(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-200908
(P2017-200908A)
(43)公開日　平成29年11月9日(2017.11.9)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 39/395	***(2006.01)***	A61K	39/395	ZNAD	4B065
C12N 5/0783	***(2010.01)***	C12N	5/0783		4C084
C12N 5/09	***(2010.01)***	C12N	5/09		4C085
C07K 16/30	***(2006.01)***	C07K	16/30		4H045
A61P 35/00	***(2006.01)***	A61K	39/395	N	

審査請求 有　請求項の数 10　ＯＬ　外国語出願　（全 292 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-85297(P2017-85297)
(22)出願日　平成29年4月24日(2017.4.24)
(62)分割の表示　特願2014-504444(P2014-504444)の分割
原出願日　平成24年4月16日(2012.4.16)
(31)優先権主張番号　61/475,682
(32)優先日　平成23年4月15日(2011.4.15)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/532,575
(32)優先日　平成23年9月9日(2011.9.9)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/581,194
(32)優先日　平成23年12月29日(2011.12.29)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　506257984
コンピュゲン　エルティーディー.
イスラエル国　ホロン　５８８５８４９，ハロクミン・ストリート　２６，ビルディング　ディー
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(74)代理人　100118902
弁理士　山本　修
(74)代理人　100107386
弁理士　泉谷　玲子
(72)発明者　トポリク，アミル
イスラエル国　ホロン　５８８４７　アパートメント　１９　マーヴァッド　ハクスアミン　ストリート　１４

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫関連疾患およびがんの治療のためのポリペプチドおよびポリヌクレオチドならびにそれらの使用

(57)【要約】　（修正有）
【課題】卵巣がんに有効な新規のな治療用組成物および診断用組成物の提供。
【解決手段】ポリペプチドに特異的に結合する抗原結合領域を有する、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントのＣＤＣ活性またはＡＤＣＣ活性の関与により、ＬＳＲタンパク質（lipolysis-stimulated lipoprotein receptor isoform 2、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）を発現するがん細胞のアポトーシスまたは溶解を誘導する作用を有する治療用薬剤。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１１、１３、１５～１８、６７および１４３からなる群から選択される配列の９８個、１０８個、１１８個、１３５個、１４５個、１５５個、１６０個、１７０個または１８０個のアミノ酸から実質的になる単離されたポリペプチド。
【請求項２】
配列番号１２、１４、４７～５０、１０、２２および１０２のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列から実質的になる単離されたポリペプチド。
【請求項３】
配列番号１２、１４、４７～５０、１０、２２および１０２のいずれかに示されるアミノ酸配列から実質的になることを特徴とする請求項２に記載のポリペプチド。
【請求項４】
ＬＳＲとその機能性対応物との相互作用をブロックまたは阻害することを特徴とする請求項１～３のいずれかに記載のポリペプチド。
【請求項５】
ＬＳＲとその機能性対応物との相互作用においてＬＳＲと置き換わること、またはＬＳＲとその機能性対応物との相互作用を増強することを特徴とする請求項１～３のいずれかに記載のポリペプチド。
【請求項６】
異種配列に連結された請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチドを含む融合タンパク質。
【請求項７】
前記の異種配列が免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含むことを特徴とする請求項６に記載の融合タンパク質。
【請求項８】
前記の免疫グロブリン分子の一部分が、免疫グロブリン重鎖定常領域のＦｃフラグメントであることを特徴とする請求項７に記載の融合タンパク質。
【請求項９】
前記の免疫グロブリン重鎖定常領域が、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡおよびＩｇＤからなる群から選択される免疫グロブリンアイソタイプに由来することを特徴とする請求項８に記載の融合タンパク質。
【請求項１０】
配列番号７５～８０および１７６～１８１のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する請求項９に記載の融合タンパク質。
【請求項１１】
インビトロおよびインビボにおいて免疫細胞応答を調節することを特徴とする請求項１０に記載の融合タンパク質。
【請求項１２】
請求項１～１１のいずれかに記載のポリペプチドをコードする核酸配列。
【請求項１３】
配列番号４０～４６、１３２、４４、１５５、１８６～１８８、および１９３～１９８からなる群から選択される核酸配列、これと少なくとも９５％の配列同一性を有する変異体、またはこれらの変性変異体であることを特徴とする請求項１２に記載の核酸配列。
【請求項１４】
請求項１２または１３に記載の核酸配列を少なくとも１つ含む発現ベクターまたはウイルス。
【請求項１５】
組換え細胞であって、請求項１４に記載の核酸配列を含む発現ベクターまたはウイルスを含み、該ＤＮＡセグメントにコードされたポリペプチドを構成的または誘導的に発現す

る組換え細胞。
【請求項１６】
ＬＳＲの可溶性細胞外ドメインポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは融合タンパク質の製造方法であって、前記のＤＮＡセグメントまたは核酸にコードされたポリペプチドの発現が可能な条件下で、請求項１５に記載の組換え細胞を培養すること、および該ポリペプチドを回収することを含む方法。
【請求項１７】
請求項１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６～１１のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項１２または１３に記載のヌクレオチド配列、請求項１４に記載の発現ベクター、または請求項１５に記載の宿主細胞と、薬学的に許容される希釈剤または担体とを含む医薬組成物。
【請求項１８】
請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれか１つと特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントの、がんの治療薬の製造のための使用。
【請求項１９】
ＬＳＲを発現するがん細胞のアポトーシスまたは溶解を誘導するための請求項１８に記載の使用。
【請求項２０】
請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれか１つと特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントの、感染症の治療薬の製造のための使用。
【請求項２１】
請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれか１つと特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントの、Ｔ細胞活性化の阻害または抑制に関連した疾患の治療薬の製造のための使用。
【請求項２２】
前記の抗原結合部位が、立体構造エピトープまたは直線状エピトープを含み、かつ、約３～７個の連続したアミノ酸または不連続アミノ酸を含むことを特徴とする、請求項１８～２１のいずれかに記載の抗体または抗原結合フラグメントの使用。
【請求項２３】
前記抗体が、完全ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または霊長類化抗体であることを特徴とする、請求項１８～２２のいずれかに記載の抗体またはフラグメントの使用。
【請求項２４】
前記抗体が、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ）フラグメント、ＦｖフラグメントおよびｓｃＦｖフラグメントおよび最小認識単位からなる群から選択されることを特徴とする、請求項１８～２３のいずれかに記載の抗体またはフラグメントの使用。
【請求項２５】
前記抗体が、薬剤、放射性核種、発蛍光団、酵素、毒素、治療剤、および化学療法剤から選択される成分と結合されており、
この検出可能なマーカーが、放射性同位元素、金属キレート剤、酵素、蛍光化合物、生物発光化合物、または化学発光化合物であることを特徴とする、請求項１８～２４のいずれかに記載の抗体またはフラグメントの使用。
【請求項２６】
前記アポトーシスまたは溶解が、前記抗体のＣＤＣ活性またはＡＤＣＣ活性に関与していることを特徴とする、請求項２５に記載の抗体または抗原結合フラグメントの使用。
【請求項２７】
請求項１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６～１１のいずれか

に記載の融合タンパク質、請求項１２または１３に記載のヌクレオチド配列、請求項１４に記載の発現ベクター、請求項１５に記載の宿主細胞、および請求項１７に記載の医薬組成物のいずれか１つの、がんの治療のための使用。

【請求項２８】

請求項１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６～１１のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項１２または１３に記載のヌクレオチド配列、請求項１４に記載の発現ベクター、請求項１５に記載の宿主細胞、および請求項１７に記載の医薬組成物のいずれか１つの使用であって、対象への投与によりＴ細胞の活性化が阻害または抑制されることを特徴とする使用。

【請求項２９】

対象において、

ａ．サイトカインのアップレギュレート；

ｂ．Ｔ細胞の増殖の誘導；

ｃ．抗原特異的Ｔ細胞免疫の促進；

ｄ．ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞および／またはＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の活性化の促進

の１以上を行う方法であって、

請求項１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６～１１のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項１２または１３に記載のヌクレオチド配列、請求項１４に記載の発現ベクター、請求項１５に記載の宿主細胞、請求項１７に記載の医薬組成物、および請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントのいずれか１つを対象に投与することを含む方法。

【請求項３０】

がんを治療または予防する方法であって、

がんの治療または予防を必要とする対象に、請求項１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６～１１のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項１２または１３に記載のヌクレオチド配列、請求項１４に記載の発現ベクター、請求項１５に記載の宿主細胞、請求項１７に記載の医薬組成物、および請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントのいずれか１つを有効量で投与することを含む方法。

【請求項３１】

前記の治療が、がんを治療するのに有用な別の成分または治療法と組み合わせられることを特徴とする、請求項３０に記載の方法。

【請求項３２】

前記治療法が、放射線療法；抗体療法；化学療法；光線力学療法；養子Ｔ細胞療法；Ｔｒｅｇ除去；手術；または慣用の薬剤との併用療法であることを特徴とする、請求項３１に記載の方法。

【請求項３３】

前記成分が、免疫抑制剤；細胞傷害剤；腫瘍ワクチン；抗体（たとえば、ベバシズマブ、アービタックス）；ペプチド；ペプチボディ；小分子；細胞傷害剤および細胞増殖抑制剤（たとえば、パクリタキセル、シスプラチン、ビノレルビン、ドセタキセル、ゲムシタビン、テモゾロミド、イリノテカン、５ＦＵ、カルボプラチン）などの化学療法剤；インターフェロンおよびインターロイキンなどの免疫調節剤；免疫刺激抗体；成長ホルモン；他のサイトカイン；葉酸；ビタミン；無機質；アロマターゼ阻害剤；ＲＮＡｉ；ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤；およびプロテアソーム阻害剤からなる群から選択されることを特徴とする請求項３２に記載の方法。

【請求項３４】

前記がんが、乳がん、子宮頸がん、卵巣がん、子宮内膜がん、メラノーマ、膀胱がん、肺がん、膵臓がん、結腸がん、前立腺がん、白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性

白血病、Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、骨髄性白血病、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病、甲状腺がん、濾胞性甲状腺がん、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、線維肉腫、横紋筋肉腫、メラノーマ、ぶどう膜メラノーマ、奇形癌、神経芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、皮膚の良性腫瘍、角化棘細胞腫、腎臓がん、未分化大細胞リンパ腫、食道扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、濾胞性樹状細胞癌、腸がん、筋層浸潤がん、精巣腫瘍、表皮癌、脾臓がん、膀胱がん、頭頸部がん、胃がん、肝臓がん、骨がん、脳がん、網膜がん、胆道がん、小腸がん、唾液腺がん、子宮がん、精巣がん、結合組織がん、前立腺肥大症、脊髄形成異常、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、鼻咽腔がん、神経内分泌がん、骨髄異形成症候群、中皮腫、血管肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド、食道胃がん、ファローピウス管がん、腹膜がん、漿液性乳頭状ミュラー管がん、悪性腹水、消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）、リー・フラウメニ症候群、およびフォンヒッペル・リンダウ症候群（ＶＨＬ）からなる群から選択される、非転移性、浸潤性、または転移性のがんであることを特徴とする請求項３０～３３のいずれかに記載の方法。

【請求項３５】

前記がんが、メラノーマ、肝臓がん、腎臓がん、脳がん、乳がん、結腸がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、胃がん、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、急性および慢性リンパ芽球性白血病、ならびに急性および慢性骨髄白血病のいずれかであることを特徴とする請求項３４に記載の方法。

【請求項３６】

抗原に対する患者の二次免疫応答を増強する方法であって、

請求項１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６～１１のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項１２または１３に記載のヌクレオチド配列、請求項１４に記載の発現ベクター、求項１５に記載の宿主細胞、または請求項１７に記載の医薬組成物、および請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントのいずれか１つを有効量で投与することを含む方法。

【請求項３７】

前記抗原ががん抗原であり、前記患者が抗がんワクチンによる治療を受けたことのある患者であること、または、前記抗原がウイルス抗原であり、前記患者が抗ウイルスワクチンによる治療を受けたことのある患者であることを特徴とする、請求項３６に記載の方法。

【請求項３８】

請求項１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６～１１のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項１２または１３に記載のヌクレオチド配列、請求項１４に記載の発現ベクター、請求項１５に記載の宿主細胞、請求項１７に記載の医薬組成物、および請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントの少なくとも１つをがんワクチンアジュバントとして使用する方法であって、

免疫応答を誘導できる量の標的とする腫瘍関連抗原調製物と、がんワクチンアジュバントとを免疫化に適した処方で患者に投与することを含み、

該がんワクチンアジュバント存在下における該腫瘍関連抗原に対する免疫応答が、該がんワクチンアジュバント非存在下におけるものよりも強力であることを特徴とする方法。

【請求項３９】

免疫系に関連した病態を治療または予防する方法であって、

免疫系に関連した病態の治療または予防を必要とする対象に、請求項１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチドのいずれか１つ、請求項６～１１のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項１２または１３に記載のヌクレオチド配列、請求項１４に記載の発現ベクター、請求項１５に記載の宿主細胞、請求項１７に記載の医薬組成物、および請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗原結合部位を含

むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントのいずれかを有効量で投与することを含む方法。

【請求項４０】

前記の免疫系に関連した病態が、免疫関連病態、自己免疫疾患、移植拒絶反応、移植片対宿主病、ＬＳＲポリペプチドによって媒介される免疫共刺激をブロックまたは促進するための状態、免疫関連疾患、および／または（免疫共刺激を促進または抑制する）免疫療法のための状態を含むことを特徴とする、請求項３９に記載の方法。

【請求項４１】

前記の治療が、免疫関連病態の治療に有用な別の成分と組み合わされることを特徴とする請求項４０または４１に記載の方法。

【請求項４２】

前記成分が、コルチコステロイド類、シクロスポリン、シクロホスファミド、プレドニゾン、アザチオプリン、メトトレキサート、ラパマイシン、タクロリムスなどの免疫抑制剤；ＴＮＦ－α遮断剤もしくはＴＮＦ－αアンタゴニスト、または任意の炎症性サイトカインを標的とする他の生物学的薬剤などの生物学的薬剤；非ステロイド性抗炎症剤／Ｃｏｘ－２阻害剤；ヒドロキシクロロキン；スルファサラゾピリン；金塩；エタネルセプト；インフリキシマブ；ミコフェノール酸モフェチル；バシリキシマブ；アタシセプト；リツキシマブ；シトキサン；インターフェロンβ－１ａ；インターフェロンβ－１ｂ；酢酸グラチラマー；塩酸ミトキサントロン；アナキンラ；他のバイオロジクス；静脈内免疫グロブリン（ＩＶＩＧ）；ＩＦＮ－β－１ａ（ＲＥＢＩＦ（登録商標）およびＡＶＯＮＥＸ（登録商標））、ＩＦＮ－β－１ｂ（ＢＥＴＡＳＥＲＯＮ（登録商標））などのインターフェロン；酢酸グラチラマー（ＣＯＰＡＸＯＮＥ（登録商標））；ポリペプチド；ナタリズマブ（ＴＹＳＡＢＲＩ（登録商標））；ミトキサントロン（ＮＯＶＡＮＴＲＯＮＥ（登録商標））；細胞毒性剤；カルシニューリン阻害剤（たとえばシクロスポリンＡまたはＦＫ５０６）；免疫抑制マクロライド（たとえばラパマイシンまたはその誘導体（たとえば４０－Ｏ－（２－ヒドロキシ）エチル－ラパマイシン））；リンパ球ホーミング剤（たとえばＦＴＹ７２０またはそのアナログ）；コルチコステロイド類；シクロホスファミド；アザチオプリン；メトトレキサート；レフルノミドまたはそのアナログ；ミゾリビン；ミコフェノール酸；ミコフェノール酸モフェチル；１５－デオキシスペルグアリンまたはそのアナログ；免疫抑制モノクローナル抗体（たとえば、ＭＨＣ、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８、ＣＤ７、ＣＤ２５、ＣＤ２７、Ｂ７、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ５８、ＣＤ１３７、ＩＣＯＳ、ＣＤ１５０（ＳＬＡＭ）、ＯＸ４０、４－１ＢＢまたはこれらのリガンドなどの白血球レセプターに対するモノクローナル抗体）；他の免疫調節化合物（たとえばＣＴＬＡ４－Ｉｇ（アバタセプト、ＯＲＥＮＣＩＡ（登録商標））、ＣＤ２８－Ｉｇ、Ｂ７－Ｈ４－Ｉｇ、他の共刺激剤）；接着分子阻害剤（たとえばモノクローナル抗体（ｍＡｂ））；ＬＦＡ－１アンタゴニスト、セレクチンアンタゴニスト、ＶＬＡ－４アンタゴニストなどの低分子阻害剤；ならびに他の免疫調節剤からなる群から選択されることを特徴とする請求項４１に記載の方法。

【請求項４３】

前記の免疫関連病態が、自己免疫疾患、移植拒絶反応、および移植片対宿主病から選択されることを特徴とする請求項３９～４２のいずれかに記載の方法。

【請求項４４】

前記の自己免疫疾患が、再発寛解型多発性硬化症、一次進行型多発性硬化症および二次進行型多発性硬化症を含む多発性硬化症；乾癬；関節リウマチ；乾癬性関節炎；全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）；潰瘍性大腸炎；クローン病；良性リンパ球性血管炎；血小板減少性紫斑病；突発性血小板減少症；特発性自己免疫性溶血性貧血；赤芽球ろう；シェーグレン症候群；リウマチ性疾患；結合組織疾患；炎症性リウマチ；変形性リウマチ；非関節性リウマチ；若年性関節リウマチ；尿酸塩関節炎；筋肉リウマチ；慢性多発性関節炎；クリオグロブリン血管炎；ＡＮＣＡ関連血管炎；抗リン脂質症候群；重症筋無力症；自己免疫性溶血性貧血；ギラン・バレー症候群；慢性免疫性多発ニューロパチー；自己免疫性

甲状腺炎；インスリン依存性糖尿病；１型糖尿病；アジソン病；膜性糸球体腎症；グッドパスチャー病；自己免疫性胃炎；自己免疫性萎縮性胃炎；悪性貧血；天疱瘡；尋常性天疱瘡；肝硬変；原発性胆汁性肝硬変；皮膚筋炎；多発性筋炎；線維筋炎；筋硬症；セリアック病；免疫グロブリンＡ腎症；ヘノッホ・シェーンライン紫斑病；エバンス症候群；アトピー性皮膚炎；乾癬；関節症性乾癬；グレーブス病；グレーブス眼症；強皮症；全身性強皮症；進行性全身性強皮症；喘息；アレルギー；原発性胆汁性肝硬変；橋本甲状腺炎；原発性粘液水腫；交感性眼炎；自己免疫性ぶどう膜炎；肝炎；慢性活動性肝炎；膠原病；強直性脊椎炎；肩関節周囲炎；結節性汎動脈炎；軟骨石灰化症；ヴェーゲナー肉芽腫症；顕微鏡的多発血管炎；慢性じんま疹；水疱性皮膚疾患；類天疱瘡；アトピー性湿疹；デビック病；小児自己免疫性溶血性貧血；難治性または慢性自己免疫性血球減少症；後天性血友病Ａにおける抗第VIII因子自己抗体の産生の予防；寒冷凝集素病；視神経脊髄炎；全身硬直症候群；歯肉炎；歯周炎；膵炎；心筋炎；血管炎；胃炎；痛風；痛風性関節炎；乾癬、アトピー性皮膚炎、湿疹、酒さ、蕁麻疹およびざ瘡からなる群から選択される炎症性皮膚疾患；正補体血症性蕁麻疹様血管炎；心膜炎；筋炎；抗合成酵素症候群；強膜炎；マクロファージ活性化症候群；ベーチェット症候群；ＰＡＰＡ症候群；Ｂｌａｕ症候群；痛風；成人および若年性スティル病；クリオピリン関連周期性症候群；マックル－ウェルズ症候群；家族性寒冷自己炎症性症候群；新生児期発症多臓器性炎症性疾患；家族性地中海熱；慢性乳児期発症神経皮膚関節症候群；全身型若年性特発性関節炎；高ＩｇＤ症候群；シュニッツラー症候群；自己免疫性網膜症；加齢黄斑変性症；アテローム性動脈硬化症；慢性前立腺炎；ならびにＴＮＦ受容体関連周期性症候群（ＴＲＡＰＳ）からなる群から選択されることを特徴とする請求項４３に記載の方法。

【請求項４５】

前記の自己免疫疾患が、任意の型および亜型の、多発性硬化症、関節リウマチ、１型糖尿病、乾癬、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、ぶどう膜炎およびシェーグレン症候群からなる群から選択されることを特徴とする請求項４４に記載の方法。

【請求項４６】

感染症を治療または予防する方法であって、
感染症の治療または予防を必要とする対象に、請求項１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチドのいずれか１つ、請求項６～１１のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項１２または１３に記載のヌクレオチド配列、請求項１４に記載の発現ベクター、請求項１５に記載の宿主細胞、請求項１７に記載の医薬組成物、および請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントのいずれかを有効量で投与することを含む方法。

【請求項４７】

前記の感染症が、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染および／または他の寄生虫感染によって引き起こされる疾患から選択されることを特徴とする、請求項４６に記載の方法。

【請求項４８】

前記の感染症が、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、伝染性単核症、ＥＢＶ、サイトメガロウイルス、ＡＩＤＳ、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、結核、マラリアおよび住血吸虫症から選択されることを特徴とする、請求項４７に記載の方法。

【請求項４９】

試料中の請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれか１つまたは該ポリペプチドと少なくとも９５％の同一性を有するその変異体を検出するためのアッセイ。

【請求項５０】

対象の疾患を診断する方法であって、対象から得られた試料または対象において、請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれか、または該ポリペプチドと少なくとも９５％の同一性を有するその変異体、またはこれらのフラグメントを検出することを含む方法。

【請求項５１】

前記ポリペプチドの検出がインビボまたはインビトロで行われることを特徴とする、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記の検出がイムノアッセイによって行われることを特徴とする請求項５０に記載の方法。
【請求項５３】
前記の検出が、請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを使用して行われることを特徴とする、請求項５０に記載の方法。
【請求項５４】
配列番号１および５８からなる群から選択される配列の可溶性細胞外ドメインの少なくとも６２個のアミノ酸、配列番号３および５からなる群から選択される配列の可溶性細胞外ドメインの少なくとも３６個のアミノ酸、もしくは配列番号７の可溶性細胞外ドメインの少なくとも４６個のアミノ酸を含む単離されたポリペプチド；または、
配列番号５に示されるアミノ酸配列、該アミノ酸配列と少なくとも９５％の配列同一性を有する変異体、これらの変異体、これらのオーソログ、またはこれらのフラグメントから実質的になる単離されたポリペプチド。
【請求項５５】
配列番号１および５８からなる群から選択される配列の６２個～２２８個のアミノ酸；配列番号３および５からなる群から選択される配列の３６個～３９３個のアミノ酸；または配列番号７の４６個～２１６個のアミノ酸のみを含むことを特徴とする請求項５４に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項５６】
配列番号１および５８からなる群から選択される配列の６２個～８２個、９５個～１１５個、もしくは２０８個～２２８個のアミノ酸のみを含むポリペプチド；配列番号３および５からなる群から選択される配列の３６個～７０個、８０個～１００個、１７０個～２００個、２６５個～２９０個、もしくは３６５個～３９３個のアミノ酸のみを含むポリペプチド；または配列番号７の４６個～６６個、８４個～１０４個、もしくは１９６個～２１６個のアミノ酸のみを含むポリペプチドからなる群から選択されることを特徴とする、請求項５５に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項５７】
配列番号１および５８からなる群から選択される配列の約７２個、１０６個、もしくは２１８個のアミノ酸；配列番号７の約５６個、９４個、もしくは２０６個のアミノ酸；または配列番号３および５の約４６個、４９個、５８個、６０個、８７個、８９個、９３個、９４個、１７８個、１８２個、１８５個、１８７個、２７３個、２７９個、２８２個、３７４個もしくは３８３個のアミノ酸のみを含むことを特徴とする、請求項５６に記載の単離されたポリペプチド。
【請求項５８】
配列番号２、４～６、８、３９、５９～６１、および８１～１０１のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列から実質的になる請求項５７に記載のポリペプチド。
【請求項５９】
配列番号２、４～６、８、３９、５９～６１、および８１～１０１のいずれかに示されるアミノ酸配列から実質的になる請求項５８に記載のポリペプチド。
【請求項６０】
ＴＭＥＭ２５、ＶＳＩＧ１０、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、またはそのフラグメントもしくは変異体と、それぞれの機能性対応物との相互作用をブロックまたは阻害することを特徴とする請求項５４～５９のいずれかに記載のポリペプチド。
【請求項６１】
ＴＭＥＭ２５、ＶＳＩＧ１０、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、またはそのフラグメントもしくは変異体

と、それぞれの機能性対応物との相互作用においてＴＭＥＭ２５、ＶＳＩＧ１０、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、またはそのフラグメントもしくは変異体と置き換わること、またはＴＭＥＭ２５、ＶＳＩＧ１０、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、またはそのフラグメントもしくは変異体と、それぞれの機能性対応物との相互作用を増強することを特徴とする請求項５４～５９のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項６２】

前記のオーソログが、配列番号９および１９～２０から選択されるマウスポリペプチドであることを特徴とする請求項５４～５９のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項６３】

異種配列に連結された請求項５４～５９のいずれかに記載のポリペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項６４】

前記の異種配列が免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含むことを特徴とする請求項６３に記載の融合タンパク質。

【請求項６５】

前記の免疫グロブリン分子の一部分が、免疫グロブリン重鎖定常領域のＦｃフラグメントであることを特徴とする請求項６４に記載の融合タンパク質。

【請求項６６】

前記の免疫グロブリン重鎖定常領域が、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡおよびＩｇＤからなる群から選択される免疫グロブリンアイソタイプに由来することを特徴とする請求項６５に記載の融合タンパク質。

【請求項６７】

配列番号７１～７４および１７２～１７５のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する請求項６６に記載の融合タンパク質。

【請求項６８】

配列番号２３～２６のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する請求項６６に記載の融合タンパク質。

【請求項６９】

インビトロおよびインビボにおいて免疫細胞応答を調節することを特徴とする請求項６７に記載の融合タンパク質。

【請求項７０】

請求項５４～６９のいずれかに記載のポリペプチドをコードする核酸配列。

【請求項７１】

配列番号３３～３７、１８２～１８５、および１８９～１９２、これらの配列と少なくとも９５％の配列同一性を有するこれらの変異体、ならびにこれらの変性変異体からなる群から選択される、請求項７０に記載の核酸配列。

【請求項７２】

請求項７０または７１に記載の核酸配列を少なくとも１つ含む発現ベクターまたはウイルス。

【請求項７３】

組換え細胞であって、請求項７２に記載の核酸配列を含む発現ベクターまたはウイルスを含み、該ＤＮＡセグメントにコードされたポリペプチドを構成的または誘導的に発現する組換え細胞。

【請求項７４】

ＴＭＥＭ２５、ＶＳＩＧ１０、もしくはＬＹ６Ｇ６Ｆの可溶性細胞外ドメインポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは融合タンパク質の製造方法であって、前記のＤＮＡセグメントまたは核酸にコードされたポリペプチドの発現が可能な条件下で、請求項７３に記載の組換え細胞を培養すること、および該ポリペプチドを回収することを含む方法。

【請求項７５】

請求項５４～５９のいずれかに記載のポリペプチド、これらのフラグメント、これらと少なくとも９５％の同一性を有する変異体、およびこれらのエピトープのいずれか１つと特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項７６】

前記の抗原結合部位が立体構造エピトープまたは直線状エピトープを含み、かつ、約３～７個の連続したアミノ酸または不連続アミノ酸を含むことを特徴とする、請求項７５に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項７７】

前記抗体が、完全ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または霊長類化抗体であることを特徴とする、請求項７５または７６に記載の抗体またはフラグメント。

【請求項７８】

前記抗体が、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ）フラグメント、ＦｖフラグメントおよびｓｃＦｖフラグメントおよび最小認識単位からなる群から選択されることを特徴とする、請求項７５または７６に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項７９】

前記抗体が、薬剤、放射性核種、発蛍光団、酵素、毒素、治療剤、および化学療法剤から選択される成分と結合されており、

この検出可能なマーカーが、放射性同位元素、金属キレート剤、酵素、蛍光化合物、生物発光化合物、または化学発光化合物であることを特徴とする、請求項７５～７８のいずれかに記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項８０】

前記抗体が、ＴＭＥＭ２５ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ならびにこれらのフラグメントおよび変異体のいずれか１つと、それぞれの対応物との相互作用をブロックまたは阻害することを特徴とする、請求項７５～７８のいずれかに記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項８１】

前記抗体が、ＴＭＥＭ２５ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、またはこれらのフラグメントもしくは変異体と、それぞれの対応物との相互作用においてＴＭＥＭ２５ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、またはこれらのフラグメントもしくは変異体と置き換わること、またはＴＭＥＭ２５ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、またはこれらのフラグメントもしくは変異体と、それぞれの対応物との相互作用を増強することを特徴とする、請求項７５～７８のいずれかに記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項８２】

前記抗体が、ＴＭＥＭ２５タンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、およびＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質のいずれか１つを発現するがん細胞のアポトーシスまたは溶解を誘導することを特徴とする、請求項７５～７８のいずれかに記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項８３】

前記アポトーシスまたは溶解が、前記抗体のＣＤＣ活性またはＡＤＣＣ活性に関与していることを特徴とする、請求項８２に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項８４】

請求項５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項７０または７１に記載のヌクレオチド配列、請求項７２に記載の発現ベクター、請求項７３に記載の宿主細胞、または請求項７５～８３のいずれかに記載の抗体と、薬学的に許容される希釈剤または担体とを含む医薬組成物。

【請求項８５】

請求項５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項７０または７１に記載のヌクレオチド配列、請求

項７２に記載の発現ベクター、請求項７３に記載の宿主細胞、請求項７５～８３のいずれかに記載の抗体、および請求項８４に記載の医薬組成物のいずれか１つの使用であって、対象への投与によりＴ細胞の活性化が阻害または抑制されることを特徴とする使用。

【請求項８６】

請求項５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項７０または７１に記載のヌクレオチド配列、請求項７２に記載の発現ベクター、請求項７３に記載の宿主細胞、請求項７５～８３のいずれかに記載の抗体、および請求項８４に記載の医薬組成物のいずれか１つの、がんの治療のための使用。

【請求項８７】

請求項５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項７０または７１に記載のヌクレオチド配列、請求項７２に記載の発現ベクター、請求項７３に記載の宿主細胞、請求項７５～８３のいずれかに記載の抗体、および請求項８４に記載の医薬組成物のいずれか１つの、感染性障害の治療のための使用。

【請求項８８】

対象において、

ａ．サイトカインのアップレギュレート；

ｂ．Ｔ細胞の増殖の誘導；

ｃ．抗原特異的Ｔ細胞免疫の促進；

ｄ．ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞および／またはＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の活性化の促進

の１以上を行う方法であって、

請求項５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項７０または７１に記載のヌクレオチド配列、請求項７２に記載の発現ベクター、請求項７３に記載の宿主細胞、請求項７５～８３のいずれかに記載の抗体、および請求項８４に記載の医薬組成物のいずれか１つを対象に投与することを含む方法。

【請求項８９】

免疫系に関連した病態を治療または予防する方法であって、

免疫系に関連した病態の治療または予防を必要とする対象に、請求項５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチドのいずれか１つ、請求項６３～６９いずれかに記載の融合タンパク質、請求項７０または７１に記載のヌクレオチド配列、請求項７２に記載の発現ベクター、請求項７３に記載の宿主細胞、請求項７５～８３のいずれかに記載の抗体、および請求項８４に記載の医薬組成物のいずれかを有効量で投与することを含む方法。

【請求項９０】

前記の免疫系に関連した病態が、免疫関連病態；自己免疫疾患；移植拒絶反応；移植片対宿主病；前記のＴＭＥＭ２５ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチドおよびＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチドのいずれか１つによって媒介される免疫共刺激をブロックまたは促進するための状態；免疫関連疾患；ならびに／または（免疫共刺激を促進または抑制する）免疫療法のための状態を含むことを特徴とする、請求項８９に記載の方法。

【請求項９１】

前記の治療が、免疫関連病態の治療に有用な別の成分と組み合わされることを特徴とする請求項８９または９０に記載の方法。

【請求項９２】

前記成分が、コルチコステロイド類、シクロスポリン、シクロホスファミド、プレドニゾン、アザチオプリン、メトトレキサート、ラパマイシン、タクロリムスなどの免疫抑制剤；ＴＮＦ－α遮断剤もしくはＴＮＦ－αアンタゴニスト、または任意の炎症性サイトカインを標的とする他の生物学的薬剤などの生物学的薬剤；非ステロイド性抗炎症剤／Ｃｏｘ－２阻害剤；ヒドロキシクロロキン；スルファサラゾピリン；金塩；エタネルセプト；インフリキシマブ；ミコフェノール酸モフェチル；バシリキシマブ；アタシセプト；リツ

キシマブ；シトキサン；インターフェロンβ－１ａ；インターフェロンβ－１ｂ；酢酸グラチラマー；塩酸ミトキサントロン；アナキンラ；他のバイオロジクス；静脈内免疫グロブリン（ＩＶＩＧ）；ＩＦＮ－β－１ａ（ＲＥＢＩＦ（登録商標）およびＡＶＯＮＥＸ（登録商標））、ＩＦＮ－β－１ｂ（ＢＥＴＡＳＥＲＯＮ（登録商標））などのインターフェロン；酢酸グラチラマー（ＣＯＰＡＸＯＮＥ（登録商標））；ポリペプチド；ナタリズマブ（ＴＹＳＡＢＲＩ（登録商標））；ミトキサントロン（ＮＯＶＡＮＴＲＯＮＥ（登録商標））；細胞毒性剤；カルシニューリン阻害剤（たとえばシクロスポリンＡまたはＦＫ５０６）；免疫抑制マクロライド（たとえばラパマイシンまたはその誘導体（たとえば４０－Ｏ－（２－ヒドロキシ）エチル－ラパマイシン））；リンパ球ホーミング剤（たとえばＦＴＹ７２０またはそのアナログ）；コルチコステロイド類；シクロホスファミド；アザチオプリン；メトトレキサート；レフルノミドまたはそのアナログ；ミゾリビン；ミコフェノール酸；ミコフェノール酸モフェチル；１５－デオキシスペルグアリンまたはそのアナログ；免疫抑制モノクローナル抗体（たとえば、ＭＨＣ、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８、ＣＤ７、ＣＤ２５、ＣＤ２７、Ｂ７、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ５８、ＣＤ１３７、ＩＣＯＳ、ＣＤ１５０（ＳＬＡＭ）、ＯＸ４０、４－１ＢＢまたはこれらのリガンドなどの白血球レセプターに対するモノクローナル抗体）；他の免疫調節化合物（たとえばＣＴＬＡ４－Ｉｇ（アバタセプト、ＯＲＥＮＣＩＡ（登録商標））、ＣＤ２８－Ｉｇ、Ｂ７－Ｈ４－Ｉｇ、他の共刺激剤）；接着分子阻害剤（たとえばモノクローナル抗体（ｍＡｂ））；ＬＦＡ－１アンタゴニスト、セレクチンアンタゴニスト、ＶＬＡ－４アンタゴニストなどの低分子阻害剤；ならびに他の免疫調節剤からなる群から選択されることを特徴とする請求項９１に記載の方法。

【請求項９３】

前記の免疫関連病態が、自己免疫疾患、移植拒絶反応、および移植片対宿主病から選択されることを特徴とする請求項９０～９２のいずれかに記載の方法。

【請求項９４】

前記の自己免疫疾患が、再発寛解型多発性硬化症、一次進行型多発性硬化症および二次進行型多発性硬化症を含む多発性硬化症；乾癬；関節リウマチ；乾癬性関節炎；全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）；潰瘍性大腸炎；クローン病；良性リンパ球性血管炎；血小板減少性紫斑病；突発性血小板減少症；特発性自己免疫性溶血性貧血；赤芽球ろう；シェーグレン症候群；リウマチ性疾患；結合組織疾患；炎症性リウマチ；変形性リウマチ；非関節性リウマチ；若年性関節リウマチ；尿酸塩関節炎；筋肉リウマチ；慢性多発性関節炎；クリオグロブリン血管炎；ＡＮＣＡ関連血管炎；抗リン脂質症候群；重症筋無力症；自己免疫性溶血性貧血；ギラン・バレー症候群；慢性免疫性多発ニューロパチー；自己免疫性甲状腺炎；インスリン依存性糖尿病；１型糖尿病；アジソン病；膜性糸球体腎症；グッドパスチャー病；自己免疫性胃炎；自己免疫性萎縮性胃炎；悪性貧血；天疱瘡；尋常性天疱瘡；肝硬変；原発性胆汁性肝硬変；皮膚筋炎；多発性筋炎；線維筋炎；筋硬症；セリアック病；免疫グロブリンＡ腎症；ヘノッホ・シェーンライン紫斑病；エバンス症候群；アトピー性皮膚炎；乾癬；関節症性乾癬；グレーブス病；グレーブス眼症；強皮症；全身性強皮症；進行性全身性強皮症；喘息；アレルギー；原発性胆汁性肝硬変；橋本甲状腺炎；原発性粘液水腫；交感性眼炎；自己免疫性ぶどう膜炎；肝炎；慢性活動性肝炎；膠原病；強直性脊椎炎；肩関節周囲炎；結節性汎動脈炎；軟骨石灰化症；ヴェーゲナー肉芽腫症；顕微鏡的多発血管炎；慢性じんま疹；水疱性皮膚疾患；類天疱瘡；アトピー性湿疹；デビック病；小児自己免疫性溶血性貧血；難治性または慢性自己免疫性血球減少症；後天性血友病Ａにおける抗第VIII因子自己抗体の産生の予防；寒冷凝集素病；視神経脊髄炎；全身硬直症候群；歯肉炎；歯周炎；膵炎；心筋炎；血管炎；胃炎；痛風；痛風性関節炎；乾癬、アトピー性皮膚炎、湿疹、酒さ、蕁麻疹およびざ瘡からなる群から選択される炎症性皮膚疾患；正補体血症性蕁麻疹様血管炎；心膜炎；筋炎；抗合成酵素症候群；強膜炎；マクロファージ活性化症候群；ベーチェット症候群；ＰＡＰＡ症候群；Ｂｌａｕ症候群；痛風；成人および若年性スティル病；クリオピリン関連周期性症候群；マックル－ウェルズ症候群；家族性寒冷自己炎症性症候群；新生児期発症多臓器性炎症性疾患；家族性地中海熱；

慢性乳児期発症神経皮膚関節症候群；全身型若年性特発性関節炎；高ＩｇＤ症候群；シュニッツラー症候群；自己免疫性網膜症；加齢黄斑変性症；アテローム性動脈硬化症；慢性前立腺炎；ならびにＴＮＦ受容体関連周期性症候群（ＴＲＡＰＳ）からなる群から選択されることを特徴とする請求項９３に記載の方法。

【請求項９５】

前記の自己免疫疾患が、任意の型および亜型の、多発性硬化症、関節リウマチ、１型糖尿病、乾癬、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、ぶどう膜炎およびシェーグレン症候群からなる群から選択されることを特徴とする請求項９４に記載の方法。

【請求項９６】

感染症を治療または予防する方法であって、

感染症の治療または予防を必要とする対象に、請求項５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項７０または７１に記載のヌクレオチド配列、請求項７２に記載の発現ベクター、請求項７３に記載の宿主細胞、請求項７５～８３のいずれかに記載の抗体、および請求項８４に記載の医薬組成物のいずれか１つを有効量で投与することを含む方法。

【請求項９７】

前記の感染症が、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染および／または他の寄生虫感染によって引き起こされる疾患から選択されることを特徴とする、請求項９６に記載の方法。

【請求項９８】

前記の感染症が、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、伝染性単核症、ＥＢＶ、サイトメガロウイルス、ＡＩＤＳ、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、結核、マラリアおよび住血吸虫症から選択されることを特徴とする、請求項９７に記載の方法。

【請求項９９】

がんを治療または予防する方法であって、

がんの治療または予防を必要とする対象に、請求項５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチドのいずれか；請求項６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質；請求項７０または７１に記載のヌクレオチド配列；請求項７２に記載の発現ベクター；請求項７３に記載の宿主細胞；請求項７５～８３のいずれかに記載の抗体；および請求項８４に記載の医薬組成物のいずれか１つを有効量で投与することを含む方法。

【請求項１００】

前記の治療が、がんを治療するのに有用な別の成分または治療法と組み合わされることを特徴とする、請求項９９に記載の方法。

【請求項１０１】

前記の治療法が、放射線療法；抗体療法；化学療法；光線力学療法；養子Ｔ細胞療法；Ｔｒｅｇ除去；手術；または慣用の薬剤との併用療法であることを特徴とする、請求項１００に記載の方法。

【請求項１０２】

前記成分が、免疫抑制剤；細胞傷害剤；腫瘍ワクチン；抗体（たとえば、ベバシズマブ、アービタックス）；ペプチド；ペプチボディ；小分子；細胞傷害剤および細胞増殖抑制剤（たとえば、パクリタキセル、シスプラチン、ビノレルビン、ドセタキセル、ゲムシタビン、テモゾロミド、イリノテカン、５ＦＵ、カルボプラチン）などの化学療法剤；インターフェロンおよびインターロイキンなどの免疫調節剤；免疫刺激抗体；成長ホルモン；他のサイトカイン；葉酸；ビタミン；無機質；アロマターゼ阻害剤；ＲＮＡｉ；ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤；およびプロテアソーム阻害剤からなる群から選択されることを特徴とする請求項１０１に記載の方法。

【請求項１０３】

前記がんが、乳がん、子宮頸がん、卵巣がん、子宮内膜がん、メラノーマ、膀胱がん、肺がん、膵臓がん、結腸がん、前立腺がん、白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、骨髄性白血病、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病、甲状

腺がん、濾胞性甲状腺がん、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、線維肉腫、横紋筋肉腫、メラノーマ、ぶどう膜メラノーマ、奇形癌、神経芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、皮膚の良性腫瘍、角化棘細胞腫、腎臓がん、未分化大細胞リンパ腫、食道扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、濾胞性樹状細胞癌、腸がん、筋層浸潤がん、精巣腫瘍、表皮癌、脾臓がん、膀胱がん、頭頸部がん、胃がん、肝臓がん、骨がん、脳がん、網膜がん、胆道がん、小腸がん、唾液腺がん、子宮がん、精巣がん、結合組織がん、前立腺肥大症、脊髄形成異常、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、鼻咽腔がん、神経内分泌がん、骨髄異形成症候群、中皮腫、血管肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド、食道胃がん、ファローピウス管がん、腹膜がん、漿液性乳頭状ミュラー管がん、悪性腹水、消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）、リー・フラウメニ症候群、およびフォンヒッペル・リンダウ症候群（ＶＨＬ）からなる群から選択される、非転移性、浸潤性、または転移性のがんであることを特徴とする請求項９９～１０２のいずれかに記載の方法。

【請求項１０４】

前記がんが、メラノーマ、肝臓がん、腎臓がん、脳がん、乳がん、結腸がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、胃がん、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、急性および慢性リンパ芽球性白血病、ならびに急性および慢性骨髄白血病のいずれかであることを特徴とする請求項１０３に記載の方法。

【請求項１０５】

抗原に対する患者の二次免疫応答を増強する方法であって、
請求項５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項７０または７１に記載のヌクレオチド配列、請求項７２に記載の発現ベクター、請求項７３に記載の宿主細胞、請求項７５～８３のいずれかに記載の抗体、および請求項８４に記載の医薬組成物のいずれか１つを有効量で投与することを含む方法。

【請求項１０６】

前記の抗原が、がん抗原、ウイルス抗原または細菌抗原であり、前記患者が、抗がんワクチンまたはウイルスワクチンによる治療を受けたことのある患者であることを特徴とする、請求項１０５に記載の方法。

【請求項１０７】

患者に免疫療法を行う方法であって、
ａ．患者または患者から単離した白血球に、請求項５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項７０もしくは７１に記載のヌクレオチド配列、請求項７２に記載の発現ベクター、請求項７３に記載の宿主細胞、請求項７５～８３のいずれかに記載の抗体、または請求項８４に記載の医薬組成物を有効量で投与し、寛容原性制御性細胞の分化を誘導することを含む、
インビボまたはエクスビボにおける寛容誘導；
ｂ．エクスビボにおける前記細胞の濃縮および増殖；ならびに
ｃ．前記患者への寛容原性制御性細胞の自己輸血
を含む方法。

【請求項１０８】

請求項５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項７０または７１に記載のヌクレオチド配列、請求項７２に記載の発現ベクター、請求項７３に記載の宿主細胞、請求項７５～８３のいずれかに記載の抗体、および請求項８４に記載の医薬組成物の少なくとも１つをがんワクチンアジュバントとして使用する方法であって、
免疫応答を誘導できる量の標的とする腫瘍関連抗原調製物と、がんワクチンアジュバントとを免疫化に適した処方で患者に投与することを含み、
該がんワクチンアジュバント存在下における該腫瘍関連抗原に対する免疫応答が、該がんワクチンアジュバント非存在下におけるものよりも強力であることを特徴とする方法。

【請求項１０９】

感染症の治療を目的として、請求項５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項７０または７１に記載のヌクレオチド配列、請求項７２に記載の発現ベクター、請求項７３に記載の宿主細胞、請求項７５～８３のいずれかに記載の抗体、および請求項８４に記載の医薬組成物のいずれか１つの投与と、抗原を用いた治療用ワクチン接種とを組み合わせる方法。

【請求項１１０】

免疫応答を増強させる目的で、請求項５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項７０または７１に記載のヌクレオチド配列、請求項７２に記載の発現ベクター、請求項７３に記載の宿主細胞、請求項７５～８３のいずれかに記載の抗体、および請求項８４に記載の医薬組成物のいずれかの１つと、アジュバントと、ワクチン中の抗原とを組み合わせる方法。

【請求項１１１】

前記の抗原が、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、寄生虫抗原および／または別の病原体の抗原であることを特徴とする、請求項１０９または１１０に記載の方法。

【請求項１１２】

試料中の配列番号：１～８、および５８のいずれかで示されるポリペプチドのいずれか１つまたは該ポリペプチドと少なくとも９５％の同一性を有するその変異体を検出するためのアッセイ。

【請求項１１３】

対象の疾患を診断する方法であって、対象から得られた試料または対象において、配列番号１～８、および５８のいずれかに示されるポリペプチドのいずれか、または該ポリペプチドと少なくとも９５％の同一性を有するその変異体、またはこれらのフラグメントを検出することを含む方法。

【請求項１１４】

前記ポリペプチドの検出がインビボまたはインビトロで行われることを特徴とする、請求項１１３に記載の方法。

【請求項１１５】

前記の検出がイムノアッセイによって行われることを特徴とする請求項１１３に記載の方法。

【請求項１１６】

前記の検出が請求項７５～８３のいずれかに記載の抗体またはフラグメントを使用して行われることを特徴とする請求項１１３に記載の方法。

【請求項１１７】

ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、またはＴＭＥＭ２５媒介性シグナル伝達を調節することができる生物活性剤を、少なくとも１種の免疫細胞活性を調節するのに効果的な量で使用して、免疫細胞活性を調節する方法。

【請求項１１８】

前記の薬剤が、免疫細胞活性を阻害または減弱することを特徴とする、請求項１１７に記載の方法。

【請求項１１９】

前記の薬剤が、免疫細胞活性を誘導または増強することを特徴とする、請求項１１７に記載の方法。

【請求項１２０】

ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質またはＴＭＥＭ２５タンパク質の活性を調節することによりがんを治療または予防することを特徴とする請求項１１７に記載の方法。

【請求項１２１】

前記の投与される薬剤が、がん細胞に対するＴ細胞活性を増強する抗体またはフラグメントであることを特徴とする請求項１１７に記載の方法。

【請求項１２２】

前記の薬剤が、請求項５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、請求項６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、請求項７０もしくは７１に記載のヌクレオチド配列、請求項７２に記載の発現ベクター、請求項７３に記載の宿主細胞、請求項７５～８３のいずれかに記載の抗体、または請求項８４に記載の医薬組成物のいずれか１つを含むことを特徴とする、請求項１１７～１２１のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、免疫療法；がん、感染性障害および／または免疫関連障害の治療；ならびに医薬品開発のための標的として適切なＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質およびＬＳＲタンパク質、これらの可溶性分子および結合体、ならびにこれらに対する抗体に関する。

【背景技術】

【０００２】

ナイーブＴ細胞が活性化されて産生能を獲得するためには、抗原提示細胞（ＡＰＣ）からの２つの独立したシグナルを受け取らなければならない。第１のシグナル（シグナル１）は抗原特異的であり、Ｔ細胞抗原レセプターがＡＰＣ上に提示された適切な抗原－ＭＨＣ複合体に遭遇すると発生する。免疫応答の運命は、ＡＰＣに発現されたリガンドと噛み合ったＴ細胞共刺激分子によって伝達される第２の抗原非依存性シグナル（シグナル２）によって決定される。この第２のシグナルは刺激性（正の共刺激）または抑制性（負の共刺激または共抑制）であり得る。共刺激シグナルがない場合または共抑制シグナルがある場合、Ｔ細胞の活性化は損なわれ中断される。これによって、（Ｔ細胞アナジーとして知られている）抗原特異的不応答が誘導され、あるいはＴ細胞アポトーシス死が引き起こされる。

【０００３】

通常、共刺激分子対は、ＡＰＣ上に発現されたリガンドとＴ細胞上に発現されたその対応レセプター（ｃｏｇｎａｔｅ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ）とからなる。共刺激分子であるリガンド／レセプター対のプロトタイプはＢ７／ＣＤ２８およびＣＤ４０／ＣＤ４０Ｌである。Ｂ７ファミリーは、免疫応答に刺激性または抑制性シグナルをもたらす、構造的に関連した細胞表面タンパク質リガンド群からなる。Ｂ７ファミリーのメンバーは、構造的に関連し、少なくとも１つの可変または定常免疫グロブリンドメインを含む細胞外ドメインを有する。

【０００４】

正および負の共刺激シグナルはともに、細胞性免疫応答の制御において重要な役割を果たしており、これらのシグナルを媒介する分子は免疫調節において有効な標的であることが証明されている。この知見に基づいて、共刺激分子を標的とした治療アプローチがいくつか開発されており、このような治療アプローチは、がん患者の免疫応答を作動させることまたは免疫応答の停止を阻止することによるがんの予防および治療、ならびに自己免疫疾患、炎症性疾患、同種移植拒絶を有する対象において、制御されていない免疫応答を停止することまたは負の共刺激（または共抑制）を介して「オフ・シグナル」を誘導することによる、これらの病態の予防および治療に有用であることが示されている。

【０００５】

Ｂ７リガンドによって伝達されるシグナルを操作することにより、自己免疫疾患、炎症性疾患および移植拒絶反応を治療できる可能性がある。治療戦略は、共刺激対のレセプターまたはリガンドに対するモノクローナル抗体を使用して、あるいは、適切なリガンドを結合またはブロックしうる共刺激レセプターを含む可溶性融合タンパク質を使用して共刺激をブロックすることを含む。別のアプローチは、抑制性リガンドの可溶性融合タンパク質を使用して共抑制を誘導することである。これらのアプローチは、少なくとも部分的に、（自己免疫疾患または移植において発症の原因となる）自己反応性Ｔ細胞またはアロ反応性Ｔ細胞を最終的に除去することに依るが、これはおそらく、（細胞生存遺伝子を誘導

する）共刺激なしにはＴ細胞はアポトーシスの誘導を極めて受けやすくなるからである。したがって、病原体に対して防御する免疫系の能力を損なうことなく、共刺激シグナルを調節することができる新規の薬剤は、上記の病態の治療および予防には非常に有利である。

【０００６】

共刺激経路は腫瘍の増殖に重要な役割を果たす。興味深いことに、腫瘍は、Ｂ７－ＣＤ２８およびＴＮＦファミリーにおける共刺激因子を抑制してＴ細胞の活性化を阻害し、かつＴ細胞の抗腫瘍応答を抑制する制御性Ｔ細胞を誘引することにより、免疫破壊を回避することが示されている（Wang (2006) Immune Suppression by Tumor Specific $CD4^+$ Regulatory T cells in Cancer. Semin. Cancer. Biol. 16:73-79;Greenwald, et al. (2005) The B7 Family Revisited. Ann. Rev. Immunol. 23:515-48;Watts (2005) TNF/TNFR Family Members in Co-stimulation of T Cell Responses Ann. Rev. Immunol. 23:23-68;Sadum, et al. (2007) Immune Signatures of Murine and Human Cancers Reveal Unique Mechanisms of Tumor Escape and New Targets for Cancer Immunotherapy. Clin. Cane. Res. 13(13): 4016-4025）。このような、腫瘍により発現される共刺激分子はがんバイオマーカーとして注目を集めており、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）として使用することもできる。さらに、共刺激経路は、Ｔ細胞依存性免疫応答の開始時および転移腫瘍内のエフェクター機能において、Ｔ細胞依存性免疫応答を弱める免疫チェックポイントであると同定されている。改変がんワクチンの改良に伴い、このような免疫チェックポイントが、ワクチンを用いて治療目的で抗腫瘍応答を誘導する際の主な障壁となっていることが明らかとなっている。この点において、共刺激分子は、能動的がん免疫療法（ワクチン接種）および（抗体を介した）受動的がん免疫療法のためのアジュバントとして使用することができ、免疫寛容を抑制し、かつ免疫系を刺激するための戦略を提供することができる。

【０００７】

さらに、このような薬剤は、腫瘍特異的Ｔ細胞集団を発展させて腫瘍細胞を攻撃し破壊するように仕向ける養子免疫療法などの他の種類のがん免疫療法に有用であり得る。このような抗腫瘍応答を増強することができる薬剤は、治療剤として有効である可能性が高く、腫瘍免疫療法の障害を乗り越える取り組みにおいて有益であり得る。最近、共刺激経路のいくつかを調節する新規の薬剤が、がん免疫療法として実際に臨床導入された。

【０００８】

急性および慢性感染症に関する様々な研究から得られたデータによって、負の共刺激レセプターが感染症の制御においても重要な役割を果たしていることが裏付けられている。急性ウイルス感染の後に発生するメモリーＣＤ８Ｔ細胞は、非常に高機能であり、感染防御免疫の重要な構成要素である。共刺激経路の調節も、メモリーＴ細胞による応答を防御能に制限することによる抗ウイルス免疫の最適化に効果的であることが証明されている（Teijaro et al., J Immunol. 2009: 182; 5430-5438）。これはインフルエンザ感染モデルにおいて実証されている。すなわち、ＣＴＬＡ４－Ｉｇで阻害したＣＤ２８共刺激は、インフルエンザ感染ナイーブマウスにおける一次免疫応答を抑制したが、インフルエンザに対するメモリーＣＤ４Ｔ細胞媒介性二次応答においては顕著な治療効果が示され、臨床転帰が改善しインフルエンザチャレンジに対する生存率が上昇した。

【０００９】

慢性感染症は、様々な程度のウイルス特異的Ｔ細胞応答の機能障害を特徴とすることが多く、この機能障害が、持続感染している病原体を宿主が排除できない主な理由となっている。機能性エフェクターＴ細胞は、当初は感染の初期段階において産生されるが、外来抗原に持続的に暴露された結果、感染が慢性化するのに伴い徐々にその機能を失い、Ｔ細胞の疲弊が起こる。疲弊したＴ細胞は、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１およびＬＡＧ３などの複数の共抑制性レセプターを高発現する（Crawford et al., Curr Opin Immunol. 2009;21: 179-186; Kaufmann et al., J Immunol 2009;182:5891-5897, Sharpe et al., Nat Immunol 2007;8:239-245）。疲弊したＴ細胞によるＰＤ－１の過剰発現は、ＨＩＶ、ＨＣＶおよびＨＢＶを含む慢性ウイルス感染の罹患患者において臨床的に観察されている（Crawfo

rd et al., Curr Opin Immunol 2009;21:179-186; Kaufmann et al., J Immunol 2009;182:5891-5897, Sharpe et al., Nat Immunol 2007;8:239-245）。他のウイルス、細菌および寄生虫を含むさらなる病原体におけるこの経路に関する調査がいくつか行われている（Hofmeyer et al., J Biomed Biotechnol. Vol 2011, Art. ID 451694, Bhadra et al., Proc Natl Acad Sci. 2011;108(22):9196-201）。たとえば、標準的な盲腸結紮穿孔法によって誘導された敗血症モデルにおいて、ＰＤ－１経路が細菌感染の制御に関連していることが示された。ノックアウトマウスにおいては、ＰＤ－１を欠損させたことにより敗血症の誘導による死を免れた（Huang et al., PNAS 2009: 106; 6303-6308）。

【００１０】

Ｔ細胞の疲弊は、ＰＤ－１やＣＴＬＡ－４などの共抑制経路をブロックすることにより回復させることができ（Rivas et al., J Immunol. 2009 ;183:4284-91; Golden-Mason et al., J Virol. 2009;83:9122-30; Hofmeyer et al., J Biomed Biotechnol. Vol 2011, Art. ID 451694）、これによって抗ウイルス免疫機能の回復させることができる。ウイルス感染を治療する目的の共抑制のブロックは、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路をブロックすることによりその治療適用の可能性が広く研究され、アカゲザルの急性および慢性サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）感染症（Valu et al., Nature 2009; 458:206-210）、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（ＬＣＭＶ）などの慢性ウイルス感染症のマウスモデル（Barber et al., Nature. 2006;439:682-7）、およびＳＪＬ／Ｊマウスのタイラーマウス脳脊髄炎ウイルス（ＴＭＥＶ）モデル（Duncan and Miller PLoS One. 2011;6:e18548）を含む感染症動物モデルのいくつかにおいて効果的であることが示された。これらのモデルにおいて、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１の遮断は、抗ウイルス応答を改善し、持続感染ウイルスの排除を促進させた。さらに、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１のブロックによって体液性免疫が増強したことが血漿中特異的抗ウイルス抗体の産生の増加により示され、この体液性免疫の増強とともに細胞性応答を改善させると、血漿中ウイルス量が減少し、生存率が上昇した。

【００１１】

ＰＤ－１やＣＴＬＡ－４などの負のシグナル経路のブロックは、宿主の免疫系を回復することができ、さらなる刺激に対して応答することを可能にする。抑制性シグナルのブロックと治療用ワクチン接種との組み合わせは相乗的に機能性ＣＤ８Ｔ細胞応答を増強し、慢性感染症を有する個体におけるウイルス制御を向上させ得、ヒト免疫不全ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルスなどの慢性ウイルス感染症の治療に有望な戦略を提供することができる（Ha et al, Immunol Rev. 2008 Jun; 223:317-33）。最近の研究結果では、ＰＤ－１経路をブロックすると、ＨＣＶ感染症を有する対象へのＨＢＶワクチン接種においてＴ細胞応答が向上したことが示されており、この経路をブロックすることによって慢性ウイルス感染経過中の免疫化の成功率を向上できる可能性が提示されている（Moorman et al, Vaccine. 2011 Apr 12;29(17):3169-76）。現在、ＰＤ－１およびＣＴＬＡ－４に対する抗体は、予防ワクチンや治療ワクチンと組み合わせるのに有望な候補物質として、慢性Ｃ型肝炎を対象に臨床試験が行われている（Diepolder and Obst, Expert Rev Vaccines. 2010 Mar;9(3):243-7）。さらに、ＰＤ－１のブロックは、エピトープ特異的Ｔ細胞を増加させて予防ワクチン接種の有効性を高める（Finnefrock et al., J Immunol 2009;182;980-987）。

【００１２】

ウイルス感染モデルを使用した最近の研究では、慢性感染症の治療を目的とした共抑制経路のブロックに加え、ウイルスに対するメモリー応答において正の共刺激シグナルが重要であることが強調されている。ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＯＸ４０などの共刺激分子は、ウイルス特異的メモリーＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の生存、発生、維持、および質とも関連があるとされている。共刺激シグナルの伝達によって、ウイルス特異的メモリーＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の発生および機能の増強が補助される。ワクチン中のウイルス抗原に共刺激分子をアジュバントとして組み合わせて使用すると、効果的な抗原特異的メモリーＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答の発生を促進し得るため、ワクチンを改善できる可能性がある（Duttagupta et al, Crit Rev Immunol. 2009;29(6):469-86）。

【００１３】
さらに、最近の研究では、ワクチンにより惹起されたマウスの抗原特異的Ｔ細胞応答において、可溶性ＰＤ－１（ｓＰＤ－１）がＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１の結合をブロックする効果が評価された。ｓＰＤ－１とＤＮＡワクチンまたはアデノウイルスベースワクチンとの同時投与により抗原特異的ＣＤ８$^{(+)}$Ｔ細胞応答が増加したことから、ｓＰＤ－１はワクチンの種類に関係なくアジュバント効果を発揮することが示された（Song et al, J Immunother. 2011 Apr;34(3):297-306）。この研究のこれらの結果およびさらなる結果は、負の共刺激タンパク質の可溶性細胞外ドメイン（ＥＣＤ）をアジュバントとして使用する免疫化戦略を、ワクチン接種によって惹起された抗原特異的Ｔ細胞免疫を増強するために使用できる可能性を示唆している。

【００１４】
Ｂ細胞は、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）やシェーグレン病などの数多くの自己免疫疾患の発症および持続において、病原性自己抗体の産生を介して重要な役割を有していると長い間考えられてきた。しかしながら、関節リウマチ（ＲＡ）や１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）などの従来主としてＴ細胞により媒介されると考えられていた臓器特異的自己免疫疾患の病因においても、Ｂ細胞が他の多くの重要な機能を果たしていることは明らかである（Wong et al 2010, Curr Opin Immunol. 22:723-731）。

【００１５】
Ｔ細胞によるＢ細胞の補助は適応免疫応答における中心的プロセスである。濾胞ヘルパーＴ（Ｔｆｈ）細胞は、Ｂ細胞の補助に特化したＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞サブセットである。（Crotty, Annu. Rev. Immunol. 29: 621-663, 2011において再検討されている）。Ｔｆｈ細胞は、ＣＸＣＬ１３依存的にＴｆｈ細胞をリンパ節内のＢ細胞濾胞に移動させる、Ｂ細胞ホーミングケモカインレセプター（ＣＸＣＲ５）を発現する。Ｔｆｈ細胞は、最初にＴ細胞領域とＢ細胞濾胞の境界において対応するＢ細胞（ｃｏｇｎａｔｅ Ｂ ｃｅｌｌ）と相互作用し、次いで、胚中心Ｂ細胞への分化および濾胞内における胚中心形成を誘導する（Crotty, Annu. Rev. Immunol. 29: 621-663, 2011において再検討されている）。Ｂ細胞の補助にＴｆｈ細胞が必要であることおよびＴ細胞依存性抗体応答は、この細胞が様々な種類の感染性因子に対する感染防御免疫や合理的なワクチン設計に非常に重要であることを示している。驚くべきことではないが、Ｔｆｈ細胞の調節異常および異常蓄積も、シェーグレン病や自己免疫性関節炎などの自己免疫疾患と関連があるとされている（Yu and Vinuesa, 2010, Cell. Mol. Immunol. 7: 198-203）。

【００１６】
Ｔｆｈ細胞は選択的に多くの表面タンパク質を発現し、これらの表面タンパク質はＴｆｈ細胞の選択的局在（ＣＸＣＲ５など）およびＢ細胞を補助するためのＢ細胞との直接的な物理的相互作用に関連する。後者に関連する表面タンパク質群には、誘導性共刺激レセプターであるＩＣＯＳ、ならびに負の共刺激因子（抑制性レセプター）であるＰＤ－１およびＢＴＬＡ（Crotty, Annu. Rev. Immunol. 29: 621-663, 2011）を含む、Ｔｆｈ細胞において高発現されている共刺激タンパク質ファミリーのいくつかのメンバーが含まれている。したがって、Ｔｆｈ細胞のサブセットも共刺激経路および共抑制経路の調節によって制御されている可能性があり、Ｂ細胞の機能に対する効果に寄与している。

【００１７】
様々な共刺激タンパク質に対するアゴニストおよび／またはアンタゴニストを使用した共刺激の調節は、自己免疫疾患、移植片拒絶、アレルギーおよびがんを治療するための戦略として広く研究されている。この分野においては、ＲＡ治療用として承認されたＣＴＬＡ４－Ｉｇ（アバタセプト（Ａｂａｔａｃｅｐｔ）、Ｏｒｅｎｃｉａ（登録商標））、腎臓の急性移植拒絶反応の予防のためのＣＴＬＡ４－Ｉｇ変異体（ベラタセプト（Ｂｅｌａｔａｃｅｐｔ）、Ｎｕｌｏｊｉｘ（登録商標））、メラノーマ治療用として最近承認された抗ＣＴＬＡ４抗体（イピリムマブ（Ｉｐｉｌｉｍｕｍａｂ）、Ｙｅｒｖｏｙ（登録商標））が臨床的に先駆けて開発されている。現在、進行性／転移性腎明細胞癌（ＲＣＣ）の治療用として開発中の抗ＰＤ－１抗体（ＭＤＸ－１１０６）や、同種腎移植移植の治療の

ための抗ＣＤ４０Ｌ抗体（ＢＧ９５８８、Ａｎｔｏｖａ（登録商標））などの他の共刺激調節因子も臨床開発が進行中である。さらに、このような薬剤はウイルス感染症のための薬剤としても臨床開発が進められており、たとえば、Ｃ型肝炎の治療用として試験中の抗ＰＤ－１抗体ＭＤＸ－１１０６や、Ｃ型肝炎ウイルス患者の肝細胞癌において臨床試験中の抗ＣＴＬＡ－４抗体ＣＰ－６７５，２０６（トレメリムマブ（ｔｒｅｍｅｌｉｍｕｍａｂ））などが挙げられ、癌腫およびウイルスの複製に対する効果を試験することを目的に研究が行われている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１８】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、新規の治療用組成物および診断用組成物であって、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質、ＬＳＲタンパク質の細胞外ドメイン、可溶性形態、もしくは分泌形態；その変異体、オーソログ、および／もしくはフラグメント；これらのいずれかを含む結合体；ならびに／またはこれらのいずれかをコードする核酸配列を含む治療用および診断用組成物を提供する。

【００１９】

公知の（野性型）ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（lymphocyte antigen 6 complex locus protein G6f、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿００１００３６９３、配列番号１）の全アミノ酸配列を図１Ａに示す。公知の（野性型）ＶＳＩＧ１０タンパク質（V-set and immunoglobulin domain-containing protein 10、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９、配列番号３）の全アミノ酸配列、およびＶＳＩＧ１０の新規変異体（配列番号５）のアミノ酸配列を図１Ｂおよび図１Ｃにそれぞれ示す。ＶＳＩＧ１０の新規変異体（配列番号５）および公知の（野性型）ＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３）のアミノ酸配列アライメントを図２Ａに示す。公知の（野性型）ＴＭＥＭ２５タンパク質（Transmembrane protein 25、Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ受託番号：Ｑ８６ＹＤ３、配列番号７）の全アミノ酸配列を図１Ｄに示す。公知の（野性型）ＬＳＲタンパク質（lipolysis-stimulated lipoprotein receptor isoform 2、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の全アミノ酸配列を配列番号６２に示す。ＬＳＲ変異体のアミノ酸配列、配列番号１１、１３、１５、１６、１７および１８を、図１Ｅ、１Ｆ、１Ｇ、１Ｈ、１Ｉおよび１Ｊにそれぞれ示す。ＬＳＲ変異体（配列番号１１、１３、１５、１６、１７および１８）および従来公知のＬＳＲ配列（配列番号６２～６７）のアミノ酸配列アライメントを図２Ｂ、２Ｃ、２Ｄ、２Ｅ、２Ｆ、および２Ｇにそれぞれ示す。

【００２０】

実施形態の少なくともいくつかによれば、配列番号１１、１３、１５～１８、６７および１４３からなる群から選択される配列の可溶性細胞外ドメインの少なくとも９８個のアミノ酸、配列番号１および５８からなる群から選択される配列の可溶性細胞外ドメインの少なくとも６２個のアミノ酸、配列番号３および５からなる群から選択される配列の可溶性細胞外ドメインの少なくとも３６個のアミノ酸、もしくは配列番号７の可溶性細胞外ドメインの少なくとも４６個のアミノ酸を含む単離されたポリペプチド；配列番号５に示されるアミノ酸配列から実質的になる単離されたポリペプチド；これらと少なくとも９５％の配列同一性を有する変異体；またはこれらの変異体、オーソログ、もしくはフラグメントが提供される。

【００２１】

上記の単離されたポリペプチドは、配列番号１１、１３、１５～１８、６７および１４３からなる群から選択される配列の９８個～１８０個のアミノ酸；配列番号１および５８からなる群から選択される配列の６２個～２２８個のアミノ酸；配列番号３および５からなる群から選択される配列の３６個～３９３個のアミノ酸；または配列番号７の４６個～２１６個のアミノ酸のみを含んでいてもよい。

【００２２】

さらに、上記の単離されたポリペプチドは、配列番号１１、１３、１５～１８、６７および１４３からなる群から選択される配列の９８個～１１８個、１３５個～１５５個、もしくは１６０個～１８０個のアミノ酸のみを含むポリペプチド；配列番号１および５８からなる群から選択される配列の６２個～８２個、９５個～１１５個、もしくは２０８個～２２８個のアミノ酸のみを含むポリペプチド；配列番号３および５からなる群から選択される配列の３６個～７０個、８０個～１００個、１７０個～２００個、２６５個～２９０個、もしくは３６５個～３９３個のアミノ酸のみを含むポリペプチド；または配列番号７の４６個～６６個、８４個～１０４個、もしくは１９６個～２１６個のアミノ酸のみを含むポリペプチドからなる群から選択されてもよい。

【００２３】

さらに、上記の単離されたポリペプチドは、配列番号１および５８からなる群から選択される配列の約７２個、１０６個、もしくは２１８個のアミノ酸；配列番号１１、１３、１５～１８、６７および１４３からなる群から選択される配列の約１０８個、１４５個、もしくは１７０個のアミノ酸；配列番号７の約５６個、９４個、もしくは２０６個のアミノ酸；または配列番号３および５の約４６個、４９個、５８個、６０個、８７個、８９個、９３個、９４個、１７８個、１８２個、１８５個、１８７個、２７３個、２７９個、２８２個、３７４個もしくは３８３個のアミノ酸のみを含んでいてもよい。

【００２４】

さらに、上記の単離されたポリペプチドは、配列番号１２、２、４～６、８、１４、４７～５０、１０、１５～１８、２２、３９、５９～６１、および８１～１０２のいずれかに示されたアミノ酸配列と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列から実質的になっていてもよい。上記の単離されたポリペプチドは、配列番号１２、２、４～６、８、１４、４７～５０、１０、１５～１８、２２、３９、５９～６１、および８１～１０２のいずれかに示されたアミノ酸配列から実質的になっていてもよく、この態様が好ましい。

【００２５】

上記の単離されたポリペプチドは、ＬＳＲ、ＴＭＥＭ２５、ＶＳＩＧ１０、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、またはそのフラグメントもしくは変異体と、それぞれの機能性対応物との相互作用をブロックまたは阻害してもよい。

【００２６】

上記の単離されたポリペプチドは、ＬＳＲ、ＴＭＥＭ２５、ＶＳＩＧ１０、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、またはそのフラグメントもしくは変異体と、それぞれの機能性対応物との相互作用においてＬＳＲ、ＴＭＥＭ２５、ＶＳＩＧ１０、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、またはそのフラグメントもしくは変異体と置き換わってもよく、またはＬＳＲ、ＴＭＥＭ２５、ＶＳＩＧ１０、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、またはそのフラグメントもしくは変異体と、それぞれの機能性対応物との相互作用を増強してもよい。

【００２７】

上記の単離されたオーソログは、配列番号９および１９～２１から選択されるマウスポリペプチドであってもよい。

【００２８】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、ＶＳＩＧ１０タンパク質の不連続部分（フラグメント）を含む以下の単離されたポリペプチドを提供する。

Ａ．単離されたキメラポリペプチドであって、

公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３）の１位～１２０位のアミノ酸およびＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）の１位～１２０位のアミノ酸に相当する配列、

ＭＡＡＧＧＳＡＰＥＰＲＶＬＶＣＬＧＡＬＬＡＧＷＶＡＶＧＬＥＡＶＶＩＧＥＶＨＥＮＶＴＬＨＣＧＮＩＳＧＬＲＧＱＶＴＷＹＲＮＮＳＥＰＶＦＬＬＳＳＮＳＳＬＲＰＡＥＰＲＦＳＬＶＤＡＴＳＬＨＩＥＳＬＳＬＧＤＥＧＩＹＴＣＱＥＩＬＮＶＴＱＷＦＱＶＷＬＱＶＡ

と少なくとも９５％の相同性を有する第１のアミノ酸配列と、

Ｎを含む第２の架橋アミノ酸配列と、

公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３）の２２３位～５４０位のアミノ酸およびＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）の１２２位～４３９位のアミノ酸に相当する配列、
ＰＰＰＳＡＰＱＣＷＡＱＭＡＳＧＳＦＭＬＱＬＴＣＲＷＤＧＧＹＰＤＰＤＦＬＷＩＥＥＰＧＧＶＩＶＧＫＳＫＬＧＶＥＭＬＳＥＳＱＬＳＤＧＫＫＦＫＣＶＴＳＨＩＶＧＰＥＳＧＡＳＣＭＶＱＩＲＧＰＳＬＬＳＥＰＭＫＴＣＦＴＧＧＮＶＴＬＴＣＱＶＳＧＡＹＰＰＡＫＩＬＷＬＲＮＬＴＱＰＥＶＩＩＱＰＳＳＲＨＬＩＴＱＤＧＱＮＳＴＬＴＩＨＮＣＳＱＤＬＤＥＧＹＹＩＣＲＡＤＳＰＶＧＶＲＥＭＥＩＷＬＳＶＫＥＰＬＮＩＧＧＩＶＧＴＩＶＳＬＬＬＬＧＬＡＩＩＳＧＬＬＬＨＹＳＰＶＦＣＷＫＶＧＮＴＳＲＧＱＮＭＤＤＶＭＶＬＶＤＳＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＥＤＡＡＶＧＥＱＥＧＡＲＥＲＥＥＬＰＫＥＩＰＫＱＤＨＩＨＲＶＴＡＬＶＮＧＮＩＥＱＭＧＮＧＦＱＤＬＱＤＤＳＳＥＥＱＳＤＩＶＱＥＥＤＲＰＶ
と少なくとも９５％の相同性を有する第３のアミノ酸配列とを含み、
第１のアミノ酸配列、第２の架橋アミノ酸配列および第３アミノ酸配列が、この順に連続して配置されているキメラポリペプチド。

Ｂ．ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）のエッジ部（ｅｄｇｅ　ｐｏｒｔｉｏｎ）の単離ポリペプチドであって、
長さ「ｎ」を有するポリペプチドを含み（ｎは、少なくとも約１０アミノ酸長であり、少なくとも約２０アミノ酸長であってもよく、好ましくは少なくとも約３０アミノ酸長、より好ましくは少なくとも約４０アミノ酸長、最も好ましくは少なくとも約５０アミノ酸長である）、該ポリペプチドにおいて少なくとも３個のアミノ酸が、ＡＮＰを含み、かつ１２０－ｘ～１２０の範囲の任意のアミノ酸番号から１２２＋（（ｎ－３）－ｘ）（式中、ｘは０～ｎ－３で変動する）で示される任意のアミノ酸番号までの配列で表される構造（番号付けはＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に準ずる）を有する単離されたポリペプチド。

【００２９】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明はさらに、ＶＳＩＧ１０タンパク質の不連続部分に相当するアミノ酸残基配列（ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）の新たな接合部およびエッジ部に相当）を含む単離されたポリペプチドを提供する。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）の新たな接合部に特有の配列を、図２Ａのタンパク質配列アラインメントに示す。

【００３０】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、ＬＳＲタンパク質の不連続部分（フラグメント）を含む以下の単離されたポリペプチドを提供する。

Ａ．単離されたキメラポリペプチドであって、
公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２）の４９位～２５８位のアミノ酸およびＬＳＲ変異体アイソフォームｆ（配列番号１８）の１位～２１０位のアミノ酸に相当する配列、
ＭＡＬＬＡＧＧＬＳＲＧＬＧＳＨＰＡＡＡＧＲＤＡＶＶＦＶＷＬＬＬＳＴＷＣＴＡＰＡＲＡＩＱＶＴＶＳＮＰＹＨＶＶＩＬＦＱＰＶＴＬＰＣＴＹＱＭＴＳＴＰＴＱＰＩＶＩＷＫＹＫＳＦＣＲＤＲＩＡＤＡＦＳＰＡＳＶＤＮＱＬＮＡＱＬＡＡＧＮＰＧＹＮＰＹＶＥＣＱＤＳＶＲＴＶＲＶＶＡＴＫＱＧＮＡＶＴＬＧＤＹＹＱＧＲＲＩＴＩＴＧＮＡＤＬＴＦＤＱＴＡＷＧＤＳＧＶＹＹＣＳＶＶＳＡＱＤＬＱＧＮＮＥＡＹＡＥＬＩＶＬＧＲＴＳＧＶＡＥＬＬＰＧＦＱＡＧＰＩＥ
と少なくとも９５％の相同性を有する第１のアミノ酸配列と、
Ｖを含む第２の架橋アミノ酸配列と、
公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２）の３０９位～６４９位のアミノ酸およびＬＳＲ変異体アイソフォームｆ（配列番号１８）の２１２位～５５２位のアミノ酸に相当する配列、
ＹＡＡＧＫＡＡＴＳＧＶＰＳＩＹＡＰＳＴＹＡＨＬＳＰＡＫＴＰＰＰＰＡＭＩＰＭＧＰＡＹＮＧＹＰＧＧＹＰＧＤＶＤＲＳＳＳＡＧＧＱＧＳＹＶＰＬＬＲＤＴＤＳＳＶＡＳＥＶＲＳＧＹＲＩＱＡＳＱＱＤＤＳＭＲＶＬＹＹＭＥＫＥＬＡＮＦＤＰＳＲＰＧＰＰＳＧＲＶＥＲＡＭＳＥＶＴＳＬＨＥＤＤＷＲＳＲＰＳＲＧＰＡＬＴＰＩＲＤＥＥＷＧＧＨＳＰＲＳＰ

ＲＧＷＤＱＥＰＡＲＥＱＡＧＧＧＷＲＡＲＲＰＲＡＲＳＶＤＡＬＤＤＬＴＰＰＳＴＡＥＳ
ＧＳＲＳＰＴＳＮＧＧＲＳＲＡＹＭＰＰＲＳＲＳＲＤＤＬＹＤＱＤＤＳＲＤＦＰＲＳＲＤ
ＰＨＹＤＤＦＲＳＲＥＲＰＰＡＤＰＲＳＨＨＨＲＴＲＤＰＲＤＮＧＳＲＳＧＤＬＰＹＤＧ
ＲＬＬＥＥＡＶＲＫＫＧＳＥＥＲＲＲＰＨＫＥＥＥＥＥＡＹＹＰＰＡＰＰＰＹＳＥＴＤＳ
ＱＡＳＲＥＲＲＬＫＫＮＬＡＬＳＲＥＳＬＶＶ
と少なくとも９５％の相同性を有する第３のアミノ酸配列とを含み、
第１のアミノ酸配列、第２の架橋アミノ酸配列および第３アミノ酸配列が、この順に連続して配置されているキメラポリペプチド。

Ｂ．ＬＳＲ変異体（配列番号１８）のエッジ部の単離ポリペプチドであって、
長さ「ｎ」を有するポリペプチドを含み（ｎは、少なくとも約１０アミノ酸長であり、少なくとも約２０アミノ酸長であってもよく、好ましくは少なくとも約３０アミノ酸長、より好ましくは少なくとも約４０アミノ酸長、最も好ましくは少なくとも約５０アミノ酸長である）、該ポリペプチドにおいて少なくとも３個のアミノ酸が、ＥＶＹを含み、かつ、２１０－ｘ～２１０の範囲の任意のアミノ酸番号から始まり、２１２＋（（ｎ－３）－ｘ）（式中、ｘは０～ｎ－３で変動する）で示される任意のアミノ酸で終わる配列（番号付けは配列番号１８に準ずる）で表される構造を有する単離されたポリペプチド。

Ｃ．単離されたキメラポリペプチドであって、
公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６）の４９位～２３９位のアミノ酸およびＬＳＲ変異体アイソフォームｆ（配列番号１８）の１位～１９１位のアミノ酸に相当する配列、
ＭＡＬＬＡＧＧＬＳＲＧＬＧＳＨＰＡＡＡＧＲＤＡＶＶＦＶＷＬＬＬＳＴＷＣＴＡＰＡＲ
ＡＩＱＶＴＶＳＮＰＹＨＶＶＩＬＦＱＰＶＴＬＰＣＴＹＱＭＴＳＴＰＴＱＰＩＶＩＷＫＹ
ＫＳＦＣＲＤＲＩＡＤＡＦＳＰＡＳＶＤＮＱＬＮＡＱＬＡＡＧＮＰＧＹＮＰＹＶＥＣＱＤ
ＳＶＲＴＶＲＶＶＡＴＫＱＧＮＡＶＴＬＧＤＹＹＱＧＲＲＩＴＩＴＧＮＡＤＬＴＦＤＱＴ
ＡＷＧＤＳＧＶＹＹＣＳＶＶＳＡＱＤＬＱＧＮＮＥＡＹＡＥＬＩＶＬ
と少なくとも９５％の相同性を有する第１のアミノ酸配列と、
ＬＳＲ変異体アイソフォームｆ（配列番号１８）の１９２位～２１８位のアミノ酸に相当する配列であるＧＲＴＳＧＶＡＥＬＬＰＧＦＱＡＧＰＩＥを有するポリペプチドと少なくとも８０％、好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、最も好ましくは少なくとも９５％の相同性を有する第２のアミノ酸配列と、
公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６）の２４０位～５８１位のアミノ酸およびＬＳＲ変異体アイソフォームｆ（配列番号１８）の２１１位～５５２位のアミノ酸に相当する配列、
ＶＹＡＡＧＫＡＡＴＳＧＶＰＳＩＹＡＰＳＴＹＡＨＬＳＰＡＫＴＰＰＰＰＡＭＩＰＭＧＰ
ＡＹＮＧＹＰＧＧＹＰＧＤＶＤＲＳＳＳＡＧＧＱＧＳＹＶＰＬＬＲＤＴＤＳＳＶＡＳＥＶ
ＲＳＧＹＲＩＱＡＳＱＱＤＤＳＭＲＶＬＹＹＭＥＫＥＬＡＮＦＤＰＳＲＰＧＰＰＳＧＲＶ
ＥＲＡＭＳＥＶＴＳＬＨＥＤＤＷＲＳＲＰＳＲＧＰＡＬＴＰＩＲＤＥＥＷＧＧＨＳＰＲＳ
ＰＲＧＷＤＱＥＰＡＲＥＱＡＧＧＧＷＲＡＲＲＰＲＡＲＳＶＤＡＬＤＤＬＴＰＰＳＴＡＥ
ＳＧＳＲＳＰＴＳＮＧＧＲＳＲＡＹＭＰＰＲＳＲＳＲＤＤＬＹＤＱＤＤＳＲＤＦＰＲＳＲ
ＤＰＨＹＤＤＦＲＳＲＥＲＰＰＡＤＰＲＳＨＨＨＲＴＲＤＰＲＤＮＧＳＲＳＧＤＬＰＹＤ
ＧＲＬＬＥＥＡＶＲＫＫＧＳＥＥＲＲＲＰＨＫＥＥＥＥＥＡＹＹＰＰＡＰＰＰＹＳＥＴＤ
ＳＱＡＳＲＥＲＲＬＫＫＮＬＡＬＳＲＥＳＬＶＶ
と少なくとも９５％の相同性を有する第３のアミノ酸配列とを含み、
第１のアミノ酸配列、第２の架橋アミノ酸配列および第３アミノ酸配列が、この順に連続して配置されているキメラポリペプチド。

Ｄ．ＬＳＲ変異体アイソフォームｆ（配列番号１８）のエッジ部の単離ポリペプチドであって、ＬＳＲ変異体アイソフォームｆ（配列番号１８）のＧＲＴＳＧＶＡＥＬＬＰＧＦＱＡＧＰＩＥで示される配列と少なくとも約８０％、好ましくは少なくとも約８５％、より好ましくは少なくとも約９０％、最も好ましくは少なくとも約９５％の相同性を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

【００３１】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明はさらに、ＬＳＲの不連続部分に相当するアミノ酸残基配列（ＬＳＲ変異体であるＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）の新たな接合部およびエッジ部に相当）を含む単離されたポリペプチドを提供する。ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）の新たな接合部に特有の配列を、図２Ｇのタンパク質配列アラインメントに示す。

【００３２】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明はさらに、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質、および／またはＬＳＲタンパク質の不連続部分に相当するアミノ酸残基配列を含むポリペプチドを提供し、これらの不連続部分としては、種々の細胞外ドメイン部分、すなわち、ＬＹ６Ｇ６Ｆ（配列番号１）の１７位～２３４位の残基に相当する細胞外ドメイン部分（配列番号２に示されるアミノ酸配列に相当）；ＶＳＩＧ１０（配列番号３）の３１位～４１３位の残基に相当する細胞外ドメイン部分（配列番号４に示されるアミノ酸配列に相当）；ＶＳＩＧ１０（配列番号５）の３１位～３１２位の残基に相当する細胞外ドメイン部分（配列番号６に示されるアミノ酸配列に相当）；ＴＭＥＭ２５（配列番号７）の２７位～２３２位の残基に相当する細胞外ドメイン部分（配列番号８に示されるアミノ酸配列に相当）；ＬＳＲ（配列番号１１および／または配列番号１４３）の４２位～２１１位の残基に相当する細胞外ドメイン部分（配列番号１２に示されるアミノ酸配列に相当）；ＬＳＲ（配列番号１３）の４２位～１９２位の残基に相当する細胞外ドメイン部分（配列番号１４に示されるアミノ酸配列に相当）；ＬＳＲ（配列番号１５）の４２位～５３３位の残基に相当する細胞外ドメイン部分（配列番号４７に示されるアミノ酸配列に相当）；ＬＳＲ（配列番号１６）の４２位～５３２位の残基に相当する細胞外ドメイン部分（配列番号４８に示されるアミノ酸配列に相当）；ＬＳＲ（配列番号１７）の４２位～４９３位の残基に相当する細胞外ドメイン部分（配列番号４９に示されるアミノ酸配列に相当）；ＬＳＲ（配列番号１８）４２位～５５２位の残基に相当する細胞外ドメイン部分（配列番号５０に示されるアミノ酸配列に相当）；ならびに／または、これらと少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％の配列相同性を有するこれらのフラグメントおよび／もしくは変異体が挙げられる。さらなる実施形態によれば、本明細書に記載されているように、ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤフラグメントは、配列番号８１、９６、およびこれらの変異体のいずれかから選択される。さらなる実施形態によれば、本明細書に記載されているように、ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤフラグメントは、配列番号８２～９３、９７～１００、およびこれらの変異体のいずれかから選択される。さらなる実施形態によれば、本明細書に記載されているように、ＬＳＲ　ＥＣＤフラグメントは、配列番号９５、１０２、およびこれらの変異体のいずれかから選択される。さらなる実施形態によれば、本明細書に記載されているように、ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤフラグメントは、配列番号９４、１０１、およびこれらの変異体のいずれかから選択される。さらなる実施形態によれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質の不連続部分は、シグナル（リーダー）ペプチド（ＳＰ）配列（図１）を含んでも含んでいなくてもよい。本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質のＳＰ配列を含むＥＣＤ部分の一例が提供される。ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（配列番号１）のＳＰ配列を含むＥＣＤ部分として、配列番号５９に示されるアミノ酸配列が挙げられる。ＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３）のＳＰ配列を含むＥＣＤ部分として、配列番号６０に示されるアミノ酸配列が挙げられる。ＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号５）のＳＰ配列を含むＥＣＤ部分として、配列番号６１に示されるアミノ酸配列が挙げられる。ＴＭＥＭ２５タンパク質（配列番号７）のＳＰ配列を含むＥＣＤ部分として、配列番号３９に示されるアミノ酸配列が挙げられる。ＬＳＲタンパク質（配列番号１１）のＳＰ配列を含むＥＣＤ部分として、配列番号１０に示されるアミノ酸配列が挙げられる。ＬＳＲタンパク質（配列番号１４）のＳＰ配列を含むＥＣＤ部分として、配列番号２２に示されるアミノ酸配列が挙げられる。

【００３３】
さらなる実施形態によれば、本発明は、配列番号１８に示される可溶性ＬＳＲタンパク質に相当するアミノ酸残基配列を含むポリペプチドを提供し、該可溶性ＬＳＲタンパク質としては、可溶性ＬＳＲタンパク質の種々の部分、これらと少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％の配列相同性を有するこれらの変異体が挙げられる。さらなる実施形態によれば、本発明は、配列番号１５および１６のいずれかに示される可溶性ＬＳＲタンパク質に相当するアミノ酸残基配列を含むポリペプチドを提供し、該可溶性ＬＳＲタンパク質としては、可溶性ＬＳＲタンパク質の種々の部分、これらと少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％の配列相同性を有するこれらの変異体が挙げられる。さらなる実施形態によれば、本発明は、配列番号１５～１８のいずれかに示される可溶性ＬＳＲタンパク質に相当するアミノ酸残基配列を含むポリペプチドを提供する。さらなる実施形態によれば、配列番号１５および１８のいずれかに示される可溶性ＬＳＲタンパク質は、シグナル（リーダー）ペプチド配列（図１Ｇ、図１Ｇ、図１Ｉおよび図１Ｊ）を含んでも含んでいなくてもよい。

【００３４】
さらなる実施形態によれば、本発明は、ＴＭＥＭ２５タンパク質、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＬＳＲ変異体１タンパク質および／またはＬＳＲ変異体２タンパク質のオーソログ（特にマウスオーソログ（配列番号２８、２９、３０、３１および／または３２））の細胞外ドメインに相当するアミノ酸残基配列を含むポリペプチドを提供し、該オーソログしては、配列番号９、１９～２１に示されるアミノ酸配列に相当するマウスオーソログ細胞外ドメイン、または、これらと少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％の配列相同性を有するこれらの細胞外ドメインの一部および／もしくは変異体が挙げられるが、これらに限定されない。

【００３５】
さらなる実施形態によれば、本発明は、ＶＳＩＧ１０（配列番号５）およびＬＳＲ（配列番号１１、１３、１５、１６および１８）の新規の変異体のいずれかに相当するアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。

【００３６】
実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、異種配列に連結された上記のポリペプチドのいずれかを含む融合タンパク質を提供する。異種配列は、免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含んでいてもよい。免疫グロブリン分子の一部分は、免疫グロブリン重鎖定常領域のＦｃフラグメントであってもよく、この態様が好ましい。免疫グロブリン重鎖定常領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡおよびＩｇＤからなる群から選択される免疫グロブリンアイソタイプに由来していてもよく、この態様が好ましい。融合タンパク質は、配列番号７１～８０、１７２～１８１のいずれか、または配列番号２３～２６のいずれかに示されるアミノ酸配列を有していてもよく、この態様が最も好ましい。また、融合タンパク質は、インビトロおよびインビボにおいて免疫細胞応答を調節してもよい。

【００３７】
実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、上述したＴＭＥＭ２５、ＶＳＩＧ１０、および／もしくはＬＳＲの新規の変異体のいずれか、ならびに／または上述したＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５、および／もしくはＬＳＲの細胞外ドメインポリペプチド、もしくはこれらのフラグメント、ホモログもしくはオーソログのいずれかをコードする単離された核酸配列を提供する。

【００３８】
実施形態の少なくともいくつかによれば、配列番号３３～３７、４０～４６、１３２、１５５、１８２～１９８、これらと少なくとも９５％の配列同一性を有する変異体、およびこれらの変性変異体（ｄｅｇｅｎｅｒａｔｉｖｅ　ｖａｒｉａｎｔ）からなる群から選択される単離された核酸配列が提供される。

【００３９】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、配列番号２、４、５、６、８～１６、１８～２２、３９、４７～５０、５９～６１、１４３に示されるアミノ酸配列、これらと少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％の配列同一性を有するこれらのフラグメントもしくは変異体、またはこれらの変性変異体のいずれかを含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【００４０】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、配列番号３３～３７、４０～４６、１３２、１４５、１５５、１８２～１８８のいずれかに示される核酸、これらと相同性を有する配列、またはこれらの変性変異体を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。別の実施形態によれば、この単離されたポリヌクレオチドは、配列番号３３～３７、４０～４６、１４５のいずれかに示される核酸配列と少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％の相同性を有する。

【００４１】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本明細書に記載の単離された核酸配列を少なくとも１つ含む発現ベクターまたはウイルスが提供される。実施形態の少なくともいくつかによれば、本明細書に記載の単離された核酸配列を少なくとも１つ含む発現ベクターまたはウイルスを含む組換え細胞であって、このＤＮＡセグメントにコードされたポリペプチドを構成的または誘導的に発現する組換え細胞が提供される。実施形態の少なくともいくつかによれば、ＬＳＲ、ＴＭＥＭ２５、ＶＳＩＧ１０、ＬＹ６Ｇ６Ｆの可溶性細胞外ドメインポリペプチド、またはこれらのフラグメントもしくは融合タンパク質の製造方法であって、本明細書に記載の組換え細胞が上記のＤＮＡセグメントまたは核酸にコードされているポリペプチドの発現が可能な条件下で、該組換え細胞を培養すること、および該ポリペプチドを回収することを含む方法が提供される。

【００４２】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質、ＬＳＲタンパク質のいずれか１つの細胞外ドメイン、可溶形態もしくは分泌形態の単離されたアミノ酸配列、その変異体、オーソログもしくはフラグメント、またはこれらのいずれかを含む結合体を含む医薬組成物が提供される。

【００４３】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、可溶性免疫グロブリンドメインまたはフラグメントなどの非ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質または核酸配列に直接または間接的に付加されてもよい、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲタンパク質の可溶性ドメインおよび／もしくは細胞外ドメインの単離もしくは精製されたアミノ酸配列またはこれをコードする核酸配列を提供する。

【００４４】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、プラスミドおよび組換えウイルスベクターなどのベクターと、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５、および／もしくはＬＳＲタンパク質の分泌形態、可溶形態および／もしくはＥＣＤ、これらのフラグメント、変異体もしくはオーソログ、またはこれらのいずれかを含むポリペプチド結合体を発現する宿主細胞とを提供する。

【００４５】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲ、これらの分泌形態、可溶形態、ＥＣＤおよび／もしくはフラグメント、これらの変異体もしくはオーソログ、またはこれらのいずれかを含むポリペプチド結合体のいずれか１つを発現する宿主細胞と、プラスミドおよび組換えウイルスベクターなどの上記のベクターとの使用であって、上記のＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲタンパク質のいずれか１つを製造することを特徴とする使用を提供する。

【００４６】
実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、上記のいずれかを含む医薬組成物または診断組成物を提供する。
【００４７】
実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、ＬＹ６Ｇ６Ｆ細胞外ドメイン、ＶＳＩＧ１０細胞外ドメイン、ＴＭＥＭ２５細胞外ドメインおよび／もしくはＬＳＲ細胞外ドメイン、これらの可溶性形態、分泌形態、フラグメント、オーソログもしくは変異体、結合体、これらのいずれかをコードする核酸配列、ならびにこれらのいずれかを含む医薬組成物の少なくとも１つを治療剤として含む化合物のいずれか１つの使用であって、本明細書に記載のがん、本明細書に記載の感染性障害および／もしくは免疫関連障害（本明細書に記載の自己免疫疾患、移植拒絶反応および移植片対宿主病を含むが、これらに限定されない）を治療または予防すること；ならびに／またはＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／もしくはＬＳＲポリペプチドのいずれか１つもしくは本明細書に記載の免疫関連疾患によって媒介される免疫共刺激をブロックまたは促進すること；ならびに／または免疫療法（免疫共刺激の促進もしくは抑制）を行うことを特徴とする使用を提供する。実施形態の少なくともいくつかによれば、上記の自己免疫疾患はあらゆる自己免疫疾患を包含し、任意の型および亜型の、多発性硬化症、関節リウマチ、１型糖尿病、乾癬、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、ぶどう膜炎およびシェーグレン症候群のいずれかを包含していてもよく（ただしこれらに限定されない）、これらを包含することが好ましい。
【００４８】
実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、ＬＹ６Ｇ６Ｆ細胞外ドメイン、ＶＳＩＧ１０細胞外ドメイン、ＴＭＥＭ２５細胞外ドメインおよび／もしくはＬＳＲ細胞外ドメイン、これらの可溶性形態、分泌形態、フラグメント、オーソログもしくは変異体、結合体、これらのいずれかをコードする核酸配列、ならびにこれらのいずれかを含む医薬組成物の少なくとも１つを含む化合物のいずれか１つの使用であって、抗がんワクチンもしくは抗がんワクチンのアジュバントとして投与すること、ならびに／または養子免疫療法を行うこと、ならびに／または本明細書に記載のがん免疫療法を行うことを特徴とする使用を提供する。
【００４９】
実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲタンパク質または核酸配列のいずれかの使用であって、
ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲタンパク質のいずれか１つに特異的に結合する薬剤、ならびに／またはＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲタンパク質と他の成分との結合を増強または抑制する薬剤を作製するための標的とすることを特徴とする使用を提供する。
【００５０】
実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲに関連する生物学的活性の少なくとも１つを調節する（増強または抑制する）薬剤を提供する。このような薬剤として、抗体、小分子、ペプチド、リボザイム、アプタマー、アンチセンス分子、ｓｉＲＮＡなどが挙げられる。これらの分子は、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／もしくはＬＳＲタンパク質、ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＤＮＡ、ＶＳＩＧ１０　ＤＮＡ、ＴＭＥＭ２５　ＤＮＡおよび／もしくはＬＳＲ　ＤＮＡ、ならびにこれらの一部分もしくは変異体のいずれか１つに直接結合してもよく；これらのいずれか１つによって誘導される活性を調節してもよく；たとえば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲのいずれか１つと、そのカウンターレセプターまたは内因性リガンドとの結合を調節することによって、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲに関連する活性を間接的に調節してもよく、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭ

ＥＭ２５および／もしくはＬＳＲ、これらの一部分、ならびにこれらの変異体のいずれか１つと分子との結合を間接的に調節してもよい。

【００５１】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、本明細書に記載のＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／もしくはＬＳＲタンパク質、およびこれらと少なくとも９５％の相同性を有するポリペプチドのいずれか１つに特異的に結合する、新規のモノクローナルまたはポリクローナル抗体、抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、および／または代替足場を提供する。このような抗体は、配列番号１～８、１０～１８、２２、３９、４７～５０、５９～６１、９、および１９～２１からなる群から選択されるタンパク質ならびに／または配列番号５および１８に特有のエッジのいずれか１つに対応するアミノ酸配列に結合してもよい。特に、これらの抗体、抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、および／または代替足場は、特に、本明細書に記載の感染性障害；本明細書に記載の自己免疫疾患、本明細書に記載の免疫関連疾患、移植拒絶反応および移植片対宿主病を含む（ただしこれらに限定されない）免疫関連障害；ならびに／または本明細書に記載のがんおよび悪性腫瘍の治療ならびに／または診断のための治療剤ならびに／または（インビトロ診断法およびインビボ診断法の両方における）診断剤として使用するのに適している。

【００５２】

少なくとも実施形態のいくつかによれば、抗原結合部位が立体構造エピトープまたは直線状エピトープを含み、かつ、約３～７個の連続したアミノ酸または不連続アミノ酸を含む抗体が提供される。該抗体は、完全ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または霊長類化抗体であってよい。

【００５３】

さらに、上記抗体は、Ｆａｂフラグメント，Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ）フラグメント、Ｆｖフラグメント、ｓｃＦｖフラグメントおよび最小認識単位からなる群から選択されてもよい。

【００５４】

さらに、上記の抗体は、薬剤、放射性核種、発蛍光団、酵素、毒素、治療剤、および化学療法剤から選択される成分と結合させてもよく、この検出可能なマーカーは、放射性同位元素、金属キレート剤、酵素、蛍光化合物、生物発光化合物、または化学発光化合物であってもよい。

【００５５】

さらに、上記の抗体は、ＬＳＲポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ならびにこれらのフラグメントおよび変異体のいずれか１つと、それぞれの対応物との相互作用をブロックまたは阻害してもよい。

【００５６】

さらに、上記の抗体は、ＬＳＲポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、またはこれらのフラグメントもしくは変異体と、その対応物との相互作用においてＬＳＲポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、またはこれらのフラグメントもしくは変異体と置き換わってもよく、またはＬＳＲポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、またはこれらのフラグメントもしくは変異体と、その対応物との相互作用を増強してもよい。

【００５７】

さらに、上記の抗体は、ＬＳＲタンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、およびＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質のいずれか１つを発現するがん細胞のアポトーシスまたは溶解を誘導してもよい。

【００５８】

さらに、上記のアポトーシスまたは溶解は、抗体のＣＤＣ活性またはＡＤＣＣ活性に関連していてもよく、ＣＤＣ（補体依存性細胞傷害作用）活性またはＡＤＣＣ（抗体依存性

細胞傷害作用）活性を使用して、免疫細胞をターゲティングしてもよい。

【００５９】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、ＬＹ６Ｇ６Ｆ（配列番号１）の１７位～２３４位の残基（配列番号２に示す）および／または配列番号８１および９６のいずれかに示されるアミノ酸配列に相当する細胞外ドメインの種々の部分を含むＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質の不連続部分に対する、抗体および抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに／または代替足場を提供する。さらなる実施形態によれば、本発明は、配列番号２０に相当する細胞外ドメインの種々の部分を含むマウスＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（配列番号２９）の不連続部分に対する、抗体および抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに／または代替足場を提供する。

【００６０】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、ＶＳＩＧ１０（配列番号３）の３１位～４１３位のアミノ酸残基（配列番号４に示す）、ＶＳＩＧ１０（配列番号５）の３１位～３１２位のアミノ酸残基（配列番号６に示す）、および／または配列番号８２～９３および９７～１００のいずれか１つに示されるアミノ酸配列に相当する細胞外ドメインの種々の部分を含むＶＳＩＧ１０タンパク質の不連続部分に対する、抗体および抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに／または代替足場を提供する。さらなる実施形態によれば、本発明は、配列番号１９に相当する細胞外ドメインの種々の部分を含むマウスＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３０）の不連続部分に対する、抗体および抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに／または代替足場を提供する。実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、本明細書に記載のＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）のエッジ部を含む、ＶＳＩＧ１０タンパク質の不連続部分に対する、抗体および抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに／または代替足場を提供する。

【００６１】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、ＴＭＥＭ２５（配列番号７）の２７位～２３２位のアミノ酸残基（配列番号８に示す）および／または配列番号９４および１０１のいずれかに示されるアミノ酸配列に相当する細胞外ドメインの種々の部分を含むＴＭＥＭ２５タンパク質の不連続部分に対する、抗体および抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに／または代替足場を提供する。さらなる実施形態によれば、本発明は、配列番号９に示される細胞外ドメインの種々の部分を含むマウスＴＭＥＭ２５タンパク質（配列番号２８）の不連続部分に対する、抗体および抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに／または代替足場を提供する。

【００６２】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、ＬＳＲ（配列番号１１）の４２位～２１１位のアミノ酸残基（配列番号１２に示す）、ＬＳＲ（配列番号１３）の４２位～１９２位のアミノ酸残基（配列番号１４に示す）、ＬＳＲ（配列番号１５）の４２位～５３３位のアミノ酸残基（配列番号４７に示す）、ＬＳＲ（配列番号１６）の４２位～５３２位のアミノ酸残基（配列番号４８に示す）、ＬＳＲ（配列番号１７）の４２位～４９３位のアミノ酸残基（配列番号４９に示す）、ＬＳＲ（配列番号１８）の４２位～５５２位のアミノ酸残基（配列番号５０に示す）、および／または配列番号９５および１０２のいずれかに示されるアミノ酸配列に相当する細胞外ドメインの種々の部分を含むＬＳＲタンパク質の不連続部分に対する、抗体および抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに／または代替足場を提供する。さらなる実施形態によれば、本発明は、配列番号２１に相当する細胞外ドメインの種々の部分を含むマウスＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（配列番号３１～３２）の不連続部分に対する、抗体および抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに／または代替足場を提供する。

【００６３】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、本明細書に記載のＬＳＲ異性体アイソフォームｆ（配列番号１８）に特有のエッジ部を含む、ＬＳＲタンパク質の不連続部

分に対する、抗体および抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに／または代替足場を提供する。

【００６４】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、配列番号１５～１８および４７～５０のいずれか１つに示される可溶性ＬＳＲタンパク質の種々の部分を含む可溶性ＬＳＲタンパク質の不連続部分に対する、抗体および抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに／または代替足場を提供する。

【００６５】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、特異的抗体と類似した特異性および親和性を有する足場タンパク質に関する。実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、１つ以上のエピトープ結合ドメインに連結される足場タンパク質を含む抗原結合構築物に関する。このような改変足場タンパク質は、通常、ループ領域またはそれ以外の許容される表面部位に注目して、突然変異を含むランダムライブラリーを設計し、次いで、ファージディスプレイまたはその関連技術を使用して任意の標的に対して変異体を選択することによって得られる。実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、ａｎｔｉｃａｌｉｎ、ＤＡＲＰｉｎ、アルマジロリピートタンパク質、プロテインＡ、リポカリン、フィブロネクチンドメイン、アンキリンコンセンサスリピートドメイン、チオレドキシン、化学的に抑制されたペプチドなどを包含する（ただしこれらに限定されない）代替足場に関する。実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、治療剤として、本明細書に記載のがん、本明細書に記載の免疫関連疾患、本明細書に記載の自己免疫疾患、および感染症の治療、ならびにインビボ診断に使用される代替足場に関する。

【００６６】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、本明細書に記載の単離されたポリペプチド、本明細書に記載の融合タンパク質、本明細書に記載のヌクレオチド配列、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞、または本明細書に記載の抗体と、薬学的に許容される希釈剤もしくは担体とを含む医薬組成物が提供される。

【００６７】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本明細書に記載の単離されたポリペプチド、本明細書に記載の融合タンパク質、本明細書に記載のヌクレオチド配列、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞、本明細書に記載の抗体、および本明細書に記載の医薬組成物のいずれか１つの使用であって、対象への投与によりＴ細胞の活性化が阻害または抑制されることを特徴とする使用が提供される。

【００６８】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本明細書に記載の単離されたポリペプチド、本明細書に記載の融合タンパク質、本明細書に記載のヌクレオチド配列、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞、本明細書に記載の抗体、および本明細書に記載の医薬組成物のいずれか１つの、がんの治療のための使用が提供される。

