

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 352977

(P2001 - 352977A)

(43)公開日 平成13年12月25日(2001.12.25)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/02		C 0 7 K 16/18	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/18		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/08		G 0 1 N 33/53	Y 4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/02			D

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 11数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 176187(P2000 - 176187)

(22)出願日 平成12年6月12日(2000.6.12)

(71)出願人 000253503

麒麟麦酒株式会社

東京都中央区新川二丁目10番1号

(72)発明者 渡会 浩志

群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社
社医薬探索研究所内

(72)発明者 山口 泰範

群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社
社医薬探索研究所内

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 樹状細胞 (D C) 膜分子 S i g l e c - 9 に対する抗体、並びにそれを用いた D C 検出法及び D C 分離法

(57)【要約】

【課題】 樹状細胞 (D C) の検出及び分離法、並びにそのための抗体を提供する。

【解決手段】 D C に特異的に発現し、かつ D C の成熟化に伴い発現が上昇する該細胞の膜分子 S i g l e c - 9 を特異的に認識する抗体、並びにその抗体を用いて D C を検出、分離する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 樹状細胞(DC)を特異的に認識すること、T細胞、B細胞、単球、ナチュラルキラー細胞及び顆粒球を認識しないこと、並びにSiglec-9タンパク質又はその断片と特異的に免疫結合することを特徴とする抗体。

【請求項2】 成熟DCを特異的に認識することを特徴とする、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】 前記抗体が、Siglec-9のアミノ酸配列(配列番号1)中、以下の位置の配列42~65、57~79、112~137、175~194、273~294、298~319、及び403~419からなるペプチドを認識する、請求項1または2に記載の抗体。

【請求項4】 ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体である、請求項1、2または3に記載の抗体。

【請求項5】 請求項1~4のいずれかに記載の抗体を用いてDCを分離する方法。

【請求項6】 成熟DCを分離することを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 請求項1~4のいずれかに記載の抗体を用いてDCを検出する方法。

【請求項8】 成熟DCを検出することを特徴とする、請求項7に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト樹状細胞(Dendritic Cell=DC)に発現する膜分子Siglec-9に対する抗体、並びにそれを用いたDC検出法及びDC分離法に関する。

【0002】

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

【0003】これまでの生物学的研究成果から、ヒト単球(Monocyte; Moともいう)をGM-CSF及びIL-4存在下で培養することによりDC(monocyte-derived DC; mo-DCともいう)を誘導することが可能であることが明らかとなっている[ジャーナル・オブ・リュウコサイト・バイオロジー、59巻、208-218頁(1996年)]。このin vitro分化誘導系は人工的な部分があるものの、実際にDCとしての機能を有することが明らかとなってきた。DCの重要な機能は、抗原の細胞内への取り込み作用(食作用)及びその抗原の情報をT細胞に伝えてT細胞を刺激活性化することである。また、DCは分化の段階によって未成熟DC

(Immature DC)と成熟DC(Mature DC)の二つに分別することができる。未成熟DC内に取りこまれた抗原は細胞内でプロセッシングを受け、抗原由来のペプチドとしてDC表面のMHCクラスII分子上に提示される。CD4陽性の抗原特異的ヘルパーT細胞は、抗原受容体で抗原由来のペプチドとMHCクラスII分子の複合体を認識し、共刺激分子からの刺激なども加わり、感作、活性化される。また、DCによりMHCクラスI分子を介してCD8陽性細胞傷害性T細胞(CTL)も刺激、活性化される。食作用は未成熟mo-DCで強く、成熟mo-DCでは弱くなる。T細胞への抗原提示能は、それに関与するCD40、CD80、CD86、MHCクラスI分子、MHCクラスII分子の発現の程度と一致して、未成熟mo-DCでは弱く、成熟mo-DCになると強くなる。

【0004】ところで、抗原取込能から抗原提示能という機能変化に伴って細胞表面上に提示される膜分子の変化が起こることは想像に難くないが、この成熟化(maturation)の過程でどのような事象が起こっているかを考えた場合に、細胞膜表面上に新たに発現した分子の発現はすべてmRNAの発現から起こるとは限らないという事実が存在する。例えば未熟な(Immature)段階から発現が見られるHLA-DRが成熟化に伴ってmRNA及びタンパク質の発現量の変化をほとんど伴わずに細胞内から細胞膜表面上に移動(translocation)するということが知られている。また、実際のmRNAの発現量とタンパク質の発現量を比較した場合にほとんど相関がない場合や、mRNAは発現しているのにタンパク質として翻訳されていない場合も存在する[バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション、231巻、1-6頁(1997年)]。これまで遺伝子側からは増幅可能なこと、大量に解析することが可能なこと、ハンドリングが容易なこと、数々の手法が編み出せることなどから精力的に解析がなされてきたが、実際に発現しているタンパク質の変化を追うことができれば、そのような変化は細胞内の事象をよりよく反映しており現実に近いものということができるというのも事実である。

