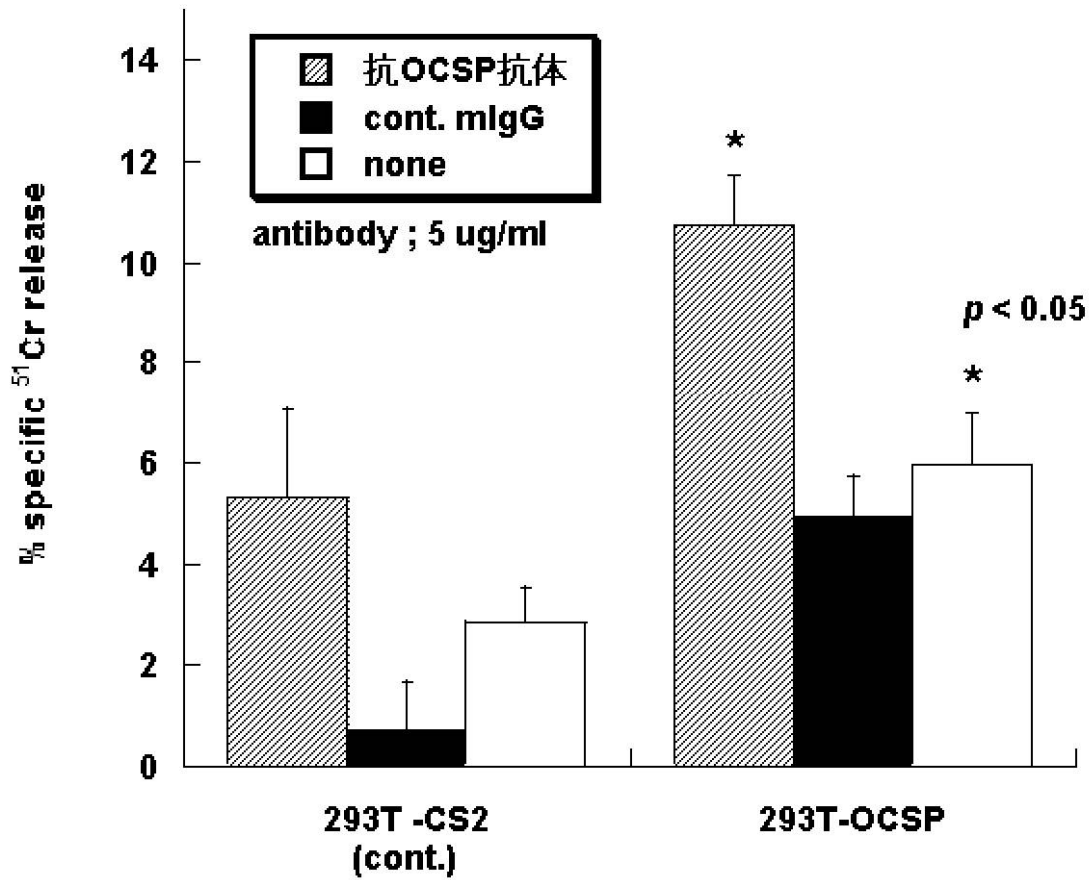
【図4】

NIH3T3細胞株での NM\_031945 遺伝子の発現



【 図 5 】

### ADCC activity of anti-OCSP antibody



【 配列表 】

[0004462964000001.app](#)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<b>G 0 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	D
<b>G 0 1 N 33/574</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/574	Z
<b>G 0 1 N 37/00</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 37/00	1 0 2
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
		A 6 1 P 35/00	

- (74)代理人 100164460  
弁理士 児玉 博宣
- (74)代理人 100119622  
弁理士 金原 玲子
- (72)発明者 市川 公久  
東京都品川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 三共株式会社内
- (72)発明者 高橋 秀  
東京都品川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 三共株式会社内
- (72)発明者 我妻 利紀  
東京都品川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 三共株式会社内
- (72)発明者 福地 圭介  
東京都品川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 三共株式会社内
- (72)発明者 平井 岳大  
東京都品川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 三共株式会社内