【００６９】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本明細書に記載の単離されたポリペプチド、本明細書に記載の融合タンパク質、本明細書に記載のヌクレオチド配列、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞、本明細書に記載の抗体、または本明細書に記載の医薬組成物の、感染性障害の治療のための使用が提供される。

【００７０】

実施形態の少なくともいくつかによれば、
対象において、
ａ．サイトカインのアップレギュレート；
ｂ．Ｔ細胞の増殖の誘導；
ｃ．抗原特異的Ｔ細胞免疫の促進；
ｄ．ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞および／またはＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の活性化の促進
の１以上を行う方法であって、

本明細書に記載の単離されたポリペプチド、本明細書に記載の融合タンパク質、本明細書に記載のヌクレオチド配列、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞、本明細書に記載の抗体、および本明細書に記載の医薬組成物のいずれかを対象に投与することを含む方法が提供される。

【００７１】

実施形態の少なくともいくつかによれば、免疫系に関連した病態を治療または予防する方法であって、免疫系に関連した病態の治療または予防を必要とする対象に、本明細書に記載の単離されたポリペプチド、本明細書に記載の融合タンパク質、本明細書に記載のヌクレオチド配列、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞、本明細書に記載の抗体、および医薬組成物のいずれかを有効量で投与することを含む方法が提供される。

【００７２】

上記の免疫系に関連した病態は、免疫関連病態；自己免疫疾患；移植拒絶反応；移植片対宿主病；上記のＬＳＲポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチドおよびＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチドのいずれか１つによって媒介される免疫共刺激をブロックまたは促進するための状態；免疫関連疾患；ならびに／または（免疫共刺激を促進または抑制する）免疫療法のための状態を含んでもよい。

【００７３】

上記の治療は、免疫関連病態の治療に有用な別の成分と組み合わせてもよい。

【００７４】

上記の成分は、コルチコステロイド類、シクロスポリン、シクロホスファミド、プレドニゾン、アザチオプリン、メトトレキサート、ラパマイシン、タクロリムスなどの免疫抑制剤；ＴＮＦ－α遮断剤もしくはＴＮＦ－αアンタゴニスト、または任意の炎症性サイトカインを標的とする他の生物学的薬剤などの生物学的薬剤；非ステロイド性抗炎症剤／Ｃｏｘ－２阻害剤；ヒドロキシクロロキン；スルファサラゾピリン；金塩；エタネルセプト；インフリキシマブ；ミコフェノール酸モフェチル；バシリキシマブ；アタシセプト；リツキシマブ；シトキサン；インターフェロンβ－１ａ；インターフェロンβ－１ｂ；酢酸グラチラマー；塩酸ミトキサントロン；アナキンラ；他のバイオロジクス；静脈内免疫グロブリン（ＩＶＩＧ）；ＩＦＮ－β－１ａ（ＲＥＢＩＦ（登録商標）およびＡＶＯＮＥＸ（登録商標））、ＩＦＮ－β－１ｂ（ＢＥＴＡＳＥＲＯＮ（登録商標））などのインターフェロン；

酢酸グラチラマー（ＣＯＰＡＸＯＮＥ（登録商標））；ポリペプチド；ナタリズマブ（ＴＹＳＡＢＲＩ（登録商標））；ミトキサントロン（ＮＯＶＡＮＴＲＯＮＥ（登録商標））；細胞毒性剤；カルシニューリン阻害剤（たとえばシクロスポリンＡ、ＦＫ５０６）；免疫抑制マクロライド（たとえばラパマイシンまたはその誘導体（たとえば４０－Ｏ－（２－ヒドロキシ）エチル－ラパマイシン））；リンパ球ホーミング剤（たとえばＦＴＹ７２０またはそのアナログ）；コルチコステロイド類；シクロホスファミド；アザチオプリン；メトトレキサート；レフルノミドまたはそのアナログ；ミゾリビン；ミコフェノール酸；ミコフェノール酸モフェチル；１５－デオキシスペルグアリンまたはそのアナログ；免疫抑制モノクローナル抗体（たとえば、ＭＨＣ、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８、ＣＤ７、ＣＤ２５、ＣＤ２７、Ｂ７、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ５８、ＣＤ１３７、ＩＣＯＳ、ＣＤ１５０（ＳＬＡＭ）、ＯＸ４０、４－１ＢＢまたはこれらのリガンドなどの白血球レセプターに対するモノクローナル抗体）；他の免疫調節化合物（たとえばＣＴＬＡ４－Ｉｇ（アバタセプト、ＯＲＥＮＣＩＡ）、ＣＤ２８－Ｉｇ、Ｂ７－Ｈ４－Ｉｇ、他の共刺激剤）；

接着分子阻害剤（たとえばモノクローナル抗体（ｍＡｂ））；ＬＦＡ－１アンタゴニスト、セレクチンアンタゴニスト、ＶＬＡ－４アンタゴニストなどの低分子阻害剤；ならびに他の免疫調節剤からなる群から選択されてもよい。

【００７５】

上記の免疫に関連する病態は、自己免疫疾患、移植拒絶反応または移植片対宿主病から

選択されてもよい。

【００７６】

上記の自己免疫疾患は、再発寛解型多発性硬化症、一次進行型多発性硬化症および二次進行型多発性硬化症を含む多発性硬化症；乾癬；関節リウマチ；乾癬性関節炎；全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）；潰瘍性大腸炎；クローン病；良性リンパ球性血管炎；血小板減少性紫斑病；突発性血小板減少症；特発性自己免疫性溶血性貧血；赤芽球ろう；シェーグレン症候群；リウマチ性疾患；結合組織疾患；炎症性リウマチ；変形性リウマチ；非関節性リウマチ；若年性関節リウマチ；尿酸塩関節炎；筋肉リウマチ；慢性多発性関節炎；クリオグロブリン血管炎；ＡＮＣＡ関連血管炎；抗リン脂質症候群；重症筋無力症；自己免疫性溶血性貧血；ギラン・バレー症候群；慢性免疫性多発ニューロパチー；自己免疫性甲状腺炎；インスリン依存性糖尿病；１型糖尿病；アジソン病；膜性糸球体腎症；グッドパスチャー病；自己免疫性胃炎；自己免疫性萎縮性胃炎；悪性貧血；天疱瘡；尋常性天疱瘡；肝硬変；原発性胆汁性肝硬変；皮膚筋炎；多発性筋炎；線維筋炎；筋硬症；セリアック病；免疫グロブリンＡ腎症；ヘノッホ・シェーンライン紫斑病；エバンス症候群；アトピー性皮膚炎；乾癬；関節症性乾癬；グレーブス病；グレーブス眼症；強皮症；全身性強皮症；進行性全身性強皮症；喘息；アレルギー；原発性胆汁性肝硬変；橋本甲状腺炎；原発性粘液水腫；交感性眼炎；自己免疫性ぶどう膜炎；肝炎；慢性活動性肝炎；膠原病；強直性脊椎炎；肩関節周囲炎；結節性汎動脈炎；軟骨石灰化症；ヴェーゲナー肉芽腫症；顕微鏡的多発血管炎；慢性じんま疹；水疱性皮膚疾患；類天疱瘡；アトピー性湿疹；デビック病；小児自己免疫性溶血性貧血；難治性または慢性自己免疫性血球減少症；後天性血友病Ａにおける抗第VIII因子自己抗体の産生の予防；寒冷凝集素病；視神経脊髄炎；全身硬直症候群；歯肉炎；歯周炎；膵炎；心筋炎；血管炎；胃炎；痛風；痛風性関節炎；乾癬、アトピー性皮膚炎、湿疹、酒さ、蕁麻疹およびざ瘡からなる群から選択される炎症性皮膚疾患；正補体血症性蕁麻疹様血管炎；心膜炎；筋炎；抗合成酵素症候群；強膜炎；マクロファージ活性化症候群；ベーチェット症候群；ＰＡＰＡ症候群；Ｂｌａｕ症候群；痛風；成人および若年性スティル病；クリオピリン関連周期性症候群；マックルーウェルズ症候群；家族性寒冷自己炎症性症候群；新生児期発症多臓器性炎症性疾患；家族性地中海熱；慢性乳児期発症神経皮膚関節症候群；全身型若年性特発性関節炎；高ＩｇＤ症候群；シュニッツラー症候群；自己免疫性網膜症；加齢黄斑変性症；アテローム性動脈硬化症；慢性前立腺炎；ならびにＴＮＦ受容体関連周期性症候群（ＴＲＡＰＳ）からなる群から選択されてもよい。

【００７７】

上記の自己免疫疾患は、任意の型および亜型の、多発性硬化症、関節リウマチ、１型糖尿病、乾癬、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、ぶどう膜炎およびシェーグレン症候群からなる群から選択されてもよい。

【００７８】

実施形態の少なくともいくつかによれば、
感染症を治療または予防する方法であって、
感染症の治療または予防を必要とする対象に、本明細書に記載の単離されたポリペプチド、本明細書に記載の融合タンパク質、本明細書に記載のヌクレオチド配列、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞、本明細書に記載の抗体、および医薬組成物のいずれかを有効量で投与することを含む方法が提供される。

【００７９】

上記の感染症は、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染および／または他の寄生虫感染によって引き起こされる疾患から選択されてもよい。

【００８０】

上記の感染症は、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、伝染性単核症、ＥＢＶ、サイトメガロウイルス、ＡＩＤＳ、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、結核、マラリアおよび住血吸虫症から選択されてもよい。

【００８１】

実施形態の少なくともいくつかによれば、
がんを治療または予防する方法であって、
がんの治療または予防を必要とする対象に、本明細書に記載の単離されたポリペプチド、本明細書に記載の融合タンパク質、本明細書に記載のヌクレオチド配列、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞、本明細書に記載の抗体、および医薬組成物のいずれか１つを有効量で投与すること含む方法が提供される。

【００８２】

上記の治療は、がんを治療するのに有用な別の成分または治療法と組み合わせてもよい。

【００８３】

上記の治療法は、放射線療法；抗体療法；化学療法；光線力学療法；養子Ｔ細胞療法；Ｔｒｅｇ除去；手術；または慣用の薬剤との併用療法であってもよい。

【００８４】

上記の成分は、免疫抑制剤；細胞傷害剤；腫瘍ワクチン；抗体（たとえば、ベバシズマブ、アービタックス）；ペプチド；ペプチボディ；小分子；細胞傷害剤および細胞増殖抑制剤（たとえば、パクリタキセル、シスプラチン、ビノレルビン、ドセタキセル、ゲムシタビン、テモゾロミド、イリノテカン、５ＦＵ、カルボプラチン）などの化学療法剤；インターフェロンおよびインターロイキンなどの免疫調節剤；免疫刺激抗体；成長ホルモン；他のサイトカイン；葉酸；ビタミン；無機質；アロマターゼ阻害剤；ＲＮＡｉ；ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤；およびプロテアソーム阻害剤からなる群から選択されてもよい。

【００８５】

上記のがんは、乳がん、子宮頸がん、卵巣がん、子宮内膜がん、メラノーマ、膀胱がん、肺がん、膵臓がん、結腸がん、前立腺がん、白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、骨髄性白血病、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病、甲状腺がん、濾胞性甲状腺がん、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、線維肉腫、横紋筋肉腫、メラノーマ、ぶどう膜メラノーマ、奇形癌、神経芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、皮膚の良性腫瘍、角化棘細胞腫、腎臓がん、未分化大細胞リンパ腫、食道扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、濾胞性樹状細胞癌、腸がん、筋層浸潤がん、精巣腫瘍、表皮癌、脾臓がん、膀胱がん、頭頸部がん、胃がん、肝臓がん、骨がん、脳がん、網膜がん、胆道がん、小腸がん、唾液腺がん、子宮がん、精巣がん、結合組織がん、前立腺肥大症、脊髄形成異常、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、鼻咽腔がん、神経内分泌がん、骨髄異形成症候群、中皮腫、血管肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド、食道胃がん、ファローピウス管がん、腹膜がん、漿液性乳頭状ミュラー管がん、悪性腹水、消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）、リー・フラウメニ症候群およびフォンヒッペル・リンダウ症候群（ＶＨＬ）、からなる群から選択される、非転移性、浸潤性、または転移性のがんであってもよい。

【００８６】

上記のがんは、メラノーマ、肝臓がん、腎臓がん、脳がん、乳がん、結腸がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、胃がん、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、急性および慢性リンパ芽球性白血病、ならびに急性および慢性骨髄白血病のいずれかであってもよい。

【００８７】

実施形態の少なくともいくつかによれば、
抗原に対する患者の二次免疫応答を増強する方法であって、
本明細書に記載の単離されたポリペプチド、本明細書に記載の融合タンパク質、本明細書に記載のヌクレオチド配列、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞、本明細書に記載の抗体、および医薬組成物のいずれかを有効量で投与することを含む方法が提供される。

【００８８】

上記の抗原が、がん抗原、ウイルス抗原または細菌抗原であってもよく、上記の患者が、抗がんワクチンまたはウイルスワクチンによる治療を受けたことのある患者であってもよい。

【００８９】

患者に免疫療法を行う方法であって、
患者または患者から単離した白血球に、本明細書に記載の単離されたポリペプチド、本明細書に記載の融合タンパク質、本明細書に記載のヌクレオチド配列、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞、本明細書に記載の抗体、および医薬組成物のいずれかを有効量で投与して、寛容原性制御性細胞の分化を誘導することを含む、インビボまたはエクスビボにおける寛容誘導；
エクスビボにおける上記細胞の濃縮および増殖；ならびに
上記患者への寛容原性制御性細胞の自己輸血を含む方法が提供される。

【００９０】

本明細書に記載の単離されたポリペプチドのいずれか、本明細書に記載の融合タンパク質、本明細書に記載のヌクレオチド配列、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞、本明細書に記載の抗体、および医薬組成物の少なくとも１つをがんワクチンアジュバントとして使用する方法であって、
免疫応答を誘導できる量の標的とする腫瘍関連抗原調製物と、がんワクチンアジュバントとを免疫化に適した処方で患者に投与することを含み、
該がんワクチンアジュバント存在下における該腫瘍関連抗原に対する免疫応答が、該がんワクチンアジュバント非存在下におけるものよりも強力であることを特徴とする方法が提供される。

【００９１】

実施形態の少なくともいくつかによれば、感染症の治療を目的として、本明細書に記載の単離されたポリペプチド、本明細書に記載の融合タンパク質、本明細書に記載のヌクレオチド配列、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞、本明細書に記載の抗体、および医薬組成物のいずれかの投与と、抗原を用いた治療用ワクチン接種とを組み合わせる方法が提供される。

【００９２】

実施形態の少なくともいくつかによれば、免疫応答の増強を目的として、本明細書に記載の単離されたポリペプチド、本明細書に記載の融合タンパク質、本明細書に記載のヌクレオチド配列、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の宿主細胞、本明細書に記載の抗体、および医薬組成物のいずれかと、アジュバントと、ワクチン中の抗原とを組み合わせる方法が提供される。

【００９３】

上記の抗原は、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、寄生虫抗原および／または別の病原体の抗原であってもよい。

【００９４】

実施形態の少なくともいくつかによれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲタンパク質のいずれか１つに対する、抗体および抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、および／もしくは代替足場；ならびに／またはＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲの分泌形態、可溶形態もしくはＥＣＤ、および／もしくこれらの変異体、オーソログもしくは結合体を含む本発明の実施形態の少なくともいくつかによる上記の治療剤のいずれか１つを使用して、養子免疫療法を行うことができる。免疫寛容または免疫学的寛容は、免疫系が抗原を攻撃しない仕組みである。免疫寛容は、体内において自己抗原への免疫応答が開始されない「自然免疫寛容」すなわち「自己免疫寛容」であるか、免疫系を操作することにより外来抗原に対する寛容を生じさせる「誘導性免疫寛容」である。免疫寛容は、中枢性寛容、末梢性寛容および獲得寛容の３つの形態で起こる。単一の理論に拘束されることを望むものではないが、免疫寛容においては、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、ＮＫＴ細胞、樹状細胞（

ＤＣ）およびＢ細胞に加えて、自己反応性細胞を直接的に抑制する制御性免疫細胞（Ｔｒｅｇを含む）、ならびに免疫調節能を有する他のいくつかの免疫細胞サブセット（ＣＤ８＋Ｔ細胞および他のタイプのＣＤ４＋Ｔ細胞（Ｔｒ１、Ｔｈ３を含む）が関与している。

【００９５】

寛容は、共刺激をブロックすること、または共抑制性Ｂ７とそのカウンターレセプターとを結合させることによって誘導することができる。寛容の移入には、インビボ（すなわち細胞単離前）またはエクスビボにおいて寛容が誘導された細胞の単離、エクスビボにおけるこれらの細胞の濃縮および増殖、次いで、増殖させた細胞の患者への自己輸血が必要とされる。この方法を利用して、本明細書に記載の自己免疫疾患、本明細書に記載の免疫関連疾患、移植および移植片拒絶を治療することができる。

したがって、実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、

寛容の誘導方法であって、

ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つに特異的な、単離された可溶性ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５、もしくはＬＳＲポリペプチド、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５、もしくはＬＳＲの細胞外ドメインを含むポリペプチド、これらのフラグメント、これらの異種配列との融合体、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに代替足場のいずれか１つを有効量で患者または患者から単離された白血球にインビボまたはエクスビボにおいて投与することにより処置を行い、寛容原性制御性細胞の分化を誘導すること、

エクスビボにおいて該細胞の濃縮および増殖を行うこと、ならびに

上記患者へ寛容原性制御性細胞を自己輸血すること

を含む方法を提供する。

【００９６】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、

生体試料中または個体中に存在するＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質をインビトロまたはインビボにおいて検出するためのアッセイであって、

ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／またはＬＳＲポリペプチドに対する特異性を有する抗体、抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、および／または代替足場を試料と接触させること、ならびに

試料中および／または個体中におけるＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質への結合を検出すること

を含むアッセイを提供する。

【００９７】

実施形態の少なくともいくつかによれば、試料中の配列番号１～８、１１～１８、４７～５０、５８、および１４３のいずれかで示されるポリペプチドのいずれか１つ、または該ポリペプチドと少なくとも９５％の同一性を有するその変異体を検出するためのアッセイが提供される。

【００９８】

実施形態の少なくともいくつかによれば、

対象の疾患を診断する方法であって、

対象または対象から得られた試料において、配列番号１～８、１１～１８、４７～５０、５８、および１４３のいずれかに示されるポリペプチドのいずれか１つ、または該ポリペプチドと少なくとも９５％の同一性を有するその変異体、またはこれらのフラグメントを検出することを含む方法が提供される。

【００９９】

上記のポリペプチドの検出はインビボまたはインビトロで行ってもよい。

【０１００】

上記の検出はイムノアッセイによって行ってもよい。

【０１０１】

上記の検出は本明細書に記載の抗体またはフラグメントを使用して行ってもよい。

【０１０２】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲの発現を検出することを含む、がん、本明細書に記載の感染性障害および／または免疫関連障害から選択される疾患の検出方法、該疾患の診断方法、該疾患の進行、治療の効果、または該疾患の再発をモニタリングする方法、該疾患の治療法を選択する方法、該疾患による影響を受けた細胞を検出する方法を提供する。

【０１０３】

一実施形態によれば、ポリペプチドの存在を検出することによって、疾患の存在、その重症度および／または進行を示すことができる。別の実施形態によれば、健常者から得られた試料中または健常者における発現量および／またはポリペプチドレベルと比較したときの、発現量および／またはポリペプチドレベルの変化は、疾患の存在、その重症度および／または進行を示す指標となる。さらなる実施形態によれば、疾患の初期段階における対象から得られた試料中または対象における発現量および／またはポリペプチドレベルと比較したときの、発現量および／またはポリペプチドレベルの変化は疾患の進行を示す指標となる。さらなる実施形態によれば、ポリペプチドの存在ならびに／またはポリペプチドの発現量および／もしくはレベルの相対的変化の検出は、治療の選択および／または疾患の治療のモニタリングに有用である。

【図面の簡単な説明】

【０１０４】

【図１Ａ】ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（図１Ａ（配列番号１））、ＶＳＩＧ１０タンパク質（図１Ｂ（配列番号３）および図１Ｃ（配列番号５））、ＴＭＥＭ２５タンパク質（図１Ｄ（配列番号７））、ＬＳＲタンパク質（図１Ｅ（配列番号１１）、図１Ｆ（配列番号１３）、図１Ｇ（配列番号１５）、図１Ｈ（配列番号１６）、図１Ｉ（配列番号１７）、および図１Ｊ（配列番号１８））、これらのフラグメントおよびＥＣＤ、ならびにこれらをコードする核酸配列を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基を太字のイタリック体で示す。ＩｇＶドメインおよび／またはＩｇＣドメインを囲み枠内に示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当するアミノ酸残基を下線を引いた太字で示す。アイソフォームのいくつかにおいて選択的にスキップされたエクソンに相当するアミノ酸残基（図１Ｂおよび図１Ｅ）を下線を引いたイタリック体で示す。選択的エクソンスキッピングＶＳＩＧ１０変異体（エクソン３をスキップさせることにより作製）および選択的エクソンスキッピングＬＳＲ変異体（エクソン３、４および５をスキップさせることにより作製したアイソフォームｅ）に相当する核酸配列を、図１Ｃおよび１Ｉに太字で示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当する核酸配列を図１Ｃにおいて下線を引いた太字で示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当する核酸配列を、図１Ｃ、１Ｅ、１Ｇ、１Ｈ、１Ｉおよび１Ｊにおいて太字のイタリック体で示す。ＴＧＡ終止コドンを図１Ｃおよび１Ｉにおいて強調して示す。

【図１Ｂ】ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（図１Ａ（配列番号１））、ＶＳＩＧ１０タンパク質（図１Ｂ（配列番号３）および図１Ｃ（配列番号５））、ＴＭＥＭ２５タンパク質（図１Ｄ（配列番号７））、ＬＳＲタンパク質（図１Ｅ（配列番号１１）、図１Ｆ（配列番号１３）、図１Ｇ（配列番号１５）、図１Ｈ（配列番号１６）、図１Ｉ（配列番号１７）、および図１Ｊ（配列番号１８））、これらのフラグメントおよびＥＣＤ、ならびにこれらをコードする核酸配列を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基を太字のイタリック体で示す。ＩｇＶドメインおよび／またはＩｇＣドメインを囲み枠内に示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当するアミノ酸残基を下線を引いた太字で示す。アイソフォームのいくつかにおいて選択的にスキップされたエクソンに相当するアミノ酸残基（図１Ｂおよび図１Ｅ）を下線を引いたイタリック体で示す。選択的エクソンスキッピングＶＳＩＧ１０変異体（エクソン３をスキップさせることにより作製）および選択的エクソンス

キッピングＬＳＲ変異体（エクソン３、４および５をスキップさせることにより作製したアイソフォームｅ）に相当する核酸配列を、図１Ｃおよび１Ｉに太字で示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当する核酸配列を図１Ｃにおいて下線を引いた太字で示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当する核酸配列を、図１Ｃ、１Ｅ、１Ｇ、１Ｈ、１Ｉおよび１Ｊにおいて太字のイタリック体で示す。ＴＧＡ終止コドンを図１Ｃおよび１Ｉにおいて強調して示す。

【図１Ｃ－１】ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（図１Ａ（配列番号１））、ＶＳＩＧ１０タンパク質（図１Ｂ（配列番号３）および図１Ｃ（配列番号５））、ＴＭＥＭ２５タンパク質（図１Ｄ（配列番号７））、ＬＳＲタンパク質（図１Ｅ（配列番号１１）、図１Ｆ（配列番号１３）、図１Ｇ（配列番号１５）、図１Ｈ（配列番号１６）、図１Ｉ（配列番号１７）、および図１Ｊ（配列番号１８））、これらのフラグメントおよびＥＣＤ、ならびにこれらをコードする核酸配列を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基を太字のイタリック体で示す。ＩｇＶドメインおよび／またはＩｇＣドメインを囲み枠内に示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当するアミノ酸残基を下線を引いた太字で示す。アイソフォームのいくつかにおいて選択的にスキップされたエクソンに相当するアミノ酸残基（図１Ｂおよび図１Ｅ）を下線を引いたイタリック体で示す。選択的エクソンスキッピングＶＳＩＧ１０変異体（エクソン３をスキップさせることにより作製）および選択的エクソンスキッピングＬＳＲ変異体（エクソン３、４および５をスキップさせることにより作製したアイソフォームｅ）に相当する核酸配列を、図１Ｃおよび１Ｉに太字で示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当する核酸配列を図１Ｃにおいて下線を引いた太字で示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当する核酸配列を、図１Ｃ、１Ｅ、１Ｇ、１Ｈ、１Ｉおよび１Ｊにおいて太字のイタリック体で示す。ＴＧＡ終止コドンを図１Ｃおよび１Ｉにおいて強調して示す。

【図１Ｃ－２】ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（図１Ａ（配列番号１））、ＶＳＩＧ１０タンパク質（図１Ｂ（配列番号３）および図１Ｃ（配列番号５））、ＴＭＥＭ２５タンパク質（図１Ｄ（配列番号７））、ＬＳＲタンパク質（図１Ｅ（配列番号１１）、図１Ｆ（配列番号１３）、図１Ｇ（配列番号１５）、図１Ｈ（配列番号１６）、図１Ｉ（配列番号１７）、および図１Ｊ（配列番号１８））、これらのフラグメントおよびＥＣＤ、ならびにこれらをコードする核酸配列を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基を太字のイタリック体で示す。ＩｇＶドメインおよび／またはＩｇＣドメインを囲み枠内に示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当するアミノ酸残基を下線を引いた太字で示す。アイソフォームのいくつかにおいて選択的にスキップされたエクソンに相当するアミノ酸残基（図１Ｂおよび図１Ｅ）を下線を引いたイタリック体で示す。選択的エクソンスキッピングＶＳＩＧ１０変異体（エクソン３をスキップさせることにより作製）および選択的エクソンスキッピングＬＳＲ変異体（エクソン３、４および５をスキップさせることにより作製したアイソフォームｅ）に相当する核酸配列を、図１Ｃおよび１Ｉに太字で示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当する核酸配列を図１Ｃにおいて下線を引いた太字で示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当する核酸配列を、図１Ｃ、１Ｅ、１Ｇ、１Ｈ、１Ｉおよび１Ｊにおいて太字のイタリック体で示す。ＴＧＡ終止コドンを図１Ｃおよび１Ｉにおいて強調して示す。

【図１Ｃ－３】ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（図１Ａ（配列番号１））、ＶＳＩＧ１０タンパク質（図１Ｂ（配列番号３）および図１Ｃ（配列番号５））、ＴＭＥＭ２５タンパク質（図１Ｄ（配列番号７））、ＬＳＲタンパク質（図１Ｅ（配列番号１１）、図１Ｆ（配列番号１３）、図１Ｇ（配列番号１５）、図１Ｈ（配列番号１６）、図１Ｉ（配列番号１７）、および図１Ｊ（配列番号１８））、これらのフラグメントおよびＥＣＤ、ならびにこれらをコードする核酸配列を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基を太字のイタリック体で示す。ＩｇＶドメインおよび／またはＩｇＣドメインを囲み枠内に示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当するアミノ酸残基を下線を引いた太字で示す。アイソフォームのいくつかにおいて選択的にスキップされたエクソンに相当するアミノ酸残基（図１Ｂおよび図１Ｅ）を下線を引いたイタリック体で示す。選択的エクソンスキッピング

ＶＳＩＧ１０変異体（エクソン３をスキップさせることにより作製）および選択的エクソンスキッピングＬＳＲ変異体（エクソン３、４および５をスキップさせることにより作製したアイソフォームｅ）に相当する核酸配列を、図１Ｃおよび１Ｉに太字で示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当する核酸配列を図１Ｃにおいて下線を引いた太字で示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当する核酸配列を、図１Ｃ、１Ｅ、１Ｇ、１Ｈ、１Ｉおよび１Ｊにおいて太字のイタリック体で示す。ＴＧＡ終止コドンを図１Ｃおよび１Ｉにおいて強調して示す。

【図１Ｄ】ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（図１Ａ（配列番号１））、ＶＳＩＧ１０タンパク質（図１Ｂ（配列番号３）および図１Ｃ（配列番号５））、ＴＭＥＭ２５タンパク質（図１Ｄ（配列番号７））、ＬＳＲタンパク質（図１Ｅ（配列番号１１）、図１Ｆ（配列番号１３）、図１Ｇ（配列番号１５）、図１Ｈ（配列番号１６）、図１Ｉ（配列番号１７）、および図１Ｊ（配列番号１８））、これらのフラグメントおよびＥＣＤ、ならびにこれらをコードする核酸配列を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基を太字のイタリック体で示す。ＩｇＶドメインおよび／またはＩｇＣドメインを囲み枠内に示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当するアミノ酸残基を下線を引いた太字で示す。アイソフォームのいくつかにおいて選択的にスキップされたエクソンに相当するアミノ酸残基（図１Ｂおよび図１Ｅ）を下線を引いたイタリック体で示す。選択的エクソンスキッピングＶＳＩＧ１０変異体（エクソン３をスキップさせることにより作製）および選択的エクソンスキッピングＬＳＲ変異体（エクソン３、４および５をスキップさせることにより作製したアイソフォームｅ）に相当する核酸配列を、図１Ｃおよび１Ｉに太字で示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当する核酸配列を図１Ｃにおいて下線を引いた太字で示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当する核酸配列を、図１Ｃ、１Ｅ、１Ｇ、１Ｈ、１Ｉおよび１Ｊにおいて太字のイタリック体で示す。ＴＧＡ終止コドンを図１Ｃおよび１Ｉにおいて強調して示す。

【図１Ｅ】ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（図１Ａ（配列番号１））、ＶＳＩＧ１０タンパク質（図１Ｂ（配列番号３）および図１Ｃ（配列番号５））、ＴＭＥＭ２５タンパク質（図１Ｄ（配列番号７））、ＬＳＲタンパク質（図１Ｅ（配列番号１１）、図１Ｆ（配列番号１３）、図１Ｇ（配列番号１５）、図１Ｈ（配列番号１６）、図１Ｉ（配列番号１７）、および図１Ｊ（配列番号１８））、これらのフラグメントおよびＥＣＤ、ならびにこれらをコードする核酸配列を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基を太字のイタリック体で示す。ＩｇＶドメインおよび／またはＩｇＣドメインを囲み枠内に示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当するアミノ酸残基を下線を引いた太字で示す。アイソフォームのいくつかにおいて選択的にスキップされたエクソンに相当するアミノ酸残基（図１Ｂおよび図１Ｅ）を下線を引いたイタリック体で示す。選択的エクソンスキッピングＶＳＩＧ１０変異体（エクソン３をスキップさせることにより作製）および選択的エクソンスキッピングＬＳＲ変異体（エクソン３、４および５をスキップさせることにより作製したアイソフォームｅ）に相当する核酸配列を、図１Ｃおよび１Ｉに太字で示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当する核酸配列を図１Ｃにおいて下線を引いた太字で示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当する核酸配列を、図１Ｃ、１Ｅ、１Ｇ、１Ｈ、１Ｉおよび１Ｊにおいて太字のイタリック体で示す。ＴＧＡ終止コドンを図１Ｃおよび１Ｉにおいて強調して示す。

【図１Ｆ】ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（図１Ａ（配列番号１））、ＶＳＩＧ１０タンパク質（図１Ｂ（配列番号３）および図１Ｃ（配列番号５））、ＴＭＥＭ２５タンパク質（図１Ｄ（配列番号７））、ＬＳＲタンパク質（図１Ｅ（配列番号１１）、図１Ｆ（配列番号１３）、図１Ｇ（配列番号１５）、図１Ｈ（配列番号１６）、図１Ｉ（配列番号１７）、および図１Ｊ（配列番号１８））、これらのフラグメントおよびＥＣＤ、ならびにこれらをコードする核酸配列を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基を太字のイタリック体で示す。ＩｇＶドメインおよび／またはＩｇＣドメインを囲み枠内に示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当するアミノ酸残基を下線を引いた太字で示す。アイソフォームのいくつかにおいて選択的にスキップされたエクソンに相当するアミノ酸残基（図１

Ｂおよび図１Ｅ）を下線を引いたイタリック体で示す。選択的エクソンスキッピングＶＳＩＧ１０変異体（エクソン３をスキップさせることにより作製）および選択的エクソンスキッピングＬＳＲ変異体（エクソン３、４および５をスキップさせることにより作製したアイソフォームｅ）に相当する核酸配列を、図１Ｃおよび１Ｉに太字で示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当する核酸配列を図１Ｃにおいて下線を引いた太字で示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当する核酸配列を、図１Ｃ、１Ｅ、１Ｇ、１Ｈ、１Ｉおよび１Ｊにおいて太字のイタリック体で示す。ＴＧＡ終止コドンを図１Ｃおよび１Ｉにおいて強調して示す。

【図１Ｇ】ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（図１Ａ（配列番号１））、ＶＳＩＧ１０タンパク質（図１Ｂ（配列番号３）および図１Ｃ（配列番号５））、ＴＭＥＭ２５タンパク質（図１Ｄ（配列番号７））、ＬＳＲタンパク質（図１Ｅ（配列番号１１）、図１Ｆ（配列番号１３）、図１Ｇ（配列番号１５）、図１Ｈ（配列番号１６）、図１Ｉ（配列番号１７）、および図１Ｊ（配列番号１８））、これらのフラグメントおよびＥＣＤ、ならびにこれらをコードする核酸配列を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基を太字のイタリック体で示す。ＩｇＶドメインおよび／またはＩｇＣドメインを囲み枠内に示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当するアミノ酸残基を下線を引いた太字で示す。アイソフォームのいくつかにおいて選択的にスキップされたエクソンに相当するアミノ酸残基（図１Ｂおよび図１Ｅ）を下線を引いたイタリック体で示す。選択的エクソンスキッピングＶＳＩＧ１０変異体（エクソン３をスキップさせることにより作製）および選択的エクソンスキッピングＬＳＲ変異体（エクソン３、４および５をスキップさせることにより作製したアイソフォームｅ）に相当する核酸配列を、図１Ｃおよび１Ｉに太字で示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当する核酸配列を図１Ｃにおいて下線を引いた太字で示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当する核酸配列を、図１Ｃ、１Ｅ、１Ｇ、１Ｈ、１Ｉおよび１Ｊにおいて太字のイタリック体で示す。ＴＧＡ終止コドンを図１Ｃおよび１Ｉにおいて強調して示す。

【図１Ｈ】ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（図１Ａ（配列番号１））、ＶＳＩＧ１０タンパク質（図１Ｂ（配列番号３）および図１Ｃ（配列番号５））、ＴＭＥＭ２５タンパク質（図１Ｄ（配列番号７））、ＬＳＲタンパク質（図１Ｅ（配列番号１１）、図１Ｆ（配列番号１３）、図１Ｇ（配列番号１５）、図１Ｈ（配列番号１６）、図１Ｉ（配列番号１７）、および図１Ｊ（配列番号１８））、これらのフラグメントおよびＥＣＤ、ならびにこれらをコードする核酸配列を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基を太字のイタリック体で示す。ＩｇＶドメインおよび／またはＩｇＣドメインを囲み枠内に示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当するアミノ酸残基を下線を引いた太字で示す。アイソフォームのいくつかにおいて選択的にスキップされたエクソンに相当するアミノ酸残基（図１Ｂおよび図１Ｅ）を下線を引いたイタリック体で示す。選択的エクソンスキッピングＶＳＩＧ１０変異体（エクソン３をスキップさせることにより作製）および選択的エクソンスキッピングＬＳＲ変異体（エクソン３、４および５をスキップさせることにより作製したアイソフォームｅ）に相当する核酸配列を、図１Ｃおよび１Ｉに太字で示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当する核酸配列を図１Ｃにおいて下線を引いた太字で示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当する核酸配列を、図１Ｃ、１Ｅ、１Ｇ、１Ｈ、１Ｉおよび１Ｊにおいて太字のイタリック体で示す。ＴＧＡ終止コドンを図１Ｃおよび１Ｉにおいて強調して示す。

【図１Ｉ－１】ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（図１Ａ（配列番号１））、ＶＳＩＧ１０タンパク質（図１Ｂ（配列番号３）および図１Ｃ（配列番号５））、ＴＭＥＭ２５タンパク質（図１Ｄ（配列番号７））、ＬＳＲタンパク質（図１Ｅ（配列番号１１）、図１Ｆ（配列番号１３）、図１Ｇ（配列番号１５）、図１Ｈ（配列番号１６）、図１Ｉ（配列番号１７）、および図１Ｊ（配列番号１８））、これらのフラグメントおよびＥＣＤ、ならびにこれらをコードする核酸配列を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基を太字のイタリック体で示す。ＩｇＶドメインおよび／またはＩｇＣドメインを囲み枠内に示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当するアミノ酸残基を下線を引いた太字で示す。アイソ

フォームのいくつかにおいて選択的にスキップされたエクソンに相当するアミノ酸残基（図１Ｂおよび図１Ｅ）を下線を引いたイタリック体で示す。選択的エクソンスキッピングＶＳＩＧ１０変異体（エクソン３をスキップさせることにより作製）および選択的エクソンスキッピングＬＳＲ変異体（エクソン３、４および５をスキップさせることにより作製したアイソフォームｅ）に相当する核酸配列を、図１Ｃおよび１Ｉに太字で示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当する核酸配列を図１Ｃにおいて下線を引いた太字で示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当する核酸配列を、図１Ｃ、１Ｅ、１Ｇ、１Ｈ、１Ｉおよび１Ｊにおいて太字のイタリック体で示す。ＴＧＡ終止コドンを図１Ｃおよび１Ｉにおいて強調して示す。

【図１Ｉ－２】ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（図１Ａ（配列番号１））、ＶＳＩＧ１０タンパク質（図１Ｂ（配列番号３）および図１Ｃ（配列番号５））、ＴＭＥＭ２５タンパク質（図１Ｄ（配列番号７））、ＬＳＲタンパク質（図１Ｅ（配列番号１１）、図１Ｆ（配列番号１３）、図１Ｇ（配列番号１５）、図１Ｈ（配列番号１６）、図１Ｉ（配列番号１７）、および図１Ｊ（配列番号１８））、これらのフラグメントおよびＥＣＤ、ならびにこれらをコードする核酸配列を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基を太字のイタリック体で示す。ＩｇＶドメインおよび／またはＩｇＣドメインを囲み枠内に示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当するアミノ酸残基を下線を引いた太字で示す。アイソフォームのいくつかにおいて選択的にスキップされたエクソンに相当するアミノ酸残基（図１Ｂおよび図１Ｅ）を下線を引いたイタリック体で示す。選択的エクソンスキッピングＶＳＩＧ１０変異体（エクソン３をスキップさせることにより作製）および選択的エクソンスキッピングＬＳＲ変異体（エクソン３、４および５をスキップさせることにより作製したアイソフォームｅ）に相当する核酸配列を、図１Ｃおよび１Ｉに太字で示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当する核酸配列を図１Ｃにおいて下線を引いた太字で示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当する核酸配列を、図１Ｃ、１Ｅ、１Ｇ、１Ｈ、１Ｉおよび１Ｊにおいて太字のイタリック体で示す。ＴＧＡ終止コドンを図１Ｃおよび１Ｉにおいて強調して示す。

【図１Ｊ－１】ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（図１Ａ（配列番号１））、ＶＳＩＧ１０タンパク質（図１Ｂ（配列番号３）および図１Ｃ（配列番号５））、ＴＭＥＭ２５タンパク質（図１Ｄ（配列番号７））、ＬＳＲタンパク質（図１Ｅ（配列番号１１）、図１Ｆ（配列番号１３）、図１Ｇ（配列番号１５）、図１Ｈ（配列番号１６）、図１Ｉ（配列番号１７）、および図１Ｊ（配列番号１８））、これらのフラグメントおよびＥＣＤ、ならびにこれらをコードする核酸配列を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基を太字のイタリック体で示す。ＩｇＶドメインおよび／またはＩｇＣドメインを囲み枠内に示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当するアミノ酸残基を下線を引いた太字で示す。アイソフォームのいくつかにおいて選択的にスキップされたエクソンに相当するアミノ酸残基（図１Ｂおよび図１Ｅ）を下線を引いたイタリック体で示す。選択的エクソンスキッピングＶＳＩＧ１０変異体（エクソン３をスキップさせることにより作製）および選択的エクソンスキッピングＬＳＲ変異体（エクソン３、４および５をスキップさせることにより作製したアイソフォームｅ）に相当する核酸配列を、図１Ｃおよび１Ｉに太字で示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当する核酸配列を図１Ｃにおいて下線を引いた太字で示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当する核酸配列を、図１Ｃ、１Ｅ、１Ｇ、１Ｈ、１Ｉおよび１Ｊにおいて太字のイタリック体で示す。ＴＧＡ終止コドンを図１Ｃおよび１Ｉにおいて強調して示す。

【図１Ｊ－２】ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（図１Ａ（配列番号１））、ＶＳＩＧ１０タンパク質（図１Ｂ（配列番号３）および図１Ｃ（配列番号５））、ＴＭＥＭ２５タンパク質（図１Ｄ（配列番号７））、ＬＳＲタンパク質（図１Ｅ（配列番号１１）、図１Ｆ（配列番号１３）、図１Ｇ（配列番号１５）、図１Ｈ（配列番号１６）、図１Ｉ（配列番号１７）、および図１Ｊ（配列番号１８））、これらのフラグメントおよびＥＣＤ、ならびにこれらをコードする核酸配列を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基を太字のイタリック体で示す。ＩｇＶドメインおよび／またはＩｇＣドメインを囲み枠内に示

す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当するアミノ酸残基を下線を引いた太字で示す。アイソフォームのいくつかにおいて選択的にスキップされたエクソンに相当するアミノ酸残基（図１Ｂおよび図１Ｅ）を下線を引いたイタリック体で示す。選択的エクソンスキッピングＶＳＩＧ１０変異体（エクソン３をスキップさせることにより作製）および選択的エクソンスキッピングＬＳＲ変異体（エクソン３、４および５をスキップさせることにより作製したアイソフォームｅ）に相当する核酸配列を、図１Ｃおよび１Ｉに太字で示す。膜貫通ドメイン（ＴＭ）に相当する核酸配列を図１Ｃにおいて下線を引いた太字で示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当する核酸配列を、図１Ｃ、１Ｅ、１Ｇ、１Ｈ、１Ｉおよび１Ｊにおいて太字のイタリック体で示す。ＴＧＡ終止コドンを図１Ｃおよび１Ｉにおいて強調して示す。

【図２Ａ－１】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ａ－２】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｅ

－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｂ－１（１）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号18）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｂ－１（２）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（

図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｂ－２（１）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｂ－２（２）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（

図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｃ－１（１）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｃ－１（２）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（

図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｃ－２（１）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｃ－２（２）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（

図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｄ－１（１）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｄ－１（２）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（

図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｄ－２（１）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｄ－２（２）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（

図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｅ－１（１）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｅ－１（２）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（

図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｅ－２（１）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｅ－２（２）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（

図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｆ－１】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｆ－２】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｅ

－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｇ－１（１）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｇ－１（２）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（

図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｇ－２（１）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図２Ｇ－２（２）】以下のアミノ酸配列比較を示す。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）と公知のＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０６１９５９．２）の比較（図２Ａ）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｂ－１）；ＬＳＲアイソフォームａ（配列番号１１）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６８、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０４）の比較（図２Ｂ－２）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６３、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿０５７００９）の比較（図２Ｃ－１）；ＬＳＲアイソフォームｂ（配列番号１３）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６５、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＣ１１６１４）の比較（図２Ｃ－２）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｄ－１）；ＬＳＲアイソフォームｃ（配列番号１５）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｄ－２）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（

図２Ｅ－１）；ＬＳＲアイソフォームｄ（配列番号１６）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６９、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＸＰ＿００２８２９１０５．１）の比較（図２Ｅ－２）；ＬＳＲアイソフォームｅ（配列番号１７）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６７、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＧ５９２２６．１）の比較（図２Ｆ）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６２、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０３）の比較（図２Ｇ－１）；ＬＳＲアイソフォームｆ（配列番号１８）と公知のＬＳＲタンパク質（配列番号６６、ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿９９１４０４）の比較（図２Ｇ－２）。ＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部（特有の接合部）の配列およびＬＳＲ変異体（配列番号１８）を下線を引いた太字で示す（図２Ａおよび図２Ｇ）。

【図３Ａ】ＭＥＤ探索エンジンを使用したすべての組織および病態のバーチャルパネルにおける、ＶＳＩＧ１０タンパク質をコードするＶＳＩＧ１０転写産物の発現を示す散布図であり、免疫系細胞（主として白血球）ならびに様々ながん病態（ＡＬＬからのＣＤ１０$^{+}$白血球およびＡＭＬからのＢＭ－ＣＤ３４$^{+}$細胞など）からなるいくつかのグループにおけるＶＳＩＧ１０転写産物の差次的発現を示している。

【図３Ｂ】ＭＥＤ探索エンジンを使用したすべての組織および病態のバーチャルパネルにおける、ＶＳＩＧ１０タンパク質をコードするＶＳＩＧ１０転写産物の発現を示す散布図であり、免疫系細胞（主として白血球）ならびに様々ながん病態（ＡＬＬからのＣＤ１０$^{+}$白血球およびＡＭＬからのＢＭ－ＣＤ３４$^{+}$細胞など）からなるいくつかのグループにおけるＶＳＩＧ１０転写産物の差次的発現を示している。

【図４Ａ－１】ＭＥＤ探索エンジンを使用したすべての組織および病態のバーチャルパネルにおける、ＬＳＲタンパク質をコードするＬＳＲ転写産物の発現を示す散布図である。免疫系細胞（主として骨髄細胞）ならびに様々な組織のがん病態（乳がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がんおよび皮膚がんなど）からなるいくつかのグループにおけるＬＳＲ転写産物の差次的発現を示している。

【図４Ａ－２】ＭＥＤ探索エンジンを使用したすべての組織および病態のバーチャルパネルにおける、ＬＳＲタンパク質をコードするＬＳＲ転写産物の発現を示す散布図である。免疫系細胞（主として骨髄細胞）ならびに様々な組織のがん病態（乳がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がんおよび皮膚がんなど）からなるいくつかのグループにおけるＬＳＲ転写産物の差次的発現を示している。

【図４Ｂ－１】ＭＥＤ探索エンジンを使用したすべての組織および病態のバーチャルパネルにおける、ＬＳＲタンパク質をコードするＬＳＲ転写産物の発現を示す散布図である。免疫系細胞（主として骨髄細胞）ならびに様々な組織のがん病態（乳がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がんおよび皮膚がんなど）からなるいくつかのグループにおけるＬＳＲ転写産物の差次的発現を示している。

【図４Ｂ－２】ＭＥＤ探索エンジンを使用したすべての組織および病態のバーチャルパネルにおける、ＬＳＲタンパク質をコードするＬＳＲ転写産物の発現を示す散布図である。免疫系細胞（主として骨髄細胞）ならびに様々な組織のがん病態（乳がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がんおよび皮膚がんなど）からなるいくつかのグループにおけるＬＳＲ転写産物の差次的発現を示している。

【図４Ｃ－１】ＭＥＤ探索エンジンを使用したすべての組織および病態のバーチャルパネルにおける、ＬＳＲタンパク質をコードするＬＳＲ転写産物の発現を示す散布図である。免疫系細胞（主として骨髄細胞）ならびに様々な組織のがん病態（乳がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がんおよび皮膚がんなど）からなるいくつかのグループにおけるＬＳＲ転写産物の差次的発現を示している。

【図４Ｃ－２】ＭＥＤ探索エンジンを使用したすべての組織および病態のバーチャルパネルにおける、ＬＳＲタンパク質をコードするＬＳＲ転写産物の発現を示す散布図である。免疫系細胞（主として骨髄細胞）ならびに様々な組織のがん病態（乳がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がんおよび皮膚がんなど）からなるいくつかのグループにおけるＬＳＲ転写産物の差次的発現を示している。

【図４Ｄ－１】ＭＥＤ探索エンジンを使用したすべての組織および病態のバーチャルパネルにおける、ＬＳＲタンパク質をコードするＬＳＲ転写産物の発現を示す散布図である。免疫系細胞（主として骨髄細胞）ならびに様々な組織のがん病態（乳がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がんおよび皮膚がんなど）からなるいくつかのグループにおけるＬＳＲ転写産物の差次的発現を示している。

【図４Ｄ－２】ＭＥＤ探索エンジンを使用したすべての組織および病態のバーチャルパネルにおける、ＬＳＲタンパク質をコードするＬＳＲ転写産物の発現を示す散布図である。免疫系細胞（主として骨髄細胞）ならびに様々な組織のがん病態（乳がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がんおよび皮膚がんなど）からなるいくつかのグループにおけるＬＳＲ転写産物の差次的発現を示している。

【図４Ｅ】ＭＥＤ探索エンジンを使用したすべての組織および病態のバーチャルパネルにおける、ＬＳＲタンパク質をコードするＬＳＲ転写産物の発現を示す散布図である。免疫系細胞（主として骨髄細胞）ならびに様々な組織のがん病態（乳がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がんおよび皮膚がんなど）からなるいくつかのグループにおけるＬＳＲ転写産物の差次的発現を示している。

【図５Ａ】ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ（配列番号１）とマウスＬＹ６Ｇ６Ｆ（ｒｅｆ｜ＮＰ＿００１１５６６６４．１、配列番号２９）のアミノ酸配列比較を示す。

【図５Ｂ－１】ヒトＶＳＩＧ１０（配列番号３）とマウスＶＳＩＧ１０（ｓｐ｜Ｄ３ＹＸ４３．２、配列番号３０）のアミノ酸配列比較を示す。

【図５Ｂ－２】ヒトＶＳＩＧ１０（配列番号３）とマウスＶＳＩＧ１０（ｓｐ｜Ｄ３ＹＸ４３．２、配列番号３０）のアミノ酸配列比較を示す。

【図５Ｃ－１】ヒトＬＳＲ（配列番号１１）とマウスＬＳＲ（ｒｅｆ｜ＮＰ＿０５９１０１．１、配列番号３１）またはマウスＬＳＲ（ｒｅｆ｜ＮＰ＿００１１５７６５６．１、配列番号３２）のアミノ酸配列比較を示す。

【図５Ｃ－２】ヒトＬＳＲ（配列番号１１）とマウスＬＳＲ（ｒｅｆ｜ＮＰ＿０５９１０１．１、配列番号３１）またはマウスＬＳＲ（ｒｅｆ｜ＮＰ＿００１１５７６５６．１、配列番号３２）のアミノ酸配列比較を示す。

【図５Ｃ－３】ヒトＬＳＲ（配列番号１１）とマウスＬＳＲ（ｒｅｆ｜ＮＰ＿０５９１０１．１、配列番号３１）またはマウスＬＳＲ（ｒｅｆ｜ＮＰ＿００１１５７６５６．１、配列番号３２）のアミノ酸配列比較を示す。

【図５Ｃ－４】ヒトＬＳＲ（配列番号１１）とマウスＬＳＲ（ｒｅｆ｜ＮＰ＿０５９１０１．１、配列番号３１）またはマウスＬＳＲ（ｒｅｆ｜ＮＰ＿００１１５７６５６．１、配列番号３２）のアミノ酸配列比較を示す。

【図５Ｄ】ヒトＴＭＥＭ２５（配列番号７）とマウスＴＭＥＭ２５（ｒｅｆ：　ｌｃｌ｜４１０９、配列番号２８）のアミノ酸配列比較を示す。

【図６】ＥＧＦＰに融合させたＬＹ６Ｇ６Ｆ転写産物のクローニングに使用したプライマーの要約を記載した表である。表１１において、太字は遺伝子特異的配列を示し、イタリック体はクローニングに使用した制限部位を示し、下線部はコザック配列を示す。

【図７－１】ＥＧＦＰに融合させた完全長ＬＹ６Ｇ６ＦのＤＮＡ配列を示す。ＬＹ６Ｇ６Ｆの完全長配列に相応する遺伝子特異的配列を太字で示し、ＥＧＦＰ配列を太字にしていない下線を引いたイタリック体で示す。

【図７－２】ＥＧＦＰに融合させた完全長ＬＹ６Ｇ６ＦのＤＮＡ配列を示す。ＬＹ６Ｇ６Ｆの完全長配列に相応する遺伝子特異的配列を太字で示し、ＥＧＦＰ配列を太字にしていない下線を引いたイタリック体で示す。

【図８】結果として得られた、ＥＧＦＰに融合させた完全長ＬＹ６Ｇ６Ｆのアミノ酸配列を示す。ＬＹ６Ｇ６Ｆの完全長配列に相応する遺伝子特異的配列を太字で示し、ＥＧＦＰ配列を太字にしていない下線を引いたイタリック体で示す。

【図９】ＨＥＫ２９３Ｔ細胞において一時的に発現されたＧ６Ｆ＿ＥＧＦＰ融合タンパク質の細胞局在を示す。画像は共焦点顕微鏡（４０倍）を使用して得た。

【図１０】マウスＩｇＧ２ａ　Ｆｃに融合させたマウスＥＣＤを示す。図１０Ａ～Ｄは、

マウスＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（本明細書においてＬＹ６Ｇ６Ｆ－Ｉｇとも呼ぶ（図１０Ａ））、マウスＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（図１０Ｂ）、マウスＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（本明細書においてＴＭＥＭ２５－Ｉｇとも呼ぶ（図１０Ｃ））マウスＬＳＲ　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（本明細書においてＬＳＲ－Ｉｇとも呼ぶ（図１０Ｄ））（配列番号２３、２４、２５、または２６）を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基をイタリック体で示す。ＥＣＤ配列に相当するアミノ酸残基を下線で示す。マウスＩｇＧ２ａＦｃに相当するアミノ酸残基を太字で示す（配列番号２７）。

【図１０Ａ】マウスＩｇＧ２ａ　Ｆｃに融合させたマウスＥＣＤを示す。図１０Ａ～Ｄは、マウスＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（本明細書においてＬＹ６Ｇ６Ｆ－Ｉｇとも呼ぶ（図１０Ａ））、マウスＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（図１０Ｂ）、マウスＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（本明細書においてＴＭＥＭ２５－Ｉｇとも呼ぶ（図１０Ｃ））マウスＬＳＲ　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（本明細書においてＬＳＲ－Ｉｇとも呼ぶ（図１０Ｄ））（配列番号２３、２４、２５、または２６）を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基をイタリック体で示す。ＥＣＤ配列に相当するアミノ酸残基を下線で示す。マウスＩｇＧ２ａＦｃに相当するアミノ酸残基を太字で示す（配列番号２７）。

【図１０Ｂ】マウスＩｇＧ２ａ　Ｆｃに融合させたマウスＥＣＤを示す。図１０Ａ～Ｄは、マウスＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（本明細書においてＬＹ６Ｇ６Ｆ－Ｉｇとも呼ぶ（図１０Ａ））、マウスＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（図１０Ｂ）、マウスＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（本明細書においてＴＭＥＭ２５－Ｉｇとも呼ぶ（図１０Ｃ））マウスＬＳＲ　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（本明細書においてＬＳＲ－Ｉｇとも呼ぶ（図１０Ｄ））（配列番号２３、２４、２５、または２６）を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基をイタリック体で示す。ＥＣＤ配列に相当するアミノ酸残基を下線で示す。マウスＩｇＧ２ａＦｃに相当するアミノ酸残基を太字で示す（配列番号２７）。

【図１０Ｃ】マウスＩｇＧ２ａ　Ｆｃに融合させたマウスＥＣＤを示す。図１０Ａ～Ｄは、マウスＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（本明細書においてＬＹ６Ｇ６Ｆ－Ｉｇとも呼ぶ（図１０Ａ））、マウスＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（図１０Ｂ）、マウスＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（本明細書においてＴＭＥＭ２５－Ｉｇとも呼ぶ（図１０Ｃ））マウスＬＳＲ　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（本明細書においてＬＳＲ－Ｉｇとも呼ぶ（図１０Ｄ））（配列番号２３、２４、２５、または２６）を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基をイタリック体で示す。ＥＣＤ配列に相当するアミノ酸残基を下線で示す。マウスＩｇＧ２ａＦｃに相当するアミノ酸残基を太字で示す（配列番号２７）。

【図１０Ｄ】マウスＩｇＧ２ａ　Ｆｃに融合させたマウスＥＣＤを示す。図１０Ａ～Ｄは、マウスＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（本明細書においてＬＹ６Ｇ６Ｆ－Ｉｇとも呼ぶ（図１０Ａ））、マウスＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（図１０Ｂ）、マウスＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（本明細書においてＴＭＥＭ２５－Ｉｇとも呼ぶ（図１０Ｃ））マウスＬＳＲ　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（本明細書においてＬＳＲ－Ｉｇとも呼ぶ（図１０Ｄ））（配列番号２３、２４、２５、または２６）を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基をイタリック体で示す。ＥＣＤ配列に相当するアミノ酸残基を下線で示す。マウスＩｇＧ２ａＦｃに相当するアミノ酸残基を太字で示す（配列番号２７）。

【図１１Ａ】２２０位（完全長ヒトＩｇＧ１に従った番号付け、配列番号７０の５位）の

ＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に融合させたヒトＥＣＤのアミノ酸配列を示す。それぞれの図は、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ（図１１Ａ）、ヒトＶＳＩＧ１０（図１１Ｂ）、エクソン３スキッピングヒトＶＳＩＧ１０変異体（図１１Ｃ）、ヒトＴＭＥＭ２５（図１１Ｄ）、ヒトＬＳＲアイソフォームａ（図１１Ｅ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｂ（図１１Ｆ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｃ（図１１Ｇ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｄ（図１１Ｈ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｅ（図１１Ｉ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｆ（ヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合させたＥＣＤ）（図１１Ｊ）（配列番号７１～８０）を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基は太字のイタリック体で示した。ヒトＥＣＤ配列に相当するアミノ酸残基には下線が引いてある。２２０位のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に相当するアミノ酸残基には印を付けていない。

【図１１Ｂ】２２０位（完全長ヒトＩｇＧ１に従った番号付け、配列番号７０の５位）のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に融合させたヒトＥＣＤのアミノ酸配列を示す。それぞれの図は、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ（図１１Ａ）、ヒトＶＳＩＧ１０（図１１Ｂ）、エクソン３スキッピングヒトＶＳＩＧ１０変異体（図１１Ｃ）、ヒトＴＭＥＭ２５（図１１Ｄ）、ヒトＬＳＲアイソフォームａ（図１１Ｅ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｂ（図１１Ｆ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｃ（図１１Ｇ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｄ（図１１Ｈ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｅ（図１１Ｉ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｆ（ヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合させたＥＣＤ）（図１１Ｊ）（配列番号７１～８０）を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基は太字のイタリック体で示した。ヒトＥＣＤ配列に相当するアミノ酸残基には下線が引いてある。２２０位のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に相当するアミノ酸残基には印を付けていない。

【図１１Ｃ】２２０位（完全長ヒトＩｇＧ１に従った番号付け、配列番号７０の５位）のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に融合させたヒトＥＣＤのアミノ酸配列を示す。それぞれの図は、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ（図１１Ａ）、ヒトＶＳＩＧ１０（図１１Ｂ）、エクソン３スキッピングヒトＶＳＩＧ１０変異体（図１１Ｃ）、ヒトＴＭＥＭ２５（図１１Ｄ）、ヒトＬＳＲアイソフォームａ（図１１Ｅ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｂ（図１１Ｆ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｃ（図１１Ｇ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｄ（図１１Ｈ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｅ（図１１Ｉ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｆ（ヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合させたＥＣＤ）（図１１Ｊ）（配列番号７１～８０）を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基は太字のイタリック体で示した。ヒトＥＣＤ配列に相当するアミノ酸残基には下線が引いてある。２２０位のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に相当するアミノ酸残基には印を付けていない。

【図１１Ｄ】２２０位（完全長ヒトＩｇＧ１に従った番号付け、配列番号７０の５位）のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に融合させたヒトＥＣＤのアミノ酸配列を示す。それぞれの図は、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ（図１１Ａ）、ヒトＶＳＩＧ１０（図１１Ｂ）、エクソン３スキッピングヒトＶＳＩＧ１０変異体（図１１Ｃ）、ヒトＴＭＥＭ２５（図１１Ｄ）、ヒトＬＳＲアイソフォームａ（図１１Ｅ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｂ（図１１Ｆ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｃ（図１１Ｇ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｄ（図１１Ｈ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｅ（図１１Ｉ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｆ（ヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合させたＥＣＤ）（図１１Ｊ）（配列番号７１～８０）を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基は太字のイタリック体で示した。ヒトＥＣＤ配列に相当するアミノ酸残基には下線が引いてある。２２０位のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に相当するアミノ酸残基には印を付けていない。

【図１１Ｅ】２２０位（完全長ヒトＩｇＧ１に従った番号付け、配列番号７０の５位）のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に融合させたヒトＥＣＤのアミノ酸配列を示す。それぞれの図は、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ（図１１Ａ）、ヒトＶＳ

ＩＧ１０（図１１Ｂ）、エクソン３スキッピングヒトＶＳＩＧ１０変異体（図１１Ｃ）、ヒトＴＭＥＭ２５（図１１Ｄ）、ヒトＬＳＲアイソフォームａ（図１１Ｅ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｂ（図１１Ｆ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｃ（図１１Ｇ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｄ（図１１Ｈ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｅ（図１１Ｉ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｆ（ヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合させたＥＣＤ）（図１１Ｊ）（配列番号７１～８０）を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基は太字のイタリック体で示した。ヒトＥＣＤ配列に相当するアミノ酸残基には下線が引いてある。２２０位のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に相当するアミノ酸残基には印を付けていない。

【図１１Ｆ】２２０位（完全長ヒトＩｇＧ１に従った番号付け、配列番号７０の５位）のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に融合させたヒトＥＣＤのアミノ酸配列を示す。それぞれの図は、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ（図１１Ａ）、ヒトＶＳＩＧ１０（図１１Ｂ）、エクソン３スキッピングヒトＶＳＩＧ１０変異体（図１１Ｃ）、ヒトＴＭＥＭ２５（図１１Ｄ）、ヒトＬＳＲアイソフォームａ（図１１Ｅ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｂ（図１１Ｆ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｃ（図１１Ｇ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｄ（図１１Ｈ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｅ（図１１Ｉ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｆ（ヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合させたＥＣＤ）（図１１Ｊ）（配列番号７１～８０）を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基は太字のイタリック体で示した。ヒトＥＣＤ配列に相当するアミノ酸残基には下線が引いてある。２２０位のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に相当するアミノ酸残基には印を付けていない。

【図１１Ｇ】２２０位（完全長ヒトＩｇＧ１に従った番号付け、配列番号７０の５位）のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に融合させたヒトＥＣＤのアミノ酸配列を示す。それぞれの図は、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ（図１１Ａ）、ヒトＶＳＩＧ１０（図１１Ｂ）、エクソン３スキッピングヒトＶＳＩＧ１０変異体（図１１Ｃ）、ヒトＴＭＥＭ２５（図１１Ｄ）、ヒトＬＳＲアイソフォームａ（図１１Ｅ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｂ（図１１Ｆ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｃ（図１１Ｇ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｄ（図１１Ｈ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｅ（図１１Ｉ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｆ（ヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合させたＥＣＤ）（図１１Ｊ）（配列番号７１～８０）を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基は太字のイタリック体で示した。ヒトＥＣＤ配列に相当するアミノ酸残基には下線が引いてある。２２０位のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に相当するアミノ酸残基には印を付けていない。

【図１１Ｈ】２２０位（完全長ヒトＩｇＧ１に従った番号付け、配列番号７０の５位）のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に融合させたヒトＥＣＤのアミノ酸配列を示す。それぞれの図は、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ（図１１Ａ）、ヒトＶＳＩＧ１０（図１１Ｂ）、エクソン３スキッピングヒトＶＳＩＧ１０変異体（図１１Ｃ）、ヒトＴＭＥＭ２５（図１１Ｄ）、ヒトＬＳＲアイソフォームａ（図１１Ｅ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｂ（図１１Ｆ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｃ（図１１Ｇ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｄ（図１１Ｈ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｅ（図１１Ｉ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｆ（ヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合させたＥＣＤ）（図１１Ｊ）（配列番号７１～８０）を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基は太字のイタリック体で示した。ヒトＥＣＤ配列に相当するアミノ酸残基には下線が引いてある。２２０位のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に相当するアミノ酸残基には印を付けていない。

【図１１Ｉ】２２０位（完全長ヒトＩｇＧ１に従った番号付け、配列番号７０の５位）のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に融合させたヒトＥＣＤのアミノ酸配列を示す。それぞれの図は、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ（図１１Ａ）、ヒトＶＳＩＧ１０（図１１Ｂ）、エクソン３スキッピングヒトＶＳＩＧ１０変異体（図１１Ｃ）、ヒトＴＭＥＭ２５（図１１Ｄ）、ヒトＬＳＲアイソフォームａ（図１１Ｅ）、ヒトＬＳＲ

アイソフォームｂ（図１１Ｆ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｃ（図１１Ｇ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｄ（図１１Ｈ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｅ（図１１Ｉ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｆ（ヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合させたＥＣＤ）（図１１Ｊ）（配列番号７１～８０）を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基は太字のイタリック体で示した。ヒトＥＣＤ配列に相当するアミノ酸残基には下線が引いてある。２２０位のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に相当するアミノ酸残基には印を付けていない。

【図１１Ｊ】２２０位（完全長ヒトＩｇＧ１に従った番号付け、配列番号７０の５位）のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に融合させたヒトＥＣＤのアミノ酸配列を示す。それぞれの図は、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ（図１１Ａ）、ヒトＶＳＩＧ１０（図１１Ｂ）、エクソン３スキッピングヒトＶＳＩＧ１０変異体（図１１Ｃ）、ヒトＴＭＥＭ２５（図１１Ｄ）、ヒトＬＳＲアイソフォームａ（図１１Ｅ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｂ（図１１Ｆ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｃ（図１１Ｇ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｄ（図１１Ｈ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｅ（図１１Ｉ）、ヒトＬＳＲアイソフォームｆ（ヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合させたＥＣＤ）（図１１Ｊ）（配列番号７１～８０）を示す。シグナルペプチド（ＳＰ）に相当するアミノ酸残基は太字のイタリック体で示した。ヒトＥＣＤ配列に相当するアミノ酸残基には下線が引いてある。２２０位のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ（配列番号１５６）に相当するアミノ酸残基には印を付けていない。

【図１２Ａ】ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）に従って、またはこれを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の卵巣がん試料における過剰発現量を正常試料に対して相対的に示したヒストグラムである。

【図１２Ｂ】ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）に従って、またはこれを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の卵巣がん試料における過剰発現量を正常試料に対して相対的に示したヒストグラムである。

【図１２Ｃ】ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）に従って、またはこれを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の卵巣がん試料における過剰発現量を正常試料に対して相対的に示したヒストグラムである。

【図１３Ａ】ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）に従って、またはこれを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の乳がん試料における過剰発現量を正常試料に対して相対的に示したヒストグラムである。

【図１３Ｂ】ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）に従って、またはこれを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の乳がん試料における過剰発現量を正常試料に対して相対的に示したヒストグラムである。

【図１３Ｃ】ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）に従って、またはこれを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の乳がん試料における過剰発現量を正常試料に対して相対的に示したヒストグラムである。

【図１４Ａ】ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）に従って、またはこれを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の肺がん試料における過剰発現量を正常試料に対して相対的に示したヒストグラムである。

【図１４Ｂ】ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）に従って、またはこれを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の肺がん試料における過剰発現量を正常試料に対して相対的に示したヒストグラムである。

【図１５Ａ】ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）に従って、またはこれを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の正常組織試料における過剰発現量を卵巣試料に対して相対的に示したヒストグラムである。

【図１５Ｂ】ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）に従って、またはこれを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の正常組織試料における過剰発現量を卵巣試料に対して相対的に示したヒストグラムである。

【図１６】ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番

号１４０）に従って、またはこれを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の腎臓がん試料における過剰発現量を正常試料に対して相対的に示したヒストグラムである。
【図１７】ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）に従って、またはこれを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の肝臓がん試料における過剰発現量を正常試料に対して相対的に示したヒストグラムである。
【図１８】抗Ｆｌａｇ抗体（シグマ、カタログ番号：Ａ８５９２）（図１８Ａ）および抗ＬＳＲ抗体（Ａｂｎｏｖａ、カタログ番号：Ｈ０００５１５９９－Ｂ０１Ｐ（図１８Ｂ）；アブカム、カタログ番号：ａｂ５９６４６（図１８Ｃ）；およびシグマ、カタログ番号：ＨＰＡ００７２７０（図１８Ｄ））を使用して検出された、安定にトランスフェクトされた組換えＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿Ｆｌａｇ＿ｍタンパク質（配列番号１４４）の発現のウェスタンブロット解析を示す。　レーン１：ＨＥＫ２９３Ｔ＿ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３；　レーン２：ＨＥＫ２９３Ｔ＿ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３＿ＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿Ｆｌａｇ
【図１９Ａ－Ｄ】ＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿Ｆｌａｇ＿ｍの細胞内局在を示す。抗Ｆｌａｇ（シグマ、カタログ番号：Ａ９５９４）（図１９Ａ）および抗ＬＳＲ抗体（アブカム、カタログ番号：ａｂ５９６４６（図１９Ｂ）、Ａｂｎｏｖａ、カタログ番号：Ｈ０００５１５９９－Ｂ０１Ｐ（図１９Ｃ）およびシグマ、カタログ番号ＨＰＡ００７２７０（図１９Ｄ））で検出されたように、ＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿Ｆｌａｇ＿ｍ（配列番号１４４）は主として細胞質に局在しているが、細胞表面上にも検出することができる。
【図２０】様々な細胞株におけるＬＳＲの内因性発現を示す。ＬＳＲに相当する７２ｋＤａのバンドは、抗ＬＳＲ抗体によって、（１）Ｃａｏｖ３、（２）ＥＳ２、（３）ＯＶ－９０、（４）ＯＶＣＡＲ３、（５）ＳＫ－ＯＶ３、（６）ＴＯＶ１１２Ｄ、（７）ＣａＣｏ２、（８）ＨｅＬａ、（９）Ｈｅｐ　Ｇ２、（１０）ＭＣＦ－７、（１１）ＳｋＢＲ３および（１２）２９３Ｔ＿ＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿Ｆｌａｇの抽出液中に検出された（図２０Ａ）。抗ＧＡＰＤＨ（アブカム、カタログ番号：ａｂ９４８４）はローディングコントロールとして使用した（図２０Ｂ）。
【図２１Ａ】ｓｅｇ２１－２７－ＴＭＥＭ２５＿ｓｅｇ＿２１－２７＿２００－３４４／３４６＿アンプリコン（配列番号１２３）に従って、またはこれを使用して検出可能なＴＭＥＭ２５転写産物の正常組織および乳がん組織における発現量を示したヒストグラムである。
【図２１Ｂ】ｓｅｇ２１－２７－ＴＭＥＭ２５＿ｓｅｇ＿２１－２７＿２００－３４４／３４６＿アンプリコン（配列番号１２３）に従って、またはこれを使用して検出可能なＴＭＥＭ２５転写産物の正常組織および乳がん組織における発現量を示したヒストグラムである。
【図２１Ｃ】ｓｅｇ２１－２７－ＴＭＥＭ２５＿ｓｅｇ＿２１－２７＿２００－３４４／３４６＿アンプリコン（配列番号１２３）に従って、またはこれを使用して検出可能なＴＭＥＭ２５転写産物の正常組織および乳がん組織における発現量を示したヒストグラムである。
【図２２Ａ】ｓｅｇ２１－２７－ＴＭＥＭ２５＿ｓｅｇ＿２１－２７＿２００－３４４／３４６＿アンプリコン（配列番号１２３）に従って、またはこれを使用して検出可能なＴＭＥＭ２５転写産物の種々の正常組織における発現量を示したヒストグラムである。
【図２２Ｂ】ｓｅｇ２１－２７－ＴＭＥＭ２５＿ｓｅｇ＿２１－２７＿２００－３４４／３４６＿アンプリコン（配列番号１２３）に従って、またはこれを使用して検出可能なＴＭＥＭ２５転写産物の種々の正常組織における発現量を示したヒストグラムである。
【図２２Ｃ】ｓｅｇ２１－２７－ＴＭＥＭ２５＿ｓｅｇ＿２１－２７＿２００－３４４／３４６＿アンプリコン（配列番号１２３）に従って、またはこれを使用して検出可能なＴＭＥＭ２５転写産物の種々の正常組織における発現量を示したヒストグラムである。
【図２３】（Ａ）ウサギ抗ＴＭＥＭ２５抗体とＴＭＥＭ２５＿Ｐ５タンパク質（配列番号７）との間、およびウサギ抗ＴＭＥＭ２５抗体とＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇ（配列番号１２９）との間に特異的相互作用が存在するが、ウサギ抗ＴＭＥＭ２５抗体とＨＥＫ＿

２９３Ｔ＿ｐＲｐ３には特異的相互作用が存在しないこと、ならびに（Ｂ）ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇタンパク質（配列番号１２９）と抗Ｆｌａｇ抗体との間に特異的相互作用が存在することを示すウェスタンブロットの結果である。　レーン１：ＨＥＫ２９３Ｔ＿ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３；レーン２：ＨＥＫ２９３Ｔ＿ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３＿ＴＭＥＭ２５－Ｐ５；レーン３：ＨＥＫ２９３Ｔ＿ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３＿ＴＭＥＭ２５－Ｐ５－Ｆｌａｇ

【図２４】抗ＴＭＥＭ２５抗体を使用することにより示された、ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５（配列番号１３２）（図２４Ａ）およびＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇ（配列番号１２９）（図２４Ｂ）の細胞表面局在を示す。図２４Ｃは、抗ｆｌａｇ抗体（シグマ、カタログ番号：Ａ９５９４）を使用することにより示された、ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇ（配列番号１２９）の局在を示す。

【図２５】ネガティブコントロールとして使用されたマウス血清（１：２２５０）（図２５Ｂ）と比較して、抗ＴＭＥＭ２５抗体（１：２２５０）（図２５Ａ）が、ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇタンパク質を発現している組換えＨＥＫ２９３Ｔ細胞中の完全長ＴＭＥＭ２５タンパク質により多く結合していることを示しており、これによって、ＴＭＥＭ２５タンパク質が細胞膜に局在していることが分かる。

【図２６】様々な細胞株（（１）ＨＥＫ２９３Ｔ＿ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３、（２）ＨＥＫ２９３Ｔ＿ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３＿ＴＭＥＭ２５－Ｐ５－Ｆｌａｇ、（３）ＫＡＲＰＡＳ、（４）Ｇ－３６１、（５）ＲＰＭＩ８２２６、（６）ＤＡＵＤＩ、および（７）Ｊｕｒｋａｔ）における内因性ＴＭＥＭ２５タンパク質の発現を示すウェスタンブロットの結果を示す。

【図２７】スクランブルｓｉＲＮＡ（Ｄｈａｒｍａｃｏｎ、Ｄ－００１８１０－１０－０５）をトランスフェクトさせた、ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿ＦＬＡＧを安定して発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞（レーン１）との比較を抗ＴＭＥＭ２５抗体（シグマ、カタログ番号：ＨＰＡ０１２１６３）を使用して行ったところ、ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５　ｓｉＲＮＡ（Ｌ－０１８１８３－００－０００５、Ｄｈａｒｍａｃｏｎ）をトランスフェクトさせた、ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇ（配列番号１２９）を安定して発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞（レーン２）においてＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇタンパク質（配列番号１２９）の特異的ノックダウンが見られたことを示す。

【図２８Ａ－Ｆ】ｐＨ９のネガティブコントロール細胞株（空ベクターをトランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞（第２列、パネルＢ、ＤおよびＦ））との比較を抗原賦活法により行うと、ポジティブコントロール細胞株（ＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿Ｆｌａｇ＿ｍをトランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞（第１列、パネルＡ、ＣおよびＥ））の切片中の抗ＬＳＲ（カタログ番号：ａｂ５９６４６、アブカム）は、３μｇ／ｍｌ、１μｇ／ｍｌおよび０．３μｇ／ｍｌのそれぞれの抗体濃度において特異的免疫反応性を示す。

【図２９Ａ－Ｆ】ｐＨ９のネガティブコントロール細胞株（空ベクターをトランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞（第２列、パネルＢ、ＤおよびＦ））との比較を抗原賦活法により行うと、ポジティブコントロール細胞株（ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿ＦｌａｇをトランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞（第１列、パネルＡ、ＣおよびＥ））の切片中の抗ＴＭＥＭ２５（カタログ番号：ＨＰＡ０１２１６３、シグマ）は、３μｇ／ｍｌ、１μｇ／ｍｌおよび０．３μｇ／ｍｌのそれぞれの抗体濃度において特異的免疫反応性を示す。

【図３０Ａ】活性化させたマウスＴ細胞に対する、可溶性ＬＹ６Ｇ６Ｆ－Ｉｇ（配列番号２３）、ＴＭＥＭ２５－Ｉｇ（配列番号２５）およびＬＳＲ－Ｉｇ（配列番号２６）のインビトロにおける抑制効果を示す。ＤＯ１１．１０マウスの脾臓から単離したＴ細胞の活性化は、放射線を照射したＢａｌｂ／ｃマウス由来脾細胞をＡＰＣとして使用し、この細胞の存在下において、２０μｇ／ｍｌ（図３０　Ａ～Ｃ、Ｅ）または２μｇ／ｍｌ（図ＤおよびＦ）のＯＶＡ３２３－３３９を使用することにより誘導した。これらの実験においては、ＣＴＬＡ４－ＩｇまたはＢ７－Ｈ４－Ｉｇをポジティブコントロールとして使用し、マウスＩｇＧ２ａをＩｇコントロールとして使用した。

【図３０Ｂ】活性化させたマウスＴ細胞に対する、可溶性ＬＹ６Ｇ６Ｆ－Ｉｇ（配列番号

２３）、ＴＭＥＭ２５－Ｉｇ（配列番号２５）およびＬＳＲ－Ｉｇ（配列番号２６）のインビトロにおける抑制効果を示す。ＤＯ１１．１０マウスの脾臓から単離したＴ細胞の活性化は、放射線を照射したＢａｌｂ／ｃマウス由来脾細胞をＡＰＣとして使用し、この細胞の存在下において、２０μｇ／ｍｌ（図３０　Ａ～Ｃ、Ｅ）または２μｇ／ｍｌ（図ＤおよびＦ）のＯＶＡ３２３－３３９を使用することにより誘導した。これらの実験においては、ＣＴＬＡ４－ＩｇまたはＢ７－Ｈ４－Ｉｇをポジティブコントロールとして使用し、マウスＩｇＧ２ａをＩｇコントロールとして使用した。

【図３０Ｃ】活性化させたマウスＴ細胞に対する、可溶性ＬＹ６Ｇ６Ｆ－Ｉｇ（配列番号２３）、ＴＭＥＭ２５－Ｉｇ（配列番号２５）およびＬＳＲ－Ｉｇ（配列番号２６）のインビトロにおける抑制効果を示す。ＤＯ１１．１０マウスの脾臓から単離したＴ細胞の活性化は、放射線を照射したＢａｌｂ／ｃマウス由来脾細胞をＡＰＣとして使用し、この細胞の存在下において、２０μｇ／ｍｌ（図３０　Ａ～Ｃ、Ｅ）または２μｇ／ｍｌ（図ＤおよびＦ）のＯＶＡ３２３－３３９を使用することにより誘導した。これらの実験においては、ＣＴＬＡ４－ＩｇまたはＢ７－Ｈ４－Ｉｇをポジティブコントロールとして使用し、マウスＩｇＧ２ａをＩｇコントロールとして使用した。

【図３０Ｄ】活性化させたマウスＴ細胞に対する、可溶性ＬＹ６Ｇ６Ｆ－Ｉｇ（配列番号２３）、ＴＭＥＭ２５－Ｉｇ（配列番号２５）およびＬＳＲ－Ｉｇ（配列番号２６）のインビトロにおける抑制効果を示す。ＤＯ１１．１０マウスの脾臓から単離したＴ細胞の活性化は、放射線を照射したＢａｌｂ／ｃマウス由来脾細胞をＡＰＣとして使用し、この細胞の存在下において、２０μｇ／ｍｌ（図３０　Ａ～Ｃ、Ｅ）または２μｇ／ｍｌ（図ＤおよびＦ）のＯＶＡ３２３－３３９を使用することにより誘導した。これらの実験においては、ＣＴＬＡ４－ＩｇまたはＢ７－Ｈ４－Ｉｇをポジティブコントロールとして使用し、マウスＩｇＧ２ａをＩｇコントロールとして使用した。

【図３０Ｅ】活性化させたマウスＴ細胞に対する、可溶性ＬＹ６Ｇ６Ｆ－Ｉｇ（配列番号２３）、ＴＭＥＭ２５－Ｉｇ（配列番号２５）およびＬＳＲ－Ｉｇ（配列番号２６）のインビトロにおける抑制効果を示す。ＤＯ１１．１０マウスの脾臓から単離したＴ細胞の活性化は、放射線を照射したＢａｌｂ／ｃマウス由来脾細胞をＡＰＣとして使用し、この細胞の存在下において、２０μｇ／ｍｌ（図３０　Ａ～Ｃ、Ｅ）または２μｇ／ｍｌ（図ＤおよびＦ）のＯＶＡ３２３－３３９を使用することにより誘導した。これらの実験においては、ＣＴＬＡ４－ＩｇまたはＢ７－Ｈ４－Ｉｇをポジティブコントロールとして使用し、マウスＩｇＧ２ａをＩｇコントロールとして使用した。

【図３１】抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８でコーティングしたビーズで誘導させたＴ細胞増殖に対する、ビーズ結合ＬＳＲ－Ｉｇ（配列番号２６）のインビトロにおける抑制効果を示す。

【図３２Ａ】ＩＦＮγの分泌低下（Ａ）および活性化マーカーであるＣＤ６９の発現減少（Ｂ）によって示された、ＣＤ４Ｔ細胞の活性化に対するＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ融合タンパク質（配列番号２３～２６）の効果を示す。それぞれの棒は培養をｄｕｐｌｉｃａｔｅで行った平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す（Ｓｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ検定、*ｐ＜０．０５、**ｐ＜０．０１、コントロールｍＩｇＧ２ａとの比較）。

【図３２Ｂ】ＩＦＮγの分泌低下（Ａ）および活性化マーカーであるＣＤ６９の発現減少（Ｂ）によって示された、ＣＤ４Ｔ細胞の活性化に対するＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ融合タンパク質（配列番号２３～２６）の効果を示す。それぞれの棒は培養をｄｕｐｌｉｃａｔｅで行った平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す（Ｓｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ検定、*ｐ＜０．０５、**ｐ＜０．０１、コントロールｍＩｇＧ２ａとの比較）。

【図３３Ａ】ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ（配列番号１、７または１１）をコードするｃＤＮＡを発現する刺激細胞（膜結合型抗ヒトＣＤ３抗体フラグメントを発現するよう改変されたマウス胸腺腫細胞株Ｂｗ５１４７）によって示された、バルクヒトＴ細胞（図３３Ａ）、ＣＤ４$^{+}$ヒトＴ細胞（図３３Ｂ）、ＣＤ８$^{+}$ヒトＴ細胞（図３３

Ｃ）またはナイーブＣＤ４ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ヒトＴ細胞（図３３Ｄ）の増殖（ＣＰＭ）に対する効果を示す。結果は、６つの実験（図３３７Ａ）または３つの実験（図３３Ｂ、ＣおよびＤ）の平均値±ＳＥＭで示す。*ｐ＜０．０５、**ｐ＜０．０１、***ｐ＜０．００１および#ｐ＜０．０００１（Ｓｔｕｄｅｎｔ’ｓ　Ｔ検定）は、空ベクターと比較して有意差があったことを示す。

【図３３Ｂ】ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ（配列番号１、７または１１）をコードするｃＤＮＡを発現する刺激細胞（膜結合型抗ヒトＣＤ３抗体フラグメントを発現するよう改変されたマウス胸腺腫細胞株Ｂｗ５１４７）によって示された、バルクヒトＴ細胞（図３３Ａ）、ＣＤ４$^{+}$ヒトＴ細胞（図３３Ｂ）、ＣＤ８$^{+}$ヒトＴ細胞（図３３Ｃ）またはナイーブＣＤ４ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ヒトＴ細胞（図３３Ｄ）の増殖（ＣＰＭ）に対する効果を示す。結果は、６つの実験（図３３７Ａ）または３つの実験（図３３Ｂ、ＣおよびＤ）の平均値±ＳＥＭで示す。*ｐ＜０．０５、**ｐ＜０．０１、***ｐ＜０．００１および#ｐ＜０．０００１（Ｓｔｕｄｅｎｔ’ｓ　Ｔ検定）は、空ベクターと比較して有意差があったことを示す。

【図３３Ｃ】ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ（配列番号１、７または１１）をコードするｃＤＮＡを発現する刺激細胞（膜結合型抗ヒトＣＤ３抗体フラグメントを発現するよう改変されたマウス胸腺腫細胞株Ｂｗ５１４７）によって示された、バルクヒトＴ細胞（図３３Ａ）、ＣＤ４$^{+}$ヒトＴ細胞（図３３Ｂ）、ＣＤ８$^{+}$ヒトＴ細胞（図３３Ｃ）またはナイーブＣＤ４ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ヒトＴ細胞（図３３Ｄ）の増殖（ＣＰＭ）に対する効果を示す。結果は、６つの実験（図３３７Ａ）または３つの実験（図３３Ｂ、ＣおよびＤ）の平均値±ＳＥＭで示す。*ｐ＜０．０５、**ｐ＜０．０１、***ｐ＜０．００１および#ｐ＜０．０００１（Ｓｔｕｄｅｎｔ’ｓ　Ｔ検定）は、空ベクターと比較して有意差があったことを示す。

【図３３Ｄ】ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ（配列番号１、７または１１）をコードするｃＤＮＡを発現する刺激細胞（膜結合型抗ヒトＣＤ３抗体フラグメントを発現するよう改変されたマウス胸腺腫細胞株Ｂｗ５１４７）によって示された、バルクヒトＴ細胞（図３３Ａ）、ＣＤ４$^{+}$ヒトＴ細胞（図３３Ｂ）、ＣＤ８$^{+}$ヒトＴ細胞（図３３Ｃ）またはナイーブＣＤ４ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ヒトＴ細胞（図３３Ｄ）の増殖（ＣＰＭ）に対する効果を示す。結果は、６つの実験（図３３７Ａ）または３つの実験（図３３Ｂ、ＣおよびＤ）の平均値±ＳＥＭで示す。*ｐ＜０．０５、**ｐ＜０．０１、***ｐ＜０．００１および#ｐ＜０．０００１（Ｓｔｕｄｅｎｔ’ｓ　Ｔ検定）は、空ベクターと比較して有意差があったことを示す。

【図３４Ａ】ＳＪＬマウスにＰＬＰ１３９－１５１を投与することにより誘導されたＲ－ＥＡＥモデルにおける、ＬＳＲ－Ｉｇ（配列番号２６）またはＴＭＥＭ２５－Ｉｇ（配列番号２５）による治療の治療効果を示す。ＬＳＲ－Ｉｇ（配列番号２６）またはＴＭＥＭ２５－Ｉｇ（配列番号２５）は、疾患の寛解が見られたとき（１８日目）から１００μｇ／マウスを週３回、２週にわたって腹腔内投与する治療方法によって投与した。臨床症状に対するＬＳＲ－ＩｇおよびＴＭＥＭ２５－Ｉｇの治療効果は、平均臨床スコアが低下したことによって実証されている（図３４Ａ）。さらに、Ｒ－ＥＡＥを誘導してから３５日目にＬＳＲ－ＩｇまたはＴＭＥＭ２５－Ｉｇにより治療を行ったところ、誘導エピトープ（ＰＬＰ１３９－１５１）または応答が拡大されたエピトープ（ＰＬＰ１７８－１９１）に対するＤＴＨ応答が抑制された（図３４Ｂ）。この調査では、ＬＳＲ－ＩｇまたはＴＭＥＭ２５－Ｉｇの効果は、試験タンパク質と同様の投薬計画により投与されたｍＩｇＧ２ａ　Ｉｇネガティブコントロールおよびｃｔｌａ４－Ｉｇポジティブコントロールとの比較を行うことによって調査した。

【図３４Ｂ】ＳＪＬマウスにＰＬＰ１３９－１５１を投与することにより誘導されたＲ－ＥＡＥモデルにおける、ＬＳＲ－Ｉｇ（配列番号２６）またはＴＭＥＭ２５－Ｉｇ（配列番号２５）による治療の治療効果を示す。ＬＳＲ－Ｉｇ（配列番号２６）またはＴＭＥＭ２５－Ｉｇ（配列番号２５）は、疾患の寛解が見られたとき（１８日目）から１００μｇ／マウスを週３回、２週にわたって腹腔内投与する治療方法によって投与した。臨床症状

に対するＬＳＲ－ＩｇおよびＴＭＥＭ２５－Ｉｇの治療効果は、平均臨床スコアが低下したことによって実証されている（図３４Ａ）。さらに、Ｒ－ＥＡＥを誘導してから３５日目にＬＳＲ－ＩｇまたはＴＭＥＭ２５－Ｉｇにより治療を行ったところ、誘導エピトープ（ＰＬＰ１３９－１５１）または応答が拡大されたエピトープ（ＰＬＰ１７８－１９１）に対するＤＴＨ応答が抑制された（図３４Ｂ）。この調査では、ＬＳＲ－ＩｇまたはＴＭＥＭ２５－Ｉｇの効果は、試験タンパク質と同様の投薬計画により投与されたｍＩｇＧ２ａ　Ｉｇネガティブコントロールおよびｃｔｌａ４－Ｉｇポジティブコントロールとの比較を行うことによって調査した。

【図３５Ａ】ＳＪＬマウスのＲ－ＥＡＥモデルにおけるＴＭＥＭ２５－Ｉｇ（配列番号２５）の用量依存的効果およびその作用機序を示す。この調査では、疾患の寛解が見られたとき（１９日目）から１００μｇ／マウス、３０μｇ／マウス、または１０μｇ／マウスを週３回、２週間にわたって腹腔内投与することにより治療を行い、同様のスケジュールにおいて投与した１００μｇ／マウスのＩｇＧ２ａコントロールと比較した。それぞれの図には、疾患の経過に対するＴＭＥＭ２５－Ｉｇの治療効果（図３５Ａ）；Ｒ－ＥＡＥの誘導後４５日目および７６日目における、応答が拡大されたエピトープであるＰＬＰ１７８－１９１およびＭＢＰ８４－１０４に対するＤＴＨ応答（図３５Ｂ）；疾患の誘導後４５日目および７５日目に単離された脾細胞のエクスビボにおけるリコール応答（図３５Ｃ）；ならびに疾患の誘導後４５日目に単離されたＬＮ細胞において示された、細胞増殖およびサイトカイン分泌（ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７、ＩＬ－１０およびＩＬ－４）に対するＴＭＥＭ２５－Ｉｇの治療効果（図３５Ｄ）が示されている。図３５Ｅには、１００μｇ／投与のＴＭＥＭ２５－Ｉｇで治療した後の、脾臓、リンパ節、およびＣＮＳにおける細胞数、ならびにＣＮＳ中に存在する様々な細胞系の細胞数に対するＴＭＥＭ２５－Ｉｇの効果を示す。

【図３５Ｂ】ＳＪＬマウスのＲ－ＥＡＥモデルにおけるＴＭＥＭ２５－Ｉｇ（配列番号２５）の用量依存的効果およびその作用機序を示す。この調査では、疾患の寛解が見られたとき（１９日目）から１００μｇ／マウス、３０μｇ／マウス、または１０μｇ／マウスを週３回、２週間にわたって腹腔内投与することにより治療を行い、同様のスケジュールにおいて投与した１００μｇ／マウスのＩｇＧ２ａコントロールと比較した。それぞれの図には、疾患の経過に対するＴＭＥＭ２５－Ｉｇの治療効果（図３５Ａ）；Ｒ－ＥＡＥの誘導後４５日目および７６日目における、応答が拡大されたエピトープであるＰＬＰ１７８－１９１およびＭＢＰ８４－１０４に対するＤＴＨ応答（図３５Ｂ）；疾患の誘導後４５日目および７５日目に単離された脾細胞のエクスビボにおけるリコール応答（図３５Ｃ）；ならびに疾患の誘導後４５日目に単離されたＬＮ細胞において示された、細胞増殖およびサイトカイン分泌（ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７、ＩＬ－１０およびＩＬ－４）に対するＴＭＥＭ２５－Ｉｇの治療効果（図３５Ｄ）が示されている。図３５Ｅには、１００μｇ／投与のＴＭＥＭ２５－Ｉｇで治療した後の、脾臓、リンパ節、およびＣＮＳにおける細胞数、ならびにＣＮＳ中に存在する様々な細胞系の細胞数に対するＴＭＥＭ２５－Ｉｇの効果を示す。

【図３５Ｃ】ＳＪＬマウスのＲ－ＥＡＥモデルにおけるＴＭＥＭ２５－Ｉｇ（配列番号２５）の用量依存的効果およびその作用機序を示す。この調査では、疾患の寛解が見られたとき（１９日目）から１００μｇ／マウス、３０μｇ／マウス、または１０μｇ／マウスを週３回、２週間にわたって腹腔内投与することにより治療を行い、同様のスケジュールにおいて投与した１００μｇ／マウスのＩｇＧ２ａコントロールと比較した。それぞれの図には、疾患の経過に対するＴＭＥＭ２５－Ｉｇの治療効果（図３５Ａ）；Ｒ－ＥＡＥの誘導後４５日目および７６日目における、応答が拡大されたエピトープであるＰＬＰ１７８－１９１およびＭＢＰ８４－１０４に対するＤＴＨ応答（図３５Ｂ）；疾患の誘導後４５日目および７５日目に単離された脾細胞のエクスビボにおけるリコール応答（図３５Ｃ）；ならびに疾患の誘導後４５日目に単離されたＬＮ細胞において示された、細胞増殖およびサイトカイン分泌（ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７、ＩＬ－１０およびＩＬ－４）に対するＴＭＥＭ２５－Ｉｇの治療効果（図３５Ｄ）が示されている。図３５Ｅには、１００μｇ

／投与のＴＭＥＭ２５－Ｉｇで治療した後の、脾臓、リンパ節、およびＣＮＳにおける細胞数、ならびにＣＮＳ中に存在する様々な細胞系の細胞数に対するＴＭＥＭ２５－Ｉｇの効果を示す。

【図３５Ｄ】ＳＪＬマウスのＲ－ＥＡＥモデルにおけるＴＭＥＭ２５－Ｉｇ（配列番号２５）の用量依存的効果およびその作用機序を示す。この調査では、疾患の寛解が見られたとき（１９日目）から１００μｇ／マウス、３０μｇ／マウス、または１０μｇ／マウスを週３回、２週間にわたって腹腔内投与することにより治療を行い、同様のスケジュールにおいて投与した１００μｇ／マウスのＩｇＧ２ａコントロールと比較した。それぞれの図には、疾患の経過に対するＴＭＥＭ２５－Ｉｇの治療効果（図３５Ａ）；Ｒ－ＥＡＥの誘導後４５日目および７６日目における、応答が拡大されたエピトープであるＰＬＰ１７８－１９１およびＭＢＰ８４－１０４に対するＤＴＨ応答（図３５Ｂ）；疾患の誘導後４５日目および７５日目に単離された脾細胞のエクスビボにおけるリコール応答（図３５Ｃ）；ならびに疾患の誘導後４５日目に単離されたＬＮ細胞において示された、細胞増殖およびサイトカイン分泌（ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７、ＩＬ－１０およびＩＬ－４）に対するＴＭＥＭ２５－Ｉｇの治療効果（図３５Ｄ）が示されている。図３５Ｅには、１００μｇ／投与のＴＭＥＭ２５－Ｉｇで治療した後の、脾臓、リンパ節、およびＣＮＳにおける細胞数、ならびにＣＮＳ中に存在する様々な細胞系の細胞数に対するＴＭＥＭ２５－Ｉｇの効果を示す。

【図３５Ｅ】ＳＪＬマウスのＲ－ＥＡＥモデルにおけるＴＭＥＭ２５－Ｉｇ（配列番号２５）の用量依存的効果およびその作用機序を示す。この調査では、疾患の寛解が見られたとき（１９日目）から１００μｇ／マウス、３０μｇ／マウス、または１０μｇ／マウスを週３回、２週間にわたって腹腔内投与することにより治療を行い、同様のスケジュールにおいて投与した１００μｇ／マウスのＩｇＧ２ａコントロールと比較した。それぞれの図には、疾患の経過に対するＴＭＥＭ２５－Ｉｇの治療効果（図３５Ａ）；Ｒ－ＥＡＥの誘導後４５日目および７６日目における、応答が拡大されたエピトープであるＰＬＰ１７８－１９１およびＭＢＰ８４－１０４に対するＤＴＨ応答（図３５Ｂ）；疾患の誘導後４５日目および７５日目に単離された脾細胞のエクスビボにおけるリコール応答（図３５Ｃ）；ならびに疾患の誘導後４５日目に単離されたＬＮ細胞において示された、細胞増殖およびサイトカイン分泌（ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７、ＩＬ－１０およびＩＬ－４）に対するＴＭＥＭ２５－Ｉｇの治療効果（図３５Ｄ）が示されている。図３５Ｅには、１００μｇ／投与のＴＭＥＭ２５－Ｉｇで治療した後の、脾臓、リンパ節、およびＣＮＳにおける細胞数、ならびにＣＮＳ中に存在する様々な細胞系の細胞数に対するＴＭＥＭ２５－Ｉｇの効果を示す。

【図３６Ａ】ＳＪＬマウスにＰＬＰ１３９－１５１を投与することにより誘導されたＲ－ＥＡＥモデルにおける、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇ（配列番号２４）による治療の治療効果を示す。ＶＳＩＧ１０－Ｉｇ（配列番号２４）は、疾患の寛解が見られたとき（１９日目）から１００μｇ／マウスを週３回、２週にわたって腹腔内投与する治療方法によって投与した。臨床症状に対するＶＳＩＧ１０－Ｉｇの治療効果は、平均臨床スコアが低下したことによって実証されている（図３６Ａ）。さらに、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇを用いた治療によって、Ｒ－ＥＡＥの誘導後４５日目および７６日目における、応答が拡大されたエピトープ（ＰＬＰ１７８－１９１およびＭＢＰ　ＭＢＰ８４－１０４）に対するＤＴＨ応答（図３６Ｂ）が抑制された。さらに、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇの効果は、疾患の誘導後４５日目および７５日目に単離された脾細胞のエクスビボにおけるリコール応答（図３６Ｃ）；ならびに疾患の誘導後４５日目に単離されたＬＮ細胞において示された、細胞増殖およびサイトカイン分泌（ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７、ＩＬ－１０およびＩＬ－４）に対するＶＳＩＧ１０－Ｉｇの治療効果（図３６Ｄ）において示された。図３６Ｅには、１００μｇ／投与のＶＳＩＧ１０－Ｉｇで治療した後の、脾臓、リンパ節、およびＣＮＳにおける細胞数、ならびにこれらの組織それぞれに存在する様々な細胞系の細胞数に対するＶＳＩＧ１０－Ｉｇの効果を示す。この調査では、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇの効果は、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇと同様の用量および投薬計画で投与されたｍＩｇＧ２ａ　Ｉｇコントロールとの比較を行うこ

とによって調査した。
【図３６Ｂ】ＳＪＬマウスにＰＬＰ１３９－１５１を投与することにより誘導されたＲ－ＥＡＥモデルにおける、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇ（配列番号２４）による治療の治療効果を示す。ＶＳＩＧ１０－Ｉｇ（配列番号２４）は、疾患の寛解が見られたとき（１９日目）から１００μｇ／マウスを週３回、２週にわたって腹腔内投与する治療方法によって投与した。臨床症状に対するＶＳＩＧ１０－Ｉｇの治療効果は、平均臨床スコアが低下したことによって実証されている（図３６Ａ）。さらに、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇを用いた治療によって、Ｒ－ＥＡＥの誘導後４５日目および７６日目における、応答が拡大されたエピトープ（ＰＬＰ１７８－１９１およびＭＢＰ　ＭＢＰ８４－１０４）に対するＤＴＨ応答（図３６Ｂ）が抑制された。さらに、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇの効果は、疾患の誘導後４５日目および７５日目に単離された脾細胞のエクスビボにおけるリコール応答（図３６Ｃ）；ならびに疾患の誘導後４５日目に単離されたＬＮ細胞において示された、細胞増殖およびサイトカイン分泌（ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７、ＩＬ－１０およびＩＬ－４）に対するＶＳＩＧ１０－Ｉｇの治療効果（図３６Ｄ）において示された。図３６Ｅには、１００μｇ／投与のＶＳＩＧ１０－Ｉｇで治療した後の、脾臓、リンパ節、およびＣＮＳにおける細胞数、ならびにこれらの組織それぞれに存在する様々な細胞系の細胞数に対するＶＳＩＧ１０－Ｉｇの効果を示す。この調査では、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇの効果は、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇと同様の用量および投薬計画で投与されたｍＩｇＧ２ａ　Ｉｇコントロールとの比較を行うことによって調査した。
【図３６Ｃ】ＳＪＬマウスにＰＬＰ１３９－１５１を投与することにより誘導されたＲ－ＥＡＥモデルにおける、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇ（配列番号２４）による治療の治療効果を示す。ＶＳＩＧ１０－Ｉｇ（配列番号２４）は、疾患の寛解が見られたとき（１９日目）から１００μｇ／マウスを週３回、２週にわたって腹腔内投与する治療方法によって投与した。臨床症状に対するＶＳＩＧ１０－Ｉｇの治療効果は、平均臨床スコアが低下したことによって実証されている（図３６Ａ）。さらに、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇを用いた治療によって、Ｒ－ＥＡＥの誘導後４５日目および７６日目における、応答が拡大されたエピトープ（ＰＬＰ１７８－１９１およびＭＢＰ　ＭＢＰ８４－１０４）に対するＤＴＨ応答（図３６Ｂ）が抑制された。さらに、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇの効果は、疾患の誘導後４５日目および７５日目に単離された脾細胞のエクスビボにおけるリコール応答（図３６Ｃ）；ならびに疾患の誘導後４５日目に単離されたＬＮ細胞において示された、細胞増殖およびサイトカイン分泌（ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７、ＩＬ－１０およびＩＬ－４）に対するＶＳＩＧ１０－Ｉｇの治療効果（図３６Ｄ）において示された。図３６Ｅには、１００μｇ／投与のＶＳＩＧ１０－Ｉｇで治療した後の、脾臓、リンパ節、およびＣＮＳにおける細胞数、ならびにこれらの組織それぞれに存在する様々な細胞系の細胞数に対するＶＳＩＧ１０－Ｉｇの効果を示す。この調査では、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇの効果は、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇと同様の用量および投薬計画で投与されたｍＩｇＧ２ａ　Ｉｇコントロールとの比較を行うことによって調査した。
【図３６Ｄ】ＳＪＬマウスにＰＬＰ１３９－１５１を投与することにより誘導されたＲ－ＥＡＥモデルにおける、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇ（配列番号２４）による治療の治療効果を示す。ＶＳＩＧ１０－Ｉｇ（配列番号２４）は、疾患の寛解が見られたとき（１９日目）から１００μｇ／マウスを週３回、２週にわたって腹腔内投与する治療方法によって投与した。臨床症状に対するＶＳＩＧ１０－Ｉｇの治療効果は、平均臨床スコアが低下したことによって実証されている（図３６Ａ）。さらに、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇを用いた治療によって、Ｒ－ＥＡＥの誘導後４５日目および７６日目における、応答が拡大されたエピトープ（ＰＬＰ１７８－１９１およびＭＢＰ　ＭＢＰ８４－１０４）に対するＤＴＨ応答（図３６Ｂ）が抑制された。さらに、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇの効果は、疾患の誘導後４５日目および７５日目に単離された脾細胞のエクスビボにおけるリコール応答（図３６Ｃ）；ならびに疾患の誘導後４５日目に単離されたＬＮ細胞において示された、細胞増殖およびサイトカイン分泌（ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７、ＩＬ－１０およびＩＬ－４）に対するＶＳＩＧ１０－Ｉｇの治療効果（図３６Ｄ）において示された。図３６Ｅには、１００μｇ／投与の

ＶＳＩＧ１０－Ｉｇで治療した後の、脾臓、リンパ節、およびＣＮＳにおける細胞数、ならびにこれらの組織それぞれに存在する様々な細胞系の細胞数に対するＶＳＩＧ１０－Ｉｇの効果を示す。この調査では、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇの効果は、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇと同様の用量および投薬計画で投与されたｍＩｇＧ２ａ　Ｉｇコントロールとの比較を行うことによって調査した。

【図３６Ｅ】ＳＪＬマウスにＰＬＰ１３９－１５１を投与することにより誘導されたＲ－ＥＡＥモデルにおける、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇ（配列番号２４）による治療の治療効果を示す。ＶＳＩＧ１０－Ｉｇ（配列番号２４）は、疾患の寛解が見られたとき（１９日目）から１００μｇ／マウスを週３回、２週にわたって腹腔内投与する治療方法によって投与した。臨床症状に対するＶＳＩＧ１０－Ｉｇの治療効果は、平均臨床スコアが低下したことによって実証されている（図３６Ａ）。さらに、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇを用いた治療によって、Ｒ－ＥＡＥの誘導後４５日目および７６日目における、応答が拡大されたエピトープ（ＰＬＰ１７８－１９１およびＭＢＰ　ＭＢＰ８４－１０４）に対するＤＴＨ応答（図３６Ｂ）が抑制された。さらに、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇの効果は、疾患の誘導後４５日目および７５日目に単離された脾細胞のエクスビボにおけるリコール応答（図３６Ｃ）；ならびに疾患の誘導後４５日目に単離されたＬＮ細胞において示された、細胞増殖およびサイトカイン分泌（ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７、ＩＬ－１０およびＩＬ－４）に対するＶＳＩＧ１０－Ｉｇの治療効果（図３６Ｄ）において示された。図３６Ｅには、１００μｇ／投与のＶＳＩＧ１０－Ｉｇで治療した後の、脾臓、リンパ節、およびＣＮＳにおける細胞数、ならびにこれらの組織それぞれに存在する様々な細胞系の細胞数に対するＶＳＩＧ１０－Ｉｇの効果を示す。この調査では、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇの効果は、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇと同様の用量および投薬計画で投与されたｍＩｇＧ２ａ　Ｉｇコントロールとの比較を行うことによって調査した。

【図３７Ａ】関節リウマチのコラーゲン誘導関節炎（ＣＩＡ）モデルにおいて、１０日間にわたって週３回、マウス１匹あたり１００μｇを腹腔内投与したＬＳＲ－Ｉｇ（配列番号２６）の治療効果を示す。臨床スコア（Ａ）、肢部の腫脹（Ｂ）、および組織学的障害（Ｃ）が測定される。ＣＴＬＡ４－Ｉｇ（１００μｇ／マウス）およびＴＮＦＲ－Ｉｇ（エタネルセプト）をポジティブコントロールとして使用し、ｍＩｇＧ２ａ　Ｉｇコントロール（１００μｇ／マウス）をネガティブコントロールとして使用した。