【0005】DCに関しては、上述の知見に加えて、DCにいくつかのサブセットが存在することも明らかになっているが、そのようなサブセットは成熟、未成熟で機能が異なることが知られている。しかしサブセット間でのそのような機能の違いが何に起因するのか、その答えは得られていない。少なくとも細胞内シグナリングに関与すると考えられる膜分子、特にDCの成熟化に伴って発現する膜分子、の解明が待たれるところである。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、DCの機能発現に重要となるDCの成熟化に着目し、DCの成熟によって発現が上昇する膜分子の同定を中心とした探索研究を、ProteomicsによるDCの成熟により発現が調節される膜分子の網羅的同定を基に実施してきた。Proteomi

csとは、タンパク質について、遺伝子のGenomicsに対応した言葉であり、タンパク質の大規模研究を行うものである。タンパク質の発現量、翻訳後の修飾や相互作用などの性質を研究し、例えば正常細胞とがん細胞において発現タンパク質レベルで何が起きているか、細胞ネットワークやプロセスなどの全体的な生物学的情報を得るものである。

【0007】DCに特異的に存在する膜分子が同定されるならば、該膜分子に対する抗体の作製や、医療分野での該抗体の利用が可能となるだろう。本発明の目的は、DC 10 特異的に発現される膜分子を見出し、DCを特異的に認識する抗体を作製し、提供することである。

【0008】また、DC特異的に発現されるだけでなく、DCの成熟化に伴って発現が上昇する膜分子を見出し、成熟DCを特異的に認識する抗体を作成し提供することである。本発明の別の目的は、DCを特異的に認識する抗体を使用してDCを分離する方法、および検出する方法を提供することである。また、別の目的は、成熟DCを特異的に認識する抗体を使用して成熟DCを分離する方法、および検出する方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、DCの成熟により発現が調節される膜分子を探索研究した結果、未成熟 DCおよび成熟DCの両方からUnigeneのひとつである膜分子(Siglec-9)を同定し、この分子がDCの成熟に伴い、そのタンパク質レベルでの発現が3倍程度上昇すること、および各種血球系細胞の中でDC特異的に発現が見られる分子であることを今回見出した。この膜分子は既知のSiglec (Sialic acid binding immunoglobulin-like lectin) ファミリーに属する分子(Siglec1~Siglec8)と高いホモロジーを有しており、immunoglobulin tyrosin-based inhibitory motif (ITIM)を有していることからSiglec-9と命名された。

【0010】Siglec-9は元々、その染色体配列情報が、OB-binding protein like proteinとしてカナダのグループにより報告されていることが判明した(Yousef, GeorgeM.等; Anticancer Res.(1999), 19(4B), 2843-2852)。その後、同グループにより、Siglec ファミリーに属する新しい分子として同定され、463個のアミノ酸からなる全アミノ酸配列が決定されている(2000年3月24日付でGenBankに登録)。このアミノ酸配列は本発明者らが同定したものと完全に一致することがわかったが、上記グループはSiglec-9の血球系細胞における発現特異性やDCの成熟に伴う発現の上昇について一切報告していない。

【0011】また、抗体を用いてSiglec-9が単球/顆粒球に発現しているとの報告がなされている[NCBI: Pubmed ID 10801860及び10801862]が、Siglec ファミリーに属する分子は互いにホモロジーが高いことから、この抗体がSiglec-9のみを特異的に検出しているのかどうか 50

微妙である。いずれにしてもDCにおける発現についての言及は一切ない。

【0012】因みに、Siglec ファミリーとしてこれまでに報告されている8つの分子(Siglec-1~Siglec8)は以下に示す通り、ほとんどが血球系細胞特異的に発現しており、ITIMを有し、機能抑制性シグナルを入れる分子である可能性が示唆されている。