審査官 光本 美奈子

- (56)参考文献 Molecular Vision, vol.8, p.205-220 (2002)  
Database GenBank, Accession no.AAG42857, 28-Dec-2000 uploaded, U R L , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?11993702:0LD03:1969974>  
今堀和友、山川民夫監修, 「生化学辞典」, 日本, 株式会社東京化学同人, 1998年10月8日, 第3版, p.513,1319  
多田富雄監訳, 「免疫学イラストレイテッド」, 日本, 株式会社南江堂, 2000年2月10日, 原書第5版, p.9,20,319  
大沼利明、小山次郎、奥田研爾、矢田純一編集, 「免疫学辞典」, 日本, 株式会社東京化学同人, 2001年12月3日, 第2版, p.243  
Joseph Sambrook and David W. Russel, 「Molecular Cloning」, 米国, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001年, THIRD EDITION, 10.4

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 9  
C 0 7 K 1 6 / 2 8  
C 0 7 K 1 6 / 3 0  
C 1 2 N 1 5 / 0 2  
C 1 2 Q 1 / 6 8  
G 0 1 N 3 3 / 5 3  
G 0 1 N 3 3 / 5 7 4  
G 0 1 N 3 7 / 0 0  
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 P 3 5 / 0 0  
C 1 2 P 2 1 / 0 8  
S w i s s P r o t / P I R / G e n e S e q  
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q  
W P I ( D I A L O G )  
B I O S I S / W P I ( D I A L O G )  
P u b M e d

专利名称(译)	针对癌症特异性抗原的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP4462964B2</a>	公开(公告)日	2010-05-12
申请号	JP2004063301	申请日	2004-03-08
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社三共		
申请(专利权)人(译)	三共株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	第一三共株式会社		
[标]发明人	市川公久 高橋秀 我妻利紀 福地圭介 平井岳大		
发明人	市川 公久 高橋 秀 我妻 利紀 福地 圭介 平井 岳大		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/02 C07K16/28 C07K16/30 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/574 G01N37/00 C12P21/08 A61K39/395 A61P35/00 A61K31/7088 A61K48/00 A61P17/00 A61P43/00 C07K16/32 C07K16/42 C12M1/00 C12N15/12		
CPC分类号	A61P17/00 C07K16/30 C07K2317/732 C12Q1/6886 C12Q2600/136 C12Q2600/158		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.C C07K16/28 C07K16/30 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/574.Z G01N37/00.102 C12P21/08 A61K39/395.T A61K39/395.Y A61P35/00 A61K31/7088 A61K48/00 A61P43/00.111 C07K16/32 C07K16/42 C12M1/00.A C12N15/00.A C12N15/00.F C12N15/00.AZN.A C12N15/09.200 C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029 /BB20 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA19 4B063/QQ52 4B063/QR66 4B063/QS16 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4C084 /AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA35 4C084/CA53 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA28 4C084/MA31 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084 /MA57 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB022 4C084 /ZB262 4C084/ZC412 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA33 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/BB36 4C085/CC02 4C085/CC32 4C085/DD86 4C085/DD88 4C085/FF02 4C085/FF03 4C085/FF20 4C085 /GG03 4C085/GG04 4C085/GG08 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA17 4C086/MA22 4C086/MA23 4C086/MA28 4C086/MA31 4C086/MA44 4C086 /NA14 4C086/ZB02 4C086/ZB26 4C086/ZC41 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72		
代理人(译)	石桥 公树 矢口俊明 竹元利泰		
优先权	2003063648 2003-03-10 JP		
其他公开文献	JP2004290187A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供使用致癌基因的癌症检测方法，具有癌症治疗和/或预防效果的化合物的筛选方法，以及用于癌症治疗和/或预防的药物组合物。 解决方案：本发明涉及使用人oculospanin基因的表达作为指示剂检测癌症的方法，以及提供含有特异性识别人oculospanin并具有针对癌细胞的细胞毒活性的抗体的药物组合物。 【选择图】无