【図３７Ｂ】関節リウマチのコラーゲン誘導関節炎（ＣＩＡ）モデルにおいて、１０日間にわたって週３回、マウス１匹あたり１００μｇを腹腔内投与したＬＳＲ－Ｉｇ（配列番号２６）の治療効果を示す。臨床スコア（Ａ）、肢部の腫脹（Ｂ）、および組織学的障害（Ｃ）が測定される。ＣＴＬＡ４－Ｉｇ（１００μｇ／マウス）およびＴＮＦＲ－Ｉｇ（エタネルセプト）をポジティブコントロールとして使用し、ｍＩｇＧ２ａ　Ｉｇコントロール（１００μｇ／マウス）をネガティブコントロールとして使用した。

【図３７Ｃ】関節リウマチのコラーゲン誘導関節炎（ＣＩＡ）モデルにおいて、１０日間にわたって週３回、マウス１匹あたり１００μｇを腹腔内投与したＬＳＲ－Ｉｇ（配列番号２６）の治療効果を示す。臨床スコア（Ａ）、肢部の腫脹（Ｂ）、および組織学的障害（Ｃ）が測定される。ＣＴＬＡ４－Ｉｇ（１００μｇ／マウス）およびＴＮＦＲ－Ｉｇ（エタネルセプト）をポジティブコントロールとして使用し、ｍＩｇＧ２ａ　Ｉｇコントロール（１００μｇ／マウス）をネガティブコントロールとして使用した。

【図３８】関節リウマチのコラーゲン誘導関節炎（ＣＩＡ）モデルにおいて、２週間にわたって週３回、２５ｍｇ／ｋｇを腹腔内投与したＬＹ６Ｇ６Ｆ－Ｉｇ（配列番号２３）の治療効果を、臨床スコアに基づいた測定とともに示す。　図１２～１７、２１および２２については、すべて結果を示すことができるように、スペースの都合のみでそれぞれの図を「Ａ」、「Ｂ」などに分割している。

【発明を実施するための形態】

【０１０５】

本発明は、実施形態の少なくともいくつかにおいて、ＬＹ６Ｇ６Ｆと称されるタンパク質、ＶＳＩＧ１０と称されるタンパク質、ＴＭＥＭ２５と称されるタンパク質、および／

もしくはＬＳＲと称されるタンパク質、ならびに、それぞれに対応する核酸配列、該タンパク質の一部分、該タンパク質の変異体、該タンパク質を含む融合タンパク質、および該タンパク質を含む結合体；ならびに／または、これらを含むポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗原結合フラグメント、および／もしくは結合体；ならびに／または、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲ、ならびにこれらの一部分および／もしくは変異体に結合する代替足場；ならびに、治療薬および／または診断用薬としてのこれらの使用、および本明細書に記載の様々な使用のいずれかに関する。

【０１０６】

ジェネンテック社に譲渡された米国特許出願第２００９１１７５６６号、第２００９００１７４７３号およびこのファミリーに属する他の特許文献には、２３４位～２５４位および３５４位～３７４位の残基位置に膜貫通ドメインを有する、３８２アミノ酸残基のＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質配列（ＤＮＡ２３４４４１、ｔｕｍｏｒ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ａｎｔｉｇｅｎｉｃ　ｔａｒｇｅｔ（ＴＡＴ）　ＴＡＴ２０１、本明細書中の配列番号９２）が開示されている。米国特許出願第２００９１１７５６６号、第２００９００１７４７３号、この特許ファミリーの他の出願には、結腸がんおよび直腸がんにおいてＴＡＴ２０１が過剰発現されていることが開示されている。ＰＣＴ出願国際公開第２００３０８３０７４号および国際公開第２００４０４６３４２号には、結腸がん細胞において過剰発現されている数多くの遺伝子の１つとして、３８２アミノ酸残基のＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質配列が開示されている。これらの特許出願はさらに、結腸がんを検出し治療するためのＬＹ６Ｇ６Ｆの使用方法に関するとされている。しかしながら、これらの特許出願は、当業者が、結腸直腸がん以外のがん、感染性障害および／または免疫関連障害の治療および／または診断に、ＬＹ６Ｇ６Ｆに特異的な抗体および／またはＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤを使用しようとする動機付けを教示、示唆、または提供するものではない。これらの特許出願にはＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤは記載されておらず、また、これらの特許出願は、当業者が、がん、感染性障害および／または免疫関連障害の治療にＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤを使用しようとするいかなる動機付けを教示、示唆、または提供するものでもない。

【０１０７】

ＴＭＥＭ２５は、異常な発現または活性を呈することによってこれに関連する障害を引き起こし、自体がこれらの障害の診断、予防、および治療するのに有用である数多くの（何百、何千という）タンパク質の１つとして、ＰＣＴ出願国際公開第９９５８６４２号、ＰＣＴ出願国際公開第２００３０８７３００号、米国特許出願第２００７０４１９６３号、および米国特許出願第２００５２０２５２６号に開示されている。しかしながら、これらの出願は、当業者が、がん、感染性障害および／または免疫関連障害の治療および／または診断に、ＴＭＥＭ２５に特異的な抗体および／またはＴＭＥＭ２５　ＥＣＤを使用しようとする動機づけを教示、示唆、または提供するものではない。ＴＭＥＭ２５は、米国特許出願第２００４０１０１３４号において、疾患または障害（たとえば、がん、貧血、関節炎、喘息、炎症性腸疾患、アルツハイマー病など）を診断、治療、予防、または改善するのに有用な何百ものアルブミン融合タンパク質の１つとしても開示されている。しかしながら、これらの出願は、当業者が、がん、感染性障害および／または免疫関連障害の治療および／または診断に、ＴＭＥＭ２５に特異的な抗体および／またはＴＭＥＭ２５　ＥＣＤを使用しようとする動機づけを教示、示唆、または提供するものではない。また、ＴＭＥＭ２５は、乳がんの診断用として好ましい予後・予測バイオマーカーとして、Doolan P, et al., Tumour Biol. 2009, 30(4):200-9に記載されている。しかしながら、これらの文献は、当業者が、がん、感染性障害および／または免疫関連障害の治療に、ＴＭＥＭ２５に特異的な抗体および／またはＴＭＥＭ２５　ＥＣＤを使用しようとする動機づけを教示、示唆、または提供するものではない。

【０１０８】

様々な実施形態において述べられる本発明をより容易に理解することができるように、まず特定の用語を定義する。さらなる定義は、発明の詳細な説明の全体にわたって記載する。

【０１０９】
本明細書において、「単離された」は、目的化合物が存在する自然界の環境とは異なる環境から得られる目的化合物（たとえばポリヌクレオチドまたはポリペプチド）を指し、たとえば、ペプチドを自然界に存在しない濃度に濃縮することなどによって自然環境から分離された目的化合物が挙げられる。「単離された」は、目的化合物を得るために実質的に濃縮された試料内に含まれる化合物、および／または目的化合物が部分的もしくは実質的に精製された試料内に含まれる化合物を含む。
【０１１０】
「免疫細胞」は、造血器由来の任意の細胞を指し、Ｔ細胞、Ｂ細胞、単球、樹状細胞、およびマクロファージが挙げられるが、これらに限定されない。
【０１１１】
本明細書において、「ポリペプチド」は、修飾（たとえばリン酸化またはグリコシル化）の有無にかかわらず、任意の長さを有するアミノ酸鎖を指す。
【０１１２】
本明細書において、「共刺激ポリペプチド」または「共刺激分子」とは、Ｔ細胞上の細胞表面分子との相互作用により、Ｔ細胞応答を調節するポリペプチドである。
【０１１３】
本明細書において、「共刺激シグナル伝達」とは、抗原特異的Ｔ細胞応答において、抗原提示細胞上の共刺激ポリペプチドとＴ細胞上のレセプターとの相互作用の結果として生じるシグナル伝達活性である。単一の仮説に限定されることを望むものではないが、抗原特異的Ｔ細胞応答は、１）ＭＨＣに関連した抗原ペプチドとＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）との結合（シグナル１）と、２）種々の共刺激レセプター／リガンド対における接触によって伝達される抗原非依存性の第２シグナル（シグナル２）との２種のシグナルによって媒介されると考えられている。単一の仮説に限定されることを望むものではないが、この「第２のシグナル」は、Ｔ細胞応答のタイプ（活性化または抑制）ならびにこの応答の強度および持続期間を決定するのに重要であり、Ｂ７ファミリータンパク質などの共刺激分子からの正シグナルと負シグナルの両方の調節を受ける。
【０１１４】
本明細書において、「Ｂ７」ポリペプチドは、Ｔ細胞を共刺激するＢ７ファミリータンパク質のメンバーを意味し、このメンバーとして、Ｂ７－１、Ｂ７－２、Ｂ７－ＤＣ、Ｂ７－Ｈ５、Ｂ７－Ｈ１、Ｂ７－Ｈ２、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、Ｂ７－Ｈ６、Ｂ７－Ｓ３、ならびにこれらの生物学的に活性なフラグメントおよび／または変異体が挙げられるが、これらに限定されない。代表的な生物学的に活性なフラグメントとして、Ｔ細胞を共刺激する細胞外ドメインまたは細胞外ドメインのフラグメントが挙げられる。
【０１１５】
本明細書において、「変異体」ポリペプチドは、野生型ポリペプチドの対応するアミノ酸配列と比較して、少なくとも１つのアミノ酸配列改変を含む。
【０１１６】
本明細書において、「保存的」アミノ酸置換とは、置換されたアミノ酸が類似した構造特性または化学的特性を有する置換である。本明細書において、「宿主細胞」は、組換えベクターの導入が可能な原核細胞および真核細胞を指す。
【０１１７】
本明細書において、「エッジ部（ｅｄｇｅ　ｐｏｒｔｉｏｎ）」または「新たな接合部（ｎｅｗ　ｊｕｎｃｔｉｏｎ）」は、野性型または公知のタンパク質においては接合されていなかった、本発明のスプライス変異体内の２つの部分の連結を指す。エッジは、変異体の上記「公知のタンパク質」部分とテールとの接合により生じてもよく、かつ／または、たとえば、野性型配列の内部部分が既に存在しない場合、公知のタンパク質においては隣接していなかった２つの配列部分がスプライス変異体において隣接するように生じてもよい。「架橋」は上述したエッジ部であってもよいが、変異体のヘッドと「公知のタンパク質」部分との接合、変異体のテールと「公知のタンパク質」部分と接合、または変異体

の「公知のタンパク質」部分とインサートとの接合をさらに包含しうる。

【０１１８】

実施形態のいくつかでは、変異体の「公知のタンパク質」部分と、テール、ヘッド、または独特のインサートとの間の架橋は、少なくとも約１０個のアミノ酸を含み、実施形態のいくつかにおいては少なくとも２０個のアミノ酸を含み、実施形態のいくつかにおいては少なくとも３０個のアミノ酸を含み、実施形態のいくつかにおいては少なくとも４０個のアミノ酸を含み、これらのアミノ酸において、少なくとも１個のアミノ酸がテール／ヘッド／インサートに由来し、少なくとも１個のアミノ酸が変異体の「公知のタンパク質」部分に由来する。実施形態のいくつかにおいて、架橋は、約１０～約４０の範囲の任意の数（たとえば、１０、１１、１２、１３～３７、３８、３９、４０アミノ酸長またはその間の任意の数）のアミノ酸を含みうる。

【０１１９】

配列の長さを超えるいずれの方向にも架橋を伸長できないことには注目すべきであり、架橋に関する各説明においては、配列自体の長さを超えて架橋を伸長できないと理解されることが想定される。

【０１２０】

さらに、特定の状況下におけるスライディングウィンドウに関して架橋を以下に説明する。たとえば、特定の架橋は以下ような構成を特徴とする。（変異体内に公知のタンパク質部分が存在しない場合の）２つのエッジ間の架橋は、ＣＯＮＴＩＧ－ＮＡＭＥ＿Ｐ１（タンパク質の名称）の架橋部であって、長さ「ｎ」を有するポリペプチドを含み（ｎは、少なくとも約１０アミノ酸長であり、または少なくとも約２０アミノ酸長、少なくとも約３０アミノ酸長、少なくとも約４０アミノ酸長、もしくは少なくとも約５０アミノ酸長であってもよい）、該ポリペプチドにおいて少なくとも２個のアミノ酸がＸＸ（架橋の中心に位置し、それぞれがエッジの各末端に由来する２個のアミノ酸）を含み、該架橋部の構造が、（たとえば）４９－ｘ～４９の範囲の任意のアミノ酸番号から始まり任意のアミノ酸番号（たとえば）５０＋（（ｎ－２）－ｘ）（式中、ｘは０～ｎ－２で変動する）で終わる配列（番号付けはＣＯＮＴＩＧ－ＮＡＭＥ＿Ｐ１の配列に準ずる）で表されることを特徴とする架橋部であると説明することができる。この例においても、ｎが１０～５０アミノ酸長である架橋が包含されると理解されるべきである。さらに、架橋ポリペプチドは配列の長さを超えて伸長することはできず、したがって、（一例としての）４９－ｘは１以上であり、（一例としての）５０＋（（ｎ－２）－ｘ）は配列の全長よりも短いと理解されるべきである。

【０１２１】

本明細書において、「がん」は、制御されていない異常細胞分裂によって悪性増殖または腫瘍が引き起こされることを特徴とする任意の（浸潤性または転移性）新生物疾患を包含すると理解されるべきである。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる化合物で治療してもよいがんとしては、充実性腫瘍、肉腫および悪性血液疾患が挙げられるがこれらに限定されず、このような充実性腫瘍、肉腫および悪性血液疾患としては、乳がん（たとえば乳癌）、子宮頸がん、卵巣がん（卵巣癌）、子宮内膜がん、メラノーマ、膀胱がん（膀胱癌）、肺がん（たとえば腺癌および非小細胞肺がん）、膵臓がん（たとえば膵外分泌腺癌などの膵癌）、結腸がん（たとえば結腸腺癌および結腸腺腫などの結腸直腸癌）、進行疾患を含む前立腺がん、リンパ系造血器腫瘍（たとえば白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫）、骨髄性白血病（たとえば急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病）、甲状腺がん、濾胞性甲状腺がん、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、間葉組織由来腫瘍（たとえば線維肉腫および横紋筋肉腫）、メラノーマ、ぶどう膜メラノーマ、奇形癌、神経芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、皮膚の良性腫瘍（たとえば角化棘細胞腫）、腎臓がん、未分化大細胞リンパ腫、食道扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、濾胞性樹状細胞癌、腸がん、筋層浸潤がん、精巣腫瘍、表皮癌、脾臓がん、膀胱がん、頭頸部がん、胃がん、肝臓がん、骨がん、脳がん、網膜がん、胆道がん、小腸がん、唾液腺がん、子宮が

ん、精巣がん、結合組織がん、前立腺肥大症、脊髄形成異常、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、鼻咽腔がん、神経内分泌がん、骨髄異形成症候群、中皮腫、血管肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド、食道胃がん、ファローピウス管がん、腹膜がん、漿液性乳頭状ミュラー管がん、悪性腹水、消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）、ならびにリー・フラウメニ症候群およびフォンヒッペル・リンダウ症候群（ＶＨＬ）などの遺伝性癌症候群が挙げられるが、これらに限定されず、このような充実性腫瘍、肉腫および悪性血液疾患は、非転移性、浸潤性、または転移性であってもよい。

【０１２２】

本発明の好ましい実施形態の少なくともいくつかによれば、上記がんは、メラノーマ、肝臓がん、腎臓がん、脳がん、乳がん、結腸がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、胃がん、多発性骨髄腫、ならびに造血器がん（（ホジキンおよび非ホジキン）リンパ腫、急性および慢性リンパ芽球性白血病、ならびに急性および慢性骨髄白血病を含むが、これらに限定されない）からなる群から選択される、非転移性、浸潤性、または転移性のがんであってもよい。

【０１２３】

本明細書において「自己免疫疾患」は、あらゆる自己免疫疾患および慢性炎症病態を包含すると理解されるべきである。本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、自己免疫疾患は、再発寛解型多発性硬化症、一次進行型多発性硬化症および二次進行型多発性硬化症を含む多発性硬化症；乾癬；関節リウマチ；乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）；潰瘍性大腸炎；クローン病；良性リンパ球性血管炎、血小板減少性紫斑病、突発性血小板減少症、特発性自己免疫性溶血性貧血、赤芽球ろう、シェーグレン症候群、リウマチ性疾患、結合組織疾患、炎症性リウマチ、変形性リウマチ、非関節性リウマチ、若年性関節リウマチ、尿酸塩関節炎、筋肉リウマチ、慢性多発性関節炎、クリオグロブリン血管炎、ＡＮＣＡ関連血管炎、抗リン脂質症候群、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、ギラン・バレー症候群、慢性免疫性多発ニューロパチー、自己免疫性甲状腺炎、インスリン依存性糖尿病、１型糖尿病、アジソン病、膜性糸球体腎症、グッドパスチャー病、自己免疫性胃炎、自己免疫性萎縮性胃炎、悪性貧血、天疱瘡、尋常性天疱瘡、肝硬変、原発性胆汁性肝硬変、皮膚筋炎、多発性筋炎、線維筋炎、筋硬症、セリアック病、免疫グロブリンＡ腎症、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、エバンス症候群、アトピー性皮膚炎、乾癬、関節症性乾癬、グレーブス病、グレーブス眼症、強皮症、全身性強皮症、進行性全身性強皮症、喘息、アレルギー、原発性胆汁性肝硬変、橋本甲状腺炎、原発性粘液水腫、交感性眼炎、自己免疫性ぶどう膜炎、肝炎、慢性活動性肝炎、膠原病、強直性脊椎炎、肩関節周囲炎、結節性汎動脈炎、軟骨石灰化症、ヴェーゲナー肉芽腫症、顕微鏡的多発血管炎、慢性じんま疹、水疱性皮膚疾患、類天疱瘡、アトピー性湿疹、デビック病、小児自己免疫性溶血性貧血、難治性または慢性自己免疫性血球減少症、後天性血友病Ａにおける抗第VIII因子自己抗体の産生の予防、寒冷凝集素病、視神経脊髄炎、全身硬直症候群、歯肉炎、歯周炎、膵炎、心筋炎、血管炎、胃炎、痛風、痛風性関節炎；乾癬、アトピー性皮膚炎、湿疹、酒さ、蕁麻疹、およびざ瘡からなる群から選択される炎症性皮膚疾患；正補体血症性蕁麻疹様血管炎、心膜炎、筋炎、抗合成酵素症候群、強膜炎、マクロファージ活性化症候群、ベーチェット症候群、ＰＡＰＡ症候群、Ｂｌａｕ症候群、痛風、成人および若年性スティル病、クリオピリン関連周期性症候群、マックルーウェルズ症候群、家族性寒冷自己炎症性症候群、新生児期発症多臓器性炎症性疾患、家族性地中海熱、慢性乳児期発症神経皮膚関節症候群、全身型若年性特発性関節炎、高ＩｇＤ症候群、シュニッツラー症候群、自己免疫性網膜症、加齢黄斑変性症、アテローム性動脈硬化症、慢性前立腺炎、ならびにＴＮＦ受容体関連周期性症候群（ＴＲＡＰＳ）を含む（ただしこれらに限定されない）群から選択される任意の疾患、障害または病態をも包含すると理解されるべきである。

【０１２４】

自己免疫疾患は、任意の型および亜型の、多発性硬化症、関節リウマチ、１型糖尿病、乾癬、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、ぶどう膜炎またはシェーグレン症候群を

含んでもよく、これらを含むことが好ましい。

【０１２５】

本明細書において「多発性硬化症」は、多発性硬化症、良性多発性硬化症、再発寛解型多発性硬化症、二次進行型多発性硬化症、一次進行型多発性硬化症、進行再発型多発性硬化症、慢性進行型多発性硬化症、移行型／進行型多発性硬化症、急速悪化型多発性硬化症、臨床的に確実な多発性硬化症、マールブルクの変異体としても知られている悪性多発性硬化症、および急性多発性硬化症の１以上を包む。「多発性硬化症に関連する病態」は、たとえば、視神経脊髄炎としても知られているデビック病；急性散在性脳脊髄膜炎、急性脱髄性視神経炎、脱髄性横断性脊髄炎、ミラー・フィッシャー症候群、脳脊髄神経根障害、急性脱髄性多発ニューロパチー、腫脹性多発性硬化症、およびバロー同心円硬化症を包含してもよい。

【０１２６】

本明細書において「関節リウマチ」は、関節リウマチ、痛風、偽痛風、若年性特発性関節炎、若年性関節リウマチ、スティル病、強直性脊椎炎、およびリウマチ性血管炎の１以上を含む。関節リウマチに関連する病態は、たとえば、変形性関節症、サルコイドーシス、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、敗血症性関節炎、ヘモクロマトーシス、肝炎、血管炎、ヴェーゲナー肉芽腫症、ライム病、家族性地中海熱、回帰熱を伴う高免疫グロブリン血症Ｄ、ＴＮＦ受容体関連周期性症候群、および炎症性腸疾患に関連した腸炎性関節炎を包含してもよい。

【０１２７】

本明細書において「ぶどう膜炎」は、ぶどう膜炎、前部ぶどう膜炎（または虹彩毛様体炎）、中間部ぶどう膜炎（扁平部炎）、後部ぶどう膜炎（または脈絡網膜炎）、および汎ぶどう膜炎の１以上を含む。

【０１２８】

本明細書において「炎症性腸疾患」は、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎（ＵＣ）、コラーゲン蓄積大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、空置大腸炎、ベーチェット病、分類不能大腸炎の１以上を含む。

【０１２９】

本明細書において「乾癬」は、乾癬；尋常性乾癬および乾癬性紅皮症（紅皮性乾癬）を含む非膿疱性乾癬；ならびに汎発性膿疱性乾癬（ｖｏｎ　Ｚｕｍｂｕｓｃｈの膿疱性乾癬）、掌蹠膿疱症（持続性掌蹠膿疱症、バーバー型膿疱性乾癬、四肢の膿疱性乾癬）、環状膿疱性乾癬、稽留性肢端皮膚炎、疱疹状膿痂疹を含む膿疱性乾癬の１以上を含む。乾癬に関連する病態は、たとえば、薬物性乾癬、間擦疹型乾癬、おむつ部乾癬、脂漏様乾癬、滴状乾癬、爪乾癬、および乾癬性関節炎を包含してもよい。

【０１３０】

本明細書において「１型糖尿病」は、１型糖尿病、インスリン依存性糖尿病、特発性糖尿病、若年性１型糖尿病、若年発症成人型糖尿病、成人潜在性自己免疫性糖尿病、および妊娠糖尿病の１以上を含む。１型糖尿病に関連する病態は、多発ニューロパチー、単ニューロパチー、末梢性ニューロパチーおよび自律神経ニューロパチーを含むニューロパチー；ならびに眼合併症（緑内障、白内障、網膜症）を包含する。

【０１３１】

本明細書において「シェーグレン症候群」は、シェーグレン症候群、原発性シェーグレン症候群、および続発性シェーグレン症候群；ならびに、シェーグレン症候群に関連する病態（関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、強皮症などの結合組織疾患を含む）の１以上を含む。他の合併症は、肺炎、肺線維症、間質性腎炎、腎臓のフィルター周囲の組織の炎症、糸球体腎炎、尿細管性アシドーシス、手根管症候群、末梢性ニューロパチー、脳神経ニューロパチー、原発性胆汁性肝硬変（ＰＢＣ）、肝硬変、食道、胃、膵臓および肝臓の炎症（肝炎を含む）、多発性筋炎、レイノー現象、血管炎、自己免疫性甲状腺疾患、ならびにリンパ腫を包含する。

【０１３２】

本明細書において「全身性エリテマトーデス」は、全身性エリテマトーデス、円板状ループス、ループス関節炎、ループス肺臓炎、およびループス腎炎の１以上を含む。全身性エリテマトーデスに関連する病態は、骨関節結核；抗リン脂質抗体症候群；心膜炎、心筋炎、心内膜炎などの心臓の様々な部位の炎症；肺炎および胸膜炎；胸膜炎；胸水；慢性びまん性間質性肺疾患；肺高血圧症；肺塞栓症；肺出血；縮小肺症候群；ループス頭痛；ギラン・バレー症候群；無菌性髄膜炎；脱髄症候群；単ニューロパチー；多発性単神経炎；重症筋無力症；ミエロパチー；脳神経ニューロパチー；多発ニューロパチー；ならびに血管炎を包含する。

【０１３３】

本明細書において「免疫関連疾患（または免疫に関連する障害もしくは病態）」は、移植片移植に対する拒絶反応に関連した自己免疫疾患、炎症性障害および免疫障害（たとえば、臓器移植、同種異系幹細胞移植、自家幹細胞移植、および骨髄移植の急性および慢性拒絶反応、ならびに移植片対宿主病など）を含む（ただしこれらに限定されない）群から選択される任意の疾患、障害または病態をも包含すると理解されるべきである。

【０１３４】

本明細書において、「炎症性障害」および／または「炎症」という用語は区別なく使用され、病原体、損傷細胞、刺激原などの有害な刺激に対する免疫応答の調節異常を特徴とする炎症性異常を包含する。炎症性障害は非常に様々なヒト疾患の原因となる。炎症過程を病因とする非免疫性疾患としては、がん、アテローム性動脈硬化症および虚血性心疾患が挙げられる。炎症に関連した障害としては、慢性前立腺炎、糸球体腎炎、過敏症、骨盤炎症性疾患、再灌流障害、サルコイドーシス、血管炎、間質性膀胱炎、正補体血症性蕁麻疹様血管炎、心膜炎、筋炎、抗合成酵素症候群、強膜炎、マクロファージ活性化症候群、ベーチェット症候群、ＰＡＰＡ症候群、Ｂｌａｕ症候群、痛風、成人および若年性スティル病、クリオピリン関連周期性症候群、マックル－ウェルズ症候群、家族性寒冷自己炎症性症候群、新生児期発症多臓器性炎症性疾患、家族性地中海熱、慢性乳児期発症神経皮膚関節症候群、全身型若年性特発性関節炎、高ＩｇＤ症候群、シュニッツラー症候群、ＴＮＦ受容体関連周期性症候群（ＴＲＡＰＳＰ）、歯肉炎、歯周炎、肝炎、肝硬変、膵炎、心筋炎、血管炎、胃炎、痛風、および痛風性関節炎、ならびに乾癬、アトピー性皮膚炎、湿疹、酒さ、蕁麻疹およびざ瘡からなる群から選択される炎症性皮膚疾患が挙げられる。

【０１３５】

本明細書において「感染性障害および／または感染性疾患」ならびに／または「感染症」という用語は区別なく使用され、個々の宿主生物における病原性生物学的因子の存在および／または増殖によって引き起こされるあらゆる障害、疾患および／または病態を包含する。本明細書において「感染症」は、臨床的に明らかな病態（すなわち特徴的な医学的徴候および／もしくは疾患の症状）が示される、かつ／またはその経過の大部分もしくは全経過において無症候である、上記の障害、疾患および／または病態を含む。本明細書において「感染症」は、さらに、Ｔ細胞の増殖低下およびサイトカインの産生低下により示される機能低下を特徴とするＴ細胞表現型の疲弊を引き起こす外来抗原が持続的に存在することによって引き起こされる障害、疾患および／または病態を包含する。本明細書において「感染性障害および／もしくは感染性疾患」ならびに／または「感染症」は、さらに、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染および／または寄生虫感染によって引き起こされる、以下に記載の感染性障害、感染性疾患および／または感染病態のいずれも含む。

【０１３６】

本明細書において「ウイルス感染」は、ウイルスによって引き起こされるあらゆる感染症を包含し、該ウイルスとしては、レトロウイルス科（たとえば、ＨＴＬＶ－III、ＬＡＶ、ＨＴＬＶ－III／ＬＡＶ、またはＨＩＶ－IIIとも呼ばれる、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、後天性免疫不全（ＡＩＤＳ）ウイルスなどのヒト免疫不全ウイルス、およびＨＩＶ－ＬＰなどの他の単離物）；ピコルナウイルス科（たとえば、ポリオウイルス、Ａ型肝炎ウイルス、エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；カリシウイルス科（たとえば、胃腸炎を引き起こす株）；トガウイルス科（たとえば

、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；フラビウイルス科（たとえば、デング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；コロナウイルス科（たとえば、コロナウイルス）；ラブドウイルス科（たとえば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；フィロウイルス科（たとえば、エボラウイルス）；パラミクソウイルス科（たとえば、パラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス）；オルソミクソウイルス科（たとえば、インフルエンザウイルス）；ブニヤウイルス科（たとえば、ハンタンウイルス、ブニヤウイルス、フレボウイルス、およびナイロウイルス）；アレナウイルス科（出血熱ウイルス）；レオウイルス科（たとえば、レオウイルス、オルビウイルス、およびロタウイルス）；ビルナウイルス科；ヘパドナウイルス科（Ｂ型肝炎ウイルス）；パルボウイルス科（パルボウイルス）；パポバウイルス科（パピローマウイルス、ポリオーマウイルス）；アデノウイルス科（ほとんどのアデノウイルス）；ヘルペスウイルス科（単純疱疹ウイルス（ＨＳＶ）１型および２型、水痘・帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ヘルペスウイルス）；ポックスウイルス科（痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス）；およびイリドウイルス科（たとえばアフリカ豚コレラウイルス）；ならびに未分類ウイルス（たとえば、海綿状脳症の病原体、デルタ型肝炎の病原体（Ｂ型肝炎ウイルスの不完全サテライトであると考えられている）、非Ａ非Ｂ型肝炎の病原体（分類１：経口伝播；分類２：非経口伝播（すなわちＣ型肝炎））、ノーウォークウイルスおよびその関連ウイルス、およびアストロウイルス）、重症急性呼吸器症候群ウイルス、および呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）を挙げることができるが、これらに限定されない。

【０１３７】

本明細書において「真菌感染」は、真菌によって引き起こされるあらゆる感染症を包含し、該真菌として、クリプトコックス・ネオフォルマンス（Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｎｅｏｆｏｒｍａｎｓ）、ヒストプラスマ・カプスラーツム（Ｈｉｓｔｏｐｌａｓｍａ ｃａｐｓｕｌａｔｕｍ）、コクシジオイデス・イミチス（Ｃｏｃｃｉｄｉｏｉｄｅｓ ｉｍｍｉｔｉｓ）、ブラストミセス・デルマチチジス（Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｅｓ ｄｅｒｍａｔｉｔｉｄｉｓ）、クラミジア・トラコマチス（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）、およびカンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）を挙げることができるが、これらに限定されない。

【０１３８】

本明細書において「寄生虫感染」は、寄生虫によって引き起こされるあらゆる感染症を包含し、該寄生虫として、アメーバ類、鞭毛虫類、熱帯熱マラリア原虫、トキソプラズマ、繊毛虫類、コクシジウム類、微胞子虫類、胞子虫類などの原虫；蠕虫類、線虫類（回虫類）、条虫類（サナダムシ類）、吸虫類；節足動物；およびプリオンとして知られている異常タンパク質を挙げることができるが、これらに限定されない。

【０１３９】

細菌によって引き起こされる感染性障害および／または感染性疾患には、敗血症；敗血症性ショック；副鼻腔炎；皮膚感染；肺炎；気管支炎；髄膜炎；細菌性膣症；尿路感染症（ＵＣＩ）；細菌性胃腸炎；膿痂疹および丹毒；丹毒；蜂巣炎；炭疽病；百日咳；ライム病；ブルセラ症；腸炎；急性腸炎；破傷風；ジフテリア；偽膜性大腸炎；ガス壊疽；急性食中毒；嫌気性蜂巣炎；院内感染；下痢；小児髄膜炎；旅行者下痢；出血性大腸炎；溶血性尿毒症候群；野兎病；消化性潰瘍；胃十二指腸潰瘍；レジオネラ症；ポンティアック熱；レプトスピラ症；リステリア症；らい病（ハンセン病）；結核；淋病；新生児眼炎；敗血症性関節炎；髄膜炎を含む髄膜炎菌性疾患；ウォーターハウス・フリーデリクセン症候群；緑膿菌感染症；ロッキー山紅斑熱；腸チフス性サルモネラ症；胃腸炎および小腸結腸炎を伴うサルモネラ症；細菌性赤痢；コアグラーゼ陽性ブドウ球菌感染症、すなわち、びまん性皮膚感染（膿痂疹）を含む限局性皮膚感染、深部限局性感染、急性細菌性心内膜炎、敗血症、壊死性肺炎；毒素性ショック症候群およびブドウ球菌食中毒などの中毒症；膀胱炎；子宮内膜炎；中耳炎；連鎖球菌性咽頭炎；猩紅熱；リウマチ熱；産褥熱；壊死性筋膜炎；コレラ；ペスト（腺ペストおよび肺ペストを含む）；ならびに、ヘリコバクター・

ピロリ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉ）、ボレリア・ブルグドルフェリ（Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）、レジオネラ・ニューモフィラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌｉａ）、マイコバクテリウム属（たとえば、結核菌（Ｍ．ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、Ｍ．アビウム（Ｍ．ａｖｉｕｍ）、Ｍ．イントラセルラー（Ｍ．Ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒｅ）、Ｍ．カンサシ（Ｍ．ｋａｎｓａｓｉｉ）、Ｍ．ゴルドネ（Ｍ．ｇｏｒｄｏｎａｅ））、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）、淋菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）、髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、リステリア・モノサイトジェネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）、化膿レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）（Ａ群レンサ球菌）、Ｂ群溶血性レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃｔｉａｅ）（Ｂ群レンサ球菌）、ストレプトコッカス（ｖｉｒｉｄａｎｓ群）、ストレプトコッカス・フェカリス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｆａｅｃａｌｉｓ）、ストレプトコッカス・ボビス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｂｏｖｉｓ）、ストレプトコッカス（嫌気性ストレプトコッカス属）、肺炎連鎖球菌、病原性のカンピロバクター属、エンテロコッカス属、インフルエンザ菌（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）、炭疽菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ａｎｔｒａｃｉｓ）、ジフテリア菌（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａｅ）、コリネバクテリウム属、豚丹毒菌（Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ ｒｈｕｓｉｏｐａｔｈｉａｅ）、ウェルシュ菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｒｓ）、破傷風菌（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｔｅｔａｎｉ）、エンテロバクター・アエロゲネス（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ｅｒｏｇｅｎｅｓ）、肺炎桿菌（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｐｎｅｕｏｍｉａｅ）、パスツレラ・ムルトシダ（Ｐａｓｔｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｉｃｏｄａ）、バクテロイデス属、フソバクテリウム・ヌクレアタム（Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｎｕｃｌｅａｔｕｍ）、ストレプトバチルス・モニリフォルミス（Ｓｔｒｅｐｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｉｓ）、梅毒トレポネーマ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐａｌｌｉｄｕｍ）、フランベジアトレポネーマ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐｅｒｔｅｎｕｅ）、レプトスピラ属、およびアクチノミセス・イスラエリイ（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓ ｉｓｒａｅｌｌｉ）から選択される細菌によって引き起こされるあらゆる感染症（ただし、これらに限定されない）の１以上が含まれていてもよい。

【０１４０】

ウイルスによって引き起こされる感染性障害および／または疾患は、後天性免疫不全（ＡＩＤＳ）、西ナイル脳炎、コロナウイルス感染症、ライノウイルス感染症、インフルエンザ、デング熱、出血熱；耳科感染症；重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）、急性熱性咽頭炎、咽頭結膜熱、流行性角結膜炎、幼児胃腸炎、伝染性単核症、バーキットリンパ腫、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌、一次ＨＳＶ－１感染症（小児の歯肉口内炎、成人の扁桃炎および咽頭炎、角結膜炎）、潜在性ＨＳＶ－１感染症（口唇ヘルペス、ヘルペス）、無菌性髄膜炎、サイトメガロウイルス感染症、巨細胞性封入体症、カポジ肉腫、キャッスルマン病、原発性滲出液リンパ腫、インフルエンザ、麻疹、脳炎、後感染性脳脊髄炎、耳下腺炎、過形成上皮病変（尋常性、扁平、足底、および肛門性器疣贅、喉頭乳頭腫、ならびに疣贅状表皮発育異常症）、クループ、肺炎、細気管支炎、ポリオ、狂犬病、細気管支炎、肺炎、風疹、先天性風疹、出血熱、水痘、デング熱、エボラ感染症、エコーウイルス感染症、ＥＢＶ感染症、伝染性紅斑、フィロウイルス、フラビウイルス、手足口病、帯状疱疹ウイルス（帯状疱疹）、ヒトパピローマウイルス関連上皮病変、ラッサ熱、リンパ球性脈絡髄膜炎、パラインフルエンザウイルス感染症、パラミクソウイルス、パルボウイルスＢ１９感染症、ピコルナウイルス、ポックスウイルス感染症、ロタウイルス性下痢、風疹、麻疹、水痘、痘瘡からなる群より選択されるが、これらに限定されない。

【０１４１】

真菌によって引き起こされる感染性障害および／または疾患としては、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症、アスペルギルス腫、アスペルギルス症、バシジオボルス症、ブラストミセス症、カンジダ症、慢性肺アスペルギルス症、ツボカビ症、コクシジオイデス

症、コニディオボルス症、堅黒穂病（オオムギ）、クリプトコックス症、皮膚糸状菌症、皮膚糸状菌疹、皮膚糸状菌症、毛内菌症、昆虫病原糸状菌症、流行性リンパ管炎、流行性潰瘍症候群、食道カンジダ症、毛外菌症、真菌血症、ヒストプラスマ症、ロボ真菌症、Ｍａｓｓｏｓｐｏｒａ ｃｉｃａｄｉｎａ菌症、真菌症、イチゴのじゃのめ病、鼓膜真菌症、パラコクシジオイデス症、病原性真菌症、ペニシリウム症、Ｔｈｏｕｓａｎｄ ｃａｎｋｅｒｓ ｄｉｓｅａｓｅ、白癬、Ｚｅａｓｐｏｒａ症、接合菌症を挙げることができるが、これらに限定されない。寄生虫によって引き起こされる感染性障害および／または疾患は、アカントアメーバ症、アメーバ症、回虫症、十二指腸虫症、アニキサス症、バベシア症、バランチジウム症、アライグマ回虫症、ブラストシスティス症、カンディル症、シャーガス病、肝吸虫症、コクリオミイヤ症、コクシジウム症、中国肝吸虫症、クリプトスポリジウム症、二核アメーバ症、裂頭条虫症、腎虫感染症、メジナ虫症、エキノコックス症、象皮病、蟯虫症、肝蛭症、肥大吸虫症、フィラリア症、ジアルジア症、顎口虫症、膜様条虫症、ハルザン症候群、イソスポラ症、片山熱、リーシュマニア症、リンパ管フィラリア症、マラリア、横川吸虫症、蠅蛆病、回旋糸状虫症、シラミ寄生症、原発性アメーバ性髄膜脳炎、寄生性肺炎、肺吸虫症、疥癬、住血吸虫症、睡眠病、糞線虫症、孤虫症、リノスポリジウム症、河川盲目症、条虫症（嚢虫症の原因）、トキソカラ症、トキソプラズマ症、旋毛虫症、トリコモナス症、鞭虫症、トリパノソーマ症、条虫症からなる群より選択されるが、これらに限定されない。

【０１４２】

感染症として好ましいものは、たとえば、Ｂ型肝炎ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、伝染性単核症ウイルス、ＥＢＶ、サイトメガロウイルス、ＡＩＤＳ、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、結核菌、マラリアおよび住血吸虫のいずれかによって引き起こされる疾患である。

【０１４３】

本明細書において、「ワクチン」は、特定の疾患に対する免疫を向上させる生物学的製剤を指し、該ワクチンは、免疫応答を惹起させる、弱毒化または死滅化された病原体、病原体の毒素、病原体の単一の表面タンパク質などの抗原を含む。通常、ワクチンは、免疫系を刺激するために免疫増強剤としてアジュバントを含む。本明細書において、「治療ワクチン」および／または「治療用ワクチン接種」は、感染症またはがんなどの進行中の疾患を治療するために使用されるワクチンを指す。

【０１４４】

本明細書において、「アジュバント」は、それ自体はいかなる特異的抗原性も有さないが、免疫系を刺激しワクチンに対する応答を増強させる薬剤を指す。

【０１４５】

本明細書において「ＬＹ６Ｇ６Ｆ」および／または「ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質」は、配列番号１に示されるタンパク質、その変異体、オーソログ、および／もしくはフラグメント、ならびに／またはこれらをコードする核酸配列のいずれかを指し、これらは、本明細書に記載のがん、感染性障害、および／もしくは免疫関連障害において異なる発現量で発現され、かつ／またはがん、感染性障害、および／もしくは免疫関連障害に病因において一定の役割を果たしている。

【０１４６】

好ましい実施形態によれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆフラグメントは、配列番号２、５９、８１、および９６のいずれかで示されるＬＹ６Ｇ６Ｆ細胞外ドメインのアミノ酸配列、および／またはこれらの変異体を含む。好ましい実施形態によれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆオーソログは、配列番号２０および２９のいずれかを含む。好ましい実施形態によれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質をコードする核酸配列は配列番号３３、５７または１８２を含む。

【０１４７】

本明細書において「ＶＳＩＧ１０」および／または「ＶＳＩＧ１０タンパク質」は、配列番号３および５のいずれかに示されたタンパク質、その変異体、オーソログ、および／もしくはフラグメント、ならびに／またはこれらをコードする核酸配列のいずれかを指し、これらは、本明細書に記載のがん、感染性障害、および／もしくは免疫関連障害におい

て異なる発現量で発現され、かつ／またはがん、感染性障害、および／もしくは免疫関連障害に病因において一定の役割を果たしている。

【０１４８】

好ましい実施形態によれば、ＶＳＩＧ１０フラグメントは、配列番号４、６、６０、６１、８２～９３、および９７～１００のいずれかで示されるＶＳＩＧ１０細胞外ドメインのアミノ酸配列、その変異体、および／または図２Ａに示したＶＳＩＧ１０変異体（配列番号５）に特有のエッジ部を含むアミノ酸配列を含む。好ましい実施形態によれば、ＶＳＩＧ１０オーソログは、配列番号１９および３０のいずれかを含む。好ましい実施形態によれば、ＶＳＩＧ１０タンパク質をコードする核酸配列は配列番号３４、３５、３６、１８３、および１８４のいずれかを含む。

【０１４９】

本明細書において「ＴＭＥＭ２５」および／または「ＴＭＥＭ２５タンパク質」は、配列番号７および３９のいずれかに示されたタンパク質、その変異体、オーソログ、および／もしくはフラグメント、ならびに／またはこれらをコードする核酸配列のいずれかを指し、これらは、本明細書に記載のがん、感染性障害、および／もしくは免疫関連障害において異なる発現量で発現され、かつ／またはがん、感染性障害、および／もしくは免疫関連障害に病因において一定の役割を果たしている。

【０１５０】

好ましい実施形態によれば、ＴＭＥＭ２５フラグメントは、配列番号８、３９、９４、および１０１のいずれかで示されるＴＭＥＭ２５細胞外ドメインのアミノ酸配列、および／またはその変異体を含む。好ましい実施形態によれば、ＴＭＥＭ２５オーソログは、配列番号９および／または２８のいずれかに示された配列を有するタンパク質を含む。好ましい実施形態によれば、ＴＭＥＭ２５タンパク質をコードする核酸配列は配列番号３７および１８５のいずれかを含む。

【０１５１】

本明細書において「ＬＳＲ」および／または「ＬＳＲタンパク質」は、配列番号１１、１３、１５～１８、および１４３のいずれかに示されたタンパク質、その変異体、オーソログ、および／もしくはフラグメント、ならびに／またはこれらをコードする核酸配列のいずれかを指し、これらは、本明細書に記載のがん、感染性障害、および／もしくは免疫関連障害において異なる発現量で発現され、かつ／またはがん、感染性障害、および／もしくは免疫関連障害に病因において一定の役割を果たしている。

【０１５２】

好ましい実施形態によれば、ＬＳＲフラグメントは、配列番号１０、１２、１４、２２、４７～５０、９５、および１０２のいずれかで示されるＬＳＲ細胞外ドメインのアミノ酸配列、その変異体、および／または図２Ｇに示したＬＳＲ変異体（配列番号１８）に特有のエッジ部を含むアミノ酸配列を含む。ＬＳＲオーソログの一例は、配列番号２１、３１、および３２のいずれかで示される。好ましい実施形態によれば、ＬＳＲタンパク質をコードする核酸配列は配列番号４０～４６、１３２、１５５、１８８、１８６、１８７、１４５、および１５４のいずれかを含む。

【０１５３】

単一の仮説に限定されることを望むものではないが、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質、および／またはＬＳＲタンパク質はそれぞれ免疫共刺激タンパク質であることが予測されたものであり、免疫共刺激タンパク質の一例として、たとえばがん細胞に対して惹起されたＴ細胞応答などを含むＢ７免疫共刺激に関与し、自己免疫作用の誘発などの免疫反応に対する効果を惹起するＢ７タンパク質ファミリーのメンバーなどが挙げられる。

【０１５４】

本明細書において、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲの「可溶性細胞外ドメイン（ＥＣＤ）」、「細胞外ドメイン」または「可溶性ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質／分子、可溶性ＶＳＩＧ１０タンパク質／分子、可溶性ＴＭＥＭ２５タンパ

ク質／分子、および／または可溶性ＬＳＲタンパク質／分子」は、細胞表面に結合されていない（すなわち循環型）ＬＹ６Ｇ６Ｆ分子、ＶＳＩＧ１０分子、ＴＭＥＭ２５分子および／もしくはＬＳＲ分子、またはこれらの任意の部分を意味し、このようなものとして、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５、および／またはＬＳＲの細胞外ドメインが免疫グロブリン（Ｉｇ）部分と融合されて可溶性の融合分子となった、ＬＹ６Ｇ６Ｆ－Ｉｇ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇ融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５－Ｉｇ融合タンパク質、および／もしくはＬＳＲ－Ｉｇ融合タンパク質、ならびに／またはこれらのフラグメントおよび誘導体；パピローマウイルスＥ７遺伝子産物、メラノーマ関連抗原ｐ９７、ＨＩＶ　ｅｎｖタンパク質などの生物学的に活性または化学的に活性なタンパク質の一部分と融合または連結された、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５、および／またはＬＳＲの細胞外ドメインを有するタンパク質またはこれらのフラグメントおよび誘導体；ならびにＬＹ６Ｇ６Ｆ－Ｉｇ、ＶＳＩＧ１０－Ｉｇ、ＴＭＥＭ２５－Ｉｇ、および／またはＬＳＲ－Ｉｇなどのハイブリッド（キメラ）融合タンパク質またはこれらのフラグメントおよび誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。このような融合タンパク質についての詳細な説明は後述する。

【０１５５】

「可溶性ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質／分子、可溶性ＶＳＩＧ１０タンパク質／分子、可溶性ＴＭＥＭ２５タンパク質／分子、および／または可溶性ＬＳＲタンパク質／分子」は、膜貫通ドメインが除去されて可溶性タンパク質となった、ＬＹ６Ｇ６Ｆ分子、ＶＳＩＧ１０分子、ＴＭＥＭ２５分子、および／もしくはＬＳＲ分子、またはこれらのフラグメントおよび誘導体；ならびに可溶性ＬＹ６Ｇ６Ｆ突然変異体分子、可溶性ＶＳＩＧ１０突然変異体分子、可溶性ＴＭＥＭ２５突然変異体分子、および／もしくは可溶性ＬＳＲ突然変異体分子、またはこれらのフラグメント、一部分もしくは誘導体をも包含する。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる方法において使用される、可溶性ＬＹ６Ｇ６Ｆ分子、可溶性ＶＳＩＧ１０分子、可溶性ＴＭＥＭ２５分子、および／または可溶性ＬＳＲ分子は、シグナル（リーダー）ペプチド配列を含んでいても含んでいなくてもよい。

【０１５６】

ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチドのフラグメント

ＬＹ６Ｇ６Ｆの「可溶性細胞外ドメイン（ＥＣＤ）」、「細胞外ドメイン」または「可溶性」形態は、ＬＹ６Ｇ６Ｆの「可溶性細胞外ドメイン（ＥＣＤ）」、「細胞外ドメイン」または「可溶性ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質／分子」に相当するタンパク質をコードする核酸配列をも指す。ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤは、下記および／または表Ａに示したポリペプチド配列のいずれか；該ポリペプチド配列と少なくとも８０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも９０％の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％の配列同一性を有する上記配列のフラグメントもしくは変異体；これらの結合体；および／またはこれらをコードするポリヌクレオチドであってもよい。

【０１５７】

配列番号２：１７位～２３４位のアミノ酸残基（シグナルペプチドを含まず、膜貫通ドメインまで）（図１Ａ）：

ＡＤＮＭＱＡＩＹＶＡＬＧＥＡＶＥＬＰＣＰＳＰＰＴＬＨＧＤＥＨＬＳＷＦＣＳＰＡＡＧ
ＳＦＴＴＬＶＡＱＶＱＶＧＲＰＡＰＤＰＧＫＰＧＲＥＳＲＬＲＬＬＧＮＹＳＬＷＬＥＧＳ
ＫＥＥＤＡＧＲＹＷＣＡＶＬＧＱＨＨＮＹＱＮＷＲＶＹＤＶＬＶＬＫＧＳＱＬＳＡＲＡＡ
ＤＧＳＰＣＮＶＬＬＣＳＶＶＰＳＲＲＭＤＳＶＴＷＱＥＧＫＧＰＶＲＧＲＶＱＳＦＷＧＳ
ＥＡＡＬＬＬＶＣＰＧＥＧＬＳＥＰＲＳＲＲＰＲＩＩＲＣＬＭＴＨＮＫＧＶＳＦＳＬＡＡ
ＳＩＤＡＳＰＡＬＣＡＰＳＴＧＷＤＭＰ、

ならびに上記アミノ酸配列と少なくとも８０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも９０％の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％または９９％の配列同一性を有する上記アミノ酸配列のフラグメントおよび変異体。配列番号５９は、シグナルペプチドを含むＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤの一例を示す。

【０１５８】
【表１】
表Ａ

配列番号	アミノ酸配列	説明
81	ADNMQAIYVALGEAVELPCPSPPTLHGDEHLSWFCSPAAG SFTTLVAQVQVGRPAPDPGKPGRESRLRLLGNYSLWLEGS KEEDAGRYWCAVLGQHHNYQNWRVYD	LY6G6F IgV ドメイン 配列番号１の 17 位～122 位のアミノ酸

【０１５９】
上記フラグメントは、少なくとも約６２、６３、６４、６５個など～２２８個の配列番号１に示したＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質細胞外ドメインのアミノ酸から構成されていてもよく、６２～２２８の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。上記フラグメントは、少なくとも約６２個～８２個のＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質細胞外ドメインアミノ酸で構成されていることが好ましく、６２～８２の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。さらに、上記フラグメントは、少なくとも約９５個～１１５個のＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質細胞外ドメインアミノ酸で構成されていることが好ましく、９５～１１５の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。さらに、上記フラグメントは、少なくとも約２０８個～２２８個のＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質細胞外ドメインアミノ酸で構成されていることが好ましく、２０８～２２８の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。上記フラグメントは、約７２個、１０６個、または２１８個のアミノ酸で構成されていることがより好ましい。本発明の実施形態の少なくともいくつかによるＬＹ６Ｇ６Ｆフラグメントタンパク質は、シグナルペプチド配列を含んでいても含んでいなくてもよく、また、ＬＹ６Ｇ６Ｆ膜貫通ドメインの１、２、３、４、または５個の連続するアミノ酸を含んでいても含んでいなくてもよい。
【０１６０】
具体的には、ＬＹ６Ｇ６Ｆの細胞外ドメインのフラグメントは、ＬＹ６Ｇ６Ｆ細胞外ドメイン内のＩｇＶドメインの任意の部分に相当する配列またはＬＹ６Ｇ６Ｆ細胞外ドメイン内のＩｇＶドメインを含む任意の配列を含んでいてもよく、ＬＹ６Ｇ６Ｆ（配列番号１）の１４位～２７位の任意の残基位置から１１２位～１３２位の任意の残基位置までに相当する配列を有している。
【０１６１】
ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質は、細胞外ドメイン内に免疫グロブリンドメインであるＩｇＶドメイン（Ｖドメイン）を含み（図１Ａの囲み枠内に示す）、これは抗体の可変ドメインと関連している。ＩｇＶドメインはＢ７ファミリーの他のメンバーと類似していることから、受容体の結合を担っている可能性がある。細胞外ドメイン内のこのＩｇドメインは、折りたたまれたタンパク質において通常みられるように、構造機能にとって重要であると考えられるジスルフィド結合をドメイン内のシステイン残基間に１つ含む。配列番号１において、これらのシステイン残基は３５位と１０６位に位置する。
【０１６２】
一実施形態では、ＬＹ６Ｇ６Ｆの可溶性フラグメントが提供される。この可溶性フラグメントは、後述の融合タンパク質についてのセクションにさらに詳細に記載する第１の融合パートナーであってもよい。上記フラグメントとして、単独または複数個の本来のレセプターに結合する能力を保持し、かつ／またはＴ細胞の活性化を抑制する能力を保持するフラグメントが有用である。完全長ＬＹ６Ｇ６Ｆのフラグメントであるポリペプチドが本来のレセプターと結合する能力および／またはＴ細胞の活性化を抑制する能力は、通常、完全長ＬＹ６Ｇ６Ｆの少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、９９％、１００％であり、さらには１００％を超える。可溶性ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチドフラグメントは、産生細胞から遊離、分泌、または抽出されてもよいＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチドのフラグメントを指す。別の実施形態では、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチドの可溶性フラグメントは、たとえば、単独または複数

個の本来のレセプターに結合する能力を保持し、かつ／またはＴ細胞の活性化を抑制する能力を保持するフラグメントなどの、ＬＹ６Ｇ６Ｆの生物学的活性を保持するＬＹ６Ｇ６Ｆ細胞外ドメインのフラグメントを包含する。細胞外ドメインは、膜貫通ドメインの１、２、３、４、または５個の連続するアミノ酸および／またはシグナル配列の１、２、３、４、または５個の連続するアミノ酸を含むことができる。あるいは、細胞外ドメインは、Ｃ末端、Ｎ末端またはその両方に由来する１、２、３、４または５個以上のアミノ酸を有していてもよい。

【０１６３】

実施形態のいくつかにおいて、ＬＹ６Ｇ６Ｆ細胞外ドメインポリペプチドは、配列番号８１に示されるＩｇＶドメインのアミノ酸配列、そのフラグメントもしくは変異体、または配列番号１に示される完全長タンパク質のＩｇＶドメイン内の３５位と１０６位に位置する保存されたシステイン残基の間の領域（配列番号９６に示される配列：ＣＰＳＰＰＴＬＨＧＤＥＨＬＳＷＦＣＳＰＡＡＧＳＦＴＴＬＶＡＱＶＱＶＧＲＰＡＰＤＰＧＫＰＧＲＥＳＲＬＲＬＬＧＮＹＳＬＷＬＥＧＳＫＥＥＤＡＧＲＹＷＣに相当）を含む。別の実施形態では、ＬＹ６Ｇ６Ｆ細胞外ドメインポリペプチドは、配列番号８１および９６のいずれかに示されるＩｇＶドメインアミノ酸配列から実質的になる。

【０１６４】

通常、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチドフラグメントは、シグナル配列をコードする配列を含む核酸から発現される。通常、シグナル配列が未熟なポリペプチドから切断されて、シグナル配列を欠く成熟ポリペプチドが生じる。標準的な分子生物学技術を使用してＬＹ６Ｇ６Ｆのシグナル配列を別のポリペプチドのシグナル配列に置換することにより、ポリペプチドの発現レベル、分泌、溶解性または他の特性を変化させることができる。ＬＹ６Ｇ６Ｆシグナルペプチド配列の置換に使用されるシグナルペプチド配列は、当技術分野で公知のものであってよい。

【０１６５】

ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤは、ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤポリペプチドをコードする核酸配列のいずれかを指してもよく、配列番号２に示されるＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤポリペプチドをコードする配列番号３３に示される核酸配列、またはそのフラグメントもしくは変性変異体を指してもよい。

【０１６６】

ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤは、オルソロガスなＥＣＤポリペプチドを指してもよい。ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤは、配列番号２０に示されるマウスＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤポリペプチド、および／または配列番号２３に示されるマウスＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－ＩｇＧ２ａ－Ｆｃ融合ポリペプチドを指してもよい。

【０１６７】

ＶＳＩＧ１０ポリペプチドのフラグメント

ＶＳＩＧ１０の「可溶性細胞外ドメイン（ＥＣＤ）」、「細胞外ドメイン」または「可溶性」形態は、ＶＳＩＧ１０の「可溶性細胞外ドメイン（ＥＣＤ）」、「細胞外ドメイン」または「可溶性ＶＳＩＧ１０タンパク質／分子」に相当するタンパク質をコードする核酸配列をも指す。ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤは、下記および／または表Ｂに示したポリペプチド配列のいずれか；該ポリペプチド配列と少なくとも８０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも９０％の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％の配列同一性を有する上記配列のフラグメントもしくは変異体；これらの結合体；および／またはこれらをコードするポリヌクレオチドであってもよい。

【０１６８】

配列番号４：３１位～４１３位のアミノ酸残基（シグナルペプチドを含まず、膜貫通ドメインまで）（図１Ｂ）：

ＶＶＩＧＥＶＨＥＮＶＴＬＨＣＧＮＩＳＧＬＲＧＱＶＴＷＹＲＮＮＳＥＰＶＦＬＬＳＳＮＳＳＬＲＰＡＥＰＲＦＳＬＶＤＡＴＳＬＨＩＥＳＬＳＬＧＤＥＧＩＹＴＣＱＥＩＬＮＶＴ

ＱＷＦＱＶＷＬＱＶＡＳＧＰＹＱＩＥＶＨＩＶＡＴＧＴＬＰＮＧＴＬＹＡＡＲＧＳＱＶＤ
ＦＳＣＮＳＳＳＲＰＰＰＶＶＥＷＷＦＱＡＬＮＳＳＳＥＳＦＧＨＮＬＴＶＮＦＦＳＬＬＬ
ＩＳＰＮＬＱＧＮＹＴＣＬＡＬＮＱＬＳＫＲＨＲＫＶＴＴＥＬＬＶＹＹＰＰＰＳＡＰＱＣ
ＷＡＱＭＡＳＧＳＦＭＬＱＬＴＣＲＷＤＧＧＹＰＤＰＤＦＬＷＩＥＥＰＧＧＶＩＶＧＫＳ
ＫＬＧＶＥＭＬＳＥＳＱＬＳＤＧＫＫＦＫＣＶＴＳＨＩＶＧＰＥＳＧＡＳＣＭＶＱＩＲＧ
ＰＳＬＬＳＥＰＭＫＴＣＦＴＧＧＮＶＴＬＴＣＱＶＳＧＡＹＰＰＡＫＩＬＷＬＲＮＬＴＱ
ＰＥＶＩＩＱＰＳＳＲＨＬＩＴＱＤＧＱＮＳＴＬＴＩＨＮＣＳＱＤＬＤＥＧＹＹＩＣＲＡ
ＤＳＰＶＧＶＲＥＭＥＩＷＬＳＶＫＥＰＬＮＩＧＧ；

配列番号６：３１位～３１２位のアミノ酸残基（エクソン３スキッピング変異体、シグナルペプチドを含まず、膜貫通ドメインまで）（図１Ｃ）：

ＶＶＩＧＥＶＨＥＮＶＴＬＨＣＧＮＩＳＧＬＲＧＱＶＴＷＹＲＮＮＳＥＰＶＦＬＬＳＳＮ
ＳＳＬＲＰＡＥＰＲＦＳＬＶＤＡＴＳＬＨＩＥＳＬＳＬＧＤＥＧＩＹＴＣＱＥＩＬＮＶＴ
ＱＷＦＱＶＷＬＱＶＡＮＰＰＰＳＡＰＱＣＷＡＱＭＡＳＧＳＦＭＬＱＬＴＣＲＷＤＧＧＹ
ＰＤＰＤＦＬＷＩＥＥＰＧＧＶＩＶＧＫＳＫＬＧＶＥＭＬＳＥＳＱＬＳＤＧＫＫＦＫＣＶ
ＴＳＨＩＶＧＰＥＳＧＡＳＣＭＶＱＩＲＧＰＳＬＬＳＥＰＭＫＴＣＦＴＧＧＮＶＴＬＴＣ
ＱＶＳＧＡＹＰＰＡＫＩＬＷＬＲＮＬＴＱＰＥＶＩＩＱＰＳＳＲＨＬＩＴＱＤＧＱＮＳＴ
ＬＴＩＨＮＣＳＱＤＬＤＥＧＹＹＩＣＲＡＤＳＰＶＧＶＲＥＭＥＩＷＬＳＶＫＥＰＬＮＩ
ＧＧ；

および上記アミノ酸配列と少なくとも８０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも９０％の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％または９９％の配列同一性を有する上記アミノ酸配列の変異体。配列番号６０～６１は、シグナルペプチドを含むＶＳＩＧ１０　ＥＣＤの一例を示す。

【０１６９】

【表２】

表Ｂ

配列番号	アミノ酸配列	説明
82	VVIGEVHENVTLHCGNISGLRGQVTWYRNNSEPVFLLSSNSSLRPAEPRFSLVDATSLHIESLSLGDEGIYTCQEILNVTQWFQVWLQV	VSIG10 IgC2 ドメイン１ 配列番号３の31位～119位のアミノ酸 配列番号５の31位～119位のアミノ酸
83	PYQIEVHIVATGTLPNGTLYAARGSQVDFSCNSSSRPPPVVEWWFQALNSSSESFGHNLTVNFFSLLLISPNLQGNYTCLALNQLSKRHRKVT	VSIG10 IgC2 ドメイン２ 配列番号３の123位～215位のアミノ酸
84	PPPSAPQCWAQMASGSFMLQLTCRWDGGYPDPDFLWIEEPGGVIVGKSKLGVEMLSESQLSDGKKFKCVTSHIVGPESGASCMVQIR	VSIG10 IgC2 ドメイン３ 配列番号３の223位～309位のアミノ酸 配列番号５の122位～208位のアミノ酸
85	PSLLSEPMKTCFTGGNVTLTCQVSGAYPPAKILWLRNLTQPEVIIQPSSRHLITQDGQNSTLTIHNCSQDLDEGYYICRADSPVGVREMEIWLS	VSIG10 IgC2 ドメイン４ 配列番号３の311位～404位のアミノ酸 配列番号５の210位～303位のアミノ酸
86	VVIGEVHENVTLHCGNISGLRGQVTWYRNNSEPVFLLSSNSSLRPAEPRFSLVDATSLHIESLSLGDEGIYTCQEILNVTQWFQVWLQVASGPYQIEVHIVATGTLPNGTLYAARGSQVDFSCNSSSRPPPVVEWWFQALNSSSESFGHNLTVNFFSLLLISPNLQGNYTCLALNQLSKRHRKVT	VSIG10 WT IgC2 ドメイン１～２ 配列番号３の31位～215位のアミノ酸
87	VVIGEVHENVTLHCGNISGLRGQVTWYRNNSEPVFLLSSNSSLRPAEPRFSLVDATSLHIESLSLGDEGIYTCQEILNVTQWFQVWLQVASGPYQIEVHIVATGTLPNGTLYAARGSQVDFSCNSSSRPPPVVEWWFQALNSSSESFGHNLTVNFFSLLLISPNLQGNYTCLALNQLSKRHRKVTTELLVYYPPPSAPQCWAQMASGSFMLQLTCRWDGGYPDPDFLWIEEPGGVIVGKSKLGVEMLSESQLSDGKKFKCVTSHIVGPESGASCMVQIR	VSIG10 WT IgC2 ドメイン１～３ 配列番号３の31位～309位のアミノ酸
88	VVIGEVHENVTLHCGNISGLRGQVTWYRNNSEPVFLLSSNSSLRPAEPRFSLVDATSLHIESLSLGDEGIYTCQEILNVTQWFQVWLQVASGPYQIEVHIVATGTLPNGTLYAARGSQVDFSCNSSSRPPPVVEWWFQALNSSSESFGHNLTVNFFSLLLISPNLQGNYTCLALNQLSKRHRKVTTELLVYYPPPSAPQCWAQMASGSFMLQLTCRWDGGYPDPDFLWIEEPGGVIVGKSKLGVEMLSESQLSDGKKFKCVTSHIVGPESGASCMVQIRGPSLLSEPMKTCFTGGNVTLTCQVSGAYPPAKILWLRNLTQPEVIIQPSSRHLITQDGQNSTLTIHNCSQDLDEGYYICRADSPVGVREMEIWLS	VSIG10 WT IgC2 ドメイン１～４ 配列番号３の31位～404位のアミノ酸
89	PYQIEVHIVATGTLPNGTLYAARGSQVDFSCNSSSRPPPVVEWWFQALNSSSESFGHNLTVNFFSLLLISPNLQGNYTCLALNQLSKRHRKVTTELLVYYPPPSAPQCWAQMASGSFMLQLTCRWDGGYPDPDFLWIEEPGGVIVGKSKLGVEMLSESQLSDGKKFKCVTSHIVGPESGASCMVQIR	VSIG10 WT IgC2 ドメイン２～３ 配列番号３の123位～309位のアミノ酸

【表３】

90	PYQIEVHIVATGTLPNGTLYAARGSQVDFSCNS SSRPPPVVEWWFQALNSSSESFGHNLTVNFFSL LLISPNLQGNYTCLALNQLSKRHRKVTTELLVY YPPPSAPQCWAQMASGSFMLQLTCRWDGGYPDP DFLWIEEPGGVIVGKSKLGVEMLSESQLSDGKK FKCVTSHIVGPESGASCMVQIRGPSLLSEPMKT CFTGGNVTLTCQVSGAYPPAKILWLRNLTQPEV IIQPSSRHLITQDGQNSTLTIHNCSQDLDEGYY ICRADSPVGVREMEIWLS	VSIG10 WT IgC2 ドメイン 2～4 配列番号 3 の 123 位～404 位のアミノ酸
91	PPPSAPQCWAQMASGSFMLQLTCRWDGGYPDPD FLWIEEPGGVIVGKSKLGVEMLSESQLSDGKKF KCVTSHIVGPESGASCMVQIRGPSLLSEPMKTC FTGGNVTLTCQVSGAYPPAKILWLRNLTQPEVI IQPSSRHLITQDGQNSTLTIHNCSQDLDEGYYI CRADSPVGVREMEIWLS	VSIG10 IgC2 ドメイン 3～4 配列番号 3 の 223 位～404 位のアミノ酸 配列番号 5 の 122 位～303 位のアミノ酸
92	VVIGEVHENVTLHCGNISGLRGQVTWYRNNSEP VFLLSSNSSLRPAEPRFSLVDATSLHI ESLSLGDEGIYTCQEILNVTQWFQVWLQVANPP PSAPQCWAQMASGSFMLQLTCRWDGGY PDPDFLWIEEPGGVIVGKSKLGVEMLSESQLSD GKKFKCVTSHIVGPESGASCMVQIR	エクソン 3 スキッピング VSIG10 変異体 T95617 P6 IgC2 ドメイン 1 および 3 配列番号 5 の 31 位～208 位のアミノ酸
93	VVIGEVHENVTLHCGNISGLRGQVTWYRNNSEP VFLLSSNSSLRPAEPRFSLVDATSLHI ESLSLGDEGIYTCQEILNVTQWFQVWLQVANPP PSAPQCWAQMASGSFMLQLTCRWDGGY PDPDFLWIEEPGGVIVGKSKLGVEMLSESQLSD GKKFKCVTSHIVGPESGASCMVQIRGP SLLSEPMKTCFTGGNVTLTCQVSGAYPPAKILW LRNLTQPEVIIQPSSRHLITQDGQNST LTIHNCSQDLDEGYYICRADSPVGVREMEIWLS	エクソン 3 スキッピング VSIG10 変異体 T95617 P6 IgC2 ドメイン 1,3 および 4 配列番号 5 の 31 位～303 位のアミノ酸

【０１７０】

上記フラグメントは、少なくとも約３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３個など～３９３個の配列番号３に示したＶＳＩＧ１０タンパク質細胞外ドメインのアミノ酸から構成されていてもよく、３６～３９３の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。上記フラグメントは、少なくとも約３６個～７０個のＶＳＩＧ１０タンパク質細胞外ドメインアミノ酸で構成されていることが好ましく、３６～７０の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。さらに、上記フラグメントは、少なくとも約８０個～１００個のＶＳＩＧ１０タンパク質細胞外ドメインアミノ酸で構成されていることが好ましく、８０～１００の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。さらに、上記フラグメントは、少なくとも約１７０個～２００個のＶＳＩＧ１０タンパク質細胞外ドメインアミノ酸で構成されていることが好ましく、１７０～２００の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。さらに、上記フラグメントは、少なくとも約２６５個～２９０個のＶＳＩＧ１０タンパク質細胞外ドメインアミノ酸で構成されていることが好ましく、２６５～２９０の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。さらに、上記フラグメントは、少なくとも約３６５個～３９３個のＶＳＩＧ１０タンパク質細胞外ドメインアミノ酸で構成されていることが好ましく、３６５～３９３の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。上記フラグメントは、約４６、４９、５８、６０、８７、８９、９３、９４、１７８、１８２、１８５、１８７、２７３、２７９、２８２、３７４、または３８３個のアミノ酸で構成されていることがより好ましい。本発明の実施形態の少なくともいくつかによるＶＳＩＧ１０フラグメントタンパク質は、シグナルペプチド配列を含んでいても含んでいなくてもよく、また、ＶＳＩＧ１０膜貫通ドメインの１、２、３、４、または５個の連続するアミノ酸を含んでいても含んでいなくてもよい。

【０１７１】
具体的には、ＶＳＩＧ１０の細胞外ドメインのフラグメントは、ＶＳＩＧ１０細胞外ドメイン内の１以上のＩｇＣ２ドメインの任意の部分に相当する配列またはＶＳＩＧ１０細胞外ドメイン内のＩｇＶドメインを１以上含む任意の配列を含んでいてもよく、ＶＳＩＧ１０（配列番号３）の２８位～４１位の任意の残基位置から１０９位～１２２位の任意の残基位置までに相当する配列、１２０位～１３３位の任意の残基位置から２０５位～２２２位の任意の残基位置までに相当する配列、２１６位～２３３位の任意の残基位置から２９９位～３１０位の任意の残基位置までに相当する配列、３１０位～３２１位の任意の残基位置から３９４位～４１４位の任意の残基位置までに相当する配列、２８位～４１位の任意の残基位置から２０５位～２２２位の任意の残基位置までに相当する配列、２８位～４１位の任意の残基位置から２９９位～３１０位の任意の残基位置までに相当する配列、２８位～４１位の任意の残基位置から３９４位～４１４位の任意の残基位置までに相当する配列、１２０位～１３３位の任意の残基位置から２９９位～３１０位の任意の残基位置までに相当する配列、１２０位～１３３位の任意の残基位置から３９４位～４１４位の任意の残基位置までに相当する配列、もしくは２１６位～２３３位の任意の残基位置から３９４位～４１４位の任意の残基位置までに相当する配列を有しているか、または、エクソン３スキッピングＶＳＩＧ１０変異体　Ｔ９５６１７　Ｐ６（配列番号５）の２８位～４１位の任意の残基位置から１９８～２０９位の任意の残基位置までに相当する配列、もしくは２８位～４１位の任意の残基位置から２９３位～３１３位の任意の残基位置までに相当する配列を有している。

【０１７２】
ＶＳＩＧ１０タンパク質は、細胞外ドメイン内に免疫グロブリンドメインであるＩｇＣ２ドメイン（Ｉｇ様Ｃ２ドメインまたは Ｉｇ Ｃ２セットドメインともいう）を複数含み、これらは抗体の定常ドメインと関連している。これらのドメインを図１Ｂ（配列番号３）および図１Ｃ（配列番号５）に示す。細胞外ドメイン内のこれらのＩｇドメインは、折りたたまれたタンパク質において通常みられるように、構造機能にとって重要であると考えられるジスルフィド結合をドメイン内のシステイン残基間に１つ含む。配列番号３において、これらのシステイン残基は、４４位と１０３位、１５３位と２０１位、２４５位と２９０位、および３３１位と３８８位に位置する。配列番号５においては、これらのシステイン残基は、４４位と１０３位、１４４位と１８９位、および２３０位と２８７位に位置する。

【０１７３】
一実施形態では、ＶＳＩＧ１０の可溶性フラグメントが提供される。この可溶性フラグメントは、後述の融合タンパク質についてのセクションに記載する第１の融合パートナーであってもよい。上記フラグメントとして、単独または複数個の本来のレセプターに結合する能力を保持し、かつ／またはＴ細胞の活性化を抑制する能力を保持するフラグメントが有用である。完全長ＶＳＩＧ１０のフラグメントであるＶＳＩＧ１０ポリペプチドが本来のレセプターと結合する能力および／またはＴ細胞の活性化を抑制する能力は、通常、完全長ＶＳＩＧ１０の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、９９％、１００％であり、さらには１００％を超える。可溶性ＶＳＩＧ１０ポリペプチドフラグメントは、産生細胞から遊離、分泌、または抽出されてもよいＶＳＩＧ１０ポリペプチドのフラグメントを指す。別の実施形態では、ＶＳＩＧ１０ポリペプチドの可溶性フラグメントは、たとえば、単独または複数個の本来のレセプターに結合する能力を保持し、かつ／またはＴ細胞の活性化を抑制する能力を保持するフラグメントなどの、ＶＳＩＧ１０の生物学的活性を保持するＶＳＩＧ１０細胞外ドメインのフラグメントを包含する。細胞外ドメインは、膜貫通ドメインの１、２、３、４、または５個の連続するアミノ酸および／またはシグナル配列の１、２、３、４、または５個の連続するアミノ酸を含むことができる。あるいは、細胞外ドメインは、Ｃ末端、Ｎ末端またはその両方に由来する１、２、３、４または５個以上のアミノ酸を有していてもよい。

【０１７４】
実施形態のいくつかにおいて、ＶＳＩＧ１０細胞外ドメインポリペプチドは、配列番号８２、８３、８４および８５のいずれかに示される少なくとも１つのＩｇＣ２ドメインのアミノ酸配列、そのフラグメントもしくは変異体、配列番号３に示される完全長タンパク質のＩｇＣ２ドメイン内の４４位と１０３位に位置する保存されたシステイン残基の間の領域（配列番号９７に示される配列：ＣＧＮＩＳＧＬＲＧＱＶＴＷＹＲＮＮＳＥＰＶＦＬＬＳＳＮＳＳＬＲＰＡＥＰＲＦＳＬＶＤＡＴＳＬＨＩＥＳＬＳＬＧＤＥＧＩＹＴＣに相当）、配列番号３に示される完全長タンパク質のＩｇＣ２ドメイン内の１５３位と２０１位に位置する保存されたシステイン残基の間の領域（配列番号９８に示される配列：ＣＮＳＳＳＲＰＰＰＶＶＥＷＷＦＱＡＬＮＳＳＳＥＳＦＧＨＮＬＴＶＮＦＦＳＬＬＬＩＳＰＮＬＱＧＮＹＴＣに相当）、配列番号３に示される完全長タンパク質のＩｇＣ２ドメイン内の２４５位と２０９位に位置する保存されたシステイン残基の間の領域（配列番号９９に示される配列：ＣＲＷＤＧＧＹＰＤＰＤＦＬＷＩＥＥＰＧＧＶＩＶＧＫＳＫＬＧＶＥＭＬＳＥＳＱＬＳＤＧＫＫＦＫＣに相当）、または配列番号３に示される完全長タンパク質のＩｇＣ２ドメイン内の３３１位と３８８位に位置する保存されたシステイン残基の間の領域（配列番号１００に示される配列：ＣＱＶＳＧＡＹＰＰＡＫＩＬＷＬＲＮＬＴＱＰＥＶＩＩＱＰＳＳＲＨＬＩＴＱＤＧＱＮＳＴＬＴＩＨＮＣＳＱＤＬＤＥＧＹＹＩＣに相当）を含む。さらなる実施形態のいくつかでは、ＶＳＩＧ１０細胞外ドメインポリペプチドは、配列番号８２～９３および９７～１００の少なくとも１つで示されるアミノ酸配列から実質的になる。

【０１７５】
通常、ＶＳＩＧ１０ポリペプチドフラグメントは、シグナル配列をコードする配列を含む核酸から発現される。通常、シグナル配列が未熟なポリペプチドから切断されて、シグナル配列を欠く成熟ポリペプチドが生じる。標準的な分子生物学技術を使用してＶＳＩＧ１０のシグナル配列を別のポリペプチドのシグナル配列に置換することにより、ポリペプチドの発現レベル、分泌、溶解性または他の特性を変化させることができる。ＶＳＩＧ１０シグナルペプチド配列の置換に使用されるシグナルペプチド配列は、当技術分野で公知のものであってよい。

【０１７６】
ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤは、ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤポリペプチドをコードする核酸配列のいずれかをも指してもよく、配列番号４および６に示されるＶＳＩＧ１０　ＥＣＤポリペプチドをそれぞれコードする配列番号３４および３６に示される核酸配列、またはこれらのフラグメントもしくは変性変異体（ｄｅｇｅｎｅｒａｔｉｖｅ　ｖａｒｉａｎｔ）を指してもよい。

【０１７７】
ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤは、オルソログガスなＥＣＤポリペプチドを指してもよい。ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤは、配列番号１９に示されるマウスＶＳＩＧ１０　ＥＣＤポリペプチド、および／または配列番号２４に示されるマウスＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ－ＩｇＧ２ａ－Ｆｃ融合ポリペプチドを指してもよい。

【０１７８】
ＴＭＥＭ２５ポリペプチドのフラグメント

ＴＭＥＭ２５の「可溶性細胞外ドメイン（ＥＣＤ）」、「細胞外ドメイン」または「可溶性」形態は、ＴＭＥＭ２５の「可溶性細胞外ドメイン（ＥＣＤ）」、「細胞外ドメイン」または「可溶性ＴＭＥＭ２５タンパク質／分子」に相当するタンパク質をコードする核酸配列をも指す。ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤは、下記および／または表Ｃに示したポリペプチド配列のいずれか；該ポリペプチド配列と少なくとも８０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも９０％の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％の配列同一性を有する上記配列のフラグメントもしくは変異体；これらの結合体；および／またはこれらをコードするポリヌクレオチドであってもよい。

【０１７９】
配列番号８：２７位～２３２位のアミノ酸残基（シグナルペプチドを含まず、膜貫通ドメインまで）（図１Ｄ）：
ＥＬＥＰＱＩＤＧＱＴＷＡＥＲＡＬＲＥＮＥＲＨＡＦＴＣＲＶＡＧＧＰＧＴＰＲＬＡＷＹＬＤＧＱＬＱＥＡＳＴＳＲＬＬＳＶＧＧＥＡＦＳＧＧＴＳＴＦＴＶＴＡＨＲＡＱＨＥＬＮＣＳＬＱＤＰＲＳＧＲＳＡＮＡＳＶＩＬＮＶＱＦＫＰＥＩＡＱＶＧＡＫＹＱＥＡＱＧＰＧＬＬＶＶＬＦＡＬＶＲＡＮＰＰＡＮＶＴＷＩＤＱＤＧＰＶＴＶＮＴＳＤＦＬＶＬＤＡＱＮＹＰＷＬＴＮＨＴＶＱＬＱＬＲＳＬＡＨＮＬＳＶＶＡＴＮＤＶＧＶＴＳＡＳＬＰＡＰＧＬＬＡＴＲＶＥ、
および上記アミノ酸配列と少なくとも８０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも９０％の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％または９９％の配列同一性を有する上記アミノ酸配列の変異体。配列番号３９は、シグナルペプチドを含むＴＭＥＭ２５　ＥＣＤの一例を示す。

【０１８０】
【表４】
表Ｃ

配列番号	アミノ酸配列	説明
94	PQIDGQTWAERALRENERHAFTCRVAGGPGTPR LAWYLDGQLQEASTSRLLSVGGEAFSGGTSTFT VTAHRAQHELNCSLQDPRSGRSANASVI	TMEM25 IgC2 ドメイン 配列番号 7 の 30 位～123 位のアミノ酸

【０１８１】
上記フラグメントは、少なくとも約４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２個など～２１６個の配列番号７に示したＴＭＥＭ２５タンパク質細胞外ドメインのアミノ酸から構成されていてもよく、４６～２１６の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。上記フラグメントは、少なくとも約４６個～６６個のＴＭＥＭ２５タンパク質細胞外ドメインアミノ酸で構成されていることが好ましく、４６～６６の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。さらに、上記フラグメントは、少なくとも約８４個～１０４個のＴＭＥＭ２５タンパク質細胞外ドメインアミノ酸で構成されていることが好ましく、８４～１０４の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。さらに、上記フラグメントは、少なくとも約１９６個～２１６個のＴＭＥＭ２５タンパク質細胞外ドメインアミノ酸で構成されていることが好ましく、１９６～２１６の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。上記フラグメントは、約５６個、９４個、または２０６個のアミノ酸で構成されていることがより好ましい。本発明の実施形態の少なくともいくつかによるＴＭＥＭ２５フラグメントタンパク質は、シグナルペプチド配列を含んでいても含んでいなくてもよく、また、ＴＭＥＭ２５膜貫通ドメインの１、２、３、４、または５個の連続するアミノ酸を含んでいても含んでいなくてもよい。

【０１８２】
具体的には、ＴＭＥＭ２５の細胞外ドメインのフラグメントは、ＴＭＥＭ２５細胞外ドメイン内のＩｇＣ２ドメインの任意の部分に相当する配列またはＴＭＥＭ２５細胞外ドメイン内のＩｇＣ２ドメインを含む任意の配列を含んでいてもよく、ＴＭＥＭ２５（配列番号７）の２７位～４０位の任意の残基位置から１１３位～１３３位の任意の残基位置までに相当する配列を有している。

【０１８３】
ＴＭＥＭ２５タンパク質は、細胞外ドメイン内に免疫グロブリンドメインであるＩｇＣ２ドメイン（Ｉｇ様Ｃ２ドメインまたは Ｉｇ Ｃ２セットドメインともいう）を含み、これは抗体の定常ドメインと関連している。このドメインを図１Ｄの囲み枠内に示す。細胞外ドメイン内のこのＩｇドメインは、折りたたまれたタンパク質において通常みられるように、構造機能にとって重要であると考えられるジスルフィド結合をドメイン内のシステイン残基間に１つ含む。配列番号７において、これらのシステイン残基は５２位と１０７位

に位置する。

【０１８４】

一実施形態では、ＴＭＥＭ２５の可溶性フラグメントが提供される。この可溶性フラグメントは、たとえば後述の融合タンパク質についてのセクションなどにさらに詳細に記載する第１の融合パートナーであってもよい。上記フラグメントとして、単独または複数個の本来のレセプターに結合する能力を保持し、かつ／またはＴ細胞の活性化を抑制する能力を保持するフラグメントが有用である。完全長ＴＭＥＭ２５のフラグメントであるＴＭＥＭ２５ポリペプチドが本来のレセプターと結合する能力および／またはＴ細胞の活性化を抑制する能力は、通常、完全長ＴＭＥＭ２５の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、９９％、１００％であり、さらには１００％を超える。可溶性ＴＭＥＭ２５ポリペプチドフラグメントは、産生細胞から遊離、分泌、または抽出されてもよいＴＭＥＭ２５ポリペプチドのフラグメントを指す。別の実施形態では、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドの可溶性フラグメントは、たとえば、単独または複数個の本来のレセプターに結合する能力を保持し、かつ／またはＴ細胞の活性化を抑制する能力を保持するフラグメントなどの、ＴＭＥＭ２５の生物学的活性を保持するＴＭＥＭ２５細胞外ドメインのフラグメントを包含する。細胞外ドメインは、膜貫通ドメインの１、２、３、４、または５個の連続するアミノ酸および／またはシグナル配列の１、２、３、４、または５個の連続するアミノ酸を含むことができる。あるいは、細胞外ドメインは、Ｃ末端、Ｎ末端またはその両方に由来する１、２、３、４または５個以上のアミノ酸を有していてもよい。

【０１８５】

実施形態のいくつかにおいて、ＴＭＥＭ２５細胞外ドメインポリペプチドは、配列番号９４に示されるＩｇＣ２ドメインのアミノ酸配列、そのフラグメントもしくは変異体、または配列番号７に示される完全長タンパク質のＩｇＣ２ドメイン内の５２位と１０７位に位置する保存されたシステイン残基の間の領域（配列番号１０１に示される配列：ＣＲＶＡＧＧＰＧＴＰＲＬＡＷＹＬＤＧＱＬＱＥＡＳＴＳＲＬＬＳＶＧＧＥＡＦＳＧＧＴＳＴＦＴＶＴＡＨＲＡＱＨＥＬＮＣに相当）を含む。別の実施形態では、ＴＭＥＭ２５細胞外ドメインポリペプチドは、配列番号９４および１０１のいずれかに示されるＩｇＣ２ドメインアミノ酸配列から実質的になる。

【０１８６】

通常、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドフラグメントは、シグナル配列をコードする配列を含む核酸から発現される。通常、シグナル配列が未熟なポリペプチドから切断されて、シグナル配列を欠く成熟ポリペプチドが生じる。標準的な分子生物学技術を使用してＴＭＥＭ２５のシグナル配列を別のポリペプチドのシグナル配列に置換することにより、ポリペプチドの発現レベル、分泌、溶解性または他の特性を変化させることができる。ＴＭＥＭ２５シグナルペプチド配列の置換に使用されるシグナルペプチド配列は、当技術分野で公知のものであってよい。

【０１８７】

ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤは、ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤポリペプチドをコードする核酸配列のいずれかをも指してもよく、配列番号８に示されるＴＭＥＭ２５　ＥＣＤポリペプチドをコードする配列番号３７に示される核酸配列、またはそのフラグメントもしくは変性変異体（ｄｅｇｅｎｅｒａｔｉｖｅ　ｖａｒｉａｎｔ）を指してもよい。

【０１８８】

ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤは、オルソロガスなＥＣＤポリペプチドを指してもよい。ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤは、配列番号９に示されるマウスＴＭＥＭ２５　ＥＣＤポリペプチド、および／または配列番号２５に示されるマウスＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ－ＩｇＧ２ａ－Ｆｃ融合ポリペプチドを指してもよい。

【０１８９】

ＬＳＲポリペプチドのフラグメント

ＬＳＲの「可溶性細胞外ドメイン（ＥＣＤ）」、「細胞外ドメイン」または「可溶性」

形態は、ＬＳＲの「可溶性細胞外ドメイン（ＥＣＤ）」、「細胞外ドメイン」または「可溶性ＬＳＲタンパク質／分子」に相当するタンパク質をコードする核酸配列をも指す。ＬＳＲ　ＥＣＤは、下記および／または表Ｄに示したポリペプチド配列のいずれか；該ポリペプチド配列と少なくとも８０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも９０％の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも９５、９６、９７、９８もしくは９９％の配列同一性を有する上記配列のフラグメントもしくは変異体；これらの結合体；および／またはこれらをコードするポリヌクレオチドであってもよい。

【０１９０】

配列番号１２：ＬＳＲアイソフォームＡ　ＥＣＤ（シグナルペプチドを含まず、膜貫通ドメインまで）の４２位～２１１位のアミノ酸残基（図１Ｅ）：

ＩＱＶＴＶＳＮＰＹＨＶＶＩＬＦＱＰＶＴＬＰＣＴＹＱＭＴＳＴＰＴＱＰＩＶＩＷＫＹＫ
ＳＦＣＲＤＲＩＡＤＡＦＳＰＡＳＶＤＮＱＬＮＡＱＬＡＡＧＮＰＧＹＮＰＹＶＥＣＱＤＳ
ＶＲＴＶＲＶＶＡＴＫＱＧＮＡＶＴＬＧＤＹＹＱＧＲＲＩＴＩＴＧＮＡＤＬＴＦＤＱＴＡ
ＷＧＤＳＧＶＹＹＣＳＶＶＳＡＱＤＬＱＧＮＮＥＡＹＡＥＬＩＶＬＧＲＴＳＧＶＡＥＬＬ
ＰＧＦＱＡＧＰＩＥＤ；

配列番号１４：ＬＳＲアイソフォームＢ　ＥＣＤ（シグナルペプチドを含まず、膜貫通ドメインまで）の４２位～１９２位のアミノ酸残基（図１Ｆ）：

ＩＱＶＴＶＳＮＰＹＨＶＶＩＬＦＱＰＶＴＬＰＣＴＹＱＭＴＳＴＰＴＱＰＩＶＩＷＫＹＫ
ＳＦＣＲＤＲＩＡＤＡＦＳＰＡＳＶＤＮＱＬＮＡＱＬＡＡＧＮＰＧＹＮＰＹＶＥＣＱＤＳ
ＶＲＴＶＲＶＶＡＴＫＱＧＮＡＶＴＬＧＤＹＹＱＧＲＲＩＴＩＴＧＮＡＤＬＴＦＤＱＴＡ
ＷＧＤＳＧＶＹＹＣＳＶＶＳＡＱＤＬＱＧＮＮＥＡＹＡＥＬＩＶＬＤ；

配列番号４７：ＬＳＲアイソフォームＣ分泌変異体の４２位～５３３位のアミノ酸残基（図１Ｇ）：

ＩＱＶＴＶＳＮＰＹＨＶＶＩＬＦＱＰＶＴＬＰＣＴＹＱＭＴＳＴＰＴＱＰＩＶＩＷＫＹＫ
ＳＦＣＲＤＲＩＡＤＡＦＳＰＡＳＶＤＮＱＬＮＡＱＬＡＡＧＮＰＧＹＮＰＹＶＥＣＱＤＳ
ＶＲＴＶＲＶＶＡＴＫＱＧＮＡＶＴＬＧＤＹＹＱＧＲＲＩＴＩＴＧＮＡＤＬＴＦＤＱＴＡ
ＷＧＤＳＧＶＹＹＣＳＶＶＳＡＱＤＬＱＧＮＮＥＡＹＡＥＬＩＶＬＶＹＡＡＧＫＡＡＴＳ
ＧＶＰＳＩＹＡＰＳＴＹＡＨＬＳＰＡＫＴＰＰＰＰＡＭＩＰＭＧＰＡＹＮＧＹＰＧＧＹＰ
ＧＤＶＤＲＳＳＳＡＧＧＱＧＳＹＶＰＬＬＲＤＴＤＳＳＶＡＳＥＶＲＳＧＹＲＩＱＡＳＱ
ＱＤＤＳＭＲＶＬＹＹＭＥＫＥＬＡＮＦＤＰＳＲＰＧＰＰＳＧＲＶＥＲＡＭＳＥＶＴＳＬ
ＨＥＤＤＷＲＳＲＰＳＲＧＰＡＬＴＰＩＲＤＥＥＷＧＧＨＳＰＲＳＰＲＧＷＤＱＥＰＡＲ
ＥＱＡＧＧＧＷＲＡＲＲＰＲＡＲＳＶＤＡＬＤＤＬＴＰＰＳＴＡＥＳＧＳＲＳＰＴＳＮＧ
ＧＲＳＲＡＹＭＰＰＲＳＲＳＲＤＤＬＹＤＱＤＤＳＲＤＦＰＲＳＲＤＰＨＹＤＤＦＲＳＲ
ＥＲＰＰＡＤＰＲＳＨＨＨＲＴＲＤＰＲＤＮＧＳＲＳＧＤＬＰＹＤＧＲＬＬＥＥＡＶＲＫ
ＫＧＳＥＥＲＲＲＰＨＫＥＥＥＥＥＡＹＹＰＰＡＰＰＰＹＳＥＴＤＳＱＡＳＲＥＲＲＬＫ
ＫＮＬＡＬＳＲＥＳＬＶＶ；

配列番号４８：ＬＳＲアイソフォームＤ分泌変異体の４２位～５３２位のアミノ酸残基（図１Ｈ）：

ＩＱＶＴＶＳＮＰＹＨＶＶＩＬＦＱＰＶＴＬＰＣＴＹＱＭＴＳＴＰＴＱＰＩＶＩＷＫＹＫ
ＳＦＣＲＤＲＩＡＤＡＦＳＰＡＳＶＤＮＱＬＮＡＱＬＡＡＧＮＰＧＹＮＰＹＶＥＣＱＤＳ
ＶＲＴＶＲＶＶＡＴＫＱＧＮＡＶＴＬＧＤＹＹＱＧＲＲＩＴＩＴＧＮＡＤＬＴＦＤＱＴＡ
ＷＧＤＳＧＶＹＹＣＳＶＶＳＡＱＤＬＱＧＮＮＥＡＹＡＥＬＩＶＬＶＹＡＡＧＫＡＡＴＳ
ＧＶＰＳＩＹＡＰＳＴＹＡＨＬＳＰＡＫＴＰＰＰＰＡＭＩＰＭＧＰＡＹＮＧＹＰＧＧＹＰ
ＧＤＶＤＲＳＳＳＡＧＧＱＧＳＹＶＰＬＬＲＤＴＤＳＳＶＡＳＶＲＳＧＹＲＩＱＡＳＱＱ
ＤＤＳＭＲＶＬＹＹＭＥＫＥＬＡＮＦＤＰＳＲＰＧＰＰＳＧＲＶＥＲＡＭＳＥＶＴＳＬＨ
ＥＤＤＷＲＳＲＰＳＲＧＰＡＬＴＰＩＲＤＥＥＷＧＧＨＳＰＲＳＰＲＧＷＤＱＥＰＡＲＥ
ＱＡＧＧＧＷＲＡＲＲＰＲＡＲＳＶＤＡＬＤＤＬＴＰＰＳＴＡＥＳＧＳＲＳＰＴＳＮＧＧ
ＲＳＲＡＹＭＰＰＲＳＲＳＲＤＤＬＹＤＱＤＤＳＲＤＦＰＲＳＲＤＰＨＹＤＤＦＲＳＲＥ
ＲＰＰＡＤＰＲＳＨＨＨＲＴＲＤＰＲＤＮＧＳＲＳＧＤＬＰＹＤＧＲＬＬＥＥＡＶＲＫＫ
ＧＳＥＥＲＲＲＰＨＫＥＥＥＥＥＡＹＹＰＰＡＰＰＰＹＳＥＴＤＳＱＡＳＲＥＲＲＬＫＫ

ＮＬＡＬＳＲＥＳＬＶＶ；
配列番号４９：ＬＳＲアイソフォームＥ分泌変異体の４２位～４９３位のアミノ酸残基（図１Ｉ）：
ＩＱＶＴＶＳＮＰＹＨＶＶＩＬＦＱＰＶＴＬＰＣＴＹＱＭＴＳＴＰＴＱＰＩＶＩＷＫＹＫ
ＳＦＣＲＤＲＩＡＤＡＦＳＰＡＳＶＤＮＱＬＮＡＱＬＡＡＧＮＰＧＹＮＰＹＶＥＣＱＤＳ
ＶＲＴＶＲＶＶＡＴＫＱＧＮＡＶＴＬＧＤＹＹＱＧＲＲＩＴＩＴＧＭＹＡＡＧＫＡＡＴＳ
ＧＶＰＳＩＹＡＰＳＴＹＡＨＬＳＰＡＫＴＰＰＰＰＡＭＩＰＭＧＰＡＹＮＧＹＰＧＧＹＰ
ＧＤＶＤＲＳＳＳＡＧＧＱＧＳＹＶＰＬＬＲＤＴＤＳＳＶＡＳＥＶＲＳＧＹＲＩＱＡＳＱ
ＱＤＤＳＭＲＶＬＹＹＭＥＫＥＬＡＮＦＤＰＳＲＰＧＰＰＳＧＲＶＥＲＡＭＳＥＶＴＳＬ
ＨＥＤＤＷＲＳＲＰＳＲＧＰＡＬＴＰＩＲＤＥＥＷＧＧＨＳＰＲＳＰＲＧＷＤＱＥＰＡＲ
ＥＱＡＧＧＧＷＲＡＲＲＰＲＡＲＳＶＤＡＬＤＤＬＴＰＰＳＴＡＥＳＧＳＲＳＰＴＳＮＧ
ＧＲＳＲＡＹＭＰＰＲＳＲＳＲＤＤＬＹＤＱＤＤＳＲＤＦＰＲＳＲＤＰＨＹＤＤＦＲＳＲ
ＥＲＰＰＡＤＰＲＳＨＨＨＲＴＲＤＰＲＤＮＧＳＲＳＧＤＬＰＹＤＧＲＬＬＥＥＡＶＲＫ
ＫＧＳＥＥＲＲＲＰＨＫＥＥＥＥＥＡＹＹＰＰＡＰＰＰＹＳＥＴＤＳＱＡＳＲＥＲＲＬＫ
ＫＮＬＡＬＳＲＥＳＬＶＶ；
配列番号５０：ＬＳＲアイソフォームＦ分泌変異体の４２位～５５２位のアミノ酸残基（図１Ｊ）：
ＩＱＶＴＶＳＮＰＹＨＶＶＩＬＦＱＰＶＴＬＰＣＴＹＱＭＴＳＴＰＴＱＰＩＶＩＷＫＹＫ
ＳＦＣＲＤＲＩＡＤＡＦＳＰＡＳＶＤＮＱＬＮＡＱＬＡＡＧＮＰＧＹＮＰＹＶＥＣＱＤＳ
ＶＲＴＶＲＶＶＡＴＫＱＧＮＡＶＴＬＧＤＹＹＱＧＲＲＩＴＩＴＧＮＡＤＬＴＦＤＱＴＡ
ＷＧＤＳＧＶＹＹＣＳＶＶＳＡＱＤＬＱＧＮＮＥＡＹＡＥＬＩＶＬＧＲＴＳＧＶＡＥＬＬ
ＰＧＦＱＡＧＰＩＥＶＹＡＡＧＫＡＡＴＳＧＶＰＳＩＹＡＰＳＴＹＡＨＬＳＰＡＫＴＰＰ
ＰＰＡＭＩＰＭＧＰＡＹＮＧＹＰＧＧＹＰＧＤＶＤＲＳＳＳＡＧＧＱＧＳＹＶＰＬＬＲＤ
ＴＤＳＳＶＡＳＥＶＲＳＧＹＲＩＱＡＳＱＱＤＤＳＭＲＶＬＹＹＭＥＫＥＬＡＮＦＤＰＳ
ＲＰＧＰＰＳＧＲＶＥＲＡＭＳＥＶＴＳＬＨＥＤＤＷＲＳＲＰＳＲＧＰＡＬＴＰＩＲＤＥ
ＥＷＧＧＨＳＰＲＳＰＲＧＷＤＱＥＰＡＲＥＱＡＧＧＧＷＲＡＲＲＰＲＡＲＳＶＤＡＬＤ
ＤＬＴＰＰＳＴＡＥＳＧＳＲＳＰＴＳＮＧＧＲＳＲＡＹＭＰＰＲＳＲＳＲＤＤＬＹＤＱＤ
ＤＳＲＤＦＰＲＳＲＤＰＨＹＤＤＦＲＳＲＥＲＰＰＡＤＰＲＳＨＨＨＲＴＲＤＰＲＤＮＧ
ＳＲＳＧＤＬＰＹＤＧＲＬＬＥＥＡＶＲＫＫＧＳＥＥＲＲＲＰＨＫＥＥＥＥＥＡＹＹＰＰ
ＡＰＰＰＹＳＥＴＤＳＱＡＳＲＥＲＲＬＫＫＮＬＡＬＳＲＥＳＬＶＶ；
および上記アミノ酸配列と少なくとも８０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも９０％の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％または９９％の配列同一性を有する上記アミノ酸配列の変異体。配列番号１０および２２は、シグナルペプチドを含むＬＳＲ　ＥＣＤの一例を示す。

【０１９１】

上記フラグメントは、少なくとも約１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０個など～１９８個の配列番号１１および／または１４３に示したＬＳＲタンパク質細胞外ドメインのアミノ酸から構成されていてもよく、１００～１９８の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。本発明の実施形態の少なくともいくつかによるＬＳＲフラグメントタンパク質は、シグナルペプチド配列を含んでいても含んでいなくてもよく、また、ＬＳＲ膜貫通ドメインの１、２、３、４、または５個の連続するアミノ酸を含んでいても含んでいなくてもよい。

【０１９２】

【表５】

表Ｄ

配列番号	アミノ酸配列	説明
95	IQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTSTPTQP IVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAA GNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQGNAVTLGD YYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVV SAQDLQGNNEAYA	LSR IgV ドメイン 配列番号 11, 13, 15, 16, 17 および 18 の 42 位～186 位のアミノ酸

【０１９３】

上記フラグメントは、少なくとも約９８、９９、１００、１０１、１０２個など～１８０個の配列番号１１に示したＬＳＲタンパク質細胞外ドメインのアミノ酸から構成されていてもよく、９８～１８０の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。上記フラグメントは、少なくとも約９８個～１１８個のＬＳＲタンパク質細胞外ドメインアミノ酸で構成されていることが好ましく、９８～１１８の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。さらに、上記フラグメントは、少なくとも約１３５個～１５５個のＬＳＲタンパク質細胞外ドメインアミノ酸で構成されていることが好ましく、１３５～１５５の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。さらに、上記フラグメントは、少なくとも約１６０個～１８０個のＬＳＲタンパク質細胞外ドメインアミノ酸で構成されていることが好ましく、１６０～１８０の範囲の任意の整数で表されるアミノ酸長であってよい。上記フラグメントは、約１０８個、１４５個、または１７０個のアミノ酸で構成されていることがより好ましい。本発明の実施形態の少なくともいくつかによるＬＳＲフラグメントタンパク質は、シグナルペプチド配列を含んでいても含んでいなくてもよく、また、ＬＳＲ膜貫通ドメインの１、２、３、４、または５個の連続するアミノ酸を含んでいても含んでいなくてもよい。

【０１９４】

ＬＳＲタンパク質は、細胞外ドメイン内に免疫グロブリンドメインであるＩｇＶドメイン（Ｖドメイン）を含み、これは抗体の可変ドメインと関連している。Ｉｇドメインを、図１Ｅ、１Ｆ、１Ｇ、１Ｈおよび１Ｊの配列番号１１、１３、１５、１６および１８において囲み枠内に示す。細胞外ドメイン内のこのＩｇドメインは、折りたたまれたタンパク質において通常みられるように、構造機能にとって重要であると考えられるジスルフィド結合をドメイン内のシステイン残基間に１つ含む。配列番号１１において、これらのシステイン残基は６３位と１７０位に位置する。

【０１９５】

一実施形態では、ＬＳＲの可溶性フラグメントが提供される。この可溶性フラグメントは、たとえば後述の融合タンパク質についてのセクションなどに記載する第１の融合パートナーであってもよい。上記フラグメントとして、単独または複数個の本来のレセプターに結合する能力を保持し、かつ／またはＴ細胞の活性化を抑制する能力を保持するフラグメントが有用である。完全長ＬＳＲのフラグメントであるＬＳＲポリペプチドが本来のレセプターと結合する能力および／またはＴ細胞の活性化を抑制する能力は、通常、完全長ＬＳＲの少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、９９％、１００％であり、さらには１００％を超える。可溶性ＬＳＲポリペプチドフラグメントは、産生細胞から遊離、分泌、または抽出されてもよいＬＳＲポリペプチドのフラグメントを指す。別の実施形態では、ＬＳＲポリペプチドの可溶性フラグメントは、たとえば、単独または複数個の本来のレセプターに結合する能力を保持し、かつ／またはＴ細胞の活性化を抑制する能力を保持するフラグメントなどの、ＬＳＲの生物学的活性を保持するＬＳＲ細胞外ドメインのフラグメントを包含する。細胞外ドメインは、膜貫通ドメインの１、２、３、４、または５個の連続するアミノ酸および／またはシグナル配列の１、２、３、４、または５個の連続するアミノ酸を含むことができる。あるいは、細胞外ドメインは、Ｃ末端、Ｎ末端またはその両方に由来する１、２、３、４ま

たは５個以上のアミノ酸を有していてもよい。
【０１９６】
実施形態のいくつかにおいて、ＬＳＲ細胞外ドメインポリペプチドは、配列番号９５に示されるＩｇＶドメインのアミノ酸配列、そのフラグメントもしくは変異体、または配列番号１１に示される完全長タンパク質のＩｇＶドメイン内の６３位と１７０位に位置する保存されたシステイン残基の間の領域（配列番号１０２に示される配列：ＣＴＹＱＭＴＳＴＰＴＱＰＩＶＩＷＫＹＫＳＦＣＲＤＲＩＡＤＡＦＳＰＡＳＶＤＮＱＬＮＡＱＬＡＡＧＮＰＧＹＮＰＹＶＥＣＱＤＳＶＲＴＶＲＶＶＡＴＫＱＧＮＡＶＴＬＧＤＹＹＱＧＲＲＩＴＩＴＧＮＡＤＬＴＦＤＱＴＡＷＧＤＳＧＶＹＹＣに相当）を含む。実施形態のいくつかでは、ＬＳＲ細胞外ドメインポリペプチドは、配列番号９５および１０２のいずれかに示されるＩｇＶドメインアミノ酸配列から実質的になる。
【０１９７】
通常、ＬＳＲポリペプチドフラグメントは、シグナル配列をコードする配列を含む核酸から発現される。通常、シグナル配列が未熟なポリペプチドから切断されて、シグナル配列を欠く成熟ポリペプチドが生じる。標準的な分子生物学技術を使用してＬＳＲのシグナル配列を別のポリペプチドのシグナル配列に置換することにより、ポリペプチドの発現レベル、分泌、溶解性または他の特性を変化させることができる。ＬＳＲシグナルペプチド配列の置換に使用されるシグナルペプチド配列は、当技術分野で公知のものであってよい。
【０１９８】
ＬＳＲ　ＥＣＤは、ＬＳＲ　ＥＣＤポリペプチドをコードする核酸配列のいずれかをも指してもよく、配列番号１２、１４、４７、４８、４９、および５０のいずれかに示されるＬＳＲ　ＥＣＤポリペプチドをそれぞれコードする配列番号４０、４１、１３２、４４、１５５、および１８８に示される核酸配列、またはこれらのフラグメントもしくは変性変異体（ｄｅｇｅｎｅｒａｔｉｖｅ　ｖａｒｉａｎｔ）を指してもよい。
【０１９９】
ＬＳＲ　ＥＣＤは、オルソロガスなＥＣＤポリペプチドを指してもよい。ＬＳＲ　ＥＣＤは、配列番号２１に示されるマウスＬＳＲ　ＥＣＤポリペプチド、および／または配列番号２６に示されるマウスＬＳＲ　ＥＣＤ－ＩｇＧ２ａ－Ｆｃ融合ポリペプチドを指してもよい。
【０２００】
ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲポリペプチドの変異体
本発明は、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチド、および／またはＬＳＲポリペプチドの有用な変異体を包含し、このような変異体には、本明細書において後述されるアッセイのいずれかで示されるように、生物学的活性を増強させるもの、またはこれらのタンパク質の半減期の延長または安定性の増加をもたらすものが包含される。可溶性ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、可溶性ＶＳＩＧ１０タンパク質、可溶性ＴＭＥＭ２５タンパク質および／もしくは可溶性ＬＳＲタンパク質、これらのフラグメント、またはＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／もしくはＬＳＲタンパク質の活性を有する融合物は、生物学的活性が増強されるように改変することができる。さらなる実施形態では、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／もしくはＬＳＲタンパク質またはこれらの融合タンパク質は、少なくとも１つのアミノ酸の置換、欠失または挿入による修飾を行うことにより、これらの分子と免疫細胞（たとえばＴ細胞）との結合が増強され、抑制性シグナルがＴ細胞へと伝達される。他の変異体は、他の免疫細胞と比較して１つのタイプのＴ細胞に選択的に結合するように改変されたＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質であってもよい。たとえば、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／またはＬＳＲポリペプチドは、Ｔｒｅｇ細胞、Ｔｈ０細胞、Ｔｈ１細胞、Ｔｈ１７細胞、Ｔｈ２細胞またはＴｈ２２細胞と結合するように改変するこ