【0013】・Siglec-1(Sialoadhesin)はマクロファージ特異的である(1994年)。

・Siglec-2(CD22)は成熟B細胞特異的であり(1993年)、またリガンドはCD45R0(T細胞)/CD75(B細胞)である。

・Siglec-3(CD33)は骨髄前駆細胞特異的である(1995年)。

・Siglec-5は単球と成熟好中球特異的である(1998年)。

・Siglec-6(CD33L)はB細胞特異的である(1999年)。

・Siglec-7は単球とナチュラルキラー(NK)細胞特異的である(1999年)。

・Siglec-8は好酸球特異的である(2000年)。

【0014】しかしながら、ITIMの意義やそのシグナル伝達への関与などについてはCD22を除いて詳細が不明である。CD22はB細胞の活性化の負の調節因子として知られている(イムニティー、6巻、509-517頁(1997年))。ITIMは免疫抑制に関与する可能性が示唆されているが、しかしITIMをもつというだけでは、Siglec分子に対する抗体やSiglec分子の可溶化型分子が、免疫応答の制御効果を有するのか否か、またどのような免疫応答の制御効果を持つのかどうかは明らかではなく、実際にそのような抗体や可溶化型分子を作製して免疫応答制御を確認してはじめて明らかになることである。

【0015】最近の研究成果から1) DCは不均一な細胞集団でありいくつかのサブセットが存在すること[ステム・セルズ、15巻、409-419頁(1997年)]、2) DCサブセットはT細胞活性化において異なる機能(アポトーシス誘導、T細胞のTh1, Th2への分化誘導など)を持つこと[サイエンス、283巻、1183-1186頁(1999年)]、3) DCを介して免疫応答を制御することが可能であること(DC療法、DC特異的な薬剤、抗体、サイトカインなど)、が明らかになってきた。

【0016】ヒトDCサブセットとしては大別して、ミエロイド系DCとリンパ球系DCとがある。ミエロイド系DCには2つの分化経路が存在することが示されており[ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディシン、184巻、695-706頁(1996年)]、CD34陽性の造血幹細胞をGM-CSFとTNF-aで培養する系ではCD14陽性CD1a陰性およびCD14陰性CD1a陽性の前駆細胞が出現し、前者からは真皮(dermal) DC、後者からは表皮ランゲルハンス細胞に分化することが知られている。本発明者らが用いたmo-DCは生体内では前者由来のDCと類似しており、ミエロイド系DCに属すると考えられている。一方、ヒトリンパ球系DCは、形質細胞様のCD4陽性T細胞がIL-3存在下で未熟

なDC (CD11c陰性、CD14陰性)へと分化し、IL-3とCD40リガンドの刺激により樹状細胞DCとして機能的に成熟することが知られている [ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディスン、185巻、1101-1111頁 (1997年)]。また、mo-DCはCD40リガンドあるいはエンドトキシンによる刺激によりナイーブT細胞をTh1に分化・誘導する機能を有する所謂DC1に分化するという報告がある [サイエンス、283巻、1183-1186頁 (1999年)]。このように本発明者らが用いたmo-DCは少なくともDC1に分化し得る一群であることがわかる。また、末梢血には少なくとも2つのDCサブセットが存在しており、系統マーカー (CD3、CD19、CD56、CD14) 陰性、HLA-DR陽性、CD11c陽性と系統マーカー (CD3、CD19、CD56、CD14) 陰性、HLA-DR陽性、CD11c陰性、CD123強陽性の表現型を示す。それらDCは成熟後、前者はDC1、後者はナイーブT細胞をTh2に分化・誘導する機能を有する所謂DC2であることが知られており [ブラッド、95巻、2484-2490頁 (2000年)]、本発明者らはSiglec-9が末梢血中ではこれら両方のDCサブセットに特異的に発現していることを今回見出した。

【0017】このように、Siglec-9は末梢血中でDC特異的に発現されるタンパク質であること、またmo-DCの成熟化に伴い発現が上昇していることなどの知見から、Siglec-9はDCの機能に関連した分子であることが考えられ、免疫応答を制御するための標的分子としても期待される。

【0018】一方、抗原をパルスした自己の末梢血DCを用いた癌ワクチンのパイロットスタディも行なわれており [ネイチャー・メディスン、2巻、52-58頁 (1996年)]、Siglec-9分子のDC発現の特異性を利用して、特異的抗体を用いた末梢血DCの高純度の分離の利点は計り知れないものがある。また、成熟DCと未成熟DCとの分離、成熟DCの検出などにも有用である。

【0019】上記の知見に基き本発明を要約すると以下のようになる。

(1) DCを特異的に認識すること、T細胞、B細胞、単球、ナチュラルキラー細胞及び顆粒球を認識しないこと、並びにSiglec-9タンパク質又はその断片と特異的に免疫結合することを特徴とする抗体。