とができる。選択的結合とは、別のタイプの細胞と比較して、１つのタイプの細胞に対する結合性が少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、またはそれ以上に高いことを指す。さらなる他の変異体として、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質を改変して、免疫細胞との結合性を野性型のＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質よりも弱くすることもできる。このような変異体は、より強力な結合特性を有している変異体と組み合わせて使用して、免疫応答を調節し、適度な効果をもたらすことができる。

【０２０１】

さらに必要に応じて、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質の変異体は、野性型よりも長い半減期を有するように改変することができる。通常、これらの変異体は酵素による分解に耐えられるように修飾が施される。このような修飾の典型的な例としては、酵素による分解に耐えられるように修飾されたアミノ酸残基およびペプチド結合が挙げられる。このような修飾を達成する様々な修飾方法が当技術分野において知られている。

【０２０２】

ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（配列番号１）はさらに、表Ｅに示される以下の非サイレントＳＮＰ（一塩基多型）を有し（アミノ酸配列におけるこれらの位置および別のアミノ酸を表に示す）、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（配列番号１）配列にＳＮＰが存在することは、本発明のこのタンパク質に別の配列が存在することを裏付けている。配列番号５８は、このような別の配列の一例であり、別のアミノ酸を有し、以下のＳＮＰの一部分が使用されている。

【０２０３】

【表６】

表Ｅ-アミノ酸変異

アミノ酸配列における SNP の位置	別のアミノ酸
34	P → Q
39	P → S
107	A → T
167	R → K

【０２０４】

ＬＳＲタンパク質（配列番号１１）はさらに、表Ｆに示される以下の非サイレントＳＮＰ（一塩基多型）を有し（アミノ酸配列におけるこれらの位置および別のアミノ酸を表に示す）、ＬＳＲタンパク質（配列番号１１）配列にＳＮＰが存在することは、本発明のこのタンパク質に別の配列が存在することを裏付けている。配列番号１４３は、このような別の配列の一例であり、別のアミノ酸を有し、以下のＳＮＰの一部分が使用されている。

【０２０５】

【表７】

表Ｆ-アミノ酸変異

アミノ酸配列における SNP の位置	別のアミノ酸
209	I → M
211	D → G
260	L → R
315	S → N
382	A → G
591	N → D

【０２０６】

ＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３）はさらに、表Ｇに示される以下の非サイレントＳＮＰ（一塩基多型）を有し（アミノ酸配列におけるこれらの位置および別のアミノ酸を表に示す）、ＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号３）配列にＳＮＰが存在することは、本発明のこのタンパク質に別の配列が存在することを裏付けている。

【０２０７】

【表８】

表Ｇ-アミノ酸変異

アミノ酸配列における SNP の位置	別のアミノ酸
333	V → M
435	H → Y

【０２０８】

ＴＭＥＭ２５タンパク質（配列番号７）はさらに、表Ｈに示される以下の非サイレントＳＮＰ（一塩基多型）を有し（アミノ酸配列におけるこれらの位置および別のアミノ酸を表に示す）、ＴＭＥＭ２５タンパク質（配列番号１）配列にＳＮＰが存在することは、本発明のこのタンパク質に別の配列が存在することを裏付けている。

【０２０９】

【表９】

表Ｈ-アミノ酸変異

アミノ酸配列における SNP の位置	別のアミノ酸
25	W → C
342	Q → R

【０２１０】

本発明の様々な態様を以下のサブセクションにおいてさらに詳細に説明する。

【０２１１】

核酸

本明細書において、「核酸フラグメント」、「オリゴヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」という用語は区別なく使用され、核酸残基のポリマーを指す。本発明のポリヌクレオチド配列は、ＲＮＡ配列の形態で単離および提供される一本鎖または二本鎖核酸配列、相補的なポリヌクレオチド配列（ｃＤＮＡ）、ゲノムポリヌクレオチド配列、および／または複合ポリヌクレオチド配列（たとえば上記ポリヌクレオチドの組み合わせ）を指す。

【０２１２】
したがって、本発明は、上述した核酸配列；これらのフラグメント；これらとハイブリダイズ可能な配列；これらと相同性を有する配列［たとえば、本明細書に記載の核酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％または９９％以上の同一性を有する配列］；コドン使用頻度が異なるが類似したポリペプチドをコードする配列；ランダムにもしくは標的を定めた方法で、自然発生的もしくは人為的に誘導された１つ以上のヌクレオチドの欠失、挿入または置換などの変異によって改変された配列を包含する。本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチドに特有の配列領域を含む、相同な核酸配列（すなわち、本発明のポリヌクレオチド配列の一部分を構成する配列）を包含する。
【０２１３】
したがって、本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドを包含する。本発明はさらにこれらのポリペプチドのホモログを包含し、このようなホモログは、後述するアミノ酸配列と少なくとも９０％、少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％または９９％以上の相同性を有していてもよく、このような相同性は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｏｆ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）のＢｌａｓｔＰソフトウェアを初期パラメータで使用して決定することができる。上述したように、本発明の生体分子配列は、組織マーカーまたは疾患マーカーとして、および疾患を治療または予防するための薬剤候補または薬剤標的として効果的に利用することができる。
【０２１４】
本明細書により提供される配列のいずれかに関連した本発明の方法を実施するために設計された（上述したように設計された）オリゴヌクレオチドは、酵素的合成または固相合成などの当技術分野で知られている任意のオリゴヌクレオチド合成法によって作成することができる。本発明のこの態様にしたがって使用されるオリゴヌクレオチドは、約１０～約２００塩基の範囲から選択される長さを有するものであり、好ましくは約１５～約１５０塩基、より好ましくは約２０～約１００塩基、最も好ましくは約２０～約５０塩基の長さを有するものである。
【０２１５】
本発明のオリゴヌクレオチドは、３’－５’ホスホジエステル結合より結合されたプリン塩基およびピリミジン塩基からなるヘテロ環式ヌクレオシドを含んでいてもよい。
【０２１６】
以下に概説するように、骨格、ヌクレオシド間結合または塩基のいずれかにおいて修飾されているオリゴヌクレオチドが好ましい。このような修飾によって、オリゴヌクレオチドの吸収が促進され、かつ細胞内環境に対する抵抗性が高められることが多い。
【０２１７】
本発明のこの態様によれば、有用かつ好ましいオリゴヌクレオチドとして、具体的には、修飾骨格または非天然のヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドが挙げられる。修飾主鎖を有するオリゴヌクレオチドとして、骨格中にリン原子を保持するものが挙げられ、このような骨格は米国特許第４，４６９，８６３号；第４，４７６，３０１号；第５，０２３，２４３号；第５，１７７，１９６号；第５，１８８，８９７号；第５，２６４，４２３号；第５，２７６，０１９号；第５，２７８，３０２号；第５，２８６，７１７号；第５，３２１，１３１号；第５，３９９，６７６号；第５，４０５，９３９号；第５，４５３，４９６号；第５，４５５，２３３号；第５，４６６，６７７号；第５，４７６，９２５号；第５，５１９，１２６号；第５，５３６，８２１号；第５，５４１，３０６号；第５，５５０，１１１号；第５，５６３，２５３号；第５，５７１，７９９号；第５，５８７，３６１号；および第５，６２５，０５０号に開示されている。
【０２１８】
好ましい修飾オリゴヌクレオチド骨格としては、たとえば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、３’－アルキレンホスホナートおよびキラルホスホナートを含むメチ

ルホスホナートおよび他のアルキルホスホナート、ホスフィナート、３’－アミノホスホロアミダートおよびアミノアルキルホスホロアミダートを含むホスホロアミダート、チオノホスホロアミダート、チオノアルキルホスホナート、チオノアルキルホスホトリエステル、通常３’－５’結合を有するボラノホスファート、これらの２’－５’結合アナログ、ヌクレオシド単位の隣接した対が３’－５’と５’－３’または２’－５’と５’－２’とで結合している逆の極性を有するものが挙げられる。各種の塩、混合塩および遊離酸形態も使用することができる。

【０２１９】

あるいは、リン原子を含まない修飾オリゴヌクレオチド骨格は、短鎖アルキルヌクレオシドまたは短鎖シクロアルキルヌクレオシド間の結合、異種ヘテロ原子を有するアルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間の結合、または短鎖ヘテロ原子ヌクレオシドまたは短鎖ヘテロ環式ヌクレオシド間の１以上の結合によって形成された骨格を有する。上記の骨格として、さらに、（その一部分がヌクレオシドの糖部分から形成された）モノホリノ結合を有する骨格；シロキサン骨格；スルフィド骨格、スルホキシド骨格、およびスルホンの骨格；ホルムアセチル骨格およびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチル骨格およびメチレンチオホルムアセチル骨格；アルケンを含む骨格；スルファマート骨格；メチレンイミノ骨格およびメチレンヒドラジノ骨格；スルホナート骨格およびスルホンアミド骨格；アミド骨格；ならびに、構成要素であるＮ、Ｏ、ＳおよびＣＨ$_2$が混在している他の骨格が挙げられ、このような骨格は、米国特許第５，０３４，５０６号；第５，１６６，３１５号；第５，１８５，４４４号；第５，２１４，１３４号；第５，２１６，１４１号；第５，２３５，０３３号；第５，２６４，５６２号；第５，２６４，５６４号；第５，４０５，９３８号；第５，４３４，２５７号；第５，４６６，６７７号；第５，４７０，９６７号；第５，４８９，６７７号；第５，５４１，３０７号；第５，５６１，２２５号；第５，５９６，０８６号；第５，６０２，２４０号；第５，６１０，２８９号；第５，６０２，２４０号；第５，６０８，０４６号；第５，６１０，２８９号；第５，６１８，７０４号；第５，６２３，０７０号；第５，６６３，３１２号；第５，６３３，３６０号；第５，６７７，４３７号；および第５，６７７，４３９号に開示されている。

【０２２０】

本発明に従って使用することができる他のオリゴヌクレオチドは、糖およびヌクレオシド間結合の両方が修飾されたもの、すなわち、ヌクレオチド単位の骨格が新たな基で置換されたものである。塩基単位は、適切なポリヌクレオチド標的との相補性のために保持されている。このようなオリゴヌクレオチドミメティックの一例として、ペプチド核酸（ＰＮＡ）が挙げられる。ＰＮＡオリゴヌクレオチドとは、糖骨格がアミド含有骨格と置換されたオリゴヌクレオチドを指し、具体的には、アミノエチルグリシン骨格が挙げられる。塩基は保持され、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的または間接的に結合されている。ＰＮＡ化合物の調製を教示する米国特許文献として、米国特許第５，５３９，０８２号；第５，７１４，３３１号；および第５，７１９，２６２号が挙げられるが、これらに限定されず、これらは参照により本明細書に組み込まれる。本発明において使用することができる他の骨格修飾は、米国特許第６，３０３，３７４号に開示されている。

【０２２１】

本発明のオリゴヌクレオチドはさらに塩基の修飾または置換を含んでいてもよい。本明細書において「非修飾」または「天然の」塩基は、プリン塩基であるアデニン（Ａ）およびグアニン（Ｇ）、ならびにピリミジン塩基であるチミン（Ｔ）、シトシン（Ｃ）およびウラシル（Ｕ）を含む。修飾塩基としては、他の合成塩基および天然塩基、たとえば、５－メチルシトシン（５－ｍｅ－Ｃ）；５－ヒドロキシメチルシトシン；キサンチン；ヒポキサンチン；２－アミノアデニン；６－メチルアデニンおよびアデニンの他のアルキル誘導体とグアニン；２－プロピルアデニンおよびアデニンの他のアルキル誘導体とグアニン；２－チオウラシル；２－チオチミンと２－チオシトシン；５－ハロウラシルとシトシン；５－プロピニルウラシルとシトシン；６－アゾウラシル；シトシンとチミン；５－ウラシル（シュードウラシル）；４－チオウラシル；８－ハロアデニン、８－アミノアデニン

、８－チオールアデニン、８－チオアルキルアデニン、８－ヒドロキシルアデニンおよび他の８位置換アデニンとグアニン；５－ハロウラシル、特に５－ブロモウラシル、５－トリフルオロメチルウラシルおよび他の５位置換ウラシルとシトシン；７－メチルグアニンと７－メチルアデニン；８－アザグアニンと８－アザアデニン；７－デアザグアニンと７－デアザアデニン；ならびに３－デアザグアニンと３－デアザアデニンが挙げられるが、これらに限定されない。このような塩基としては、さらに、米国特許第３，６８７，８０８号に開示されているもの、The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990に開示されているもの、Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613に開示されているもの、およびSanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993に開示されているものが挙げられる。このような塩基は、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるオリゴマー化合物の結合親和性を高めるのに特に有用である。さらに、このような塩基として、５位置換ピリミジン、６－アザピリミジン、およびN^2位置換プリン、N^6置換プリンおよびO^6位置換プリンが挙げられ、このようなものとして、２－アミノプロピルアデニン、５－プロピニルウラシル、および５－プロピニルシトシンが挙げられる。５－メチルシトシンによる置換は、核酸二本鎖の安定性を０．６～１．２℃高めることが示されており、［Sanghvi YS et al. (1993) Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton 276-278]現在、この塩基による置換が好ましいとされ、特に、２’－Ｏ－メトキシエチルによる糖修飾と組み合わせると、安定性をさらに増強することができる。

【０２２２】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによるオリゴヌクレオチドの別の修飾においては、オリゴヌクレオチドを１つ以上の成分または結合体に化学的に結合させることによって、オリゴヌクレオチドの活性、細胞内分布または細胞による吸収を増強する。このような成分として、米国特許第６，３０３，３７４号に開示されているように、コレステロール成分、コール酸、チオエテール（たとえばヘキシル－Ｓ－トリチルチオール）、チオコレステロール、脂肪族鎖（たとえばドデカンジオール残基またはウンデシル残基）、リン脂質（たとえばジ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロールまたはトリエチルアンモニウム１，２－ジ－Ｏ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロ－３－Ｈ－ホスホナート）、ポリアミン、ポリエチレングリコール鎖、アダマンタン酢酸、パルミチル成分、オクタデシルアミン、およびヘキシルアミノ－カルボニル－オキシコレステロール成分などの脂質成分が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２２３】

オリゴヌクレオチド分子のすべての位置を均一に修飾する必要はなく、また、単一の化合物またはオリゴヌクレオチド内の単一のヌクレオシドにおいて上記の修飾の２つ以上を組み合わせてもよい。

【０２２４】

ペプチド

本明細書において、「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は区別なく使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、天然のアミノ酸ポリマーだけでなく、１個以上のアミノ酸残基が、天然のアミノ酸の対応アミノ酸残基のアナログまたはミメティックであるアミノ酸ポリマーにも使用される。ポリペプチドは修飾することができ、たとえば糖鎖残基を付加して糖タンパク質を形成させることができる。「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、非糖タンパク質だけでなく、糖タンパク質をも包含する。

【０２２５】

ポリペプチド産物は、標準的な固相法の使用などにより生化学的に合成することができる。このような方法として、排除固相合成、部分的固相合成法、フラグメント縮合、古典的な溶液合成が挙げられる。これらの方法は、ペプチドが比較的短い（すなわち１０ｋＤ

ａ）場合、および／または組換え技術によってペプチドを製造できず（すなわち核酸配列によってコードされていない）他の化学技術が必要とされる場合に使用することが好ましい。

【０２２６】

固相ポリペプチド合成法は当技術分野においてよく知られており、John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, Solid Phase Peptide Syntheses (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984）に詳細に記載されている。

【０２２７】

合成されたポリペプチドは分取高速液体クロマトグラフィーにより精製することができ［Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and Co. N.Y.］、合成されたポリペプチドの組成はアミノ酸配列決定法により確認することができる。

【０２２８】

大量のポリペプチドが必要とされる場合、Bitter et al., (1987) Methods in Enzymol. 153:516-544, Studier et al. (1990) Methods in Enzymol. 185:60-89, Brisson et al. (1984) Nature 310:511-514, Takamatsu et al. (1987) EMBO J. 6:307-311, Coruzzi et al. (1984) EMBO J. 3:1671-1680 および Brogli et al., (1984) Science 224:838-843, Gurley et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565に記載されているような組換え技術を使用して作成することができる。

【０２２９】

本発明の教示に従って同定されたペプチドが、ペプチドミメティックだけでなく、分解産物、合成ペプチドまたは組換ペプチドであってもよいこと、ならびに、通常、該同定されたペプチドが、たとえば体内中のペプチドをより安定化させるような修飾、またはより多くのペプチドが細胞に移行可能となるような修飾を有していてもよい、ペプチドのアナログである合成ペプチド、ペプトイドおよびセミペプトイドであってもよいことは十分に理解されるであろう。このような修飾として、Ｎ末端修飾、Ｃ末端修飾、およびペプチド結合修飾が挙げられるが、これらに限定されず、このようなものとして、CH_2－ＮＨ、CH_2－Ｓ、CH_2－Ｓ＝Ｏ、Ｏ＝Ｃ－ＮＨ、CH_2－Ｏ、CH_2－CH_2、Ｓ＝Ｃ－ＮＨ、ＣＨ＝ＣＨまたはＣＦ＝ＣＨ、骨格修飾および残基修飾が挙げられるが、これらに限定されない。ペプチドミメティック化合物を調製する方法は当技術分野においてよく知られており、たとえば、Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992)（その全体が本明細書に記載されているかのように参照により本明細書に組み込まれる）において詳細に記載されている。これに関する詳細は以下でさらに説明する。

【０２３０】

ペプチド内のペプチド結合（－ＣＯ－ＮＨ－）は、たとえば、Ｎ－メチル化結合（－Ｎ（CH_3）－ＣＯ－）、エステル結合（－Ｃ（Ｒ）Ｈ－Ｃ－Ｏ－Ｏ－Ｃ（Ｒ）－Ｎ－）、ケトメチレン結合（－ＣＯ－CH_2－）、α－アザ結合（－ＮＨ－Ｎ（Ｒ）－ＣＯ－）（式中、Ｒは任意のアルキル（たとえばメチル）を表す）、カルバ結合（－CH_2－ＮＨ－）、ヒドロキシエチレン結合（－ＣＨ（ＯＨ）－CH_2－）、チオアミド結合（－ＣＳ－ＮＨ－）、オレフィン二重結合（－ＣＨ＝ＣＨ－）、レトロアミド結合（－ＮＨ－ＣＯ－）、またはペプチド誘導体（－Ｎ（Ｒ）－CH_2－ＣＯ－）（式中、Ｒは自然界の炭素原子上に存在する「通常の」側鎖を表す）で置換されていてもよい。

【０２３１】

これらの修飾は、ペプチド鎖に沿った結合のいずれに施されてもよく、同時に数箇所（２～３箇所）に施されてもよい。

【０２３２】

天然の芳香族アミノ酸（Ｔｒｐ、ＴｙｒおよびＰｈｅ）は、フェニルグリシン、ＴＩＣ、ナフチルアラニン（Ｎｏｌ）、Ｐｈｅの環メチル化誘導体、Ｐｈｅのハロゲン化誘導体、またはｏ－メチル－Ｔｙｒなどの合成非天然酸で置換されていてもよい。

【０２３３】
上記のものに加えて、本発明のペプチドはさらに、１以上の修飾アミノ酸または１以上の非アミノ酸モノマー（たとえば脂肪酸、複合糖質など）を包含してもよい。
【０２３４】
本明細書および請求項において、「アミノ酸」は、２０種の天然アミノ酸；インビボにおいて翻訳後に修飾されることの多いアミノ酸（たとえば、ヒドロキシプロリン、ホスホセリンおよびホスホトレオニンが挙げられる）；ならびに他の異常アミノ酸（２－アミノアジピン酸、ヒドロキシリシン、イソデスモシン、ノルバリン、ノルロイシンおよびオルニチンが挙げられるが、これらに限定されない）を包含すると理解される。さらに、「アミノ酸」はＤ－アミノ酸およびＬ－アミノ酸の両方を包含する。
【０２３５】
本発明のペプチドは治療に利用されることが好ましいため、可溶形態であることが必要であり、したがって、本発明のペプチドは、１以上の非天然または天然の極性アミノ酸を含むことが好ましく、このようなアミノ酸として、ヒドロキシル含有側鎖を有することからペプチド溶解性を増加させることができるセリンおよびトレオニンが挙げられるが、これらに限定されない。
【０２３６】
発現系
本発明のポリヌクレオチドの細胞発現を可能にするため、本発明による核酸構築物を使用してもよく、この核酸構築物は、上記の核酸配列のうちの１つをコードするコード領域を少なくとも１つ含み、さらにシス作用調節エレメントを少なくとも１つ包む。本明細書において「シス作用調節エレメント」は、ポリヌクレオチド配列、好ましくはプロモーターを指し、これは、トランス作用調節因子と結合して、トランス作用調節因子の下流に位置するコード配列の転写を調節する。
【０２３７】
適切なプロモーター配列はいずれも本発明の核酸構築物に使用することができる。
【０２３８】
本発明の核酸構築物に利用されるプロモーターは、形質転換された特定の細胞集団において活性を有することが好ましい。細胞種特異的および／または組織特異的プロモーターとしては、肝臓特異的アルブミン［Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277］、リンパ組織特異的プロモーター［Calame et al., (1988) Adv. Immunol. 43:235-275］、具体的にはＴ細胞レセプターのプロモーター［Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733］、および免疫グロブリン［Banerji et al. (1983) Cell 33 729-740］などのプロモーター；ニューロフィラメントプロモーター［Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477］、膵臓特異的プロモーター［Edlunch et al. (1985) Science 230:912-916］などのニューロン特異的プロモーター；およびミルクホエイプロモーター（米国特許第４，８７３，３１６号および欧州特許出願公開第２６４，１６６号）などの乳腺特異的プロモーターが挙げられる。本発明の核酸構築物はエンハンサーをさらに含んでもよく、このエンハンサーはプロモーター配列に隣接していてもプロモーター配列から離れていてもよく、プロモーター配列からの転写をアップレギュレートする機能を発揮することができる。
【０２３９】
本発明の核酸構築物は、適切な選択可能マーカーおよび／または複製開始点をさらに含むことが好ましい。使用される核酸構築物は、大腸菌中での増殖が可能であり（構築物が適切な選択可能マーカーおよび複製開始点を含む）、かつ、細胞中での増殖または選択した遺伝子および組織への組み込みが可能なシャトルベクターであることが好ましい。本発明による構築物は、たとえば、プラスミド、バクミド、ファージミド、コスミド、ファージ、ウイルス、または人工染色体であってもよい。
【０２４０】
適切な構築物としては、ｐｃＤＮＡ３、ｐｃＤＮＡ３．１（＋／－）、ｐＧＬ３、Ｐｚ

ｅｏＳＶ２（＋／－）、ｐＤｉｓｐｌａｙ、ｐＥＦ／ｍｙｃ／ｃｙｔｏ、およびｐＣＭＶ／ｍｙｃ／ｃｙｔｏが挙げられるが、これらに限定されず、これらはそれぞれインビトロジェン社（www.invitrogen.com）から入手可能である。レトロウイルスベクターおよびパッケージングシステムとしては、クロンテック社（カリフォルニア州、サンディエゴ）より市販されているものが挙げられ、これにはＲｅｔｒｏ－Ｘベクター（ｐＬＮＣＸおよびｐＬＸＳＮ）が含まれており、複数のクローニングサイトへのクローニングが可能であり、導入遺伝子がＣＭＶプロモーターから転写される。また、導入遺伝子が５’ＬＴＲプロモーターから転写されるｐＢａｂｅなどのＭｏ－ＭｕＬＶ由来ベクターも挙げられる。

【０２４１】

現在好ましいインビボ核酸移入技術としては、アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス１型またはアデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）および脂質ベースのシステムなどのウイルス構築物または非ウイルス構築物を用いたトランスフェクションが挙げられる。遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、たとえば、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＰＥおよびＤＣ－Ｃｈｏｌ［Tonkinson et al., Cancer Investigation, 14(1): 54-65 (1996)］である。遺伝子治療に使用するのに最も好ましい構築物はウイルスであり、アデノウイルス、ＡＡＶ、レンチウイルスまたはレトロウイルスが最も好ましい。レトロウイルス構築物などのウイルス構築物は、転写プロモーター／エンハンサーもしくは座位決定エレメント、または選択的スプライシング、核ＲＮＡ輸出、メッセンジャーの翻訳後修飾などの他の手段によって遺伝子発現を制御する他の成分を少なくとも１つ含む。このようなベクター構築物は、パッケージングシグナル、長い末端反復配列（ＬＴＲ）もしくはこの一部分、ならびに使用するウイルスに適したプラス鎖およびマイナス鎖プライマー結合部位を（これらがウイルス構築物中に既に含まれていない場合）さらに含む。さらに、このような構築物は、通常、これらが導入されている宿主細胞からペプチドを分泌させるためのシグナル配列を含む。この目的のためのシグナル配列は、哺乳動物のシグナル配列または本発明のポリペプチドのシグナル配列であることが好ましい。必要に応じて、構築物は、ポリアデニル化をもたらすシグナル、１つ以上の制限部位、および翻訳終止配列を含んでいてもよい。一例として、このような構築物は、通常、５’ＬＴＲ、ｔＲＮＡ結合部位、パッケージングシグナル、第２鎖ＤＮＡ合成の起点、および３’ＬＴＲもしくはその一部分を含むであろう。使用可能な他のベクターは、陽イオン性脂質、ポリリシンおよびデンドリマーなどの非ウイルス性のものである。

【０２４２】

組換え発現ベクターおよび宿主細胞

本発明の別の態様は、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質をコードする核酸を含むベクター、好ましくは発現ベクター、またはその誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに関する。本明細書において「ベクター」は、自体に連結された別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。ベクターの種類は、プラスミドおよびウイルスベクターである。特定のベクターは自体が導入された宿主細胞において自律複製できる（たとえば、細菌由来の複製能を有する細菌性ベクター、および哺乳動物由来のエピソームベクター）。他のベクター（たとえば哺乳動物由来の非エピソームベクター）は、宿主細胞に導入されると宿主細胞のゲノムに組み込まれるため、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、自体が機能可能に連結された遺伝子の発現を制御することができる。このようなベクターは本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。本発明は、このような形態の発現ベクター（たとえば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルスなどのプラスミド、ウイルスベクターなど）を包含することを意図されたものであり、このようなベクターも同等の機能を有する。

【０２４３】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組換え発現ベクターは、宿主細胞における発現に適した形態の、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる核酸を含む。このことは、該組換え発現ベクターが、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択された調節配列を１つ以上含み、この調節配列が、発現される核酸配列に機能可能に連結されている

ことを意味する。組換え発現ベクター内において「自体の機能が発揮できるように連結された」は、（たとえば、インビトロ転写／翻訳システム、またはベクターが導入された宿主細胞において）ヌクレオチド配列が発現可能となるように、目的のヌクレオチド配列が調節配列に連結されていることを意味すると意図される。

【０２４４】

「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現調節エレメント（たとえばポリアデニル化シグナル）を包含すると意図される。このような調節配列は、たとえば、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載されている。調節配列には、数多くの種類の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的活性化を制御するもの、および特定の宿主細胞のみにおいてヌクレオチド配列の発現を制御するもの（たとえば組織特異的調節配列）が包含される。発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質発現レベルなどの因子によって左右されうることは当業者によって十分に理解されるであろう。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる発現ベクターを、宿主細胞に導入することによって、本明細書に記載の核酸にコードされているタンパク質またはペプチド（融合タンパク質またはペプチドを包含する）を作製することができる。

【０２４５】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組換え発現ベクターは、原核細胞または真核細胞においてタンパク質異性体が産生されるように設計することができる。たとえば、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質は、大腸菌などの細菌細胞、（バキュロウイルス発現ベクターを使用して）昆虫細胞、酵母菌細胞または哺乳動物細胞において発現させることができる。適切な宿主細胞は、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)においてさらに詳細に説明されている。あるいは、組換え発現ベクターは、たとえばＴ７プロモーター調節配列およびＴ７ポリメラーゼを使用するなどして、インビトロにおいて転写および翻訳することもできる。

【０２４６】

原核細胞におけるタンパク質の発現は、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を制御する構成的プロモーターまたは誘導的プロモーターを含むベクターを用いて大腸菌において実施されることが最も多い。融合ベクターは、自体にコードされたタンパク質（組換えタンパク質のアミノ末端またはＣ末端）に数多くのアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、通常、以下の３つの目的で使用される。

（ｉ）組換えタンパク質の発現を増加させる。

（ii）組換えタンパク質の溶解性を増加させる。

（iii）アフィニティー精製におけるリガンドとして作用することにより組換えタンパク質の精製を補助する。

融合発現ベクターにおいては、タンパク質の分解を生じる切断部位が融合部分と組換えタンパク質との接合部に導入されることによって、融合部分からの組換えタンパク質の分離およびそれに続く融合タンパク質の精製が可能となることが多い。このような酵素およびそれらに対応する認識配列としては、Ｆａｃｔｏｒ　Ｘａ、トロンビン、ＰｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ、ＴＥＶおよびエンテロキナーゼが挙げられる。典型的な融合発現ベクターとしては、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、マルトースＥ結合タンパク質、またはプロテインＡを標的組換えタンパク質に融合させる、ｐＧＥＸ（ファルマシア・バイオテク社；Smith and Johnson, 1988. Gene 67: 31-40）、ｐＭＡＬ（ニュー・イングランド・バイオラボ（マサチューセッツ州ベヴァリー））、およびｐＲＩＴ５（ファルマシア社（ニュージャージー州ピスカタウェイ））が挙げられる。

【０２４７】

別の実施形態では、本発明のタンパク質をコードする発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母であるサッカロミセス・セレビシエにおいて発現させるためのベクターとしては、ｐＹｅｐＳｅｃ１（Baldari, et al., 1987. EMBO J. 6: 229-234）、ｐＭＦａ（K

urjan and Herskowitz, 1982. Cell 30: 933-943）、ｐＪＲＹ８８（Schultz et al., 1987. Gene 54: 113-123）、ｐＹＥＳ２（インビトロジェン社（カリフォルニア州サンディエゴ））、およびｐｉｃＺ（インビトロジェン社（カリフォルニア州サンディエゴ））が挙げられる。

【０２４８】

あるいは、本発明のポリペプチドは、バキュロウイルス発現ベクターを用い昆虫細胞において産生させることができる。培養昆虫細胞（たとえばＳＦ９細胞）におけるタンパク質の発現に利用できるバキュロウイルスベクターとしては、ｐＡｃシリーズ（Smith, et al., 1983. Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165）およびｐＶＬシリーズ（Lucklow and Summers, 1989. Virology 170: 31-39）が挙げられる。

【０２４９】

さらに別の実施形態では、本発明の核酸は哺乳動物発現ベクターを用い哺乳動物細胞において発現される。哺乳動物発現ベクターとしては、ｐＣＤＭ８（Seed, 1987. Nature 329: 840）、ｐＭＴ２ＰＣ（Kaufman, et al., 1987. EMBO J. 6: 187-195）、ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ（クロンテック）、ｐＵＢ６（インビトロジェン）、ｐＣＥＰ４（インビトロジェン）ｐＲＥＰ４（インビトロジェン）、およびｐｃＤＮＡ３（インビトロジェン）が挙げられる。哺乳動物細胞において使用される場合、発現ベクターの制御機能はウイルスの調節エレメントにより提供されることが多い。たとえば、一般的に使用されるプロモーターは、ポリオーマウイルス、アデノウイルス２型、サイトメガロウイルス、ラウス肉腫ウイルス、またはシミアンウイルス４０に由来する。原核細胞および真核細胞の両方に適した他の発現系については、たとえば、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989の１６章および１７章を参照されたい。

【０２５０】

別の実施形態では、組換えの哺乳動物発現ベクターは、選択的に特定の細胞種において核酸の発現を制御することができる（たとえば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現する）。組織特異的調節エレメントは当技術分野において知られている。適切な組織特異的プロモーターとしては、アルブミンプロモーター（肝臓特異的； Pinkert, et al., 1987. Genes Dev. 1: 268-277）；リンパ組織特異的プロモーター（Calame and Eaton, 1988. Adv. Immunol. 43: 235-275）、具体的にはＴ細胞レセプターのプロモーター（Winoto and Baltimore, 1989. EMBO J. 8: 729-733）；免疫グロブリン（Banerji, et al., 1983. Cell 33: 729 740; Queen and Baltimore, 1983. Cell 33: 741-748）；ニューロン特異的プロモーター（たとえばニューロフィラメントプロモーター； Byrne and Ruddle, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477）；膵臓特異的プロモーター（Edlund, et al., 1985. Science 230: 912-916）；および乳腺特異的プロモーター（たとえばミルクホエイプロモーター；米国特許第４，８７３，３１６号および欧州特許出願公開第２６４，１６６号）が挙げられるが、これらに限定されない。発達段階に応じて調節されるプロモーターには、たとえば、マウスｈｏｘプロモーター（Kessel and Gruss, 1990. Science 249: 374-379）およびα－フェトプロテインプロモーター（Campes and Tilghman, 1989. Genes Dev. 3: 537-546）も包含される。

【０２５１】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明はさらに、アンチセンス方向にクローニングされた本発明の実施形態の少なくともいくつかによるＤＮＡ分子を含む組換え発現ベクターを提供する。すなわち、このＤＮＡ分子は調節配列に機能可能に連結されており、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質をコードするｍＲＮＡに対してアンチセンスであるＲＮＡ分子が（該ＤＮＡ分子の転写により）発現可能となる。アンチセンス方向にクローニングされた核酸に機能可能に連結された調節配列として、様々な細胞種において該アンチセンスＲＮＡ分子の連続発現を制御するもの（たとえば、ウイルスのプロモーターおよび／またはエンハンサー）を選択することができ、または、アンチセンスＲＮＡの構成的な組織特異的または細胞種特異的発現を制御する調節配列を選択す

ることができる。アンチセンス発現ベクターは、高効率調節領域の制御下でアンチセンス核酸を作製する組換えプラスミド、ファージミドまたは弱毒化ウイルスの形態とすることができ、その活性は該ベクターが導入される細胞種によって決定することができる。アンチセンス遺伝子を使用した遺伝子発現調節に関する論考については、たとえば、Weintraub, et al.,“Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis,” Reviews Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986を参照されたい。

【０２５２】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。本明細書において、「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」という用語は区別なく使用される。この用語は、特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の子孫または将来的に生じる子孫をも指すと理解される。変異または外界の影響のいずれかにより特定の変化が後の世代に起こる可能性があり、実際にこのような子孫は親細胞と同一ではないが、本明細書におけるこれらの用語の範囲内に含まれる。

【０２５３】

宿主細胞は原核細胞または真核細胞であればどのようなものでもよい。たとえば、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質は、大腸菌などの細菌細胞、昆虫細胞、酵母細胞、植物細胞、または哺乳動物細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）、ＣＯＳ細胞、２９３細胞など）において産生させることができる。他の適切な宿主細胞は当業者に知られている。

【０２５４】

ベクターＤＮＡは、慣用の形質転換技術またはトランスフェクション技術によって原核細胞または真核細胞に導入することができる。本明細書において「形質転換」および「トランスフェクション」は、外来性核酸（たとえばＤＮＡ）を宿主細胞に導入するための、当技術分野で公知の様々な技術技術を指すと意図され、このような技術として、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、およびエレクトロポレーションが挙げられる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするのに適した方法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989）および他の実験マニュアルに記載されている。

【０２５５】

哺乳動物細胞の安定したトランスフェクションについては、使用する発現ベクターおよびトランスフェクション技術によっては、細胞のごく一部のみしか外来性ＤＮＡをゲノムに組み込まない可能性があることが知られている。外来性ＤＮＡが組み込まれた細胞を同定および選択するため、通常、選択可能なマーカー（たとえば抗生物質耐性）をコードする遺伝子を目的遺伝子とともに宿主細胞に導入する。様々な選択マーカーとして、Ｇ４１８、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ブラストサイジンおよびメトトレキサートなどの薬剤に対する耐性を付与するものが挙げられる。選択可能なマーカーをコードする核酸は、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質をコードするベクターに乗せて宿主細胞に導入することができ、または、別のベクターに乗せて導入することもできる。導入された核酸により安定にトランスフェクトされた細胞は、薬剤選択によって同定することができる（たとえば、選択可能なマーカー遺伝子が組み込まれた細胞は生存し、組み込まれなかった細胞は死滅するであろう）。

【０２５６】

培養物中の原核宿主細胞または真核宿主細胞のなどの、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる宿主細胞は、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質を産生させる（すなわち発現させる）ために使用することができる。したがって、本発明はさらに、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる宿主細胞を使用して、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質を作製する方法を提供する。一実施形態で

は、この方法は、適切な培地中において（本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質をコードする組換え発現ベクターが導入された）本発明の宿主細胞を培養し、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質を産生させることを含む。別の実施形態では、この方法はさらに、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質を培地または宿主細胞から単離することを含む。

【０２５７】

タンパク質を効率的に作製するためには、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質をコードするヌクレオチド配列を、所望の宿主における発現のために最適化された発現制御配列の制御下に置くことが好ましい。たとえば、発現制御配列は、最適化された転写調節配列および／または翻訳調節配列（改変されたコザック配列など）を含んでいてもよい。

【０２５８】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質は、天然のポリペプチドとして単離されてもよく、天然物、合成物、半合成物、組換え物などの任意のペプチド源から単離されてもよいことに注目すべきである。したがって、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質は任意の生物種、特に哺乳動物から天然のタンパク質として単離されてもよく、哺乳動物としては、ウシ、ヒツジ、ブタ、マウス、ウマ、好ましくはヒトが挙げられる。あるいは、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質は、原核宿主細胞または真核宿主細胞において発現された組換えポリペプチドとして単離されてもよく、化学的に合成されたポリペプチドとして単離されてもよい。

【０２５９】

当業者であれば、標準的な単離方法を使用して、単離されたＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質を容易に得ることができる。単離方法の特徴および単離の程度は、単離源および単離される分子の用途に左右されるであろう。

【０２６０】

トランスジェニック動物および植物

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明はさらに、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるポリペプチドを作製するために使用してもよい、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる核酸分子を１つ以上含むトランスジェニック非ヒト動物およびトランスジェニック植物を提供する。本発明のポリペプチドは、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、ラット、マウス、ウサギ、ハムスターまたは他の哺乳動物に由来する組織中、またはこれらの動物から得られる乳汁、血液または尿などの体液中に作製され、これらから回収することができる。たとえば、米国特許第５，８２７，６９０号、第５，７５６，６８７号、第５，７５０，１７２号、および第５，７４１，９５７号を参照されたい。

【０２６１】

非ヒトトランスジェニック動物およびトランスジェニック植物は、標準的なトランスジェニック技術によって動物または植物に本発明の実施形態の少なくともいくつかによる核酸分子を１つ以上導入することにより作製される。トランスジェニック動物を作製するのために使用されるトランスジェニック細胞は、胚性幹細胞、体細胞または受精卵細胞であってよい。非ヒトトランスジェニック生物は、キメラヘテロ接合体、非キメラヘテロ接合体、または非キメラホモ接合体であってもよい。たとえば、Hogan et al. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual 2ed. Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson et al., Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach, Oxford University Press (2000);およびPinkert, Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press (1999)を参照されたい。

【０２６２】

遺伝子治療

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、可溶性ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、可溶性ＶＳＩＧ１０タンパク質、可溶性ＴＭＥＭ２５および／または可溶性ＬＳＲタンパク質をコードする核酸配列は、感染性障害、免疫関連障害および／またはがんを治療するための遺伝子治療において使用することができる。

【０２６３】

本明細書において「遺伝子治療」は、核酸配列を細胞内に移入させ、次いでこの核酸によってコードされる任意の遺伝子産物を細胞において発現させる遺伝子操作によって疾患を治療する方法である。たとえば、当業者によく知られているように、核酸の移入は、エクスビボまたはインビトロにおいて、様々な方法を使用して目的の核酸を含む発現ベクターを細胞に挿入することにより行われてもよく、これに用いられる方法として、たとえば、ジエチルアミノエチルデキストラン、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、エレクトロポレーション、直接注射、リポフェクション、およびウイルス感染（Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989); Kriegler M. Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (W. H. Freeman and Co, New York, N.Y., 1993)およびWu, Methods in Enzymology (Academic Press, New York, 1993)）が挙げられる。あるいは、インビボにおいて、たとえば、対象への核酸を直接投与する方法、および核酸を挿入したウイルスベクターを用いて対象に感染させる方法などの様々な方法および様々なベクターを使用することにより目的の核酸配列を細胞に移入してもよい。インビボにおける移入に使用される他の方法としては、リポソーム中に核酸を封入してリポソームを直接移入させる方法、赤血球凝集センダイウイルスと組み合わせたリポソームを対象に投与する方法が挙げられる。トランスフェクトされた細胞または感染細胞は、核酸によってコードされるタンパク質産物を発現することにより、疾患または疾患の症状を改善する。

【０２６４】

抗体および免疫システム応答

本明細書において「免疫」応答は、レシピエント患者の体内における、ペプチドに対する有益な（抗体によって媒介される）体液性応答および／または（抗原特異的Ｔ細胞またはこれらの分泌物によって媒介される）細胞性応答の発現を指す。このような応答は、免疫原の投与によって誘導された能動的応答、または抗体もしくは感作Ｔ細胞の投与によって誘導された受動的応答であってもよい。単一の仮説に限定されることを望むものではないが、細胞性免疫応答は、クラスＩまたはクラスII ＭＨＣ分子と関連したポリペプチドエピトープの提示によって惹起され、抗原特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔヘルパー細胞および／またはＣＤ８$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞を活性化する。この応答は、さらに、単球、マクロファージ、ＮＫ細胞、好塩基球、樹状細胞、星状細胞、小膠細胞、および好酸球の活性化、好中球の動員、または先天性免疫の他の構成要素の活性化を伴ってもよい。細胞媒介性免疫応答の存在は、増殖アッセイ（ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞）またはＣＴＬ（細胞傷害性リンパ球）アッセイによって決定することができる。体液性応答および細胞性応答が相対的にどの程度、免疫原に対する防御効果または治療効果に寄与しているのかは、免疫した同系の動物から抗体およびＴ細胞を別々に単離し、防御効果または治療効果を第２の対象において測定することにより識別することができる。

【０２６５】

「免疫原」は、（必要に応じてアジュバントとともに）哺乳動物に投与されることによって、自体に対する免疫応答を誘導することができる。

【０２６６】

「シグナル伝達経路」は、細胞のある部分から細胞の別の部分へのシグナル伝達において役割を果たす種々のシグナル伝達分子間の生化学的関係を指す。

【０２６７】

本明細書において「細胞表面レセプター」は、たとえば、シグナルを受け取り、受け取ったシグナルを細胞の形質膜を横切って伝達することができる分子およびそのような分子の複合体を包含する。

【０２６８】
本明細書において「抗体」は、ポリクローナル抗体の全体、モノクローナル抗体の全体、これらの任意の抗原結合フラグメント（すなわち「抗原結合部分」）もしくは一本鎖を包含する。また、「抗体」は、少なくとも２本の重鎖（Ｈ）と２本の軽鎖（Ｌ）とを含み、重鎖と軽鎖とがジスルフィド結合によって相互接続された糖タンパク質、またはその抗原結合部分を指す。それぞれの重鎖は、重鎖可変領域（本明細書においてV_Hと略す）と重鎖定常領域とで構成されている。重鎖定常領域は、C_H1、C_H2およびC_H3の３つのドメインで構成されている。それぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書においてV_Lと略す）と軽鎖定常領域とで構成されている。軽鎖定常領域は、C_Lと呼ばれる１つのドメインで構成されている。V_H領域およびV_L領域は、相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる超可変性領域と、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれるより保存性の高い領域とにさらに細分することができ、相補性決定領域（ＣＤＲ）はフレームワーク領域（ＦＲ）とともに散在している。V_HおよびV_Lはそれぞれ、３つのＣＤＲおよび４つのＦＲから構成されており、これらはアミノ末端からカルボキシ末端方向に、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４の順で配置されている。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（たとえばエフェクター細胞）および古典的補体系の第一成分（Ｃ１ｑ）を含む宿主の組織または因子と免疫グロブリンとの結合を媒介しうる。
【０２６９】
本明細書において抗体の「抗原結合部分」（または単に「抗体部分」）は、特異的に抗原（たとえば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ分子、ＶＳＩＧ１０分子、ＴＭＥＭ２５分子および／またはＬＳＲ分子、またはそれらのフラグメント）に結合する能力を保持する、抗体の１つ以上のフラグメントを指す。完全長抗体のフラグメントは、抗体の抗原結合機能を発揮することが示されている。抗体の「抗原結合部分」に包含される結合フラグメントとしては、
（ｉ）Ｆａｂフラグメント（軽鎖可変領域、重鎖可変領域、軽鎖定常領域（C_L）、およびC_H1ドメインからなる１価のフラグメント）；
（ii）Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント（ヒンジ領域のジスルフィド架橋によって連結されている２つのＦａｂフラグメントを含む二価のフラグメント）；
（iii）V_HドメインおよびC_H1のドメインからなるＦｄフラグメント；
（iv）抗体の単腕のV_LドメインおよびV_HドメインからなるＦｖフラグメント；
（ｖ）V_HドメインからなるｄＡｂフラグメント（Ward et al., (1989) Nature 341:544-546）；および
（vi）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）
が挙げられる。
さらに、上記Ｆｖフラグメントの２種のドメイン（V_LおよびV_H）は別の遺伝子によってコードされているが、組み換え法を用い、これらのドメインを単一のタンパク質鎖とすることが可能な合成リンカーでこれらのドメインを連結することができ、これによって、１組のV_L領域およびV_H領域から１価の分子が形成される（一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として知られている；たとえば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426; およびHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照されたい）。このような一本鎖抗体も、抗体の「抗原結合部分」に包含されると意図される。これらの抗体フラグメントは、当業者に公知の慣用の技術を使用して得られ、手を加えていない抗体と同様の方法でスクリーニングされ有用に用いられる。
【０２７０】
本明細書において「単離された抗体」は、様々な抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指すと意図される（たとえば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ以外の抗原と特異的に結合する抗体を実質的に含まない、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質もしくはＬＳＲタンパク質および／またはこれらのフラグメントと特異的に結合する単離された抗体）。しかしながら、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質また

はＬＳＲタンパク質と特異的に結合する単離された抗体は、他の生物種由来のＬＹ６Ｇ６Ｆ分子、ＶＳＩＧ１０分子、ＴＭＥＭ２５分子またはＬＳＲ分子などの他の抗原に対して交差反応性を有していてもよい。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質および／または化学物質を実質的に含まないものであってもよい。

【０２７１】

本明細書において「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、単一の分子組成物の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性および親和性を示す。

【０２７２】

本明細書において「ヒト抗体」は、フレームワーク領域およびＣＤＲ領域の両方がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を包含すると意図される。さらに、この抗体が定常領域を含んでいる場合、この定常領域もヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する。本発明の実施形態の少なくともいくつかによるヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（たとえば、インビトロにおけるランダム突然変異もしくは部位特異的突然変異、またはインビボにおける体細胞突然変異により導入された変異）を含んでいてもよい。しかしながら、本明細書において「ヒト抗体」は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系に由来するＣＤＲ配列がヒトのフレームワーク配列に移植された抗体を含むとは意図されない。

【０２７３】

「ヒトモノクローナル抗体」は、フレームワーク領域およびＣＤＲ領域の両方がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有し、かつ単一の結合特異性を示す抗体を指す。一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体はハイブリドーマから作製されるが、ハイブリドーマには、ヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する非ヒトトランスジェニック動物（たとえばトランスジェニックマウス）から得られたＢ細胞を不死化細胞に融合したものが包含される。

【０２７４】

本明細書において「組換えヒト抗体」は、組換え技術によって作製、発現、創出、単離されたあらゆるヒト抗体を包含し、該組換えヒト抗体としては、

（ａ）ヒト免疫グロブリン遺伝子が導入されたトランスジェニック動物（たとえばマウス）もしくはこの遺伝子を含む染色体が導入されたトランスクロモソミック動物（たとえばマウス）から単離された抗体、またはこの抗体を用いて作製されたハイブリドーマ（さらに詳しくは後述する）；

（ｂ）ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞（たとえばトランスフェクトーマ）から単離された抗体；

（ｃ）組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、および

（ｄ）ヒト免疫グロブリン遺伝子配列をスプライシングして別のＤＮＡ配列を作製することを伴う他の方法によって、作製、発現、構築、または単離された抗体

が挙げられる。

このような組換えヒト抗体は、フレームワーク領域およびＣＤＲ領域がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかしながら、特定の実施形態では、このような組換えヒト抗体は、インビトロ突然変異誘発（または、ヒトＩｇが配列に対してトランスジェニック動物を使用する場合はインビボ体細胞突然変異誘発）に供することができることから、組換え抗体のV_H領域およびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系のV_H配列およびV_L配列に由来しかつこれらのV_H配列およびV_L配列に関連しているものの、天然のインビボヒト抗体生殖細胞系レパートリー内には存在しない配列である可能性がある。

【０２７５】

本明細書において「アイソタイプ」は、重鎖定常域遺伝子によってコードされる抗体クラス（たとえばＩｇＭまたはＩｇＧ１）を指す。

【０２７６】

本明細書において、「抗原を認識する抗体」および「抗原に特異的な抗体」という用語は、「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と区別なく使用される。

【０２７７】

本明細書において「ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ヒトＶＳＩＧ１０タンパク質、ヒトＴＭＥＭ２５タンパク質またはヒトＬＳＲタンパク質に特異的に結合する」抗体は、たとえば５×１０$^{-8}$Ｍ、３×１０$^{-8}$Ｍ、１×１０$^{-9}$Ｍ、またはこれ以下のＫＤで、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質またはＬＳＲタンパク質に結合する抗体を指すと意図される。

【０２７８】

本明細書において「Ｋ－ａｓｓｏｃ」または「Ｋａ」は、特定の抗体－抗原相互作用の結合速度定数を指すと意図され、本明細書において「Ｋｄｉｓｓ」または「Ｋｄ」は、特定の抗体－抗原相互作用の解離速度定数を指すと意図される。本明細書において「ＫＤ」は、解離定数を指すと意図され、Ｋａに対するＫｄの比率（すなわちＫｄ／Ｋａ）で得られ、モル濃度（Ｍ）で表される。抗体のＫＤ値は、当技術分野において十分に確立された方法を使用して決定することができる。抗体のＫＤ値を決定するため方法としては、表面プラズモン共鳴を使用した方法が好ましく、Ｂｉａｃｏｒｅ（登録商標）システムなどのバイオセンサシステムを使用した方法が好ましい。

【０２７９】

本明細書において、ＩｇＧ抗体に対する「高親和性」は、標的抗原に対するＫＤが１０$^{-8}$Ｍ以下、より好ましくは１０$^{-9}$Ｍ以下、さらに好ましくは１０$^{-10}$Ｍ以下である抗体を指す。しかしながら、「高親和性」結合は他の抗体アイソタイプよって異なりうる。たとえば、ＩｇＭアイソタイプに対する「高親和性」結合は、ＫＤが１０$^{-7}$Ｍ以下、より好ましくは１０$^{-8}$Ｍ以下である抗体を指す。

【０２８０】

本明細書において「対象」または「患者」は、あらゆるヒトまたは非ヒト動物を包含する。「非ヒト動物」は、あらゆる脊椎動物（たとえば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの哺乳動物および非哺乳動物）を包含する。

【０２８１】

抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および抗ＬＳＲ抗体特定の生殖細胞系配列を有する抗体、相同抗体、保存的修飾を有する抗体、改変された抗体、および修飾された抗体を含む、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体は、特定の機能的特徴または特性を特徴とする。たとえば、これらの抗体は、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲに特異的に結合する。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体は、たとえば、ＫＤが１０$^{-8}$Ｍ以下、１０$^{-9}$Ｍ以下、さらには１０$^{-10}$Ｍ以下であるような高い親和性でそれぞれの抗体に対応するＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５、またはＬＳＲに結合することが好ましい。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および抗ＬＳＲ抗体は、以下の特徴の１以上を示すことが好ましい。

（ｉ）対応するヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５もしくはＬＳＲに５×１０$^{-8}$Ｍ以下のＫＤで結合する、

（ii）抗腫瘍免疫および自己免疫に関与するＴ細胞応答などの、Ｂ７免疫共刺激ならびにそれに関連する活性および機能を調節（増強または抑制）する、ならびに／または

（iii）たとえば、メラノーマ、肝臓がん、腎臓がん、脳がん、乳がん、結腸がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、胃がん、多発性骨髄腫、造血器がん（（ホジキンおよび非ホジキン）リンパ腫、急性および慢性リンパ芽球性白血病、ならびに急性および慢性骨髄白血病を含むが、これらに限定されない）を含むがん細胞によって発現されたＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原またはＬＳＲ抗原に結合するが、正常細胞には実質的には結合しない。さらに、これらの抗体およびその結合体は、このようながん細胞の選択的破壊の惹起、ならびに自己免疫およびがんに関与する免疫応答の調

節に効果的であることが好ましい。

【０２８２】

これらの抗体は、それぞれに対応するヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ヒトＶＳＩＧ１０抗原、ヒトＴＭＥＭ２５抗原またはヒトＬＳＲ抗原に、３×１０$^{-8}$Ｍ以下のＫＤ、１×１０$^{-9}$Ｍ以下のＫＤ、０．１×１０$^{-9}$Ｍ以下のＫＤ、０．０５×１０$^{-9}$Ｍ以下のＫＤ、または１×１０$^{-9}$～１×１０$^{-11}$ＭのＫＤで結合することがより好ましい。

【０２８３】

ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲに対する抗体の結合能力を評価するための標準的なアッセイは当技術分野において知られており、たとえば、ＥＬＩＳＡ、ウェスタンブロットおよびＲＩＡが挙げられる。適切なアッセイは実施例に詳細に記載されている。抗体の結合動態（たとえば結合親和性）も、当技術分野において公知の標準的なアッセイ（Ｂｉａｃｏｒｅ分析など）で評価することができる。

【０２８４】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲに結合可能な抗体から抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ配列、抗ＶＳＩＧ１０配列、抗ＴＭＥＭ２５配列および抗ＬＳＲ抗体配列を作製した後に、V_H配列とV_L配列とを「調和よく組み合わせ」て、別の抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ結合分子、抗ＶＳＩＧ１０結合分子、抗ＴＭＥＭ２５結合分子および抗ＬＳＲ結合分子を作製することができる。「調和よく組み合わせ」られた抗体のＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲに対する結合は、上述した結合アッセイ（たとえばＥＬＩＳＡ）を使用して試験することができる。V_H鎖とV_L鎖とを調和よく組み合わせる場合、特定のV_H／V_L対のV_H配列を構造的に類似したV_H配列と置き換えることが好ましい。同様に、特定のV_H／V_L対のV_L配列を構造的に類似したV_L配列と置き換えることが好ましい。たとえば、特に、相同抗体のV_H配列およびV_L配列は、調和よく組み合わせることが容易である。

【０２８５】

特定の生殖細胞系配列を有する抗体

特定の実施形態において、本発明の抗体は、特定の生殖細胞系重鎖免疫グロブリン遺伝子の重鎖可変領域および／または特定の生殖細胞系軽鎖免疫グロブリン遺伝子の軽鎖可変領域を含む。

【０２８６】

本明細書において、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子を使用した系から抗体の可変領域を得る場合、ヒト抗体は、特定の生殖細胞系配列の「産物」または「由来物」である重鎖可変領域または軽鎖可変領域を含む。このような系は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを目的抗原を用いて免疫化すること、または、ファージ上に提示させたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーを目的抗原を用いてスクリーニングすることを含む。ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列の「産物」または「由来物」であるヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖細胞系免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較し、次いで、該ヒト抗体の配列に最も類似した配列を有する（すなわち同一性（％）が最も高い）ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列を選択することによって同定される。

【０２８７】

特定のヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列の「産物」または「由来物」であるヒト抗体は、たとえば自然界において発生する体細胞突然変異または意図的に導入された部位特異的突然変異などによって、生殖細胞系配列とは異なるアミノ酸を含んでいてもよい。しかしながら、選択されたヒト抗体は、通常、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも９０％一致するアミノ酸配列を有し、かつ、他の生物種の生殖細胞系免疫グロブリンアミノ酸配列（たとえばマウスの生殖細胞系配列）と比較したときにヒトの抗体であると同定されるアミノ酸残基を含んでいる。特定の場合においては、ヒト抗体のアミノ酸配列は、生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列と少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％、または

少なくとも９６％、９７％、９８％もしくは９９％一致していてもよい。通常、特定のヒト生殖細胞系配列に由来するヒト抗体は、このヒト生殖細胞系の免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列とのアミノ酸の差異が１０個以下であろう。特定の場合においては、ヒト抗体は、生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列とのアミノ酸の差異が５個以下、または４個以下、３個以下、２個以下、もしくは１個以下であってもよい。

【０２８８】

相同抗体

さらに別の実施形態において、本発明の抗体は、好ましい抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体または抗ＬＳＲ抗体のそれぞれから単離された抗ＬＹ６Ｇ６Ｆアミノ酸配列、抗ＶＳＩＧ１０アミノ酸配列、抗ＴＭＥＭ２５アミノ酸配列または抗ＬＳＲアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、親抗体である抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体または抗ＬＳＲ抗体の所望の機能特性を保持している。

【０２８９】

本明細書において、２つのアミノ酸配列間の相同性（ｈｏｍｏｌｏｇｙ）（％）は、２つの配列間の同一性（ｉｄｅｎｔｉｔｙ）（％）に等しい。２つの配列間の同一性（％）は、これらの配列においてアミノ酸が一致しているの位置の数の関数であり（すなわち、相同性（％）＝同一の位置の数／位置の総数×１００）、２つの配列のアライメントを最適化するのために導入する必要のあるギャップの数および各ギャップの長さが考慮に入れられている。配列の比較および２つの配列間の同一性（％）の決定は、以下の例示（ただしこれらに限定されない）に記載されているような数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。

【０２９０】

２つのアミノ酸配列間の同一性（％）は、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれたＥ．ＭｅｙｅｒｓおよびＷ．Ｍｉｌｌｅｒ（Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)）によるアルゴリズムを利用し、ＰＡＭ１２０残基質量表を使用し、ギャップ長ペナルティ＝１２、ギャップペナルティ＝４として決定することができる。さらに、２つのアミノ酸配列間の同一性（％）は、ＧＣＧソフトウェアパッケージ（市販）のＧＡＰプログラムに組み込まれたＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ（J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)）によるアルゴリズムを利用し、Ｂｌｏｓｓｕｍ６２マトリックスまたはＰＡＭ２５０マトリックスのいずれかを使用し、ギャップ加重＝１６、１４、１２、１０、８、６、または４、ギャップ長加重＝１、２、３、４、５、または６として決定することができる。

【０２９１】

別法としてまたは上記に加えて、本発明のタンパク質配列は、たとえば関連配列を同定する目的などのために、公開データベースを検索するための「クエリー配列」として使用することもできる。このような検索は、Altschul, et al. (1990) J Mol. Biol. 215:403-10によるＸＢＬＡＳＴプログラム（バージョン２．０）を使用して行うことができる。ＸＢＬＡＳＴプログラム（スコア＝５０、ワード長＝３）によりＢＬＡＳＴタンパク質検索を行い、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的でギャップが挿入されたアライメントを得るためには、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402に記載のＧａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴを利用することができる。ＢＬＡＳＴプログラムおよびＧａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴプログラムを利用する場合、それぞれのプログラムの初期パラメータ（たとえばＸＢＬＡＳＴおよびＮＢＬＡＳＴ）を使用することができる。

【０２９２】

保存的修飾を有する抗体

特定の実施形態において、本発明の抗体は、ＣＤＲ１配列、ＣＤＲ２配列およびＣＤＲ３配列を含む重鎖可変領域と、ＣＤＲ１配列、ＣＤＲ２配列およびＣＤＲ３配列を含む軽

鎖可変領域とを含み；これらのＣＤＲ配列の１以上が、本明細書に記載の方法を使用して単離および作製された好ましい抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体もしくは抗ＬＳＲ抗体またはこれらが保存的修飾されたものに基づいた特定のアミノ酸配列を含み；さらに本発明の当該抗体は、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体または抗ＬＳＲ抗体の所望の機能特性を保持している。

【０２９３】

種々の実施形態において、抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体または抗ＬＳＲ抗体は、たとえば、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体であってもよい。

【０２９４】

本明細書において「保存的配列修飾」は、上記のアミノ酸配列を含む抗体の結合特性に顕著な影響または変化を及ぼさないアミノ酸修飾を指すと意図される。このような保存的修飾は、アミノ酸の置換、付加および欠失を包含する。修飾は、部位特異的突然変異誘発およびＰＣＲ突然変異誘発などの当技術分野において公知の標準的な技術によって、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体に導入することができる。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸残基を、類似した側鎖を有するアミノ酸残基で置換することである。類似した側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーは当技術分野において定義されている。これらのファミリーとして、塩基性側鎖を有するアミノ酸（たとえば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（たとえば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（たとえば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（たとえば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、β－分枝側鎖を有するアミノ酸（たとえば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を有するアミノ酸（たとえば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。したがって、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体のＣＤＲ領域内の１個以上のアミノ酸残基は、同一の側鎖ファミリーに属する他のアミノ酸残基と置換することができ、改変された抗体は、本明細書に記載の機能アッセイを使用して、機能（すなわち（ｃ）～（ｊ）に記載の機能）の保持について試験することができる。

【０２９５】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ、抗ＶＳＩＧ１０、抗ＴＭＥＭ２５または抗ＬＳＲと同一のエピトープに結合する抗体

別の実施形態において、本発明は、Ｂ７共刺激およびこれに関連する機能の調節などの所望の機能特性を有する、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ上の好ましいエピトープに結合する抗体を提供する。所望のエピトープ特異性を有する他の抗体を選択してもよく、このような抗体は、所望の抗体と、ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原またはＬＳＲ抗原との結合に対して交差競合する能力を有するであろう。

【０２９６】

改変および修飾された抗体

さらに、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体は、抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体または抗ＬＳＲ抗体に由来するV_H配列および／またはV_L配列を１つ以上有する抗体を、修飾抗体を構築するための出発物質として使用することにより作製することができ、得られる修飾抗体は、出発抗体に由来する特性が改変されたものであってもよい。抗体は、片方または両方の可変領域（すなわちV_Hおよび／またはV_L）内の、たとえば１つ以上のＣＤＲ領域および／または１つ以上のフレームワーク領域内などの、１個以上の残基を修飾することによって改変することができる。上記に加えてまたは別法として、たとえば抗体のエフェクター機能の改変などを目的として、定常領域内の残基を修飾することにより抗体を改変することができる。

【０２９７】
実施可能な可変領域の改変の１つとして、ＣＤＲの移植が挙げられる。抗体は、６つの重鎖および軽鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）に位置するアミノ酸残基を主に介して標的抗原と相互作用する。このことから、ＣＤＲ内のアミノ酸配列は、ＣＤＲ外の配列よりも抗体ごとに大きく異なる。ＣＤＲ配列は抗体－抗原相互作用の大部分を担っているため、異なる特性を有する別の抗体のフレームワーク配列に移植した特定の天然抗体のＣＤＲ配列を含む発現ベクターを構築することにより、この天然抗体が有する特性を模倣する組換え抗体を発現させることが可能である（たとえば、Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033；Ｗｉｎｔｅｒに付与された米国特許第５，２２５，５３９号；ならびにＱｕｅｅｎらに付与された米国特許第５，５３０，１０１号；第５，５８５，０８９号；第５，６９３，７６２号；および第６，１８０，３７０号を参照されたい）。

【０２９８】
適切なフレームワーク配列は、生殖細胞系抗体の遺伝子配列を含む、公共ＤＮＡデータベースまたは公表されている文献から得ることができる。たとえば、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子の生殖細胞系ＤＮＡ配列は、（インターネットから入手可能な）「ＶＢａｓｅ」ヒト生殖細胞系配列データベースから得ることができ、さらに、Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) “The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops” J. Mol. Biol. 227:776-798; および Cox, J. P. L. et al. (1994) “A Directory of Human Germline VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage” Eur. J Immunol. 24:827-836（これらの内容は参照により本明細書に明示的に組み込まれる）にも記載されている。

【０２９９】
可変領域を修飾するための別の方法として、V_Hおよび／またはV_LのＣＤＲ１領域、ＣＤＲ２領域および／またはＣＤＲ３領域内のアミノ酸残基を変異させることにより、目的の抗体の１以上の結合特性（たとえば親和性）を向上させる方法が挙げられる。部位特異的突然変異誘発またはＰＣＲ突然変異誘発を実施することにより変異を導入することができ、また、抗体結合または目的とする別の機能特性に対する効果は、適切なインビトロまたはインビボアッセイで評価することができる。（上述したような）保存的修飾を導入することが好ましい。変異はアミノ酸置換、付加または欠失であってもよいが、置換が好ましい。さらに、通常、ＣＤＲ領域内の１個、２個、３個、４個または５個以下の残基が改変される。

【０３００】
本発明の実施形態の少なくともいくつかによる遺伝子操作された抗体は、たとえば抗体の特性の向上などを目的として、V_Hおよび／またはV_L内のフレームワーク残基に修飾がなされたものを含む。通常、このようなフレームワーク修飾は抗体の免疫原性を低下させる目的で行われる。たとえば、このような方法の１つとして、１個以上のフレームワーク残基を対応する生殖細胞系配列へと「復帰突然変異させる」方法が挙げられる。より具体的には、体細胞突然変異を経た抗体は、この抗体が由来する生殖細胞系配列とは異なるフレームワーク残基を含んでいてもよい。このような残基は、抗体のフレームワーク配列と、この抗体が由来する生殖細胞系配列とを比較することにより同定することができる。

【０３０１】
フレームワーク領域内またはＣＤＲ領域内になされる修飾に加えてまたはこの別法として、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体は、Ｆｃ領域内に修飾が加えられるように改変してもよく、このような修飾は、典型的には、血清中半減期、補体結合、Ｆｃレセプター結合、および／または抗原依存性細胞傷害性などの抗体の１つ以上の機能特性を改変するために行われる。さらに、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗

体は、化学的に修飾してもよく（たとえば、１つ以上の化学成分を抗体に結合させることができる）、または、糖鎖を改変するために修飾してもよく、これらの場合においても抗体の１つ以上の機能特性を改変するために修飾が行われる。このような実施形態については以下で詳細に説明する。Ｆｃ領域の残基はＫａｂａｔによるＥＵインデックスに従い番号を付ける。

【０３０２】

一実施形態では、C_H1のヒンジ領域を修飾して、ヒンジ領域のシステイン残基数がたとえば増加または減少するように改変する。この方法は、Ｂｏｄｍｅｒらによる米国特許第５，６７７，４２５号にさらに詳細に説明されている。C_H1のヒンジ領域のシステイン残基数の改変は、たとえば軽鎖と重鎖の組立てを容易にしたり、抗体の安定性を増加また減少させたりするために行われる。

【０３０３】

別の実施形態では、抗体のＦｃヒンジ領域を変異させて、抗体の生物学的半減期を減少させる。より具体的には、抗体のブドウ球菌プロテインＡ（ＳｐＡ）に対する結合が、ネイティブのＦｃヒンジドメイン－ＳｐＡ結合よりも低下するように、ＦｃヒンジフラグメントのC_H2－C_H3ドメイン界面領域に１つ以上のアミノ酸変異を導入する。この方法は、Ｗａｒｄらによる米国特許第６，１６５，７４５号にさらに詳細に説明されている。

【０３０４】

別の実施形態では、抗体を修飾してその生物学的半減期を増加させる。様々な方法を採用することができる。たとえば、Ｗａｒｄによる米国特許第６，２７７，３７５号に記載されているように、Ｔ２５２Ｌ、Ｔ２５４Ｓ、Ｔ２５６Ｆの変異を１つ以上導入することができる。あるいは、Ｐｒｅｓｔａらによる米国特許第５，８６９，０４６号および第６，１２１，０２２号に記載されているように、生物学的半減期を増加させる目的で、ＩｇＧのＦｃ領域C_H2ドメインの２つのループから得られたサルベージレセプター結合エピトープが、C_H1領域またはC_L領域内に含まれるように抗体を改変することができる。

【０３０５】

さらに別の実施形態では、Ｆｃ領域の少なくとも１個のアミノ酸残基を別のアミノ酸残基で置換して改変することにより、抗体のエフェクター機能を改変する。たとえば、２３４位、２３５位、２３６位、２３７位、２９７位、３１８位、３２０位および３２２位から選択される１個以上のアミノ酸残基を、別のアミノ酸残基と置換することにより、親抗体の抗原結合能力が保持されたまま、抗体のエフェクターリガンドに対する親和性を改変することができる。親和性が改変されたエフェクターリガンドは、たとえばＦｃレセプターまたは補体のＣ１成分になりえる。この方法は、Ｗｉｎｔｅｒらによる米国特許第５，６２４，８２１号および第５，６４８，２６０号にさらに詳細に説明されている。

【０３０６】

別の実施形態では、３２９位、３３１位および３２２位から選択される１個以上のアミノ酸残基を別のアミノ酸残基と置換することにより、抗体のＣ１ｑ結合性を改変させ、かつ／または抗体の補体依存性細胞傷害作用（ＣＤＣ）を低下または欠失させることができる。この方法は、Ｉｄｕｓｏｇｉｅらによる米国特許第６，１９４，５５１号にさらに詳細に説明されている。

【０３０７】

別の実施形態では、２３１位および２３９位のアミノ酸残基の１個以上を改変させることによって、抗体が補体を結合する能力を改変する。この方法は、ＢｏｄｍｅｒらによるＰＣＴ国際公開第９４／２９３５１号にさらに詳細に説明されている。

【０３０８】

さらに別の実施形態では、２３８位、２３９位、２４８位、２４９位、２５２位、２５４位、２５５位、２５６位、２５８位、２６５位、２６７位、２６８位、２６９位、２７０位、２７２位、２７６位、２７８位、２８０位、２８３位、２８５位、２８６位、２８９位、２９０位、２９２位、２９３位、２９４位、２９５位、２９６位、２９８位、３０１位、３０３位、３０５位、３０７位、３０９位、３１２位、３１５位、３２０位、３２

２位、３２４位、３２６位、３２７位、３２９位、３３０位、３３１位、３３３位、３３４位、３３５位、３３７位、３３８位、３４０位、３６０位、３７３位、３７６位、３７８位、３８２位、３８８位、３８９位、３９８位、４１４位、４１６位、４１９位、４３０位、４３４位、４３５位、４３７位、４３８位または４３９位のアミノ酸を１個以上を修飾することによってＦｃ領域を修飾し、抗体が抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を媒介する能力を増強させ、かつ／または抗体のＦｃγレセプターに対する親和性を増加させる。この方法は、ＰｒｅｓｔａによるＰＣＴ国際公開第００／４２０７２号にさらに詳細に説明されている。さらに、ヒトＩｇＧ１上のＦｃγＲＩ結合部位、ＦｃγＲII結合部位、ＦｃγＲIII結合部位およびＦｃＲｎ結合部位はマッピングされており、また、結合性を向上させた変異体が文献に記載されている（Shields, R. L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604を参照されたい）。２５６位、２９０位、２９８位、３３３位、３３４位および３３９位における特異的突然変異はＦｃγＲIIIに対する結合性を向上させることが示されている。さらに、Ｔ２５６Ａ／Ｓ２９８Ａ、Ｓ２９８Ａ／Ｅ３３３Ａ、Ｓ２９８Ａ／Ｋ２２４ＡおよびＳ２９８Ａ／Ｅ３３３Ａ／Ｋ３３４Ａの組み合わせの突然変異体においてＦｃγＲIIIに対する結合性が向上することが示されている。さらに、Ｍ２５２Ｙ／Ｓ２５４Ｔ／Ｔ２５６ＥまたはＭ４２８Ｌ／Ｎ４３４Ｓなどの変異は、ＦｃＲｎに対する結合を向上させ、かつ抗体の循環半減期を延長させる（Chan CA and Carter PJ (2010) Nature Rev Immunol 10:301-316を参照されたい）。

【０３０９】

さらに別の実施形態では、抗体の糖鎖修飾を改変する。たとえば、脱グリコシル化された抗体（すなわち、糖鎖を持たない抗体）を作製することができる。糖鎖修飾を改変することによって、たとえば、抗原に対する抗体の親和性を増加させることができる。このような糖鎖修飾は、たとえば、抗体配列内の１以上のグリコシル化部位を改変することによって達成することができる。たとえば、１個以上のアミノ酸を置換することによって、可変領域のフレームワーク内から１以上のグリコシル化部位を取り除き、その部位の糖鎖を除去することができる。このような脱グリコシル化によって、抗原に対する抗体の親和性を増加させてもよい。このような方法は、Ｃｏらによる米国特許第５，７１４，３５０号および第６，３５０，８６１号にさらに詳細に説明されている。

【０３１０】

上記に加えてまたは別法として、たとえば、フコシル残基の数を減少させた低フコシル化抗体またはバイセクティングＧｌｃＮａｃ構造を増加させた抗体などの、改変された糖鎖修飾を有する抗体を作製することができる。このような改変グリコシル化パターンによって、抗体のＡＤＣＣ能が増強されることが実証されている。このような糖鎖修飾は、たとえば、改変されたグリコシル化機構を有する宿主細胞において抗体を発現させることによって達成することができる。改変されたグリコシル化機構を有する細胞は当技術分野において知られており、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組換え抗体を発現させて、改変された糖鎖修飾を有する抗体を作製するための宿主細胞として使用することができる。たとえば、Ｍｓ７０４細胞株、Ｍｓ７０５細胞株、およびＭｓ７０９細胞株はフコシルトランスフェラーゼ（α（１，６）フコシルトランスフェラーゼ（ＦＵＴ８））遺伝子を欠くことから、Ｍｓ７０４細胞株、Ｍｓ７０５細胞株、およびＭｓ７０９細胞株において発現される抗体は、その糖鎖にフコースを持たない。Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５、およびＭｓ７０９　ＦＵＴ８$^{-/-}$細胞株は、２種の置換ベクターを使用して、ＣＨＯ／ＤＧ４４細胞のＦＵＴ８遺伝子を標的破壊することによって作製される（Ｙａｍａｎｅらによる米国特許公開第２００４０１１０７０４号およびYamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22を参照されたい）。別の例として、Ｈａｎａｉらによる欧州特許第１，１７６，１９５号には、フコシルトランスフェラーゼをコードするＦＵＴ８遺伝子が機能破壊された細胞株が記載されており、α－１，６結合に関連する酵素が減少または除去されたことによって、このような細胞株において発現される抗体はフコシル残基の数が減少している。Ｈａｎａｉらの文献には、さらに、抗体のＦｃ部分に結合するＮ‐アセチルグルコサミンにフコースを付加するための酵素活性が低い細胞株、およびこのよう

な酵素活性を有さない細胞株（たとえばラット骨髄腫細胞株ＹＢ２／０）（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６６２）が記載されている。ＰｒｅｓｔａによるＰＣＴ国際公開第０３／０３５８３５号には、ＣＨＯ細胞変異株（Ｌｅｃ１３細胞）が記載されているが、この細胞株は、Ａｓｎ（２９７）に結合した糖鎖にフコースを付加する能力が低減されており、その結果、この宿主細胞において発現される抗体のフコシル残基の数も低減されている（Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740も参照されたい）。ＵｍａｎａらによるＰＣＴ国際公開第９９／５４３４２号には、糖タンパク質修飾を行うグリコシルトランスフェラーゼ（たとえば、β（１，４）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII（ＧｎＴIII））を発現するように改変された細胞株が記載されており、この改変された細胞株において発現される抗体は、バイセクティングＧｌｃＮａｃ構造が増加しており、その結果として抗体のＡＤＣＣ活性が増強されている（Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180も参照されたい）。あるいは、フコシダーゼを使用して抗体のフコース残基を切断してもよい。たとえば、α－Ｌ－フコシダーゼというフコシダーゼは、抗体からフコシル残基を取り除く（Tarentino, A. L. et al. (1975) Biochem. 14:5516-23）。

【０３１１】

本明細書において、本発明により考えられる別の抗体修飾はＰＥＧ化である。たとえば抗体の生物学的（たとえば血清中）半減期を増加させる目的などで、抗体をＰＥＧ化することができる。抗体をＰＥＧ化するためには、通常、１つ以上のＰＥＧ基が抗体または抗体フラグメントに結合するようなる条件下において、抗体またはそのフラグメントを、ＰＥＧの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）と反応させる。ＰＥＧ化は、反応性ＰＥＧ分子（または類似した反応性の水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して行うことが好ましい。本明細書において「ポリエチレングリコール」は、他のタンパク質を誘導体化するために使用されるあらゆる形態のＰＥＧを包含すると意図され、たとえば、モノ（Ｃ１～Ｃ１０）アルコキシポリエチレングリコール、アリールオキシポリエチレングリコール、およびポリエチレングリコールマレイミドが挙げられる。特定の実施形態では、ＰＥＧ化抗体は脱グリコシル化された抗体である。タンパク質をＰＥＧ化する方法は当技術分野において公知であり、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体に使用することができる。たとえば、Ｎｉｓｈｉｍｕｒａらによる欧州特許第０　１５４　３１６号およびＩｓｈｉｋａｗａらによる欧州特許第０　４０１　３８４号を参照されたい。

【０３１２】

抗体の改変方法

上述したように、本明細書に開示されている、V_H配列およびV_K配列を有する抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体または抗ＬＳＲ抗体は、V_H配列および／またはV_L配列もしくはこれらに結合した定常領域を修飾することによって、新たな抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体または抗ＬＳＲ抗体を作製するために使用することができる。このように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる別の態様中においては、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体または抗ＬＳＲ抗体の構造上の特徴を利用して、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲに対する結合性などの本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体の少なくとも１つの機能特性を保持する、構造的に関連した抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体または抗ＬＳＲ抗体を作製する。たとえば、上述したように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、単一のＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、ＶＳＩＧ１０抗体、ＴＭＥＭ２５抗体またはＬＳＲ抗体のＣＤＲ領域またはその変異体の１以上を、組換え技術によって公知のフレームワーク領域および／または他のＣＤＲと組み合わせることによって、組換え技術によって作製されたさらなる抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体または抗ＬＳＲ抗体を得ることができる。他のタイプの修飾としては上述のセクションに記載したものが挙げられる。これらの組換え方法のための出発物質は

、本明細書に記載のV_H配列および／またはV_K配列の１以上、またはこれらのＣＤＲ領域の１以上である。改変された抗体を作製するためには、本明細書に記載のV_H配列および／またはV_K配列の１以上もしくはこれらのＣＤＲ領域の１以上を有する抗体を実際に作製する（すなわち、タンパク質として発現させる）ことは必要とされない。このような抗体を実際に作製するよりも、これらの配列に含まれている情報を出発物質として使用して、元の配列に由来する「第二世代」配列を作製し、次いで「第二世代」配列をタンパク質として産生および発現させる。

【０３１３】

標準的な分子生物学的技術を使用して、改変した抗体配列を作製し、発現させることができる。

【０３１４】

改変された抗体配列によってコードされる抗体は、本明細書に記載の配列を使用した方法により作製された抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体または抗ＬＳＲ抗体の機能特性のうちの１つ、いくつか、またはすべてを保持するものであることが好ましく、該機能特性としては、ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原またはＬＳＲ抗原に特定のＫＤ値以下で結合すること；Ｂ７共刺激を調節すること；および／またはＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原および／またはＬＳＲ抗原を発現する、メラノーマ、肝臓がん、腎臓がん、脳がん、乳がん、結腸がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、胃がん、多発性骨髄腫、ならびに造血器がん（（ホジキンおよび非ホジキン）リンパ腫、急性および慢性リンパ芽球性白血病、ならびに急性および慢性骨髄白血病を含むが、これらに限定されない）などの所望の標的細胞に選択的に結合することが挙げられる。

【０３１５】

改変された抗体の機能特性は、当技術分野において入手可能なかつ／または本明細書に記載の標準的なアッセイを使用して評価することができる。

【０３１６】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体を改変する方法の特定の実施形態においては、抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体または抗ＬＳＲ抗体をコードする配列の全体または一部に沿ってランダムまたは選択的に変異を導入し、その結果生じる修飾された抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体または抗ＬＳＲ抗体を結合活性および／または他の所望の機能特性についてスクリーニングすることができる。

【０３１７】

突然変異の方法は当技術分野において知られている。たとえば、ＳｈｏｒｔによるＰＣＴ国際公開第０２／０９２７８０号には、飽和突然変異誘発、合成ライゲーションアセンブリ、またはこれらの組み合わせを使用して抗体変異体を作製し、スクリーニングする方法が記載されている。別法として、ＬａｚａｒらによるＰＣＴ国際公開第０３／０７４６７９号には、コンピュータによるスクリーニング方法を使用して抗体の生理化学的な特性を最適化する方法が記載されている。

【０３１８】

抗体をコードする核酸分子

本発明の別の態様は、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体をコードする核酸分子に関する。核酸は、全細胞または細胞溶解物中に含まれていてもよく、部分的に精製された形態または実質的に純粋な形態であってもよい。核酸は、アルカリ／ＳＤＳ処理、ＣｓＣｌバンド形成、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動、他の当技術分野でよく知られている方法などの標準的な技術によって、他の細胞成分または他の汚染物質（たとえば他の細胞の核酸、タンパク質）から精製された場合に「単離された」または「実質的に純粋である」と言える。F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New Yorkを参照されたい。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる核酸は、たとえばＤＮＡ

またはＲＮＡであってもよく、イントロン配列を含んでいても含んでいなくてもよい。好ましい実施形態では、核酸はｃＤＮＡ分子である。

【０３１９】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる核酸は標準的な分子生物学的技術を使用して得ることができる。ハイブリドーマ（たとえば、さらに詳しくは後述する、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスから作製されるハイブリドーマ）により発現された抗体の場合、標準的なＰＣＲ増幅またはｃＤＮＡクローン技術を使用して該ハイブリドーマにより産生される抗体の軽鎖および重鎖をコードするｃＤＮＡを得ることができる。（たとえば、ファージディスプレイ技術を使用した）免疫グロブリン遺伝子ライブラリーから得られた抗体の場合は、該ライブラリーから抗体をコードする核酸を回収することができる。

【０３２０】

V_HセグメントコードするＤＮＡ断片およびV_LセグメントをコードするＤＮＡ断片が得られたら、これらのＤＮＡ断片を標準的な組換えＤＮＡ技術によってさらに遺伝子操作し、たとえば、これらの可変領域遺伝子を完全長抗体鎖遺伝子、Ｆａｂフラグメント遺伝子またはｓｃＦｖ遺伝子に変換することができる。これらの遺伝子操作では、V_LまたはV_HをコードするＤＮＡ断片は、抗体定常領域やフレキシブルリンカーなどの別のタンパク質をコードする別のＤＮＡ断片に機能可能に連結される。

【０３２１】

本明細書において「機能可能に連結する」は、上記２種のＤＮＡ断片によりコードされたアミノ酸配列がインフレームになるように、上記２種のＤＮＡ断片を連結することを意味すると意図される。

【０３２２】

V_H領域をコードする単離されたＤＮＡは、重鎖定常領域（C_H1、C_H2およびC_H3）をコードする別のＤＮＡ分子に該ＤＮＡを機能可能に連結することによって、完全長重鎖遺伝子に変換することができる。ヒト重鎖定常域遺伝子の配列は当技術分野において公知であり（たとえば、Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照されたい）、上記の領域を包むＤＮＡ断片は標準的なＰＣＲ増幅によって得ることができる。重鎖定常領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＭまたはＩｇＤの定常領域であってよいが、ＩｇＧ１またはＩｇＧ４の定常領域が最も好ましい。Ｆａｂフラグメント重鎖遺伝子については、V_HをコードするＤＮＡを、重鎖C_H1定常領域のみをコードする別のＤＮＡ分子に機能可能に連結することができる。

【０３２３】

V_L領域をコードする単離されたＤＮＡは、軽鎖定常領域（C_L）をコードする別のＤＮＡ分子に該ＤＮＡを機能可能に連結することによって、完全長軽鎖遺伝子（およびＦａｂ軽鎖遺伝子）に変換することができる。ヒト軽鎖定常域遺伝子の配列は当技術分野において公知であり（たとえば、Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照されたい）、上記の領域を包むＤＮＡ断片は標準的なＰＣＲ増幅によって得ることができる。軽鎖定常領域はκ定常領域またはλ定常領域であってよいが、κ定常領域が最も好ましい。

【０３２４】

ｓｃＦｖ遺伝子を作製するためには、V_HをコードするＤＮＡ断片およびV_LをコードするＤＮＡ断片を、たとえばアミノ酸配列（Ｇｌｙ４－Ｓｅｒ）３などのフレキシブルリンカーをコードする別のフラグメントに機能可能に連結させることによって、V_H配列およびV_L配列を、V_L領域とV_H領域とがフレキシブルリンカーによって連結された一本の連続したタンパク質鎖として発現させることができる（たとえば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-58

83; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554を参照されたい）。

【０３２５】

抗ＬＹ６Ｇ６Ｆモノクローナル抗体、抗ＶＳＩＧ１０モノクローナル抗体、抗ＴＭＥＭ２５モノクローナル抗体または抗ＬＳＲモノクローナル抗体の作製

本発明のモノクローナル抗体（ｍＡｂ）は慣用のモノクローナル抗体方法論（たとえば、Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495に記載の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術など）を包含する様々な技術によって作製することができる。原則として、体細胞ハイブリダイゼーション法が好ましいが、モノクローナル抗体を作製するための他の技術（たとえば、Ｂリンパ球のウイルス形質転換または発がん性形質転換など）を使用することもできる。

【０３２６】

ハイブリドーマを作製するための動物系としては、マウス系が好ましい。マウスにおけるハイブリドーマの作製は十分に確立された手法である。融合に用いるために免疫した脾細胞を単離するための免疫化プロトコルおよび技術は、当技術分野において知られている。融合パートナー（たとえばマウス骨髄腫細胞）および融合手順も公知である。

【０３２７】

本発明のキメラ抗体またはヒト化抗体は、上述のように作製されたマウスモノクローナル抗体の配列に基づいて作製することができる。上記の重鎖免疫グロブリンおよび軽鎖免疫グロブリンをコードするＤＮＡは、目的のマウスハイブリドーマから得ることができ、標準的な分子生物学技術を使用して、非マウス（たとえばヒト）免疫グロブリン配列を含有するように改変することができる。たとえば、キメラ抗体を作製するために、当技術分野で公知の方法を使用してマウス可変領域をヒト定常領域に連結することができる（たとえば、Ｃａｂｉｌｌｙらに付与された米国特許第４，８１６，５６７号を参照されたい）。ヒト化抗体を作製するために、当技術分野で公知の方法を使用してマウスＣＤＲ領域をヒトフレームワークに挿入することができる（たとえば、Ｗｉｎｔｅｒに付与された米国特許第５，２２５，５３９号；ならびにＱｕｅｅｎらに付与された米国特許第５，５３０，１０１号、第５，５８５，０８９号、第５，６９３，７６２号および第６，１８０，３７０号を参照されたい）。

【０３２８】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、上記の抗体はヒトモノクローナル抗体である。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲに対する上記のようなヒトモノクローナル抗体は、マウス免疫系ではなくヒト免疫系の一部を保有するトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソミックマウスを使用して作製することができる。これらのトランスジェニックマウスおよびトランスクロモソミックマウスは、本明細書においてＨｕＭＡｂマウス（登録商標）およびＫＭマウス（登録商標）と呼ばれるマウスを包含し、これらのマウスは本明細書において集合的に「ヒトＩｇマウス」と呼ばれる。ＨｕＭＡｂマウス（Ｍｅｄａｒｅｘ社）には、再構成されていないヒト重鎖（μ鎖およびγ鎖）およびκ軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ座が、内因性のμ鎖座およびκ鎖座を不活性化する標的変異とともに含まれている（たとえばLonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859を参照されたい）。したがって、このマウスはマウスＩｇＭまたはκ鎖の発現減少を示し、免疫化に応答して、導入されたヒト重鎖遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子がクラススイッチおよび体細胞突然変異を起こし、高親和性のヒトＩｇＧκモノクローナルを産生する（前掲のLonberg, N. et al. (1994)に記載されており；ならびに、Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, およびHarding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546において再検討されている）。ＨｕＭａｂマウスの作製および使用、ならびにこのようなマウスが持つゲノム修飾については、Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5:647-656; Tuaillon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (

1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuaillon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6:579-591;およびFishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851にさらに詳細に記載されており、これらの内容全体が参照により本明細書に具体的に組み込まれる。さらに、ＬｏｎｂｅｒｇおよびＫａｙに付与された米国特許第５，５４５，８０６号；第５，５６９，８２５号；第５，６２５，１２６号；第５，６３３，４２５号；第５，７８９，６５０号；第５，８７７，３９７号；第５，６６１，０１６号；第５，８１４，３１８号；第５，８７４，２９９号；および第５，７７０，４２９号；Ｓｕｒａｎｉらに付与された米国特許第５，５４５，８０７号；Ｌｏｎｂｅｒｇおよび Ｋａｙに付与されたＰＣＴ出願国際公開第９２／０３９１８号、国際公開第９３／１２２２７号、国際公開第９４／２５５８５号、国際公開第９７／１３８５２号、国際公開第９８／２４８８４号、および国際公開第９９／４５９６２号；ならびにＫｏｒｍａｎらに付与されたＰＣＴ出願国際公開第０１／１４４２４号を参照されたい。

【０３２９】

別の実施形態では、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるヒト抗体は、導入遺伝子および導入染色体上にヒト免疫グロブリン配列を持つマウス（たとえば、ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入染色体を持つマウスなど）を使用して産生させることができる。本明細書において「ＫＭマウス（登録商標）」と呼ばれるこのようなマウスは、Ｉｓｈｉｄａらによって ＰＣＴ国際公開第０２／４３４７８号に詳しく説明されている。

【０３３０】

さらに、当技術分野において、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する別のトランスジェニック動物系が入手可能であり、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および／または抗ＬＳＲ抗体を産生させるために使用することができる。たとえば、Ｘｅｎｏｍｏｕｓｅ（アブジェニックス社）と呼ばれる別のトランスジェニック系を使用することができ、このようなマウスは、たとえば、Ｋｕｃｈｅｒｌａｐａｔｉらに付与された米国特許第５，９３９，５９８号、第６，０７５，１８１号、第６，１１４，５９８号、第６，１５０，５８４号および第６，１６２，９６３号に記載されている。

【０３３１】

さらに、当技術分野において、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する別のトランスクロモソミック動物系が入手可能であり、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および／または抗ＬＳＲ抗体を産生させるために使用することができる。たとえば、「ＴＣマウス」と呼ばれる、ヒト重鎖導入染色体およびヒト軽鎖導入染色体の両方を持つマウスを使用することができ、このようなマウスは、Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad Sci. USA 97:722-727に記載されている。さらに、ヒト重鎖導入染色体および軽鎖導入染色体を持つウシが当技術分野において報告されており（Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894）、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および／または抗ＬＳＲ抗体を産生させるために使用することができる。

【０３３２】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによるヒトモノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ法を使用して作製することもできる。ヒト抗体を単離するためのこのようなファージディスプレイ法は当技術分野において確立されている。たとえば、Ｌａｄｎｅｒらに付与された米国特許第５，２２３，４０９号、第５，４０３，４８４号、および第５，５７１，６９８号；Ｄｏｗｅｒらに付与された米国特許第５，４２７，９０８号および第５，５８０，７１７号；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙらに付与された米国特許第５，９６９，１０８号および第６，１７２，１９７号；ならびに、Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓらに付与された米国特許第５，８８５，７９３号、第６，５２１，４０４号、第６，５４４，７３１号、第６，５５５，３１３

号、第６，５８２，９１５号および第６，５９３，０８１号を参照されたい。

【０３３３】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによるヒトモノクローナル抗体は、免疫化によりヒト抗体応答を起こすことができるように再構築されたヒト免疫細胞を有するＳＣＩＤマウスを使用して作製することもできる。このようなマウスは、たとえば、Ｗｉｌｓｏｎらに付与された米国特許第５，４７６，９９６号および第５，６９８，７６７号に記載されている。

【０３３４】

ヒトＩｇマウスの免疫化

本発明の実施形態の少なくともいくつかによるヒト抗体を作製するためにヒトＩｇマウスを使用する場合、このようなマウスは、ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原および／もしくはＬＳＲ抗原、ならびに／または組換えＬＹ６Ｇ６Ｆ、組換えＶＳＩＧ１０、組換えＴＭＥＭ２５および／もしくは組換えＬＳＲ、またはＬＹ６Ｇ６Ｆ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５融合タンパク質および／もしくはＬＳＲ融合タンパク質の精製調製物または濃縮調製物で免疫することができ、このような方法は、Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851；ならびにＰＣＴ国際公開第９８／２４８８４号および国際公開第０１／１４４２４号に記載されている。６～１６週齢のマウスに最初の点滴を行うことが好ましい。たとえば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原および／またはＬＳＲ抗原の精製調製物または組換え調製物（５～５０μｇ）を使用して、ヒトＩｇマウスを腹腔内投与により免疫することができる。

【０３３５】

他の研究者による様々な抗原を用いた過去の経験より、最初に完全フロイントアジュバントを加えた抗原を腹腔内（ＩＰ）投与することにより免疫し、次いで、不完全フロイントアジュバントを加えた抗原を１週おきに腹腔内投与することにより（計６回まで）免疫した場合にトランスジェニックマウスが応答を示すことが示されている。しかしながら、フロイント以外のアジュバントも効果的であることが分かっている。さらに、アジュバント非存在下の全細胞は高免疫原性であることが分かっている。後眼窩出血によって得られる血漿試料を使用して、免疫化プロトコル中に免疫応答をモニタリングすることができる。（後述の）ＥＬＩＳＡによって血漿をスクリーニングすることができ、抗ＬＹ６Ｇ６Ｆヒト免疫グロブリン、抗ＶＳＩＧ１０ヒト免疫グロブリン、抗ＴＭＥＭ２５ヒト免疫グロブリンおよび／または抗ＬＳＲヒト免疫グロブリンの力価が十分に高いマウスを融合に使用することができる。屠殺および脾臓摘出の３日前にマウスに抗原を静脈内投与することによりブーストを行うことができる。１回の免疫化につき２～３回の融合が必要であると予想される。通常、抗原それぞれに対して６～２４匹のマウスを免疫する。通常、ＨＣｏ７株およびＨＣｏ１２株の両方を使用する。さらに、ＨＣｏ７由来導入遺伝子とＨＣｏ１２由来導入遺伝子とを交配して、２種の異なるヒト重鎖導入遺伝子（ＨＣｏ７／ＨＣｏ１２）を有する単一のマウスを作製することができる。別法としてまたは上記に加えて、ＫＭマウス株を使用することもできる。

【０３３６】

ヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

本発明の実施形態の少なくともいくつかによるヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製するために、免疫したマウスから脾細胞および／またはリンパ節細胞を単離し、マウス骨髄腫細胞株などの適切な不死化細胞株に融合することができる。この結果生じるハイブリドーマを抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングすることができる。たとえば、免疫したマウスから得た脾リンパ球の単一細胞懸濁液を、５０％ＰＥＧとともに、６分の１の細胞数のＰ３Ｘ６３－Ａｇ８．６５３非分泌性マウス骨髄腫細胞（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ　１５８０）と融合させる。平底マイクロタイタープレートにおいて約２×10^5個の細胞を平板培養し、次いで、２０％ｆｅｔａｌ　Ｃｌｏｎｅ　Ｓｅｒｕｍ、１８％「６５３」調整培地、５％ｏｒｉｇｅｎ（ＩＧＥＮ）、４ｍＭ　Ｌ－グルタミン、

１ｍＭピルビン酸ナトリウム、５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、０．０５５のｍＭ　２－メルカプトエタノール、５０単位／ｍｌペニシリン、５０ｍｇ／ｍｌストレプトマイシン、５０ｍｇ／ｍｌゲンタマイシンおよび１×ＨＡＴ（シグマ；ＨＡＴは融合の２４時間後に添加する）を含む選択培地中で２週間インキュベートする。約２週間後に、ＨＡＴをＨＴで置き換えた培地中で細胞を培養することができる。次いで、ＥＬＩＳＡによって各ウェルのヒトモノクローナルＩｇＭ抗体およびＩｇＧ抗体のスクリーニングを行うことができる。ハイブリドーマの増殖が広範囲に起これば、通常１０～１４日後に培地を観察することができる。抗体を分泌するハイブリドーマを再び平板培養し、再度スクリーニングを行い、ヒトＩｇＧがなお陽性であれば、このモノクローナル抗体を限界希釈法により少なくとも２回サブクローニングすることができる。次いで、安定なサブクローンをインビトロで培養し、特性評価用の組織培養培地において少量の抗体を作製することができる。

【０３３７】

ヒトモノクローナル抗体を精製するために、選択したハイブリドーマをモノクローナル抗体精製用の２Ｌスピナーフラスコ中で増殖させることができる。上清をろ過および濃縮して、プロテインＡセファロース（ファルマシア（ニュージャージー州ピスカタウェイ））を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供することができる。溶出されたＩｇＧをゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーで確認し、純度を確保することができる。緩衝液をＰＢＳに交換することができ、また、濃度は吸光係数１．４３を用いＯＤ２８０において測定することができる。モノクローナル抗体は小分けし－８０℃で保存することができる。

【０３３８】

モノクローナル抗体を作製するトランスフェクトーマの作製

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体は、当技術分野においてよく知られているように（たとえばMorrison, S. (1985) Science 229:1202）、たとえば組換えＤＮＡ技術と遺伝子導入法の組み合わせを使用して、宿主細胞トランスフェクトーマにおいて作製することもできる。

【０３３９】

たとえば、抗体またはその抗体フラグメントを発現させるために、完全長の軽鎖および重鎖またはその一部分をコードするＤＮＡは、標準的な分子生物学技術（たとえば目的の抗体を発現するハイブリドーマを使用したＰＣＲ増幅またはｃＤＮＡクローニング）によって得ることができ、このＤＮＡを発現ベクターに挿入して、該遺伝子を転写調節配列および翻訳調節配列に機能可能に連結させることができる。本明細書において「機能可能に連結する」は、ベクター内の転写調節配列および翻訳調節配列が抗体遺伝子の転写および翻訳を調節するという意図された機能を果たすように、抗体遺伝子をベクターにライゲートすることを意味すると意図される。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用される発現宿主細胞と適合するように選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は、別々のベクターに挿入することができ、より典型的には両方の遺伝子を同一の発現ベクターに挿入する。これらの抗体遺伝子は、標準的な方法（たとえば、抗体遺伝子フラグメント上およびベクター上の相補的制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しない場合における平滑末端ライゲーション）によって発現ベクターに挿入される。本明細書に記載の抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を使用して、すなわち、これらの軽鎖可変領域および重鎖可変領域を、所望のアイソタイプの重鎖定常領域および軽鎖定常領域がすでにコードされている発現ベクターに挿入して、V_Hセグメントをベクター内のC_Hセグメントに機能可能に連結し、V_Kセグメントをベクター内のC_Lセグメントに機能可能に連結することによって、あらゆるアイソタイプの完全長抗体遺伝子を作製することができる。上記に加えてまたは別法として、上記の組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることができる。シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームに連結するように、抗体鎖遺伝子をベクターにクローニングすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド（すなわち非免疫グロブリンタンパク質に由来するシグナルペプチ

ド）であってもよい。

【０３４０】

上記の抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組換え発現ベクターは、宿主細胞において抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を保有する。「調節配列」は、抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御するプロモーター、エンハンサーおよび他の発現調節エレメント（たとえばポリアデニル化シグナル）を包含すると意図される。このような調節配列は、たとえば、Ｇｏｅｄｄｅｌ（Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)）に記載されている。調節配列を選択することを含む発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質発現レベルなどの因子によって左右されうることは当業者によって十分に理解されるであろう。哺乳動物宿主細胞における発現に使用するのに好ましい調節配列としては、哺乳動物細胞においてタンパク質を高発現させるウイルスエレメント、たとえば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、シミアンウイルス４０（シミアンウイルス４０）、アデノウイルス（たとえばアデノウイルス主要後期プロモーター（ＡｄＭＬＰ））およびポリオーマウイルスに由来するプロモーターおよび／またはエンハンサーが挙げられる。あるいは、ユビキチンプロモーターまたはβ－グロビンプロモーターなどの非ウイルス性調節配列を使用してもよい。さらに、由来の異なる様々な配列から構成される調節エレメント、たとえば、ＳＶ４０早期プロモーター由来の配列とヒトＴ細胞白血病ウイルス１型の長い末端反復配列由来の配列とを含むＳＲαプロモーター系（Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472）などが挙げられる。

【０３４１】

上記の抗体鎖遺伝子および調節配列に加えて、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組換え発現ベクターは、たとえば、宿主細胞においてベクターの複製を調節する配列（たとえば複製開始点）および選択可能なマーカー遺伝子などのさらなる配列を保有してもよい。選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする（たとえば、Ａｘｅｌらに付与された米国特許第４，３９９，２１６号、第４，６３４，６６５号、第５，１７９，０１７号を参照されたい）。たとえば、通常、選択可能なマーカー遺伝子は、Ｇ４１８、ハイグロマイシンまたはメトトレキサートなどの薬剤に対する耐性を、ベクターが導入された宿主細胞に付与する。好ましい選択可能なマーカー遺伝子としては、（メトトレキサート選択／増幅とともにｄｈｆｒ－宿主細胞において使用される）ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）遺伝子および（Ｇ４１８選択用の）ｎｅｏ遺伝子が挙げられる。

【０３４２】

上記の軽鎖および重鎖を発現させるために、上記の軽鎖および重鎖をコードする発現ベクターを標準的な技術を用いて宿主細胞にトランスフェクトする。様々な形を取る「トランスフェクション」という用語は、たとえば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿法、ＤＥＡＥ－デキストランによるトランスフェクションなどの、原核宿主細胞または真核宿主細胞に外来性ＤＮＡを導入するために一般的に使用される様々な技術を包含すると意図される。原核宿主細胞および真核宿主細胞のいずれにおいても本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体を発現させることは理論上可能ではあるが、真核細胞、最も好ましくは哺乳動物宿主細胞において抗体を発現させることが最も好ましく、これは、このような真核細胞、具体的には哺乳動物細胞は、原核細胞と比較して、適切に折りたたまれかつ免疫学的に活性な抗体を構築し分泌する可能性がより高いからある。抗体遺伝子を原核細胞において発現させても、活性な抗体を高収率で作製することはできないことが報告されている（Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13）。

【０３４３】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組み換え抗体を発現するための好ましい哺乳動物宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ細胞）（Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載されているｄｈｆｒ－

ＣＨＯ細胞が挙げられ、これは、たとえばR. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621などに記載されているように、ＤＨＦＲ選択可能マーカーとともに使用される）、ＮＳＯ骨髄腫細胞、ＣＯＳ細胞、およびＳＰ２細胞が挙げられる。具体的には、ＮＳＯ骨髄腫細胞を使用する場合、別の好ましい発現系は、国際公開第８７／０４４６２号、国際公開第８９／０１０３６号および欧州特許第３３８，８４１号に開示されたＧＳ遺伝子発現システムである。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入する場合、宿主細胞を、宿主細胞において抗体を発現させるのに十分な時間、より好ましくは、宿主細胞が増殖する培養培地中に抗体が分泌されるのに十分な時間培養することにより抗体を作製する。抗体は標準的なタンパク質精製法を使用して培養培地から回収することができる。

【０３４４】

抗原に対する抗体の結合の特性評価

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体は、たとえば標準的なＥＬＩＳＡなどによって、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲに対する結合性を試験することができる。簡潔に述べると、ＰＢＳ中０．２５μｇ／ｍｌの精製したＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲでマイクロタイタープレートをコーティングし、次いで、ＰＢＳ中５％ウシ血清アルブミンでブロッキングする。希釈した抗体（たとえば免疫したマウスから得た血漿を希釈したもの）を各ウェルに加え、３７℃で１～２時間インキュベートする。プレートをＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎで洗浄し、次いで、アルカリホスファターゼに結合させた第２試薬（たとえば、ヒト抗体に対しては、ヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ特異的ポリクローナル試薬）とともに３７℃で１時間インキュベートする。洗浄後、プレートをｐＮＰＰ基質（１ｍｇ／ｍｌ）で発色させ、ＯＤ４０５～６５０において分析する。最も高い力価を示したマウスを融合に使用することが好ましい。

【０３４５】

上記のＥＬＩＳＡアッセイを使用して、ＬＹ６Ｇ６Ｆ免疫原、ＶＳＩＧ１０免疫原、ＴＭＥＭ２５免疫原および／またはＬＳＲ免疫原との反応性が陽性であるハイブリドーマのスクリーニングを行うこともできる。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲに高いアビディティで結合するハイブリドーマはサブクローニングされ、さらにその特性が評価される。親細胞の反応性（ＥＬＩＳＡで評価）を保持する１つのクローンを各ハイブリドーマから選択し、保存細胞として５～１０個のバイアル中で－１４０℃において保存するとともに、抗体精製に使用する。

【０３４６】

抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および／または抗ＬＳＲ抗体を精製するために、選択したハイブリドーマをモノクローナル抗体精製用の２Ｌスピナーフラスコ中で増殖させることができる。上清をろ過および濃縮して、プロテインＡセファロース（ファルマシア（ニュージャージー州ピスカタウェイ））を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供することができる。溶出されたＩｇＧをゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーで確認し、純度を確保することができる。緩衝液をＰＢＳに交換することができ、また、濃度は吸光係数１．４３を用いＯＤ２８０において測定することができる。モノクローナル抗体は小分けし－８０℃で保存することができる。

【０３４７】

選択した抗ＬＹ６Ｇ６Ｆモノクローナル抗体、抗ＶＳＩＧ１０モノクローナル抗体、抗ＴＭＥＭ２５モノクローナル抗体および／または抗ＬＳＲモノクローナル抗体が特異的エピトープに結合するかどうか確認するために、市販の試薬（ピアス（イリノイ州ロックフォード））を使用して各抗体をビオチン化することができる。非標識モノクローナル抗体およびビオチン化モノクローナル抗体を使用した比較試験は、上述したような、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲをコーティングしたＥＬＩＳＡプレートを使用して行うことができる。ビオチン化モノクローナル抗体（ｍＡｂ）の結合は、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼプローブで検出することができる。

【０３４８】
精製した抗体のアイソタイプを確認するために、特定のアイソタイプの抗体に特異的な試薬を使用してアイソタイプＥＬＩＳＡを行うことができる。たとえば、ヒトモノクローナル抗体のアイソタイプを確認するために、マイクロタイタープレートのウェルを、１μｇ／ｍｌ抗ヒト免疫グロブリンで４℃において一晩かけてコーティングすることができる。１％ＢＳＡでブロッキング後、プレートを、１μｇ／ｍｌ以下の試験モノクローナル抗体または精製したアイソタイプコントロールと環境温度において１～２時間反応させる。次いで、ウェルを、ヒトＩｇＧ１またはヒトＩｇＭに特異的なアルカリホスファターゼを結合したプローブと反応させることができる。上述したようにプレートを発色させて分析する。

【０３４９】
さらに、抗ＬＹ６Ｇ６ＦヒトＩｇＧ、抗ＶＳＩＧ１０ヒトＩｇＧ、抗ＴＭＥＭ２５ヒトＩｇＧおよび／または抗ＬＳＲヒトＩｇＧは、ウェスタンブロットを用いて、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ抗原との反応性についてそれぞれ試験することができる。簡潔に述べると、ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原および／またはＬＳＲ抗原を作製し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動に供することができる。電気泳動後、分離された抗原をニトロセルロース膜に転写し、１０％ウシ胎仔血清でブロッキングし、試験モノクローナル抗体をプローブとして用いて検出する。ヒトＩｇＧの結合は、抗ヒトＩｇＧアルカリホスファターゼを使用して検出でき、ＢＣＩＰ／ＮＢＴ基質錠剤（Ｓｉｇｍａ　Ｃｈｅｍ社（ミズーリ州セントルイス））で発色させることができる。

【０３５０】
代替足場

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、特異的抗体と類似した特異性および親和性を有する足場タンパク質に関する。実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、１つ以上のエピトープ結合ドメインに連結される足場タンパク質を含む抗原結合構築物に関する。このような改変足場タンパク質は、通常、ループ領域またはそれ以外の許容される表面部位に注目して、突然変異を含むランダムライブラリーを設計し、次いで、ファージディスプレイまたはその関連技術を使用して任意の標的に対して変異体を選択することによって得られる。実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、ａｎｔｉｃａｌｉｎ、ＤＡＲＰｉｎ、アルマジロリピートタンパク質、プロテインＡ、リポカリン、フィブロネクチンドメイン、アンキリンコンセンサスリピートドメイン、チオレドキシン、化学的に抑制されたペプチドなどを包含する（ただしこれらに限定されない）代替足場に関する。実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、治療剤として、がん、自己免疫疾患および感染症の治療、ならびにインビボにおける診断に使用される代替足場に関する。

【０３５１】
実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明はさらに、本明細書に記載の抗原結合構築物と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。

【０３５２】
本明細書において「足場タンパク質」は、免疫グロブリン（Ｉｇ）足場、たとえばＩｇＧ足場を包含するが（ただしこれらに限定されない）、免疫グロブリン（Ｉｇ）足場は、四本鎖抗体または二本鎖抗体であってもよく、抗体のＦｃ領域のみを含んでもよく、抗体の定常領域を１つ以上含んでもよく（定常領域はヒト由来または霊長類由来であってもよい）、ヒトまたは霊長類由来の定常領域の人工キメラであってもよい。このような足場タンパク質は、１つ以上の定常領域に加えて抗原結合部位を含んでもよく、たとえば、足場タンパク質は完全なＩｇＧを含んでもよい。このような足場タンパク質は、他のタンパク質ドメイン、たとえば抗原結合部位を有するタンパク質ドメイン、たとえばエピトープ結合ドメインまたはＳｃＦｖドメインなどに結合することができるであろう。

【０３５３】

「ドメイン」は、他の部分から独立した三次構造を有する、折りたたまれたタンパク質構造である。通常、ドメインは、タンパク質の独立した様々な機能特性を担い、多くの場合、タンパク質の残り部分および／またはドメインの機能を損なうことなく、他のタンパク質に付加されてもよいし、除去されてもよいし、他のタンパク質へと移動されてもよい。「単一の抗体可変ドメイン」は、抗体可変ドメインに特徴的な配列を含む、折りたたまれたポリペプチドドメインである。したがって、単一の抗体可変ドメインには、完全な抗体可変ドメインおよび修飾された可変ドメインが包含され、たとえば、抗体可変ドメインに特徴的ではない配列で１つ以上のループが置換された修飾可変ドメイン、切断された抗体可変ドメイン、Ｎ末端伸長もしくはＣ末端伸長を含む抗体可変ドメイン、または、完全長ドメインの結合活性および特異性を少なくとも保持する可変ドメインの折りたたみフラグメントが包含される。

【０３５４】

「免疫グロブリンの単一可変ドメイン」は、Ｖ領域やＶドメインの違いとは関係なく、抗原またはエピトープに特異的に結合する抗体可変ドメイン（V_H、V_HH、V_L）を指す。免疫グロブリンの単一可変ドメインは、該免疫グロブリンの単一可変ドメインによる抗原結合に必要とされない様々な他の可変領域または可変ドメインを有する構成（たとえばホモ多量体またはヘテロ多量体）であってよい（すなわち、免疫グロブリンの単一可変ドメインは、さらなる可変ドメインとは無関係に抗原に結合する）。「ドメイン抗体」または「ｄＡｂ」は、本明細書に記載の用語である、抗原に結合することが可能な「免疫グロブリンの単一可変ドメイン」と同義である。免疫グロブリンの単一可変ドメインは、ヒト抗体可変ドメインであってもよく、これに加えて、げっ歯類（たとえば国際公開第００／２９００４号に開示されている）、テンジクザメおよびラクダ科のV_HH　ｄＡｂｓなどの他の生物種由来の単一抗体可変ドメインをも包含する。ラクダ科V_HHは、軽鎖を欠いた重鎖抗体を天然に産生する、ラクダ、ラマ、アルパカ、ヒトコブラクダおよびグアナコを含む生物種に由来する免疫グロブリン単一可変ドメインポリペプチドである。このようなV_HHドメインは、当技術分野において利用可能な標準的な技術によってヒト化してもよく、本発明によれば、このようなドメインはそれでもなお「ドメイン抗体」であると考えられる。本明細書において「V_H」は、ラクダ科V_HHドメインを含む。ＮＡＲＶは、テンジクザメを含む軟骨魚類において同定された別のタイプの免疫グロブリン単一可変ドメインである。

これらのドメインは、新規抗原レセプター可変領域（Ｎｏｖｅｌ　Ａｎｔｉｇｅｎ　Ｒｅｃｅｐｔｏｒ　ｖａｒｉａｂｌｅ　ｒｅｇｉｏｎ；一般にＶ（ＮＡＲ）またはＮＡＲＶと略される）として知られている。詳細については、MoI. Immunol. 44, 656-665 (2006)および米国特許第２００５００４３５１９（Ａ）を参照されたい。

【０３５５】

「エピトープ結合ドメイン」は、Ｖ領域またはＶドメインの違いとは関係なく抗原またはエピトープに特異的に結合するドメインを指す。これは、ドメイン抗体（ｄＡｂ）（たとえばヒト、ラクダ科、サメ科の免疫グロブリン単一可変ドメイン）であってもよく、または、ＣＴＬＡ－４（Ｅｖｉｂｏｄｙ）；リポカリン；プロテインＡのＺドメイン（Ａｆｆｉｂｏｄｙ、ＳｐＡ）、Ａドメイン（Ａｖｉｍｅｒ／Ｍａｘｉｂｏｄｙ）などのプロテインＡ由来分子；ＧｒｏＥＩおよびＧｒｏＥＳなどの熱ショックタンパク質；トランスフェリン（ｔｒａｎｓ－ｂｏｄｙ）；アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）；ペプチドアプタマー；Ｃ型レクチン領域（Ｔｅｔｒａｎｅｃｔｉｎ）；ヒトγ－クリスタリンおよびヒトユビキチン（ａｆｆｉｌｉｎ）；ＰＤＺドメイン；ヒトプロテアーゼ阻害剤のサソリ毒ｋｕｎｉｔｚ型ドメイン；アルマジロリピートタンパク質；チオレドキシン；およびフィブロネクチン（ａｄｎｅｃｔｉｎ）（天然リガンド以外のリガンドに結合するようにタンパク質工学により操作されたもの）からなる群から選択される足場の誘導体であるドメインであってもよい。

【０３５６】

抗体のＣＤＲに相当するループは、異種配列で置換することにより様々な結合特性を付

与することができる（すなわちＥｖｉｂｏｄｙ）。詳細については、Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001)を参照されたい。リポカリンは、ステロイド、ビリン、レチノイドおよび脂質などの疎水性低分子を輸送する細胞外タンパクのファミリーである。リポカリンは、円錐形構造の開放端にいくつかのループを有する強固な二次構造を持ち、このループを改変することによって様々な標的抗原に結合させることが可能となる。Ａｎｔｉｃａｌｉｎは、サイズが１６０～１８０アミノ酸残基であり、リポカリンに由来する。詳細については、Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000)、米国特許第７２５０２９７（Ｂ１）号および米国特許第２００７０２２４６３３号を参照されたい。ａｆｆｉｂｏｄｙは、黄色ブドウ球菌のプロテインＡに由来する足場であり、抗原に結合するように改変することができる。このドメインは、約５８個のアミノ酸で構成される３つのらせん構造の束からなる。ライブラリーは表面残基をランダム化することによって作製されている。詳細については、Protein Eng. Des. SeI. 17, 455-462 (2004)および欧州特許第１６４１８１８（Ａ１）号を参照されたい。Ａｖｉｍｅｒは、Ａドメイン足場ファミリーに由来するマルチドメインタンパク質である。約３５個のアミノ酸からなるネイティブドメインは、明確なジスルフィド結合構造をとっている。Ａドメインファミリーによって示される自然変異を様々に再構成することにより多様性を持たせることができる。詳細については、Nature Biotechnology 23(12), 1556-1561 (2005)およびExpert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (June 2007)を参照されたい。トランスフェリンは単量体の血清輸送糖タンパク質である。トランスフェリンは、許容表面ループにペプチド配列を挿入することによって、様々な標的抗原に結合するように改変することができる。改変されたトランスフェリン足場として、Ｔｒａｎｓ－ｂｏｄｙが挙げられる。詳細については、J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999)を参照されたい。

【０３５７】

設計アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）は、細胞骨格への必須膜タンパク質の結合を媒介するタンパク質ファミリーであるアンキリンに由来する。単一のアンキリンリピートは、２つのαヘリックスとβターンとからなる３３残基のモチーフである。ＤＡＲＰｉｎは、各リピートの第１のαヘリックスおよびβターンの残基をランダム化することによって、様々な標的抗原に結合するよう改変することができる。モジュールの数を増加させることによって、結合に寄与する部分を増加させることができる（親和性成熟と呼ばれる方法）。詳細については、J. MoI. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003)、 J. MoI. Biol. 369, 1015-1028 (2007)および米国特許第２００４０１３２０２８（Ａ１）号を参照されたい。

【０３５８】

フィブロネクチンは、抗原に結合するよう改変することができる足場である。Ａｄｎｅｃｔｉｎは、１５個のヒトフィブロネクチンIII型（ＦＮ３）の繰り返し単位の第１０ドメインの天然のアミノ酸配列のバックボーンからなる。βサンドイッチの一端の３つのループを改変することによって、Ａｄｎｅｃｔｉｎが目的の治療標的を特異的に認識することが可能となる。詳細については、Protein Eng. Des. SeI. 18, 435-444 (2005)、米国特許第２００８０１３９７９１号、国際公開第２００５０５６７６４号および米国特許６８１８４１８（Ｂ１）号を参照されたい。

【０３５９】

ペプチドアプタマーは、抑制された可変ペプチドループが活性部位に挿入された定常足場タンパク質（通常チオレドキシン（ＴｒｘＡ））からなるコンビナトリアル認識分子である。詳細については、Expert Opin. Biol. Ther. 5. 783-797 (2005)を参照されたい。

【０３６０】

ミクロボディは、３～４個のシステイン架橋を含む２５～５０アミノ酸長の天然のマイクロタンパク質に由来し、マイクロタンパク質としては、ＫａｌａｔａＢＩ、コノトキシンおよびｋｎｏｔｔｉｎｓが挙げられる。マイクロタンパク質には、マイクロタンパク質の全体的な折りたたみに影響を及ぼすことなく、２５個までのアミノ酸が含有されるように改変することが可能なループが存在する。改変されたｋｎｏｔｔｉｎドメインの詳細に

ついては、国際公開第２００８０９８７９６号を参照されたい。
【０３６１】
他のエピトープ結合ドメインとして、様々な標的抗原結合特性を改変するための足場として使用されてきたタンパク質が挙げられ、このようなものとしてヒトγＢ－クリスタリンおよびヒトユビキチン（ａｆｆｉｌｉｎ）、ヒトプロテアーゼ阻害剤のｋｕｎｉｔｚ型ドメイン、Ｒａｓ結合タンパク質であるＡＦ－６のＰＤＺドメイン、サソリ毒（カリブドトキシン）、Ｃ型レクチン領域（テトラネクチン）が挙げられ、これらは、Non-Antibody Scaffolds from Handbook of Therapeutic Antibodies (2007, edited by Stefan Dubel)の第７章およびProtein Science 15:14-27 (2006)において再検討されている。本発明のエピトープ結合ドメインは、これらの代替タンパク質ドメインのいずれに由来してもよい。
【０３６２】
結合体または免疫結合体
本発明は、ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原および／もしくはＬＳＲ抗原、または（これらの細胞外ドメイン、一部分、もしくは変異体を包含する）これらの可溶性部分を含む、免疫療法において使用される結合体を包含する。たとえば、本発明は、ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原および／またはＬＳＲ抗原のＥＣＤが免疫グロブリンまたはそのフラグメントに結合された結合体を包含する。本発明は、ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原および／またはＬＳＲ抗原の活性（たとえば免疫共刺激など）を促進または抑制するための上記結合体の使用、および移植片、自己免疫、およびがんに関する本明細書に記載の徴候を治療するための上記結合体の使用を意図したものである。
【０３６３】
別の態様において、本発明は、ペイロードとしての（多くの場合細胞毒性を有する）薬剤に連結された抗体（または一本鎖可変フラグメント［ｓｃＦｖ］などの抗体フラグメント）からなる、たとえばがんの治療などに使用される抗体－薬物結合体（ＡＤＣ）を特徴とする。該抗体はＡＤＣを標的がん細胞に結合させる。次いで、ＡＤＣは細胞によって取り込まれ、薬剤が細胞内に放出される場合が多い。標的化されているため、副作用はより低く、治療域はより広いものとなる。親水性のリンカー（たとえばＰＥＧ４Ｍａｌ）は、ＭＤＲ（多剤耐性）トランスポーターを介して耐性がん細胞から薬剤が排出されるのを防ぐのに役立つ。切断可能なリンカーに基づいたＡＤＣは、治療域があまり有利でないと考えられるが、標的（腫瘍細胞表面抗原）としては、その取り込みが効率的ではないものが切断可能なリンカーにより適していると考えられる。
【０３６４】
別の一態様において、本発明は、細胞毒素、薬剤（たとえば免疫抑制剤）、放射性毒素などの治療成分に結合させた抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および／または抗ＬＳＲ抗体もしくはこれらのフラグメントを含む免疫結合体を特徴とする。本明細書において、このような結合体を「免疫結合体（ｉｍｍｕｎｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ）」と呼ぶ。１以上の細胞毒素を含む免疫結合体を「免疫毒素（ｉｍｍｕｎｏｔｏｘｉｎ）」と呼ぶ。細胞毒素または細胞毒性剤は、細胞に有害な（たとえば破壊するような）あらゆる薬剤を包含する。このような薬剤として、タキソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシンならびにこれらのアナログまたはホモログが挙げられる。治療剤として、たとえば、代謝拮抗剤（たとえばメトトレキサート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、５－フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（たとえばメクロレタミン、チオテパ、クロラムブチル、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）およびロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロホ

スファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ、ならびにｃｉｓ－ジクロロジアミン白金（II）（ＤＤＰ）シスプラチン）、アントラサイクリン（たとえば（以前はダウノマイシンと呼ばれていた）ダウノルビシンおよびドキソルビシン）、抗生物質（たとえばダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（ＡＭＣ））、ならびに抗有糸分裂剤（たとえばビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられる。

【０３６５】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体に共役可能な他の好ましい治療用細胞毒素としては、デュオカルマイシン類、カリケアミシン類、メイタンシン類およびオーリスタチン類、ならびにこれらの誘導体が挙げられる。カリケアミシン抗体結合体の一例としては、市販されているものが挙げられる（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（登録商標）；Ｗｙｅｔｈ）。

【０３６６】

当技術分野において利用可能なリンカー技術を使用して、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体に細胞毒素を共役させることができる。抗体に細胞毒素を結合するために使用されるリンカーの種類としては、ヒドラゾン類、チオエテール類、エステル類、ジスルフィド類、およびペプチド含有リンカーが挙げられるが、これらに限定されない。たとえば、リソソームコンパートメント内の低ｐＨ条件下において切断されやすいリンカー、または腫瘍組織において選択的に発現されるプロテアーゼ（たとえばカテプシン（たとえばカテプシンＢ、Ｃ、Ｄ））などプロテアーゼにより切断されやすいリンカーを選択することができる。

【０３６７】

細胞毒素の種類、リンカーの種類、および抗体に治療剤を結合する方法に関するさらなる論考については、Saito, G. et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P. A. et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, T. M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091;およびSenter, P. D. and Springer, C. J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264.も参照されたい。

【０３６８】

本発明の抗体はさらに、放射性同位体に結合させることにより、細胞毒性を有する放射性医薬品（放射性免疫結合体とも呼ぶ）とすることができる。診断目的または治療目的で使用される抗体に結合できる放射性同位体としては、ヨウ素１３１、インジウム１１１、イットリウム９０およびルテチウム１７７が挙げられるが、これらに限定されない。放射性免疫結合体の作製方法は当技術分野において確立されている。市販されている放射性免疫結合体としては、ゼヴァリン（Ｚｅｖａｌｉｎ）（ＩＤＥＣ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）およびベキサール（Ｂｅｘｘａｒ）（Ｃｏｒｉｘａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）が挙げられ、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体を用い、上記と同様の方法を使用して放射性免疫結合体を作製することができる。

【０３６９】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体結合体を使用して任意の生物学的応答を修飾することができ、薬剤成分は古典的な化学治療剤に限定されないと理解される。たとえば、薬剤成分は所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質としては、たとえば、アブリン、リシンＡ、緑膿菌外毒素、ジフテリア毒素などの酵素的に活性な毒素またはその活性フラグメント；腫瘍壊死因子およびインターフェロンγなどのタンパク質；ならびに、リンホカイン、インターロイキン１（「ＩＬ－１」）、インターロイキン２（「ＩＬ－２」）、インターロイキン６（「ＩＬ－６」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「ＧＭ－ＣＳＦ」）、顆粒球コロニー刺激因子（「Ｇ－ＣＳＦ」）、他の増殖因子などの生物学的応答調節物質が挙げられる。

【０３７０】
抗体に上記のような治療成分を結合するための技術はよく知られており、たとえば、Arnon et al., “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., “Antibodies For Drug Delivery”, in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, in Monoclonal Antibodies ’84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985),およびThorpe et al., “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)を参照されたい。
【０３７１】
二重特異性分子
本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、別の態様において本発明は、抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および／もしくは抗ＬＳＲ抗体またはこれらのフラグメントを含む二重特異性分子を特徴とする。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体またはその抗原結合部分を誘導体化するか、または別の機能分子（たとえば別のペプチドもしくはタンパク質（たとえば別の抗体またはレセプターに対するリガンド））に連結させることによって、少なくとも２種の異なる結合部位または標的分子と結合する二重特異性分子を作製することができる。実際に、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体を誘導体化するか、または２種の他の機能分子に連結させることによって、３種以上の異なる結合部位および／または標的分子と結合する多重特異性分子を作製してもよく、このような多重特異性分子も、本明細書における「二重特異性分子」に包含されると意図される。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる二重特異性分子を作製するためには、たとえば、別の抗体、抗体フラグメント、ペプチド、結合ミメティックなどの１以上の他の結合分子に抗体を（たとえば、化学的結合、遺伝子融合、非共有結合性会合などにより）機能的に連結することによって、二重特異性分子を得ることができる。
【０３７２】
したがって、本発明は、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲに対する少なくとも１つの第１の結合特異性と、第２の標的エピトープに対する第２の結合特異性とを含む二重特異性分子を包含する。本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、第２の標的エピトープは、Ｆｃレセプター、たとえば、ヒトＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）またはヒトＦｃαレセプター（ＣＤ８９）である。したがって、本発明は、ＦｃγＲ、ＦｃαＲまたはＦｃεＲを発現するエフェクター細胞（たとえば単球、マクロファージまたは多核白血球（ＰＭＮ））と、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲを発現する標的細胞との両方に結合することができる二重特異性分子を包含する。このような二重特異性分子は、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲを発現している細胞をエフェクター細胞に近接させ、Ｆｃレセプターを介したエフェクター細胞活性、たとえば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲを発現している細胞に対する食作用、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、サイトカインの放出、スーパーオキシドアニオンの発生などを誘起させる。
【０３７３】
二重特異性分子が多重特異性を有する本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、この分子は、抗Ｆｃ結合特異性および抗６ｆ結合特異性に加えて、第３の結合特異性をさらに含むことができる。一実施形態において、第３の結合特異性は、抗増強因子部分（

ａｎｔｉ－ｅｎｈａｎｃｅｍｅｎｔ　ｆａｃｔｏｒ（ＥＦ）ｐｏｒｔｉｏｎ）、たとえば、細胞毒性活性に関与する表面タンパク質と結合することによって標的細胞に対する免疫応答を増強させる分子である。

【０３７４】

「抗増強因子部分（ａｎｔｉ－ｅｎｈａｎｃｅｍｅｎｔ　ｆａｃｔｏｒ　ｐｏｒｔｉｏｎ）」は、任意の分子（たとえば抗原やレセプター）と結合することによって、Ｆｃレセプターまたは標的細胞抗原を結合する決定基の効果を増強させる抗体、機能的抗体フラグメントまたはリガンドであってもよい。「抗増強因子部分」は、Ｆｃレセプターまたは標的細胞抗原と結合することができる。あるいは、抗増強因子部分は、第１の結合特異性および第２の結合特異性によって結合する対象とは異なる対象に結合することができる。たとえば、抗増強因子部分は、（たとえば、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ８、ＣＤ２８、ＣＤ４、ＣＤ４０、ＩＣＡＭ－１、または標的細胞に対する免疫応答を増強させる別の免疫細胞を介して）細胞傷害性Ｔ細胞と結合することができる。

【０３７５】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、二重特異性分子は結合特異性として少なくとも１つの抗体またはその抗体フラグメントを含み、このような抗体またはその抗体フラグメントとして、たとえば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、または一本鎖Ｆｖが挙げられる。また、Ｌａｄｎｅｒらによる米国特許第４，９４６，７７８号（この内容は参照により本明細書に明示的に組み込まれる）に記載されているように、この抗体は、軽鎖または重鎖の二量体またはその任意の最小フラグメント（Ｆｖや一本鎖構造など）であってもよい。

【０３７６】

一実施形態では、Ｆｃγレセプターに対する結合特異性はモノクローナル抗体によって付与され、この結合はヒト免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）によってブロックされない。本明細書において「ＩｇＧレセプター」は、第１染色体に位置する８個のγ鎖遺伝子のいずれかを指す。これらの遺伝子は、合計１２種の膜貫通型または可溶性レセプターアイソフォームをコードし、これらのアイソフォームは、３つのＦｃγレセプタークラス、すなわち、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲII（ＣＤ３２）およびＦｃγＲIII（ＣＤ１６）に分類される。好ましい一実施形態において、Ｆｃγレセプターはヒト高親和性ＦｃγＲＩである。ヒトＦｃγＲＩは７２ｋＤａの分子であり、単量体のＩｇＧに対して高親和性（$10^8 \sim 10^9 M^{-1}$）を示す。

【０３７７】

特定の好ましい抗Ｆｃγモノクローナル抗体の作製およびその特性評価は、ＦａｎｇｅｒらによってＰＣＴ国際公開第８８／００５５２号および米国特許第４，９５４，６１７号（これらの教示全体は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。これらの抗体は、ＦｃレセプターのＦｃγ結合部位とは異なる部位でＦｃγＲＩ、ＦｃγＲIIまたはＦｃγＲIIIのエピトープに結合するため、これらの結合は、生理的濃度のＩｇＧによって実質的にブロックされない。本発明に有用な抗ＦｃγＲＩ抗体は、具体的には、ｍＡｂ２２、ｍＡｂ３２、ｍＡｂ４４、ｍＡｂ６２およびｍＡｂ１９７である。ｍＡｂ３２を産生するハイブリドーマは、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ受託番号：ＨＢ９４６９）から入手可能である。別の実施形態において、抗Ｆｃγレセプター抗体はモノクローナル抗体２２（Ｈ２２）のヒト化形態である。Ｈ２２抗体の作製および特性評価については、Graziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol. 155 (10): 4996-5002およびＰＣＴ国際公開第９４／１０３３２号に記載されている。Ｈ２２抗体産生細胞株はＨＡＯ２２ＣＬＩの名称でＡｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎに寄託されており、その受託番号はＣＲＬ１１１７７である。

【０３７８】

さらに別の好ましい実施形態では、Ｆｃレセプターに対する結合特異性は、たとえばＦｃαレセプター（ＦｃαＲＩ（ＣＤ８９））などのヒトＩｇＡレセプターに結合する抗体

によって付与され、その結合はヒト免疫グロブリンＡ（ＩｇＡ）によってブロックされないことが好ましい。「ＩｇＡレセプター」は、第１９染色体に位置する１種のα遺伝子（ＦｃαＲＩ）の遺伝子産物を含むと意図される。この遺伝子は５５～１１０ｋＤａの選択的スプライシング膜貫通型アイソフォームをいくつかコードすることが知られている。

【０３７９】

ＦｃαＲＩ（ＣＤ８９）は、単球／マクロファージ、好酸球および好中球上に構成的に発現されているが、非エフェクター細胞集団には発現されていない。ＦｃαＲＩは、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２の両方に対して中程度の親和性（約$5\times10^{7}M^{-1}$）を有しているが、これは、Ｇ－ＣＳＦやＧＭ－ＣＳＦなどのサイトカインへの暴露により増加する（Morton, H. C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440）。ＦｃαＲＩに特異的な４種のモノクローナル抗体がＡ３、Ａ５９、Ａ６２およびＡ７７として同定されており、これらはＩｇＡリガンド結合ドメイン外のＦｃαＲＩに結合することが報告されている（Monteiro, R. C. et al. (1992) J. Immunol. 148:1764）。

【０３８０】

ＦｃαＲＩおよびＦｃγＲＩは、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる二重特異性分子において使用されるトリガーレセプターとして好ましく、この理由として、

（１）主として免疫エフェクター細胞（たとえば、単球、ＰＭＮ、マクロファージ、樹状細胞）上に発現されること；

（２）高レベル（たとえば細胞１個あたり５，０００～１００，０００）に発現されること；

（３）細胞毒性活性（たとえば、ＡＤＣＣ、食作用）を媒介するものであること；および

（４）これらのレセプターに向けられた抗原（自己抗原を含む）の抗原提示の増強を媒介することが挙げられる。

【０３８１】

ヒトモノクローナル抗体が好ましいが、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる二重特異性分子において使用することができる別の抗体は、マウスモノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体である。

【０３８２】

本発明の二重特異性分子は、当技術分野で公知の方法を使用して、構成要素である結合特異性成分同士を結合させることによって作製することができ、該結合特異性としては、たとえば、抗ＦｃＲ結合特異性、ならびに抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ結合特異性、抗ＶＳＩＧ１０結合特異性、抗ＴＭＥＭ２５結合特異性および／または抗ＬＳＲ結合特異性が挙げられる。たとえば、二重特異性分子の結合特異性成分はそれぞれ別個に作製した後に結合させてもよい。結合特異性成分がタンパク質またはペプチドである場合、様々な結合剤または架橋剤を使用して共有結合によりこれらを結合させることができる。架橋剤としては、プロテインＡ、カルボジイミド、Ｎ－スクシンイミジル－Ｓ－アセチル－チオアセタート（ＳＡＴＡ）、５，５’－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸（ＤＴＮＢ）、ｏ－フェニレンジマレイミド（ｏＰＤＭ）、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオナート（ＳＰＤＰ）、およびスルホスクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシラート（スルホ－ＳＭＣＣ）が挙げられる（たとえば、Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686;および Liu, M A et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648を参照されたい）。他の方法として、Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83, および Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375に記載されているものが挙げられる。結合するための薬剤としてはＳＡＴＡおよびスルホ－ＳＭＣＣが好ましく、これらはいずれもピアスケミカル社（イリノイ州ロックフォード）より入手可能である。

【０３８３】

結合特異性成分が抗体である場合、２つの重鎖のＣ末端ヒンジ領域に位置するスルフヒドリル結合を介してこれらを結合させてもよい。特に好ましい実施形態では、これらを結合させる前に、ヒンジ領域を修飾して奇数個、好ましくは１個のスルフヒドリル残基を含

有させる。

【０３８４】

あるいは、両方の結合特異性成分を同一ベクター内にコードし、同一宿主細胞において発現および構築させることができる。二重特異性分子が、ｍＡｂ×ｍＡｂ融合タンパク質、ｍＡｂ×Ｆａｂ融合タンパク質、Ｆａｂ×Ｆ（ａｂ’）$_2$融合タンパク質、またはリガンド×Ｆａｂ融合タンパク質である場合、この方法は特に有用である。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる二重特異性分子は、１つの一本鎖抗体と結合決定基とを含む一本鎖分子、または２つの結合決定基を含む一本鎖二重特異性分子であってもよい。二重特異性分子は少なくとも２つの一本鎖分子を含んでいてもよい。二重特異性分子の作製方法は、たとえば、米国特許第５，２６０，２０３号；米国特許第５，４５５，０３０号；米国特許第４，８８１，１７５号；米国特許第５，１３２，４０５号；米国特許第５，０９１，５１３号；米国特許第５，４７６，７８６号；米国特許第５，０１３，６５３号；米国特許第５，２５８，４９８号；および米国特許第５，４８２，８５８号に記載されている。

【０３８５】

二重特異性分子の特定の標的への結合は、たとえば、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、放射免疫測定法（ＲＩＡ）、ＦＡＣＳ分析、バイオアッセイ（たとえば増殖抑制）またはウェスタンブロットアッセイによって確認することができる。これらのアッセイはそれぞれ、通常、目的とする特定のタンパク質－抗体複合体の存在を、この目的複合体に特異的な標識試薬（たとえば抗体）を使用して検出する。たとえば、ＦｃＲ－抗体複合体は、たとえば、このＦｃＲ－抗体複合体を認識し特異的に結合する酵素結合抗体または抗体フラグメントを使用して検出することができる。あるいは、この複合体は、様々な他のイムノアッセイの任意のものを使用して検出することができる。たとえば、抗体を放射能で標識し、放射免疫測定法（ＲＩＡ）において使用することができる（たとえば、Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986（この文献は参照により本明細書に組み込まれる）を参照を参照されたい）。放射性同位体は、γカウンターもしくはシンチレーションカウンターを使用する方法、またはオートラジオグラフィによって検出することができる。

【０３８６】

タンパク質修飾

融合タンパク質

実施形態の少なくともいくつかによれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ融合ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０融合ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５融合ポリペプチドおよび／またはＬＳＲ融合ポリペプチドは、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質の全体または一部を含む第１の融合パートナーを有し、この第１の融合パートナーは、第２のポリペプチドに直接またはこれら２種のタンパク質を連結するのに有用なリンカーペプチド配列もしくは化学的リンカーを介して融合されている。本明細書に記載されているように、本発明のＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／またはＬＳＲポリペプチドを、第２のポリペプチドと融合させることによって融合タンパク質を形成させてもよい。第２のポリペプチドを存在させることによって、ＬＹ６Ｇ６Ｆ融合ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０融合ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５融合ポリペプチドおよび／またはＬＳＲ融合ポリペプチドの溶解性、安定性、親和性、および／または原子価を改変することができる。本明細書において「原子価」は、１分子あたりに含まれる、ある原子が結合可能な結合部位数を指す。一実施形態では、第２のポリペプチドは、別のペプチド源または別のタンパク質に由来するポリペプチドである。

【０３８７】

実施形態の少なくともいくつかによれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質もしくはフラグメント

は、本明細書に記載の免疫関連障害、感染性障害および／またはがんに対する治療活性を得るために選択される。

【０３８８】

一実施形態では、第２のポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖定常領域のドメインを１つ以上含み、ヒンジ部に相当するアミノ酸配列；ヒト免疫グロブリンＣγ１鎖、Ｃγ２鎖、Ｃγ３鎖もしくはＣγ４鎖のC_H2領域およびC_H3領域、もしくはヒンジ部に相当するアミノ酸配列；またはマウス免疫グロブリンＣγ２ａ鎖のC_H2領域およびC_H3領域に相当するアミノ酸配列を有していることが好ましい。配列番号７０は、ヒト免疫グロブリンＣγ１鎖のヒンジ部、C_H2領域およびC_H3領域の典型的な配列を示す。

【０３８９】

実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明の融合タンパク質は二量体融合タンパク質である。二量体融合タンパク質の任意の形態では、二量体は、２つの免疫グロブリン重鎖のヒンジ領域においてシステイン残基が共有結合を形成することによって生じ、このシステイン残基は、二量化した通常の免疫グロブリン重鎖においてジスルフィド結合されているシステイン残基と同じである。このようなタンパク質を、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／もしくはＬＳＲポリペプチド、またはこれらのフラグメントもしくは融合タンパク質と呼ぶ。

【０３９０】

一実施形態では、免疫グロブリン定常ドメインは、特定の種類の細胞への結合を増強させるか、バイオアベイラビリティを増加させるか、またはＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／もしくはＬＳＲポリペプチド、またはこれらの融合タンパク質もしくはフラグメントの安定性を増加させる１個以上のアミノ酸の挿入、欠失または置換を含んでいてもよい。適切なアミノ酸置換には、上述したように保存的置換および非保存的置換が包含される。

【０３９１】

融合タンパク質は、２つ以上の融合タンパク質を二量化または多量体化する機能を有するドメインを含んでいてもよい。ペプチド／ポリペプチドリンカードメインは、別個のドメインであってもよく、あるいは、融合タンパク質の他のドメイン（ＬＹ６Ｇ６ＦＬＳＲポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ＬＳＲポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ＬＳＲポリペプチドおよび／もしくはＬＳＲポリペプチドまたは第２のポリペプチド）のうちの１つに含まれていてもよい。同様に、融合タンパク質を二量化または多量体化する機能を有するドメインは、別個のドメインであってもよく、あるいは、融合タンパク質の他のドメイン（ＬＹ６Ｇ６ＦＬＳＲポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ＬＳＲポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ＬＳＲポリペプチドおよび／もしくはＬＳＲポリペプチド、第２のポリペプチド、またはペプチド／ポリペプチドリンカードメイン）のうちの１つに含まれていてもよい。一実施形態では、二量化／多量体化ドメインと、ペプチド／ポリペプチドリンカードメインは同じものである。

二量化／多量体化ドメインおよびリンカーを説明するためのさらに具体的な例（ただしこれらに限定されない）については後述する。

【０３９２】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる、本明細書に開示されている融合タンパク質は、式Ｉ：Ｎ－R_1－R_2－R_3－Ｃ（式中、「Ｎ」は融合タンパク質のＮ末端を表し、「Ｃ」は融合タンパク質のＣ末端を表す）で示される。さらなる実施形態では、「R_1」は、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／またはＬＳＲポリペプチドであり、「R_2」は任意のペプチド／ポリペプチドリンカードメインまたは化学的リンカードメインであり、「R_3」は第２のポリペプチドである。

あるいは、R_3は、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／またはＬＳＲポリペプチドであってもよく、R_1は、第２のポリペプチドであってもよい。様々なリンカーの非限定的な例についての詳細な説明は後述す

る。
【０３９３】
融合タンパク質は、１個以上のアミノ酸で構成されるリンカーペプチド（たとえばＧＳ）を必要に応じて使用して、１つ以上の「半減期を延長する成分」に融合された、本明細書に記載のＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチドフラグメント、ＶＳＩＧ１０ポリペプチドフラグメント、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドフラグメントおよび／またはＬＳＲポリペプチドフラグメントを含んでいてもよい。「半減期を延長する成分」は、任意の成分であってよく、たとえば、タンパク質に付加した場合に、対象の体内（たとえば対象の血漿中）における該タンパク質のインビボ半減期を延長するポリペプチド、小分子、ポリマーである。たとえば、本発明の実施形態において半減期を延長する成分は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、モノメトキシＰＥＧ（ｍＰＥＧ）、または免疫グロブリン（免疫グロブリン）である。本発明の実施形態において、ＰＥＧは、５ｋＤａ、１０ｋＤａ、１２ｋＤａ、２０ｋＤａ、３０ｋＤａ、４０ｋＤａ、５０ｋＤａ、もしくはそれよりも大きい成分であるか、またはエチレングリコール単位を約１２０００個含むもの（ＰＥＧ１２０００）である。
【０３９４】
融合タンパク質は化学的合成法によって作製してもよく、「接合」は合成中または合成後に化学的に行ってもよい。必要に応じて架橋およびこのような他の方法を（必要に応じて上記の遺伝子レベルの融合法とともに）使用してもよく、このような方法は、たとえば、Ｗａｌｌｎｅｒらに付与された米国特許第５，５４７，８５３号（この文献はその全体が本明細書に記載されているかのように、非限定的な例示のみを目的として参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。
【０３９５】
本発明によれば、融合タンパク質は、免疫グロブリンの定常領域を含む免疫グロブリンの一部分と、本発明のタンパク質とを融合させることによって作製してもよい。この免疫グロブリンの一部分は重鎖定常領域を含むことがより好ましく、この重鎖定常領域はヒト重鎖定常領域であってもよく、ヒト重鎖定常領域であることがより好ましい。この重鎖定常領域は、ＩｇＧ重鎖定常領域であることが最も好ましく、Ｆｃ鎖であってもよく、Ｆｃ鎖であることが最も好ましく、ヒンジ領域すなわちC_H2ドメインおよびC_H3ドメインを含むＩｇＧＦｃフラグメントであることが最も好ましい。Ｆｃ鎖は、公知のＦｃ鎖または「野性型」Ｆｃ鎖であってもよく、あるいは、変異させたり切断してもよい。たとえば、エフェクター機能の向上、半減期の制御、組織到達性、生物物理学的特性（安定性など）の増強、および作製効率の向上（およびコスト削減）などを目的として、融合タンパク質のＦｃ部分を、アイソタイプもしくはサブクラスに応じて変化させてもよく、キメラもしくはハイブリッドとしてもよく、または修飾してもよい。本明細書において開示された融合タンパク質を構築するのに有用な修飾およびこのような融合タンパク質を製造する方法は、当技術分野において数多く知られている。たとえば、Mueller, et al, MoI. Immun., 34(6):441-452 (1997), Swann, et al., Cur. Opin. Immun., 20:493-499 (2008), およびPresta, Cur. Opin. Immun. 20:460-470 (2008)を参照されたい。実施形態のいくつかでは、Ｆｃ領域はネイティブのＩｇＧ１Ｆｃ領域、ＩｇＧ２Ｆｃ領域またはＩｇＧ４Ｆｃ領域である。実施形態のいくつかでは、Ｆｃ領域は、ハイブリッド、たとえばＩｇＧ２Ｆｃ定常領域／ＩｇＧ４Ｆｃ定常領域からなるキメラである。
【０３９６】
Ｆｃ領域への修飾としては、Ｆｃγレセプターおよび補体への結合を防ぐためのＩｇＧ４の修飾、１つ以上のＦｃγレセプターへの結合性を向上させるためのＩｇＧ１修飾、エフェクター機能を最小化するためのＩｇＧ１の修飾（アミノ酸変化）、（通常、宿主の発現を変化させるまたは２９７位のＡｓｎを置換することによる）グリカンを改変／除去したＩｇＧ１、およびＦｃＲｎへのｐＨ依存性結合性が改変されたＩｇＧ１が挙げられるが、これらに限定されない。Ｆｃ領域はヒンジ領域全体またはヒンジ領域の一部を含んでいてもよい。
【０３９７】

別の実施形態では、Ｆｃドメインは、低親和性および抑制性のＦｃレセプターＣＤ３２Ｂ（ＦｃγＲＩＩＢ）への結合を低下させ、かつ、低親和性および活性化性のＦｃレセプターＣＤ１６Ａ（ＦｃγＲＩＩＩＡ）への結合を野生型と同等レベルに保つまたはＣＤ１６Ａ（ＦｃγＲＩＩＩＡ）への結合を増強させる、１つ以上のアミノ酸の挿入、欠失、または置換を含んでいてもよい。

【０３９８】

別の実施形態は、ＦｃＲ（Ｆｃレセプター）に対する結合を低下させることによって半減期を増加させたＩｇＧ２－ＩｇＧ４ハイブリッドおよびＩｇＧ４突然変異体を含む。代表的なＩｇＧ２－ＩｇＧ４ハイブリッドおよびＩｇＧ４突然変異体は、Angal, S. et al., Molecular Immunology, 30(l):105-108 (1993); Mueller, J. et al., Molecular Immunology, 34(6): 441-452 (1997);およびＷａｎｇらに付与された米国特許第６，９８２，３２３号
に記載されている。実施形態のいくつかでは、ＩｇＧ１ドメインおよび／またはＩｇＧ２ドメインを除去する。たとえば、Ａｎｇａｌらは、２４１位のセリンをプロリンで置換したＩｇＧ１およびＩｇＧ２を記載している。

【０３９９】

さらなる実施形態では、Ｆｃドメインは、ＣＤ１６Ａへの結合を増強させる、アミノ酸の挿入、欠失、または置換を含む。ヒトＩｇＧ１のＦｃドメインにおいて置換数を多くすると、ＣＤ１６Ａへの結合が増加し、ＣＤ３２Ｂへの結合が低下することが当技術分野において知られており、これは、Stavenhagen, et al., Cancer Res. , 57(18):8882-90 (2007)に記載されている。ＣＤ３２Ｂへの結合が減少し、かつ／またはＣＤ１６Ａへの結合が増加したヒトＩｇＧ１Ｆｃドメイン変異体として典型的なものは、Ｆ２４３Ｌ置換、Ｒ９２９Ｐ置換、Ｙ３００Ｌ置換、Ｖ３０５Ｉ置換またはＰ２９６Ｌ置換を含んでいる。これらのアミノ酸置換は、ヒトＩｇＧ１Ｆｃドメインにおいてどのように組み合わせてもよい。

【０４００】

一実施形態では、ヒトＩｇＧ１Ｆｃドメイン変異体は、Ｆ２４３Ｌ置換、Ｒ９２９Ｐ置換およびＹ３００Ｌ置換を含んでいる。別の実施形態では、ヒトＩｇＧ１Ｆｃドメイン変異体は、Ｆ２４３Ｌ置換、Ｒ９２９Ｐ置換、Ｙ３００Ｌ置換、Ｖ３０５Ｉ置換およびＰ２９６Ｌ置換を含んでいる。別の実施形態では、ヒトＩｇＧ１Ｆｃドメイン変異体はＮ２９７Ａ／Ｑ置換を含んでおり、これらの変異体においてはＦｃγＲ結合が除去されている。変異体のタイプを説明するためのさらに具体的な例（ただしこれらに限定されない）は、２００６年２月１６日に公開された米国特許出願第２００６００３４８５２号（この文献はその全体が本明細書に記載されているかのように参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。「Ｆｃ鎖」は、任意のタイプのＦｃフラグメントを包含してもよい。

【０４０１】

ＩｇＧサブクラスにおいて、抗体定常領域を介した活性に重要な特定のアミノ酸残基のいくつかが同定されている。したがって、これらの特定のアミノ酸を付加、置換または除去することによって、免疫グロブリン定常領域を介した特定の活性を付加または除去することができる。さらに、特定の変更は、たとえば脱グリコシル化など、および／または他の所望の変化をＦｃ鎖にもたらしうる。少なくともいくつかの変更によって、望ましくないと考えられるＦｃの機能、たとえば、より詳しくは後述するような免疫系における望ましくない効果などを必要に応じてブロックしてもよい。

【０４０２】

融合タンパク質の活性を調節するために導入されてもよいＦｃに対する変異としては、具体的には、（以下、Kabat EA et al: Sequences of Proteins of Immunological Interest. US Department of Health and Human Services, NIH, 1991においてＫａｂａｔにより提供されたＦｃ配列の命名法に従って記載する）２２０Ｃ→Ｓ；２３３～２３８ＥＬＬＧＧＰ→ＥＡＥＧＡＰ；２６５Ｄ→Ａ（好ましくは４３４Ｎ→Ａと組み合わせる）；（たとえばＮ－グリコシル化をブロックするための）２９７Ｎ→Ａ；３１８～３２２ＥＹＫＣ

Ｋ→ＡＹＡＣＡ；３３０～３３１ＡＰ→ＳＳ；またはこれらの組み合わせなどの変更が挙げられるが、これらに限定されない（これらの変異およびその効果については、たとえば、M. Clark, “Chemical Immunol and Antibody Engineering”, pp 1-31の説明を参照されたい）。上記の変化を特徴とするＦｃ鎖の構築物は、ヒンジ領域とC_H2ドメインおよびC_H3ドメインとの組み合わせを含んでもよく、この態様が好ましい。

【０４０３】

上記の変異は、所望の特性を増強するため、あるいは、望ましくない特性をブロックするために行ってもよい。たとえば、抗体の脱グリコシル化は、所望の結合能を保持しつつ、望ましくない作用でありうるＴ細胞枯渇をブロックするか、またはサイトカイン放出を誘起することが示された（M. Clark, “Chemical Immunol and Antibody Engineering”, pp 1-31を参照されたい）。３３１位のプロリンをセリンで置換することによって、望ましくない機能であると考えられうる補体活性化能をブロックしてもよい（M. Clark, “Chemical Immunol and Antibody Engineering”, pp 1-31を参照されたい）。さらに、このような変更と組み合わせて３３０位のアラニンをセリンに変更することによって、補体活性化能をブロックするという所望の効果を増強させてもよい。

【０４０４】

２３５位および２３７位の残基は抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）に関与することが示されていることから、ＡＤＣＣが望ましくない機能であると考えられる場合、２３３位～２３８位の残基からなるブロックを記載されているように変更することによってもこの活性をブロックすることができる。

【０４０５】

ＩｇＧ１のＦｃにおける２２０位の残基は通常システインであり、この部位において重鎖と軽鎖とが共有結合を形成する。この残基を別のアミノ酸残基（たとえばセリン）に置換することによって、任意のタイプの共有結合の形成を妨げてもよく、（M. Clark, “Chemical Immunol and Antibody Engineering”, pp 1-31を参照されたい）欠失または切断によってこれを行ってもよい。

【０４０６】

２６５位の残基および４３４の残基における上記の変更は、Ｆｃレセプターへの結合を低下させるまたはブロックするために行ってもよく、これによって、免疫系の機能と関連するＦｃの望ましくない機能性をブロックしてもよい（“Binding site on Human IgG1 for Fc Receptors”, Shields et al, Vol 276, pp 6591-6604, 2001を参照されたい）。

【０４０７】

上記の変更は、任意の変更を説明することのみを目的とし、これらに限定されることを全く意図しない。さらに、上記の記載は、単一の仮説に拘束されることを望むものではなく、説明することのみを目的として提供される。

【０４０８】

さらなる実施形態では、融合タンパク質には、免疫グロブリン（Ｉｇ）のＦｃ領域に融合させたＬＹ６Ｇ６Ｆの細胞外ドメインまたはそのフラグメントが包含される。組換えＩｇＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは融合タンパク質は、上述したように、ヒトＩｇＧ１またはマウスＩｇＧ２ａのＦｃ領域に、ＬＹ６Ｇ６Ｆ細胞外ドメインまたはそのフラグメントのコード領域を融合させることによって作製することができる（Chapoval, et al., Methods MoI. Med, 45:247-255 (2000)）。

【０４０９】

ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤは、ヒト免疫グロブリンＦｃに融合させたヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤのアミノ酸配列を含む融合タンパク質を指してもよい。この融合タンパク質は、配列番号７０および１５６のいずれかに示されるヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合させた、配列番号２に示されるヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤのアミノ酸配列を含んでいてもよい。上記の融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号７１または配列番号１７２で示されてもよい。

【０４１０】

さらなる実施形態では、融合タンパク質には、免疫グロブリン（Ｉｇ）のＦｃ領域に融

合させたＶＳＩＧ１０の細胞外ドメインまたはそのフラグメントが包含される。組換えＩｇＶＳＩＧ１０ポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは融合タンパク質は、上述したように、ヒトＩｇＧ１またはマウスＩｇＧ２ａのＦｃ領域に、ＶＳＩＧ１０細胞外ドメインまたはそのフラグメントのコード領域を融合させることによって作製することができる（Chapoval, et al., Methods MoI. Med, 45:247-255 (2000)）。

【０４１１】

ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤは、ヒト免疫グロブリンＦｃに融合させたヒトＶＳＩＧ１０　ＥＣＤのアミノ酸配列を含む融合タンパク質を指してもよい。この融合タンパク質は、配列番号７０および１５６のいずれかに示されるヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合させた、配列番号４および６のいずれかで示されるアミノ酸配列から選択されるヒトＶＳＩＧ１０　ＥＣＤのアミノ酸配列を含んでいてもよい。上記の融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号７２、７３、１７３および１７４のいずれかで示されてもよい。

【０４１２】

さらなる実施形態では、融合タンパク質には、免疫グロブリン（Ｉｇ）のＦｃ領域に融合させたＴＭＥＭ２５の細胞外ドメインまたはそのフラグメントが包含される。組換えＩｇＴＭＥＭ２５ポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは融合タンパク質は、上述したように、ヒトＩｇＧ１またはマウスＩｇＧ２ａのＦｃ領域に、ＴＭＥＭ２５細胞外ドメインまたはそのフラグメントのコード領域を融合させることによって作製することができる（Chapoval, et al., Methods MoI. Med, 45:247-255 (2000)）。

【０４１３】

ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤは、ヒト免疫グロブリンＦｃに融合させたヒトＴＭＥＭ２５　ＥＣＤのアミノ酸配列を含む融合タンパク質を指してもよい。この融合タンパク質は、配列番号７０および１５６のいずれかに示されるヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合させた、配列番号８に示されるヒトＴＭＥＭ２５　ＥＣＤのアミノ酸配列を含んでいてもよい。上記の融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号７４および１７５のいずれかで示されてもよい。

【０４１４】

さらなる実施形態では、融合タンパク質には、免疫グロブリン（Ｉｇ）のＦｃ領域に融合させたＬＳＲの細胞外ドメインまたはそのフラグメントが包含される。組換えＩｇＬＳＲポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは融合タンパク質は、上述したように、ヒトＩｇＧ１またはマウスＩｇＧ２ａのＦｃ領域に、ＬＳＲ細胞外ドメインまたはそのフラグメントのコード領域を融合させることによって作製することができる（Chapoval, et al., Methods MoI. Med, 45:247-255 (2000)）。

【０４１５】

ＬＳＲ　ＥＣＤは、ヒト免疫グロブリンＦｃに融合させたヒトＬＳＲ　ＥＣＤのアミノ酸配列を含む融合タンパク質を指してもよい。この融合タンパク質は、配列番号７０および１５６のいずれかに示されるヒトＩｇＧ１　Ｆｃに融合させた、配列番号１２、１４、１５、１６、１７、１８、４７、４８、４９および５０のいずれかで示されるアミノ酸配列から選択されるヒトＬＳＲ　ＥＣＤのアミノ酸配列を含んでいてもよい。上記の融合タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号７５、７６、７７、７８、７９、８０、１７６、１７７、１７８、１７９、１８０、および１８１のいずれかで示されてもよい。

【０４１６】

上記で例示した融合タンパク質に、本明細書に記載の変異体の任意の組み合わせを組み込むことができる。別の実施形態では、上記で例示した融合タンパク質の末端リシンは欠失される。

【０４１７】

開示された融合タンパク質は標準的な分子生物学的技術を使用して単離することができる。たとえば、ＬＹ６Ｇ６Ｆリペプチド、ＶＳＩＧ１０リペプチド、ＴＭＥＭ２５リペプチドおよび／もしくはＬＳＲポリペプチド、またはこれらのフラグメントもしくは融合タンパク質をコードするＤＮＡ配列を含む発現ベクターを、リン酸カルシウム沈殿法によって２９３細胞にトランスフェクトし、血清を含まないＤＭＥＭ中で培養する。７２時間後

に上清を回収し、プロテインＧ　ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ（登録商標）カラム（ファルマシア（スウェーデン、ウプサラ））、好ましくはプロテインＡ　ＳＥＰＨＡＲＯＳＥカラムで融合タンパク質を精製する。ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／もしくはＬＳＲポリペプチド、またはこれらのフラグメントもしくは融合タンパク質をコードするＤＮＡ配列は、ＧＰＥｘ（登録商標）レトロベクターにトランスフェクトし、レトロベクターによる形質導入を４サイクル行った後にＣＨＯ－Ｓ細胞において発現させてもよい。融合タンパク質はプロテインＡクロマトグラフィーを使用して上清から精製する。

【０４１８】

別の実施形態では、第２のポリペプチドは、ＬＹ６Ｇ６ＦＲ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０Ｒ融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５Ｒ融合タンパク質および／またはＬＳＲ融合タンパク質にさらなる分子を結合することができる結合ドメインを有していてもよい。このような一実施形態では、この結合分子は、特定の臓器または組織に融合タンパク質をターゲティングさせることができる。このようなターゲティングを行うドメインおよび／または分子を説明するためのさらに具体的な例（ただしこれらに限定されない）は後述する。

【０４１９】

別のこのような実施形態では、結合分子は、ＬＹ６Ｇ６Ｆ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５融合タンパク質および／またはＬＳＲ融合タンパク質の効果を強化または増強することができる別の免疫調節剤である。別の実施形態では、結合分子はポリエチレングリコール（ＰＥＧ）である。

【０４２０】

ペプチドリンカードメインまたはポリペプチドリンカードメイン

開示されたＬＹ６Ｇ６Ｆ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５融合タンパク質および／またはＬＳＲ融合タンパク質は、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／またはＬＳＲポリペプチドから第２のポリペプチドを隔てるペプチドリンカードメインまたはポリペプチドリンカードメインを含んでいてもよい。一実施形態では、リンカードメインは、免疫グロブリンのヒンジ領域を含んでいる。さらなる実施形態では、ヒンジ領域はヒト免疫グロブリンに由来する。ヒンジ領域が得ることができる適切なヒト免疫グロブリンとしては、ＩｇＧ、ＩｇＤおよびＩｇＡが挙げられる。さらなる実施形態では、ヒンジ領域はヒトＩｇＧに由来する。免疫グロブリンヒンジ領域および他のドメインのアミノ酸配列は当技術分野においてよく知られている。一実施形態では、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／またはＬＳＲ融合ポリペプチドは、ヒト免疫グロブリンＣγ１鎖のヒンジ領域、C_H2領域およびC_H3領域を含んでいてもよく、このヒト免疫グロブリンＣγ１鎖は、２２０位（完全長ヒトＩｇＧ１に従った番号付け、配列番号７０の５位）のＣｙｓがＳｅｒで置換されていてもよく（配列番号１５６）、配列番号７０：

ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

に示されるアミノ酸配列と少なくとも８５％、９０％、９５％、９９％または１００％の配列相同性を有する。ヒンジ領域は、配列番号７０および１５６のいずれかの、１位、２位、３位、４位、もしくは５位のアミノ酸もしくはこれらの組み合わせを除去することによって短縮することができる。一実施形態では、配列番号７０および１５６のいずれかの、１位～５位のアミノ酸を欠失させる。２２０位のＣｙｓがＳｅｒで置換されたヒト免疫グロブリンＣγ１鎖のヒンジ領域、C_H2領域およびC_H3領域で構成される典型的なＬＹ６Ｇ６Ｆ融合ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０融合ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５融合ポリペ

プチドおよび／またはＬＳＲ融合ポリペプチドは、配列番号７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、および８０に示されている。

【０４２１】

別の実施形態では、ＬＹ６Ｇ６Ｆ融合ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０融合ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５融合ポリペプチドおよび／またはＬＳＲ融合ポリペプチドは、配列番号１５７：

ＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤ
ＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨ
ＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴ
ＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮ
ＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥ
ＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

に示されるアミノ酸配列と少なくとも８５％、９０％、９５％、９９％または１００％の配列相同性を有するヒト免疫グロブリンＣγ１鎖のＣ$_{H}$２領域およびＣ$_{H}$３領域を含む。別の実施形態では、ＬＹ６Ｇ６Ｆ融合ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０融合ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５融合ポリペプチドおよび／またはＬＳＲ融合ポリペプチドは、配列番号１５８：

ＥＰＲＧＰＴＩＫＰＣＰＰＣＫＣＰＡＰＮＬＬＧＧＰＳＶＦＩＦＰＰＫＩＫＤＶＬＭＩＳ
ＬＳＰＩＶＴＣＶＶＶＤＶＳＥＤＤＰＤＶＱＩＳＷＦＶＮＮＶＥＶＨＴＡＱＴＱＴＨＲＥ
ＤＹＮＳＴＬＲＶＶＳＡＬＰＩＱＨＱＤＷＭＳＧＫＥＦＫＣＫＶＮＮＫＤＬＰＡＰＩＥＲ
ＴＩＳＫＰＫＧＳＶＲＡＰＱＶＹＶＬＰＰＰＥＥＥＭＴＫＫＱＶＴＬＴＣＭＶＴＤＦＭＰ
ＥＤＩＹＶＥＷＴＮＮＧＫＴＥＬＮＹＫＮＴＥＰＶＬＤＳＤＧＳＹＦＭＹＳＫＬＲＶＥＫ
ＫＮＷＶＥＲＮＳＹＳＣＳＶＶＨＥＧＬＨＮＨＨＴＴＫＳＦＳＲＴＰＧＫ

に示されるアミノ酸配列と少なくとも８５％、９０％、９５％、９９％または１００％の配列相同性を有するマウス免疫グロブリンＣγ２ａ鎖のＣ$_{H}$２領域およびＣ$_{H}$３領域を含む。別の実施形態では、リンカードメインは、上記の免疫グロブリンのヒンジ領域を含んでおり、１以上のさらなる免疫グロブリンドメインをさらに含む。

【０４２２】

他の適切なペプチド／ポリペプチドリンカードメインとして、天然または非天然のペプチドまたはポリペプチドが挙げられる。ペプチドリンカー配列は少なくとも２アミノ酸長である。このペプチドドメインまたはポリペプチドドメインは、フレキシブルなペプチドまたはポリペプチドであってもよい。本明細書において「フレキシブルリンカー」は、ペプチド結合によって連結された２個以上のアミノ酸残基を含むペプチドまたはポリペプチドであって、フレキシブルリンカー非存在下において結合させた２個のポリペプチドと比べて、結合した２個のポリペプチドをより自由に回転させるものを指す。回転がより自由になることから、フレキシブルリンカーによって連結された２個以上の抗原結合部位のそれぞれがより効率的に標的抗原に到達することが可能となる。典型的なフレキシブルペプチド／ポリペプチドとして、Ｇｌｙ－Ｓｅｒ（配列番号１５９）、Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ（配列番号１６０）、Ａｌａ－Ｓｅｒ（配列番号１６１）、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ（配列番号１６２）、Ｇｌｙ４－Ｓｅｒ（配列番号１６３）、（Ｇｌｙ４－Ｓｅｒ）$_{2}$（配列番号１６４）、（Ｇｌｙ４－Ｓｅｒ）$_{3}$（配列番号１６５）、および（Ｇｌｙ４－Ｓｅｒ）$_{4}$（配列番号１６６）などのアミノ酸配列が挙げられるが、これらに限定されない。さらなるフレキシブルなペプチド／ポリペプチド配列は当技術分野においてよく知られている。他の適切なペプチドリンカードメインとして、Ａｌａ－（Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｌｙｓ）ｎ－Ａｌａ（ｎ＝１～５）などのリンカー形成ヘリックスが挙げられる。さらなるヘリックス形成ペプチド／ポリペプチド配列は当技術分野においてよく知られている。このようなリンカーとしては、配列番号１６７～１７１に示したものが挙げられるが、これらに限定されない。

【０４２３】

二量化、多量体化および標的ドメイン

本明細書において開示された融合タンパク質は、２つ以上の融合タンパク質を二量化または多量体化する機能を有する二量化ドメインまたは多量体化ドメインを含んでいてもよい。融合タンパク質を二量化または多量体化する機能を有するドメインは、別個のドメインであってもよく、あるいは、融合タンパク質の他のドメイン（ＬＹ６Ｇ６ＦＬＳＲポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ＬＳＲポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ＬＳＲポリペプチドおよび／もしくはＬＳＲポリペプチド、第２のポリペプチド、またはペプチド／ポリペプチドリンカードメイン）のうちの１つに含まれていてもよい。

【０４２４】

二量化または多量体化は、二量化ドメインまたは多量体化ドメインを介して２つ以上の融合タンパク質間で起こりうる。あるいは、融合タンパク質の二量化または多量体化は、化学的架橋によって起こりうる。形成される二量体または多量体は、ホモ二量体／ホモ多量体、またはヘテロ二量体／ヘテロ多量体であってもよい。ＬＹ６Ｇ６Ｆ融合ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０融合ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５融合ポリペプチドおよび／またはＬＳＲ融合ポリペプチドにおける第２のポリペプチド「パートナー」は、本明細書に記載の１つ以上の他のタンパク質、タンパク質フラグメントまたはペプチドで構成されていてもよく、このような他のタンパク質、タンパク質フラグメントまたはペプチドとして、任意の免疫グロブリン（Ｉｇ）タンパク質またはその一部分、好ましくはＦｃ領域；およびパピローマウイルスＥ７遺伝子産物、メラノーマ関連抗原（ｐ９７）、ＨＩＶ　ｅｎｖタンパク質（ｇｐ１２０）などの生物学的または化学的に活性なタンパク質の一部分が挙げられるが、これらに限定されない。「パートナー」は、可溶性の二量体／多量体を作製するために選択してもよく、かつ／または本明細書に記載の１以上の他の生物学的活性を得るために選択してもよい。

【０４２５】

「二量化ドメイン」は、少なくとも２個のアミノ酸残基、または（同一もしくは異なったアミノ酸配列を有していてもよい）少なくとも２つのペプチドもしくはポリペプチドが結合することによって形成される。ペプチドまたはポリペプチドは、共有結合または非共有結合を介して互いに相互作用してもよい。二量化ドメインは、融合タンパク質パートナーのシステインと分子間ジスルフィド結合を形成することができるシステインを少なくとも１個含んでいてもよい。融合タンパク質パートナーとの間にジスルフィド結合を形成することができるように、二量化ドメインは１個以上のシステイン残基を含むことができる。一実施形態では、二量化ドメインは、１個、２個もしくは３個、または約１０個以下のシステイン残基を含んでいる。さらなる実施形態では、二量化ドメインは免疫グロブリンのヒンジ領域である。

【０４２６】

さらなる典型的な二量化ドメインは当技術分野において公知のものであればどのようなものであってもよいが、当技術分野において公知の二量化ドメインとして、コイルドコイル；ａｃｉｄ　ｐａｔｃｈ；ジンクフィンガー；カルシウムハンド；C_H1-C_L対；米国特許第５，８２１，３３３号に記載の、改変された「こぶ（ｋｎｏｂ）」および／または「突起（ｐｒｏｔｕｂｅｒａｎｃｅ）」を有する「相互作用部分（ｉｎｔｅｒｆａｃｅ）」；

（たとえばｊｕｎおよび／またはｆｏｓ由来の）ロイシンジッパー（米国特許第５，９３２，４４８号）；酵母転写活性化因子であるＧＣＮ４、ＳＨ２（ｓｒｃ　Ｈｏｍｏｌｏｇｙ　２）、ＳＨ３（ｓｒｃ　Ｈｏｍｏｌｏｇｙ　３）（Vidal, et al, Biochemistry, 43, 7336-44 ((2004)）；ホスホチロシン結合（ＰＴＢ）（Zhou, et al., Nature, 378:584-592 (1995)）；ＷＷ（Sudol, Prog, Biochys. MoL Bio. , 65:113-132 (1996)）；ＰＤＺ（Kim, et al., Nature, 378: 85-88 (1995); Komau, et al, Science, 269.1737-1740 (1995)）；１４－３－３；ＷＤ４０（Hu Y, et al., J Biol Chem., 273, 33489-33494 (1998)）；ＥＨ；Ｌｉｍ；イソロイシンジッパー；レセプター二量体対（たとえばインターロイキン８レセプター（ＩＬ－８Ｒ））；インテグリンヘテロ二量体（たとえばＬＦＡ－ＩおよびＧＰIIIｂ／IIIａ）またはその二量化領域；二量体リガンドポリペプチド（た

とえば神経成長因子（ＮＧＦ）；ニューロトロフィン－３（ＮＴ－３）；インターロイキン８（ＩＬ－８）；血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）；ＶＥＧＦ－Ｃ；ＶＥＧＦ－Ｄ；ＰＤＧＦメンバー；脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）（Arakawa, et al., J Biol. Chem., 269(45): 27833-27839 (1994)およびRadziejewski, et al., Biochem., 32(48): 1350 (1993)）；ならびに親和性が改変されたこれらのドメインの変異体が挙げられるが、これらに限定されない。これらのポリペプチド対は酵母を用いたツーハイブリッドスクリーニング法などの当技術分野で公知の方法によって同定することができる。酵母を用いたツーハイブリッドスクリーニング法は、米国特許第５，２８３，１７３号および第６，５６２，５７６号に記載されている。相互作用する１対のドメイン間の親和性は、Katahira, et at, J. Biol Chem, 277, 9242-9246 (2002)に記載されているような、当技術分野で公知の方法を使用して決定することができる。あるいは、たとえば国際公開第０１／００８１４号に記載されている方法を使用して、ペプチド配列ライブラリーをヘテロ二量体化についてスクリーニングすることができる。タンパク質間相互作用に関する有用な方法は米国特許第６，７９０，６２４号にも記載されている。

【０４２７】

「多量体化ドメイン」は、共有結合および／または非共有結合結合を介して３つ以上のペプチドまたはポリペプチドに互いを相互作用させるドメインである。適切な多量体化ドメインはとして、コイルドコイルドメインが挙げられるが、これらに限定されない。コイルドコイルは、３残基または４残基の間隔で離れた疎水性残基で主として構成された連続パターンを有するペプチド配列であり、通常、７個のアミノ酸からなる配列（７残基の繰り返し）または１１個のアミノ酸からなる配列（１１残基の繰り返し）がアセンブルされて（折りたたまれて）、ヘリックスが多重結合された束を形成する。３残基および４残基間隔が不規則に分布した配列を有するコイルドコイルも考えられる。疎水性残基は、具体的には、疎水性アミノ酸のＶａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｔｙｒ、ＰｈｅおよびＴｒｐである。「疎水性残基で主として」は、残基の少なくとも５０％が、上記の疎水性アミノ酸から選択されなければならないことを意味する。

【０４２８】

コイルドコイルドメインはラミニンに由来してもよい。細胞外空間では、ヘテロ三量体のコイルドコイルタンパク質であるラミニンが基底膜の形成において重要な役割を果たしている。ラミニンが機能するには、多機能のオリゴマー構造が必要であることは明白である。コイルドコイルドメインは、３つの鎖が連結されたトロンボスポンジン（ＴＳＰ－１およびＴＳＰ－２）もしくは５つの鎖が連結されたトロンボスポンジン（ＴＳＰ－３、ＴＳＰ－４およびＴＳＰ－５）に由来してもよく、または、５本鎖のコイルドコイルが並列に並ぶように折りたたまれたＣＯＭＰ（ＣＯＭＰｃｃ）（Guo, et at., EMBO J, 1998, 17: 5265-5272)(Malashkevich, et al., Science, 274: 761-765 (1996)）に由来してもよい。他のタンパク質に由来するコイルドコイルドメインおよびポリペプチド多量体化を媒介する他のドメインのさらなる例（ただしこれらに限定されない）は当技術分野において公知であり、たとえば、血管拡張刺激リンタンパク質（ＶＡＳＰ）ドメイン、マトリリン－１（ＣＭＰ）、ウイルス融合ペプチド、可溶性ＮＳＦ（Ｎ－エチルマレイミド感受性因子）接着タンパク質レセプター（ＳＮＡＲＥ）複合体、ロイシンリッチリピート、特定のｔＲＮＡ合成酵素などが開示された融合タンパク質において使用するのに適している。

【０４２９】

別の実施形態では、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／もしくはＬＳＲポリペプチド、またはこれらの融合タンパク質もしくはフラグメントは、抗体などの第２の多価ポリペプチドと結合させることにより誘導して多量体を形成させることができる。ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／もしくはＬＳＲポリペプチド、またはこれらの融合タンパク質もしくはフラグメントの多量体化において使用するのに適した抗体としては、ＩｇＭ抗体、ならびに架橋した多価ＩｇＧ複合体、多価ＩｇＡ複合体、多価ＩｇＤ複合体および多価ＩｇＥ複合体が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３０】
二量化または多量体化は、上述のものを含む二量化ドメインまたは多量体化ドメインを介して２つ以上の融合タンパク質間で起こりうる。あるいは、融合タンパク質の二量化または多量体化は、化学的架橋によって起こりうる。融合タンパク質の二量体はホモ二量体またはヘテロ二量体であってもよい。融合タンパク質の多量体はホモ多量体またはヘテロ多量体にであってもよい。本明細書において開示された融合タンパク質の二量体は、
式II：
Ｎ－Ｒ$_{1}$－Ｒ$_{2}$－Ｒ$_{3}$－Ｃ
Ｎ－Ｒ$_{4}$－Ｒ$_{5}$－Ｒ$_{6}$－Ｃ、または、
式III：
Ｎ－Ｒ$_{1}$－Ｒ$_{2}$－Ｒ$_{3}$－Ｃ
Ｃ－Ｒ$_{4}$－Ｒ$_{5}$－Ｒ$_{6}$－Ｎ
で示され、
式IIによって示される融合タンパク質の二量体はパラレルな配向であると定義され、式IIIによって示される融合タンパク質の二量体はアンチパラレルな配向であると定義される。パラレルな二量体およびアンチパラレルな二量体をそれぞれシス二量体およびトランス二量体と呼ぶ。「Ｎ」および「Ｃ」はそれぞれ融合タンパク質のＮ末端およびＣ末端を表す。融合タンパク質の構成要素である「Ｒ$_{1}$」、「Ｒ$_{2}$」および「Ｒ$_{3}$」は、式Ｉに関して上記で定義されたとおりである。式IIおよび式IIIにおいて、「Ｒ$_{4}$」はＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／もしくはＬＳＲポリペプチド、または第２のポリペプチドであり；「Ｒ$_{5}$」は任意のペプチド／ポリペプチドリンカードメインであり；「Ｒ$_{6}$」はＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／もしくはＬＳＲポリペプチド、または第２のポリペプチドであって、「Ｒ$_{4}$」が第２のポリペプチドであるとき、「Ｒ$_{6}$」は、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／もしくはＬＳＲポリペプチドであり、「Ｒ$_{6}$」が第２のポリペプチドであるとき、「Ｒ$_{4}$」はＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／もしくはＬＳＲポリペプチドである。一実施形態では、「Ｒ$_{1}$」は、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／またはＬＳＲポリペプチドであり；「Ｒ$_{4}$」も同様にＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／またはＬＳＲポリペプチドであり；「Ｒ$_{3}$」および「Ｒ$_{6}$」はいずれも第２のポリペプチドである。
【０４３１】
「Ｒ$_{1}$」＝「Ｒ$_{4}$」、「Ｒ$_{2}$」＝「Ｒ$_{5}$」および「Ｒ$_{3}$」＝「Ｒ$_{6}$」のとき、式IIの融合タンパク質二量体はホモ二量体であると定義される。同様に、「Ｒ$_{1}$」＝「Ｒ$_{6}$」、「Ｒ$_{2}$」＝「Ｒ$_{5}$」および「Ｒ$_{3}$」＝「Ｒ$_{4}$」のとき、式IIIの融合タンパク質二量体はホモ二量体であると定義される。何らかの理由によってこれらの条件が満たされない場合、融合タンパク質二量体はヘテロ二量体であると定義される。たとえば、ヘテロ二量体は、これらの条件を満たすドメイン配向（すなわち、式IIで示される二量体において、「Ｒ$_{1}$」および「Ｒ$_{4}$」はいずれもＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／またはＬＳＲポリペプチドであり；「Ｒ$_{2}$」および「Ｒ$_{5}$」はいずれもペプチド／ポリペプチドリンカードメインであり；「Ｒ$_{3}$」および「Ｒ$_{6}$」はいずれも第２のポリペプチドである）を含んでいてもよいが、これらのドメインに１つ以上の同一の種は含まれない。たとえば、「Ｒ$_{3}$」および「Ｒ$_{6}$」はいずれもＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／またはＬＳＲポリペプチドでありうるが、一方のポリペプチドが野生型のＬＹ６Ｇ６Ｆアミノ酸配列、ＶＳＩＧ１０アミノ酸配列、ＴＭＥＭ２５アミノ酸配列および／またはＬＳＲアミノ酸配列を含んでいてもよく、他方のポリペプチドが変異体のＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／またはＬＳＲポリペプチドであってもよい。典型的なＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド

、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／またはＬＳＲポリペプチドの異性体は、これらのポリペプチドを修飾するによって、標的細胞に対する結合が増加もしくは減少しているか、免疫細胞に対する活性が増加しているか、半減期が延長もしくは短縮しているか、かつ／または安定性が増加または減少しているＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／またはＬＳＲポリペプチドである。ポリペプチドリンカードメインの一部として免疫グロブリンのC_H1領域またはC_L領域を含む融合タンパク質の二量体は、一方の融合タンパク質がC_H1領域を含み、他方の融合タンパク質がC_L領域を含んでいるヘテロ二量体を形成することが好ましい。

【０４３２】

融合タンパク質を使用して多量体を形成させることもできる。二量体の場合と同様に、多量体は、多量体に含まれる融合タンパク質のすべてがＮ末端およびＣ末端に関する方向において同じ方向に整列したパラレルな多量体であってもよい。多量体は、多量体に含まれる融合タンパク質がＮ末端およびＣ末端に関する方向において交互に逆の方向に整列したアンチパラレル多量体であってもよい。（パラレルまたはアンチパラレル）多量体はホモ多量体またはヘテロ多量体であってもよい。融合タンパク質は二量体の形態で作製されてもよく、より好ましくは、後述するように、二量体の２つ（またはそれ以上）のタンパク質、タンパク質の一部分および／またはペプチドに相当するポリヌクレオチド配列を接合することにより融合を遺伝子レベルで行い、接合されたポリヌクレオチド配列に従って接合または融合されたタンパク質を細胞に産生させる。このような融合タンパク質の作製についての説明は、Ｌｉｎｓｌｅｙらに付与された米国特許第５，８５１，７９５号に記載されており、この文献はその全体が非限定的な例示として本明細書に記載されているかのように参照により本明細書に組み込まれる。

【０４３３】

標的ドメイン

ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／またはＬＳＲポリペプチドならびに融合タンパク質は、体内の特定部位に上記の分子をターゲティングするための標的ドメインを含んでいてもよい。標的ドメインは、炎症部位に上記の分子をターゲティングするものであってもよい。典型的な標的ドメインは、ＩＬ－１７、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－１２、ＩＬ－２１、ＩＬ－２２、ＩＬ－２３などの炎症性サイトカイン（ただしこれらに限定されない）または炎症を起こした組織に特異的な抗体またはその抗原結合フラグメントである。多発性硬化症などの神経異常の場合、標的ドメインによって上記の分子をＣＮＳにターゲティングさせてもよく、血管上皮上のＶＣＡＭ－Ｉに結合させてもよい。さらなる標的ドメインは、炎症誘発性分子に特異的なペプチドアプタマーであってもよい。別の実施形態では、ＬＹ６Ｇ６Ｆ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５融合タンパク質および／またはＬＳＲ融合タンパク質は、免疫細胞（たとえばＴ細胞）の表面上に提示されるポリペプチドに特異的な結合パートナーを含むことができる。さらに別の実施形態では、標的ドメインは活性化免疫細胞を特異的にターゲティングする。ターゲティングされる免疫細胞としては、Ｔｈ０、Ｔｈ１、Ｔｈ１７、Ｔｈ２、Ｔｈ２２などのＴ細胞；ＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ＴＧＦ－β、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７、ＩＬ－６、ＩＬ－２３、ＩＬ－２２、ＩＬ－２１、ＭＭＰなど（ただしこれらに限定されない）の炎症分子を分泌する他の細胞および別の細胞にこれらの炎症分子を分泌させる他の細胞；ならびにＴｒｅｇを挙げることができる。たとえば、Ｔｒｅｇに使用される標的ドメインはＣＤ２５に特異的に結合してもよい。上記の変更は、任意の変更を説明することのみを目的とし、これらに限定されることを全く意図しない。さらに、上記の記載は、単一の仮説に拘束されることを望むものではなく、説明することのみを目的として提供される。

【０４３４】

基の付加

本発明のタンパク質が直線状分子である場合、直線状分子上の化学修飾を受けやすいまたは化学修飾に適した様々な位置に種々の官能基を配置することができる。本発明の実施

形態の少なくともいくつかによるタンパク質の直線状形態の末端に官能基を付加することができる。実施形態のいくつかでは、官能基を付加することによって、安定性、（細胞膜および／または組織バリアを通過することによる）移行性、組織局在性、および有効性の向上；クリアランスの減少；毒性の低下；選択性の向上；細胞ポンプによる排出に対する抵抗性の向上など（ただしこれらに限定されない）の１つ以上の特性に関してタンパク質の活性が向上する。便宜上、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組成物に含まれている配列のうちの１つに含まれる遊離Ｎ末端を組成物のＮ末端と称し、この配列の遊離Ｃ末端を組成物のＣ末端と見なすが、これに限定されることを望むものではない。このような配列のＣ末端もしくはＮ末端またはこの両方を、アミン官能基またはカルボン酸官能基と連結することができる。

【０４３５】

適切な官能基は、Green and Wuts, “Protecting Groups in Organic Synthesis”, John Wiley and Sons, Chapters 5 and 7, 1991（この文献の教示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているが、この文献に記載されているものに限定されない。保護基としては、たとえば、有効成分の親水性を低下させかつ親油性を増加させることによって、自体に付加された有効成分の細胞内への輸送を容易にするものが好ましく、このような保護基は「細胞膜を通過させて輸送するための成分」の一例である。

【０４３６】

これらの成分は、細胞内部において加水分解または酵素分解のいずれかによりインビボにおいて切断されてもよく、この態様が好ましい（Ditter et al., J. Pharm. Sci. 57:783 (1968); Ditter et al., J. Pharm. Sci. 57:828 (1968); Ditter et al., J. Pharm. Sci. 58:557 (1969); King et al., Biochemistry 26:2294 (1987); Lindberg et al., Drug Metabolism and Disposition 17:311 (1989); Tunek et al., Biochem. Pharm. 37:3867 (1988), Anderson et al., Arch. Biochem. Biophys. 239:538 (1985)およびSinghal et al., FASEB J. 1:220 (1987)）。ヒドロキシル保護基としては、エステル、炭酸塩およびカーバメート保護基が挙げられる。Ｎ末端保護基について上述したように、アミン保護基としては、アルコキシカルボニル基およびアリールオキシカルボニル基が挙げられる。Ｃ末端保護基について上述したように、カルボン酸保護基としては、脂肪族エステル、ベンジルエステル、およびアリールエステルが挙げられる。一実施形態では、本発明の組成物中の１個以上のグルタミン酸残基またはアスパラギン酸残基の側鎖のカルボン酸基は、メチル、エチル、ベンジルまたは置換ベンジルエステルで保護することが好ましく、ベンジルエステルで保護することがより好ましい。

【０４３７】

Ｎ末端保護基として、具体的には、アシル基（－ＣＯ－R_1）およびアルコキシカルボニル基またはアリールオキシカルボニル基（－ＣＯ－Ｏ－R_1）（式中、R_1は、脂肪族基、置換脂肪族基、ベンジル基、置換ベンジル基、芳香族基、または置換芳香族基である）が挙げられるが、これらに限定されない。アシル基として、具体例には、アセチル、（エチル）－ＣＯ－、ｎ－プロピル－ＣＯ－、イソプロピル－ＣＯ－、ｎ－ブチル－ＣＯ－、ｓｅｃ－ブチル－ＣＯ－、ｔ－ブチル－ＣＯ－、ヘキシル、ラウロイル、パルミトイル、ミリストイル、ステアリル、オレオイルフェニル－ＣＯ－、置換フェニル－ＣＯ－、ベンジル－ＣＯ－、および（置換ベンジル）－ＣＯ－が挙げられるが、これらに限定されない。アルコキシカルボニル基およびアリールオキシカルボニル基としては、CH_3－Ｏ－ＣＯ－、（エチル）－Ｏ－ＣＯ－、ｎ－プロピル－Ｏ－ＣＯ－、イソプロピル－Ｏ－ＣＯ－、ｎ－ブチル－Ｏ－ＣＯ－、ｓｅｃ－ブチル－Ｏ－ＣＯ－、ｔ－ブチル－Ｏ－ＣＯ－、フェニル－Ｏ－ＣＯ－、置換フェニル－Ｏ－ＣＯ－、ベンジル－Ｏ－ＣＯ－、（置換ベンジル）－Ｏ－ＣＯ－、アダマンタン、ナフタレン、ミリストレイル、トルエン、ビフェニル、シンナモイル、ニトロベンゾイル、トルオイル、フロイル、ベンゾイル、シクロヘキサン、ノルボルナン、およびＺ－カプロン酸が挙げられる。Ｎ－アシル化を容易にするため、上記分子のＮ末端に１～４個のグリシン残基が存在していてもよい。

【０４３８】

上記化合物のＣ末端のカルボキシル基は、たとえば、アミド（すなわちＣ末端のヒドロキシル基が－ＮＨ$_2$、－ＮＨＲ$_2$または－ＮＲ$_2$Ｒ$_3$で置換されたもの）またはエステル（すなわちＣ末端のヒドロキシル基が－ＯＲ$_2$で置換されたもの）を含む（ただしこれらに限定されない）基で保護することができる。Ｒ$_2$およびＲ$_3$は、それぞれ独立して、脂肪族基、置換脂肪族基、ベンジル基、置換ベンジル基、アリール基、または置換アリール基であってもよい。さらに、Ｒ$_2$およびＲ$_3$は、窒素原子と一緒になって、窒素、酸素または硫黄などの約０～２個のさらなるヘテロ原子を含むＣ$_4$～Ｃ$_8$ヘテロ環を形成してもよい。適切なヘテロ環として好適なものとしては、ピペリジノ、ピロリジニル、モノホリノ、チオモルホリノ、およびピペラジニルが挙げられるが、これらに限定されない。Ｃ末端保護基としては、－ＮＨ$_2$、－ＮＨＣＨ$_3$、－Ｎ（ＣＨ$_3$）$_2$、－ＮＨ（エチル）、－Ｎ（エチル）$_2$、－Ｎ（メチル）（エチル）、－ＮＨ（ベンジル）、－Ｎ（Ｃ$_1$～Ｃ$_4$アルキル）（ベンジル）、－ＮＨ（フェニル）、－Ｎ（Ｃ$_1$～Ｃ$_4$アルキル）（フェニル）、－ＯＣＨ$_3$、－Ｏ－（エチル）、－Ｏ－（ｎ－プロピル）、－Ｏ－（ｎ－ブチル）、－Ｏ－（イソプロピル）、－Ｏ－（ｓｅｃ－ブチル）、－Ｏ－（ｔ－ブチル）、－Ｏ－ベンジル、および－Ｏ－フェニルが挙げられるが、これらに限定されない。

【０４３９】

ペプチドミメティックな成分による置換

「ペプチドミメティックな有機成分」は、保存的置換基および非保存的置換基として、本発明の組成物中のアミノ酸残基を置換するために用いてもよい。このような成分は「非天然アミノ酸」とも呼ばれ、および、アミノ酸残基またはアミノ酸を置換するために使用してもよく、または、ペプチド内において欠失されたアミノ酸に代わるスペーサー基として機能してもよい。ペプチドミメティックな有機成分は、置換されたアミノ酸に類似した立体化学的特性、電子的特性または立体配置的特性を有していてもよく、この態様が好ましい。また、このようなペプチドミメティックは、極めて重要な位置を占めるアミノ酸を置換するために使用してもよく、このような置換は保存的置換と考えられる。しかしながら、こような類似性は必ずしも必要とされない。本発明の好ましい実施形態によれば、本発明の組成物が少なくとも実質的に本発明に記載のネイティブタンパク質の生理活性を保持するようなペプチドミメティックが１つ以上選択される。

【０４４０】

ペプチドミメティックは、酵素または別の分解過程によるペプチド分解を抑制するために使用してもよい。ペプチドミメティックは、有機合成技術によって作製してもよく、この態様が好ましい。適切なペプチドミメティックとしては、個々のＬ－アミノ酸に対応するＤ－アミノ酸、テトラゾール（Zabrocki et al., J. Am. Chem. Soc. 110:5875-5880 (1988)）；アミド結合の同配体（Jones et al., Tetrahedron Lett. 29: 3853-3856 (1988)）；およびＬＬ－３－アミノ－２－プロペニドン－６－カルボン酸（ＬＬ－Ａｃｐ）（Kemp et al., J. Org. Chem. 50:5834-5838 (1985)）が挙げられるが、これらに限定されない。類似のアナログは、Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29:5081-5082 (1988), Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29:5057-5060 (1988), Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29:4935-4938 (1988)およびKemp et al., J. Org. Chem. 54:109-115 (1987)に記載されている。他の適切かつ典型的なペプチドミメティックは、Nagai and Sato, Tetrahedron Lett. 26:647-650 (1985); Di Maio et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1687 (1985); Kahn et al., Tetrahedron Lett. 30:2317 (1989); Olson et al., J. Am. Chem. Soc. 112:323-333 (1990); およびGarvey et al., J. Org. Chem. 56:436 (1990)に記載されている。さらなる適切かつ典型的なペプチドミメティックとしては、ヒドロキシ－１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン－３－カルボキシラート（Miyake et al., J. Takeda Res. Labs 43:53-76 (1989)）；１，２，３，４－テトラヒドロ－イソキノリン－３－カルボキシラート（Kazmierski et al., J. Am. Chem. Soc. 133:2275-2283 (1991)）；ヒスチジンイソキノロンカルボン酸（ＨＩＣ）（Zechel et al., Int. J. Pep. Protein Res. 43 (1991)）；（２Ｓ，３Ｓ）－メチル－フェニルアラニン、（２Ｓ，３Ｒ）－メチル－フェニルアラニン、（２Ｒ，３Ｓ）－メチル－フェニルアラニン、および（２Ｒ，３Ｒ

）－メチル－フェニルアラニン（Kazmierski and Hruby, Tetrahedron Lett. (1991)）が挙げられる。

【０４４１】

非天然アミノ酸としては、具体的には、β－アミノ酸（β_3およびβ_2）、ホモアミノ酸、環状アミノ酸、芳香族アミノ酸、Ｐｒｏ誘導体、Ｐｙｒ誘導体、３位置換アラニン誘導体、グリシン誘導体、環置換Ｐｈｅ誘導体、環置換Ｔｙｒ誘導体、直鎖状コアアミノ酸、またはジアミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。これらはたとえばシグマアルドリッチ（米国）などの様々な供給業者から入手可能である。

【０４４２】

タンパク質の化学修飾

本発明において、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質の任意の部分を必要に応じて化学修飾してもよく、すなわち、官能基を付加することによって変化させてもよい。たとえば、ネイティブ配列に存在する側鎖アミノ酸残基を必要に応じて修飾してもよく、あるいは後述するように、この側鎖アミノ酸残基に加えてまたはこのアミノ酸残基の代わりに、タンパク質の別の部分を必要に応じて修飾してもよい。化学的合成プロセスの後に、たとえば化学的修飾されたアミノ酸の付加を行う場合、上記分子の合成中にこの修飾を行ってもよい。しかしながら、アミノ酸の化学修飾が分子内に既に存在するような修飾（「インサイチュー」修飾）も可能である。

【０４４３】

上記分子の配列領域のいずれかのアミノ酸は、以下に記載する（ペプチドが「化学的に修飾された」と概念的に見なされる）典型的な修飾法のいずれか１つで修飾してもよい。典型的な修飾としては、カルボキシメチル化、アシル化、リン酸化、グリコシル化、および脂肪酸アシル化が挙げられるが、これらに限定されない。エーテル結合を使用して、糖のヒドロキシルと、セリンまたはトレオニンのヒドロキシルとを連結してもよい。アミド結合を使用して、糖のアミノ基と、グルタミン酸塩またはアスパラギン酸塩のカルボキシル基とを連結してもよい（Garg and Jeanloz, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 43, Academic Press (1985);およびKunz, Ang. Chem. Int. Ed. English 26:294-308 (1987)）。さらに、アセタール結合およびケタール結合をアミノ酸と糖との間に形成させてもよい。また、たとえば遊離アミノ基（たとえばリシン）をアシル化することによって、脂肪酸のアシル誘導体を形成させてもよい（Toth et al., Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Rivier and Marshal, eds., ESCOM Publ., Leiden, 1078-1079 (1990)）。

【０４４４】

本発明によるタンパク質またはペプチドに言及する場合、本明細書において「化学修飾」は、翻訳後プロセシングもしくは他の翻訳後修飾などの自然現象、または当技術分野においてよく知られている化学修飾技術によって、少なくとも１個のアミノ酸残基が修飾されたタンパク質またはペプチドを指す。種々の公知の修飾として、通常、アセチル化、アシル化、アミド化、ＡＤＰ－リボシル化、グリコシル化、ＧＰＩアンカー形成、脂質または脂質誘導体の共有結合、メチル化、ミリスチル化、ＰＥＧ化、プレニル化、リン酸化、ユビキチン化、およびあらゆる類似の処理が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４４５】

他のタイプの修飾として、ＰＣＴ国際公開第２００６／０５０２６２号（この文献はその全体が本明細書に記載されているかのように参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているような、たとえばタンパク質などの生体分子へのシクロアルカン部分の付加を挙げることができる。これらの部分は生体分子とともに使用するために設計され、タンパク質に様々な特性を付与するために使用してもよい。

【０４４６】

さらに、タンパク質上の任意の位置を修飾してもよい。たとえば、ＰＣＴ出願国際公開第２００６／０５０２４７号（この文献はその全体が本明細書に記載されているかのように参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、タンパク質上のグリコ

シル化部分をＰＥＧ化してもよい。Ｏ－結合型および／またはＮ－結合型グリコシル化部位に、１つ以上のポリエチレングリコール（ＰＥＧ）基を付加してもよい。ＰＥＧ基は分枝状でも直鎖状であってもよい。タンパク質上のグリコシル化部位に、グリコシルリンカーを介して任意のタイプの水溶性ポリマーを付加してもよい。

【０４４７】

グリコシル化の改変

本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質を修飾して、そのグリコシル化パターンを改変してもよい（すなわち、本来またはネイティブのグリコシル化パターンを改変してもよい）。本明細書において「改変」手段は、１つ以上の糖鎖部分を欠失させること、および／または本来のタンパク質に少なくとも１つのグリコシル化部位を付加することを指す。

【０４４８】

通常、タンパク質のグリコシル化にはＮ－結合型とＯ－結合型がある。Ｎ－結合は、アスパラギン残基の側鎖への糖鎖部分の結合を指す。アスパラギン－Ｘ－セリンおよびアスパラギン－Ｘ－トレオニンで示されるトリペプチド配列（式中、Ｘはプロリン以外の任意のアミノ酸である）は、酵素によってアスパラギン側鎖に糖鎖部分を結合させるための認識配列である。したがって、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列のいずれかが存在していると、これらは潜在的なグリコシル化部位となる。Ｏ－結合型グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸（５－ヒドロキシプロリンまたは５－ヒドロキシリシンを使用してもよいが、最も一般的にはセリンまたはトレオニン）への、Ｎ－アセチルガラクトサミン、ガラクトースおよびキシロースの糖類うちの１つの結合を指す。

【０４４９】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質へのグリコシル化部位の付加は、該タンパク質のアミノ酸配列を改変させて、（Ｎ－結合型グリコシル化部位としての）上記のトリペプチド配列を１つ以上含有させることによって簡便に達成される。この改変は、元のタンパク質の配列において、（Ｏ－結合型グリコシル化部位としての）１個以上のセリンまたはトレオニン残基を付加または置換することにおこなってもよい。タンパク質のアミノ酸配列をＤＮＡレベルにおいて改変し、変更を導入してもよい。

【０４５０】

タンパク質の糖鎖部分の数を増加させる別の手段として、タンパク質のアミノ酸残基にグリコシドを化学結合または酵素結合させる方法がある。使用する結合方法に応じて、

（ａ）アルギニンおよびヒスチジン、

（ｂ）遊離カルボキシル基、

（ｃ）遊離スルフヒドリル基（たとえばシステインの遊離スルフヒドリル基など）、

（ｄ）遊離ヒドロキシル基（たとえば、セリン、トレオニンまたはヒドロキシプロリンの遊離ヒドロキシル基など）、

（ｅ）芳香族残基（フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファンの芳香族残基など）、

（ｆ）グルタミンのアミド基

に糖を付加してもよい。これらの方法は、国際公開第８７／０５３３０号およびAplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 22: 259-306 (1981)に記載されている。

【０４５１】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質上に存在する任意の糖鎖部分の除去は、化学的または酵素的に行ってもよい。化学的脱グリコシルは、タンパク質をトリフルオロメタンスルホン酸または同等の化合物と接触させることを必要とする。この処理によって、構成要素同士を連結する糖（Ｎ‐アセチルグルコサミンまたはＮ－アセチルガラクトサミン）以外の大部分またはすべての糖が切断され、アミノ酸配列を損なうことなく糖鎖部分を除去することができる。

【０４５２】

化学的脱グリコシルは、Hakimuddin et al., Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (198

7); および Edge et al., Anal. Biochem., 118: 131 (1981)に記載されている。酵素を用いたタンパク質の糖鎖部分の切断は、Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138: 350 (1987)に記載されているように、様々なエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼを使用して行うことができる。

【０４５３】

使用方法

本明細書において「治療剤」は、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲタンパク質およびポリペプチド、またはこれらのオーソログもしくはフラグメント；特に、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲタンパク質の細胞外ドメインもしくは分泌形態；これらを含む融合タンパク質もしくは多量体タンパク質；ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲの核酸配列もしくはこれらのフラグメント；ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質に特異的に結合する薬剤；ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質と他の成分との結合を増強または抑制する薬剤；ならびにＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲと関連する生物学的活性の少なくとも１つを調節する（増強または抑制する）薬剤のいずれかである。上記の薬剤は、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／もしくはＬＳＲポリペプチド、およびこれらのエピトープのいずれか１つに特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体および／もしくはポリクローナル抗体、その抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに／または代替足場を包含する。上記の薬剤としては、小分子、ペプチド、リボザイム、アプタマー、アンチセンス分子、ｓｉＲＮＡなどがさらに挙げられる。

【０４５４】

ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲが異常にダウンレギュレートされている場合、かつ／またはＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲの活性が増加している場合、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲの活性を刺激することが望ましく、これによって有益な効果がもたらされるであろう。同様に、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲが異常にアップレギュレートされている場合、かつ／またはＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲの活性が減少している場合、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲの活性を抑制することが望ましく、これによって有益な効果がもたらされるであろう。

【０４５５】

本明細書において記載されているように、上記の治療剤は、本明細書に記載の免疫関連障害、本明細書に記載の自己免疫疾患、本明細書に記載の感染性障害および／もしくは本明細書に記載のがんの治療、ならびに／またはＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／もしくはＬＳＲポリペプチドのいずれか１つによって媒介される免疫共刺激のブロックおよび／もしくは促進に使用することができる。

【０４５６】

本発明のさらなる態様によれば、上記の治療剤は、がん細胞もしくは慢性感染症などに対するＴ細胞活性の病的な抑制の阻止；および／または自己免疫疾患における自己抗原などに対するＴ細胞活性の病的な促進の阻止に使用することができる。たとえば、上記の分子は、様々な疾患の治療、予防、および診断を目的として、インビトロもしくはエクスビボにおける培養物中の細胞、またはたとえばインビボにおけるヒト対象に投与することができる。好ましい対象としては、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲタンパク質を発現している細胞によって媒介される疾患を有するヒト患者、ならびにＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲ活性を有する細胞が挙げられる。

【０４５７】
本発明のさらなる態様によれば、上記治療剤は、たとえばＴ細胞の増殖およびサイトカインの分泌などによって示されるＴ細胞の活性化を抑制するために使用することができる。
【０４５８】
本発明のさらなる態様によれば、上記の治療剤は、インビボもしくはインビトロにおいて生物学的活性、すなわち、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲを発現している細胞の増殖抑制および／もしくは破壊；ヒトエフェクター細胞の存在下において、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲを発現している細胞の食作用もしくはＡＤＣＣの媒介、またはＬＹ６Ｇ６Ｆリガンド、ＶＳＩＧ１０リガンド、ＴＭＥＭ２５リガンドおよび／もしくはＬＳＲリガンドの、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲへの結合のブロックの１以上を誘導するために使用することができる。
【０４５９】
したがって、本発明のさらなる態様によれば、本明細書に記載の免疫関連障害、本明細書に記載の自己免疫疾患、本明細書に記載の感染性障害、および／もしくは本明細書に記載のがんを治療する方法、ならびに／または、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲポリペプチドによって媒介される免疫刺激を対象においてブロックまたは促進する方法が提供され、これらの方法は、上記の治療剤および／もしくは上記の治療剤のいずれかと薬学的に許容される希釈剤もしくは担体とを含む医薬組成物のいずれか１つの有効量を上記の治療またはブロックもしくは促進を必要とする対象に投与することによって行われる。
【０４６０】
本発明における対象は、上記の疾患、障害もしくは病態のうちの１つを有すると診断されたか、または少なくとも１つのタイプの、がん、感染性障害および／もしくは免疫関連障害の素因を有する哺乳動物、好ましくはヒトである。
【０４６１】
本明細書において「治療」は、上記疾患、障害または病態の有害な影響の予防、発生の遅延、治癒、改善、減弱、緩和、最小化、抑制、または阻止を指す。さらに、「治療」は上記の疾患の管理を含む。「管理」は、疾患の重症度の低下、疾患の出現頻度の減少、疾患の出現期間の短縮、疾患の出現における重症度の低下などを意味する。
【０４６２】
本発明によれば、「治療」は、対象において本発明のポリペプチドの少なくとも１つの発現を特異的にアップレギュレートすることにより達成することができる。
【０４６３】
本発明による上記疾患の治療を、当技術分野で公知の他の治療法と組み合わせてもよいこと（すなわち併用療法）は十分に理解されるであろう。したがって、本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、本明細書に記載の治療剤および／または該治療剤を含む医薬組成物は、免疫応答を調節するための以下の薬剤の１以上と組み合わせて使用することもできる：可溶性ｇｐ３９（ＣＤ４０リガンド（ＣＤ４０Ｌ）、ＣＤ１５４、Ｔ－ＢＡＭ、ＴＲＡＰとしても知られている）、可溶性ＣＤ２９、可溶性ＣＤ４０、可溶性ＣＤ８０（たとえばＡＴＣＣ　６８６２７）、可溶性ＣＤ８６、可溶性ＣＤ２８（たとえば６８６２８）、可溶性ＣＤ５６、可溶性Ｔｈｙ－１、可溶性ＣＤ３、可溶性ＴＣＲ、可溶性ＶＬＡ－４、可溶性ＶＣＡＭ－１、可溶性ＬＥＣＡＭ－１、可溶性ＥＬＡＭ－１、可溶性ＣＤ４４、ｇｐ３９と反応する抗体（たとえばＡＴＣＣ　ＨＢ－１０９１６、ＡＴＣＣ　ＨＢ－１２０５５およびＡＴＣＣ　ＨＢ－１２０５６）、ＣＤ４０と反応する抗体（たとえばＡＴＣＣ　ＨＢ－９１１０）、Ｂ７と反応する抗体（たとえばＡＴＣＣ　ＨＢ－２５３、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－２２２３、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－２２２６、ＡＴＣＣ　ＨＢ－３０１、ＡＴＣＣ　ＨＢ－１１３４１など）、ＣＤ２８と反応する抗体（たとえばＡＴＣＣ　ＨＢ－１１９４４またはｍＡｂ　９．３）、ＬＦＡ－１と反応する抗体（たとえばＡＴＣＣ

ＨＢ－９５７９およびＡＴＣＣ　ＴＩＢ－２１３）、ＬＦＡ－２と反応する抗体、ＩＬ－２と反応する抗体、ＩＬ－１２と反応する抗体、ＩＦＮ－γと反応する抗体、ＣＤ２と反応する抗体、ＣＤ４８と反応する抗体、任意のＩＣＡＭと反応する抗体（たとえばＩＣＡＭ－１（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－２２５２）、ＩＣＡＭ－２およびＩＣＡＭ－３）、ＣＴＬＡ４と反応する抗体（たとえばＡＴＣＣ　ＨＢ－３０４）、Ｔｈｙ－１と反応する抗体、ＣＤ５６と反応する抗体、ＣＤ３と反応する抗体、ＣＤ２９と反応する抗体、ＴＣＲと反応する抗体、ＶＬＡ－４と反応する抗体、ＶＣＡＭ－１と反応する抗体、ＬＥＣＡＭ－１と反応する抗体、ＥＬＡＭ－１と反応する抗体、ＣＤ４４と反応する抗体；Ｌ１０４ＥＡ２９ＹＩｇ、ＣＤ８０モノクローナル抗体（ｍＡｂ）、ＣＤ８６ｍＡｂ、ｇｐ３９ｍＡｂ、ＣＤ４０ｍＡｂ、ＣＤ２８ｍＡｂ、抗ＬＦＡ１　ｍＡｂ；ＣＤ５２（アレムツズマブ）、ＣＤ２５（ダクリズマブ）、ＶＬＡ－４（ナタリズマブ）、ＣＤ２０（リツキシマブ）、ＩＬ２Ｒ（ダクリズマブ）およびＭＳ４Ａ１（オクレリズマブ）などの、免疫系のメカニズムを標的とする抗体または他の薬剤；フィンゴリモド（ＦＴＹ７２０）などの、リンパ器官からのリンパ球再循環を妨げることが示されている新規経口免疫調節剤、およびｍｙｌｉｎａｘ（経口クラドリビン）またはテリフルノミドなどの、リンパ球枯渇をもたらす新規経口免疫調節剤；ならびに、ｐａｎａｃｌａｒ（フマル酸ジメチルＢＧ－１２）またはラキニモド（ＡＢＲ２１６０６２）などの、免疫活性化を妨げる薬剤。他の組み合わせも当業者によって容易に認識かつ理解されるであろう。実施形態のいくつかでは、治療剤を、炎症性薬剤の活性の減弱もしくは相殺、またはそのような薬剤の副作用の制限に使用することができる。

【０４６４】

当業者によって容易に理解されるように、上記の組み合わせは、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療剤および／または該治療剤を含む医薬組成物と、１種の別の免疫抑制剤との組み合わせ；本明細書に記載の治療剤および／または該治療剤を含む医薬組成物と、２種の他の免疫抑制剤との組み合わせ；本明細書に記載の治療剤および／または該治療剤を含む医薬組成物と、３種の他の免疫抑制剤との組み合わせなどを含むことができる。最適な組み合わせおよび用量の決定は、当技術分野においてよく知られている方法を使用して決定および最適化することができる。

【０４６５】

本発明による治療剤および１種以上の他の治療剤は、順番に投与することも、同時に投与することもできる。他の治療剤は、たとえば、細胞毒性剤、放射性毒性剤または免疫抑制剤である。医薬組成物は、（免疫複合体として）薬剤に結合することができ、あるいは、薬剤とは別個に投与することもできる。後者の場合（別々に投与する場合）、医薬組成物は、他の薬剤の投与前、投与後、または投与と同時に投与することができ、あるいは、他の公知の治療法（たとえば抗がん療法、たとえば、放射線療法）と併用することができる。このような治療剤としては、特に、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、シスプラチン、硫酸ブレオマイシン、カルムスチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、ヒドロキシ尿素　などの、それぞれの治療剤自体が患者に毒性または準毒性を示すレベルにおいてのみ効果を発揮する抗新生物剤が挙げられる。シスプラチンは、１００ｍｇ／投与で４週ごとに１回静脈内投与され、アドリアマイシンは、１回量として６０～７５ｍｇ／ｍ１が２１日ごとに１回静脈内投与される。

【０４６６】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる、ヒト抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ、抗ＶＳＩＧ１０、抗ＴＭＥＭ２５および／もしくは抗ＬＳＲ抗体またはこれらの抗原結合フラグメントと化学療法剤とを併用することによって、ヒト腫瘍細胞に対して細胞傷害効果をもたらす異なったメカニズムを介して作動する２種の抗がん剤が提供される。このような併用によって、薬剤に対する耐性の発現、または抗体との反応が起こらなくなる腫瘍細胞の抗原性の変化を原因とする問題を解決することができる。標的特異的エフェクター細胞、たとえば、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組成物（たとえばヒト抗体、多重特異性分子、および二重特異性分子）を結合させたエフェクター細胞も治療剤として使用するこ

とができる。標的するためのエフェクター細胞は、マクロファージ、好中球、単球などのヒト白血球であってよい。他の細胞としては、好酸球、ナチュラルキラー細胞、およびＩｇＧレセプターまたはＩｇＡレセプターを有する他の細胞が挙げられる。所望に応じて、エフェクター細胞は治療の対象から得ることができる。標的特異的エフェクター細胞は、生理学的に許容される溶液中の細胞懸濁液として投与することができる。投与される細胞数は約１０８～１０９であってよく、治療目的によって異なるであろう。通常、上記の細胞数は、標的細胞、たとえば、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質を発現している腫瘍細胞に上記の細胞を局在化させ、かつ、たとえば食作用などによって細胞破壊を行うのに十分な量であろう。投与経路も異なっていてもよい。