(2) 成熟DCを特異的に認識することを特徴とする、上記(1)に記載の抗体。

(3) 前記抗体が、Siglec-9のアミノ酸配列 (配列番号1) 中、以下の位置の配列42~65、57~79、112~137、175~194、273~294、298~319、及び403~419からなるペプチドを認識する、上記(1)または(2)に記載の抗体。

(4) ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体である、上記(1)、(2)または(3)に記載の抗体。

(5) 上記(1)~(4)のいずれかに記載の抗体を用いてDCを分離する方法。

(6) 成熟DCを分離することを特徴とする、上記(5)に記載の方法。

(7) 上記(1)~(4)のいずれかに記載の抗体を用いてDCを検出する方法。

(8) 成熟DCを検出することを特徴とする、上記(7)に記載の方法。

【0020】本明細書中で使用する「特異的に認識する」とは、Siglec-9分子のみが有するエピトープと免疫学的に交差反応することを意味する。

【0021】

【発明の実施の形態】以下に本発明をさらに詳細に説明する。上述したように、本発明は、Siglec-9がDCに特異的に発現していること、並びにDCの成熟化に発現が上昇すること、という知見に基いている。この知見を利用することによりDCを特異的に認識し、一方T細胞、B細胞、単球、ナチュラルキラー細胞及び顆粒球を認識しない、Siglec-9に対する抗体、更には、成熟DCを特異的に認識する抗体を得ることができる。

【0022】上記の特性を有するいずれの抗体も本発明に包含されるが、目的の抗体を得るための抗原エピトープは、Siglec-9のアミノ酸配列 (配列番号1) において抗原性の高い領域、表在性がある領域、二次構造をとらない可能性のある領域、他のタンパク質 (特にSiglecファミリーの他のタンパク質) とホモロジーがないか又は低い領域から選択されうる。ここで抗原性の高い領域は、Perkerらの方法 (Biochemistry、25巻 5425-5432、1986年) によって推定可能である。表在性がある領域は、例えばハイドロパシーインデックスを計算しプロットすることによって推定可能である。二次構造をとらない可能性のある領域は、例えば、ChouとFasmanの方法 (Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol、47巻 45-148、1978年) によって推定可能である。さらに、特にSiglecファミリーの他のタンパク質とホモロジーがないか又は低い領域は、Siglec-9のアミノ酸配列と他のタンパク質のアミノ酸配列との相溶性比較によって推定可能である。

【0023】上記の手法で推定されたSiglec-9の部分アミノ酸配列を基に、ペプチド合成法を利用することによって該アミノ酸配列からなるペプチドを合成することができる。目的のペプチドは、例えば、R.B. Merrifield (Science 232:341-347, 1986) によって開発された固相ペプチド合成に基いた市販のペプチド合成機を使用して合成し、保護基を脱離後、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等を単独もしくは組合わせた方法により精製する。得られた精製ペプチドはキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) やアルブミンなどのキャリアタンパク質と結合し免疫原として使用することができる。

【0024】さらに、遺伝子組換えSiglec-9を免疫原としてSiglec-9に対するポリクローナル抗体・モノクロー

ナル抗体を公知の手法により作製することもできる。この場合、Siglec-9、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、または他のタンパク質に関して用いられる「組換え」という用語は、これらのタンパク質が宿主細胞内で組換えDNAによって生産されたものであることを意味する。宿主細胞としては、原核生物（例えば大腸菌のような細菌）及び真核生物（例えば酵母、CHO細胞、昆虫細胞等）のいずれも使用され得る。

【0025】本発明の「抗体」はペプチド抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体いずれでもよい。10 「抗体」は、マウスまたは他の適した宿主動物を免疫に用いられたタンパク質に特異的に結合するであろう抗体を産生するか、産生するであろうリンパ球を引き出すために、皮下、腹腔内、または筋肉内の経路によって、抗原あるいは抗原発現細胞により免疫化することによって得られる。さらに宿主動物としてはヒト抗体遺伝子のレポトリーを有するトランスジェニック動物に抗原または抗原発現細胞を投与し、所望のヒト抗体を取得しても良い[Proc Natl Acad Sci U S A., 97巻、722-727頁(2000年)、国際公開公報W096/33735、W097/07671、W097/13852、W098/37757参照]。そのかわりに、リンパ球をin vitroで免疫化しても良い。宿主動物から得られた血清から、抗原に結合する画分を集め、精製することにより、ポリクローナル抗体を取得することができる。また、ハイブリドーマ細胞を形成するために、ポリエチレングリコールのような適当な融合試薬を用いて、リンパ球を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体を作製することができる(Godnig, Monoclonal Antibodies: Principals and Practice, 59-103, Academic Press, 1986)。例え30 ば本発明のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法(Nature, 256巻495ページ1975年)を用いても、組換えDNA法(Cabillyら、米国特許第4816567号)を用いても作製することができる。