【０４６７】

標的特異的エフェクター細胞を用いた治療法は、標的細胞を除去するための他の技術を併用して実施することができる。たとえば、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組成物（たとえばヒト抗体、多重特異性分子、および二重特異性分子）および／またはこれらの組成物を結合させたエフェクター細胞を使用した抗腫瘍療法は、化学療法と併用することができる。さらに、併用免疫療法を使用し、２種の異なる細胞傷害性エフェクター集団によって腫瘍細胞の拒絶を引き起こしてもよい。たとえば、抗ＦｃγＲＩまたは抗ＣＤ３に連結させた、抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および／または抗ＬＳＲ抗体と、ＩｇＧレセプターまたはＩｇＡレセプターに特異的に結合する薬剤とを併用してもよい。

【０４６８】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる二重特異性分子および多重特異性分子を使用して、細胞表面のレセプターを塞ぐことおよび除去することなどによって、エフェクター細胞のＦｃγＲレベルまたはＦｃγＲレベルを調節することもできる。抗Ｆｃレセプターの混合物もこの目的に使用することができる。

【０４６９】

本発明は、免疫系疾患を治療するための、他の薬剤と組み合わせた本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組成物の使用も包含する。たとえば、自己免疫疾患は、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる分子と、コルチコステロイド、シクロスポリン、シクロホスファミド、プレドニゾン、アザチオプリン、メトトレキサート、ラパマイシン、タクロリムスなどの免疫抑制剤；ＴＮＦ－α遮断剤もしくはＴＮＦ－αアンタゴニスト、または任意の炎症性サイトカインを標的とする他の生物学的薬剤などの生物学的薬剤；非ステロイド性抗炎症剤／Ｃｏｘ－２阻害剤；ヒドロキシクロロキン；スルファサラゾピリン；金塩；エタネルセプト；インフリキシマブ；ミコフェノール酸モフェチル；バシリキシマブ；アタシセプト；リツキシマブ；シトキサン；インターフェロンβ－１ａ；インターフェロンβ－１ｂ；酢酸グラチラマー；塩酸ミトキサントロン；アナキンラ；他のバイオロジクス；および／または静脈内免疫グロブリン（ＩＶＩＧ）（ただしこれらに限定されない）との併用により治療してもよい。上記のような公知の治療剤として、ＩＦＮ－β－１ａ（ＲＥＢＩＦ（登録商標）、ＡＶＯＮＥＸ（登録商標）およびＣＩＮＮＯＶＥＸ（登録商標））、ならびにＩＦＮ－β－１ｂ（ＢＥＴＡＳＥＲＯＮ（登録商標）、ＥＸＴＡＶＩＡ（登録商標）、ＢＥＴＡＦＥＲＯＮ（登録商標）、およびＺＩＦＥＲＯＮ（登録商標））などのインターフェロン；ポリペプチドである酢酸グラチラマー（ＣＯＰＡＸＯＮＥ（登録商標））；ナタリズマブ（ＴＹＳＡＢＲＩ（登録商標））；ならびに細胞毒性剤であるミトキサントロン（ＮＯＶＡＮＴＲＯＮＥ（登録商標））が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４７０】

上記のように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる薬剤を使用した多発性硬化症の治療は、たとえば、多発性硬化症の公知の任意の治療剤または治療方法と組み合わせてもよい。多発性硬化症の公知の治療剤または治療方法としては、ＩＦＮ－β－１ａ（ＲＥＢＩＦ（登録商標）、ＡＶＯＮＥＸ（登録商標）およびＣＩＮＮＯＶＥＸ（登録商標

））、ならびにＩＦＮ－β－１ｂ（ＢＥＴＡＳＥＲＯＮ（登録商標）、ＥＸＴＡＶＩＡ（登録商標）、ＢＥＴＡＦＥＲＯＮ（登録商標）、およびＺＩＦＥＲＯＮ（登録商標））などのインターフェロン；ポリペプチドである酢酸グラチラマー（ＣＯＰＡＸＯＮＥ（登録商標））；ナタリズマブ（ＴＹＳＡＢＲＩ（登録商標））；細胞毒性剤であるミトキサントロン（ＮＯＶＡＮＴＲＯＮＥ（登録商標））；ならびにＦａｍｐｒｉｄｉｎｅ（ＡＭＰＹＲＡ（登録商標））が挙げられるが、これらに限定されない。他の薬剤として、コルチコステロイド；メトトレキサート；シクロホスファミド；アザチオプリン；静脈内免疫グロブリン（ＩＶＩＧ）；イノシン；オクレリズマブ（Ｒ１５９４）；Ｍｙｌｉｎａｘ（Ｃａｌｄｒｉｂｉｎｅ）；アレムツズマブ（Ｃａｍｐａｔｈ）；ダクリズマブ（Ｚｅｎａｐａｘ）；Ｐａｎａｃｌａｒ／フマル酸ジメチル（ＢＧ－１２）；テリフルノミド（ＨＭＲ１７２６）；フィンゴリモド（ＦＴＹ７２０）；ラキニモド（ＡＢＲ２１６０６２）；造血幹細胞移植；Ｎｅｕｒｏｖａｘ；リツキシマブ（リツキサン）；ＢＣＧワクチン；低用量ナルトレキソン；蠕虫療法；血管形成術；静脈内ステント；およびビタミンＤ、多価不飽和脂肪、医療用マリファナなどの代替療法が挙げられる。

【０４７１】

上記のように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる薬剤を使用した関節リウマチの治療は、たとえば、関節リウマチの公知の任意の治療剤または治療方法と組み合わせてもよい。関節リウマチの公知の治療剤または治療方法としては、グルココルチコイド；サリチル酸塩、シクロオキシゲナーゼ－２阻害剤、イブプロフェン、ナプロキセン、ジクロフェナク、インドメタシン、エトドラクなどの非ステロイド系抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）；疾患修飾性抗リウマチ薬（ＤＭＡＲＤ）、すなわち、経口ＤＭＡＲＤ：オーラノフィン（リドーラ）、アザチオプリン（イムラン）、シクロスポリン（ジェネリック薬である、サンディミュン、Ｇｅｎｇｒａｆ、ネオーラル）、Ｄ－ペニシラミン（Ｃｕｐｒｉｍｉｎｅ）、ヒドロキシクロロキン（プラケニル）、注射金剤である金チオリンゴ酸ナトリウム（Ｍｙｏｃｈｒｙｓｉｎｅ）および金チオグルコース（Ｓｏｌｇａｎａｌ）、レフルノミド（アラバ）、メトトレキサート（リウマトレックス）、ミノサイクリン（ミノシン）、ブドウ球菌プロテインＡ免疫吸着（Ｐｒｏｓｏｒｂａカラム）、スルファサラジン（アザルフィジン）；生物学ＤＭＡＲＤ：アダリムマブ（ヒュミラ）、エタネルセプト（エンブレル）、インフリキシマブ（レミケード）、ゴリムマブ（シンポニー）、セルトリズマブペゴール（シムジア）を含むＴＮＦ－α遮断剤；他の生物学的ＤＭＡＲＤ：アナキンラ（Ｋｉｎｅｒｅｔ）、リツキシマブ（リツキサン）、トシリズマブ（アクテムラ）など；ならびにアバタセプト（Ｏｒｅｎｃｉａ）およびベラタセプトを含むＣＤ２８阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４７２】

上記のように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる薬剤を使用したＩＢＤの治療は、たとえば、ＩＢＤの公知の任意の治療剤または治療方法と組み合わせてもよい。ＩＢＤの公知の治療剤または治療方法として、プレドニゾン、メサラジン（アサコール、ペンタサ、Ｌｉａｌｄａ、Ａｓｐｉｒｏを含む）、アザチオプリン（イムラン）、メトトレキサートまたは６－メルカプトプリン、ステロイド、オンダンセトロン、ＴＮＦ－α遮断剤（インフリキシマブ、アダリムマブ、ゴリムマブ、セルトリズマブペゴールを含む）、Ｏｒｅｎｃｉａ（アバタセプト）、ウステキヌマブ（ステラーラ（登録商標））、ブリアキヌマブ（ＡＢＴ－８７４）、セルトリズマブペゴール（シムジア（登録商標））、ＩＴＦ２３５７（ｇｉｖｉｎｏｓｔａｔ）、ナタリズマブ（Ｔｙｓａｂｒｉ）、フィラテグラスト（ＳＢ－６８３６９９）、レミケード（インフリキシマブ）、ベドリズマブ（ＭＬＮ０００２）などによる、症状を制御するための免疫抑制；ＧＳＫ１６０５７８６すなわちＣＣＸ２８２－Ｂ（Ｔｒａｆｉｃｅｔ－ＥＮ）、ＡＪＭ３００、ステラーラ（ウステキヌマブ）、セマピモド（ＣＮＩ－１４９３）、ｔａｓｏｃｉｔｉｎｉｂ（ＣＰ－６９０５５０）、ＬＭＷヘパリンＭＭＸ、ブデソニドＭＭＸ、シンポニー（ゴリムマブ）、ＭｕｌｔｉＳｔｅｍ（登録商標）、ガーダシルＨＰＶワクチン、およびＥｐａｘａｌ　Ｂｅｒｎａ（ビロソームＨＡワクチン）を含む他の薬剤；腸切除、狭窄形成術、および一時的もし

くは永久的な人工肛門形成術もしくは回腸造瘻術などの手術；ナイスタチン（広域スペクトル腸内抗真菌剤）およびイトラコナゾール（スポラノックス）またはフルコナゾール（ジフルカン）などの抗真菌剤；代替医療；プレバイオティクスおよびプロバイオティクス；大麻；ならびに蠕虫療法または豚鞭虫卵が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４７３】

上記のように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる薬剤を使用した乾癬の治療は、たとえば、乾癬の公知の任意の治療剤または治療方法と組み合わせてもよい。乾癬の公知の治療剤としては、軽度の疾患に通常使用される局所剤、中程度の疾患に使用される光線療法、およびおよび重度の疾患に使用される全身性薬剤が挙げられるが、これらに限定されない。局所剤としては、液体入浴剤、保湿剤、鉱油およびワセリン；ならびにコールタール、ジトラノール（アントラリン）、コルチコステロイド（たとえば、デスオキシメタゾン（Ｔｏｐｉｃｏｒｔ）、ベタメタゾン、フルオシノニド）、ビタミンＤ３類似化合物（たとえばカルシポトリオール）、またはレチノイドを含む軟膏およびクリームが挙げられるが、これらに限定されない。光線療法としては、日光；ならびに３１１～３１３ｎｍの波長、ソラレンおよび紫外線のＡ光線療法（ＰＵＶＡ）が挙げられるが、これらに限定されない。全身性薬剤としては、インフリキシマブ（レミケード）、アダリムマブ（ヒュミラ）、ゴリムマブ、セルトリズマブペゴールなどの抗体、および組換えＴＮＦ－αデコイレセプター、エタネルセプト（エンブレル）などを含む、インターロイキンアンタゴニストおよびＴＮＦ－α遮断剤などのバイオロジクス；エファリズマブ（Ｘａｎｎｅｌｉｍ／Ｒａｐｔｉｖａ）、アレファセプト（Ａｍｅｖｉｖ））などのＴ細胞を標的とする薬剤、およびエファリズマブなどの樹状細胞を標的とする薬剤；抗ＩＬ－１２／ＩＬ－２３（ウステキヌマブ（ステラーラ（登録商標））および抗インターロイキン１７などの、サイトカインを標的とするモノクローナル抗体（ＭＡｂ）；ブリアキヌマブ（ＡＢＴ－８７４）；ＩＳＡ２４７を含む（ただしこれらに限定されない）小分子；メトトレキサート、シクロスポリンなどの免疫抑制剤；ビタミンＡおよびレチノイド（合成ビタミンＡ）；ならびに食事およびライフスタイルの変更、絶食期間、低カロリー食および菜食、ビタミンＡおよびビタミンＤを豊富に含む魚油（タラ肝油など）を添加した食事、２種のオメガ３脂肪酸すなわちエイコサペンタエン酸（ＥＰＡ）およびドコサヘキサエン酸（ＤＨＡ）を豊富に含みかつビタミンＥを含む魚油、ｉｃｈｔｈｙｏｔｈｅｒａｐｙ（フィッシュセラピー）、催眠療法、大麻などの代替療法が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４７４】

上記のように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる薬剤を使用した１型糖尿病の治療は、たとえば、１型糖尿病の公知の任意の治療剤または治療方法と組み合わせてもよい。１型糖尿病の公知の治療剤または治療方法としては、インスリン；インスリンアナログ；膵島移植；ＰＲＯＣＨＹＭＡＬ（登録商標）を含む幹細胞療法；アナキンラ（Ｋｉｎｅｒｅｔ（登録商標））を含むＩＬ－１β阻害剤、アバタセプト（Ｏｒｅｎｃｉａ（登録商標））、Ｄｉａｍｙｄ、アレファセプト（Ａｍｅｖｉｖ（登録商標））、Ｏｔｅｌｉｘｉｚｕｍａｂ、ＤｉａＰｅｐ２７７（Ｈｓｐ６０由来ペプチド）、α１－アンチトリプシン、プレドニゾン、アザチオプリン、シクロスポリンなどの非インスリン療法；Ｅ１－ＩＮＴ（上皮成長因子アナログおよびガストリンアナログを含む注射可能な膵島新生療法）；ゾコール（登録商標）、Ｓｉｍｌｕｐ（登録商標）、Ｓｉｍｃａｒｄ（登録商標）、Ｓｉｍｖａｃｏｒ（登録商標）、シタグリプチン（ジペプチジルペプチダーゼ－（ＤＰＰ－４）阻害剤）、抗ＣＤ３モノクローナル抗体（たとえばテプリズマブ）を含むスタチン；ＣＴＬＡ４－Ｉｇ（アバタセプト）；抗ＩＬ－１β（カナキヌマブ）；抗ＣＤ２０モノクローナル抗体（たとえばリツキシマブ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４７５】

上記のように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる薬剤を使用したぶどう膜炎の治療は、たとえば、ぶどう膜炎の公知の任意の治療剤または治療方法と組み合わせてもよい。ぶどう膜炎の公知の治療剤または治療方法としては、コルチコステロイド；アトロピン、ホマトロピンなどの局所毛様体筋麻痺剤；ＰＳＴＴＡ注射（酢酸トリアムシノロ

ンの後部テノン嚢下注射）；メトトレキサートなどの代謝拮抗剤；ＴＮＦ－α遮断剤（インフリキシマブ、アダリムマブ、エタネルセプト、ゴリムマブ、セルトリズマブペゴールを含む）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４７６】

上記のように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる薬剤を使用したシェーグレン症候群の治療は、たとえば、シェーグレン症候群の公知の任意の治療剤または治療方法と組み合わせてもよい。シェーグレン症候群の公知の治療剤または治療方法としては、シクロスポリン、ピロカルピン（サラジェン）およびセビメリン（エボザック）、ヒドロキシクロロキン（プラケニル）、コルチゾン（プレドニゾンなど）、アザチオプリン（イムラン）、シクロホスファミド（シトキサン）、デキサメタゾン、サリドマイド、デヒドロエピアンドロステロン、ＮＧＸ２６７、レバミピド、ＦＩＤ　１１４６５７、エタネルセプト、ラプティバ、ベリムマブ、マブセラ（リツキシマブ）、アナキンラ、静脈内免疫グロブリン（ＩＶＩＧ）、同種間葉系幹細胞（ＡｌｌｏＭＳＣ）、ならびに「Ｓａｌｉｗｅｌｌ　Ｃｒｏｗｎ」による自動神経電気刺激が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４７７】

上記のように、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる薬剤を使用した全身性エリテマトーデスの治療は、たとえば、全身性エリテマトーデスの公知の任意の治療剤または治療方法と組み合わせてもよい。全身性エリテマトーデスの公知の治療剤または治療方法としては、コルチコステロイド；一般的に抗マラリア薬（プラキニルなど）および免疫抑制剤（たとえばメトトレキサートおよびアザチオプリン）である疾患修飾性抗リウマチ薬（ＤＭＡＲＤ）；ヒドロキシクロロキン；細胞傷害剤（たとえばシクロホスファミドおよびミコフェノール酸塩）；ヒドロキシクロロキン（ＨＣＱ）；ベンリスタ（ベリムマブ）；非ステロイド系抗炎症剤；プレドニゾン；セルセプト；プログラフ；アタシセプト；Ｌｕｐｕｚｏｒ；静脈内免疫グロブリン（ＩＶＩＧ）；セルセプト（ミコフェノール酸モフェチル）；Ｏｒｅｎｃｉａ；ＣＴＬＡ４－ＩｇＧ４ｍ（ＲＧ２０７７）；リツキシマブ；オクレリズマブ；エプラツズマブ；ＣＮＴＯ　１３６；Ｓｉｆａｌｉｍｕｍａｂ（ＭＥＤＩ－５４５）；Ａ－６２３（以前のＡＭＧ　６２３）；ＡＭＧ　５５７；Ｒｏｎｔａｌｉｚｕｍａｂ；ｐａｑｕｉｎｉｍｏｄ（ＡＢＲ－２１５７５７）；ＬＹ２１２７３９９；ＣＥＰ－３３４５７；デヒドロエピアンドロステロン；レボチロキシン；ａｂｅｔｉｍｕｓ　ｓｏｄｉｕｍ（ＬＪＰ　３９４）；メマンチン；オピエート；ラパマイシン；腎移植；幹細胞移植が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４７８】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、本明細書に記載の、治療剤および／または該治療剤を含む医薬組成物は、たとえば、同種移植片もしくは異種移植片の急性もしくは慢性の拒絶反応、炎症性疾患、または自己免疫疾患の治療または予防、または寛容の誘導を目的として、単独の有効成分として、または免疫調節を目的とした投薬計画における他の薬剤もしくは他の抗炎症剤とともに投与してもよい。

【０４７９】

たとえば、上記の治療剤および／または該治療剤を含む医薬組成物は以下の薬剤と組みあわせて使用してもよい：カルシニューリン阻害剤（たとえばシクロスポリンＡ、ＦＫ５０６）；免疫抑制マクロライド（たとえばラパマイシン）もしくはその誘導体（たとえば４０－Ｏ－（２－ヒドロキシ）エチル－ラパマイシン）；リンパ球ホーミング剤（たとえばＦＴＹ７２０）もしくはそのアナログ；コルチコステロイド；シクロホスファミド；アザチオプリン；メトトレキサート；レフルノミドもしくはそのアナログ；ミゾリビン；ミコフェノール酸；ミコフェノール酸モフェチル；１５－デオキシスペルグアリンもしくはそのアナログ；免疫抑制モノクローナル抗体（たとえば、ＭＨＣ、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８、ＣＤ７、ＣＤ２５、ＣＤ２７、Ｂ７、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ５８、ＣＤ１３７、ＩＣＯＳ、ＣＤ１５０（ＳＬＡＭ）、ＯＸ４０、４－１ＢＢもしくはこれらのリガンドなどの白血球レセプターに対するモノクローナル抗体）；他の免疫調節化合物（たとえばＣＴＬＡ４－Ｉｇ（アバタセプト、ＯＲＥＮＣＩＡもしくはベラタ

セプト）、ＣＤ２８－Ｉｇ、Ｂ７－Ｈ４－Ｉｇ、他の共刺激剤）；接着分子阻害剤（たとえばモノクローナル抗体（ｍＡｂ））；またはＬＦＡ－１アンタゴニスト、セレクチンアンタゴニスト、ＶＬＡ－４アンタゴニストなどの低分子阻害剤。

【０４８０】

言うまでもないことだが、本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、たとえば本明細書に記載の他の免疫抑制療法／免疫調節療法または抗炎症療法と併用して、本明細書に記載の治療剤および／または該治療剤を含む医薬組成物を投与する場合、併用される薬剤の種類（たとえば、ステロイド系の薬剤であるのか、シクロスポリンであるのか）、使用される特定の薬剤、治療条件などによって、併用される免疫抑制剤、免疫調節剤または抗炎症性化合物の用量は変化するであろう。

【０４８１】

本発明の薬剤を使用した悪性腫瘍の治療は、当技術分野で公知の他の治療法、たとえば、放射線療法、抗体療法、化学療法、光線力学療法、手術の１以上と組み合わせてもよく、あるいは、免疫抑制剤、細胞傷害剤などの慣用の薬剤を用いた併用療法において、本発明の薬剤を使用した悪性腫瘍の治療を実施してもよい。

【０４８２】

さらに、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療剤または医薬組成物は、他の化合物または免疫療法と組み合わせて投与してもよい。たとえば、この併用療法は、少なくとも１つの他の治療剤もしくは免疫調節剤または免疫刺激療法と組み合わせられた本発明の化合物を含んでいてもよく、組み合わせられる治療剤もしくは免疫調節剤または免疫刺激療法としては、腫瘍ワクチン、養子Ｔ細胞療法、Ｔｒｅｇ除去、抗体（たとえば、ベバシズマブ、アービタックス）、ペプチド、ペプチボディ、小分子、細胞傷害剤および細胞増殖抑制剤（たとえば、パクリタキセル、シスプラチン、ビノレルビン、ドセタキセル、ゲムシタビン、テモゾロミド、イリノテカン、５ＦＵ、カルボプラチン）などの化学療法剤、インターフェロンおよびインターロイキンなどの免疫調節剤、免疫刺激抗体、成長ホルモン、他のサイトカイン、葉酸、ビタミン、無機質、アロマターゼ阻害剤、ＲＮＡｉ、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、プロテアソーム阻害剤などが挙げられるが、これらに限定されない。

【０４８３】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、本明細書に記載の治療剤および／または該治療剤を含む医薬組成物と、感染症の治療に効果的な公知の治療剤との組み合わせの使用が提供される。

【０４８４】

本明細書に記載の治療剤および／または該治療剤を含む医薬組成物は、細菌感染の治療に使用される１以上のさらなる治療剤と組み合わせて投与することができ、該治療剤としては、アミノグリコシド、カルバペネム、セファロスポリン、マクロライド、リンコサミド、ニトロフラン、ペニシリン、ポリペプチド、キノロン、スルホンアミド、およびテトラサイクリンを含む抗生物質；クロファジミン、シクロセリン、シクロセリン、リファブチン、リファペンチン、およびストレプトマイシンを含む（ただしこれらに限定されない）抗マイコバクテリウム剤；ならびにクロラムフェニコール、ホスホマイシン、メトロニダゾール、ムピロシン、チニダゾールなどの他の抗菌薬が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４８５】

本明細書に記載の治療剤および／または該治療剤を含む医薬組成物は、ウイルス感染の治療に使用される１以上のさらなる治療剤と組み合わせて投与することができ、該治療剤としては、オセルタミビル（商品名タミフル）、ザナミビル（商品名リレンザ）、アルビドール（アダマンタン誘導体）（アマンタジン、リマンタジン）、ノイラミニダーゼ阻害剤（オセルタミビル、ラニナミビル、ペラミビル、ザナミビル）などの抗ウイルス薬；グアニン（アシクロビル／バラシクロビル、ガンシクロビル／バルガンシクロビル、ペンシクロビル／ファムシクロビル）およびアデニン（ビダラビン）などのプリンアナログ、な

らびにウリジン（イドクスウリジン、トリフルリジン、エドクスジン）、チミン（ブリブジン）、シトシン（シタラビン）などのピリミジンアナログを含むヌクレオチドアナログ逆転写酵素阻害剤；ホスカルネット；エンテカビル、ラミブジン、テルビブジン、クレブジンなどのヌクレオシドアナログ／ＮＡＲＴＩ；アデフォビル、テノホビルなどのヌクレオチドアナログ／ＮｔＲＴＩｓ；シドフォビルなどの核酸阻害剤；インターフェロン、インターフェロンα－２ｂ、ペグインターフェロンα－２ａ；リバビリン／タリバビリン；ジドブジン、ラミブジン、アバカビル、ロピナビル、リトナビル、テノホビル／エムトリシタビン、エファビレンツなど（これらは単独または様々な組み合わせで使用される）の抗レトロウイルス剤；ｇｐ４１（エンフビルチド）；ラルテグラビル；ホスアンプレナビル、ロピナビル、アタザナビルなどのプロテアーゼ阻害剤；メチサゾン；ドコサノール；ホミビルセン；トロマンタジンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０４８６】

本明細書に記載の治療剤および／または該治療剤を含む医薬組成物は、真菌感染の治療に使用される１以上のさらなる治療剤と組み合わせて投与することができ、該治療剤としては、ポリエン系抗真菌剤、イミダゾール、トリアゾール、チアゾール系抗真菌剤、アリルアミン、エキノキャンディン、他の抗真菌剤などの抗真菌薬が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４８７】

別法としてまたは上記に加えて、アップレギュレートのための方法は、本発明のポリペプチドの少なくとも１つまたはその活性な部分の量（または必要に応じて発現量）を対象において特異的にアップレギュレートすることにより行ってもよい。

【０４８８】

上述したように、また後述の実施例において述べられるように、本発明のこの態様における生体分子配列は、野生型遺伝子産物（公知のタンパク質）の活性または発現の変化が、疾患、障害または病態の発症または進行を引き起こすことが知られている疾患、障害または病態の治療における有益な治療ツールとして使用してもよい。たとえば、膜結合レセプターの過剰発現によって疾患が引き起こされる場合、このレセプターの可溶性変異体を、該レセプターのリガンドへの結合に競合するアンタゴニストとして使用することによって、該レセプターからのシグナル伝達を遮断させてもよい。

【０４８９】

実施形態の少なくともいくつかによれば、インビボまたはエクスビボにおいて、免疫細胞（好ましくはＴ細胞）を治療剤と接触させて、免疫応答を調節することができる。治療剤と接触させるＴ細胞は、α／β細胞レセプターおよびγ／δＴ細胞レセプターを含むＴ細胞レセプターを発現する任意の細胞であってよい。Ｔ細胞はさらにＣＤ３を発現するあらゆる細胞を包含し、ＣＤ４およびＣＤＳをさらに発現するＴ細胞サブセットも包含する。Ｔ細胞はナイーブ細胞および記憶細胞の両方を包含し、ＣＴＬなどのエフェクター細胞も包含する。Ｔ細胞はさらに、Ｔｈ１、Ｔｃ１、Ｔｈ２、Ｔｃ２、Ｔｈ３、Ｔｈ１７、Ｔｈ２２、Ｔｒｅｇ、およびＴｒ１細胞などの細胞も包含する。Ｔ細胞はさらにＮＫＴ細胞および類似した独特のＴ細胞系細胞を包含する。

【０４９０】

Ｅｐｉｔｏｐｅ　ｓｐｒｅａｄｉｎｇの抑制

ｅｐｉｔｏｐｅ　ｓｐｒｅａｄｉｎｇは、特異性およびＶ遺伝子の利用の両方において、Ｂ細胞およびＴ細胞が免疫応答を拡大する能力を指し、特に、特異性は単一の決定基から自己抗原の多数の部位へと拡大される（Monneaux, F. et al., Arthritis & Rheumatism, 46(6): 1430-1438 (2002)）。ｅｐｉｔｏｐｅ　ｓｐｒｅａｄｉｎｇは全身性自己免疫疾患のみに限られず、ヒトの１型糖尿病および多発性硬化症などのＴ細胞依存性臓器特異性疾患、ならびに様々なミエリンタンパク質を有するＥＡＥ誘導実験動物についても報告がなされている。

【０４９１】

ｅｐｉｔｏｐｅ　ｓｐｒｅａｄｉｎｇは、同一の高分子複合体内の関連タンパク質に存

在するエピトープの後天的な認識だけではなく、同一の自己分子内の新たなエピトープの後天的な認識も関係している。ｅｐｉｔｏｐｅ ｓｐｒｅａｄｉｎｇは遅延型過敏症（ＤＴＨ）応答を測定することにより評価することができ、この方法は当技術分野において知られている。

【０４９２】

一実施形態は、有効量の上記の治療剤を対象に投与することによって、対象におけるｅｐｉｔｏｐｅ ｓｐｒｅａｄｉｎｇを阻害または抑制する方法を提供する。さらなる実施形態では、上記の治療剤のいずれか１つによって、多発性硬化症を有する個体におけるｅｐｉｔｏｐｅ ｓｐｒｅａｄｉｎｇが阻害される。上記の治療剤は、炎症経路の複数の箇所を阻害またはブロックすることが好ましい。

【０４９３】

さらに別の実施形態では、多発性硬化症を有する対象におけるｅｐｉｔｏｐｅ ｓｐｒｅａｄｉｎｇを阻害または抑制する方法であって、有効量の上記の治療剤を対象に投与することによって、Ｔｈ１細胞、Ｔｈ１７細胞、Ｔｈ２２細胞、または炎症分子（ＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ＴＧＦ－β、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７、ＩＬ－６、ＩＬ－２３、ＩＬ－２２、ＩＬ－２１およびＭＭＰを含むが、これらに限定されない）を分泌するもしくは炎症分子を別の細胞に分泌させる他の細胞の、分化、増殖、活性、ならびに／またはサイトカイン産生および／もしくは分泌を阻害または抑制させることを特徴とする方法が提供される。

【０４９４】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療剤の、がんワクチン接種におけるアジュバントとしての使用

腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）に対する免疫化は、がんを治療および予防するための有望な方法であるが、たとえば、腫瘍細胞によって発現された自己抗原に関連する寛容機構などの、いくつかの困難な点および制限を抱えている。Ｂ７．１（ＣＤ８０）およびＢ７．２（ＣＤ８６）などの共刺激分子を用いることによって、遺伝子ベースのワクチンおよび細胞ベースのワクチンの有効性が動物モデルにおいて向上されており、これらの共刺激分子はアジュバントとして臨床試験で試験中である。このようなアジュバント活性は、共刺激シグナルを増強すること、または腫瘍細胞によって発現された負の共刺激因子によって伝達される抑制性シグナルをブロックすることによって達成することができる（Neighbors et al., 2008 J Immunother. ;31(7):644-55）。本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つに特異的な、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲの分泌形態、可溶形態、もしくはＥＣＤ、これらの変異体、オーソログ、および／もしくは結合体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体および／もしくは抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに／または代替足場のいずれか１つは、がんワクチン接種におけるアジュバントとして使用することができる。実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、ＴＡＡに対する免疫化を向上させる方法であって、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つに特異的な、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲの分泌形態、可溶形態、もしくはＥＣＤ、これらの変異体、オーソログ、および／もしくは結合体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体および／もしくは抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに／または代替足場のいずれか１つは、を有効量で患者に投与することを含む方法を提供する。

【０４９５】

養子免疫療法のための、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療剤の使用

寛容モデルのいくつかにおける重要な特徴の１つは、寛容状態が一旦確立されれば、ドナーに特異的な制御性細胞を養子移入させることによってナイーブレシピエントにおける寛容状態を永続させることができるということである。このような養子移入についての研究においては、Ｔ細胞亜集団および非Ｔ細胞の能力を利用して寛容の移入を行っている。

このような寛容は、共刺激をブロックすること、または共抑制性Ｂ７とそのカウンターレセプターとを結合させることによって誘導することができる。動物に対する適用が成功しており、ヒトにおける臨床試験で評価されているこの方法は（Scalapino KJ and Daikh DI. PLoS One. 2009;4(6):e6031; Riley et al., Immunity. 2009; 30(5): 656-665）、自己免疫疾患および移植における治療法の選択肢として有望である。本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つに特異的な、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲの分泌形態、可溶形態、もしくはＥＣＤ、これらの変異体、オーソログ、および／もしくは結合体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体および／もしくは抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに／または代替足場は、養子免疫療法に使用される。したがって、実施形態の少なくともいくつかによれば、本発明は、インビボまたはエクスビボにおいて寛容を誘導する方法であって、
ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つに特異的な、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲの分泌形態、可溶形態、もしくはＥＣＤ、これらの変異体、オーソログ、および／もしくは結合体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体および／もしくは抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、ならびに／または代替足場の有効量を患者または患者から単離した白血球に投与することによって、寛容原性制御性細胞の分化を誘導すること、
該細胞をエクスビボにおいて濃縮および増殖させること、ならびに
該寛容原性制御性細胞を患者に自己輸血すること
を含む方法を提供する。

【０４９６】

あるいは、患者の免疫応答は、
患者から免疫細胞を採取すること、
ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲの活性を阻害し、かつ／または、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲと本来の結合パートナーとの相互作用を阻害する薬剤と、免疫細胞とをインビトロにおいて接触させること、ならびに
インビトロにおいて刺激した免疫細胞を患者に再導入すること
によって増強することができる。
別の実施形態においては、免疫応答を調節する方法は、
患者から免疫細胞を単離すること、
ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲの一形態をコードする核酸分子で免疫細胞をトランスフェクトし、本発明の様々な実施形態によるＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲポリペプチドの全体またはその一部を細胞表面上に発現させること、ならびに
トランスフェクトした細胞を患者に再導入することを含む。
このトランスフェクト細胞は、患者の免疫応答を調節する能力を有する。

【０４９７】

免疫増強のための、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療剤の使用

１．がんの治療

本明細書において提供される治療剤は、通常、免疫応答を刺激する治療剤としてインビボおよびエクスビボにおいて有用である。本明細書に開示された治療剤組成物は、通常、免疫系が免疫応答を開始するような任意の疾患もしくは障害を有する対象、またはこのような疾患もしくは障害の素因を有する対象を治療するのに有用である。治療剤が、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ免疫シグナルを調節する能力を発揮することによって、より強力な免疫応答を起こすことが可能となる。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療剤は、Ｔ細胞などの免疫細胞が関与する免疫応答を刺激または増強するのに有用である。

【０４９８】
本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療剤は、対象のＴ細胞を刺激するのに効果的な量の治療剤を対象に投与することによって、宿主における免疫応答をがんを治療する目的で刺激または増強するのに有用である。
【０４９９】
２．ワクチン中における治療剤の使用
本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療剤は、単独または他の適切な治療と組み合わせて投与される。一実施形態において、治療剤は、上記のワクチン組成物とともに、または上記のワクチン組成物の一成分として投与することができる。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療剤は、ワクチンの投与前、投与と同時、または投与後に投与することができる。一実施形態において、治療剤はワクチンの投与と同時に投与される。
【０５００】
医薬組成物
本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、別の態様において本発明は、上記の治療剤のいずれか１つまたはそれらの組み合わせを含む組成物（たとえば医薬組成物）を提供する。
【０５０１】
したがって、本発明は、治療有効量の本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療剤を含む医薬組成物を特徴とする。
【０５０２】
さらに、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる医薬組成物は、非転移性、侵襲性、もしくは転移性であってもよいがんの治療、ならびに／または免疫関連障害および／もしくは感染性障害の治療に使用することが好ましい。
【０５０３】
「治療」は治療処置および予防手段の両方を指す。治療を必要とする対象としては、既に疾患を有するものおよび疾患の予防がなされるものが挙げられる。したがって、本明細書において治療を受ける哺乳動物は、疾患を有すると診断されたもの、疾患の素因を有するもの、または、疾患に罹患しやすいものであってよい。治療の対象となる「哺乳動物」は、哺乳動物として分類されるあらゆる動物を指し、ヒト、ならび家畜、動物園の飼育動物、スポーツに使用される動物、愛玩動物、たとえば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなどが挙げられる。哺乳動物はヒトであることが好ましい。
【０５０４】
「治療有効量」は、哺乳動物の疾患または障害を治療するのに効果的な本発明の薬剤の量を指す。
【０５０５】
本発明の治療剤は、対象に単独で提供することができ、あるいは、薬学的に許容される担体と混合することにより医薬組成物の一部として提供することができる。
【０５０６】
本発明の実施形態の少なくともいくつかによる医薬組成物は、併用療法において投与することもでき、すなわち、他の薬剤と組み合わせることができる。たとえば、併用療法は、少なくとも１つの他の治療剤または免疫調節剤と組み合わせられた、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および／もしくは抗ＬＳＲ抗体、またはＬＹ６Ｇ６Ｆ調節剤、ＶＳＩＧ１０調節剤、ＴＭＥＭ２５調節剤および／もしくはＬＳＲ調節剤、たとえば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原および／もしくはＬＳＲ抗原の細胞外ドメインを含む可溶性ポリペプチド結合体；ペプチド、リボザイム、アプタマー、ｓｉＲＮＡなどの小分子；またはＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲに結合する他の薬剤を包含することができる。
【０５０７】

ある組成物が患者に投与された際にレシピエント患者がその組成物を寛容することができる場合、「薬学的に許容される担体」であると言う。本明細書において「薬学的に許容される担体」は、生理学的に許容されるあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤、等張化剤、吸収遅延剤などを包含する。担体は、（たとえば注射または点滴による）、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、非経口投与、脊髄投与、表皮投与に適していることが好ましい。このような組成物として、滅菌水、緩衝食塩水（たとえばＴｒｉｓ－ＨＣｌ、酢酸塩、リン酸塩）、ｐＨおよびイオン強度、ならびに必要に応じて加えられる添加剤などが挙げられ、添加剤としては、洗浄剤および可溶化剤（たとえばポリソルベート２０、ポリソルベート８０）、酸化防止剤（たとえばアスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、保存剤（たとえばチメロサール、ベンジルアルコール）、ならびに増量成分（たとえばラクトース、マンニトール）が挙げられる。以下に詳述するように、非水性溶媒またはビヒクルを使用してもよい。

【０５０８】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる医薬組成物において使用してもよい適切な水性および非水性の担体としては、水、エタノール、ポリオール（たとえばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、これらの適切な混合物、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、たとえば、レシチンなどのコーティング剤を使用すること、分散液中の粒子の粒子径を要求される大きさに保つこと、または界面活性剤を使用することによって、一定に保つことができる。投与経路によっては、活性化合物、すなわち、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つに特異的に結合する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原および／もしくはＬＳＲ抗原の細胞外ドメイン、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、抗原結合フラグメント、これらのいずれかを含む結合体、代替足場、または二重特異性分子を含む可溶性ポリペプチド結合体を何らかの材料でコーティングして、該化合物を失活させうる酸の作用および他の自然条件下から該化合物を保護してもよい。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる医薬品化合物は、薬学的に許容される塩を１以上含んでいてもよい。「薬学的に許容される塩」は、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、望ましくない毒性効果を与えない塩を指す（たとえば、Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19を参照されたい）。このような塩としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、リン酸などの無毒な無機酸に由来するもの；および脂肪族モノカルボン酸、脂肪族ジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族スルホン酸、芳香族スルホン酸などの無毒な有機酸に由来するものが挙げられる。塩基付加塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどのアルカリ土類金属に由来するもの；およびＮ，Ｎ’－ジベンジルエチレンジアミン、Ｎ－メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどの無毒な有機アミンに由来するものが挙げられる。

【０５０９】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる医薬組成物は、薬学的に許容される抗酸化剤を含んでいてもよい。

薬学的に許容される酸化防止剤としては、

（１）アスコルビン酸、塩酸システイン、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどの水溶性抗酸化剤；

（２）アスコルビルパルミタート、ブチルヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、レシチン、没食子酸プロピル、α－トコフェロールなどの油溶性抗酸化剤；および

（３）クエン酸、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などの金属キレート剤

が挙げられる。

【０５１０】
このような組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤などのアジュバントを含んでいてもよい。微生物の混入を確実に防ぐために、上述の滅菌処理と、様々な抗菌剤および抗真菌剤（たとえばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸など）の添加の両方を行ってもよい。糖類、塩化ナトリウムなどの等張化剤を組成物に添加することとも望ましいと考えられる。さらに、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチンなどの吸収遅延剤を添加することによって、注射用医薬品形態を持続的に吸収させてもよい。
【０５１１】
薬学的に許容される担体としては、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注射溶液または分散液の即時調製のための滅菌散剤が挙げられる。薬学的活性物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は当技術分野において公知である。慣用の媒体または薬剤が活性化合物と適合しない場合を除いて、慣用の媒体または薬剤を本発明の実施形態の少なくともいくつかによる医薬組成物において使用することも考えられる。補助的な活性化合物を医薬組成物に含有させることができる。
【０５１２】
治療用組成物は、通常、製造過程および保存中において無菌かつ安定でなければならない。治療用組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、もしくはリポソーム、または高濃度の薬剤に適した他の秩序構造に製剤化することができる。担体は溶媒または分散媒であってよく、溶媒または分散媒として、たとえば、水、エタノール、ポリオール（たとえばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの適切な混合物が挙げられる。適切な流動性は、たとえば、レシチンなどのコーティングを使用すること、分散液中の粒子の粒子径を要求される大きさに保つこと、または界面活性剤を使用することによって、一定に保つことができる。多くの場合、等張化剤、たとえば、マンニトール、ソルビトールなどの糖類、多価アルコール、または塩化ナトリウムを組成物中に含有させることが好ましいであろう。たとえばモノステアリン酸塩、ゼラチンなどの吸収遅延剤を注射用組成物中に含有させることによって、該注射用組成物を持続的に吸収させることができる。滅菌注射溶液は、適切な溶媒中の必要量の活性化合物と、上記の成分のうちの１つまたは上記の成分の組み合わせとを必要に応じて組み合わせ、次いで、滅菌精密ろ過を行うことによって調製することができる。通常、分散液は、上記の成分のうち必要とされる他の成分と塩基性分散媒とを含む滅菌ビヒクルに活性化合物を分散させることによって調製される。滅菌注射溶液の調製のための滅菌散剤の場合は、前もって滅菌ろ過した溶液を真空乾燥または凍結乾燥することによって、所望のさらなる成分と有効成分とを含む粉末を調製する方法が好ましい。
【０５１３】
滅菌注射溶液は、適切な溶媒中の必要量の活性化合物と、上記の成分のうちの１つまたは上記の成分の組み合わせとを必要に応じて組み合わせ、次いで、滅菌精密ろ過を行うことによって調製することができる。通常、分散液は、上記の成分のうち必要とされる他の成分と塩基性分散媒とを含む滅菌ビヒクルに活性化合物を分散させることによって調製される。滅菌注射溶液の調製のための滅菌散剤の場合は、前もって滅菌ろ過した溶液を真空乾燥または凍結乾燥することによって、所望のさらなる成分と有効成分とを含む粉末を調製する方法が好ましい。
【０５１４】
担体材料と組み合わせて単一剤形を調製することができる有効成分量は、治療対象および特定の投与方法によって異なるであろう。担体材料と組み合わせて単一剤形を調製することができる有効成分量は、通常、治療効果をもたらす組成物量であろう。この量は、通常、薬学的に許容される担体と組み合わせられる有効成分の量が、１００％のうち、約０．０１％～約９９％の範囲、好ましくは約０．１％～約７０％の範囲、最も好ましくは約１％～約３０％の範囲であろう。
【０５１５】
投与計画は所望の応答（たとえば治療効果）が最適化されるように調整される。たとえ

ば、単一のボーラスとして投与されてもよく、いくつかの用量に分割してある一定期間にわたって投与してもよく、あるいは、治療状況に伴う緊急性に応じて用量を減少または増加させてもよい。投与のしやすさおよび用量の均一性のための単位剤形中の非経口組成物を製剤化することは特に有利である。本明細書において、単位剤形は、治療を受ける対象への単位用量として適した物理的に別々の単位を指し、それぞれの単位は、必要とされる薬学的担体とともに所望の治療効果をもたらすように算出された所定量の活性化合物を含んでいる。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる単位剤形の仕様は、（ａ）活性化合物に特有の特性および達成される特定の治療効果、および（ｂ）個体における感受性を治療するための上記のような活性化合物の調製技術に固有の制限事項によって決定されかつこれらによって直接的に左右される。

【０５１６】

抗体を投与する場合、用量は宿主の体重あたり、約０．０００１～１００ｍｇ／ｋｇの範囲、さらに一般的には０．０１～５ｍｇ／ｋｇの範囲である。たとえば、用量は、１～１０ｍｇ／ｋｇの範囲において、０．３ｍｇ／ｋｇ体重、１ｍｇ／ｋｇ体重、３ｍｇ／ｋｇ体重、５ｍｇ／ｋｇ体重または１０ｍｇ／ｋｇ体重であってもよい。典型的な治療計画は、投与を１週に１回、２週ごとに１回、３週ごとに１回、４週ごとごとに１回、月に１回、３ヶ月に１回、または３～６ヶ月ごとに１回行うことを必然的に伴う。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる抗体のための好ましい投与計画は、

（ｉ）４週ごとに１回の投与を計６回行い、以降３ヶ月ごとに１回；

（ii）３週ごとに１回；および

（iii）３ｍｇ／ｋｇ体重を１回投与した後、１ｍｇ／ｋｇ体重を３週ごとに１回

のいずれか１つの投薬スケジュールを使用して、１ｍｇ／ｋｇ体重または３ｍｇ／ｋｇ体重の抗体を静脈内投与することを含む。

【０５１７】

本明細書に記載の融合タンパク質の場合、類似した投与計画に従ってもよく、あるいは、適切なタイミングの投薬計画に従って、融合タンパク質を、０．０００１～１００ｍｇ／ｋｇ患者体重／日、好ましくは０．００１～１０．０ｍｇ／ｋｇ／日で投与してもよい。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療用組成物は、たとえば、１日３回、１日２回、１日１回、週３回、週２回、週１回、２週ごとに１回、または３週、４週、５週、６週、７週もしくは８週ごとに１回投与することができる。さらに、該組成物は、短期間または長期間（たとえば１週、１ヶ月、１年、５年）にわたって投与することができる。

【０５１８】

いくつかの方法では、異なる結合特異性を有する２種以上のモノクローナル抗体を同時に投与し、この場合、投与されるそれぞれの抗体の用量は上記の範囲内である。通常、抗体は様々な理由で投与される。１回の投与と次の投与との間隔は、たとえば、１週間、１ヶ月、３ヶ月、または１年であってもよい。患者において測定される標的抗原に対する抗体の血中濃度を指標として、間隔を不規則にしてもよい。いくつかの方法では、血漿中抗体濃度を約１～１０００μｇ／ｍｌとするため、さらにいくつかの方法では２５～３００μｇ／ｍｌとするために用量を調整する。

【０５１９】

あるいは、治療剤を徐放性処方として投与することができ、この場合、投与回数はより少ないものとなる。用量および投与回数は、患者体内における治療剤の半減期によって異なる。通常、ヒト抗体の半減期が最も長く、ヒト化抗体、キメラ抗体および非ヒト抗体が後に続く。融合タンパク質の半減期は大きく異なっていてもよい。用量および投与回数は、処置が予防目的か、治療目的かによって異なっていてもよい。予防的な投与においては、比較的低用量を比較的長い間隔で長期間にわたり投与する。一部の患者においては、一生を通して治療を受け続ける。治療目的投与においては、疾患の進行が低下または停止するまで、好ましくは患者の疾患の症状が部分的または完全に改善されるまで、比較的高用量を比較的短い間隔で投与することが必要とされる場合がある。この後、患者に予防的な

投与を行ってもよい。

【０５２０】

患者に毒性を与えることなく、特定の患者、組成物、および投与方法において所望の治療効果を達成するのに効果的な有効成分量とするため、本発明の医薬組成物中の有効成分の実際の投与量レベルは様々であってよい。投与量レベルの選択は、様々な薬物動態学的要因に左右され、薬物動態学的要因として、使用する本発明の特定の組成物、またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性；投与経路；投与のタイミング；使用する特定の化合物の排泄速度；治療期間；使用される特定の組成物と組み合わせられた他の薬剤、化合物および／または物資；治療を受ける患者の年齢、性別、体重、状態、健康状態および既往症；および、医学分野においてよく知られている同様の要因が挙げられる。

【０５２１】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ可溶性タンパク質、ＶＳＩＧ１０可溶性タンパク質、ＴＭＥＭ２５可溶性タンパク質および／もしくはＬＳＲ可溶性タンパク質、ＬＹ６Ｇ６Ｆ細胞外ドメイン、ＶＳＩＧ１０細胞外ドメイン、ＴＭＥＭ２５細胞外ドメインおよび／もしくはＬＳＲ細胞外ドメイン、これらのいずれかを含む融合タンパク質、または抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および／もしくは抗ＬＳＲ抗体の「治療有効量」によって、疾患の症状の重症度の低下、疾患の症状が消失している頻度およびその持続期間の増加、寿命の延長、疾患の寛解、または疾患によって引き起こされる障害または身体障害の予防もしくは低下がもたらされることが好ましい。たとえば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲが陽性である腫瘍、たとえば、メラノーマ、肝臓がん、腎臓がん、脳がん、乳がん、結腸がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、胃がん、多発性骨髄腫、ならびに造血器がん（（ホジキンおよび非ホジキン）リンパ腫、急性および慢性リンパ芽球性白血病、ならびに急性および慢性骨髄白血病を含むが、これらに限定されない）を治療するためには、「治療有効量」によって、治療を受けていない対象と比較して細胞増殖または腫瘍増殖が、少なくとも約２０％、より好ましくは少なくとも約４０％、さらにより好ましくは少なくとも約６０％、さらにより好ましくは少なくとも約８０％抑制されることが好ましい。化合物が腫瘍増殖を抑制する能力は、ヒト腫瘍における有効性を予測可能な動物モデル系で評価することができる。あるいは、組成物のこの特性は、化合物の抑制能を試験することにより評価することができ、抑制能は当業者に公知のアッセイによってインビトロにおいて試験される。治療化合物の治療有効量によって腫瘍サイズを減少させることまたは対象の症状を改善することができる。

【０５２２】

当業者は、対象の大きさ、対象の症状の重症度、および特定の組成物または選択された投与経路などの要因に基づいて治療有効量を決定することができるであろう。

【０５２３】

本発明の組成物は、当技術分野において公知の様々な方法の１以上を使用し、１以上の投与経路を介して投与することができる。当業者によって十分に理解されるように、投与経路および／または投与方法は所望とする効果によって異なるであろう。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療剤の好ましい投与経路として、血管内送達（たとえば注射または点滴）、静脈内送達、筋肉内送達、皮内送達、腹腔内送達、皮下送達、脊髄送達、経口送達、腸送達、直腸送達、肺送達（たとえば吸入）、経鼻送達、局所送達（経皮送達、バッカル送達および舌下送達を含む）、膀胱内送達、硝子体内送達、腹腔内送達、経膣送達、脳内送達（たとえば脳室内、脳内、およびＣＥＤ法（ｃｏｎｖｅｃｔｉｏｎ ｅｎｈａｎｃｅｄ ｄｉｆｆｕｓｉｏｎ））、ＣＮＳ送達（たとえば髄腔内送達、脊髄周囲送達、および脊髄内送達）、非経口投与（皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、および皮内投与を含む）、経粘膜投与（たとえば舌下投与）、移植片を介した投与、たとえば注射または点滴などによる他の非経口投与経路、ならびに、当技術分野において公知の他の送達経路および／または投与形態が挙げられる。本明細書において「非経口投与」は、通常、経腸投与および局所投与以外の、注射による投与方法を意味し、静脈内、筋肉内、動

脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外、および胸骨下における注射ならびに点滴が包含されるが、これらに限定されない。特定の実施形態においては、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質、治療剤または医薬組成物は、腹腔内投与または静脈内投与することができる。

【０５２４】

あるいは、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質の活性を調節できる、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲの特異的抗体、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲの他の薬剤または分子、これらの結合体、ならびにこれらの組み合わせは、非経口経路以外の経路で投与することができ、たとえば、鼻腔内投与、経口投与、経膣投与、直腸投与、舌下投与、局所投与などの、局所投与経路、表皮投与経路、粘膜投与経路により投与することができる。

【０５２５】

活性化合物は、化合物が急速に放出されることを防ぐ担体を使用して調製することができ、たとえば移植片、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化された送達システムを包含する放出制御処方とすることができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの生物分解性・生体適合性ポリマーを使用することができる。このような処方を調製するための方法は、数多くが特許されており、通常、当業者によく知られている。たとえば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【０５２６】

治療用組成物は当技術分野において公知の医療器具を用いて投与することができる。たとえば、好ましい実施形態では、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療用組成物は、針を有する皮下注射装置で投与することができ、このような装置は、米国特許第５，３９９，１６３号；第５，３８３，８５１号；第５，３１２，３３５号；第５，０６４，４１３号；第４，９４１，８８０号；第４，７９０，８２４号；または第４，５９６，５５６号に開示されている。本発明において有用な公知の移植片およびモジュールとしては、米国特許第４，４８７，６０３号（制御された速度で薬剤を供給するための、移植可能なマイクロ輸液ポンプが開示されている）；米国特許第４，４８６，１９４号（皮膚を介して薬剤を投与するための治療器具が開示されている）；米国特許第４，４４７，２３３号（正確な輸液速度で薬剤を伝達するための薬剤輸液ポンプが開示されている）；米国特許第４，４４７，２２４号（流量を変更することが可能な、連続的な薬剤送達のための移植可能な輸液装置が開示されている）；米国特許第４，４３９，１９６号（マルチチャンバーコンパートメントを有する浸透圧薬物送達システムが開示されている）；および米国特許第４，４７５，１９６号（浸透圧薬物送達システムが開示されている）が挙げられる。これらの特許文献は参照により本明細書に組み込まれる。他のこのような移植片、送達システムおよびモジュールは数多くが当業者に知られている。

【０５２７】

特定の実施形態において、上記の抗体、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲの可溶性タンパク質、細胞外ドメイン、ならびに／または融合タンパク質は、インビボにおいて確実に適切に分布するように製剤化することができる。たとえば、脳血液関門（ＢＢＢ）は数多くの高親水性の化合物を排除する。（所望に応じて）本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療化合物をＢＢＢにおいて確実に通過させるためには、たとえば、リポソーム内に内包されるように製剤化することができる。リポソームの製造方法については、たとえば、米国特許第４，５２２，８１１号；第５，３７４，５４８号；および第５，３９９，３３１号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または臓器への選択的な輸送により標的薬物送達を増強する１以上の成分を含んでいてもよい（たとえば、V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685を参照されたい

）。ターゲティングのための成分としては、典型的には、葉酸塩またはビオチン（たとえば、Ｌｏｗらに付与された米国特許第５，４１６，０１６号を参照されたい）；マンノシド（Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038）；抗体（P. G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180）；サーファクタントタンパク質Ａレセプター（Briscoe et al. (1995) Am. J Physiol. 1233:134）；ｐ１２０（Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090）；が挙げられるが、さらに、K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273も参照されたい。

【０５２８】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および抗ＬＳＲ抗体は、中和抗体として使用することができる。中和抗体（ＮＡｂ）は、特定の抗原に結合してこれを中和または阻害することによって、特定の抗原の生物学的作用を阻害することができる抗体であり、たとえば、細胞またはウイルスのレセプターをブロックすることにより宿主細胞へのウイルスの結合を阻害することによって生物学的作用が阻害される。ＮＡｂは、薬剤の生物作用に必要とされる重要な表面分子をブロックすること、または標的細胞のレセプターへの薬剤の結合を妨害することにより、薬剤の生物作用を部分的または完全に打ち消すであろう。

【０５２９】

さらに別の実施形態では、化合物（たとえば治療剤、標識、細胞毒素、放射性毒素、免疫抑制剤など）を結合させた本発明の免疫結合体を使用して、このような化合物をＬＹ６Ｇ６Ｆ細胞表面レセプター、ＶＳＩＧ１０細胞表面レセプター、ＴＭＥＭ２５細胞表面レセプターおよび／またはＬＳＲ細胞表面レセプターを有する細胞にターゲティングさせることができる。したがって、本発明はさらに、エクスビボまたはインビボにおいて、（たとえば放射性同位元素、蛍光化合物、酵素または酵素補因子などの検出可能な標識を有する）、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲを発現している細胞の位置を特定する方法を提供する。あるいは、免疫結合体を使用することにより、細胞毒素または放射性毒素をＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原および／またはＬＳＲ抗原にターゲティングさせ、ＬＹ６Ｇ６Ｆ細胞表面レセプター、ＶＳＩＧ１０細胞表面レセプター、ＴＭＥＭ２５細胞表面レセプターおよび／またはＬＳＲ細胞表面レセプターを有する細胞を破壊することができる。

【０５３０】

ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＴＭＥＭ２５ポリペプチドおよび／またはＬＳＲポリペプチドおよびこれらに対応するポリヌクレオチドの診断用途

実施形態のいくつかによれば、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる診断アッセイを実施するために対象（患者）から採取される試料は、体液または分泌液からなる群から選択され、体液または分泌液には、血液；血清；尿；血漿；前立腺液；精液（ｓｅｍｉｎａｌ　ｆｌｕｉｄ）；精液（ｓｅｍｅｎ）；皮膚、呼吸器、腸および泌尿生殖路の外分泌液；涙液；脳脊髄液；滑液；喀痰；唾液；乳汁；腹水；胸膜液；嚢胞液；乳管系の分泌液（および／または洗浄液）；肺胞洗浄液；生殖器系洗浄液；体の他の部分または体内の他の系の洗浄液；単離された細胞または組織（肺、結腸、卵巣、および／もしくは乳房組織から選択される臓器（ただしこれらに限定されない）から得ることができる細胞または組織）を含む任意の臓器の試料；便；組織試料；ならびにこれらの組み合わせが包含されるが、これらに限定されない。実施形態のいくつかでは、上記の試料は、インビボ細胞培養構成要素の試料を包含する。診断アッセイに供する前に、必要に応じて試料を適切な溶離剤で希釈することができる。

【０５３１】

実施形態のいくつかでは、本明細書における「マーカー」は、本明細書に記載の疾患または病態のいずれか１つを有さない対象から採取された類似の試料と比較して、本明細書に記載の疾患または病態のいずれか１つを有する患者（対象）から採取された試料中に差

次的に存在する核酸フラグメント、ペプチドまたはポリペプチドを指す。

【０５３２】

実施形態のいくつかにおいて、「差次的に存在する」は、本明細書に記載の疾患または病態のいずれか１つを有さない患者から採取された類似の試料と、本明細書に記載の疾患または病態のいずれか１つを有する患者から採取された試料との、試料中に存在するマーカーの量的または質的の差異を指す。たとえば、ハイブリダイゼーションおよび／またはＮＡＴに基づいたアッセイなどによって測定したときに、一方の試料中の核酸フラグメントの量が、他方の試料中の核酸フラグメントの量とは顕著に異なる場合、核酸フラグメントは２種の試料間において差次的に存在していてもよい。一方の試料中のポリペプチドの量が、他方の試料中のポリペプチドの量とは顕著に異なる場合、ポリペプチドは２種の試料間において差次的に存在している。マーカーが、一方の試料において検出可能であり、他方の試料において検出できない場合、このようなマーカーは差次的に存在すると考えることができることに注目すべきである。本明細書において記載されているように、比較的少ない発現量のアップレギュレーションをマーカーとして使用してもよい。当業者はマーカーのこのような相対レベルを容易に決定することができ、さらなる教示は、後述の各マーカーについての説明において記載する。

【０５３３】

実施形態のいくつかにおいて「診断」は、病的な状態の存在または特性を同定することを意味する。感度および特異性は診断法によって異なる。診断アッセイの「感度」は、試験結果が陽性である疾患個体のパーセンテージ（「真の陽性」のパーセント）である。診断アッセイによって検出されない疾患個体は「偽陰性」である。疾患を有さず、アッセイにおいて試験結果が陰性である対象は「真の陰性」と呼ばれる。診断アッセイの「特異性」は、偽陽性率から１を引いた値であり、「偽陽性」率は、疾患を有さないのに試験結果が陽性である個体の割合として定義される。診断法によっては病態の確定診断をすることができないと考えられるが、その診断法が診断の補助に役立つ陽性の兆候を提供するものであればその診断法で十分である。

【０５３４】

本明細書において「診断」は、病態または疾患の兆候および症状、具体的には様々な診断法の結果から、病態または疾患を同定する方法を指し、たとえば、個体から得られた生体試料中（たとえば、以下に定義するように、細胞中、組織中または血清中）の本発明の実施形態の少なくともいくつかによる核酸またはポリペプチドの発現量を検出することを包含する。さらに、本明細書において「診断」は、疾患のスクリーニング、疾患の存在またはその重症度の検出、疾患の予後の判定、疾患の進行または再発のモニタリング；治療効果の評価および／または疾患、障害もしくは病態の再発の評価；ならびに疾患の治療法および／または処置の選択、疾患に対して行われた治療法の最適化、疾患に対する処置のモニタリング、および／または特定の患者または亜集団に対する治療法の適合性の予測、または患者または亜集団における治療薬の適切な用量の決定を包含する。診断法はインビボまたはインビトロで行ってもよい。

【０５３５】

実施形態のいくつかにおいて、本明細書に記載のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現レベルの差異に関して述べられる場合、「定性的」は、当業者によって十分に理解されるように、発現の存在と非存在の比較を指し、実施形態のいくつかでは発現の一時的な制御を指し、実施形態のいくつかでは発現のタイミングを指し、実施形態のいくつかでは発現された分子への任意の翻訳後修飾などを指す。実施形態のいくつかにおいて、本明細書に記載のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現レベルの差異に関して述べられる場合、「定量的」は、当技術分野で公知の任意の手段によって決定される発現量の量的な絶対差を指し、他の実施形態では統計的に有意であってもよい相対的差異を指し、実施形態のいくつかでは、全体をひとつとしてまたは長期間にわたり観察された場合、発現量の差異における傾向を示す。

【０５３６】

実施形態のいくつかにおいて「診断する」は、疾患または症状を分類すること、疾患の重症度を判定すること、疾患の進行をモニタリングすること、疾患がもたらす転帰を予測すること、または回復の見込みを立てることを指す。「検出する」は上記のいずれを包含してもよい。

【０５３７】

実施形態のいくつかにおいて、本発明による疾患の診断は、対象から得られた生体試料中の本発明のポリヌクレオチドレベルまたはポリペプチドレベルを決定することによって行うことができ、決定したレベルは、疾患の素因もしくは疾患の存在または非存在と関連付けることができる。「対象から得られた生体試料」は、より詳細に後述するように、対象から物理的に採取されなかった試料をさらに包含してもよいことに注目すべきである。

【０５３８】

実施形態のいくつかでは、「レベル」は、ＲＮＡおよび／またはタンパク質の発現レベル、または本発明のマーカーのＤＮＡコピー数を指す。

【０５３９】

通常、対象から得られた生体試料中のマーカーのレベルは、健常人から得られた類似試料中の同一マーカーのレベルとは異なる（すなわち増加または減少している）（生体試料の例は本明細書に記載されている）。

【０５４０】

対象における目的のマーカーのＤＮＡ、ＲＮＡおよび／またはポリペプチドのレベルを決定することを目的として、数多くの公知の組織回収方法または体液回収方法を使用することにより対象から生体試料を回収することができる。

【０５４１】

回収方法としては、細針生検、針生検、コア針生検および外科的生検（たとえば脳生検）、ならびに洗浄が挙げられるが、これらに限定されない。使用した手順に関係なく、生検材料／試料が得られれば、マーカーのレベルを決定することができ、診断を行うことができる。

【０５４２】

同一由来の正常組織における同一マーカーのレベルの決定は、正常組織に対立するものにおけるマーカーの発現上昇、増幅および／または発現低下の検出と同時に行うことが好ましい。

【０５４３】

実施形態のいくつかでは、マーカーの「試験量」は、特定の疾患または病態の診断と一致する、対象の試料中のマーカーの量を指す。試験量は、絶対量（たとえばμｇ／ｍｌ）でも、相対量（たとえばシグナルの相対強度）でもよい。

【０５４４】

実施形態のいくつかでは、マーカーに対する「コントロールの量」は、マーカーの試験量と比較される、任意の量または一定の量範囲であってよい。たとえば、マーカーに対するコントロールの量は、特定の疾患もしくは病態を有する患者または疾患もしくは病態を有さない者におけるマーカーの量であってよい。コントロールの量は、絶対量（たとえばμｇ／ｍｌ）でも、相対量（たとえばシグナルの相対強度）でもよい。

【０５４５】

実施形態のいくつかでは、「検出する」は、検出される対象物の存在、非存在またはその量を同定することを指す。

【０５４６】

実施形態のいくつかでは、「標識」は、分光学的方法、光化学的方法、生化学的方法、免疫化学方法、または化学的方法によって検出可能な任意の成分または要素を包含する。たとえば、有用な標識として、３２Ｐ、３５Ｓ、蛍光色素、電子密度の高い試薬、（たとえばＥＬＩＳＡにおいて一般的に使用されるような）酵素、ビオチン－ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン、ハプテン、抗血清またはモノクローナル抗体が利用可能なタンパク質、または標的に対して配列相補性を有する核酸分子が挙げられる。これらの標識は、多

くの場合、放射性シグナル、発色シグナル、蛍光シグナルなどの、試料中の標識の結合量の定量化に使用することができる測定可能シグナルを発生する。標識は、共有結合、イオン結合、ファンデルワールス結合、および水素結合のいずれかを介して、プライマーまたはプローブに組み込むか、または付加することができ、たとえば、放射性ヌクレオチドまたはストレプトアビジンによって認識されるビオチン化ヌクレオチドに組み込むことができる。標識は、直接的または間接的に検出可能であってよい。間接的な検出は、第１の標識に第２の標識を直接または間接的に結合させることを含んでもよい。たとえば、標識は、結合パートナーのリガンド（たとえば、ストレプトアビジンの結合パートナーであるビオチン）であってよく、相補的配列の結合パートナーであり、相補的配列が特異的にハイブリダイズすることが可能なヌクレオチド配列であってもよい。結合パートナーは、それ自体が直接的に検出可能であってもよく、たとえば、抗体自体を蛍光分子で標識してもよい。結合パートナーは間接的に検出可能であってもよく、たとえば、相補的ヌクレオチド配列を有する核酸は、他の標識核酸分子を用いたハイブリダイゼーションによって検出可能な分枝ＤＮＡ分子の一部であってもよい（たとえば、P. D. Fahrlander and A. Klausner, Bio/Technology 6:1165 (1988)を参照されたい）。シグナルの定量は、たとえば、シンチレーション計測、デンシトメトリーまたはフローサイトメトリーによって行う。

【０５４７】

イムノアッセイにおいて使用してもよくかつイムノアッセイにおいて使用することが好ましい典型的なかつ検出可能な標識としては、磁気ビーズ、蛍光色素、放射性標識、酵素（たとえば、ＥＬＩＳＡにおいて一般的に使用される西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど）、およびコロイド金、色ガラス、プラスチックビーズなどの熱量測定用標識が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、試料中のマーカーは、間接的な測定法、たとえば、結合したマーカー特異的抗体を標識した二次抗体を使用して検出する測定法、および／または競合アッセイもしくは阻害アッセイ、たとえば、マーカーが有する特徴的なエピトープに結合するモノクローナル抗体を混合物と一緒にインキュベートするアッセイを使用して検出することができる。

【０５４８】

「イムノアッセイ」は、抗原に特異的に結合する抗体を使用するアッセイである。イムノアッセイは、特定の抗体の特異的結合特性を利用して、抗原をの単離、ターゲティング、および／または定量を行うことを特徴とする。

【０５４９】

実施形態のいくつかにおいて、タンパク質またはペプチド（または他のエピトープ）をについて述べられる場合、抗体に「特異的に（または選択的に）結合する」、「特異的に（または選択的に）免疫反応性を示す」または「特異的に相互作用または結合する」は、タンパク質および他のバイオロジクスの不均一集団におけるタンパク質の存在の決定因である結合反応を指す。したがって、選択したイムノアッセイ条件下において、特定のタンパク質に対する規定の抗体の結合は、バックグラウンド（非特異的シグナル）の少なくとも２倍であり、該抗体は、試料中に存在する他のタンパク質に実質的に有意な量で結合しない。このような条件下における抗体への特異的結合には、特定のタンパク質に対する特異性について選択された抗体が必要とされてもよい。たとえば、ラット、マウス、ヒトなどの特定の生物種から得た精子塩基性タンパク質に対して作製したポリクローナル抗体を選択して、精子塩基性タンパク質に特異的な免疫反応性を示すが、精子塩基性タンパク質の多型変異体およびアリル以外の他のタンパク質には免疫反応性を示さないポリクローナル抗体のみを得ることができる。この選択は、他の生物種からの精子塩基性タンパク質分子と交差反応する抗体を取り除くことによって行ってもよい。様々なイムノアッセイの構成を使用して、特定のタンパク質に特異的な免疫反応性を示す抗体を選択してもよい。たとえば、固相ＥＬＩＳＡイムノアッセイは、タンパク質に特異的な免疫反応性を示す抗体を選択するために日常的に使用されている（特異的な免疫反応性を決定するために使用することができるイムノアッセイの構成および条件についての説明に関しては、たとえば、Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988)を参照されたい）。一般的に

は、特異的または選択的な反応は、バックグラウンドシグナルまたはノイズの少なくとも２倍、より一般的にはバックグラウンドの１０～１００倍である。

【０５５０】

別の実施形態では、本発明は、生体試料中の本発明のポリペプチドを検出する方法であって、本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体と生体試料とを接触させること、およびこれらによる相互作用を検出することを含み、該相互作用の存在と、生体試料中のポリペプチドの存在とが相関していることを特徴とする方法を提供する。

【０５５１】

本発明の実施形態のいくつかでは、本明細書に記載のポリペプチドは、疾患および／または兆候的な状態を診断するためのマーカーの非限定的な一例である。本発明のマーカーはそれぞれ、単独または組み合わせて、予後、予測、スクリーニング、早期診断、進行度の判定、治療法の選択、ならびに疾患および／または兆候的な状態に対する治療のモニタリングなど様々な用途（ただしこれらに限定されない）に使用することができる。

【０５５２】

関連する態様において、検出される疾患には、非充実性腫瘍および充実性腫瘍などのがん、肉腫ならびに悪性血液疾患が包含されるであろう。

【０５５３】

別の関連する態様においては、検出される疾患には、自己免疫疾患、臓器移植の拒絶反応および／または移植片対宿主病が包含されるであろう。

【０５５４】

上記で詳述したように、本発明のポリペプチド／ポリヌクレオチドはそれぞれ、単独または組み合わせて、予後、予測、スクリーニング、早期診断、進行度の判定、治療法の選択、ならびに疾患および／または兆候的な状態に対する治療のモニタリングなど様々な用途（ただしこれらに限定されない）に使用することができる。

【０５５５】

上記の組み合わせは、マーカーの任意のサブコンビネーション、および／または少なくとも１つの他のマーカー（たとえば公知のマーカー）を特徴とする組み合わせを含んでいてもよい。さらに、上記の組み合わせは、本明細書に記載の任意のマーカーと、本明細書に記載の他のマーカー、他の公知のマーカーおよび／または他のマーカーとの定量測定値または半定量測定値の比率を決定するために上述のように使用してもよく、この態様が好ましい。

【０５５６】

本発明の実施形態のいくつかにおいて、疾患または病態の診断のための方法、使用、装置、およびアッセイが提供される。複数のマーカーを本発明とともに使用してもよい。複数のマーカーは、本明細書に記載のマーカーおよび／または１つ以上の公知のマーカーを含んでいてもよい。次いで、複数のマーカーを疾患または病態と関連付けることが好ましい。たとえば、このような関連付けは、複数のマーカーの各濃度を測定すること、および各マーカー濃度をそれぞれの閾値レベルと比較することを含んでいてもよい。マーカー濃度が（マーカーおよび／または実施される診断検査に左右される）閾値レベルよりも高いまたは低い場合、マーカー濃度は疾患または病態と相関していてもよい。複数のマーカー濃度が疾患または病態と相関していてもよく、相関していることが好ましい。

【０５５７】

あるいは、このような関連付けは、複数のマーカーの各濃度を測定すること、複数のマーカーの各濃度に基づいた単一の指標値を算出すること、および指標値を閾値レベルと比較することを含んでいてもよい。

【０５５８】

あるいは、このような関連付けは、少なくとも１個のマーカーの一時的な変化を測定し、この一時的な変化を関連付けに使用することを含んでいてもよい。

【０５５９】

あるいは、このような関連付けは、少なくとも「Ｘ」個の複数のマーカーの濃度が、所

定の範囲外であるか、かつ／または（上記の）閾値よりも高いもしくは低いかどうかを判断することを含んでいてもよい。「Ｘ」は、１個のマーカー、複数個のマーカーまたはすべてのマーカーであってよく、別法としてまたは上記に加えて、あらゆるマーカーを「Ｘ」に含めるよりも、（範囲および／または閾値に応じて）複数のマーカーのうち１個以上の特異的マーカーを疾患または病態との関連付けに必要としてもよい。

【０５６０】

あるいは、このような関連付けは、２個のマーカーのマーカー濃度の比率が範囲外であるか、かつ／または閾値よりも高いもしくは低いかどうか判断することを含んでいてもよい。比率が閾値レベルよりも高いもしくは低いかつ／または範囲外である場合、比率は疾患または病態と相関していてもよい。

【０５６１】

これらの相関性の２つ以上の組み合わせを、単一のパネルとともに使用してもよく、かつ／または複数のパネル間の関連付けに使用してもよい。

【０５６２】

上記の方法は、正常な対象との比較を行った場合、少なくとも７０％の感度および少なくとも８５％の特異性で、正常な状態と疾患または病態とを識別してもよい。本明細書において、感度は、存在するすべての陽性試料から検出された陽性（疾患を有する）試料の数に関連し、特異性は、存在するすべての陰性試料から検出された真の陰性（疾患を有さない）試料の数に関連する。上記の方法は、正常な対象との比較を行った場合、少なくとも８０％の感度および少なくとも９０％の特異性で、正常な状態と疾患または病態とを識別することが好ましい。上記の方法は、正常な対象との比較を行った場合、少なくとも９０％の感度および少なくとも９０％の特異性で、正常な状態と疾患または病態とを識別することがより好ましい。また、上記の方法は、疾患または病態の症状とよく似た症状を示す対象との比較を行った場合、少なくとも７０％の感度および少なくとも８５％の特異性で、よく似た症状と疾患または病態とを識別することがより好ましい。

【０５６３】

マーカーパネルは、当業者によく知られている数多くの方法で分析してもよい。たとえば、パネルに含まれる各メンバーを、「正常な」値、または特定の転帰を示す値と比較してもよい。特定の診断／予後の判断は、各マーカーとこれらの値との比較に基づいていてもよく、あるいは、マーカーのサブセットが正常範囲外の場合、このサブセットを指標として特定の診断／予後の判断を行ってもよい。当業者は、診断マーカー、差次的な診断マーカー、予後マーカー、発症マーカー、疾患または病態を識別するマーカーなどを単一のアッセイまたは装置において組み合わせてもよいことをも理解するであろう。たとえば、異なる閾値または異なる重み付け係数を異なる複数の目的のためのマーカーに適用することによって、マーカーを複数の目的に共通して使用してもよい。

【０５６４】

一実施形態では、パネルは、以下を目的としたマーカーを含む。疾患の診断；疾患が急性期にある場合および／または急性疾患が発症した場合における疾患の診断および指標；疾患が非急性期にある場合および／または非急性疾患が発症した場合における疾患の診断および指標；急性期および非急性期が組み合わさった病態または急性疾患および非急性疾患の同時発症の指標；疾患の診断およびそれに続く有害転帰の予測；疾患の診断およびそれに続く急性期もしくは非急性期病態または急性疾患もしくは非急性疾患の発症の予測；疾患の進行（たとえば、がんの場合、進行は、たとえば転移の発生または再発を含んでいてもよい）。

【０５６５】

上記の診断は、１以上の類似または同一の症状を特徴としうる疾患を含む他の疾患と、特定の疾患とを識別するための疾患の鑑別診断を含んでいてもよい。

【０５６６】

特定の実施形態では、診断もしくは予後の指標の存在または非存在のみに基づいて、１以上の診断もしくは予後の指標を病態または疾患と関連付ける。別の実施形態では、診断

の閾値レベルまたは予後の指標を確立することができ、患者試料中の指標のレベルを閾値レベルと単に比較することができる。診断検査および／または予後検査の感度および特異性は、試験の単なる分析「品質」以上のものによって左右され、すなわち、異常な結果が何によって構成されるのかという定義にも左右される。実際上は、通常、「正常」集団および「疾患」集団において、変数値をその相対頻度に対してプロットすること、および／または治療前、治療中、治療後に対象から得られる結果を比較することによって、受信者動作特性曲線すなわち「ＲＯＣ」曲線を算出する。

【０５６７】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲタンパク質、ポリヌクレオチド、またはこれらのフラグメントは、上述のような、疾患および／または兆候的な状態を検出するためのバイオマーカーとして特徴付けられてもよい。

【０５６８】

さらに別の実施形態によれば、本発明は、本明細書に記載のＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲに対応する核酸配列によってコードされる任意のアミノ酸配列またはそのフラグメントを包含してもよく、また、包含することが好ましい。このようなアミノ酸配列またはそのフラグメントに関連する任意のオリゴペプチドまたはペプチドも、（上記に加えてまたは別法において）バイオマーカーとして使用してもよい。

【０５６９】

さらに別の実施形態では、本発明は、ＮＡＴに基づいたアッセイを使用して生体試料中の本発明のポリヌクレオチドを検出する方法であって、少なくとも概して最小長を有する単離された核酸分子またはオリゴヌクレオチドフラグメントを生体試料中の核酸物質に対してハイブリダイズすること、および、ハイブリダイゼーション複合体を検出することを含み、該ハイブリダイゼーション複合体の存在と、生体試料中のポリヌクレオチドの存在とが相関していることを特徴とする方法が提供される。上記のような方法またはアッセイの非限定的な例示は後述する。

【０５７０】

本発明はさらに、上記のような診断法またはアッセイに基づいたキットに関する。本発明のＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲタンパク質、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲ結合体、または抗体組成物（たとえば、ヒト抗体、二重特異性もしくは多重特異性分子または免疫結合体）と、使用説明書とを含むキットも本発明の範囲内に包含される。上記のキットは、免疫抑制剤、細胞毒性剤、および放射性毒性剤などの１以上のさらなる試薬、または本発明の実施形態の少なくともいくつかによる１以上のさらなるヒト抗体（たとえば、第１のヒト抗体とは異なる抗原エピトープに結合する相補的な活性を有するヒト抗体）をさらに含むことができる。

【０５７１】

核酸技術（ＮＡＴ）に基づいたアッセイ

生体試料中の目的の核酸の検出は、たとえばＰＣＲ（たとえばＰＣＲの変形、リアルタイムＰＣＲ）などの核酸増幅技術を用いた、ＮＡＴに基づいたアッセイによって行ってもよい。本明細書において「プライマー」は、標的配列にアニーリングすること（標的配列とハイブリダイズすること）ができ、その結果、適切な条件下においてＤＮＡ合成の開始点として機能することが可能な二本鎖領域を構築することができるオリゴヌクレオチドを指す。選択されたまたは標的の核酸配列の増幅は、当技術分野において公知のいくつかの適切な方法により行ってもよい。増幅技術としては、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、ｓｔｒａｎｄ ｄｉｓｐｌａｃｅｍｅｎｔ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ（ＳＤＡ）、転写に基づく増幅、ｑβレプリカーゼ系、およびＮＡＳＢＡが挙げられるが、これらに限定されない（Kwoh et al., 1989, Proc. NatI. Acad. Sci. USA 86, 1173-1177; Lizardi et al., 1988, BioTechnology 6:1197-1202; Malek et al.

, 1994, Methods Mol. Biol., 28:253-260; および上記のSambrook et al., 1989）。核酸技術に基づくアッセイとしては、ＰＣＲ、リアルタイムＰＣＲ、ＬＣＲ、Ｓｅｌｆ－Ｓｕｓｔａｉｎｅｄ　Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ、Ｑβレプリカーゼ、Ｃｙｃｌｉｎｇ　ｐｒｏｂｅ　ｒｅａｃｔｉｏｎ、分枝ＤＮＡ、ＲＦＬＰ分析、ＤＧＧＥ／ＴＧＧＥ、一本鎖ＤＮＡ高次構造多型、ジデオキシフィンガープリンティング、マイクロアレイ、蛍光インサイチューハイブリダイゼーションおよび比較ゲノムハイブリダイゼーションからなる群から選択されるものが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書において「増幅対」（または「プライマー対」）は、いくつかのタイプの増幅方法のうちの１つ（好ましくはポリメラーゼ連鎖反応）による選択した核酸配列の増幅において同時に使用することを意図して選択された、本発明の１対のオリゴヌクレオチド（オリゴ）を指す。当技術分野において一般に知られているように、上記のオリゴヌクレオチドは、選択された条件下で相補的配列に結合するように設計されている。特定の一実施形態においては、患者からの核酸試料の増幅は、最も豊富に存在する差次的に発現された核酸の増幅にとって好ましい条件下において実施される。好ましい一実施形態では、最も豊富に存在するｍＲＮＡの増幅にとって好ましい条件下において、患者からのｍＲＮＡ試料に対してＲＴ－ＰＣＲを実施する。別の好ましい実施形態では、差次的に発現された複数種の核酸の増幅を同時に実施する。このような方法を、差次的に発現される核酸配列ではなく、差次的に発現されるタンパク質の検出に適合させることが可能であることは当業者によって理解されるであろう。

本発明を実施するための核酸（すなわちＤＮＡまたはＲＮＡ）は、公知の方法によって得てもよい。

【０５７２】

本発明のオリゴヌクレオチドプライマーの長さは、特定のアッセイの構成、特定の必要性、および使用する標的ゲノムに応じた適切な任意の長さであってよい。オリゴヌクレオチドプライマーは、少なくとも１２ヌクレオチド長であってよく、好ましくは１５～２４個の分子からなり、また、選択した核酸増幅系に特に適するように改変してもよい。当技術分野において一般に知られているように、オリゴヌクレオチドプライマーは、標的配列とのハイブリッドの融点を考慮に入れて設計することができる（Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning -A Laboratory Manual, 2nd Edition, CSH Laboratories; およびAusubel et al., 1989, in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., N.Y.）。

【０５７３】

イムノアッセイ

本発明の別の実施形態では、イムノアッセイを使用して、試料中のマーカーを定性的または定量的に検出および分析することができる。この方法は、マーカーに特異的に結合する抗体を提供すること；この抗体を試料と接触させること；および試料中のマーカーに抗体が結合した複合体の存在を検出することを含む。

【０５７４】

マーカーに特異的に結合する抗体を作製するために、精製されたタンパク質マーカーを使用することができる。タンパク質マーカーに特異的に結合する抗体は、当技術分野において知られている任意の適切な方法を使用して作製することができる。

【０５７５】

抗体が提供された後、数多くの公知の免疫結合アッセイのいずれかを使用してマーカーを検出および／または定量することができる。有用なアッセイとしては、たとえば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）などの酵素免疫アッセイ（ＥＩＡ）、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）、ウェスタンブロットアッセイ、およびスロットブロットアッセイが挙げられる。たとえば、米国特許第４，３６６，２４１号；第４，３７６，１１０号；第４，５１７，２８８号；および第４，８３７，１６８号を参照されたい。通常、対象から得られた試料は、マーカーに特異的に結合する抗体と接触させることができる。

【０５７６】

抗体を試料と接触させる前に、抗体を固相支持体に固定させて、複合体の洗浄およびそれに続く単離を容易なものにすることができる。固相支持体としては、たとえばマイクロタイタープレート、スティック、ビーズ、またはマイクロビーズの形態のガラスまたはプラスチックが挙げられるが、これらに限定されない。抗体を固相支持体に付着させることもできる。

【０５７７】

抗体を含む試料をインキュベートした後、混合物を洗浄し、形成された抗体－マーカー複合体を検出することができる。これは、洗浄した混合物を検出試薬とともにインキュベートすることによって行うことができる。あるいは、試料中のマーカーは、間接的な測定法、たとえば、結合したマーカー特異的抗体を標識した二次抗体を使用して検出する測定法、および／または競合アッセイもしくは阻害アッセイ、たとえば、マーカーが有する特徴的なエピトープに結合するモノクローナル抗体を混合物と一緒にインキュベートするアッセイを使用して検出することができる。

【０５７８】

アッセイ全体にわたって、試薬の添加ごとにインキュベーションステップおよび／または洗浄ステップが必要とされうる。インキュベーションステップは、約５秒間～数時間の範囲で変化してもよく、好ましくは約５分間～約２４時間である。しかしながら、インキュベーション時間は、アッセイの構成、マーカー、溶液量、濃度などに左右されるであろう。１０℃～４０℃などの一定の温度範囲においてアッセイを行うことができるが、アッセイは通常、環境温度において実施されるであろう。

【０５７９】

イムノアッセイは、対象から得た試料中のマーカーの試験量を測定するために使用することができる。最初に、試料中のマーカーの試験量は上記のイムノアッセイ法を使用して検出することができる。マーカーが試料中に存在する場合、上記の適切なインキュベーション条件下において、マーカーに特異的に結合する抗体により抗体－マーカー複合体が形成されるであろう。抗体－マーカー複合体の量は、スタンダードと比較することによって決定してもよい。上述したように、測定単位をコントロールの量および／またはコントロールシグナルと比較することができる限り、マーカーの試験量を絶対単位で測定する必要はない。

【０５８０】

ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）：

一形態では、この方法および本明細書において後述される方法は、アガロースビーズなどの沈殿可能な担体上に固相化し、放射性同位体で標識した抗体結合タンパク質（たとえば^{125}Ｉで標識したプロテインＡ）と特異的抗体とを使用して所望の基質を沈殿させることを含む。沈殿ペレット中のカウント数は基質の量と比例する。

【０５８１】

ＲＩＡの別の形態では、標識した基質と、標識していない抗体結合タンパク質とを使用する。未知量の基質を含む試料は、様々な量で添加される。沈殿物中の標識基質に由来するカウントの減少は、添加した試料中の基質の量に比例する。

【０５８２】

酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）：

この方法は、マイクロタイタープレートのウェルなどの表面への、タンパク質基質を含む試料の固定（たとえば固定された細胞またはタンパク質溶液）を含む。酵素と結合させた基質特異的抗体が添加され、基質に結合する。次いで、抗体に結合された酵素を使用した比色反応によって、抗体の存在を検出および定量する。この方法において一般に使用される酵素として、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼが挙げられる。較正が適切であり、かつ反応が線形領域内にある場合、試料中に存在する基質の量は発色した色の量に比例する。通常、定量的精度を向上させるために基質スタンダードを使用する。

【０５８３】

ウェスタンブロット：
この方法は、アクリルアミドゲルを用いて他のタンパク質からの基質を分離し、次いで、膜（たとえばナイロンまたはＰＶＤＦ）に基質を転写することを含む。次いで、基質に特異的な抗体を用いて基質の存在を検出した後、抗体結合試薬を用いて基質を検出する。抗体結合試薬は、たとえばプロテインＡまたは他の抗体であってよい。上述するように、抗体結合試薬は放射性同位体で標識してもよく、酵素を結合させてもよい。検出はオートラジオグラフィ、比色反応または化学発光によって行ってもよい。この方法は、アクリルアミドゲルにおける電気泳動中の泳動距離を示す膜上の相対位置によって、基質の定量と基質の同定の両方を行うことができる。

【０５８４】
免疫組織化学法：
この方法は、固定された細胞中の基質を、基質特異的抗体を用いてインサイチューで検出することを含む。基質特異的抗体は、酵素に結合されていてもよく、発蛍光団に結合されていてもよい。検出は顕微鏡観察および主観評価による。酵素を結合させた抗体を使用する場合、比色反応が必要とされうる。

【０５８５】
蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）：
この方法は、基質特異的抗体を用いて細胞中の基質をインサイチューで検出することを含む。基質特異的抗体は発蛍光団に結合される。検出は、細胞が光線を通過する際にそれぞれの細胞から発せられた光の波長を読み取るセルソーティング装置を用いて行う。この方法では２種以上の抗体を同時に使用してもよい。

【０５８６】
放射性イメージング法
この方法は、陽電子放射断層撮影（ＰＥＴ）およびシングルフォトンエミッションＣＴ（ＳＰＥＣＴ）含むが、これらに限定されない。これらの技術はいずれも非侵襲性であり、様々な組織事象および／または組織機能を検出および／または測定するために（たとえば癌細胞の検出などに）使用することができる。ＰＥＴとは異なり、ＳＰＥＣＴでは２種の標識を同時に使用してもよい。ＳＰＥＣＴは、たとえばコストおよび使用可能な標識の種類に関連して、他にも利点をいくつか有する。たとえば、米国特許第６，６９６，６８６号には、乳がんを検出するためのＳＰＥＣＴの使用が記載されており、この文献はその全体が本明細書に記載されているかのように参照により本明細書に組み込まれる。

【０５８７】
セラノスティクス（Ｔｈｅｒａｎｏｓｔｉｃｓ）
セラノスティクス（ｔｈｅｒａｎｏｓｔｉｃｓ）は、疾患の診断、診断試験の結果に従った適切な治療計画の選択、および／または診断試験の結果に従った療法に対する患者の応答のモニタリングのための、診断試験の使用を指す。セラノスティクス試験は、患者に特に有益で、副作用を起こさないと考えられる治療法を患者に対して選択するために使用することができる。さらに、セラノスティクス試験は、個々の患者における治療効果の早期かつ客観的な指標を示すことができるため、治療を最小限の遅れで（必要に応じて）変更することができる。たとえば、ＤＡＫＯ社とジェネンテック社は共同で、乳がんの治療のためのＨｅｒｃｅｐＴｅｓｔおよびハーセプチン（トラスツズマブ）を開発したが、これは初めてのセラノスティクス試験であり、新規の治療薬と同時に承認された。ＨｅｒｃｅｐＴｅｓｔ（免疫組織化学的試験）に加えて、従来の臨床化学、イムノアッセイ、細胞に基づいた技術および核酸試験を使用した他のセラノスティクス試験も現在開発中である。ＰＰＧｘ社は最近ＴＰＭＴ（チオプリン－Ｓ－メチルトランスフェラーゼ）試験を市販したが、この試験によって、６－メルカプトプリン（白血病の治療において用いられる薬剤）に致命的な副作用を示す危険性のある患者の医師による識別が可能となる。さらに、Ｎｏｖａ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ社は、アルツハイマー病患者のコリン様作用療法に対する応答を予測するための、アポリポ蛋白質Ｅ遺伝子のＳＮＰ遺伝子型決定法を先駆けて開発しており、現在、新薬の臨床試験においてこの指標を得るために広く利用されている。こ

のように、セラノスティクス分野は、治療に対する患者の応答を予測する診断試験情報と、その特定の患者のための適切な治療の選択との融合である。

【０５８８】

代理マーカー

代理マーカーは、研究所において検出可能かつ／または患者の身体的徴候または症状に伴って検出可能であり、臨床的意義のあるエンドポイントの代わりとして治験において使用されるマーカーである。代理マーカーは、治療法の効果を予測すると考えられる患者の知覚、身体機能、生存率を具体的に示す直接的な尺度である。代理マーカーは、患者に対する治療効果についての目的のエンドポイント（臨床エンドポイントと呼ばれる）よりも代理マーカーの方が早期に、簡便にまたは頻回に測定可能である場合に主として必要とされる。理想的には、代理マーカーは生物学的に妥当性があり、疾患の進行を予測でき、標準化されたアッセイ（従来の臨床化学、イムノアッセイ、細胞に基づいた技術、核酸試験および画像診断療法を含むが、これらに限定されない）によって測定可能であるべきである。

【０５８９】

補体と結合するＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＭの一部分などの補体結合部位を有している、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療用組成物（たとえば、ヒト抗体、多重特異性分子、二重特異性分子および免疫結合体）は、補体の存在下でも使用することができる。一実施形態において、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる結合剤と適切なエフェクター細胞とを用いた、標的細胞を含む細胞集団のエクスビボ治療は、補体または補体を含む血清を添加することによって補助することができる。本発明の実施形態の少なくともいくつかによる結合剤で覆われた標的細胞の食作用は、補体タンパク質を結合させることによって向上させることができる。別の実施形態では、本発明の実施形態の少なくともいくつかよる組成物（たとえば、ヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子）で覆われた標的細胞を補体によって溶解することもできる。さらに別の実施形態では、本発明の実施形態の少なくともいくつかによる組成物は補体を活性化しない。

【０５９０】

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる治療用組成物（たとえば、ヒト抗体、多重特異性分子、二重特異性分子および免疫結合体）は補体とともに投与することもできる。したがって、本発明の実施形態の少なくともいくつかによれば、ヒト抗体、多重特異性分子、または二重特異性分子と、血清または補体とを含む組成物が提供される。これらの組成物は、ヒト抗体、多重特異性分子、または二重特異性分子の極めて近傍に補体が存在するという点で有利である。あるいは、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるヒト抗体、多重特異性分子、または二重特異性分子と、補体または血清とは、別々に投与することができる。

【０５９１】

本発明を以下の実施例によってさらに説明する。以下の情報および実施例は説明を目的としたものであり、本発明をさらに限定するものとして解釈されるべきでない。すべての図およびすべての引用文献の内容、ならびに本出願において引用された特許文献および公開特許出願は、参照することにより明示的に本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【０５９２】

実施例１

ＭＥＤ探索エンジンを使用した、本発明の実施形態の少なくともいくつかによるタンパク質の発現パターン

ＭＥＤは、公開されている遺伝子発現データ、正規化、注釈、様々なクエリーの性能を収集した、著作権付きソフトウェアプラットフォームである。最も広く用いられているアフィメトリックスマイクロアレイによる発現データを、Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｏｍｎｉｂｕｓ（ＧＥＯ－www.ncbi.nlm.nih.gov/GEO）からダウンロードする。９５パ

ーセンタイルを定常値としてデータを乗法的に正規化し（正規化された発現＝１２００）、ノイズは最小値を３０％～ゼロとすることにより取り除く。実験は、最初に自動的に注釈付けを行った後、次いで手作業でこれを行い、組織および条件を特定し、チップをこの注釈に従ってグループ化し、各チップの遺伝子の全体的な発現パターンと、このグループの遺伝子全体の平均発現パターンとを比較することによって、グループ化を交差検証する。各グループの各プローブセットに、そのグループに含まれるすべてのチップのプローブセットの発現量の中央値である発現値を割り当てる。特定のグループ内のすべてのプローブセットを発現するベクターは、そのグループのバーチャルチップを形成し、また、このようなバーチャルチップのすべてを収集したものがバーチャルパネルである。パネル（またはサブパネル）に対してクエリーを行い、所望の挙動を有するプローブセットを特定することができる（たとえば、組織のサブセットにおける特異的な発現、または疾患組織および健常組織間の差次的発現）。以後の分析のために、これらのプローブセットを、プローブレベルでマッピングを行うことによって、ＬＥＡＤＳコンティグおよびＲｅｆＳｅｑ（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/）にリンクする。

【０５９３】

アフィメトリックスプラットフォーム（ＨＧ－Ｕ９５ＡおよびＨＧ－Ｕ１３３ファミリー（Ａ、Ｂ、Ａ２．０およびＰＬＵＳ２．０））をダウンロードする。３枚のバーチャルのパネル（Ｕ９５、Ｕ１３３　Ｐｌｕｓ　２．０、およびＵ１３３）を作製する。Ｕ９５およびＵ１３３　Ｐｌｕｓ　２．０は、対応するアフィメトリックスプラットフォームに基づいており、Ｕ１３３は、共通プローブセット一式（ＨＧ－Ｕ１３３Ａ、ＨＧ－Ｕ１３３Ａ２．０、およびＨＧ－Ｕ１３３　ＰＬＵＳ　２．０＋）を使用している。

【０５９４】

ＭＥＤ探索エンジンの結果を散布図に示す。散布図は、任意のパネル（グループを収集したもの）のコンパクト表現である。Ｙ軸は（正規化された）発現であり、Ｘ軸はパネル内のグループを説明している。各グループについて、発現量の中央値を太字の記号によって示し、グループ内の様々なチップの発現値を小さいダッシュ記号（－）で示す。各グループは以下のように整理してマークで示した。「他の」グループ（たとえば良性疾患、非がん疾患など）は△印で示した。治療した細胞は□印で示した。正常は○印で示した。対応させたものは×印で示した。がんは◇印で示した。各グループ中のチップの番号も名称の横に記載している。

【０５９５】

ＶＳＩＧ１０転写産物の発現を評価するためにＭＥＤ探索エンジンを使用した。ＶＳＩＧ１０遺伝子のデータを表すアフィメトリックスプローブセット２２０１３７＿ａｔの発現データを図３に示す（ＭＥＤ探索エンジンに関連するすべての図において、すべてのプローブの結果を示すことができるように、スペースの都合のみでそれぞれの図を「Ａ」、「Ｂ」などに分割している）。図３に示した散布図から明らかなように、上記のプローブセットで検出可能なＶＳＩＧ１０転写産物の発現は、免疫系細胞のいくつかのグループ、主として白血球において観察された。様々ながん疾患、たとえば、ＡＬＬ（急性リンパ芽球性白血病（Ａｃｕｔｅ　Ｌｙｍｐｈｏｂｌａｓｔｉｃ　Ｌｅｕｋｅｍｉａ））のＣＤ１０$^{+}$白血球上、およびＡＭＬ（急性骨髄白血病（Ａｃｕｔｅ　Ｍｙｅｌｏｉｄ　Ｌｅｕｋｅｍｉａ））細胞のＢＭ－ＣＤ３４$^{+}$細胞上において差次的発現が観察された。

【０５９６】

図３は、ＭＥＤ探索エンジンを使用したすべての組織および病態のバーチャルパネルにおける、ＶＳＩＧ１０タンパク質をコードするＶＳＩＧ１０転写産物の発現を示す散布図である。

【０５９７】

ＬＳＲ転写産物の発現を評価するためにＭＥＤ探索エンジンを使用した。ＬＳＲ遺伝子のデータを表すアフィメトリックスプローブセット２０８１９０＿ｓ＿ａｔの発現データを図４に示す。図４に示した散布図から明らかなように、上記のプローブセットで検出可能なＬＳＲ転写産物の発現は、免疫系細胞のいくつかのグループ、主として骨髄細胞にお

いて観察された。ＬＳＲ転写産物の高度発現は、乳がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がんなどの様々な組織のがん病態において観察された。

【０５９８】

図４は、ＭＥＤ探索エンジンを使用したすべての組織および病態のバーチャルパネルにおける、ＬＳＲタンパク質をコードするＬＳＲ転写産物の発現を示す散布図である。

【０５９９】

実施例２

ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質をコードするＲＮＡの発現を分析するための方法

本発明の実施形態の少なくともいくつかによる標的を、種々のがん組織試料および非がん組織試料における発現に関して試験した。卵巣がん試験パネルにおいて使用した試料の説明を以下の表１に記載する。乳がん試験パネルにおいて使用した試料の説明を以下の表２に記載する。肺がん試験パネルにおいて使用した試料の説明を以下の表３に記載する。健常試験パネルにおいて使用した試料の説明を以下の表４に記載する。腎臓がん試験パネルにおいて使用した試料の説明を以下の表５に記載する。肝臓がん試験パネルにおいて使用した試料の説明を以下の表６に記載する。次いで、以下の材料および方法に関するセクションに記載するように試験を実施した。

【０６００】

材料と方法

ＲＮＡ調製物

ＲＮＡは、ＡＢＳ（米国デラウェア州ウィルミントン１９８０１、http://www.absbioreagents.com）、ＢｉｏＣｈａｉｎ Ｉｎｓｔ. Ｉｎｃ.（米国カリフォルニア州ヘイワード９４５４５、www.biochain.com）、ＧＯＧ（Ｐｅｄｉａｔｉｃ Ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅ Ｈｕｍａｎ Ｔｉｓｓｕｅ Ｎｅｔｗｏｒｋ, Ｇｙｎｅｃｏｌｏｇｉｃ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ Ｇｒｏｕｐ Ｔｉｓｓｕｅ Ｂａｎｋ, Ｃｈｉｌｄｒｅｎ Ｈｏｓｐｉｔａｌ ｏｆ Ｃｏｌｕｍｂｕｓ）（米国オハイオ州コロンブス４３２０５）（卵巣試料）、Ａｍｂｉｏｎ（米国テキサス州オースティン７８７４４、http://www.ambion.com）、Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ Ｉｎｃ.（米国デラウェア州ウィルミントン１９８０１、www.absbioreagents.com）、Ａｓｔｅｒｎａｄ（米国ミシガン州デトロイト４８２０２－３４２０、www.asterand.com）、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｖｅ Ｉｎｃ.ａ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ ｏｆ Ｓｅｒａｃａｒｅ（米国マサチューセッツ州ケンブリッジ０２１３９、www.genomicsinc.com）、Ｔｈｅ Ｔｅｌ Ａｖｉｖ Ｓｏｕｒａｓｋｙ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃｅｎｔｅｒ Ｉｃｈｉｌｏｖ Ｈｏｓｐｉｔａｌ（イスラエル国テルアビブ、www.tasmc.org.il/e/）、およびＴｈｅ Ｃｈａｉｍ Ｓｈｅｂａ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃｅｎｔｅｒ（イスラエル国テルハショメール（Ｔｅｌ－Ｈａｓｈｏｍｅｒ）、eng.sheba.co.il）から得た。ＲＮＡ試料は患者または死亡した患者から得た。トータルＲＮＡ試料はすべてＤＮａｓｅＩ（Ａｍｂｉｏｎ）で処理した。

【０６０１】

卵巣パネル、腎臓パネルおよび健常パネルに対するＲＴ－ＰＣＲ

精製したＲＮＡ１０μｇを、Ｒａｎｄｏｍ Ｈｅｘａｍｅｒプライマー（アプライドバイオシステムズ、メーカーの説明書に準じて使用）、ｄＮＴＰ ４ｍＭ、１０×ＭｕｌｔｉＳｃｒｉｂｅ（登録商標）バッファー（アプライドバイオシステムズ）１２．５μｌ、ＲＮａｓｉｎ（プロメガ）６μｌ（５０Ｕ／μＬ）、およびＭｕｌｔｉＳｃｒｉｂｅ（アプライドバイオシステムズ）６μｌ（５０Ｕ／μＬ）と混合して全量１２５μｌとした。２５℃で１０分間インキュベートして反応させ、３７℃で２時間さらにインキュベートした。次いで、８５℃で５秒間加熱し混合物を失活させた。得られたｃＤＮＡを、ＴＥバッファー（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ（ｐＨ＝８）、１ｍＭ ＥＤＴＡ（ｐＨ＝８））で１：１０～１：４０（倍率はパネルの補正に左右される）に希釈した。

【０６０２】

リアルタイムＲＴ－ＰＣＲ分析は以下のように行った。上記で作製したｃＤＮＡ（５μｌ）をテンプレートとして使用して、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ｉアッセイ（ＰＥアプライドバイオシステムズ）によるリアルタイムＰＣＲ反応（最終量：２０μｌ）を特異的プライマーおよびＵＮＧ酵素（Ｅｕｒｏｇｅｎｔｅｃｈ、ＡＢＩまたはロシュ）を用いて行った。増幅は、５０℃２分、９５℃１０分の後、９５℃１５秒を４０サイクル、さらに６０℃３０秒、次いで解離ステップを行うことにより実施した。検出はＳＤＳ　７０００（ＰＥアプライドバイオシステムズ）を使用して行った。上記反応において蛍光強度が閾値レベルに達したサイクル（Ｃｔ＝Ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ　Ｃｙｃｌｅ、以下に詳細に記載する）を記録し、ＲＴ反応における相対的な転写産物量を算出するために使用した。相対量は$Q=efficiency^{-Ct}$を使用して算出した。ＰＣＲ反応の効率は、様々な希釈倍率において逆転写（ＲＴ）反応を行うことにより作製した標準曲線から算出した。ＲＴ反応の本質的な差異を最小限にするため、以下のようにして算出した正規化係数を使用して、得られた相対量を正規化した。

【０６０３】

いくつかのハウスキーピング（ＨＳＫＰ）遺伝子の発現を各パネルについて調査した。上述したように算出した各試料中のハウスキーピング遺伝子の相対量（Ｑ）を、すべてのパネル試料におけるこの遺伝子の量の中央値（ＭＥＤ）で除することにより「ＭＥＤに対する相対的Ｑ」を求めた。次いで、各試料について、選択したハウスキーピング遺伝子の「ＭＥＤに対する相対的Ｑ」の中央値を算出し、各試料の正規化係数としてさらなる計算に使用した。

【０６０４】

各ＲＴ試料について、種々のハウスキーピング遺伝子の発現量から算出された正規化係数を用いて、特異的アンプリコンの発現量を正規化した。卵巣パネル、腎臓パネル、肺パネル、肝臓パネル、乳房パネルおよび健常パネルに使用したハウスキーピング遺伝子（ＨＳＫＧ）を表７に記載する。

【０６０５】

卵巣パネルおよび健常パネルの補正に使用したＨＳＫＧは、ＨＰＲＴ１、ＳＤＨＡおよびＧ６ＰＤである。腎臓パネルおよび肝臓パネルの補正に使用したＨＳＫＰ遺伝子は、Ｇ６ＰＤ、ＰＢＧＤおよびＳＤＨＡである。肺パネルの補正に使用したＨＳＫＰ遺伝子は、ＵＢＣ、ＰＢＧＤ、ＨＰＲＴおよびＳＤＨＡである。乳房パネルの補正に使用したＨＳＫＰ遺伝子は、Ｇ６ＰＤ、ＰＢＧＤ、ＲＰＬ１９およびＳＤＨＡである。

【０６０６】

【表１０】

表１：卵巣ＲＮＡ詳細：

試料名	入手元	試料 ID	診断名	がんのステージ
1-As-SI-SER	Asterand	23074	漿液性腺癌	ステージ I
2-As-SI-SER	Asterand	22653	漿液性腺癌	ステージ I
3-As-SIB-SER	Asterand	18700	漿液性腺癌	ステージ IB
4-As-SIB-SER	Asterand	17646	漿液性腺癌	ステージ IB
5-As-SIC-SER	Asterand	15644	漿液性腺癌	ステージ IC
6-GC-SIIB-SER	GCI-1st_del	7B3DP	漿液性腺癌	ステージ IIB
7-As-SIIIC-SER	Asterand	13268	漿液性腺癌	ステージ IIIC
8-GC-SIIIC-SER	GCI-1st_del	3NTIS	漿液性腺癌	ステージ IIIC
9-GC-SIIIC-SER	GCI-1st_del	CEJUS	漿液性腺癌	ステージ IIIC
10-GC-SIIIC-SER	GCI-1st_del	1HI5H	漿液性腺癌	ステージ IIIC
11-GC-SIIIC-SER	GCI-1st_del	7RMHZ	漿液性腺癌	ステージ IIIC
12-GC-SIIIC-SER	GCI-1st_del	4WAAB	漿液性腺癌	ステージ IIIC
13-GC-SIIIC-SER	GCI-1st_del	79Z67	漿液性腺癌	ステージ IIIC
14-GC-SIIIC-SER	GCI-1st_del	DDSNL	漿液性腺癌	ステージ IIIC
15-GC-SIV-SER	GCI-1st_del	DH8PH	漿液性腺癌	ステージ IV
16-GC-SIA-ENDO	GCI-1st_del	E2WKF	類内膜腺癌	ステージ IA
17-GC-SIA-ENDO	GCI-1st_del	HZ2EY	類内膜腺癌	ステージ IA
18-GC-SIA-ENDO	GCI-1st_del	RWOIV	類内膜腺癌	ステージ IA
19-GC-SIIA-ENDO	GCI-1st_del	1U52X	類内膜腺癌	ステージ IIA
20-GC-SIIB-ENDO	GCI-1st_del	A17WS	類内膜腺癌	ステージ IIB
21-GC-SIIIC-ENDO	GCI-1st_del	1VT3I	類内膜腺癌	ステージ IIIC
22-GC-SIIIC-ENDO	GCI-1st_del	PZQXH	類内膜腺癌	ステージ IIIC
23-GC-SIV-ENDO	GCI-1st_del	I8VHZ	類内膜腺癌	ステージ IV
24-GC-SIC-MUC	GCI-1st_del	IMDA1	粘液性腺癌	ステージ IC
25-As-SIC-MUC	Asterand	12742	粘液性腺癌	ステージ IC
26-AB-SIC-MUC	ABS	A0139	粘液性嚢胞腺癌	ステージ IC
27- AB-SIIIA-MUC	ABS	USA-00273	乳頭状粘液性嚢胞腺癌	ステージ IIIA
28-GC-SIIIA-MUC	GCI-2nd_del	RAFCW	粘液性腺癌	ステージ IIIA
29-As-SIIIC-MUC	Asterand	23177	粘液性腺癌	ステージ IIIC
30-As-SIIIC-MUC	Asterand	16103	粘液性腺癌	ステージ IIIC
31-GC-SIA-BRD	GCI-3rd_del	SC656	粘液性境界型腫瘍	ステージ IA
32-GC-SIA-BRD	GCI-3rd_del	3D5FO	粘液性境界型腫瘍	ステージ IA
33-GC-SIA-BRD	GCI-3rd_del	7JP3F	粘液性境界型腫瘍	ステージ IA
34-GC-Muc-BNG	GCI-1st_del	QLIKY	良性粘液性嚢胞腺腫	
35-As-Muc-BNG	Asterand	16870	良性粘液性嚢胞腺腫	
36-GC-Muc-BNG	GCI-1st_del	943EC	良性粘液性嚢胞腺腫	
37-GC-Muc-BNG	GCI-2nd_del	JO8W7	良性粘液性嚢胞腺腫	
38-As-Ser-BNG	Asterand	17016	良性漿液性嚢胞腺腫	IA
39-GO-Ser-BNG	GOG	99-06-G039	良性漿液性嚢胞腺腫	
40-GC-Ser-BNG	GCI-2nd_del	DQQ2F	良性漿液性嚢胞腺線維腫	
41-As-BM-N	Asterand	15690	正常卵巣-BM	
42-As- BM-N	Asterand	16850	正常卵巣-BM	
43-As- BM-N	Asterand	16848	正常卵巣-BM	
44-GC- PS-N	GCI-4th_del	WPU1U	正常卵巣-PS	
45-GC- PS-N	GCI-4th_del	Y9VHI	正常卵巣-PS	
46-GC-PS-N	GCI-4th_del	76VM9	正常卵巣-PS	
47-GC-PS-N	GCI-1st_del	DWHTZ	正常卵巣-PS	

【表１１】

48-GC-PS-N	GCI-1st_del	SJ2R2	正常卵巣-PS	
49-GC-PS-N	GCI-4th_del	9RQMN	正常卵巣-PS	
50-GC-PS-N	GCI-1st_del	TOAE5	正常卵巣-PS	
51-GC-PS-N	GCI-1st_del	TW9PM	正常卵巣-PS	
52-GC-PS-N	GCI-4th_del	2VND2	正常卵巣-PS	
53-GC-PS-N	GCI-1st_del	L629F	正常卵巣-PS	
54-GC-PS-N	GCI-1st_del	XLB23	正常卵巣-PS	
55-GC-PS-N	GCI-1st_del	IDUVY	正常卵巣-PS	
56-GC-PS-N	GCI-4th_del	ZCXAD	正常卵巣-PS	
57-GC-PS-N	GCI-4th_del	PEQ6C	正常卵巣-PS	
58-GC-PS-N	GCI-1st_del	DD73B	正常卵巣-PS	
59-GC-PS-N	GCI-4th_del	E2UF7	正常卵巣-PS	
60-GC-PS-N	GCI-4th_del	4YG5P	正常卵巣-PS	
61-GC-PS-N	GCI-1st_del	FDPL9	正常卵巣-PS	
62-Bc-PM-N	BioChain	A503274	正常卵巣-PM	
63-Bc-PM-N	BioChain	A504086	正常卵巣-PM	
64-Ic-PM-N	Ichilov	CG-188-7	正常卵巣-PM	
65-GO-SIIIC-SER	GOG	2001-12-G035	漿液性腺癌	ステージ 3C
66-AB-SIIIC-SER	ABS	N0021	乳頭状漿液性腺癌	ステージ 3C
67-BC-SER	BioChain	A503175	漿液性乳頭状嚢胞腺癌	
68-Bc-SER	Biochain	A406023	腺癌	
69-Bc-SER	Biochain	A407068	腺癌	
70-AB-SER	ABS	ILS-7286	乳頭状嚢胞腺癌	不明
71-AB-SER	ABS	A0106	腺癌	不明
72-AB-SER	ABS	ILS-1431	乳頭状腺癌	不明
73-Bc-SER	BioChain	A503176	漿液性乳頭状嚢胞腺癌	
74-AB-SER	ABS	ILS-1408	乳頭状腺癌	不明
75-Bc-SER	Biochain	A407069	腺癌	
76-AB-SER	ABS	ILS-1406	乳頭状腺癌	不明
77-GO-Ser Mix SIIIC-OTR	GOG	2002-05-G509	ミュラー管混合漿液性・類内膜腺癌	ステージ 3C
78-Bc-MUC	BioChain	A504083	粘液性腺癌	
79-Bc-MUC	BioChain	A504084	粘液性腺癌	
80-Bc-Car-OTR	BioChain	A407065	癌腫	
81-GO-Clear cell SIIIA-OTR	GOG	2001-10-G002	明細胞腺癌	ステージ 3A
82-AB-BRD	ABS	VNM-00187	低悪性度粘液性嚢胞腺癌	
83-GO-SIA-BRD	GOG	98-08-G001	境界悪性類内膜腺癌	ステージ 1A

【０６０７】

【表１２】

表２：乳房 RNA 詳細：

試料名	入手元	試料 ID	試料の診断名	がんのステージ
1-As-DCIS S0	Asterand	19723	乳管内癌(DCIS)	ステージ 0
2-GC-IDC SI	GCI-1st_del	5IRTK	浸潤性乳管癌	ステージ I
3-(42)-AB-IDC SI	ABS	6005020031T	浸潤性乳管癌	ステージ I
4-(7)-AB-IDC SI	ABS	7263T	浸潤性乳管癌	ステージ I
5-GC-IDC SI	GCI-1st_del	DSI52	浸潤性乳管癌	ステージ I
6-GC-IDC SI	GCI-1st_del	S2GBY	浸潤性乳管癌	ステージ I
7-GC-IDC SI	GCI-1st_del	POPHP	浸潤性乳管癌	ステージ I
8-GC-IDC SI	GCI-1st_del	I2YLE	浸潤性乳管癌	ステージ I
9-As-IDC SI	Asterand	17959	浸潤性乳管癌	ステージ I
10-(12)-AB-IDC SIIA	ABS	1432T	浸潤性乳管癌	ステージ IIA
11-As-IDC SIIA	Asterand	17138	浸潤性乳管癌	ステージ IIA
12-GC-IDC SIIA	GCI-1st_del	YSZ67	浸潤性乳管癌	ステージ IIA
13-(6)-AB-IDC SIIA	ABS	7238T	浸潤性乳管癌	ステージ IIA
14-(26)-AB-IDC SIIA	ABS	7249T	浸潤性乳管癌	ステージ IIA
15-GC-IDC SIIA	GCI-1st_del	UT3SE	浸潤性乳管癌	ステージ IIA
16-GC-IDC SIIA	GCI-1st_del	PVSYX	浸潤性乳管癌	ステージ IIA
17-GC-IDC SIIA	GCI-1st_del	GETCV	浸潤性乳管癌	ステージ IIA
18-(27)-AB-IDC SIIA	ABS	4907020072T	浸潤性乳管癌	ステージ IIA
19-GC-IDC SIIB	GCI-1st_del	SE5BK	浸潤性乳管癌	ステージ IIB
20-GC-IDC SIIB	GCI-1st_del	OLKL4	浸潤性乳管癌	ステージ IIB
21-GC-IDC SIIB	GCI-1st_del	VK1EJ	浸潤性乳管癌	ステージ IIB
22-GC-IDC SIIB	GCI-1st_del	3Z5Z4	浸潤性乳管癌	ステージ IIB
23-(13)-AB-IDC SIIB	ABS	A0133T	浸潤性乳管癌	ステージ IIB
24-GC-IDC SIIB	GCI-1st_del	J5MPN	浸潤性乳管癌	ステージ IIB
25-GC-IDC SIIB	GCI-1st_del	54NTA	浸潤性乳管癌	ステージ IIB
27-GC-IDC SIIIA	GCI-1st_del	RD3F9	浸潤性乳管癌	ステージ IIIA
28-(17)-AB-IDC SIIIA	ABS	4904020036T	浸潤性乳管癌	ステージ IIIA
29-(16)-AB-IDC IIIA	ABS	4904020032T	浸潤性乳管癌	ステージ IIIA
30-(15)-AB-IDC SIIIA	ABS	7259T	浸潤性乳管癌	ステージ IIIA
31-GC-IDC SIIIA	GCI-1st_del	YOLOF	浸潤性乳管癌	ステージ IIIA

【表１３】

32-GC-IDC SIIIB	GCI-1st_del	4W2NY	浸潤性乳管癌	ステージ IIIB
33-GC-IDC SIIIB	GCI-1st_del	YQ1WW	浸潤性乳管癌	ステージ IIIB
34-GC-IDC SIIIB	GCI-1st_del	KIOE7	浸潤性乳管癌	ステージ IIIB
35-As-ILC SI	Asterand	17090	浸潤性小葉癌	ステージ I
36-GC-ILC SIIA	GCI-1st_del	I35US	浸潤性小葉癌	ステージ IIA
37-GC-ILC SIIB	GCI-1st_del	IS84Y	浸潤性小葉癌	ステージ IIB
38-(52)-Bc-ILC	Biochain	A605360	浸潤性小葉癌	
39-As-BNG	Asterand	11975	線維腺癌	
40-GC-BNG	GCI-2nd_del	ZT15M	線維腺癌	
41-GC-BNG	GCI-2nd_del	NNP3Q	線維腺癌	
42-GC-BNG	GCI-2nd_del	QK8IY	線維腺癌	
43-GC-N PS	GCI-1st_del	83LO7	正常乳房-PS	
45-GC-N PS	GCI-2nd_del	O6JBJ	正常乳房-PS	
46-GC-N PS	GCI-2nd_del	E6UDD	正常乳房-PS	
47-GC-N PS	GCI-1st_del	DHLR1	正常乳房-PS	
48-GC-N PS	GCI-2nd_del	JHQEH	正常乳房-PS	
49-(63)-Am-N PS	Ambion	26486	正常乳房-PS	
50-GC-N PS	GCI-2nd_del	ONBFK	正常乳房-PS	
51-GC-N PS	GCI-1st_del	TG6J6	正常乳房-PS	
52-As-N PS	Asterand	14398	正常乳房-PS	
54-GC-N PS	GCI-2nd_del	AJGXV	正常乳房-PS	
56-GC-N PS	GCI-1st_del	HLCZX	正常乳房-PS	
58-GC-N PS	GCI-1st_del	FGV8P	正常乳房-PS	
59-As-N PS	Asterand	9264	正常乳房-PS	
60-(57)-Bc-N PM	Biochain	A609233	正常乳房-PM	
61-(59)-Bc-N PM	Biochain	A607155	正常乳房-PM	
62-(60)-Bc-N PM	Biochain	A609234	正常乳房-PM	
63-(66)-Am-N PM	Ambion	36678	正常乳房-PM	
64-(64)-Am-N PM	Ambion	23036	正常乳房-PM	
66-(67)-Am-N PM	Ambion	073P010602086A	正常乳房-PM	
67-(58)-Bc-N PM	Biochain	A609232	正常乳房-PM	
68-As-N PM	Asterand	8862	正常乳房-PM	
69-As-N PM	Asterand	8457	正常乳房-PM	

【表１４】

70-(43)-Bc-IDC	Biochain	A609183	浸潤性乳管癌	
71-(54)-Bc-IDC	Biochain	A605353	浸潤性乳管癌	
72-(55)-Bc-IDC	ABS	A609179	浸潤性乳管癌	
73-(47)-Bc-IDC	Biochain	A609221	浸潤性乳管癌	
74-(48)-Bc-IDC	Biochain	A609222	浸潤性乳管癌	
75-(53)-Bc-IDC	Biochain	A605151	浸潤性乳管癌	
76-(61)-Bc-IDC	Biochain	A610029	浸潤性乳管癌	
77-(46)-Bc-Carci	Biochain	A609177	癌腫	
78-(62)-Bc-IDC	Biochain	A609194	浸潤性乳管癌	
79-(32)-AB-Muc Carci SIIA	Ambion	7116T	粘液性癌腫	ステージ IIA
80-(49)-Bc-IDC	Biochain	A609223	浸潤性乳管癌	
81-(45)-Bc-IDC	Biochain	A609181	浸潤性乳管癌	
82-(50)-Bc-IDC	Biochain	A609224	浸潤性乳管癌	
83-(44)-Bc-IDC	Biochain	A609198	浸潤性乳管癌	
84-(51)-Bc-IDC	Biochain	A605361	浸潤性乳管癌	
85-(31)-Ic-IDC	Ambion	CG-154	浸潤性乳管癌	

【０６０８】

【表１５】

表３：肺パネル RNA 詳細

試料名	入手元	試料 ID	診断名	がんのステージ
1-GC-BAC-SIA	GCI-1st_del	7Z9V4	腺癌	ステージ IA
2-GC-BAC-SIB	GCI-1st_del	ZW2AQ	腺癌	ステージ IB
4-GC-Adeno-SIA	GCI-1st_del	3MOPL	腺癌	ステージ IA
5-GC-Adeno-SIA	GCI-1st_del	KOJXD	腺癌	ステージ IA
6-GC-Adeno-SIA	GCI-1st_del	X2Q44	腺癌	ステージ IA
8-GC-Adeno-SIA	GCI-1st_del	BS9AF	腺癌	ステージ IA
9-GC-Adeno-SIA	GCI-1st_del	UCLOA	腺癌	ステージ IA
10-GC-Adeno-SIA	GCI-1st_del	BVYK3	腺癌	ステージ IA
11-GC-Adeno-SIB	GCI-1st_del	U4DM4	腺癌	ステージ IB
12-GC-Adeno-SIB	GCI-1st_del	OWX5Y	腺癌	ステージ IB
13-GC-Adeno-SIIA	GCI-1st_del	XYY96	腺癌	ステージ IIA
14-GC-Adeno-SIIA	GCI-1st_del	SO7B1	腺癌	ステージ IIA
15-GC-Adeno-SIIIA	GCI-1st_del	QANSY	腺癌	ステージ IIIA
18-(76)-Bc-Adeno	Biochain	A609218	腺癌	
19-As-Sq-S0	Asterand	9220	扁平上皮癌	オカルト
20-GC-Sq-SIA	GCI-1st_del	U2QHS	扁平上皮癌	ステージ IA
21-GC-Sq-SIB	GCI-2nd_del	TRQR7	扁平上皮癌	ステージ IB
22-As-Sq-SIB	Asterand	17581	扁平上皮癌	ステージ IB
23-As-Sq-SIB	Asterand	18309	扁平上皮癌	ステージ IB
24-As-Sq-SIB	Asterand	9217	扁平上皮癌	ステージ IB
25-GC-Sq-SIIB	GCI-1st_del	RXQ1P	扁平上皮癌	ステージ IIB
26-GC-Sq-SIIB	GCI-1st_del	KB5KH	扁平上皮癌	ステージ IIB
27-GC-Sq-SIIIA	GCI-1st_del	LAYMB	扁平上皮癌	ステージ IIIA
30-(19)-Bc-Sq	Biochain	A408175	扁平上皮癌	
31-(78)-Bc-Sq	Biochain	A607125	扁平上皮癌	
33-(80)-Bc-Sq	Biochain	A609163	扁平上皮癌	
34-(18)-Bc-Sq	Biochain	A503387	扁平上皮癌	
35-(81)-Bc-Sq	Biochain	A609076	扁平上皮癌	
36-GC-LCC-SIA	GCI-1st_del	AF8AL	大細胞癌	ステージ IA
37-GC-LCC-SIB	GCI-1st_del	O62XU	大細胞癌	ステージ IB
38-GC-LCC-SIB	GCI-2nd_del	OLOIM	大細胞癌	ステージ IB

【表１６】

39-GC-LCC-SIIB	GCI-4th_del	1ZWSV	大細胞癌	ステージ IIB
41-GC-LCC-SIIB	GCI-1st_del	38B4D	大細胞癌	ステージ IIB
42-GC-SCC-SIB	GCI-1st_del	QPJQL	小細胞癌	ステージ IB
43-(32)-Bc-SCC	Biochain	A501391	小細胞癌	
44-(30)-Bc-SCC	Biochain	A501389	小細胞癌	
45-(83)-Bc-SCC	Biochain	A609162	小細胞癌	
46-(86)-Bc-SCC	Biochain	A608032	小細胞癌	
47-(31)-Bc-SCC	Biochain	A501390	小細胞癌	
48-(84)-Bc-SCC	Biochain	A609167	小細胞癌	
49-(85)-Bc-SCC	Biochain	A609169	小細胞癌	
50-(33)-Bc-SCC	Biochain	A504115	小細胞癌	
51-As-N-PS	Asterand	9078	正常肺	
52-As-N-PM	Asterand	8757	正常肺	
53-As-N-PM	Asterand	6692	正常肺	
54-As-N-PM	Asterand	7900	正常肺	
55-As-N-PM	Asterand	8771	正常肺	
56-As-N-PM	Asterand	13094	正常肺	
57-As-N-PM	Asterand	19174	正常肺	
58-As-N-PM	Asterand	13128	正常肺	
59-As-N-PM	Asterand	14374	正常肺	
60-(99)-Am-N PM	Ambion	36856	正常 PM	
61-(96)-Am-N PM	Ambion	36853	正常 PM	
62-(97)-Am-N PM	Ambion	36854	正常 PM	
63-(93)-Am-N PM	Ambion	111P0103A	正常 PM	
64-(98)-Am-N PM	Ambion	36855	正常 PM	
69-(91)-Bc-N PM	Biochain	A607257	正常（プール 2）PM	
70-(90)-Bc-N PM	Biochain	A608152	正常（プール 2）PM	

【０６０９】

【表１７】

表４：健常パネル RNA 詳細:

試料名	入手元	試料 ID
1-Bc-Rectum	Biochain	A610297
2-Bc-Rectum	Biochain	A610298
3-GC-Colon	GCI	ZJ17R
4-GC-Colon	GCI	YUZNR
5-GC-Colon	GCI	28QN6
6-Bc-Colon	Biochain	A501156
7-GC-Small bowel	GCI	V9L7D
8-Bc-Esoph	Biochain	A603814
9-Bc-Esoph	Biochain	A603813
10-As-Panc	Asterand	8918
11-As-Panc	Asterand	10082
12-As-Liver	Asterand	7916
13-GC-Kidney	GCI	N1EVZ
14-GC-Kidney	GCI	BMI6W
15-Bc-Adrenal	Biochain	A610374
16-Am-Lung	Ambion	111P0103A
17-Bc-Lung	Biochain	A503205
18-As-Lung	Asterand	6692
19-As-Lung	Asterand	7900
20-Am-Ovary	Asterand	16848
21-GC-Ovary	GCI	Y9VHI
22-GC-Ovary	GCI	DD73B
23-GC-Ovary	GCI	FDPL9
24-GC-Cervix	GCI	E2P2N
25-ABS-Bladder	ABS	150300503
26-ABS-Bladder	ABS	150700103
27-ABS-Bladder	ABS	150700203
28-Am-Placen	Ambion	021P33A
29-Bc-Placen	Biochain	A411073
30-Am-Breast	Ambion	26486
31-Am-Breast	Ambion	23036
32-GC-Breast	GCI	E6UDD
33-Bc-Breast	Biochain	A609234
34-Am-Prostate	Ambion	25955
35-Bc-Prostate	Biochain	A609258
36-As-Testis	Asterand	13071
37-As-Testis	Asterand	19671
38-TH-Blood-PBMC	Tel-Hashomer	52497
39-TH-Blood-PBMC	Tel-Hashomer	31055
40-TH-Blood-PBMC	Tel-Hashomer	31058

【表１８】

41-Ic-Spleen	Ichilov	CG-267
42-ABS-Spleen	ABS	150800704
43-ABS-Spleen	ABS	150800904
44-ABS-Spleen	ABS	150801804
45-ABS-Thymus	ABS	13066
46-ABS-Thymus	ABS	13105
47-ABS-Thymus	ABS	133968
48-Bc-Thyroid	Biochain	A610287
49-Ic-Thyroid	Ichilov	CG-119-2
50-GC-Sali gland	GCI	NNSMV
51-Ic-Cerebellum	Ichilov	CG-183-5
52-Bc-Brain	Biochain	A411322
53-Bc-Brain	Biochain	A411079
54-ABS-Heart	ABS	151101109
55-ABS-Heart	ABS	35208I026
56-ABS-Heart	ABS	352JA02409
57-Ic-Heart (Fibrotic)	Ichilov	CG-255-9
58-GC-Skel Mus	GCI	T8YZS
59-GC-Skel Mus	GCI	Q3WKA
60-As-Skel Mus	Asterand	8774
61-As-Skel Mus	Asterand	10937
62-As-Skel Mus	Asterand	6692
63-ABS-Skin	ABS	151104009
64-ABS-Skin	ABS	352MC01909
65-ABS-Skin	ABS	150402309

【０６１０】

【表１９】

表５：腎臓パネル RNA 詳細

試料名	入手元	試料 ID	診断名	がんのステージ
1_AB_K_PM-N	ABS	ABS150303105	アルツハイマー	
2_AB_K_PM-N	ABS	ABS151200305	アルツハイマー	
3_AB_K_PM-N	ABS	ABS151201805	心血管疾患	
4_AB_K_PM-N	ABS	ABS24724672102	COPD	
5_AB_K_RCC_ST2aN0MX	ABS	UH1003-29	RCC	ST2aN0MX
7_AS_K_RCC_ST3aN0M1	Asterand	52813 (1066748F-3152)	RCC	ST3aN0M1
8_AS_K_RCC_ST3NXM1	Asterand	52819 (1066176F-3152)	RCC	ST3NXM1
9_OR_K_RCC_ST4N1MX	Origene	CI0000011656 (1A26)	RCC	ST4N1MX
10_OR_K_RCC_ST3aN0M1	Origene	CU0000001623 (3714)	RCC	ST3aN0M1
11_OR_K_RCC_ST3N2M1	Origene	CU0000009324 (1A1A)	RCC	ST3N2M1
12_OR_K_RCC_ST2NXMX	Origene	CX0000000190 (3D99)	RCC	ST2NXMX
13_OR_K_RCC_ST2N0M1	Origene	CU0000005834 (34DD)	RCC	ST2N0M1
14_OR_K_RCC_ST3bN0MX	Origene	CU0000000762 (374D)	RCC	ST3bN0MX
15_OR_K_RCC_ST3NXMX	Origene	CI0000016503 (3743)	RCC	ST3NXMX
16_OR_K_RCC_ST3aNXMX	Origene	CU0000001216 (3711)	RCC	ST3aNXMX
17_AB_K_RCC_ST2N0MX	ABS	UH1002-14	RCC	ST2N0MX
18_AB_K_RCC_ST2bN0M1	ABS	UH1007-18	RCC	ST2bN0M1
19_AB_K_PM-N	ABS	ABS150400105	ALS	

【０６１１】

【表２０】

表６： 肝臓パネル RNA 詳細

試料名	入手元	試料 ID	診断名	がんのステージ
41_AB_L_PM-N	ABS	ABS151203707	アルツハイマー	
42_AB_L_PM-N	ABS	ABS151003509	認知症	
43_AS_L_PM-N	Asterand	49874 (1143071F-3152)	呼吸停止	
44_AS_L_PM-N	Asterand	50466 (1144029F-3152)	不明	
45_AS_L_PM-N	Asterand	50483 (1144465F-3152)	心肺停止	
46_AB_L_HCC_ST2N1MX	ABS	UH0603-43	HCC	T2N1MX
47_AB_L_HCC_ST3N0MX	ABS	UH0901-55	HCC	T3N0MX
48_AS_L_HCC_ST3N0M0	Asterand	51356 (1100251F-3152)	HCC	T3N0M0
49_AS_L_HCC_ST4NXMX	Asterand	51365 (1100271F-3152)	HCC	T4NXMX
50_AS_L_HCC_ST2N0M0	Asterand	52528 (1149074F-3152)	HCC	T2N0M0
51_OR_L_HCC_ST2N0MX	Origene	CI0000008358 (1A25)	HCC	T2N0MX
52_OR_L_HCC_ST2NXMX	Origene	CI0000009200 (14B1)	HCC	T2NXMX
53_OR_L_HCC_STXNXM1	Origene	CI0000013002 (30B6)	HCC	TXNXM1
54_OR_L_HCC_ST3NXM1	Origene	CI0000020838 (2445)	HCC	T3NXM1
55_OR_L_HCC_ST3NXMX	Origene	CU0000000996 (15F6)	HCC	T3NXMX
56_OR_L_HCC_ST3NXMX	Origene	CU0000001197 (02DE)	HCC	T3NXMX
57_OR_L_HCC_ST3NXMX	Origene	CI0000019267 (2441)	HCC	T3NXMX
58_OR_L_HCC_ST2NXMX	Origene	CU0000005407 (0F2D)	HCC	T2NXMX
59_OR_L_HCC_ST2NXMX	Origene	CU0000006675 (0F2E)	HCC	T2NXMX

【０６１２】

【表２１】

表７：ハウスキーピング遺伝子

HSKG	受託番号	HSKGの配列番号	フォワードプライマーの配列番号	フォワードプライマーの配列	リバースプライマーの配列番号	リバースプライマーの配列	アンプリコンの配列番号	アンプリコンの配列
SDHA	NM_004168	103	104	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	105	CCACCACTGCATCAAATTCATG	106	TGGGAACAAGAGGGCATCTGCTAAAGTTTCAGATTCCATTTCTGCTCAGTATCCAGTAGTGGATCATGAATTTGATGCAGTGGTGG
HPRT1	NM_000194	107	108	TGACACTGGCAAAACAATGCA	109	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	110	TGACACTGGCAAAACAATGCAGACTTTGCTTTCCTTGGTCAGGCAGTATAATCCAAAGATGGTCAAGGTCGCAAGCTTGCTGGTGAAAAGGACC
G6PD	NM_000402	111	112	GAGGCCGTCACCAAGAACAT	113	GGACAGCCGGTCAGAGCTC	114	GAGGCCGTCACCAAGAACATTCACGAGTCCTGCATGAGCCAGATAGGCTGGAACCGCATCATCGTGGAGAAGCCCTTCGGGAGGGACCTGCAGAGCTCTGACCGGCTGTCC
UBC	BC000449	133	134	ATTTGGGTCGCGGTTCTTG	135	TGCCTTGACATTCTCGATGGT	136	ATTTGGGTCGCGGTTCTTGTTTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGACAATGCAGATCTTCGTGAAGACTCTGACTGGTAAGACCATCACCCTCGAGGTTGAGCCCAGTGACACCATCGAGAATGTCAAGGCA
RPL19	NM_000981	119	120	TGGCAAGAAGAAGGTCTGGTTAG	121	TGATCAGCCCATCTTTGATGAG	122	TGGCAAGAAGAAGGTCTGGTTAGACCCCAATGAGACCAATGAAATCGCCAATGCCAACTCCCGTCAGCAGATCCGGAAGCTCATCAAAGATGGGCTGATCA

【表２２】

PBGD	BC019323	115	116	TGAGAGTGATTCGCGTGGG	117	CCAGGGTACGAGGCTTTCAAT	118	TGAGAGTGATTCGCGTGGGTACCCGCAAGAGCCAGCTTGCTCGCATACAGACGGACAGTGTGGTGGCAACATTGAAAGCCTCGTACCCTGG

【０６１３】

ＬＳＲ転写産物の発現分析に使用した特異的なプライマーおよびアンプリコンを表８に示す。

【０６１４】

【表２３】

表８：LSR 用プライマーおよびアンプリコン

アンプリコンの名称	アンプリコンの配列番号	アンプリコンの配列	フォワードプライマーの名称	フォワードプライマーの配列番号	フォワードプライマーの配列	リバースプライマーの名称	リバースプライマーの配列番号	リバースプライマーの配列
LSR_seg21-24_200-307/308_アンプリコン	137	GTCGACAACCAGCTCAATGCCCAGCTGGCAGCCGGGAACCCAGGCTACAACCCCTACGTCGAGTGCCAGGACAGCGTGCGCACCGTCAGGGTCGTGGCCACCAAGCAGGGCAACGCTGTGACCCTGGGAGATTACTACCAGGGCCGGAGGATTACCATCACCGGAAATGCTGACCTGACCTT	LSR_seg21F_200-307	138	GTCGACAACCAGCTCAATGC	LSR_seg24R_200-308	139	AAGGTCAGGTCAGCATTTCC
LSR_seg24-36_200-309/310_アンプリコン	140	ATGCTGACCTGACCTTTGACCAGACGGCGTGGGGGGACAGTGGTGTGTATTACTGCTCCGTGGTCTCAGCCCAGGACCTCCAGGGGAACAATGAGGCCTACGCAGAGCTCATCGTCCTTGGGAGGACCTCAGGGGTGGCTGAGCTCTTACCTGG	LSR_seg24F_200-309	141	ATGCTGACCTGACCTTTGAC	LSR_seg36R_200-310	142	CCAGGTAAGAGCTCAGCCAC

【０６１５】

ＴＭＥＭ２５転写産物の発現分析に使用した特異的なプライマーおよびアンプリコンを表９に示す。

【０６１６】

【表２４】

表９：TMEM25用プライマーおよびアンプリコン

アンプリコンの名称	アンプリコンの配列番号	アンプリコンの配列	フォワードプライマーの名称	フォワードプライマーの配列番号	フォワードプライマーの配列	リバースプライマーの名称	リバースプライマーの配列番号	リバースプライマーの配列
TMEM25_seg_21-27_200-344/346_アンプリコン	123	TTCACTGTCACTGCCCATCGGGCCCAGCATGAGCTCAACTGCTCTCTGCAGGACCCCAGAAGTGGCCGATCAGCCAACGCCTCTGTCATCCTTAATGTGCAATTCAAGCCAGAGATTGCCCAAGTCGGCGCCAAGTACCAGGAAGCTCAGGGCCCAGGCCTCCTGGTTGTCCTGTTTGCCCTGGTG	TMEM25_seg21F_200-344	124	TTCACTGTCACTGCCCATCGG	TMEM25_seg27R_200-346	125	CACCAGGGCAAACAGGACAAC

【０６１７】

ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）の発現データを以下の実施例３～９に記載する。

【０６１８】

実施例３

配列ＬＳＲ＿ＳＥＧ２４－３６＿２００－３０９／３１０に示したアンプリコンによって検出可能なＬＳＲ転写産物の正常卵巣組織および卵巣がん組織における発現量

ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）、ならびにＬＳＲ＿ｓｅｇ２４Ｆ＿２００－３０９プライマー（配列番号１４１）およびＬＳＲ＿ｓｅｇ３６Ｒ＿２００－３１０プライマー（配列番号１４２）に従って、またはこれらを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の発現をリアルタイムＰＣＲで測定した。検出対象でない試料（試料番号２８）のＣｔ値を４１とし、これをもとに計算を行った。いくつかのハウスキーピング遺伝子、すなわち、ＳＤＨＡ（配列番号１０３）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００４１６８；アンプリコン：ＳＤＨＡ＿アンプリコン（配列番号１０６））、ＨＰＲＴ１（配列番号１０７）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００１９４；ＨＰＲＴ１＿アンプリコン（配列番号１１０））、およびＧ６ＰＤ（配列番号１１１）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００４０２；Ｇ６ＰＤ＿アンプリコン（配列番号１１１４））の発現量をそれぞれ同様にして並行測定した。「材料および方法」セクションの正規化方法２に記載したように、各ＲＴ試料について、これらのハウスキーピング遺伝子の発現量から算出した正規化係数を用いて、上記アンプリコンの発現量を正規化した。次いで、各ＲＴ試料の正規化された発現量を、正常試料（上記表１の試料番号４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３および６４）の発現量の中央値で除することによって、各試料のアップレギュレーションを正常試料の中央値に対する倍率として得た。

【０６１９】

図１２は、上記のＬＳＲ転写産物の卵巣がん試料における過剰発現量を正常な試料に対して相対的に示したヒストグラムである。

【０６２０】
図１２から明らかなように、漿液性癌腫、粘液性癌腫および腺癌の試料中における、上記のアンプリコンによって検出可能なＬＳＲ転写産物の発現量は、非がん試料よりも顕著に高かった（上記表１の試料番号４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３および６４）。特に、漿液性癌腫の２７試料のうち２１試料、粘液性癌腫の９試料のうち７試料、および類内膜癌の８試料のうち７試料において、少なくとも５倍の過剰発現が見られた。
【０６２１】
これらの結果の有意性を確認するために以下のようにして統計分析を行った。
【０６２２】
卵巣漿液性癌腫試料と正常組織試料との間の、上記アンプリコンによって検出可能なＬＳＲ転写産物の発現レベルの差異は、Ｔ検定によって求めたところＰ値＝２．２２ｅ－００２であった。卵巣粘液性癌腫試料と正常組織試料との間の、上記アンプリコンによって検出可能なＬＳＲ転写産物の発現レベルの差異は、Ｔ検定によって求めたところＰ値＝６．８４ｅ－００４であった。卵巣類内膜癌試料と正常組織試料との間の、上記アンプリコンによって検出可能なＬＳＲ転写産物の発現レベルの差異は、Ｔ検定によって求めたところＰ値＝４．６１ｅ－００３であった。卵巣腺癌試料と正常組織試料との間の、上記アンプリコンによって検出可能なＬＳＲ転写産物の発現レベルの差異は、Ｔ検定によって求めたところＰ値＝５．６８ｅ－００４であった。
【０６２３】
５倍過剰発現の閾値についてＦｉｓｈｅｒの正確検定により確認したところ、漿液性癌腫試料と正常試料はＰ値＝２．５９ｅ－００９で有意差があることが分かった。５倍過剰発現の閾値についてＦｉｓｈｅｒの正確検定により確認したところ、粘液性癌腫試料と正常試料はＰ値＝８．４３ｅ－００６で有意差があることが分かった。５倍過剰発現の閾値についてＦｉｓｈｅｒの正確検定によって確認したところ、類内膜癌試料と正常試料はＰ値＝２．３８ｅ－００６で有意差があることが分かった。５倍過剰発現の閾値をＦｉｓｈｅｒの正確検定により確認したところ、腺癌試料と正常試料はＰ値＝７．２８ｅ－０１２で有意差があることが分かった。
【０６２４】
上記の値によってこれらの結果が統計的有意差を有することが実証されている。
【０６２５】
プライマー対も本発明の範囲内に包含されてもよく、本発明の範囲内に包含されることが好ましい。たとえば、上記の実験では、ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４Ｆ＿２００－３０９（配列番号１４１）とＬＳＲ＿ｓｅｇ３６Ｒ＿２００－３１０（配列番号１４２）とからなるプライマー対を使用したが、これらは適切なプライマー対を説明することのみを目的とした例示であり、プライマー対はこれらに限定されない。
【０６２６】
本発明は、任意の適切なプライマー対を使用することにより得られた任意のアンプリコンも包含することが好ましい。たとえば、上記の実験では、ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）で示されるアンプリコンが得られたが、これは適切なアンプリコンを説明することのみを目的とした例示であり、アンプリコンはこれに限定されない。
【０６２７】
実施例４
配列ＬＳＲ＿ＳＥＧ２４－３６＿２００－３０９／３１０に示したアンプリコンによって検出可能なＬＳＲ転写産物の正常乳房組織および乳がん組織における発現量
ｓｅｇ２４－３６ＦＲ－ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）、ならびにＬＳＲ＿ｓｅｇ２４Ｆ＿２００－３０９プライマー（配列番号１４１）およびＬＳＲ＿ｓｅｇ３６Ｒ＿２００－３１０プライマー（配列番号

１４２）に従って、またはこれらを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の発現をリアルタイムＰＣＲで測定した。検出対象でない試料（試料番号８１）のＣｔ値を４１とし、これをもとに計算を行った。いくつかのハウスキーピング遺伝子、すなわち、Ｇ６ＰＤ（配列番号１１１）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００４０２；Ｇ６ＰＤ＿アンプリコン）、ＰＢＧＤ（配列番号１１５）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＢＣ０１９３２３；ＰＢＧＤ＿アンプリコン）、ＲＰＬ１９（配列番号１１９）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００９８１；ＲＰＬ１９＿アンプリコン）、およびＳＤＨＡ（配列番号１０３）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００４１６８；ＳＤＨＡ＿アンプリコン）の発現量をそれぞれ同様にして並行測定した。「材料および方法」セクションの正規化方法２に記載したように、各ＲＴ試料について、これらのハウスキーピング遺伝子の発現量から算出した正規化係数を用いて、上記アンプリコンの発現量を正規化した。次いで、各ＲＴ試料の正規化された発現量を、正常試料（上記表２の試料番号４３、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５４、５６、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６６、６７、６８および６９）の発現量の中央値で除することによって、各試料のアップレギュレーションを正常試料の中央値に対する倍率として得た。

【０６２８】

図１３は、上記のＬＳＲ転写産物の乳がん試料における過剰発現量を正常な試料に対して相対的に示したヒストグラムである。

【０６２９】

図１３から明らかなように、がん試料中における、上記のアンプリコンによって検出可能なＬＳＲ転写産物の発現量は、非がん試料よりも高かった（上記表２の試料番号４３、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５４、５６、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６６、６７、６８および６９）。特に、腺癌の５３試料のうち９試料において、少なくとも５倍の過剰発現が見られた。

【０６３０】

プライマー対も本発明の範囲内に包含されてもよく、本発明の範囲内に包含されることが好ましい。たとえば、上記の実験では、ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４Ｆ＿２００－３０９（配列番号１４１）とＬＳＲ＿ｓｅｇ３６Ｒ＿２００－３１０（配列番号１４２）とからなるプライマー対を使用したが、これらは適切なプライマー対を説明することのみを目的とした例示であり、プライマー対はこれらに限定されない。

【０６３１】

本発明は、任意の適切なプライマー対を使用することにより得られた任意のアンプリコンも包含することが好ましい。たとえば、上記の実験では、ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）で示されるアンプリコンが得られたが、これは適切なアンプリコンを説明することのみを目的とした例示であり、アンプリコンはこれに限定されない。

【０６３２】

実施例５

配列ＬＳＲ＿ＳＥＧ２４－３６＿２００－３０９／３１０に示したアンプリコンによって検出可能なＬＳＲ転写産物の正常肺組織および肺がん組織における発現量

ｓｅｇ２４－３６ＦＲ－ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）、ならびにＬＳＲ＿ｓｅｇ２４Ｆ＿２００－３０９プライマー（配列番号１４１）およびＬＳＲ＿ｓｅｇ３６Ｒ＿２００－３１０プライマー（配列番号１４２）に従って、またはこれらを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の発現をリアルタイムＰＣＲで測定した。いくつかのハウスキーピング遺伝子、すなわち、ＨＰＲＴ１（配列番号１０７）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００１９４；ＨＰＲＴ１＿アンプリコン（配列番号１１０））、ＰＢＧＤ（配列番号１１５）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＢＣ０１９３２３；ＰＢＧＤ＿アンプリコン（配列番号１１８））、ＳＤＨＡ（配列番号１０３）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００４１６８；ＳＤＨＡ＿アンプリコン（配列番号１０６））、およびユビキチン（配列番号１３３）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＢＣ

０００４４９；ユビキチン＿アンプリコン（配列番号１３６））の発現量をそれぞれ同様にして並行測定した。「材料および方法」セクションの正規化方法２に記載したように、各ＲＴ試料について、これらのハウスキーピング遺伝子の発現量から算出した正規化係数を用いて、上記アンプリコンの発現量を正規化した。次いで、各ＲＴ試料の正規化された発現量を、正常試料（上記表３の試料番号５１、５２、５３、５４、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６９および７０）の発現量の中央値で除することによって、各試料のアップレギュレーションを正常試料の中央値に対する倍率として得た。

【０６３３】

図１４は、上記のＬＳＲ転写産物の肺がん試料における過剰発現量を正常な試料に対して相対的に示したヒストグラムである。

【０６３４】

図１４から明らかなように、腺癌および非小細胞癌の試料中における、上記のアンプリコンによって検出可能なＬＳＲまたは転写産物の発現量は、非がん試料よりも顕著に高く（上記表３の試料番号５１、５２、５３、５４、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６９および７０）、扁平上皮癌試料のいくつかにおいても非がん試料よりも高かった。特に、腺癌の１５試料のうち７試料、扁平上皮癌の１８試料のうち３試料、および非小細胞癌の４０試料のうち１０試料において、少なくとも５倍の過剰発現が見られた。

【０６３５】

これらの結果の有意性を確認するために以下のようにして統計分析を行った。

【０６３６】

肺腺癌試料と正常組織試料との間の、上記アンプリコンによって検出可能なヒトlipolysis-stimulated lipoprotein receptor転写産物の発現レベルの差異は、Ｔ検定によって求めたところＰ値＝２．９８ｅ－００５であった。肺扁平上皮癌試料と正常組織試料との間の、上記アンプリコンによって検出可能なＬＳＲ転写産物の発現レベルの差異は、Ｔ検定によって求めたところＰ値＝７．４２ｅ－００３であった。肺大細胞癌試料と正常組織試料との間の、上記アンプリコンによって検出可能なヒトlipolysis-stimulated lipoprotein receptor転写産物の発現レベルの差異は、Ｔ検定によって求めたところＰ値＝１．７６ｅ－００２であった。肺小細胞癌試料と正常組織試料との間の、上記アンプリコンによって検出可能なヒトlipolysis-stimulated lipoprotein receptor転写産物の発現レベルの差異は、Ｔ検定によって求めたところＰ値＝４．３５ｅ－００２であった。肺非小細胞癌試料と正常組織試料との間の、上記アンプリコンによって検出可能なヒトlipolysis-stimulated lipoprotein receptor転写産物の発現レベルの差異は、Ｔ検定によって求めたところＰ値＝４．３１ｅ－００６であった。

【０６３７】

５倍過剰発現の閾値についてＦｉｓｈｅｒの正確検定により確認したところ、腺癌試料と正常試料はＰ値＝３．１６ｅ－００３で有意差があることが分かった。５倍過剰発現の閾値についてＦｉｓｈｅｒの正確検定によって確認したところ、非小細胞癌試料と正常試料はＰ値＝２．９０ｅ－００２で有意差があることが分かった。

【０６３８】

上記の値によってこれらの結果が統計的有意差を有することが実証されている。

【０６３９】

プライマー対も本発明の範囲内に包含されてもよく、本発明の範囲内に包含されることが好ましい。たとえば、上記の実験では、ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４Ｆ＿２００－３０９（配列番号１４１）とＬＳＲ＿ｓｅｇ３６Ｒ＿２００－３１０（配列番号１４２）とからなるプライマー対を使用したが、これらは適切なプライマー対を説明することのみを目的とした例示であり、プライマー対はこれらに限定されない。

【０６４０】

本発明は、任意の適切なプライマー対を使用することにより得られた任意のアンプリコ

ンも包含することが好ましい。たとえば、上記の実験では、ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）で示されるアンプリコンが得られたが、これは適切なアンプリコンを説明することのみを目的とした例示であり、アンプリコンはこれに限定されない。

【０６４１】

実施例６

配列ＬＳＲ＿ＳＥＧ２４－３６＿２００－３０９／３１０に示したアンプリコンによって検出可能なＬＳＲ転写産物の種々の正常組織における発現量

ｓｅｇ２４－３６ＦＲ－ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）、ならびにＬＳＲ＿ｓｅｇ２４Ｆ＿２００－３０９プライマー（配列番号１４１）およびＬＳＲ＿ｓｅｇ３６Ｒ＿２００－３１０プライマー（配列番号１４２）に従って、またはこれらを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の発現をリアルタイムＰＣＲで測定した。いくつかのハウスキーピング遺伝子、すなわち、ＳＤＨＡ（配列番号１０３）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００４１６８；ＳＤＨＡ＿アンプリコン（配列番号１０６））、ＨＰＲＴ１（配列番号１０７）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００１９４；ＨＰＲＴ１＿アンプリコン（配列番号１１０））、およびＧ６ＰＤ（配列番号１１１）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００４０２；Ｇ６ＰＤ＿アンプリコン（配列番号１１４））の発現量をそれぞれ同様にして並行測定した。「材料および方法」セクションの正規化方法２に記載したように、各ＲＴ試料について、これらのハウスキーピング遺伝子の発現量から算出した正規化係数を用いて、上記アンプリコンの発現量を正規化した。次いで、各ＲＴ試料の正規化された発現量を、卵巣試料（上記表４の試料番号２０、２１、２２および２３）の中央値で除することによって、卵巣試料における発現量の中央値に対する各試料の相対的発現量を得た。

【０６４２】

図１５は、上記のＬＳＲ転写産物の正常組織における発現量を卵巣試料に対して相対的に示したヒストグラムである。

【０６４３】

実施例７

配列ＬＳＲ＿ＳＥＧ２４－３６＿２００－３０９／３１０に示したアンプリコンによって検出可能なＬＳＲ転写産物の正常腎臓組織および腎臓がん組織における発現量

ｓｅｇ２４－３６ＦＲ－ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）、ならびにＬＳＲ＿ｓｅｇ２４Ｆ＿２００－３０９プライマー（配列番号１４１）およびＬＳＲ＿ｓｅｇ３６Ｒ＿２００－３１０プライマー（配列番号１４２）に従って、またはこれらを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の発現をリアルタイムＰＣＲで測定した。いくつかのハウスキーピング遺伝子、すなわち、ＳＤＨＡ（配列番号１０３）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００４１６８；ＳＤＨＡ＿アンプリコン（配列番号１０６））、Ｇ６ＰＤ（配列番号１１１）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００４０２； Ｇ６ＰＤ＿アンプリコン（配列番号１１４））、およびＰＢＧＤ（配列番号１１５）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＢＣ０１９３２３；ＰＢＧＤ＿アンプリコン（配列番号１１８））の発現量をそれぞれ同様にして並行測定した。「材料および方法」セクションの正規化方法２に記載したように、各ＲＴ試料について、これらのハウスキーピング遺伝子の発現量から算出した正規化係数を用いて、上記アンプリコンの発現量を正規化した。次いで、各ＲＴ試料の正規化された発現量を、正常試料（上記表５の試料番号１、２、３、４および１９）の中央値で除することによって、各試料のアップレギュレーションを正常試料の中央値に対する倍率として得た。

【０６４４】

図１６は、上記のヒトｌｉｐｏｌｙｓｉｓ ｓｔｉｍｕｌａｔｅｄ ｌｉｐｏｐｒｏｔｅｉｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ転写産物の腎臓がん試料におけるダウンレギュレーションを正常な試料に対して相対的に示したヒストグラムである。

【０６４５】

図１６から明らかなように、腎臓がん試料中における、上記のアンプリコンによって検出可能なＬＳＲ転写産物の発現量は、非がん試料よりも顕著に低かった（上記表５の試料番号１、２、３、４および１９）。

【０６４６】

これらの結果の有意性を確認するために以下のようにして統計分析を行った。

【０６４７】

腎臓がん試料と正常組織試料との間の、上記アンプリコンによって検出可能なＬＳＲ転写産物の発現レベルの差異は、Ｔ検定によって求めたところＰ値＝１．２５ｅ－０１であった。

【０６４８】

プライマー対も本発明の範囲内に包含されてもよく、本発明の範囲内に包含されることが好ましい。たとえば、上記の実験では、ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４Ｆ＿２００－３０９（配列番号１４１）とＬＳＲ＿ｓｅｇ３６Ｒ＿２００－３１０（配列番号１４２）とからなるプライマー対を使用したが、これらは適切なプライマー対を説明することのみを目的とした例示であり、プライマー対はこれらに限定されない。

【０６４９】

本発明は、任意の適切なプライマー対を使用することにより得られた任意のアンプリコンも包含することが好ましい。たとえば、上記の実験では、ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）で示されるアンプリコンが得られたが、これは適切なアンプリコンを説明することのみを目的とした例示であり、アンプリコンはこれに限定されない。

【０６５０】

実施例８

配列ＬＳＲ＿ＳＥＧ２４－３６＿２００－３０９／３１０に示したアンプリコンによって検出可能なＬＳＲ転写産物の正常肝臓組織および肝臓がん組織における発現量

ｓｅｇ２４－３６ＦＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）、ならびにＬＳＲ＿ｓｅｇ２４Ｆ＿２００－３０９プライマー（配列番号１４１）およびＬＳＲ＿ｓｅｇ３６Ｒ＿２００－３１０プライマー（配列番号１４２）に従って、またはこれらを使用して検出可能なＬＳＲ転写産物の発現をリアルタイムＰＣＲで測定した。いくつかのハウスキーピング遺伝子、すなわち、ＳＤＨＡ（配列番号１０３）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００４１６８；ＳＤＨＡ＿アンプリコン（配列番号１０６））、Ｇ６ＰＤ（配列番号１１１）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００４０２；Ｇ６ＰＤ＿アンプリコン（配列番号１１４））、およびＰＢＧＤ（配列番号１１５）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＢＣ０１９３２３；－ＰＢＧＤ＿アンプリコン（配列番号１１８））の発現量をそれぞれ同様にして並行測定した。「材料および方法」セクションの正規化方法２に記載したように、各ＲＴ試料について、これらのハウスキーピング遺伝子の発現量から算出した正規化係数を用いて、上記アンプリコンの発現量を正規化した。次いで、各ＲＴ試料の正規化された発現量を、正常試料（上記表６の試料番号４１、４２、４３、４４および４５）の中央値で除することによって、各試料のアップレギュレーションを正常試料の中央値に対する倍率として得た。

【０６５１】

図１７は、上記のＬＳＲ転写産物の肝臓がん試料における発現量を正常な試料に対して相対的に示したヒストグラムである。

【０６５２】

プライマー対も本発明の範囲内に包含されてもよく、本発明の範囲内に包含されることが好ましい。たとえば、上記の実験では、ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４Ｆ＿２００－３０９（配列番号１４１）とＬＳＲ＿ｓｅｇ３６Ｒ＿２００－３１０（配列番号１４２）リバースプライマーとからなるプライマー対を使用したが、これらは適切なプライマー対を説明することのみを目的とした例示であり、プライマー対はこれらに限定されない。

【０６５３】

本発明は、任意の適切なプライマー対を使用することにより得られた任意のアンプリコンも包含することが好ましい。たとえば、上記の実験では、ＬＳＲ＿ｓｅｇ２４－３６＿２００－３０９／３１０＿アンプリコン（配列番号１４０）で示されるアンプリコンが得られたが、これは適切なアンプリコンを説明することのみを目的とした例示であり、アンプリコンはこれに限定されない。

【０６５４】

実施例９

ＦＬＡＧタグに融合させたＬＳＲ＿Ｔ１＿Ｐ５ａ　ＯＲＦのクローニング

ＦＬＡＧ（アミノ酸配列：ＤＹＫＤＤＤＤＫ、配列番号１５３）に融合させた、ＬＳＲ＿Ｔ１＿Ｐ５ａのオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）（配列番号１５４）をＰＣＲによりクローニングして、ｆｌａｇに融合させたＬＳＲ＿Ｐ５ａタンパク質（配列番号１１）を以下のように作製した。

【０６５５】

３ステップＰＣＲ反応を、ＰｆｕＵｌｔｒａ　ＩＩ　Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＳ　ＤＮＡポリメラーゼ（アジレント、カタログ番号：６００６７０）を使用して以下の条件で実施した。第１ステップにおいては、全反応量２５μｌ中、２００＿３６９＿ＬＳＲ＿Ｋｏｚａｋ＿ＮｈｅＩプライマー（配列番号１４７）および２００＿３７９＿ＬＳＲ＿Ｒｅｖプライマー（配列番号１４８）それぞれ０．５μｌとともに、卵巣パネル（表１）からの非希釈卵巣試料（ＩＤ：ＰＺＱＸＨ）１μｌをＰＣＲ反応のテンプレートとして使用した。反応条件は、９８℃５分；９８℃２０秒→５５℃３０秒→７２℃１．５分を３５サイクル；次いで７２℃５分であった。ＰＣＲ産物をＤＤＷで１：２０に希釈し、そのうちの１μｌを各ＰＣＲ反応のステップ２においてテンプレートとして使用した。

【０６５６】

第２ステップにおいては、全反応量２５μｌ中、２００＿３６９＿ＬＳＲ＿Ｋｏｚａｋ＿ＮｈｅＩプライマー（配列番号１４７）（１０μＭ）および２００＿３７１＿ＬＳＲ＿ｓｅｇ３６Ｒプライマー（配列番号１４９）（１０μＭ）をそれぞれ０．５μｌ使用して、ＬＳＲの５’部分を増幅した。全反応量２５μｌ中、２００＿３７０＿ＬＳＲ＿ｓｅｇ３６Ｆプライマー（配列番号１５０）（１０μＭ）および２００－３７３＿ＬＳＲ＿Ｆｌａｇ＿ＢａｍＨＩ＿Ｒｅｖプライマー（配列番号１５１）（１０μＭ）をそれぞれ０．５μｌ使用して、ＬＳＲの３’部分を増幅した。両方の反応において、反応条件は、９８℃５分；９８℃２０秒→６０℃１５秒→７２℃１．５分を３５サイクル；次いで７２℃５分であった。それぞれの反応産物を、１％アガロースゲル上で分離し、Ｑｉａｑｕｉｃｋ（登録商標）Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（キアゲン、カタログ番号：２８７０６）を使用してゲルから精製した。５’産物１００ｎｇおよび３’産物１００ｎｇを、ＰＣＲ反応の第３ステップにおけるテンプレートとして使用した。ＰＣＲ反応の第３ステップにおいては、全反応量２５μｌ中、２００＿３６９＿ＬＳＲ＿Ｋｏｚａｋ＿ＮｈｅＩプライマー（配列番号１４７）および２００－３７３＿ＬＳＲ＿Ｆｌａｇ＿ＢａｍＨＩ＿Ｒｅｖプライマー（配列番号１５１）をそれぞれ０．５μｌ使用して、完全長ＬＳＲ－Ｆｌａｇ配列を増幅した。反応条件は、９８℃５分；９８℃２０秒→５５℃３０秒→７２℃１．５分を３５サイクル；次いで７２℃５分であった。使用したプライマーはすべて、遺伝子特異的配列、制限酵素部位、コザック配列およびＦＬＡＧタグ配列を含む。ステップ３のＰＣＲ産物を１％アガロースゲル上で分離した。予想されるバンドサイズを検証した後、ＱＩＡｑｕｉｃｋ（登録商標）Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　ｋｉｔを使用してＰＣＲ産物を精製した。

【０６５７】

精製した完全長ＰＣＲ産物を、制限酵素ＮｈｅＩおよびＢａｍＨＩ（ニュー・イングランド・バイオラボ（米国マサチューセッツ州ベヴァリー）で消化した。消化した後、ＤＮＡを１％アガロースゲル上で分離した。予想されたサイズのバンドをゲルから切り出し抽出した。次いで、消化したＤＮＡを、上述のＮｈｅＩおよびＢａｍＨＩで消化したｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３ベクターにライゲートし、Ａｎｔａｒｃｔｉｃホスファターゼ（ニュー・

イングランド・バイオラボ（米国マサチューセッツ州ベヴァリー）カタログ番号：Ｍ０２８９Ｌ）を用いて３７℃で３０分間処理し、上述のＱＩＡｑｕｉｃｋ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　ｋｉｔを使用して、１％アガロースゲルから精製した。ライゲーション反応はＴ４ＤＮＡリガーゼ（プロメガ；カタログ番号：Ｍ１８０Ａ）を用いて行った。

【０６５８】

実施例１０

ＬＳＲ＿Ｔ１＿Ｐ５ａ　ＯＲＦのクローニング

ＬＳＲ＿Ｔ１＿Ｐ５ａのオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）（配列番号１５４）をＰＣＲによりクローニングして、ＬＳＲ＿Ｐ５ａタンパク質（配列番号１１）を以下のように作製した。

【０６５９】

ＰＣＲ反応を、ＰｆｕＵｌｔｒａ　ＩＩ　Ｆｕｓｉｏｎ　ＨＳ　ＤＮＡポリメラーゼ（アジレント、カタログ番号：６００６７０）を使用して以下の条件で実施した。全反応量２５μｌ中、２００＿３６９＿ＬＳＲ＿Ｋｏｚａｋ＿ＮｈｅＩプライマー（配列番号１４７）および２００－３７２＿ＬＳＲ＿ＢａｍＨＩ＿Ｒｅｖプライマー（配列番号１５２）それぞれ０．５μｌとともに、上記のｐＩＲＥＳ＿ｐｕｒｏ３＿ＬＳＲ＿Ｔ１＿Ｐ５ａ＿Ｆｌａｇ構築物５０ｎｇをＰＣＲ反応のテンプレートとして使用した。反応条件は、９８℃５分；９８℃２０秒→５５℃３０秒→７２℃１．５分を３５サイクル；次いで７２℃１０分であった。使用したプライマーはすべて、遺伝子特異的配列、制限酵素部位およびコザック配列を含む。ＰＣＲ産物を１％アガロースゲル上で分離した。予想されるバンドサイズを検証した後、上述のＱＩＡｑｕｉｃｋ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　ｋｉｔを使用してＰＣＲ産物を精製した。

【０６６０】

精製したＰＣＲ産物を、制限酵素ＮｈｅＩおよびＢａｍＨＩ（ニュー・イングランド・バイオラボ（米国マサチューセッツ州ベヴァリー）で消化した。消化した後、ＤＮＡを１％アガロースゲル上で分離した。予想されたサイズのバンドをゲルから切り出し抽出した。次いで、消化したＤＮＡを、上述のＮｈｅＩおよびＢａｍＨＩで消化したｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３ベクターにライゲートし、Ａｎｔａｒｃｔｉｃホスファターゼ（ニュー・イングランド・バイオラボ（米国マサチューセッツ州ベヴァリー）カタログ番号：Ｍ０２８９Ｌ）を用いて３７℃で３０分間インキュベートし、上述のＱＩＡｑｕｉｃｋ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　ｋｉｔを使用して、１％アガロースゲルから精製した。ライゲーション反応はＴ４ＤＮＡリガーゼ（プロメガ；カタログ番号：Ｍ１８０Ａ）を用いて行った。

【０６６１】

上記のタグを付加した構築物およびタグを付加していない構築物の配列検証を行った（Ｈｙｌａｂｓ（イスラエル国レホボト））。これら２つのヌクレオチド間のミスマッチは以下のように同定された。配列番号１５４の１１９位の核酸がＧからＡに変化し、配列番号１５４の６２６位の核酸がＡからＧに変化した結果、タグを付加していない構築物では配列番号１４５に示した核酸配列が得られ、タグを付加した構築物においては配列番号１４６に示した核酸配列が得られた。これらの核酸配列から、配列番号３０１の２０９位のアミノ酸において、ＩがＭに変化したアミノ酸ミスマッチを有するポリペプチドが作製され、その結果、タグを付加していない構築物については配列番号１４３に示したアミノ酸配列を有するタンパク質が得られ、タグを付加した構築物については配列番号１４４に示したアミノ酸配列を有するタンパク質が得られた。

【０６６２】

上記の組換えプラスミドを処理に供し、以下の安定なプールを作製した。

【０６６３】

実施例１１

ＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿ＦＬＡＧ＿Ｍタンパク質を発現する組換えＨＥＫ－２９３Ｔ細胞の安定なプールの確立

ＬＳＲ＿Ｔ１＿Ｐ５ａ＿Ｆｌａｇ＿ｍ（配列番号１４６）およびｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３

空ベクタープラスミドを、以下のようにしてＨＥＫ２９３Ｔ細胞に安定にトランスフェクトさせた。

【０６６４】

ＨＥＫ２９３Ｔ（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ－１１２６８）細胞を、あらかじめ温めておいた２ｍｌの完全培地を含む、組織培養に適した滅菌６ウェルプレートに播種した。この完全培地の組成は、ＤＭＥＭ［ダルベッコの改変イーグル培地（バイオロジカルインダストリーズ（イスラエル国Ｂｅｉｔ　Ｈａ’Ｅｍｅｋ）、カタログ番号：０１－０５５－１Ａ）］＋１０％ＦＢＳ［ウシ胎仔血清（バイオロジカルインダストリーズ（イスラエル国Ｂｅｉｔ　Ｈａ’Ｅｍｅｋ）、カタログ番号：０４－００１－１Ａ）］＋４ｍＭ　Ｌ－グルタミン（バイオロジカルインダストリーズ（イスラエル国Ｂｅｉｔ　Ｈａ’Ｅｍｅｋ）、カタログ番号：０３－０２０－１Ａ）であった。１ウェルあたり５００，０００個の細胞を播種し、９４μｌのＤＭＥＭで希釈したＦｕＧＥＮＥ６試薬（ロシュ、カタログ番号：１１－８１４－４４３－００１）６μｌを使用してＤＮＡ構築物２μｇをトランスフェクトした。この複合混合物は、室温で１５分間インキュベートしてから細胞に滴下した。５％CO_2を含み３７℃に保持されたインキュベーターに細胞をセットした。トランスフェクションの４８時間後、選択培地（５μｇ／ｍｌピューロマイシン（シグマ、カタログ番号：Ｐ８８３３）を添加した完全培地）１５ｍｌを含む７５ｃｍ^{2}の組織培養フラスコに細胞を移した。細胞をインキュベーターにセットし、クローン形成が観察されるまで培地を３～４日ごとに交換した。

【０６６５】

実施例１２

安定にトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿ＦＬＡＧ＿Ｍの異所性発現の分析

安定にトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞におけるＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿Ｆｌａｇ＿ｍ（配列番号１４４）の発現を、抗ＬＳＲ抗体および表９に示す抗ｆｌａｇ抗体を使用して細胞溶解物をウェスタンブロット解析することにより測定した。

【０６６６】

Ｃｅｌｌ　Ｄｉｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ　Ｅｎｚｙｍｅ－Ｆｒｅｅ　ＰＢＳ－Ｂａｓｅｄ（Ｇｉｂｃｏ；１３１５１－０１４）を使用して、細胞をプレートから剥離し、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）（バイオロジカルインダストリーズ、０２－０２３－１Ａ）中で洗浄し、１２００ｇで5分間遠心分離した。２５×コンプリートＥＤＴＡフリープロテアーゼインヒビターカクテル（ロシュ、１１　８７３　５８０　００１）を添加した、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．４、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、１％トリトンＸ－１００中に細胞を再懸濁し、２０秒間ボルテックスすることによって全細胞抽出を行った。４℃、２００００ｇで２０分間遠心分離後、細胞抽出液を回収し、Ｂｒａｄｆｏｒｄバイオ・ラッドプロテインアッセイ（バイオ・ラッド、カタログ番号：５００－０００６）でタンパク濃度を測定した。同量のタンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥ（インビトロジェン、ＮｕＰＡＧＥ　４－１２％　ＮｕＰＡＧＥ　Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓ、カタログ番号：ＮＰ０３３５、ＮＰ０３２２）で分析し、ニトロセルロース膜（ＢＡ８３、０．２μｍ、Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ　＆　Ｓｃｈｕｅｌｌ、カタログ番号：４０１３８５）に転写した。この膜を、ＴＴＢＳ（Ｂｉｏｌａｂ、カタログ番号：２０８９２３２３）／１０％スキムミルク（Ｄｉｆｃｏ、カタログ番号：２３２１００）でブロックし、ＴＴＢＳ／５％ＢＳＡ（シグマアルドリッチ、Ａ４５０３）を用いて（表９に）示した濃度に希釈した本明細書（図１８）に記載の一次抗体を使用して、４℃で１６時間インキュベートした。ＴＴＢＳで３回洗浄後、ＴＴＢＳで希釈した本明細書に記載の二次結合抗体を使用して、膜を室温で１時間さらにインキュベートした。化学発光反応は、ＥＣＬウェスタンブロット検出試薬（ＧＥヘルスケア、カタログ番号：ＲＰＮ２２０９）を用いて行い、膜をスーパーＲＸ富士Ｘ－レイフィルム（カタログ番号：４７４１００８３８９）に露光させた。

【０６６７】

図１８は、抗Ｆｌａｇ抗体（シグマ、カタログ番号：Ａ８５９２）（図１８Ａ）および抗ＬＳＲ抗体（Ａｂｎｏｖａ、カタログ番号：Ｈ０００５１５９９－Ｂ０１Ｐ（図１８Ｂ）；アブカム、カタログ番号：ａｂ５９６４６（図１８Ｃ）；およびシグマ、カタログ番号：ＨＰＡ００７２７０（図１８Ｄ））を使用して検出された、予想バンドサイズ～７０ｋＤａのＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿Ｆｌａｇ＿ｍタンパク質（配列番号１４４）の組換えＨＥＫ２９３Ｔ細胞における発現を示す。

【０６６８】

実施例１３

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞における異所性ＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿ＦＬＡＧ＿Ｍの細胞内局在の決定

安定にトランスフェクトされた細胞におけるＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿Ｆｌａｇ＿ｍタンパク質（配列番号１４４）の細胞内局在を共焦点顕微鏡法により決定した。

【０６６９】

上記のＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿Ｆｌａｇ＿ｍ（配列番号１４４）を発現した、安定にトランスフェクトされた組換えＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、ポリ－Ｌ－リシン（シグマ；カタログ番号：Ｐ４８３２）であらかじめコーティングしたカバースリップに載せた。２４時間後、細胞に免疫染色を施し、共焦点顕微鏡法で分析した。カバースリップをリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中で洗浄し、次いで、ＰＢＳ／３．７％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）（ＥＭＳ、カタログ番号：１５７１０）／３％グルコース（シグマ、カタログ番号：Ｇ５７６７）溶液中で１５分間固定した。ＰＢＳ／３ｍＭグリシン（シグマ、カタログ番号：Ｇ７１２６）で５分間処理することによって、ＰＦＡをクエンチした。ＰＢＳ中での５分間の洗浄を２回行った後、ＰＢＳ／０．１％トリトン－Ｘ１００を用いて細胞を室温で５分間透過処理し、ＰＢＳ中で２回洗浄した。次いで、ＰＢＳ／５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）（シグマ、カタログ番号：Ａ４５０３）を用いて非特異的領域のブロッキング処理を２０分間行った。次いで、ＰＢＳ／５％ＢＳＡで希釈した本明細書に記載の各一次抗体とともに、カバースリップを湿潤箱中で１時間インキュベートし、ＰＢＳ中での５分間の洗浄を３回行った。次いで、ＰＢＳ／２．５％ＢＳＡで本明細書に示した希釈倍率で希釈した対応する二次抗体とともに、カバースリップを３０分間インキュベートした。上記の抗体および使用した希釈倍率を表９に具体的に示す。フェノールレッドを含まないハンクス平衡塩類溶液（ＨＢＳＳ）（バイオロジカルインダストリーズ、カタログ番号：０２－０１６－１）中で前洗浄した後、ＨＢＳＳで１：２００に希釈したＷＧＡ－Ａｌｅｘａ４８８（インビトロジェン、カタログ番号：Ｗ１１２６１）とともにカバースリップを１０分間インキュベートし、ＨＢＳＳ中で洗浄し、ＨＢＳＳで１：１０００に希釈したビスベンズイミドＨ　３３２５８（シグマ、カタログ番号：１４５３０）中でインキュベートした。次いで、Ｇｅｌ　Ｍｏｕｎｔ　Ａｑｕｅｏｕｓ　ｍｅｄｉｕｍ（シグマ、カタログ番号：Ｇ０９１８）を用いてカバースリップをスライドに載せ、共焦点顕微鏡法を使用して細胞中の蛍光生成物の存在を観察した。

【０６７０】

図１９に、ＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿Ｆｌａｇ＿ｍの細胞内局在を示す。抗Ｆｌａｇ抗体（シグマ、カタログ番号：Ａ９５９４）（図１９Ａ）および抗ＬＳＲ抗体（アブカム、カタログ番号：ａｂ５９６４６（図１９Ｂ）、Ａｂｎｏｖａ、カタログ番号：Ｈ０００５１５９９－Ｂ０１Ｐ（図１９Ｃ）およびシグマ、カタログ番号ＨＰＡ００７２７０（図１９Ｄ））で検出されたように、ＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿Ｆｌａｇ＿ｍ（配列番号１４４）は主として細胞質に局在しているが、細胞表面上にも検出することができる。

【０６７１】

実施例１４

様々な細胞株における内因性ＬＳＲタンパク質の発現の分析

様々な細胞株における内因性ＬＳＲタンパク質の発現を以下のようにしてウェスタンブロットによって分析した。

【０６７２】

ＳＫ－ＯＶ３（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＨＴＢ－７７）、Ｃａｏｖ３（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＨＴ

Ｂ－７５）、ＯＶＣＡＲ３（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＨＴＢ－１６１）、ＥＳ－２（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－１９７８）、ＯＶ－９０（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－１１７３２）、ＴＯＶ１１２Ｄ（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＣＲＬ－１１７３１）、およびＨｅｐ　Ｇ２（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．ＨＢ－８０６５）の細胞抽出液を上述のように調製した。

【０６７３】

ＨｅＬａ（カタログ番号：ｓｃ－２２００）、ＭＣＦ－７（カタログ番号：ｓｃ－２２０６）、ＣａＣｏ２（カタログ番号：ｓｃ－２２６２）およびＳｋＢＲ３（カタログ番号：ｓｃ－２２１８）の細胞抽出液はＳａｎｔａＣｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙから購入した。

【０６７４】

同量のタンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析し、上述のニトロセルロース膜に転写した。この膜を、ＴＴＢＳ（Ｂｉｏｌａｂ、カタログ番号：２０８９２３２３）／１０％スキムミルク（Ｄｉｆｃｏ、カタログ番号：２３２１００）でブロックし、ＴＴＢＳ／５％ＢＳＡ（シグマアルドリッチ、Ａ４５０３）を用いて（表９に）示した濃度に希釈した抗ＬＳＲ抗体（アブカム、カタログ番号：ａｂ５９６４６）を使用して、４℃で１６時間インキュベートした。ＴＴＢＳで３回洗浄後、ＴＴＢＳで希釈した本明細書（表９）に記載の二次結合抗体を使用して、膜を室温で１時間さらにインキュベートした。化学発光反応は、ＥＣＬウェスタンブロット検出試薬（ＧＥヘルスケア、カタログ番号：ＲＰＮ２２０９）を用いて行い、膜をスーパーＲＸ富士Ｘ－レイフィルム（カタログ番号：４７４１００８３８９）に露光させた。

【０６７５】

図２０は、様々な細胞株におけるＬＳＲの内因性発現を示す。ＬＳＲに相当する７２ｋＤａのバンドは、抗ＬＳＲ抗体によって、ＳＫ－ＯＶ３、Ｃａｏｖ３、ＯＶＣＡＲ３、ＯＶ－９０、Ｈｅｐ　Ｇ２、ＨｅＬａ、ＣａＣｏ２およびＳｋＢＲ３の抽出液中に検出された（図２０Ａ）。抗ＧＡＰＤＨ（アブカム、カタログ番号：ａｂ９４８４）をローディングコントロールとして使用した（図２０Ｂ）。

【０６７６】

【表２５】

表９：一次抗体および二次抗体

抗体	適用	希釈倍率
マウス抗 FLAG-Cy3（シグマ、カタログ番号:A9594）	ＩＦ	1:200
マウス抗 FLAG-HRP（シグマ、カタログ番号:A8592）	WB	1:2000
ウサギ抗 LSR（アブカム、カタログ番号:ab59646）	ＩＦ WB	1:500 1:4000
ウサギ抗 LSR(シグマ、カタログ番号:HPA007270)	ＩＦ WB	1:100 1:2500
マウス抗 LSR(Abnova、カタログ番号:H00051599-B01P)	ＩＦ WB	1:500 1:1000
マウス抗 GAPDH（アブカム、カタログ番号:ab9484）	WB	1:1000
ロバ抗ウサギ Cy3（Jackson ImmunoResearch Laboratories 社、カタログ番号:711-165-152）	ＩＦ	1:200
ロバ抗マウス Dylight 549（Jackson ImmunoResearch Laboratories 社、カタログ番号:715-506-150）	ＩＦ	1:100
ペルオキシダーゼ結合アフィニティー精製ヤギ抗ウサギ IgG（Jackson ImmunoResearch Laboratories 社、カタログ番号:111-035-003）	WB	1:10000
ペルオキシダーゼ結合アフィニティー精製ヤギ抗マウス IgG（Jackson ImmunoResearch Laboratories 社、カタログ番号:115-035-146）	WB	1:10000

【０６７７】

実施例１５

配列ＴＭＥＭ２５＿ＳＥＧ２１－２７に示したアンプリコンによって検出可能なＴＭＥＭ２５転写産物の正常乳房組織および乳がん組織における発現量

ｓｅｇ２１－２７－ＴＭＥＭ２５＿ｓｅｇ＿２１－２７＿２００－３４４／３４６＿アンプリコン（配列番号１２３）、ならびにＴＭＥＭ２５＿ｓｅｇ２１Ｆ＿２００－３４４プライマー（配列番号１２４）およびＴＭＥＭ２５＿ｓｅｇ２７Ｒ＿２００－３４６プライマー（配列番号１２５）に従って、またはこれらを使用して検出可能なＴＭＥＭ２５転写産物の発現をリアルタイムＰＣＲで測定した。いくつかのハウスキーピング遺伝子、すなわち、Ｇ６ＰＤ（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００４０２（配列番号１１１）；Ｇ６ＰＤ＿アンプリコン（配列番号１１４））、ＲＰＬ１９（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００９８１（配列番号１１９）；ＲＰＬ１９＿アンプリコン（配列番号１２２））、ＰＢＧＤ（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＢＣ０１９３２３（配列番号１１５）；ＰＢＧＤ＿アンプリコン（配列番号１１８））、およびＳＤＨＡ（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００４１６８（配列番号１０３）；ＳＤＨＡ＿アンプリコン（配列番号１０６））の発現量をそれぞれ同様にして並行測定した。「材料および方法」セクションの正規化方法２に記載したように、各ＲＴ試料について、これらのハウスキーピング遺伝子の発現量から算出した正規化係数を用いて、上記アンプリコンの発現量を正規化した。次いで、各ＲＴ試料の正規化された発現量を、正常試料（上記表１の試料番号４３、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５４、５６、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６６、６７、６８および６９）の発現量の中央値で除することによって、各試料の差次的発現を正常試料の中央値に対する倍率として得た。

【０６７８】

実施した２つの実験において、正常試料に対して差次的な発現はがん試料において観察されなかった（図２１）。

【０６７９】

プライマー対も本発明の範囲内に包含されてもよく、本発明の範囲内に包含されることが好ましい。たとえば、上記の実験では、ＴＭＥＭ２５＿ｓｅｇ２１Ｆ＿２００－３４４（配列番号１２４）フォワードプライマーとＴＭＥＭ２５＿ｓｅｇ２７Ｒ＿２００－３４６（配列番号１２５）リバースプライマーとからなるプライマー対を使用したが、これらは適切なプライマー対を説明することのみを目的とした例示であり、プライマー対はこれらに限定されない。

【０６８０】

本発明は、任意の適切なプライマー対を使用することにより得られた任意のアンプリコンも包含することが好ましい。たとえば、上記の実験では、ＴＭＥＭ２５＿ｓｅｇ＿２１－２７＿２００－３４４／３４６＿アンプリコン（配列番号１２３）で示されるアンプリコンが得られたが、これは適切なアンプリコンを説明することのみを目的とした例示であり、アンプリコンはこれに限定されない。

【０６８１】

実施例１６

配列ＴＭＥＭ２５＿ＳＥＧ２１－２７に示したアンプリコンによって検出可能なＴＭＥＭ２５転写産物の種々の正常組織における発現量

ｓｅｇ２１－２７－ＴＭＥＭ２５＿ｓｅｇ＿２１－２７＿２００－３４４／３４６＿アンプリコン（配列番号１２３）、ならびにＴＭＥＭ２５＿ｓｅｇ２１Ｆ＿２００－３４４プライマー（配列番号１２４）およびＴＭＥＭ２５＿ｓｅｇ２７Ｒ＿２００－３４６プライマー（配列番号１２５）に従って、またはこれらを使用して検出可能なＴＭＥＭ２５転写産物の発現をリアルタイムＰＣＲで測定した。いくつかのハウスキーピング遺伝子、すなわち、ＳＤＨＡ（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００４１６８（配列番号１０３）；ＳＤＨＡ＿アンプリコン（配列番号１０６））、Ｇ６ＰＤ（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００４０２（配列番号１１１）；Ｇ６ＰＤ＿アンプリコン（配列番号１１４））、

およびＨＰＲＴ１（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００１９４（配列番号１０７）；ＨＰＲＴ１＿アンプリコン（配列番号１１０））の発現量をそれぞれ同様にして並行測定した。「材料および方法」セクションの正規化方法２に記載したように、各ＲＴ試料について、これらのハウスキーピング遺伝子の発現量から算出した正規化係数を用いて、上記アンプリコンの発現量を正規化した。次いで、各ＲＴ試料の正規化された発現量を、乳房試料（上記表２の試料番号３０、３１、３２および３３）の中央値で除することによって、乳房試料における発現量の中央値に対する各試料の相対的発現量を得た（図２２）。

【０６８２】

実施例１７

ＴＭＥＭ２５タンパク質のクローニング

ＦＬＡＧタグに融合させたＴＭＥＭ２５＿Ｔ０＿Ｐ５　ＯＲＦのクローニング

ＦＬＡＧ（配列番号１５３）に融合させた、ＴＭＥＭ２５＿Ｔ０＿Ｐ５のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）（配列番号１３０）のクローニングを以下のようにしてＲＴ－ＰＣＲにより行った。

【０６８３】

非希釈結腸がんプールＤＮＡ１μｌをＰＣＲ反応のテンプレートとして使用した。ＰＣＲを、ＫＡＰＡ　Ｈｉｆｉ　ＤＮＡポリメラーゼ（ＫＡＰＡＢＩＯＳＹＳＴＥＭ、カタログ番号：ＫＫ２１０１）を使用して以下の条件で実施した：上記のｃＤＮＡ１μｌ；全反応量５０μｌ中、２００－３７４＿ＴＭＥＭ２５＿ＮｈｅＩ＿Ｋｏｚａｋ＿ｓｅｇ５Ｆプライマー（配列番号１２７）および２００－３７５＿ＴＭＥＭ２５＿Ｆｌａｇ＿ＳＴＯＰ＿ＥｃｏＲＩ＿ｓｅｇ４３Ｒプライマー（配列番号１２８）をそれぞれ１μｌ（２５μＭ）；９５℃５分；９８℃２０秒→５５℃１５秒→７２℃１分を４０サイクル；次いで７２℃５分からなる反応プログラム；使用したプライマーは、遺伝子特異的配列、制限酵素部位、コザック配列およびＦＬＡＧタグを含む。

【０６８４】

ＰＣＲ産物２５μｌを１．５％アガロースゲルに載せ、臭化エチジウムで染色し、１×ＴＡＥ溶液中において１００Ｖで電気泳動し、ＵＶ光で可視化した。予想されるバンドサイズの検証後、上記テンプレートのＰＣＲ産物１μｌを再増幅のためのテンプレートとして使用した。ＫＡＰＡ　Ｈｉｆｉ　ＤＮＡポリメラーゼ（ＫＡＰＡＢＩＯＳＹＳＴＥＭ、カタログ番号：ＫＫ２１０１）を使用して上記と同一の条件下でＰＣＲを実施した。

【０６８５】

ＰＣＲ産物はＱＩＡｑｕｉｃｋ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　ｋｉｔ（キアゲン、カタログ番号：２８７０７）を使用してゲルから精製した。

【０６８６】

精製したＰＣＲ産物を、制限酵素ＮｈｅＩおよびＥｃｏＲＩ（ニュー・イングランド・バイオラボ（米国マサチューセッツ州ベヴァリー）で消化した。次いで、上記の制限酵素であらかじめ消化したｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３（ｐＲｐ）ベクター（クロンテック、カタログ番号：６３１６１９）に、消化したＤＮＡをＴ４ＤＮＡリガーゼ（プロメガ、カタログ番号：Ｍ１８０１）を使用してライゲートした。メーカーの説明書に従って、コンピテントＥ．Ｃｏｌｉ細菌ＤＨ５α（ＲＢＣ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（台湾国台北）、カタログ番号：ＲＨ８１６）を得られたＤＮＡにより形質転換し、次いで、組換えプラスミドを選択するためのＬＢ－アンピシリン寒天平板上に播種し、３７℃で一晩インキュベートした。翌日、ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３ベクターに特異的なプライマーおよび遺伝子に特異的なプライマー（データは示さず）を使用したＰＣＲにより、陽性のコロニーをスクリーニングした。ＰＣＲ産物を上述の２％アガロースゲルを使用して分析した。予想されるバンドサイズの検証後、１００μｇ／ｍｌアンピシリンを添加した５ｍｌのＴｅｒｒｉｆｉｃ　Ｂｒｏｔｈ中で、陽性のコロニーを３７℃で一晩、振盪しながら増殖させた。Ｑｉａｐｒｅｐ（登録商標）　Ｓｐｉｎ　Ｍｉｎｉｐｒｅｐ　ｋｉｔ（キアゲン、カタログ番号：２７１０６）を使用して、プラスミドＤＮＡを細菌培養物から単離した。クローニングの正確性は、インサート（Ｈｙｌａｂｓ（イスラエル国レホボト））の配列を決定することによ

り検証した。エラーのないコロニー（すなわち、ＯＲＦ内に変異がない）の検証後、組換えプラスミドをさらなる分析に供した。

【０６８７】

タグを付加していないＴＭＥＭ２５＿Ｔ０＿Ｐ５　ＯＲＦのクローニング

タグを付加していないＴＭＥＭ２５＿Ｔ０＿Ｐ５のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）（配列番号１３０）のクローニングを以下のようにしてＲＴ－ＰＣＲにより行った。

【０６８８】

非希釈結腸がんプールＤＮＡ１μｌをＰＣＲ反応のテンプレートとして使用した。ＰＣＲを、ＫＡＰＡ　Ｈｉｆｉ　ＤＮＡポリメラーゼ（ＫＡＰＡＢＩＯＳＹＳＴＥＭ、カタログ番号：ＫＫ２１０１）を使用して以下の条件で実施した：上記のｃＤＮＡ１μｌ；全反応量５０μｌ中、２００－３７４＿ＴＭＥＭ２５＿ＮｈｅＩ＿Ｋｏｚａｋ＿ｓｅｇ５Ｆプライマー（配列番号１２７）および２００－３７７＿ＴＭＥＭ２５＿ＳＴＯＰ＿ＥｃｏＲＩ＿ｓｅｇ４３Ｒプライマー（配列番号１３１）をそれぞれ１μｌ（２５μＭ）；９５℃５分；９８℃２０秒→５５℃１５秒→７２℃１分を４０サイクル；次いで７２℃５分からなる反応プログラム；使用したプライマーは、遺伝子特異的配列、制限酵素部位、およびコザック配列を含む。

【０６８９】

ＰＣＲ産物２５μｌを１．５％アガロースゲルに載せ、臭化エチジウムで染色し、１×ＴＡＥ溶液中において１００Ｖで電気泳動し、ＵＶ光で可視化した。予想されるバンドサイズの検証後、上記テンプレートのＰＣＲ産物５μｌを再増幅のためのテンプレートとして使用した。ＫＡＰＡ　Ｈｉｆｉ　ＤＮＡポリメラーゼ（ＫＡＰＡＢＩＯＳＹＳＴＥＭ、カタログ番号：ＫＫ２１０１）を使用して上記と同一の条件下でＰＣＲを実施した。

【０６９０】

ＰＣＲ産物はＱＩＡｑｕｉｃｋ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　ｋｉｔ（キアゲン、カタログ番号：２８７０７）を使用してゲルから精製した。

【０６９１】

精製したＰＣＲ産物を、制限酵素ＮｈｅＩおよびＥｃｏＲＩ（ニュー・イングランド・バイオラボ（米国マサチューセッツ州ベヴァリー）で消化した。次いで、上記の制限酵素であらかじめ消化したｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３（ｐＲｐ）ベクター（クロンテック、カタログ番号：６３１６１９）に、Ｔ４ＤＮＡリガーゼ（プロメガ、カタログ番号：Ｍ１８０１）を使用して消化したＤＮＡをライゲートした。メーカーの説明書に従って、コンピテントＥ．Ｃｏｌｉ細菌ＤＨ５α（ＲＢＣ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（台湾国台北）、カタログ番号：ＲＨ８１６）を得られたＤＮＡにより形質転換し、次いで、組換えプラスミドを選択するためのＬＢ－アンピシリン寒天平板上に播種し、３７℃で一晩インキュベートした。翌日、ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３ベクターに特異的なプライマーおよび遺伝子に特異的なプライマー（データは示さず）を使用したＰＣＲにより、陽性のコロニーをスクリーニングした。ＰＣＲ産物を上述の２％アガロースゲルを使用して分析した。予想されるバンドサイズの検証後、１００μｇ／ｍｌアンピシリンを添加した５ｍｌのＴｅｒｒｉｆｉｃ　Ｂｒｏｔｈ中で、陽性のコロニーを３７℃で一晩、振盪しながら増殖させた。Ｑｉａｐｒｅｐ　Ｓｐｉｎ　Ｍｉｎｉｐｒｅｐ　ｋｉｔ（キアゲン、カタログ番号：２７１０６）を使用して、プラスミドＤＮＡを細菌培養物から単離した。クローニングの正確性は、インサート（Ｈｙｌａｂｓ（イスラエル国レホボト））の配列を決定することにより検証した。エラーのないコロニー（すなわち、ＯＲＦ内に変異がない）の検証後、組換えプラスミドをさらなる分析に供した。

【０６９２】

実施例１８

ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５およびＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿ＦＬＡＧタンパク質を発現する安定なプールの作製

ＴＭＥＭ２５＿Ｔ０＿Ｐ５（配列番号１３０）ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３構築物およびＴＭ

ＥＭ２５＿Ｔ０＿Ｐ５＿ＦＬＡＧ（配列番号１２６）ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３構築物、またはｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３空ベクターを、以下のようにしてＨＥＫ２９３Ｔ細胞に安定にトランスフェクトさせた。

【０６９３】

ＨＥＫ２９３Ｔ（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ－１１２６８）細胞を、あらかじめ温めておいた完全培地２ｍｌを使用して、組織培養に適した滅菌６ウェルプレートに播種した。この完全培地の組成は、ＤＭＥＭ［ダルベッコの改変イーグル培地（バイオロジカルインダストリーズ（イスラエル国Ｂｅｉｔ　Ｈａ’Ｅｍｅｋ）、カタログ番号：０１－０５５－１Ａ）］＋１０％ＦＢＳ［ウシ胎仔血清（バイオロジカルインダストリーズ（イスラエル国Ｂｅｉｔ　Ｈａ’Ｅｍｅｋ）、カタログ番号：０４－００１－１Ａ）］＋４ｍＭ　Ｌ－グルタミン（バイオロジカルインダストリーズ（イスラエル国Ｂｅｉｔ　Ｈａ’Ｅｍｅｋ）、カタログ番号：０３－０２０－１Ａ）であった。１ウェルあたり３５０，０００個の細胞を播種し、９４μｌのＤＭＥＭで希釈したＦｕＧＥＮＥ６試薬（ロシュ、カタログ番号：１１－８１４－４４３－００１）６μｌを使用してＤＮＡ構築物２μｇをトランスフェクトした。この複合混合物は、室温で１５分間インキュベートしてから細胞に滴下し、回転撹拌した。５％CO_2を含み３７℃に保持されたインキュベーターに細胞をセットした。トランスフェクションの４８時間後、選択培地（５μｇ／ｍｌピューロマイシン（シグマ、カタログ番号：Ｐ８８３３）を添加した完全培地）１５ｍｌを含む７５cm^2の組織培養フラスコにトランスフェクトした細胞を移した。細胞をインキュベーターにセットし、クローン形成が観察されるまで培地を３～４日ごとに交換した。

【０６９４】

十分量の細胞を選択した後、３～５００万個の細胞を採取した。プロテアーゼ阻害剤（ロシュ、カタログ番号：１１８７３５８０００１）を添加したＲＩＰＡバッファー（５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ８、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１％ＮＰ－４０、０．５％デオキシコール酸ナトリウム、０．１％ＳＤＳ）３００μｌ中において４℃で２０分間かけて細胞を溶解した。１４，０００×ｒｐｍ、４℃で１０分間遠心分離した後、透明な上清を清潔な試験管に移し、溶解物３０μｇを１，４－ジチオトレイトール（ＤＴＴ；還元剤）と混合して最終濃度を１００ｍＭとし、ウェスタンブロット法に使用した。

【０６９５】

次いで、試料を１００℃で１０分間インキュベートし、１４，０００×ｒｐｍで１分間遠心分離した。メーカーの説明書に従い、４～１２％ＮｕＰＡＧＥ（登録商標）Ｂｉｓ－Ｔｒｉｓゲル（インビトロジェン、カタログ番号：ＮＰ０３２１）の１レーンあたり試料３０μｌを載せ、ＸＣｅｌｌ　ＳｕｒｅＬｏｃｋ（登録商標）Ｍｉｎｉ－Ｃｅｌｌ（インビトロジェン、カタログ番号：Ｅ１０００１）を使用して、１×ＭＥＳ　ＳＤＳランニングバッファー（インビトロジェン、カタログ番号：ＮＰ０００６０）中でゲルを泳動させて、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（Laemmli, U.K., Nature 1970; 227; 680-685)を実施した。メーカーの説明書に従い、ＸＣｅｌｌ（登録商標）IIブロッティング装置（インビトロジェン、カタログ番号：Ｅ１９０５１）を使用して、分離したタンパク質をニトロセルロース膜（Ｓｃｈｌｅｉｃｈｅｒ＆Ｓｃｈｕｅｌｌ、カタログ番号：４０１３８５）に転写した。

【０６９６】

ブロットしたタンパク質を含む膜を以下のように処理して抗体を検出した。

【０６９７】

０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０（ＰＢＳＴ）を添加したリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で希釈した５％スキムミルク中において室温で１時間インキュベーションすることによって、上記の膜の非特異的領域をブロックした（これ以降のインキュベーションはすべて室温、１時間の条件で行った）。次いで、ブロッキング溶液を、５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）（シグマ、カタログ番号：Ａ４５０３）（ＰＢＳで希釈）で１：５００に希釈したウサギ抗ＴＭＥＭ２５一次抗体（カタログ番号：ＨＰＡ０１２１６３、シグマ）に交換した。１時間インキュベーションを行った後、５分間の洗浄を３回行い、二次抗体（ブロッキング溶液で１：２０，０００に希釈した、ペルオキシダーゼ結合Ａｆｆｉｐｕｒｅヤ

ギ抗ウサギＩｇＧ（Ｊａｃｋｓｏｎ、カタログ番号：１１１－０３５－００３）に結合させたヤギ抗ウサギ）を添加した。ブロッキング溶液で１：１０００に希釈したマウス抗Ｆｌａｇ　Ｍ２ペルオキシダーゼ（シグマ、カタログ番号：Ａ８５９２）を用いて、タンパク質も検出した。１時間インキュベーションを行った後、５分間の洗浄を３回行い、ＥＣＬ基質（ＰＩＥＲＣＥ、カタログ番号：ＰＩＲ－３４０８０）を１分間適用し、次いで、Ｘ線フィルム（富士、カタログ番号：１００ＮＩＦ）に露光させた。結果を図２３に示す。

【０６９８】

図２３Ａは、上記のウサギ抗ＴＭＥＭ２５によって、ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５タンパク質（配列番号７）およびＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇ（配列番号１２９）が予想バンドサイズ～４０．２ｋＤａにおいて特異的に認識されたが、ＨＥＫ＿２９３Ｔ＿ｐＲｐ３は認識されなかったことを示す。

【０６９９】

図２３Ｂは、抗Ｆｌａｇによって、ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇタンパク質（配列番号１２９）が予想バンドサイズ～４０．２ｋＤａにおいて特異的に認識されたことを示す。

【０７００】

実施例１９

ＨＥＫ２９３Ｔ細胞における異所性ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５およびＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿ＦＬＡＧの細胞内局在の免疫蛍光法による決定

ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５（配列番号７）およびＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿ＦＬＡＧ（配列番号１２９）を上述のように安定にトランスフェクトさせた後、共焦点顕微鏡法を使用してこれらのタンパク質の局在を観察した。

【０７０１】

ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５（配列番号７）およびＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿ＦＬＡＧ（配列番号１２９）を発現した、安定にトランスフェクトされた組換えＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、ポリ－Ｌ－リシン（シグマ；カタログ番号：Ｐ４８３２）であらかじめコーティングしたカバースリップに載せた。２４時間後、細胞に免疫染色を施し、共焦点顕微鏡法で分析した。

【０７０２】

カバースリップをリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中で洗浄し、次いで、３．７％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）（シグマ、カタログ番号：Ｐ－６１４８）／３％グルコース（シグマ、カタログ番号：Ｇ５７６７）（ＰＢＳで希釈）溶液で１５分間固定した。３ｍＭグリシン（シグマ、カタログ番号：Ｇ７１２６）（ＰＢＳで希釈）中で５分間インキュベートすることによって、ＰＦＡをクエンチした。ＰＢＳ中での５分間の洗浄を２回行った後、５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）（シグマ、カタログ番号：Ａ４５０３）（ＰＢＳで希釈）で非特異的領域のブロッキングを２０分間行った。

【０７０３】

次いで、ＰＢＳ中５％ＢＳＡで１：２００に希釈したマウス抗ＦＬＡＧ－Ｃｙ３抗体（シグマ、カタログ番号：Ａ９５９４）とともに、またはＰＢＳ中５％ＢＳＡで１：５０に希釈したウサギ抗ＴＭＥＭ２５（カタログ番号：ＨＰＡ０１２１６３、シグマ）とともに、カバースリップを湿潤箱中で１時間インキュベートし、ＰＢＳ中での５分間の洗浄を３回行った。抗ＴＭＥＭ２５抗体に対してのみ二次抗体（ＰＢＳ中５％ＢＳＡで１：２００に希釈したロバ抗ウサギｃｙ３（カタログ番号：７１１－１６５－１５２、Ｊａｃｋｓｏｎ））を使用し、湿潤箱中で１時間インキュベートし、ＰＢＳ中での５分間の洗浄を３回行った。ビスベンズイミドＨ　３３２５８（ＨＢＳＳ）（シグマ、カタログ番号：１４５３０）で前洗浄した後、ＨＢＳＳで１：２００に希釈したＷＧＡ－Ａｌｅｘａ　４８８（インビトロジェン、カタログ番号：Ｗ１１２６１）とともにカバースリップを１０分間インキュベートし、ＨＢＳＳで２回洗浄し、ＨＢＳＳで１：１０００に希釈したビスベンズイミドＨ　３３２５８（シグマ、カタログ番号：１４５３０）中でインキュベートした。次いで、Ｇｅｌ　Ｍｏｕｎｔ　Ａｑｕｅｏｕｓ　ｍｅｄｉｕｍ（シグマ、カタログ番号：

Ｇ０９１８）を用いてカバースリップをスライドに載せ、共焦点顕微鏡法を使用して細胞中の蛍光生成物の存在を観察した。

【０７０４】

抗ＴＭＥＭ２５抗体を使用することにより示された、ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５（配列番号１３２）およびＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇ（配列番号１２９）の細胞内局在を図２４Ａおよび図２４Ｂにそれぞれ示す。図２４Ｃは、抗ＦＬＡＧ抗体（シグマ、カタログ番号：Ａ９５９４）を使用することにより示された、ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇ（配列番号１２９）の局在を示す。ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５タンパク質は細胞表面に局在する。

【０７０５】

実施例２０

ＦＡＣＳによるＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿ＦＬＡＧの細胞局在の決定

上述のようにＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇタンパク質（配列番号１２９）を安定にトランスフェクトさせた後、抗ＴＭＥＭ２５抗体（Ａｂ１６２８、Ｙｏｍｉｃｓ）およびネガティブコントロールとしての正常マウス血清（０１５－０００－１２０、Ｊａｃｋｓｏｎ）を使用したフローサイトメトリー分析によって、ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇタンパク質の膜局在を観察した。ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇを発現している組換えＨＥＫ２９３Ｔ細胞を抗ＴＭＥＭ２５抗体（Ａ）または正常マウス血清（Ｂ）、次いで、二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ、７１５－５０６－１５０）に結合させたロバ抗マウスＤｙＬｉｇｈｔ５４９で染色し、蛍光シグナルの存在を観察した。

【０７０６】

Ｃｅｌｌ ｄｉｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ｂｕｆｆｅｒ Ｅｎｚｙｍｅ－Ｆｒｅｅ ＰＢＳ－Ｂａｓｅｄ（Ｇｉｂｃｏ；１３１５１－０１４）を使用して、組換えＨＥＫ２９３Ｔ－ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇ細胞をプレートから剥離し、ＦＡＣＳバッファー［ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）（バイオロジカルインダストリーズ、０２－０２３－１Ａ）／１％ウシアルブミン（シグマ、Ａ７０３０）］で洗浄し、細胞数をカウントした。１：２２５０に希釈した抗体溶液１００μｌ中に０．５×10^6個の細胞を再懸濁し、氷上で１時間インキュベートした。細胞を氷冷ＦＡＣＳバッファーで洗浄し、本明細書に記載の二次抗体とともに氷上で１時間インキュベートした。細胞を氷冷ＦＡＣＳバッファーで洗浄し、ＦＡＣＳバッファー５００μｌ中に再懸濁し、次いで、ＦＡＣＳ装置（ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ、ＢＤ）で分析した。Ｃｅｌｌｑｕｅｓｔ Ｐｒｏ ＶＥＲ．５．２を使用してデータを得、分析した。

【０７０７】

図２５に示した結果は、ネガティブコントロールとして使用したマウス血清（Ｂ）と比較して、抗ＴＭＥＭ２５抗体（Ａ）が、ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇタンパク質を発現している組換えＨＥＫ２９３Ｔ細胞中の完全長ＴＭＥＭ２５タンパク質により多く結合していることを示しており、これによって、ＴＭＥＭ２５タンパク質が細胞膜に局在していることが分かる。

【０７０８】

実施例２１

様々な細胞株における内因性ＴＭＥＭ２５タンパク質の発現の分析

様々な細胞株における内因性ＴＭＥＭ２５タンパク質の発現を以下のようにしてウェスタンブロットによって分析した。

【０７０９】

ＪＵＲＫＡＴ（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＴＩＢ－１５２）、Ｄａｕｄｉ（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＣＬ－２１３）、ＲＰＭＩ８２２６（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＣＬ－１５５）、Ｇ－３６１（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＣＲＬ－１４２４）、およびＫＡＲＰＡＳ（ＡＴＣＣ Ｎｏ．ＶＲ－７０２）の細胞抽出液を上述のように調製した（図２６のレーン３～７：対応するレーン／材料の割り当てについては図中の凡例を参照されたい）。

【０７１０】

全細胞溶解物を上述のように調製しウェスタンブロットによって分析した。同量のタン

パク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析し、上述のニトロセルロース膜に転写した。
【０７１１】
０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０（ＰＢＳＴ）を添加したリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で希釈した５％スキムミルクを用いて、室温で１時間インキュベーションすることにより上記の膜をブロックした（これ以降のインキュベーションはすべて室温、１時間の条件で行った）。次いで、ブロッキング溶液を、５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）（シグマ、カタログ番号：Ａ４５０３）（ＰＢＳで希釈）で１：５００に希釈したウサギ抗ＴＭＥＭ２５一次抗体（カタログ番号：ＨＰＡ０１２１６３、シグマ）に交換した。１時間インキュベーションを行った後、５分間の洗浄を３回行い、二次抗体（ブロッキング溶液で１：２０，０００に希釈した、ペルオキシダーゼ結合Ａｆｆｉｐｕｒｅヤギ抗ウサギＩｇＧ（Ｊａｃｋｓｏｎ、カタログ番号：１１１－０３５－００３）に結合させたヤギ抗ウサギ）を添加した。ブロッキング溶液で１：１０００に希釈したマウス抗Ｆｌａｇ　Ｍ２ペルオキシダーゼ（シグマ、カタログ番号：Ａ８５９２）を用いて、タンパク質も検出した。１時間インキュベーションを行った後、５分間の洗浄を３回行い、ＥＣＬ基質（ＰＩＥＲＣＥ、カタログ番号：ＰＩＲ－３４０８０）を１分間適用し、次いで、Ｘ線フィルム（富士、カタログ番号：１００ＮＩＦ）に露光させた。
【０７１２】
図２６は、様々な細胞株におけるＴＭＥＭ２５の内因性発現を示す。ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇを発現しているＨＥＫ２９３Ｔ細胞（レーン２）において観察される、ＴＭＥＭ２５に相当する４０．２ｋＤａのタンパク質は、抗ＴＭＥＭ２５抗体によって、ＲＰＭＩ８２２６（レーン５）、Ｄａｕｄｉ（レーン６）およびＪＵＲＫＡＴ（レーン７）の抽出液中に検出された（レーン１はＦｌａｇを含まないコントロールを示す）。
【０７１３】
実施例２２
安定したＨＥＫ２９３Ｔ＿ＴＭＥＭ２５へのＴＭＥＭ２５　ｓｉＲＮＡのトランスフェクション
上記のＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇ（配列番号１２９）を安定して発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞にＴＭＥＭ２５＿Ｐ５－ＳｉＲＮＡをトランスフェクトすることによって、ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇタンパク質（配列番号１２９）の発現の特異的ノックダウンを観察した。
【０７１４】
ｓｉＲＮＡは、ＴＭＥＭ２５（Ｌ－０１８１８３－００－０００５、Ｄｈａｒｍａｃｏｎ、ＯＮ　ＴＡＲＧＥＴ　ｐｌｕｓ　ＳＭＡＲＴ　ｐｏｏｌ、ヒトＴＭＥＭ２５（８４８６６）、５ｎｍｏｌ）およびネガティブコントロールとしてのスクランブルｓｉＲＮＡ（Ｄｈａｒｍａｃｏｎ、Ｄ－００１８１０－１０－０５）をＤｈａｒｍａｃｏｎから購入した。
【０７１５】
トランスフェクションの２４時間前に、細胞を５０～７０％コンフルエントまで平板培養した。ｓｉＲＮＡ複合体２５０ｐｍｏｌを、ｒｅｄｕｃｅｄ　ｓｅｒｕｍ　Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（カタログ番号：３１９８５、ＧＩＢＣＯ）２５０μｌに添加した。これと並行して、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００試薬（カタログ番号：１１６６８０１９、インビトロジェン）を混合し、そのうちの５μｌをｒｅｄｕｃｅｄ　ｓｅｒｕｍ　Ｏｐｔｉ－ＭＥＭ（カタログ番号：３１９８５、ＧＩＢＣＯ）２５０μｌに添加した。各試験管の内容物を合わせ、ＲＴで１５～３０分間インキュベートすることによって十分量の複合体を形成させ、次いで、この材料を上記の細胞上に拡散させ、４８時間インキュベートした。細胞を採取し、細胞溶解物を上述のように調製し、抗ＴＭＥＭ２５抗体（カタログ番号：ＨＰＡ０１２１６３、シグマ）、次いでペルオキシダーゼ結合ロバ抗ウサギ二次抗体で検出した。
【０７１６】
図２７は、スクランブルｓｉＲＮＡ（Ｄｈａｒｍａｃｏｎ、Ｄ－００１８１０－１０－

０５）をトランスフェクトさせた、ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿ＦＬＡＧを安定して発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞（レーン１）との比較を抗ＴＭＥＭ２５抗体（シグマ、カタログ番号：ＨＰＡ０１２１６３）を使用して行ったところ、ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５　ｓｉＲＮＡ（Ｌ－０１８１８３－００－０００５、Ｄｈａｒｍａｃｏｎ）をトランスフェクトさせた、ＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇ（配列番号１２９）を安定して発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞（レーン２）においてＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇタンパク質（配列番号１２９）の特異的ノックダウンが見られたことを示す。

【０７１７】

実施例２３

抗ＬＳＲポリクローナル抗体および抗ＴＭＥＭ２５ポリクローナル抗体を使用した免疫組織化学（ＩＨＣ）

抗ＬＳＲ（アブカム、カタログ番号：ａｂ５９６４６）および抗ＴＭＥＭ２５抗体（カタログ番号：ＨＰＡ０１２１６３、シグマ）を表１０に詳述する腫瘍組織マイクロアレイ（ＴＭＡ）パネルに適用して、組織結合プロファイルを評価した。

【０７１８】

ＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿Ｆｌａｇ＿ｍ（配列番号１４４）またはＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇ（配列番号１２９）を発現するＨＥＫ２９３細胞を、染色用ポリクローナル抗体のキャリブレーションのためのポジティブコントロールとして使用した。空ベクターをトランスフェクトしたＨＥＫ２９３Ｔ細胞およびウサギ血清ＩｇＧ抗体をネガティブコントロールとして使用した。

【０７１９】

抗ＬＳＲ抗体および抗ＴＭＥＭ２５抗体によるＬＳＲ＿Ｐ５ａ＿Ｆｌａｇ＿ｍ（配列番号１４４）またはＴＭＥＭ２５＿Ｐ５＿Ｆｌａｇ（配列番号１２９）の免疫組織化学的検出は、ホルマリンで固定しパラフィンで包埋した（ＦＦＰＥ）切片でキャリブレーションを行った。３種の抗体濃度（３μｇ／ｍｌ、１μｇ／ｍｌ、０．３μｇ／ｍｌ）をｐＨ６．１およびｐＨ９．０における２つの抗原賦活法で試験した。

【０７２０】

抗原賦活法は以下のように実施した。上記のＦＦＰＥ切片を脱パラフィンし、ｐＨ６．１またはｐＨ９．０のＦｌｅｘ＋３－ｉｎ－１抗原賦活バッファーおよびＰＴ　Ｌｉｎｋ自動抗原賦活システムを使用して、自動的に加温および冷却しながら９５℃で２０分間かけて抗原賦活および親水化を行った。