【0026】抗原タンパク質はSiglec-9タンパク質の全てまたは部分配列をコードするDNAを、大腸菌や酵母、昆虫細胞、動物細胞などで発現させることにより調製することができる。遺伝子組換えSiglec-9は、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフ40 ー等を単独もしくは組合わせた方法により精製し、この精製標品を免疫原として用いる。

【0027】また、本発明の抗体は、無傷の抗体であってもよいし、あるいは(Fab')₂やFabなどの抗体断片であってもよい。また、定常領域をヒトの定常領域に置き換えたキメラ抗体(例えばマウス-ヒトキメラ抗体; Cabillyら、米国特許4816567及びMorrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci., 89:6851 (1984))、定常領域および超可変領域(または、Complementary-determining region; CD50 R)を除く全ての可変領域をヒトの配列に置き換えたヒ

ト化抗体(Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci., 89:4285 (1992)及びCarterら、BioTechnology, 10:163 (1992))も本発明の抗体に含まれる。また、このようにして得られた本発明の抗体に対する抗体、すなわち抗イデオタイプ抗体もまた本発明に含まれる。

【0028】このようにして得られたSiglec-9に対する各種抗体は、請求項に記載されている様に様々な用途で使用可能である。Siglec-9がDCに特異的に発現が見られる分子であることを利用して、マグネットビーズを結合させた本抗体を末梢血に作用させ、これを磁場に通すことで末梢血DCを特異的に分離することができる。また、本抗体を蛍光標識し、FACSを用いて末梢血から目的のDCを検出・分離したり、mo-DCのin vitroでの分化を確認することができる。さらに、Siglec-9はDCの成熟化に伴って発現量が上昇するタンパク質であることから、本抗体を用いてFACSにより未成熟DCと成熟DCを分離することもできる。Siglec-9の検出に関しては、FACSでの検出にとどまるものではない。例えばウェスタンブロッティングにおいて本抗体を1次抗体として作用させることにより検出可能であることが予想されるし、タンパク質レベルでの発現確認を行うことができる。また、Siglec-9の機能を評価する用途にも使用可能である。成熟DCは強力な抗原提示細胞であり、MHCクラスII分子を介したCD4陽性のT細胞を刺激活性化及びMHCクラスI分子を介したCD8陽性細胞障害性T細胞を刺激活性化することが知られている。これら機能を制御し得るか否かを確認するために、アロジェニックMLR (Mixed Leucocyte Reaction)での機能を抑制しうるか否かの確認、抗原特異的にCTLを誘導した場合にその機能を抑制しうるか否かの確認、さらにDCの抗原提示に関わる分子が否かの確認等のin vitroでのアッセイにも使用確認可能である。

【0029】本発明の抗体はさらに、in vivoで免疫応答を制御するために使用することもできる。Siglec-9は、前述したとおり、細胞内ドメインにITIMを有していることから分子機能抑制的に働く膜分子であると予想される。このため、本発明の抗体がアゴニスト様の活性を有する抗体(agonistic抗体)であれば分子機能抑制的に作用するし、逆に、アンタゴニスト様の活性を有する抗体(antagonistic抗体)であれば分子機能活性的に作用することが期待される。このようにSiglec-9の機能制御可能な抗体を作用させることでDCの機能を制御することによる免疫応答を制御し得ることが期待される。

【0030】さらにはSiglec-9の可溶化型分子(すなわち、細胞外領域に相当する分子)にも免疫応答を制御する活性が期待される。本発明の抗体類またはSiglec-9の可溶化型分子を用いてSiglec-9リガンドを取得することも可能である。可溶化型Siglec-9リガンドは直接Siglec-9に作用し、DC上のSiglec-9を介したシグナルを制御し得る。また、Siglec-9リガンドとSiglec-9のinteractionをモジュレートできる低分子物質やSiglec-9リガンド

及びSiglec-9に関わる細胞内シグナル経路をモジュレートする低分子物質もシグナルの制御に有用である。

【0031】本発明の抗体類またはSiglec-9の可溶性型分子、Siglec-9リガンドの可溶性型分子、上記低分子を治療に用いる場合には、例えば癌、自己免疫疾患、臓器移植、感染症、アレルギーなどの疾患の治療に適用可能である。投与方法および投与剤型は特に制限されないが、静脈、動脈内投与、筋内投与、経口投与、座剤投与などであり、薬学的に許容可能な賦形剤や希釈剤と組合わせて経口用または非経口用に処方することができるが、好ましくは非経口投与である。投与は1日あたり1回かまたは数回に分けて行い、投与量は患者の重篤度、年齢、性別、体重などの条件に応じて決定され、副作用を併発しない範囲である。

【0032】

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

実施例1 DCの細胞膜の調製

細胞膜タンパク質の場合、元々発現量が低いこと、またハンドリングが難しいことが挙げられる。これを解決する手段の一つとして、より純度の高い細胞膜を取得する方法を確立することが必要である。細胞膜表面をコートし、これを均一に破碎することで、比重の重くなった細胞膜を密度勾配遠心により取得する方法で純度の高い細胞膜を調製した[ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、258巻、10062-10072頁(1983年)]。

【0033】ターゲットとしている膜分子の発現量の少なさとハンドリングの難しさから、大量のヒトDCを集めるためにアフェレーシス産物(単核球画分)から単球を分離してmo-DC大量調製した。LPS(リポポリサッカライド)刺激あり、なしを同数の細胞で実施し、同数(5×10⁸細胞)の未成熟DCと成熟DCを得た。

【0034】実施例2 タンパク質の高感度検出とin gel digestion

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

【0035】実施例3 膜タンパク質の分画

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

衝液で溶出した(WGA EL)。ConA EL、WGA EL、WGA FTを分子同定サンプルとした。これら画分をSDS-PAGEにて展開した後、実施例2の手法によりタンパク質を検出し、短冊状に切ったゲルをin gel digestionして分析サンプルとした。

【0036】実施例4 LC/MSによる微量分析

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

【0037】実施例5 Siglec-9の同定

実施例4の手法により同定された分子のうち、未成熟DC及び成熟DCの両方からUnigeneの1つであるSiglec-9が同定された。同定対象となったフラグメントはm/z=920.7の2価イオンであり、そのMS/MSのパターンはSiglec-9の部分アミノ酸配列(64~81)EGANTDQDAPVATNPNPAR(配列番号3)に非常に良く帰属された。Siglecファミリーはファミリー内でのホモロジーが非常に高く、アミノ酸レベルで80%程度あるが、上記配列は、ホモロジーがないところに存在することから、DCでSiglec-9が発現していることが予想された。また、このフラグメントのMSでのイオン強度から定量を行うと、3倍程度Mature DCの方が多かったことから、細胞膜表面上で成熟化に伴い3倍程度アップレギュレート(Up-regulate)している分子であることが予想された。

【0038】Siglec-9の推定アミノ酸配列の一次構造についてKyteとDoolittleの方法(ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン、157巻、105-132頁、1982年)に従い、ハイドロパシープロット解析を行なった(図1)。その結果、Siglec-9はN末端にシグナル配列を有するI型の細胞膜貫通タンパク質であることが明らかとなった。Siglec-9は463アミノ酸残基からなり、ハイドロパシープロット解析結果から21残基のシグナル配列、317残基の細胞外領域、32残基の膜貫通領域、93残基の細胞内領域を有してい

た。さらにホモロジー検索並びにモチーフ検索の結果から細胞外領域は8ヶ所のアスパラギン結合型糖鎖付加部位、10ヶ所のシステイン残基を持つ3つのイムノグロブリンスーパーファミリーに属する構造を有していた。また、細胞内領域のC末端側には、2つのよく保存されたITIMをもっていた。

【0039】実施例6 RT-PCRによるSiglec-9の発現確認

Siglec-9の発現がDC特異的であるか否かを明らかにするために、RT-PCRによる確認を実施した。まず、ヒト末梢血より、Ficoll 勾配により単核球画分及び赤血球画分を分離した。単核球画分よりCD3陽性(T細胞)、CD19陽性(B細胞)、CD14陽性(単球)、CD56陽性(NK細胞)をFACS vantage (Becton Dickinson)により分離し、赤血球画分よりCD66b陽性(顆粒球)を分離した。また、単核球画分よりLinage陰性(CD3, CD14, CD19, CD56陰性)細胞をMACSにより分離し、この中からDC1(HLA-DR, CD11c陽性)及びDC2(HLA-DR, CD123陽性)をFACS vantageにより分離した。それぞれの細胞よりISOGEN LS (ニッポンジーン社製)を用いてmRNAを調製し、クローンテック社のSMART法の添付文書に従い一本鎖DNAを調製した。この一本鎖DNAを鋳型として、Siglec-9遺伝子5'リーダー配列特異的センスプライマー5'-ATGCTGCTGCTGTGCTGCCCTGCTCTGGGGAGG-3'(配列番号4)と3'末端特異的アンチセンスプライマー5'-TCATCTGTGGATCTTGATCTCGAGTACTCGGTGTC-3'(配列番号5)を用いたRT-PCRを実施した。反応にはLA-Taqポリメラーゼ(宝酒造)を用い、95を30秒、55を1分、72を2分のサイクルを40回行う反応条件を用いた。その結果、これら7種類の血球系細胞のうち、Siglec-9はDC1及びDC2に目的の大きさ(1391 bp)のバンドが検出され、その他の細胞(T細胞, B細胞, 単球, NK細胞, 顆粒球)ではバンドが検出*

*されなかった。このことから、Siglec-9は血球系細胞の中でDC特異的に発現が見られる分子であることが示された。

【0040】実施例7 Siglec-9に対するペプチド抗体の設計とペプチド合成並びにペプチド抗体作製

Siglec-9に対する特異的ペプチド抗体を作製するためにSiglec-9の推定アミノ酸配列から設計を行なった。まず、Parkerの法則(前述)に従い抗原性の高い部分を選択し、これらの中からChouとFasmanの方法(前述)に基づき表在性がある部分、2次構造を取らない可能性のある部分、さらに糖鎖付加が予想されない部分、システイン残基を含まない部分、他のSiglecファミリー及び他のタンパク質とホモロジーの低い部分7ヶ所を選びシングルペプチドを合成した。選んだ領域は、以下のアミノ酸位置からなる配列:(42~65)、(57~79)、(112~137)、(175~194)、(273~294)、(298~319)、(403~419)である。これらシングルペプチドを精製し、0.2mg/mlの濃度で1mg/mlのキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に対してコンジュゲートした。このKLH-結合ペプチド(100µg)を免疫原として8回繰り返してウサギに免疫し、ペプチド抗体を作製した。

【0041】

【発明の効果】本発明により、DCを他の血球系細胞から選択的に高い純度で分離することができるのみならず、成熟DCと未成熟DCとの分離も可能とすることから、DC療法への該細胞の供給を可能とする。分離されたDCは、抗原をパルスしたのち、再び患者に戻すことにより癌ワクチンとして利用するなどの用途が期待される。

【0042】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```
<110> Kirin Brewery Company, Limited
<120> Antibodies to Siglec-9, a membrane molecule of dendritic cell (DC), and methods for detecting DC and for separating DC using the same
<130> P00-0438
<140>
<141>
<160> 5
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 463
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1
Met Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp
Gly Arg Glu Arg Ala Glu
```

	20		25		30
Glu Gly Leu Cys Val His Val Pro Cys Ser					
Phe Ser Tyr Pro Ser His					
	35		40		45
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Pro Val Val His					
Gly Tyr Trp Phe Arg Glu					
	50		55		60
Gly Ala Asn Thr Asp Gln Asp Ala Pro Val					
Ala Thr Asn Asn Pro Ala					
	65		70		75
					80
Arg Ala Val Trp Glu Glu Thr Arg Asp Arg					
Phe His Leu Leu Gly Asp					
		85		90	95
Pro His Thr Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile					
Arg Asp Ala Arg Arg Ser					
	100		105		110
Asp Ala Gly Arg Tyr Phe Phe Arg Met Glu					
Lys Gly Ser Ile Lys Trp					
	115		120		125
Asn Tyr Lys His His Arg Leu Ser Val Asn					
Val Thr Ala Leu Thr His					
	130		135		140
Arg Pro Asn Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu					
Glu Ser Gly Cys Pro Gln					
	145		150		155
	60				1
Asn Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys					
Glu Gln Gly Thr Pro Pro					
		165		170	175
Met Ile Ser Trp Ile Gly Thr Ser Val Ser					
Pro Leu Asp Pro Ser Thr					
	180		185		190
Thr Arg Ser Ser Val Leu Thr Leu Ile Pro					
Gln Pro Gln Asp His Gly					
	195		200		205
Thr Ser Leu Thr Cys Gln Val Thr Phe Pro					
Gly Ala Ser Val Thr Thr					
	210		215		220
Asn Lys Thr Val His Leu Asn Val Ser Tyr					
Pro Pro Gln Asn Leu Thr					
	225		230		235
	40				2
Met Thr Val Phe Gln Gly Asp Gly Thr Val					
Ser Thr Val Leu Gly Asn					
		245		250	255
Gly Ser Ser Leu Ser Leu Pro Glu Gly Gln					
Ser Leu Arg Leu Val Cys					
	260		265		270
Ala Val Asp Ala Val Asp Ser Asn Pro Pro					
Ala Arg Leu Ser Leu Ser					
	275		280		285

specific for 5'-leader sequence of
Siglec-9 gene

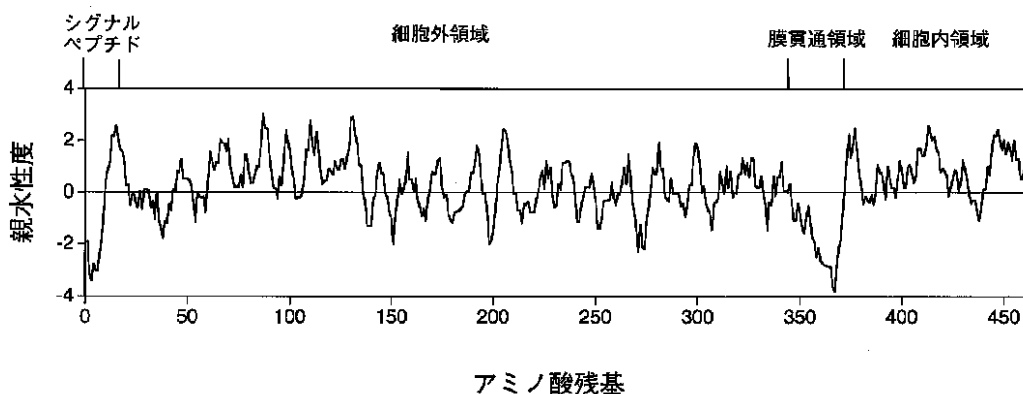
<400> 4
atgctgctgc tgctgctgcc cctgctctgg ggga
gg 36

<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: 3 an antisense 14

【0043】 primer specific for 3'-end of Siglec-9の推定アミノ酸配列の一次構造について
【配列表フリーテキスト】配列番号4 : Siglec-9遺伝子でKyteとDoolittleの方法(ジャーナル・オブ・エクス
5'リーダー配列特異的コンプライマー。ペリメンタル・メディスン、157巻、105-132
配列番号5 : Siglec-9遺伝子3'末端特異的アンチセンスコンプライマー。tc 36 ページ、1982年)に従って行ったヒドロパシープロ
ットを示す。

【図面の簡単な説明】

【図1】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-コード (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/577	B
		C 1 2 Q 1/68	Z
	33/577	C 1 2 N 15/00	C
// C 1 2 Q 1/68			Z N A A

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 BA80 CA02
CA20 DA02 DA06 DA12 GA01
GA11 HA03 HA15
4B063 QA01 QQ03 QQ08 QQ42 QQ79
QR31 QR62 QS12 QS16 QS25
4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CA20
CC24 DA01 DA13
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75
DA76 DA86 EA20 EA22 EA28
FA34 FA72 FA74 GA22 HA06

专利名称(译)	针对树突细胞 (DC) 膜分子Siglec-9的抗体 , DC检测方法和使用它的DC分离方法		
公开(公告)号	JP2001352977A	公开(公告)日	2001-12-25
申请号	JP2000176187	申请日	2000-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	麒麟麦酒株式会社		
申请(专利权)人(译)	麒麟麦酒株式会社		
[标]发明人	渡会浩志 山口泰範		
发明人	渡会 浩志 山口 泰範		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/18 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/53.Y G01N33/53.D G01N33/577.B C12Q1/68.Z C12N15/00.C C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR31 4B063/QR62 4B063/QS12 4B063/QS16 4B063/QS25 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/FA34 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA22 4H045/HA06		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种检测和分离树突状细胞 (DC) 的方法及其抗体。 特异性表达DC并特异性识别细胞膜分子Siglec-9的抗体，其表达随DC成熟而增加，并且使用该抗体检测并分离了DC 怎么办

【图1】