【０７２１】

抗原賦活後、蒸留水中における切片の洗浄を５分間で２回行い、次いで、ＤＡＫＯ　Ａｕｔｏｓｔａｉｎｅｒ　Ｐｌｕｓにセットした。次いで、切片をＦｌｅｘ＋Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ　Ｂｌｏｃｋｉｎｇ試薬とともに１０分間インキュベートし、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０、ｐＨ７．６（ＴＢＳＴ）中で２回リンスし、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｂｌｏｃｋ試薬（ＤＡＫＯ、Ｘ０９０９）とともに１０分間インキュベートした。

【０７２２】

ＤＡＫＯ　Ｅｎｖｉｓｉｏｎ　Ｆｌｅｘ抗体希釈液（ＤＡＫＯ　Ｃｙｔｏｍａｔｉｏｎ、カタログ番号：Ｋ８００６）で希釈した一次抗体とともに、切片を３０分間インキュベートした。一次抗体とともにインキュベーションした後、次いで切片をＦＬＥＸバッファー中で２回リンスし、抗マウス／ウサギＦｌｅｘ＋ＨＲＰとともに２０分間インキュベートし、ＦＬＥＸバッファー中で２回リンスし、次いでジアミノベンジジン（ＤＡＢ）基質とともに１０分間インキュベートした。蒸留水でスライドをリンスすることにより発色反応を止めた。

【０７２３】

発色後、ヘマトキシリンで切片を対比染色し、エタノールの上昇系列（９０→９９→１００％）中で脱水し、キシレンを３回変えて透徹し、ＤｅＰｅＸを用いてカバーグラスをかけた。ライカＤＦＣ２９０カメラを備えたオリンパスＢＸ５１顕微鏡を使用して、染色

した切片を分析した。

【０７２４】

図２８は、ｐＨ９のネガティブコントロール細胞株（パネルＢ、ＤおよびＦ）との比較を上述した抗原賦活法により行ったところ、ポジティブコントロール細胞株（パネルＡ、ＣおよびＥ）の切片中の抗ＬＳＲ抗体（カタログ番号：ａｂ５９６４６、アブカム）が、３μｇ／ｍｌ、１μｇ／ｍｌおよび０．３μｇ／ｍｌのそれぞれの抗体濃度において特異的免疫反応性を示したことを示す。

【０７２５】

図２９は、ｐＨ９のネガティブコントロール細胞株（パネルＢ、ＤおよびＦ）との比較を上述した抗原賦活法により行うと、ポジティブコントロール細胞株（パネルＡ、ＣおよびＥ）の切片中の抗ＴＭＥＭ２５（カタログ番号：ＨＰＡ０１２１６３、シグマ）が、３μｇ／ｍｌ、１μｇ／ｍｌおよび０．３μｇ／ｍｌのそれぞれの抗体濃度において特異的免疫反応性を示すことを示す。

【０７２６】

【表２６】
表１０：組織マイクロアレイ（ＴＭＡ）に含まれる組織標本の要約

TMA マップ ID	(X,Y) ポジション	ドナー ID	組織	病理報告	年齢	性別
1	(1,1)	15766	腫瘍：乳房：小葉癌	浸潤性小葉癌 グレード 2/3	42	女
2	(2,1)	5252	腫瘍：乳房：乳管腺癌	浸潤性乳管癌の標本を含むスライド (modified Bloom & Richardson グレード III) 乳房－浸潤性乳管癌	57	女
3	(3,1)	8723	腫瘍：乳房：乳管腺癌	原発性乳癌(浸潤性乳管パターン)	74	女
4	(4,1)	15778	腫瘍：乳房：小葉癌	わずかに秩序性が損なわれた(discohesive な)低分化型癌腫の浸潤を有する、真皮および皮下組織を含む皮膚切片；それぞれの細胞の核はやや多形性を示す；多形型小葉癌(pleomorphic lobular carcinoma)と矛盾しない外観	52	女
5	(5,1)	3724	腫瘍：乳房：乳管腺癌	浸潤性乳管癌	82	女
6	(6,1)	2953	腫瘍：乳房：乳管腺癌	DCIS(乳管内癌)および広範な浸潤性低分化型腺癌を含む乳房組織からなる標本	67	女
7	(7,1)	9533	腫瘍：乳房：乳管腺癌	低分化型腺管癌の浸潤を有する乳房組織を含むスライド 乳房腫瘍－腺管癌	50	女
8	(8,1)	3346	腫瘍：乳房：乳管腺癌	低分化型乳管腺癌の広範な浸潤を有する結合組織要素からなる標本	63	女
9	(9,1)	5704	乳房	正常乳房組織の良好な標本を含む切片	46	女
10	(10,1)	5347	乳房	正常乳房	64	女
11	(11,1)	3550	腫瘍：結腸：腺癌	結腸由来腺癌と矛盾しない中等度によく分化した(moderately well differentiated)腺癌の広範な浸潤を有する大腸	61	男
12	(12,1)	3269	腫瘍：結腸：腺癌	原発性結腸癌パターンを示す腺癌 (中分化型)	58	男
13	(1,2)	15767	腫瘍：結腸：腺癌	中分化型腺癌	58	女
14	(2,2)	3751	腫瘍：結腸：腺癌	中分化型腺癌	79	女
15	(3,2)	3881	腫瘍：結腸：腺癌	中分化型腺癌	71	男
16	(4,2)	2889	腫瘍：結腸：腺癌	中等度によく分化した原発性腺癌に関連した潰瘍を表層に有する大腸からなる標本	73	女
17	(5,2)	15764	腫瘍：結腸：腺癌	中分化型腺癌	75	女
18	(6,2)	15763	腫瘍：結腸：腺癌	中分化型腺癌	69	女
19	(7,2)	2681	結腸	正常結腸：全層	54	女
20	(8,2)	3121	結腸	正常全層結腸 結腸－正常	34	男

【表２７】

21	(9,2)	5638	腫瘍：前立腺	前立腺腫瘍－前立腺由来腺癌と矛盾しない所見 グリーソンスコア 5+5=10	87	男
22	(10,2)	15295	腫瘍：前立腺：腺癌	腺癌　グリーソンスコア 3+3=6	71	男
23	(11,2)	15301	腫瘍：前立腺：腺癌	腺癌　グリーソンスコア 3+4=7	51	男
24	(12,2)	15758	腫瘍：前立腺：腺癌	腺癌　グリーソンスコア 3+4=7	74	男
25	(1,3)	15745	腫瘍：前立腺：腺癌	腺癌　グリーソンスコア 4+5=9	52	男
26	(2,3)	15777	腫瘍：前立腺：腺癌	腺癌　グリーソンスコア 4+4=8	68	男
27	(3,3)	15755	腫瘍：前立腺：腺癌	腺癌　グリーソンスコア 3+4=7	55	男
28	(4,3)	15756	腫瘍：前立腺：腺癌	腺癌　グリーソンスコア 4+5=9	68	男
29	(5,3)	1317	前立腺	正常前立腺	55	男
30	(6,3)	13951	前立腺	正常前立腺	37	男
31	(7,3)	15052	リンパ腫	大細胞型リンパ腫の浸潤を有するリンパ節	45	女
32	(8,3)	15760	リンパ腫	低悪性度非ホジキンリンパ腫	72	女
33	(9,3)	15754	リンパ腫	高悪性度非ホジキンリンパ腫	77	男
34	(10,3)	15039	リンパ腫	分裂速度の速い、中型～大型のリンパ球の浸潤 高悪性度非ホジキンリンパ腫	47	男
35	(11,3)	15034	リンパ腫	非ホジキンリンパ腫と矛盾しない単調なリンパ系細胞のびまん性浸潤	71	男
36	(12,3)	15037	リンパ腫	非ホジキンリンパ腫と矛盾しない単調なリンパ系細胞のびまん性浸潤 切片の端部に甲状腺組織が見られる	53	女
37	(1,4)	15032	リンパ腫	非ホジキンリンパ腫と矛盾しない小型リンパ球のびまん性浸潤	50	女
38	(2,4)	15775	リンパ腫	ホジキンリンパ腫	75	女
39	(3,4)	4655	リンパ節	正常な境界を有するリンパ節	1	女
40	(4,4)	10789	リンパ節	正常リンパ節	58	男
41	(5,4)	12053	腫瘍：肺	扁平上皮に類似した特徴を有する低分化型非小細胞癌 非小細胞癌	72	男
42	(6,4)	15772	腫瘍：肺：非小細胞癌	低分化型非小細胞癌	44	男
43	(7,4)	13586	腫瘍：肺	低分化～中分化型扁平上皮癌	67	女
44	(8,4)	2760	腫瘍：肺：扁平上皮癌	正常気管支と、広範な血管内膜の線維化/組織化を示した動脈と推定される大血管と、中等度によく分化した角質化扁平上皮癌の広範な浸潤を有する肺実質とを含む標本	64	男
45	(9,4)	9354	腫瘍：肺：腺癌	肺胞腔に沿って増殖した腫瘍を含む肺組織の切片 腺癌の特徴を示す大細胞型の腫瘍	63	男
46	(10,4)	3473	腫瘍：肺：腺癌	肺腫瘍－他の臓器由来である可能性を除外すれば、肺原発性腺癌と矛盾しない低分化型腺癌と考えられる	72	男

【表２８】

47	(11,4)	5757	腫瘍：肺：腺癌	肺腫瘍－気管支肺胞パターンを示す腺癌	72	男
48	(12,4)	4852	腫瘍：肺：腺癌	肺腫瘍－顕著な気管支肺胞パターンを示す腺癌	56	女
49	(1,5)	10414	小細胞	低分化型小細胞癌を示す肺の切片 診断：肺小細胞癌	74	男
50	(2,5)	15055	小細胞	小細胞癌の浸潤を有する線維組織	52	男
51	(3,5)	15054	小細胞	小細胞癌の浸潤を有する肺の切片	65	男
52	(4,5)	15053	小細胞	小細胞癌の浸潤を有する肺の切片	52	男
53	(5,5)	1311	肺：実質	正常な境界を有する肺	36	女
54	(6,5)	14	肺：実質	正常な肺および気管支	39	女
55	(7,5)	5767	肺：実質	肺実質（胸膜面を含む）－正常な境界	45	男
56	(8,5)	2649	肺：実質	正常肺	37	男
57	(9,5)	3588	腫瘍：胃	低分化型粘液性癌腫を示す生検	69	女
58	(10,5)	5065	腫瘍：胃	よく分化した胃腺癌を示す切片	64	男
59	(11,5)	9275	腫瘍：胃	中分化型浸潤腺癌を示す胃洞の切片； 粘膜および粘膜下層の両方に癌腫が見られ、粘膜下層に癌腫が浸潤している 診断：胃癌	78	女
60	(12,5)	2295	胃	中分化型胃腺癌を示す切片	66	女
61	(1,6)	13665	胃：体部	胃体部と適合する正常胃の全層切片	57	女
62	(2,6)	2874	胃：体部	胃－正常な胃体部粘膜を有する全層胃壁	53	男
63	(3,6)	12998	腫瘍：卵巣	漿液性乳頭状嚢胞癌	78	女
64	(4,6)	13003	腫瘍：卵巣	浸潤性漿液性乳頭状癌	74	女
65	(5,6)	5739	腫瘍：卵巣	核溝を示す核を有する凝集した細胞群の浸潤を示す卵巣切片； 顆粒膜細胞腫と矛盾しない外観 卵巣：顆粒膜細胞腫	48	女
66	(6,6)	9407	腫瘍：卵巣	漿液性嚢胞腺癌として分類することが最も適当なパターンを示す、複数の小胞を有する卵巣腫瘍の壁の一部を含むスライド 卵巣腫瘍－漿液性嚢胞腺癌	75	女
67	(7,6)	4739	卵巣	濾胞状構造（原始卵胞および嚢性卵胞）および退縮黄体を示す正常卵巣組織	42	女
68	(8,6)	4781	卵巣	卵胞を有する正常卵巣皮質	34	女
69	(9,6)	15759	メラノーマ	悪性メラノーマ	65	男
70	(10,6)	15753	メラノーマ	高悪性度メラノーマ	46	女
71	(11,6)	15038	メラノーマ	悪性メラノーマの大型の皮膚沈着物を有する、潰瘍化した表層を有する皮膚切片	41	男
72	(12,6)	15343	メラノーマ	悪性メラノーマ	24	男
73	(1,7)	13779	皮膚	適切な方向に薄切された、皮下組織を含む正常皮膚の切片を含むスライド； 毛包と皮脂腺はわずかに見られ、汗腺は中程度に豊富である 乳房の皮膚－正常	44	女
74	(2,7)	13280	皮膚	真皮および表皮を含む正常皮膚	50	女
75	(3,7)	15342	腫瘍：脳： 多形膠芽腫	核多形性および巣状壊死を示すグリア細胞から構成された、非常に細胞の多い脳腫瘍の切片	56	男
76	(4,7)	9514	腫瘍：脳	星状細胞腫の浸潤を有する脳組織を示す切片；グレード２	17	男
77	(5,7)	3306	腫瘍：脳	紡錘細胞髄膜腫を示す切片	82	男

【表２９】

78	(6,7)	9516	腫瘍：脳	星状細胞腫の浸潤を有する脳組織を示す切片；グレード４	25	女
79	(7,7)	2007	脳：皮質：前頭	正常脳	40	男
80	(8,7)	4585	脳：皮質：前頭	目立たないニューロンを含む正常皮質灰白質を示す切片； 正常白質が灰白質で覆われている 正常脳皮質	85	男
81	(9,7)	3737	腫瘍：腎臓	原発性腎細胞腺癌の特徴を示す標本	54	女
82	(10,7)	13262	腫瘍：腎臓	グレード１乳頭状移行上皮癌	59	男
83	(11,7)	4764	腫瘍：腎臓	腎細胞(明細胞)癌腫	66	男
84	(12,7)	9043	腫瘍：腎臓	腎明細胞癌	45	男
85	(1,8)	2874	腎臓：皮質	正常腎皮質	53	男
86	(2,8)	4818	腎臓：皮質	正常腎皮質	52	女
87	(3,8)	14022	腫瘍：肝臓	低分化型胆管癌	45	男
88	(4,8)	15757	腫瘍：肝臓	Fibrolamellar hepatocellular carcinoma	25	男
89	(5,8)	14826	腫瘍：肝臓	低悪性度肝細胞癌	66	女
90	(6,8)	15750	腫瘍：肝臓	胆管癌	70	女
91	(7,8)	1991	肝臓：実質	正常肝臓	79	女
92	(8,8)	3123	肝臓：実質	肝臓－正常境界	31	男

【０７２７】

実施例２４

完全長ＬＹ６Ｇ６Ｆ転写産物におけるコーディングの検証

ＬＹ６Ｇ６Ｆ（配列番号１）をコードする完全長転写産物を以下のように検証した。

【０７２８】

１．逆転写反応を以下のように行った。精製したＲＮＡ（正常肺）１０μｇを、Ｒａｎｄｏｍ　Ｈｅｘａｍｅｒプライマー（インビトロジェン（米国カリフォルニア州カールスバッド）、カタログ番号：４８１９０－０１１）１５０ｎｇおよびｄＮＴＰ　５００μＭと混合し、全量を１５６μｌとした。混合物を６５℃で５分間インキュベートし、次いで氷上で急速冷却した。次いで、５×Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　II　ｆｉｒｓｔ　ｓｔｒａｎｄバッファー（インビトロジェン、カタログ番号：１８０６４－０１４、部品番号：Ｙ００１４６）５０μｌ、０．１Ｍ　ＤＴＴ　２４μｌ、ＲＮａｓｉｎ（プロメガ（米国ＷＳミルウォーキー）、カタログ番号：Ｎ２５１１）４００単位を添加し、混合物を２５℃で１０分間インキュベートし、さらに４２℃で２分間インキュベートした。次いで、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　II（インビトロジェン、カタログ番号：１８０６４－０１４）１０μｌ（２０００単位）を添加し、４２℃で５０分間インキュベートして反応させ（最終量：２５０μｌ）、次いで、７０℃、１５分間の条件で反応を失活させた。得られたｃＤＮＡをＴＥバッファー（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ８）で１：２０に希釈した。

【０７２９】

２．以下の条件で２×ＧｏＴａｑ　Ｒｅａｄｙ　Ｍｉｘ（プロメガ、カタログ番号：Ｍ７１２２）を使用してＰＣＲを実施した。全反応量２５μｌ中、ＧｏＴａｑ　ｒｅａｄｙ　ｍｉｘ　１２．５μｌ、上記で得られたｃＤＮＡ５μｌ、１０μＭフォワードプライマー１００－６９０（配列番号５１）１μｌ、１０μＭリバースプライマー１００－６９１（配列番号５２）１μｌおよびH_2O　５．５μｌ；９５℃５分；９４℃３０秒→５３℃３０秒→７２℃５０秒を３５サイクル；次いで７２℃１０分からなる反応プログラム。プライマーに関する詳細は後掲の表１１に示す。

【０７３０】

上記のＰＣＲ産物を１．２％アガロースゲルに載せ、臭化エチジウムで染色し、１×ＴＡＥ溶液中において１００Ｖで電気泳動し、ＵＶ光で可視化した。ＱｉａＱｕｉｃｋ　Ｇ

ｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　ｋｉｔ（キアゲン、カタログ番号：２８７０７）を使用して、予想されたサイズのバンドをゲルから切り出し抽出した。次いで、上記のプライマーを使用して、精製したＤＮＡの配列決定を行い（テルアビブ大学（イスラエル国））、このＤＮＡがＬＹ６Ｇ６Ｆ（配列番号１）をコードする完全長転写物であることを検証した。

【０７３１】

実施例２５

ＥＧＦＰに融合させたＬＹ６Ｇ６Ｆをコードする完全長転写産物のクローニング

ＥＧＦＰ（高感度緑色蛍光タンパク質）に融合させたＬＹ６Ｇ６Ｆをコードする完全長転写産物のクローニングを以下のように行った。

【０７３２】

まずＥＧＦＰ発現ベクターを構築し、次いで配列番号５８に示したアミノ酸配列をコードするＬＹ６Ｇ６Ｆオープンリーディングフレーム（配列番号５７）をクローニングした。以下のようにして、ＥＧＦＰをｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３（クロンテック、カタログ番号：６３１６１９）にサブクローニングした。ＥＧＦＰ－Ｎ１ベクター（クロンテック、カタログ番号：６０８５－１）をＮｈｅＩおよびＮｏｔＩで消化し、ＥＧＦＰ遺伝子を切り出した。次いで、同じ酵素であらかじめ消化したｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３（クロンテック、カタログ番号：６３１６１９）に、ＥＧＦＰインサートをライゲートし、ＥＧＦＰ－ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３ベクターを得た。

【０７３３】

以下の条件においてＰｌａｔｉｎｕｍ　ＰＦＸ（登録商標）（インビトロジェン（米国カリフォルニア州カールスバッド）、カタログ番号：１１７８－０２１）を使用して、ＰＣＲを実施した。全反応量５０μｌ中、Ｐｌａｔｉｎｕｍ　ＰＦＸ　１０×バッファー５μｌ、上記で得られ精製および検証されたＤＮＡ２μｌ、１０ｍＭ　ｄＮＴＰ（各ヌクレオチド：２．５ｍＭ）１μｌ、Ｐｌａｔｉｎｕｍ　ＰＦＸ酵素１μｌ、H_2O　３７μｌ、ならびに１０μＭフォワードプライマー１００－７２９（配列番号５３）１μｌおよび１０μＭリバースプライマー１００－７３０（配列番号５４）１μｌ（それぞれ１０μＭ）；９５℃５分；９４℃３０秒→５５℃３０秒→６８℃６０秒を３５サイクル；次いで６８℃１０分からなる反応プログラム。使用したプライマーは、後掲の表１１および図６に記載したように、所望のタンパク質座標に対応する遺伝子特異的配列、制限酵素部位、およびコザック配列を含んでいた。表１１において、太字は上記の遺伝子特異的配列を示し、イタリック体はクローニングに使用した制限部位を示し、下線部はコザック配列を示す。

【０７３４】

上記のＰＣＲ産物５μｌを１．２％アガロースゲルに載せ、臭化エチジウムで染色し、１×ＴＡＥ溶液中において１００Ｖで電気泳動し、ＵＶ光で可視化した。予想されるバンドサイズの検証後、Ｑｉａｑｕｉｃｋ　ＰＣＲ　ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（キアゲン（米国カリフォルニア州バレンシア）、カタログ番号：２８１０６）を使用して、残りのＰＣＲ産物を処理しＤＮＡを精製した。抽出したＰＣＲ産物を、表１１に示す制限酵素ＮｈｅＩおよびＥｃｏＲＩ（ニュー・イングランド・バイオラボ（米国マサチューセッツ州ベヴァリー）で消化した。消化した後、ＤＮＡを上述のように１．２％アガロースゲルに載せた。ＱｉａＱｕｉｃｋ　Ｇｅｌ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　ｋｉｔ（キアゲン、カタログ番号：２８７０７）を使用して、予想されたサイズのバンドをゲルから切り出し抽出した。

【０７３５】

消化したＤＮＡを、あらかじめ制限酵素ＮｈｅＩおよびＥｃｏＲＩで消化したＥＧＦＰ＿ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３ベクターに、ＬｉｇａＦａｓｔ（登録商標）　Ｒａｐｉｄ　ＤＮＡ　Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（プロメガ、カタログ番号：Ｍ８２２１）を使用してライゲートした。メーカーの説明書に従って、コンピテントＥ．Ｃｏｌｉ細菌ＤＨ５α（ＲＢＣ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（台湾国台北）、カタログ番号：ＲＨ８１６）を得られ

たＤＮＡにより形質転換し、次いで、組換えプラスミドを選択するためのＬＢ－アンピシリン寒天平板上に播種し、３７℃で一晩インキュベートした。

【０７３６】

ＧｏＴａｑ　Ｒｅａｄｙ　Ｍｉｘ（プロメガ、カタログ番号：Ｍ７１２２）を使用して、陽性クローンのスクリーニングをＰＣＲによって行った。１００μｇ／ｍｌアンピシリンを添加した５ｍｌのＴｅｒｒｉｆｉｃ　Ｂｒｏｔｈ中で、陽性のコロニーを３７℃で一晩、振盪しながら増殖させた。Ｑｉａｐｒｅｐ　Ｓｐｉｎ　Ｍｉｎｉｐｒｅｐ　ｋｉｔ（キアゲン、カタログ番号：２７１０６）を使用して、プラスミドＤＮＡを細菌培養物から単離した。クローニングの正確性は、インサート（Ｈｙｌａｂｓ（テルアビブ大学（イスラエル国））の配列を決定することにより検証した。エラーのないコロニー（すなわち、ＯＲＦ内に変異がない）の検証後、組換えプラスミドをさらなる分析に供した。

【０７３７】

図７に、上記で得られた、ＥＧＦＰに融合させた完全長ＬＹ６Ｇ６ＦのＤＮＡ配列（配列番号５５）を示す。図７において、ＬＹ６Ｇ６Ｆの完全長配列に相応する遺伝子特異的配列を太字で示し、ＥＧＦＰ配列を下線を引いたイタリック体で示す。図８に、上記で得られた、ＥＧＦＰに融合させた完全長ＬＹ６Ｇ６Ｆのアミノ酸配列（配列番号５６）を示す。ＬＹ６Ｇ６Ｆの完全長配列に相応する遺伝子特異的配列を太字で示し、ＥＧＦＰ配列を下線を引いたイタリック体で示す。

【０７３８】

【表３０】

表 11：プライマーの詳細

配列番号	プライマーID	プライマーの配列	制限部位
51	100-690	GAGAACTTGGCAGGCTCTCC	-
52	100-691	CACACTTCCCAGCAGATGTC	-
53	100-729	CTA*GCTAGCCACC***ATGGCAGTC**TTATTCCTCCTC**	NheI
54	100-730	CGC*GAATTC***GCCTGGGCTTGT**GGGCAGGTG**	EcoRI

【０７３９】

実施例２６

ＬＹ６Ｇ６Ｆの細胞内局在の決定

ＬＹ６Ｇ６Ｆ－ＥＧＦＰ融合タンパク質（配列番号５６）を使用して、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質の細胞内局在を決定した。ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質の局在は、一時的にトランスフェクトさせた後に共焦点顕微鏡を使用して観察した（Chen et al., Molecular vision 2002; 8; 372-388）。トランスフェクションの４８時間後に、細胞中の蛍光生成物の存在を観察した。

【０７４０】

上記のＬＹ６Ｇ６Ｆ－ＥＧＦＰ　ｐＩＲＥＳｐｕｒｏ３構築物を以下のようにＨＥＫ２９３Ｔ細胞に一時的にトランスフェクトさせた。

【０７４１】

あらかじめ加温したＤＭＥＭ［ダルベッコの改変イーグル培地（バイオロジカルインダ

ストリーズ（イスラエル国Ｂｅｉｔ　Ｈａ’Ｅｍｅｋ）、カタログ番号：０１－０５５－１Ａ）］＋１０％ＦＢＳ（ウシ胎仔血清）＋４ｍＭ　Ｌ－グルタミンを２ｍｌ使用して、ＨＥＫ２９３Ｔ（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ－１１２６８）細胞を、６ウェルプレートにセットした滅菌ガラスカバースリップ（直径１３ｍｍ）（Ｍａｒｉｅｎｆｅｌｄ、カタログ番号：０１　１１５　３０）上に播種した。１ウェルあたり５００，０００個の細胞を播種し、９４μｌのＤＭＥＭで希釈したＦｕＧＥＮＥ６試薬（ロシュ、カタログ番号：１１－８１４－４４３－００１）６μｌを使用して上記のＤＮＡ構築物２μｇをトランスフェクトした。この複合混合物は、室温で１５分間インキュベートしてから細胞に滴下し、回転撹拌した。５％CO_2を含み３７℃に保持されたインキュベーターに細胞をセットした。

【０７４２】

一時的なトランスフェクションの４８時間後、細胞をさらに処理して共焦点顕微鏡法で分析した。カバースリップをリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中で３回洗浄し、３．７％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）（シグマ、カタログ番号：Ｐ－６１４８）で１５分間固定した。ＰＢＳ中で２回洗浄後、固定したカバースリップを封入液（シグマ、カタログ番号：Ｇ０９１８）を使用してスライドに接着させ、共焦点顕微鏡を使用して細胞中の蛍光生成物の存在を観察した。結果を図９に示す。

【０７４３】

図９は、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞において発現されたＬＹ６Ｇ６Ｆ＿ＥＧＦＰ（配列番号５６）融合タンパク質が、細胞膜に局在することを示している。画像は共焦点顕微鏡（４０倍）を使用して得られた。

【０７４４】

実施例２７

ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－マウスＩＧｇ２ＡＦＣ融合タンパク質のクローニングおよび発現

Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｏｆ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）のＢｌａｓｔＰソフトウェアを初期パラメータで使用して、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲタンパク質のマウスオーソログを同定し、このマウスオーソログを動物モデルにおいて使用して、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ－Ｉｇ融合タンパク質の機能に関する概念を実験により実証した。ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲタンパク質に対応するマウスオーソログを、配列番号２０、１９、９および２１にそれぞれ示す。ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＬＳＲおよびＴＭＥＭ２５タンパク質と、それぞれに対応するマウスオーソログとのアミノ酸アライメントおよび比較を図５Ａ、図５Ｂ、図５Ｃおよび図５Ｄにそれぞれ示す。

【０７４５】

マウスＴＭＥＭ２５タンパク質（配列番号９）、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質（配列番号２０）、ＶＳＩＧ１０タンパク質（配列番号１９）およびＬＳＲタンパク質（配列番号２１）のｃＤＮＡ配列をそれぞれマウスＩｇＧ２ａＦｃ（配列番号２７）のＦｃドメインに融合させた。すべてのタンパク質について、それぞれに対応する天然のシグナルペプチドをＥＣＤにおいて使用した。得られたＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ　Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２３、２４、２５、または２６）を図１０Ａ～Ｄにそれぞれ示す。

【０７４６】

ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質（配列番号２３、２４、２５または２６）を、ＧＰＥｘ（登録商標）レトロベクターにクローニングし、このレトロベクターをキャタレント社の「自家製」ＣＨＯ－Ｓ細胞株に形質導入した。プールした集団を作製し、その生産性を検証した。次いで、プールを増殖させ、プールの相対的生産性および相対的コピー数を決定した。細胞培養上清をキャタレント社のＦｃ　ＥＬＩＳＡアッセイで分析し、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａＦｃ融合タンパク質の生産性を確認

した。

【０７４７】

タンパク質溶液のバイオバーデンおよび内毒素について試験した。ヒトＩｇＧ１に融合させたＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤのうちのいずれかのヒトＥＣＤから構成されるヒト融合タンパク質（図１１に示す）も同様の系を使用して発現させた。

【０７４８】

インビトロにおいて活性化させたマウスおよびヒトＴ細胞に対するＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果の評価：

実施例２８

ＯＶＡペプチドにより活性化させたＤＯ１１．１０ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞に対するＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－ＩＧ融合タンパク質の効果

ａｕｔｏｍａｘを使用して、抗ＣＤ２５（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号：１３０－０９１－０７２）を含むネガティブソートカクテルでＣＤ４$^{-}$をソート（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号：１３０－０９５－２４８）し、次いで、ＣＤ６２Ｌ$^{+}$をソート（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号：１３０－０４９－７０１）することによって、５匹のＤＯ１１．１０マウス（Ｊａｃｋｓｏｎ）の脾臓からナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を単離した。また、１匹のマウスからＢａｌｂ／ｃ全脾細胞も採取し、３０００ｒａｄの放射線を照射して、ＤＯ１１．１０　ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞のための抗原提示細胞（ＡＰＣ）として使用した。９６ウェル平底プレート１ウェルあたり５×１０^{5}個を播種したナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を、放射線照射したＡＰＣとともに１：１（ＡＰＣ：Ｔ細胞）の比率でＨＬ－１培地２００μｌ中において培養し、本明細書に示した濃度のＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２５）、ＬＳＲ－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２６）、ＬＹ６Ｇ６Ｆ－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２３）のいずれかの存在下において、２０μｇ／ｍｌまたは２μｇ／ｍｌのＯＶＡ３２３－３３９で活性化した。ポジティブコントロールとして、Ｂ７－Ｈ４－Ｉｇ（Ｒ＆Ｄシステムズ）またはＣＴＡ４－Ｉｇ（ｍＩｇＧ２ａ　Ｆｃに融合させたマウスＥＣＤ）を使用した。ネガティブコントロールとして、アイソタイプコントロールＩｇ（ｍＩｇＧ２ａ、ＢｉｏＸＣｅｌｌ、カタログ番号：ＢＥ００８５）を使用した。２４時間後にトリチウム化チミジン１μＣｉを添加して細胞をパルス標識し、７２時間後に回収した。

【０７４９】

図３０に示すように、ＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇ、ＬＳＲ－ＥＣＤ－ＩｇおよびＬＹ６Ｇ６Ｆ－ＥＣＤ－Ｉｇは、Ｔ細胞の活性化の用量依存的な抑制を誘導する。これは、２０μｇ／ｍｌ（図３０Ａ～Ｃ、Ｅ）または２μｇ／ｍｌ（図３０Ｄ）のＯＶＡ３２３－３３９によって誘導したＴ細胞の増殖が抑制されたことによって実証された。

【０７５０】

同様のアッセイを用いて実施した３つの実験において、ＶＳＩＧ１０－ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２４）は活性を示さなかった。

【０７５１】

実施例２９

抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８コーティングビーズで活性化したナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果

上記の実施例に記載したように、ａｕｔｏｍａｘでソーティングすることによって、５匹のＳＪＬ（Ｈａｒｌａｎ）マウスからナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を単離した。ビーズは、メーカーのプロトコル（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ　Ｍ－４５０　Ｅｐｏｘｙ、カタログ番号：１４０．１１、インビトロジェン）に従って、抗ＣＤ３（０．５μｇ／ｍｌ；クローン２Ｃ１１）および抗ＣＤ２８（２μｇ／ｍｌ；クローン３７．５１、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ならびに段階的に濃度を増加させた（０．１～１０μｇ／ｍｌ）ＬＳＲ－ＥＣＤ－ＩｇまたはｍＩｇＧ２ａアイソタイプコントロール（ｍＩｇＧ２ａ、ＢｉｏＸＣｅｌｌ、

カタログ番号：ＢＥ００８５）でコーティングした。ＬＳＲ－ＥＣＤ－Ｉｇによるビーズのコーティングに使用した総タンパク質量は、コントロールＩｇを使用して１０μｇ／ｍｌになるよう調整した。１：２（ビーズ：Ｔ細胞）の比率において、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（０．５×１０^{6}個／ウェル）をコーティングビーズで活性化した。２４時間後にトリチウム化チミジン１μＣｉを用いて細胞をパルス標識し、７２時間後に回収した。

【０７５２】

ＬＳＲ－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２６）は、Ｔ細胞の増殖を明らかに抑制し、その効果は用量依存的に発揮された（図３１）。

【０７５３】

図１０および図１１に示したＴＭＥＭ２５、ＬＹ６Ｇ６ＦおよびＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質も、同様のアッセイにおいて試験され、同様の結果が得られる。

【０７５４】

実施例３０

活性化マーカーとしてのサイトカインＣＤ６９の産生および発現により示された、プレート結合抗ＣＤ３により活性化されたマウスＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞に対するＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の用量依存的効果

メーカーの説明書に従ってＣＤ４$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{+}$Ｔ　ｃｅｌｌアイソレーションキット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号：１３０－０９３－２２７）を使用しネガティブセレクションを行うことによって、ＢＡＬＢ／Ｃマウスの脾細胞およびリンパ節細胞のプールから未感作ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｔ細胞を単離した。純度は＞９５％であった。

【０７５５】

１μｇ／ｍｌ、５μｇ／ｍｌおよび１０μｇ／ｍｌのＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２３、２４、２５および２６）の存在下において、９６ウェル組織培養プレートに２μｇ／ｍｌの抗ＣＤ３モノクローナル抗体（クローン１４５－２Ｃ１１）を４℃で一晩コーティングした。コントロールｍＩｇＧ２ａ（ＢｉｏＸＣｅｌｌから入手したクローンＣ１．１８．４；カタログ番号：ＢＥ００８５）を各ウェルに加えて、各ウェルの総タンパク質濃度が１２μｇ／ｍｌになるよう調整した。各ウェルに１×１０^{5}個のＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｔ細胞を播種した。刺激した４８時間後に、培養液上清を回収し、マウスＩＦＮγＥＬＩＳＡキットを使用して分析し、フローサイトメトリーを使用して、活性化マーカーであるＣＤ６９の細胞における発現を分析した。

【０７５６】

図３２に示した結果において、ＴＣＲを刺激後、コントロールであるｍＩｇＧ２ａおよびＣＴＬＡ４－Ｉｇと比較してＩＦＮγの分泌が低下したこと（図３２Ａ）およびＣＤ６９の発現が減少したこと（図３２４Ｂ）は、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質がＣＤ４Ｔ細胞の活性化に対する抑制効果を奏することを実証している。

【０７５７】

実施例３１

インビトロにおけるＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の分化に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果

ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の分化に対するＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ－Ｉｇ融合タンパク質の抑制能を試験するために、ＯＶＡ３２３－３３９ペプチドに特異性を示すＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）を有するトランスジェニックマウスであるＤＯ１１．１０マウスからナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を単離する。ＤＯ１１．１０　Ｔ細胞を使用することによって、同一のＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞集団において、ポリクローナル（抗ＣＤ３モノクローナル抗体／抗ＣＤ２８モノクローナル抗体）に特異的な応答とペプチドに特異的な応答の両方を評価することが可能となる。ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、ＤＯ１１．１０マウスから単離された後、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８コーティングビーズの存在下またはＯＶＡ３２３－３３９ペプチドと放射線照射ＢＡＬＢ／ｃ脾細胞との存在下、ならびにＬＹ６Ｇ

６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５もしくはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、コントロールＩｇ、またはＢ７－Ｈ４　Ｉｇの存在下において培養物中で活性化される。Ｔｈに刺激が与えられる条件下において、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は以下のように活性化される：Ｔｈ０細胞－（ＩＬ－２）、Ｔｈ１細胞－（ＩＬ－２＋ＩＬ－１２）、Ｔｈ２細胞－（ＩＬ－２＋ＩＬ－４）、またはＴｈ１７細胞－（ＴＧＦ－β＋ＩＬ－６＋ＩＬ－２３＋抗ＩＬ－２）。Ｔ細胞の分化およびＴｈ特異的応答に対する効果は、細胞増殖とサブタイプに特異的なサイトカイン（ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－１０、ＩＬ－１７、ＩＦＮ－γ）の産生とを測定することによって評価される。

【０７５８】

実施例３２

ヒトＴ細胞の活性化に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果の評価

ヒトＴ細胞応答に対するＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果は、精製したヒトＴ細胞を使用した２種の異なるインビトロアッセイによって試験する。一方のアッセイにおいては、抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８でコーティングしたビーズを用いてヒトＴ細胞を活性化し、他方のアッセイにおいては、放射線を照射した自己由来ＰＢＭＣの存在下、抗ＣＤ３抗体および抗ＣＤ２８抗体を用いて活性化を行う。ヒトＴ細胞の活性化に対するＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の制御活性は、細胞増殖およびサイトカイン放出を測定することによって評価する。

【０７５９】

調査Ｉ－抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８でコーティングしたビーズにより活性化したヒトＴ細胞に対する融合タンパク質の抑制効果

４人の健常人ドナーからナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を単離し、ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質のいずれか１つまたはコントロールであるｍＩｇＧ２ａの存在下において、抗ＣＤ３モノクローナル抗体／抗ＣＤ２８モノクローナル抗体コーティングビーズを用いてこのナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を活性化する。２種の培養系、すなわち、２４時間後にトリチウム化チミジンを用いてパルス標識を行い、７２時間後に回収を行う培養系と、９６時間後に別のプレートから回収を行う培養系とを構築して並行して実施し、ＬｉｑｕｉＣｈｉｐを用いてサイトカイン産生を測定する。

【０７６０】

調査II－放射線を照射した自己由来ＰＢＭＣにより活性化したヒトＴ細胞に対する融合タンパク質の抑制効果

健常人ドナー由来の新鮮血からフィコール勾配により全ＰＢＭＣを単離する。１０×１０^{6}個の全ＰＢＭＣをＥｘ－Ｖｉｖｏ２０培地中に再懸濁し、３０００ｒａｄの放射線を照射する。この細胞を使用して、試験タンパク質のいずれか、ならびに抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８を提示させ、単離したＴ細胞をインビトロにおいて活性化させる。残りのＰＢＭＣは、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ社のＣＤ４$^{+}$Ｔ　ｃｅｌｌアイソレーションキットIIを用いたＴ細胞の単離に使用する。

【０７６１】

活性化を行うために、放射線を照射した５×１０^{5}個の自己由来ＰＢＭＣの存在下において、５×１０^{5}個の単離したＴ細胞を培養する。抗ＣＤ３（０．５μｇ／ｍｌ）および抗ＣＤ２８（２μｇ／ｍｌ）と、ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質のいずれかまたはコントロールＩｇ（ｍＩｇＧ２ａ）とを可溶形態で添加する。２４時間後にトリチウム化チミジン１μＣｉを用いて培養物をパルス標識し、７２時間後に増殖を測定する。

【０７６２】

実施例３３

ＡＰＣ様細胞において異所性発現させたＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲタンパク質のヒトＴ細胞応答に対する効果

ヒトＴ細胞応答に対するＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲの効果は、「Ｔ細胞刺激」細胞であるマウス胸腺腫細胞株Ｂｗ５１４７においてＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲを異所性発現させることにより評価した。マウス胸腺腫細胞株Ｂｗ５１４７は、ヒトＴ細胞上においてＴＣＲ複合体を誘導することが可能な膜結合型抗ヒトＣＤ３抗体フラグメントを、推定上の共刺激リガンドまたは共抑制リガンドの共発現の存在下または非存在下において発現するよう改変された細胞株である。

【０７６３】

ＬＹ６Ｇ６Ｆ（配列番号１）、ＴＭＥＭ２５（配列番号７）またはＬＳＲ（配列番号１１）をコードするコドン最適化ｃＤＮＡを遺伝子合成し、レトロウイルスベクターｐＣＪＫ２のＳｆｉ－Ｉ部位に方向性をもたせてクローニングした。モノシストロン性発現構築物を作製した。この構築物をアガロースゲル電気泳動によって検証し、高レベルの細胞膜結合抗ＣＤ３抗体を提示するＢｗ５１４７細胞（Ｂｗ－３／２）（Leitner et al., 2010）において発現させた。ネガティブコントロールとして、「空」ベクター（ｐＣＪＫ２）を形質導入したＢｗ５１４７細胞を使用した。さらに、コントロールとして、共刺激分子（ＩＣＯＳＬおよびＣＤ７０）を発現するＢｗ－３／２細胞、および共抑制分子（Ｂ７－Ｈ３およびＢ７－Ｈ１／ＰＤ－Ｌ１）を発現するＢｗ－３／２細胞も使用した。上記の刺激細胞上に発現されるマウス一本鎖抗体と反応するＤｙＬｉｇｈｔ－６４９抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）抗体を使用したＦＡＣＳによって、刺激を与える抗体である膜結合型抗ＣＤ３抗体の均質な高レベル発現を確認した。また、それぞれの刺激細胞における発現モノシストロン性構築物の存在および高レベルの転写をｑＰＣＲで確認した。

【０７６４】

健常ボランティアドナー由来のバフィーコートまたはヘパリン処理血液からＴ細胞を精製し、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（ＧＥヘルスケア）を使用して標準的な密度遠心分離を行うことによって単核画分を得た。各細胞に対応するビオチン化モノクローナル抗体と常磁性ストレプトアビジンビーズと組み合わせたＭＡＣＳを用いて、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１４、ＣＤ１６、ＣＤ１９、ＣＤ３３およびＭＨＣクラスII提示細胞を除去することによって未感作バルクヒトＴ細胞を得た（Leitner et al., 2009）。精製されたＣＤ８Ｔ細胞およびＣＤ４Ｔ細胞は、ビオチン化ＣＤ４モノクローナル抗体およびビオチン化ＣＤ８モノクローナル抗体を上記のプールに添加することによって得た。ナイーブＣＤ４Ｔ細胞は、ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ ｃｅｌｌアイソレーションキットII（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して単離した。それぞれの細胞を単離した後、細胞の純度をＦＡＣＳによって分析し、十分な純度（＞９０％）を有する試料を実験に使用した。

【０７６５】

上記の刺激細胞を回収し、カウントし、放射線を照射し（３０００ｒａｄ×２回）、９６ウェル平底プレートに播種した（２００００個／ウェル）。液体窒素で保存していたＭＡＣＳ精製Ｔ細胞を解凍し、カウントし、１ウェルあたり１００，０００個を添加し、全量を２００μｌ／ウェルとした。１条件につき３つずつウェルを用意した（ｔｒｉｐｌｉｃａｔｅ）。共培養を４８時間行った後、^{3}Ｈ－チミジン（最終濃度：０．０２５ｍＣｉ；パーキンエルマー／Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｎｕｃｌｅａｒ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（マサチューセッツ州ウェルスレイ））をウェルに添加した。さらに１８時間培養した後、プレートの内容物をフィルタープレートで回収し、Ｐｆｉｓｔｅｒｓｈａｍｍｅｒら（２００４）の記載に従って^{3}Ｈ－チミジンの取り込みを測定した。加えて、ＭＡＣＳで精製されたＴ細胞サブセット（ＣＤ８Ｔ細胞、ＣＤ４Ｔ細胞、およびナイーブＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＤ４Ｔ細胞）を使用して一連の実験を実施した。また、細胞を顕微鏡で評価するため、およびＴ細胞非存在下における上記の刺激細胞の^{3}Ｈ－チミジンの基礎取り込み量を決定するために、すべての実験において上記の刺激細胞のみを添加したウェルをさらなるコントロールとして使用した。放射線照射後すぐに崩壊した刺激細胞から得られた結果は

分析から除外した。

【０７６６】

図３３に示す結果はいくつかの実験の平均値であり、バルクヒトＴ細胞（図３３Ａ）、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（図３３Ｂ）、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞（図３３Ｃ）またはナイーブＣＤ４　ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$Ｔ細胞（図３３Ｄ）の増殖に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲを発現する刺激細胞の効果を示している。コントロールである共刺激分子（ＩＣＯＳＬおよびＣＤ７０）の発現は、すべての亜型細胞において一貫した結果を示しており、増殖を顕著に刺激した。種々のＴ細胞サブタイプの増殖を軽度に抑制した、コントロールである共抑制分子（Ｂ７－Ｈ３およびＢ７－Ｈ１／ＰＤ－Ｌ１）の発現と同様に、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲの発現もＴ細胞の増殖を軽度に抑制し、その抑制効果はＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞において最も顕著であった。

【０７６７】

実施例３４

免疫細胞に対する結合プロファイルを決定することによる、ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、ＴＭＥＭ２５タンパク質および／またはＬＳＲタンパク質の標的細胞の特性評価

ＤＯ１１．１０マウス（すべてのＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞がＯＶＡ３２３－３３９ペプチドに特異的なＴ細胞レセプターを発現しているトランスジェニックマウス）から得た脾細胞をＯＶＡ３２３－３３９ペプチドの存在下で活性化し、初期活性化後、ｔ＝０時間、６時間、１２時間、２４時間および４８時間において細胞を回収し、どのタイプの細胞がＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲを結合するレセプターを発現しているかを経時的に調査する。次いで、細胞を、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、Ｂ２２０、ＣＤ１９、ＣＤ１１ｂおよびＣＤ１１ｃに対して共染色する。

【０７６８】

実施例３５

Ｂ細胞のクラススイッチ能および抗体分泌能に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果の評価

プライミングしていないＣ５７ＢＬ／６マウスから休止Ｂ細胞を単離し、抗ＣＤ４０の存在下かつ（ｉ）外因性サイトカイン非存在下または（ii）ＩＬ－４の存在下または（iii）ＩＦＮ－γの存在下において、インビトロで活性化させる。培養開始時に、コントロールＩｇ（ｍＩｇＧ２ａ）、抗ＣＤ８６モノクローナル抗体（Ｉｇの産生を増加させるためのポジティブコントロール）、または本明細書の実施例５に記載のＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ融合タンパク質およびＬＳＲ　ＥＣＤ融合タンパク質のいずれか１つを細胞培養に加え、５日間培養を行う。ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ融合タンパク質およびＬＳＲ　ＥＣＤ融合タンパク質は、それぞれ３つの濃度で試験する。培養終了後、上清中にＩｇＭ、ＩｇＧ１およびＩｇＧ２ａが存在するかどうかをＥＬＩＳＡを使用して試験する。抗体を特定のアイソタイプから別のアイソタイプへとクラススイッチさせるＢ細胞の能力に変化が見られた場合、クラススイッチを起こしたＢ細胞の数をＥＬＩＳＰＯＴにより測定する。抗体産生細胞の数に変化が見られた場合、ＩｇＧ１およびＩｇＧ２ａの成熟転写産物のレベルと比較したときの、γ１－ｓｔｅｒｉｌｅ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔおよびγ２ａ－ｓｔｅｒｉｌｅ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔのレベルに変化があるかどうかを確認する。

【０７６９】

自己免疫疾患の治療における、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の治療効果の評価

実施例３６

多発性硬化症マウスＲ－ＥＡＥモデルにおけるＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の有効性

自己免疫疾患の治療における、ＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＬＳＲ－

ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質およびＶＳＩＧ１０－ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２５、２６および２４）の治療効果を、多発性硬化症マウスモデル（再発寛解型実験的自己免疫性脳脊髄炎（Ｒ－ＥＡＥ））を用いて試験した。

【０７７０】

６週齢の雌性ＳＪＬマウスをＨａｒｌａｎから購入し、実験開始前の１週間、ＣＣＭの施設において飼育した。マウスをランダムに１０匹の群に分け、０日目にＰＬＰ１３９－１５１／ＣＦＡ５０μｇを用いてプライミングした。ＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２５）、ＬＳＲ－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２６）、ｍＩｇＧ２ａアイソタイプコントロール、またはポジティブコントロールとしてのＣＴＬＡ４－Ｉｇ（マウスＩｇＧ２ａＦｃに融合させたマウスＥＣＤ）の注射剤を１００μｇ／投与でマウスに計６回腹腔内投与した。治療は疾患の寛解が見られたときから開始し、１週あたり３回の投与を２週間にわたって行った。マウスにおける疾患の症状を追跡調査した。３５日目（疾患の再発のピーク）において、各群の５匹のマウスの一方の耳にＰＬＰ１３９－１５１　１０μｇを注射し、他方の耳にＰＬＰ１７８－１９１　１０μｇを注射することによって、疾患誘導エピトープ（ＰＬＰ１３９－１５１）に対するＤＴＨ（遅延型過敏）応答、および再発関連ミエリンエピトープ（ＰＬＰ１７８－１９１）に対するＤＴＨ（遅延型過敏）応答を分析した。チャレンジの２４時間後に耳の腫脹レベルを分析した。

【０７７１】

この実施例は、図３４Ａに示すように、１００μｇ／投与でＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２５）またはＬＳＲ－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２６）を週３回投与する治療方法によって治療を行うと、Ｒ－ＥＡＥ誘導マウスにおける疾患重症度が顕著に減少することを示している。抑制のレベルはＣＴＬＡ４－Ｉｇによるものと類似していた。

【０７７２】

さらに、ＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２５）またはＬＳＲ－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２６）によりＲ－ＥＡＥマウスを治療すると、３５日目において、疾患誘導エピトープ（ＰＬＰ１３９－１５１）に対するＤＴＨ応答、および再発関連エピトープ（ＰＬＰ１７８－１９１）に対するＤＴＨ応答が劇的に抑制された（図３４Ｂ）。

【０７７３】

ＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２５）の有効性の用量依存性およびＰＬＰ誘導Ｒ－ＥＡＥモデルにおけるその作用機序を試験するために、上記のように疾患を誘導し、疾患の寛解が見られたときから、１００μｇ／投与、３０μｇ／投与または１０μｇ／投与でＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇを週３回、２週間にわたって投与することによりマウスを治療した。高用量（１００μｇ／投与）での効果とは顕著に異なる、低用量の試験量（１０μｇ／投与）で観察された穏やかな効果において示されるように、ＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇは用量依存的に疾患重症度レベルを低下させた（図３５Ａ）。加えて、ＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇは、４５日目および７６日目において、応答が拡大されたエピトープであるＰＬＰ１７８－１９１およびＭＢＰ８４－１０４に対するＤＴＨ応答を抑制した（図３５Ｂ）。さらに、ＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇは、４５日目および７６日目の脾細胞ならびに４５日目の頸部リンパ節細胞において、ＰＬＰ１３９－１５１、ＰＬＰ１７８－１９１およびＭＢＰ８４－１０４に対するリコール応答を抑制した（図３５Ｃおよび図３５Ｄ）。これは、主として、増殖の抑制ならびにＩＦＮ－γおよびＩＬ－１７の放出の低下により示された。さらに、ＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇは、３０μｇ／投与のＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇによる治療後、マウスの頸部リンパ節細胞からのＩＬ－４およびＩＬ－１０の放出を抑制する。これらの条件下、脾細胞からのＩＬ－４およびＩＬ－１０の放出については一貫した効果は見られなかった。

【０７７４】

Ｒ－ＥＡＥモデルにおけるＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２５）の有益な効果は、ＣＮＳへの免疫細胞の浸潤の有意な減少をももたらした（図３５Ｅ）。ＣＮＳにおいて試験した細胞系はいずれも有意な変化を示さなかったが、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞および樹状細胞（Ｄｃ）（ＣＤ１１Ｃ$^{+}$）の減少ならびにＢ細胞（ＣＤ１９$^{+}$）集団の増加において明

確な傾向が見られた。しかしながら、これらに統計的有意差は見られなかった（図３５Ｅ）。

【０７７５】

ＶＳＩＧ１０－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２４）も、ＰＬＰにより誘導した上記のＲ－ＥＡＥモデルにおいて試験した。治療は寛解が見られた日から開始し、１００μｇ／投与を３回／週、２週間にわたり投与した。疾患スコアの低下によって示されるように、ＶＳＩＧ１０－ＥＣＤ－Ｉｇは疾患重症度を有意に低下させた（図３６Ａ）。このモデルにおけるＶＳＩＧ１０－ＥＣＤ－Ｉｇの有益な効果は、４５日目および７６日目において、ＰＬＰ１７８－１９１からＭＢＰ８４－１０４へのＤＴＨ応答の拡大が抑制されたことによっても示された（図３６Ｂ）。さらに、ＶＳＩＧ１０－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２４）は、４５日目に採取された脾細胞および排出（頚部）リンパ節細胞における、誘導エピトープＰＬＰ１３９－１５１または応答拡大エピトープＰＬＰ１７８－１９１およびＭＢＰ８４－１０４による活性化に応答したリコール応答を抑制した（図３６Ｃおよび図３６Ｄ）。これは、増殖の抑制ならびにＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７、ＩＬ－４およびＩＬ－１０の分泌低下により示された。

【０７７６】

興味深いことに、７６日目において、ＶＳＩＧ１０－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２４）は、ＭＢＰ８４－１０４により誘導された脾細胞増殖のみを抑制し、早期のミエリンエピトープにより誘導された脾細胞増殖を抑制しなかった（図３６Ｃ）。Ｒ－ＥＡＥモデルにおけるＶＳＩＧ１０－ＥＣＤ－Ｉｇによる治療は、ＣＮＳへの免疫細胞の浸潤を有意に減少させたことが明らかであったが、リンパ節における細胞数の増加は有意なものではなかった（図３６Ｅ）。ＣＮＳにおいて減少した主要な細胞サブタイプは$CD4^+$Ｔ細胞であったが、ＣＮＳにおいて$CD19^+$Ｂ細胞および$CD11c^+$Ｄｃに明確な減少傾向が見られた。すべての免疫細胞サブタイプはリンパ節において有意に増加したが、このことは、ＶＳＩＧ１０－ＥＣＤ－Ｉｇが、リンパ節からＣＮＳへの免疫細胞の移動を抑制している可能性を示唆している。

【０７７７】

ＬＹ６Ｇ６Ｆ－ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質は多発性硬化症の類似モデルにおいて調査する。

【０７７８】

実施例３７

関節リウマチマウスＣＩＡモデルにおけるＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の有効性

調査Ｉ：

ＬＳＲ－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２６）は、関節リウマチモデルであるコラーゲン誘導関節炎（ＣＩＡ）のマウスモデルにおいて試験した。雄性ＤＢＡ／１マウスを８～１０匹の群に分けて収容し、食餌および水を自由に摂取させ、１２時間の明／暗サイクルで２１℃±２℃において飼育した。関節炎は、完全フロイントアジュバント中に乳化させたタイプIIコラーゲンで免疫処置することによって誘導した。マウスの関節炎の徴候を毎日モニタリングした。関節炎（１日目）の徴候を確認後、ＬＳＲ－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２６）、ｍＩｇＧ２ａアイソタイプコントロール、またはポジティブコントロールとしてのＣＴＬＡ４－Ｉｇ（マウスＩｇＧ２ａ　Ｆｃに融合させたマウスＥＣＤ）（それぞれ１００μｇ／投与）による処置を開始し、１０日間にわたって週３回投与した。後肢足底の腫脹ならびに四肢すべての関節病変の数およびその程度を（マイクロキャリパーを使用して）測定した。これによって、統計評価に使用することが可能な２種類の測定値、すなわち臨床スコアおよび足底の厚さを得た。

【０７７９】

処置期間の終わりにマウスから採血を行い屠殺した。組織学的分析を行うため、マウスの死後に肢部を採取し、緩衝ホルマリン（１０％ｖ／ｖ）中で固定し、次いで緩衝ホルマリン（５．５％ｗ／ｖ）中ＥＤＴＡで脱灰した。次いで、組織をパラフィンに包埋し、薄

切し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色する。採点法は以下のとおりである。
０＝正常；
１＝滑膜炎が見られるが、軟骨の減少および骨侵食は見られないか、個々の病巣に限定されている；
２＝滑膜炎および有意な侵食が見られるが、関節構造は正常であり損傷がない；
３＝滑膜炎、広範囲な侵食、関節構造の破壊が見られる。
【０７８０】
ＬＳＲ－ＥＣＤ－Ｉｇを１０日間にわたって週３回、１００μｇ／投与で投与することによりＣＩＡ発症マウスを処置すると、臨床スコア（図３７Ａ）、肢部の腫脹（図３７Ｂ）、および組織学的障害（図３７Ｃ）が強力に低下することがこの実施例において示された。ＬＳＲ－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２６）の有効性はＣＴＬＡ４－Ｉｇによるものと類似していた。
【０７８１】
ＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇ、ＶＳＩＧ１０－ＥＣＤ－ＩｇおよびＬＹ６Ｇ６Ｆ－ＥＣＤ－Ｉｇの有効性をこのＣＩＡモデルで評価する。
【０７８２】
完全フロイントアジュバント中に乳化したタイプIIコラーゲンによるブーストを２１日目に行った、ＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２５）またはＬＳＲ－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２６）による処置は、より重度なＣＩＡモデルにおいて有効性を示さなかった。この重度ＣＩＡにおいては、同様の投薬計画および用量で投与されたエンブレル、ポジティブコントロールは非常に弱い有効性を示した。アジュバントを使用せずにタイプIIコラーゲンによるブーストを２１日目に行ったＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇによる処置も、ＣＩＡモデルにおいて治療効果を示さなかった。
【０７８３】
調査II：
改変ＣＩＡモデルを使用して、このＣＩＡモデルにおけるＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の有効性を以下のように評価した。雌性ＤＢＡ／１マウス（９～１１週齢、Ｔａｃｏｎｉｃ　Ｆａｒｍｓ）を７日間かけて順応させた。０日目に、ニワトリコラーゲン／ＣＦＡ、具体的には、マウス１匹あたり０．０５ｍＬのＥＫ－０２１０乳液（Ｈｏｏｋｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．）を用いてマウスを免疫し、２０日目に、ニワトリコラーゲン／ＩＦＡ、具体的には、マウス１匹あたり０．０５ｍＬのＥＫ－０２１１乳液（Ｈｏｏｋｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．）によるブースター注射を行った。マウスの採点評価を毎日行い、関節炎を発症した日に以下の処置群のいずれか１つに割り振った。
群１：ＬＹ６Ｇ６Ｆ－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２３）を２週間にわたって１日おきに３０ｍｇ／ｋｇの用量で１０ｍＬ／ｋｇを腹腔内投与
群２：ビヒクル（ＰＢＳ）を２週間にわたって１日おきに１０ｍＬ／ｋｇ投与（ネガティブコントロール）
【０７８４】
それぞれの群に割り振った後、臨床的徴候および関節の強直について以下の採点法に従いマウスを１日おきに採点評価した。
【０７８５】

【表３１】

臨床スコア：

0	正常な肢部。
1	１本の肢が炎症を起こし腫脹した。
2	１本以上４本未満の肢が炎症を起こし腫脹した、 または すべての肢が軽度に腫脹した。
3	すべての肢が炎症を起こし腫脹した。
4	重度の炎症を起こし腫脹した肢または強直した肢。 肢が強直した場合、マウスはケージの天井のワイヤーをつかむことができない。

【０７８６】

【表３２】

強直スコア：

肢部スコア	臨床観察
0	強直なし
1	軽度の強直
2	中程度の強直
3	重度の強直

【０７８７】

関節炎の発症後にＬＹ６Ｇ６Ｆ－ＥＣＤ－Ｉｇを２週間にわたって１日おきに３０ｍｇ／ｋｇ投与することによりＣＩＡ発症マウスを処置すると、疾患スコア（図３８）の低下に示されるように関節炎が緩和されることがこの実施例において示された。

【０７８８】

ＶＳＩＧ１０－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２４）およびＴＭＥＭ２５－ＥＣＤ－Ｉｇ（配列番号２５）の有効性は相似モデルにおいて評価する。

【０７８９】

調査III：ＣＩＡ移植モデルにおける寛容誘導に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果

免疫調節におけるＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果をさらに理解するために、これらのタンパク質が関節炎移植モデルにおいて寛容を誘導する能力を分析する。

【０７９０】

簡潔に述べれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２３、２４、２５および２６）またはコントロールＩｇ２ａを用いて１０日間にわたり処置した関節炎ＤＢＡ／１マウスに由来する脾臓細胞およびリンパ節（ＬＮ）細胞を採取し、Ｔ細胞欠損Ｃ．Ｂ－１７ＳＣＩＤ被移植マウスに腹腔内注射する。次いで、関節炎の移植を成功させるために必要なタイプIIコラーゲン１００μｇを（ＣＦＡを用いずに）マウスに注射する。次いで、ＳＣＩＤマウスにおいて関節炎をモニタリングする。組織学的試験を行い、抗コラーゲン抗体レベル測定することにより、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質による処置が長期的に疾患を予防できることを判断できる。

【０７９１】

実施例３８

ＴＭＥＶウイルス感染モデルにおける、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果の評価

タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス（ＴＭＥＶ）は、このウイルスの感染を受けやすいマ

ウス株（ＳＪＬ／Ｊ、Ｈ－２ＫＳ）において、原発性進行型ＭＳに類似した誘導性脱髄疾患（ＴＭＥＶ－ＩＤＤ）を引き起こす、天然に存在するマウス特有の病原体である（Munz et al., Nat Rev Immunol 2009;9:246-58）。ＴＭＥＶ感染症は、ＣＮＳにおける持続性ウイルス感染を生涯にわたってもたらし、炎症を起こしたＣＮＳの内因性のミエリンエピトープに対するＣＤ４Ｔ細胞応答のデノボ活性化を介して、慢性Ｔ細胞媒介性自己免疫性脱髄疾患の発症を引き起こす（すなわちｅｐｉｔｏｐｅ　ｓｐｒｅａｄｉｎｇ）（Miller et al., Nat Med 1997;3:1133-6; Katz-Levy et al., J Clin Invest 1999;104:599-610）。

【０７９２】

ＳＪＬマウスは、感染後２１日以内にウイルスの大部分を排除するが、小膠細胞、星状細胞およびニューロンにおける潜在的ウイルス感染は持続する。疾患は感染後約２５～３０日目に症状を示す。

【０７９３】

ウイルス感染症の急性期および慢性期に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２３、２４、２５および２６）の治療効果は、ＴＭＥＶ－ＩＤＤモデルにおいてウイルス排除および疾患重症度を評価することによって調査する。

【０７９４】

方法：

雌性ＳＪＬ／Ｊマウス（５～６週）の右大脳半球に、3×10^{7}プラーク形成単位（ＰＦＵ）のＴＭＥＶ　ＢｅＡｎ株８３８６を含む無血清培地３０μｌを頭蓋内接種することによって、マウスをＴＭＥＶに感染させる。感染の２日後から、コントロールＩｇ、ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質を、それぞれ１００μｇ／投与で３回／週、２週間にわたって投与することによりマウスを治療する。

【０７９５】

マウスの臨床スコアを追跡調査する。感染後７日目および１４日目において（すなわち、治療を３回行った後および治療を６回行った後）、各治療群の５匹のマウスから脳および脊髄を採取し、プラークアッセイに使用する。プラークアッセイの終了後にＣＮＳ組織のＰＦＵ／ｍｇの比率を算出するため、組織の重量を計測しておく。

【０７９６】

ＴＭＥＶプラークアッセイ：

感染後７日目および１４日目において、ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質もしくはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２３、２４、２５および２６）、またはコントロールＩｇ（マウスＩｇＧ２ａ）で処置したマウスの脳および脊髄を、麻酔をかけたマウスから灌流せずに採取する。脳および脊髄の重量を計測しホモジナイズする。ＣＮＳホモジネートをＤＭＥＭで段階的に希釈して、組織培養処理プレート中のコンフルエントなＢＨＫ－２１細胞に加え、周期的な緩やかに揺らしながら室温で１時間インキュベートする。

【０７９７】

培地／寒天溶液を１：１（容積：容積）を混合して細胞に加え、室温で凝固させる。次いで、プレートを３４℃で５日間培養する。培養の終了後、ＢＨＫ単層を固定するため、ホルマリン１ｍｌを添加し室温で１時間インキュベートする。ホルマリンを廃液容器に廃棄し、寒天をプレートから取り外す。クリスタルバイオレットで５分間染色することによりプラークを可視化し、プレートをdiH_2Oで穏やかにすすぐ。各プレートのプラーク数にホモジネートの希釈倍率を掛け、次いで、各プレートに加えたホモジネートの量で割ることにより、ホモジネート中ＰＦＵ／ｍｌを決定する。ＰＦＵ／ｍｌを組織の重量で割って、組織中ＰＦＵ／ｍｇを算出する。

【０７９８】
実施例３９
マウスインフルエンザモデルのウイルス感染における一次および二次免疫応答に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果の評価
ウイルス感染による一次免疫応答および二次免疫応答に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２３、２４、２５および２６）の効果を試験するため、Teijaro et al., J Immunol. 2009: 182; 5430-5438および以下に記載の方法で作製された、ＢＡＬＢ／ｃ　ナイーブマウス（一次免疫応答用）および「ＨＡメモリーマウス」ならびに「ポリクローナルインフルエンザメモリーマウス」（メモリーＣＤ４Ｔ細胞によって媒介される二次応答の評価用）を使用する。
【０７９９】
「ＨＡメモリーマウス」を得るために、まず、ＨＡ特異的メモリーＣＤ４Ｔ細胞を作製する。ＨＡ－ＴＣＲマウス［インフルエンザ赤血球凝集素（ＨＡ）ペプチド（１１０－１１９）に特異的なトランスジェニックＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）を発現するＢＡＬＢ／ｃ－ＨＡマウス］の脾臓からナイーブＣＤ４Ｔ細胞を精製し、５．０μｇ／ｍｌ　ＨＡペプチドおよびマイトマイシンＣで処理しかつＴ細胞を除去したＢＡＬＢ／ｃ脾細胞をＡＰＣとして使用して３７℃で３日間培養することにより、インビトロにおいてプライミングする。得られた活性化ＨＡ特異的エフェクター細胞を、コンジェニック系ＢＡＬＢ／ｃ（Ｔｈｙ１．１）宿主（５×１０^{6}細胞／マウス）に移入して、ＨＡ特異的メモリーＣＤ４Ｔ細胞の安定した集団としての「ＨＡメモリーマウス」を得る。
【０８００】
「ポリクローナルメモリーマウス」得るためには、ＰＲ８インフルエンザの亜致死量をＢＡＬＢ／ｃマウスに鼻腔内感染させ、感染の２～４ヶ月後にＣＤ４Ｔ細胞を単離し、ＥＬＩＳＰＯＴを使用してインフルエンザに特異的なメモリーＣＤ４Ｔ細胞の頻度を決定することにより、ポリクローナルなインフルエンザ特異的メモリーＣＤ４Ｔ細胞をまず作製する。あらかじめプライミングしたマウスから得られたＣＤ４Ｔ細胞をＢＡＬＢ／ｃ宿主に移入し、内因性Ｔ細胞の完全な亜集団を備えた「ポリクローナルインフルエンザメモリー」マウスを作製する。
【０８０１】
ナイーブＢＡＬＢ／ｃマウスまたはＢＡＬＢ／ｃ－ＨＡメモリーマウスおよびＢＡＬＢ／ｃ「ポリクローナルインフルエンザメモリーマウス」に、亜致死量または致死量のＰＲ８インフルエンザウイルスを鼻腔内投与により感染させることによって、インフルエンザウイルスに対する一次応答および二次応答を試験する。
【０８０２】
インフルエンザチャレンジの前後において、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５もしくはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、またはｍＩｇＧ２ａコントロールでマウスを処置する。体重減少および死亡率のモニタリングを毎日行う。チャレンジの６日後、気管支肺胞洗浄（ＢＡＬ）を採取して洗浄液中のウイルス含有量を分析し、ＭＤＣＫ細胞における５０％組織培養感染量（ＴＣＩＤ５０）を決定することによって上清中のウイルス含有量を試験する。さらに、肺組織の組織病理学的調査を実施する。
【０８０３】
Ｔ細胞増殖に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果を試験するために、感染後３日目、４日目および５日目において、ＢＡＬＢ／ｃまたはＢＡＬＢ／ｃ－ＨＡメモリーマウスまたは、ＢＡＬＢ／ｃ「ポリクローナルインフルエンザメモリーマウス」を上記と同様にして感染させ、ＢｒｄＵ（１ｍｇ／投与）を投与する。６日目に、脾臓および肺を採取し、ＢｒｄＵの取り込みを評価する。また、インビトロにおいて、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５

もしくはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質またはＩｇＧ２ａの存在下、ＨＡペプチドで１８時間刺激したＨＡ特異的メモリーＣＤ４Ｔ細胞を用いて、インフルエンザチャレンジの際の肺のメモリーＣＤ４Ｔ細胞によるサイトカイン産生についても調査する。

【０８０４】

実施例４０

マウスインフルエンザモデルのウイルス感染における一次および二次ＣＤ８Ｔ細胞応答に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５　またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果の評価

インフルエンザウイルスよる一次ＣＤ８Ｔ細胞応答に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２３、２４、２５および２６）の効果を、鼻腔内投与または腹腔内投与によりインフルエンザＡ型ＨＫｘ３１に感染させたＣ５７ＢＬ／６マウスを使用し、文献（Hendriks et al., J Immunol 2005;175;1665-1676; Bertram et al., J Immunol. 2004;172:981-8）に記載の方法に従って調査する。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５もしくはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質またはｍＩｇＧ２ａコントロールはプライミング中に投与する。マウスの体重減少および死亡率のモニタリングを毎日行う。ウイルス特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を追跡調査するため、主要なＣＤ８Ｔ細胞エピトープを搭載させたＭＨＣ　Ｈ－２Ｄ^{b}四量体、すなわちＮＰ$_{366-374}$ペプチドを使用する。肺、排出リンパ節および脾臓におけるウイルス特異的Ｈ－２Ｄ^{b}／ＮＰ$_{366-374}$$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞は、感染後約８日目～１０日目でピークに達し、その後わずか１．５％まで減少することが予想される（Hendriks et al J Immunol 2005;175;1665-1676; Bertram et al., J Immunol. 2002 ;168:3777-85; Bertram et a., J Immunol. 2004;172:981-8）。したがって、感染後８日目および２１日目にマウスを屠殺し、肺、排出リンパ節および脾臓におけるウイルス特異的ＣＤ８Ｔ細胞の数を評価する。ウイルス排除を評価する。上記の記載（Bertram et al., J Immunol. 2004;172:981-8）および以下の詳述に従った細胞内ＩＦＮ－γ染色およびＣＴＬ活性などにより、脾細胞懸濁液を用いてＣＤ８Ｔ細胞応答を評価する。

【０８０５】

ＦＩＴＣ結合抗マウスＣＤ６２ＬおよびＰＥ結合抗マウスＣＤ８で細胞を表面染色して、ＣＤ８$^{+}$活性化Ｔ細胞を測定する（または抗マウスＣＤ４を使用してＣＤ４$^{+}$細胞を測定する）。これらの抗体に加えて、マウスクラスＩ　ＭＨＣ分子Ｈ－２Ｄ^{b}、β$_{2}$－ミクログロブリンおよびインフルエンザＮＰペプチド（ＮＰ$_{366-374}$）からなるアロフィコシアニン標識四量体を使用して、インフルエンザ特異的ＣＤ８Ｔ細胞を測定する。細胞内ＩＦＮ－γの染色を行うため、１μＭ　ＮＰ$_{366-374}$ペプチドおよびＧｏｌｇｉＳｔｏｐ（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ（カリフォルニア州サンディエゴ））を用いて、培養培地中において３７℃で６時間にわたり細胞懸濁液を再び刺激する。次いで、細胞を採取し、ＰＢＳ／２％ＦＣＳ／アジ化物中に再懸濁し、上記のＰＥ－抗－ＣＤ８およびＦＩＴＣ－抗－ＣＤ６２Ｌで染色表面する。表面染色後、Ｃｙｔｏｆｉｘ／Ｃｙｔｏｐｅｒｍ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）で細胞を固定し、次いで１×ｐｅｒｍ／ｗａｓｈ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）で希釈したアロフィコシアニン結合抗マウスＩＦＮ－γで染色する。試料をフローサイトメトリーで分析する。

【０８０６】

細胞毒性アッセイ（ＣＴＬ応答）を行うため、インフルエンザに感染したマウスから得られた脾細胞を３７℃で２時間インキュベートして付着細胞を除去する。Ｂｅｒｔｒａｍ　ｅｔ　ａｌ　２００２　ａｎｄ　Ｂｅｒｔｒａｍ　ｅｔ　ａｌ　２００４の記載に従い、３倍ずつ段階希釈したエフェクター細胞を使用して、５０μＭ　ＮＰ$_{366-374}$ペプチドで６時間かけてパルス標識した^{51}Ｃｒ標識ＥＬ４細胞に対する、該エフェクター細胞の抗インフルエンザＮＰ$_{366-374}$特異的ＣＴＬ活性について分析する。

【０８０７】

感染の３週間後、中和抗体が二次ＣＴＬ応答を制限しないように、血清学的に異なるインフルエンザＡ型／ＰＲ８／３４（ＰＲ８）（インフルエンザＡ型ＨＫｘ３１とＮＰ遺伝子を共有しているが、赤血球凝集素およびノイラミニダーゼが異なっている）を用いて何匹かのマウスを再チャレンジさせる。ＨｅｎｄｒｉｋｓらおよびＢｅｒｔｒａｍら（Hendriks et al., J Immunol 2005;175;1665-1676; Bertram et al., J Immunol. 2004;172:981-8）の記載および上記の詳述に従って、ウイルス再チャレンジ後５日目および７日目にマウスを屠殺し、肺、排出リンパ節および脾臓におけるウイルス特異的ＣＤ８Ｔ細胞の数を評価する。上述のように、細胞内ＩＦＮ－γ染色およびＣＴＬ活性を含む、二次ＣＤ８Ｔ細胞応答を、ウイルス再チャレンジ後５日目および７日目においてマウスの脾細胞懸濁液を用いて評価する。

【０８０８】

二次応答におけるメモリーＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の増殖および蓄積に対するＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果を決定するために、上述の方法（Hendriks et al., J Immunol 2005;175;1665-1676; Bertram et al., J Immunol. 2004;172:981-8）に従って、養子移入実験を実施する。インフルエンザＡ型ＨＫｘ３１でマウスを免疫する。２１日後に、マウスＴ細胞免疫細胞濃縮カラム（Ｃｅｄａｒｌａｎｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（カナダ国オンタリオ州ホーンズビー））を用いて脾臓からＴ細胞を精製し、ＣＦＳＥで標識する（あるいは、Ｔｈｙ１．１コンジェニック系マウスをレシピエントとして使用する）。同数の四量体陽性のＴ細胞をレシピエントマウスの尾静脈に注射する。上述のようにマウスをインフルエンザウイルスに再チャレンジさせ、７日後に、上述のように脾細胞中のドナーウイルス特異的ＣＤ８Ｔ細胞について評価する。

【０８０９】

実施例４１

疲弊Ｔ細胞におけるタンパク質の発現、ならびにＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の疲弊Ｔ細胞表現型への結合および疲弊Ｔ細胞表現型に対する改善効果の評価

メモリーＣＤ８Ｔ細胞の分化は、急性ウイルス感染後と慢性ウイルス感染後とで異なった経路に沿って進む（Klenerman and HillNat Immunol 6, 873-879, 2005）。急性ウイルス感染後に産生されるメモリーＣＤ８Ｔ細胞は機能性が高く、防御免疫の重要な構成要素である。これとは対照的に、慢性感染症は、様々な程度のウイルス特異的Ｔ細胞応答の機能障害を特徴とすることが多く、この機能障害が、持続感染している病原体を宿主が排除できない主な理由となっている。機能性エフェクターＴ細胞は、当初は感染の初期段階において産生されるが、感染が慢性化するのに伴い徐々にその機能を失い、Ｔ細胞の機能障害を特徴とする疲弊表現型が発生する。

【０８１０】

調査Ｉ．感染ウイルスの排除、ならびに急性および慢性ウイルス感染におけるＴ細胞機能に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果

急性および慢性ウイルス感染におけるＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２３、２４、２５および２６）の効果は、Wherry et al J. Virol. 77: 4911-4927, 2003およびBarber et al Nature, 2006によって記載された方法論ならびに以下に詳述する方法論に従い、ＬＣＭＶ（リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス）感染症を有するマウスモデルにおいて評価する。

【０８１１】

成体マウスにおいて急性または慢性の感染症を引き起こすことができる２種のＬＣＭＶ株、すなわち１週間以内に排除されるＡｒｍｓｔｒｏｎｇ株と、数ヶ月間にわたりうる持

続感染を確立するクローン１３株とを使用する。これらの２種の株は、公知のＴ細胞エピトープをすべて保存しつつ、２個のアミノ酸においてのみ相違することから、急性または慢性のウイルス感染後に同じＣＤ８Ｔ細胞応答を追跡することが可能である。Ａｒｍｓｔｒｏｎｇ株による急性感染症の後に極めて強力なメモリーＣＤ８Ｔ細胞が産生されるのとは対照的に、持続的なクローン１３株による感染ではＬＣＭＶ特異的ＣＤ８Ｔ細胞は疲弊してしまう（Wherry et al J. Virol. 77: 4911-4927, 2003; Barber et al., Nature. 2006;439:682-7）。

【０８１２】

２×１０^{5}ＰＦＵのＬＣＭＶ Ａｒｍｓｔｒｏｎｇ株を腹腔内投与することによってマウスを感染させて急性感染症を発症させ、または２×１０^{6}ＰＦＵのＣｌ－１３を静脈内投与することにより慢性感染症を発症させる。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５もしくはＬＳＲ ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、またはｍＩｇＧ２ａコントロールと、特異的抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ、抗ＶＳＩＧ１０、抗ＴＭＥＭ２５もしくは抗ＬＳＲ抗体またはアイソタイプコントロールとを腹腔内投与することによってマウスを処置する。

【０８１３】

ＤｂＮＰ$_{396-404}$およびＤｂＧＰ$_{33-41}$などの、急性感染症と慢性感染症とで異なっているウイルス特異的ＭＨＣ四量体エピトープを使用して、マウス脾臓中のウイルス特異的ＣＤ８Ｔ細胞の数をモニタリングする。Wherry et al J. Virol. 77: 4911-4927, 2003に記載されているように、かつ実施例４０の記載と同様に、細胞内サイトカインレベルおよびＣＴＬ活性などのＣＤ８Ｔ細胞機能アッセイを実施する。さらなるアッセイとして、ウイルス特異的エピトープによる刺激後の脾細胞による産生；ならびに血清中、脾臓、肝臓、肺および腎臓におけるウイルスの力価の評価が挙げられる（Wherry et al J. Virol. 77: 4911-4927, 2003; Barber et al., Nature. 2006;439:682-7）。

【０８１４】

調査II. Ｔ細胞の疲弊におけるＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲまたはそれらの対応レセプターによる制御を調査するための、疲弊Ｔ細胞におけるＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲの発現、ならびに疲弊Ｔ細胞へのＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の結合の評価

Ｃｌ－１３株で誘導した慢性ＬＣＭＶ感染症を有するマウスからＴ細胞を単離する。ポジティブコントロールとしての蛍光標識抗ＰＤ－１抗体（ＰＤ－１は疲弊Ｔ細胞により高発現される）と、ビオチン化ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、またはビオチン化抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ、抗ＶＳＩＧ１０、抗ＴＭＥＭ２５および抗ＬＳＲ融合タンパク質抗体と、それぞれのアイソタイプコントロールとを用いて細胞を共染色する。蛍光標識したストレプトアビジンを使用したＦＡＣＳ分析によって結合を検出する。

【０８１５】

実施例４２

濾胞ヘルパーＴ（Ｔｆｈ）細胞におけるＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質の発現、ならびにＴｆｈ細胞へのＩｇ融合タンパク質の結合の評価

濾胞ヘルパーＴ（Ｔｆｈ）細胞は、Ｂ細胞の補助に特化したＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞サブセットである（Crotty, Annu. Rev. Immunol. 29: 621-663, 2011において再検討されている）。Ｔｆｈ細胞は、リンパ節内のＢ細胞濾胞に移行し、Ｔ細胞領域とＢ細胞濾胞の境界において対応するＢ細胞（ｃｏｇｎａｔｅ Ｂ ｃｅｌｌ）と相互作用し、次いで、胚中心Ｂ細胞への分化および濾胞内における胚中心形成を誘導する（Crotty, Annu. Rev. Immunol. 29: 621-663, 2011において再検討されている）。Ｂ細胞の補助にＴｆｈ細胞が必要であることおよびＴ細胞依存性抗体応答は、この細胞が様々な種類の感染性因子に対する感染防御免疫や合理的なワクチン設計に非常に重要であることを示している。

【０８１６】

Ｔｆｈ細胞は、急性リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（ＬＣＭＶ）感染症に対するＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞応答のピークにおいて、ＣＸＣＲ５^{hi}ＳＬＡＭ^{lo}ＢＴＬＡ^{hi}ＰＤ１^{hi}Ｂｃｌ６$^{+}$ウイルス特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞として容易に識別可能である（Choi et al 2011, Immunity 34: 932-946）。２×１０^{5}ＰＦＵのＬＣＭＶ　Ａｒｍｓｔｒｏｎｇ株を腹腔内投与することにより誘導した急性ＬＣＭＶ感染症を有するマウスからＴ細胞を単離する。Ｔｆｈ細胞に高発現されるＴｆｈマーカー（ＣＸＣＲ５、ＰＤ１、ＢＴＬＡ、Ｂｃｌ６）に対する蛍光標識抗体と、ビオチン化ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５、およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、またはＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲに特異的なビオチン化抗体と、それぞれのアイソタイプコントロールとを用いて細胞を共染色する。蛍光標識したストレプトアビジンを使用したＦＡＣＳ分析によってＦｃ融合タンパク質または抗体の結合を検出する。

【０８１７】

実施例４３

濾胞ヘルパーＴ（Ｔｆｈ）細胞の産生および活性に対するＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ－Ｉｇ融合タンパク質の効果の評価

Ｔｆｈの分化およびインビボＢ細胞免疫の発生に対するＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果を調べるために、ＬＣＭＶ（リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス）のＡｒｍｓｔｒｏｎｇ株による急性ウイルス感染症の全経過において、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質と、アイソタイプコントロールとを用いてＣ５７ＢＬ／６を処置する。Ｔｆｈの分化およびＢｃｌ６タンパク質発現は、Eto et al 2011 (PLoS One 6: e17739)に記載されているようなＦＡＣＳ分析によって評価する。ＬＣＭＶ感染症の８日後に脾細胞を分析し、ＦＡＣＳ分析によってＴｆｈの産生（ＣＤ４４^{hi}ＣＸＣＲ５^{hi}ＳＬＡＭ^{lo}）およびＢｃｌ６の発現を評価する。さらに、Eto et al 2011 (PLoS One 6: e17739)に記載されているように、抗原特異的Ｂ細胞応答に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２３、２４、２５および２６）の効果を、ＬＣＭＶ感染症の８日後の血清中の抗ＬＣＭＶ　ＩｇＧの力価の測定、およびＣＤ１９$^{+}$脾細胞にゲーティングした感染８日後における、形質細胞（ＣＤ１３８$^{+}$ＩｇＤ$^{-}$）の産生のＦＡＣＳ分析による定量などで評価する。

【０８１８】

実施例４４

ＮＯＤマウス、ＣＤ２８－ＫＯ　ＮＯＤおよびＢ７－２－ＫＯ　ＮＯＤにおける１型糖尿病の調節に対するＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果

ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果を、１型糖尿病マウスモデルとして広く使用されている自然発症非肥満性糖尿病（ＮＯＤ）マウスにおいて調査する。ＮＯＤマウスでは、特発性膵島炎（特徴的病変）がいくつかの特徴的な段階を経て発症し、膵島周囲炎（ｐｅｒｉ－ｉｎｓｕｌｉｔｉｓ）から始まり、浸潤性および破壊性の膵島炎ならびに顕性糖尿病で終わる。膵島周囲炎は３～４週齢において最初に観察され、浸潤性膵島炎は８～１０週齢において観察され、破壊性膵島炎は臨床的糖尿病を発症する直前に見られ、最も早い場合は１０～１２週齢において観察される。２０週齢の雌性ＮＯＤマウスの７０～８０％は糖尿病を発症する（Ansari et al 2003 J. Exp. Med. 198: 63-69）。

【０８１９】

２種のＫＯマウス：加速された糖尿病を発症するＣＤ－２８－ＫＯ　ＮＯＤマウスおよびＢ７－１／Ｂ７－２ダブルＫＯ　ＮＯＤマウス（Lenschow et al 1996 Immunity 5: 285-293; Salomon et al 2000 Immunity 12: 431-440）を使用する。

【０８２０】

調査Ｉ：

糖尿病の経過の早期および後期、発症前または発症後に、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０

、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２３、２４、２５および２６）を用いてＮＯＤマウスを処置することによって、この疾患の発病機序に対するこれらの化合物の効果を調査し、かつ、このような治療が疾患の発症を低下させ、発病機序を改善することを実証する。膵島炎に対する効果を調査するためには、血糖レベルを３回／週、２５週まで測定する（Ansari et al 2003 J. Exp. Med. 198: 63-69）。

【０８２１】

疾患修飾のメカニズムおよび作用機序を、種々のタイプの免疫細胞を実験的に評価することによって調査する。膵臓、膵臓のリンパ節（ＬＮ）および脾臓を採取し、Ｔｒｅｇ、Ｔｈサブタイプおよびｃｄ８Ｔ細胞、ならびに樹状細胞（ＤＣ）およびＢ細胞を得る。ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７、ＩＬ－４、ＩＬ－１０およびＴＧＦｂに注目して、膵臓、膵臓のリンパ節（ＬＮ）および脾臓から単離した細胞のサイトカイン分泌に対する効果を分析する。化合物の効果を試験した後、種々のタイプの免疫細胞（Ｔｒｅｇ、Ｔｈサブタイプおよびｃｄ８Ｔ細胞、ならびに樹状細胞（ＤＣ）およびＢ細胞を含む）、サイトカイン（ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１７、ＩＬ－４、ＩＬ－１０およびＴＧＦｂ）、ならびに組織学的分析を評価することによって、疾患修飾のメカニズムを調査する。膵臓の組織学的分析を実施して、膵島炎の発症およびリンパ球の浸潤を比較する。

【０８２２】

調査II：養子移入モデルにおける１型糖尿病の調節に対するＬＹ６Ｇ６Ｆ－Ｉｇ融合タンパク質の効果

Ｉｇ融合タンパク質の作用機序をさらに調査するために、糖尿病養子移入モデルを使用する。糖尿病または糖尿病前症のＮＯＤドナーから得たＴ細胞をＮＯＤ　ＳＣＩＤレシピエントマウスに移入する。これらのマウスを糖尿病の発症についてモニタリングする。尿中糖および血糖を測定し、膵臓の組織学的評価を行い、上記の実施例に記載したようにＴ細胞応答をモニタリングする。

【０８２３】

調査III：

さらに、活性化したＣＤ４$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$ＢＤＣ２．５Ｔ細胞（膵島特異的ペプチド１０４０－ｐ３１を認識するＴＣＲを有するトランスジェニックを１０４０－ｐ３１とともにインキュベートすることによって活性化したもの）をＮＯＤレシピエントに移入することによって、糖尿病を誘導する。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５もしくはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ｍＩｇＧ２ａコントロール、またはポジティブコントロールでマウスを処置する。処置は移入の１日後に開始する。移入後１０～２８日間にわたりマウスの糖レベルを追跡調査する（Bour-Jordan et al., J Clin Invest. 2004;114(7):979-87）。

【０８２４】

処置後７日間、膵細胞、脾細胞、膵臓のリンパ節（ＬＮ）の細胞、および末梢リンパ節細胞を抽出し、種々の免疫細胞集団について試験する。さらに、ｐ３１ペプチドに応答したエクスビボ増殖およびサイトカイン分泌を試験することにより、リコール応答を測定する。

【０８２５】

上記の調査において、ＬＹ６Ｇ６Ｆ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質は、疾患の発症を防ぐか、疾患の重症度を低下させる。

【０８２６】

実施例４５

ループスマウスモデルにおける、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果

調査Ｉ：

ループスを発症する傾向のあるマウスモデル（ＮＺＢ×ＮＺＷ）（Ｆ１（Ｂ／Ｗ））を使用する。シクロホスファミド（ＣＴＸ）は、腎臓のループス患者におけるびまん性増殖

性糸球体腎炎に最初に使用される薬剤であり、ＣＴＸとＣＴＬＡ４－Ｉｇとの併用治療は、それぞれの薬剤を単独で使用した場合よりも、進行性腎炎を有するＮＺＢ／ＮＺＷ　Ｆ１ループスマウスの腎臓病の改善および生存率の延長においてより効果的であることがＤａｉｋｈおよびＷｏｆｓｙにより報告されている（Daikh and Wofsy, J Immunol, 166(5):2913-6 (2001)）。この概念を実証するための調査では、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質およびＣＴＸによる処置を、これらのタンパク質を単独で使用して、またはＣＴＸと組み合わせて試験を行う。

【０８２７】

タンパク質による処置の３日前に血液試料を採取し、処置中１週間おきおよび処置後に、ＥＬＩＳＡによって血漿中抗ｄｓＤＮＡ自己抗体を分析する。糸球体腎炎は腎臓の組織学的分析により評価する。タンパク尿は、尿試験紙を使用して新鮮尿試料を試験することにより測定する。

【０８２８】

ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２３、２４、２５および２６）は、少なくともループス腎炎の改善に有益な効果を有する。

【０８２９】

調査II：

ＮＺＭ２４１０由来のＳＬＥマウスモデルであるＢ６．Ｓｌｅ１．Ｓｌｅ２．Ｓｌｅ３マウスモデルを使用する。ＮＺＭ２４１０は、高い浸透度を有する早発型ループス様疾患を発症するＮＺＢおよびＮＺＷから作製された組換え近交系である（Blenman et al 2006 Lab. Invest. 86: 1136-1148）。上述するようにこのモデルにおいてタンパク尿および自己抗体を評価することによって、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果を調査する。

【０８３０】

調査III：

誘導ループスモデルを使用する。このモデルは、正常マウス株（Ｂ６．Ｃ－Ｈ２（ｂｍ１２）／ＫｈＥｇ（ｂｍ１２）など）由来のＩａ不適合脾細胞を別の株（Ｃ５７ＢＬ／６など）に移入することによって誘導された慢性移植片対宿主（ｃＧＶＨ）病に基づいており、抗二本鎖ＤＮＡ（抗ｄｓＤＮＡ）自己抗体の産生および免疫複合体型増殖性糸球体腎炎を含む、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）に類似した自己免疫症候群を引き起こす（Appleby et al Clin. Exp. Immunol. 1989 78: 449-453; Eisenberg and Choudhury 2004 Methods Mol. Med. 102:273-284）。このモデルにおけるループスは、ｂｍ１２マウス由来の脾細胞をＣ５７ＢＬ／６レシピエントに注射することによって誘導される。上述するようにこのモデルにおいてタンパク尿および自己抗体を評価することによって、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果を調査する。Ｔ細胞応答およびＢ細胞応答も評価する。

【０８３１】

調査IV：

ＭＲＬ／ｌｐｒループスを発症する傾向のあるマウスモデルを使用する。上述するようにこのモデルにおいてタンパク尿および自己抗体を評価することによって、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果を調査する。

【０８３２】

実施例４６

腸の炎症の制御における、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果

マウス大腸炎を養子移入したマウスモデルを使用する。ＢＡＬＢ／ｃマウス由来のＣＤ４５ＲＢ^{ｈｉｇｈ}－ＣＤ４$^{+}$ナイーブＴ細胞を同系ＳＣＩＤマウスに移入すると、Ｔ細胞再構築の６～１０週間後にヒトのクローン病に類似したＩＢＤ様症候群を発症する。

【０８３３】
ＳＣＩＤマウスは、同系ＣＤ４５ＲＢ^{hi}^{gh}－ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の単独移入、または同系ＣＤ４５ＲＢ^{low}－ＣＤ４$^{+}$もしくはＣＤ２５$^{+}$ＣＤ４$^{+}$細胞とともに共移入を行う腹腔内注射によって再構築する（各細胞集団につき４×１０^{5}個／マウス）（Liu et al., J Immunol. 2001; 167(3): 1830-8）。正常マウスの脾臓由来の同系ＣＤ４５ＲＢ^{hi}^{gh}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を用いて再構築した大腸炎性ＳＣＩＤマウスに、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５もしくはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質またはＩｇアイソタイプコントロールの腹腔内注射を行う処置をＴ細胞移入時から開始し、週に２回、８週目まで実施する。すべてのマウスに対して、体重、軟便または下痢、および直腸脱のモニタリングを毎週行う。すべてのマウスは、Ｔ細胞の移入から８週間後、または元の体重から２０％の体重減少を示した後に屠殺する。結腸組織を採取して組織学的検査および細胞学的検査を行う。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質は、少なくとも炎症性腸疾患の改善に有益な効果を有する。
【０８３４】
実施例４７
乾癬モデルにおける、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果
調査Ｉ：乾癬ＳＣＩＤ異種移植片モデルの確立
ヒト乾癬プラークをＳＣＩＤマウスに移植する。乾癬のための全身療法または光線療法を６ヶ月間一切受けておらず、皮膚軟化剤以外の局所調製剤による治療を６週間受けていない、皮膚全体の５～１０％に全身性の乾癬プラークを有する患者から薄片生検（２．５×２．５ｃｍ）を採取する。大腿または腕の活性なプラークからも生検を得る。生検により得られたそれぞれの薄片を約１ｃｍ^{2}のサイズに４等分する。それぞれの薄片を別個のマウスに移入する。
【０８３５】
全身麻酔下において、７～８週齢のＣＢ１７　ＳＣＩＤマウスの背部の毛を剃り、下層の背部筋肉を覆う筋膜上の血管叢を無傷のまま残して全層皮膚試料を除去し、約１ｃｍ^{2}の移植床を作製する。次いで、薄片生検によって得られた中間層ヒト皮膚を移植床に同所性に移入する。Ｎｅｘａｂａｎｄ（動物用液体絆創膏）（Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（アリゾナ州フェニックス））を使用して、ヒト皮膚をマウス皮膚に接着し、抗生物質軟膏（バシトラシン）を塗布する。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５もしくはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、アイソタイプコントロール、またはＣＴＬＡ４－Ｉｇ（ポジティブコントロール）を週３回、４週間にわたって腹腔内投与することによりマウスを処置する。
【０８３６】
調査期間の０日目（処置前）および２８日目（処置後）にパンチ生検（２ｍｍ）を得る。生検を急速凍結して、組織病理学検査および免疫組織化学的検査のための凍結切片を作製する。治療効果は、以下の処置前および処置後のデータを比較することによって決定する。（ｉ）表皮の厚さに対する効果を決定するための乳頭間突起の長さ、および（ii）炎症性浸潤細胞に対する効果を決定するための浸潤した単核リンパ球レベル（Raychaudhuri et al. 2008, J Invest Dermatol.;128(8):1969-76; Boehncke et al., 1999 Arch Dermatol Res 291:104-6）。
【０８３７】
ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２３、２４、２５および２６）は、少なくとも乾癬の改善に有益な効果を有する。
【０８３８】
調査II：ＳＣＩＤマウスにＣＤ４５ＲＢ^{hi}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を養子移入した乾癬および大腸炎モデルにおける、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲの効果
０．３×１０^{6}個のＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＢ^{hi}細胞を免疫不全マウスに静脈内（ｉ．ｖ

．）注射する。細胞を養子移入した翌日に、１０μｇのブドウ球菌腸毒素Ｂをマウスに腹腔内（ｉ．ｐ．）注射する（Davenport et al., Int Immunopharmacol. 2002 Apr;2(5):653-72）。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５もしくはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２３、２４、２５および２６）、アイソタイプコントロール、またはＣＴＬＡ４－Ｉｇ（ポジティブコントロール）でレシピエントマウスを処置する。マウスの体重減少および皮膚病変の存在を、週１回、８週間にわたって評価する。

【０８３９】

得られる結果は上記のものと類似している。

【０８４０】

実施例４８

移植拒絶反応の調節における、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果

調査Ｉ：同種異系膵島を移植した糖尿病マウスモデルにおける、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲの効果

移植拒絶反応に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２３、２４、２５および２６）の効果を試験するために、同種異系膵島移植モデルを使用する。Ｃ５７ＢＬ／６マウスをストレプトゾトシンで処置することによって糖尿病を誘導する。７日後に、ＢＡＬＢ／ｃドナーマウスから単離した膵島をマウスの腎臓被膜下に移植する。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５もしくはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、またはネガティブコントロールとしてのｍＩｇＧ２ａでレシピエントマウスを処置する。ＥＣＤＩで固定したドナー脾細胞に対する寛容を、膵島移植片の拒絶の調節に成功した際のポジティブコントロールとして使用する。移植片受容／拒絶の基準として、レシピエントマウスの血糖レベルをモニタリングする（Luo et al., PNAS, September 23, 2008_vol. 105_no. 38_ 14527-14532）。

【０８４１】

調査II：皮膚移植片拒絶Ｈｙａモデルにおける、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲの効果

ヒトおよび特定の実験用マウス株においては、雌性の免疫系は、組織適合性Ｙ染色体コード抗原（ｈｉｓｔｏｃｏｍｐａｔｉｂｉｌｉｔｙ－Ｙ　ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ　ｅｎｃｏｄｅｄ　ａｎｔｉｇｅｎ）（Ｈｙａ）を認識することによって雄性の組織を非自己と認識し、これを破壊する。雄性組織の破壊はヘルパーＴに依存的に細胞傷害性リンパ球によって行われると考えられる。

【０８４２】

移植に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質（配列番号２３、２４、２５および２６）の効果を試験するために、雄性Ｃ５７ＢＬ／６ドナー由来の尾部皮膚移植片を雌性Ｃ５７ＢＬ／６マウスに移植したＨｙａモデル系を使用する。

【０８４３】

この調査では、週齢が同じである雄性Ｃ５７ＢＬ／６マウス由来の尾部の分層皮膚を雌性Ｃ５７ＢＬ／６マウスに同所性に移植する。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５もしくはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、またはアイソタイプコントロールｍＩｇＧ２ａでマウスを処置する。免疫優性ＨｙａコードＣＤ４エピトープ（Ｄｂｙ）を付加した雌性脾臓白血球（Ｄｂｙ－ＳＰ）を、移植片拒絶の調節に成功した際のポジティブコントロールとして使用する（Martin et al., J Immunol. 2010 September 15; 185(6): 3326-3336）。皮膚移植片の浮腫、色素の退色および脱毛の採点評価を毎日行う。完全に脱毛し、色素の退色が８０％を上回ったときに、拒絶されたと定義する。さらに、様々な時間点において脾臓および排出リンパ節から単離した細胞を用いて、ＣＤ４特異的なエピトープ（Ｄｂｙ）、ＣＤ８エピトープ（ＵｔｙおよびＳｍｃｙ）、または関連性がないペプチド（ＯＶＡ　３２３－３３９）に応答したＴ細胞のリコール応答を調査する。この調査では、増殖およびサイトカイン分泌のポジティブコントロールとして、抗ＣＤ３による刺

激を使用する。
【０８４４】
調査III：
移植片拒絶に対する、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５およびＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質の効果を、上記のＨｙａモデル系を使用した同系骨髄細胞移植マウスモデルにおいて調査する。ＣＤ４５．１マーカーを発現する雄性造血細胞を、ＣＤ４５．２コンジェニックマーカーを発現する雌性宿主マウスに移植する。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５もしくはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｉｇ融合タンパク質、またはアイソタイプコントロールｍＩｇＧ２ａで雌性宿主を処置する。雌性宿主を経時的に追跡調査し、ＣＤ４５．１$^{+}$細胞の存在をモニタリングする。
【０８４５】
実施例４９
本発明の実施形態の少なくともいくつかによるＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質の、がん免疫監視機構における調節物質としての役割の確立
１）インビボにおける概念実証
ａ）マウスがん同系モデル：
（ｉ）ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つ、またはコントロールとしての無関係なタンパク質を過剰発現している腫瘍細胞を遺伝学的に一致したマウスに移植する。次いで、腫瘍体積（およびマウスを屠殺した後の腫瘍重量）、ならびに腫瘍の排出リンパ節または脾臓から得た免疫細胞のエクスビボ分析を評価し、腫瘍の拒絶が遅延することを実証する（すなわち、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲを過剰発現する腫瘍は、無関係なコントロールタンパク質を過剰発現する腫瘍よりも早く成長する）。腫瘍の排出リンパ節から得た免疫細胞をエクスビボ分析することによって、制御性Ｔ細胞の頻度の増加、および刺激に対するエフェクターＴ細胞の応答性の低下が明らかになると予想される（Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．２０１１ Ｖｏｌ．２０８ Ｎｏ．３ ５７７-５９２）。
【０８４６】
（ｉｉ）ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つのマウスオーソログの細胞外ドメインと抗体Ｆｃフラグメントとの融合体（マウスＥＣＤ－Ｆｃ）（配列番号２３、２４、２５および２６）を使用したインビボ同系モデルは、以下のように試験する。Ｊ ｉｍｍｕｎｏｌ ２０１０; １８５;２７４７-２７５３に記載されているように、腫瘍の確立後、マウスＥＣＤ－ＦＣをＣ５７ＢＬ／６マウスに３～４日間隔で静脈内注射する。次いで、腫瘍体積（およびマウスを屠殺した後の腫瘍重量）、ならびに腫瘍の排出リンパ節または脾臓から得た免疫細胞のエクスビボ分析を評価する。マウスＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ　ＥＣＤ－ＦＣを用いた静脈内注射による処置の結果、腫瘍の拒絶が遅延する（すなわち、マウスＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ　ＥＣＤ－ＦＣで処置したマウスの腫瘍は、無関係なコントロールタンパク質で処置したマウスの腫瘍よりも早く成長する）。腫瘍の排出リンパ節から得た免疫細胞をエクスビボ分析することによって、制御性Ｔ細胞の頻度の増加、および刺激に対するエフェクターＴ細胞の応答性の低下が明らかになる。
【０８４７】
（ｉｉｉ）同系腫瘍の確立、ならびにＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質（１、３、５、７、１１、１４３、１３、１５～１７、１８、２８、２９～３２）のいずれか１つに対する中和抗体による治療
腫瘍細胞を遺伝学的に同一のマウスに移植する。腫瘍の確立後、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つに対する中和抗体を様々な用量でマウスに静脈内注射する。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つに特異的な中和抗体を静脈内注射することによる処置の結果、腫瘍の拒絶が増強する（すなわち、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、Ｔ

ＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つに対する中和抗体で処置したマウスの腫瘍は、無関係な抗体で処置したマウスの腫瘍よりも成長が遅くなる）。腫瘍の排出リンパ節から得た免疫細胞をエクスビボ分析することによって、制御性Ｔ細胞の頻度の減少、および刺激に対するエフェクターＴ細胞の応答性の上昇が明らかになる。

【０８４８】

ｂ）ヒトがん異種移植片モデル：

（ｉ）免疫不全にされたＮＯＤ　Ｃｇ－Ｐｒｋｄｃｓｃｉｄ　Ｉｌ２ｒｇｔｍ１Ｗｊｌ／ＳｚＪマウス（Ｊａｃｋｓｏｎ　ｌａｂ）（「ＮＳＧ」マウス）モデルにおける腫瘍免疫応答の再構築

ヒト腫瘍は、腫瘍抗原であらかじめ刺激したＡＰＣおよび／またはＴ細胞を使用し、ＮＳＧモデルにおいて確立する（がん標的細胞であらかじめ活性化したＣＤ８Ｔ細胞を担がんＮＳＧマウスに移入する）（移植／注射された細胞はすべてがん患者に由来する））。このモデルは以下の４群からなる：

１．ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つを過剰発現するＡＰＣ、

２．ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質（ｓｉＲＮＡまたはＳｈＲＮＡ）のいずれか１つがサイレンシングされたＡＰＣ、

３．ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つを過剰発現するがん細胞、

４．ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質（ｓｉＲＮＡまたはＳｈＲＮＡ）のいずれか１つがサイレンシングされたがん細胞。

ポジティブコントロール（たとえばＢ７－Ｈ１、ＰＤ－Ｌ１）、ネガティブコントロール（たとえばベクター、細胞単独）が含まれる。次いで、腫瘍体積または腫瘍転移およびマウスの生存率を調査する（Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．；２００６；Ｖｏｌ．２０３；ｐ.８７１-８８１）。ＡＰＣまたは腫瘍細胞における、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つの過剰発現は、腫瘍の拒絶を遅延させる（すなわち、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲのいずれかを過剰発現するＡＰＣまたは腫瘍細胞で処置したマウスの腫瘍は、無関係なコントロールタンパク質で処置したマウスの腫瘍よりも早く成長する）。ＡＰＣまたは腫瘍細胞における、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲのいずれかの（ｓｉＲＮＡまたはＳｈＲＮＡの）サイレンシングは、腫瘍の拒絶を増強させる。

【０８４９】

（ｉｉ）上記のＮＳＧがん異種移植片の確立（ＡＰＣおよび／またはがん細胞の遺伝子操作は行わない）ならびにＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つに対する中和抗体による処置

ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲのいずれかに対する中和抗体を使用してＮＳＧ異種移植片モデルを処置することによって、腫瘍の拒絶を増強させる。

【０８５０】

２）ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の活性のインビトロにおける検証

ａ）結合アッセイ：

（ｉ）ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ　ＥＣＤ－ＦＣタンパク質を用いた、活性化された初代培養ＮＫ細胞に対する結合アッセイは、Ｊ Immunol 2005;174;6692-6701の記載に従い実施する。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲのカウンターレセプターがＮＫ細胞上に発現されていれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｆｃの結合が観察される。

【０８５１】

（ｉｉ）ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つに対する特異的抗体を用いた、活性化された初代培養ＮＫ細胞に対する結合ア

ッセイは、PNAS, 2009, vol. 109; 17858-17863の記載に従い実施する。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲのいずれか１つがＮＫ細胞上に発現されていれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ特異的抗体の結合が観察される。

【０８５２】

（iii）ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ　ＥＣＤ－ＦＣタンパク質を用いた、ＮＫによる殺傷の標的細胞になりうる様々なヒトがん細胞株に対する結合アッセイは、J Immunol 2006;176;6762-6769の記載に従い実施する。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲのいずれか１つのカウンターレセプターが標的がん細胞上に発現されていれば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ　ＥＣＤ－Ｆｃの結合が観察される。

【０８５３】

ｂ）機能性ｋｉｌｌｉｎｇ　ａｓｓａｙ：

（ｉ）ｋｉｌｌｉｎｇ　ａｓｓａｙは過剰発現システム（ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つを過剰発現しているＮＫ細胞または標的がん細胞）を使用して行う。PNAS, 2009, vol. 109; 17858-17863に記載されているように、ＮＫ細胞（ｅｆｆｅｃｔｏｒ；ｅ）と、放射性（Ｓ３５）標識された標的がん細胞（ｔａｒｇｅｔ；ｔ）とを様々なｅ：ｔ比で共インキュベートする。次いで、ＮＫの殺傷活性による標的細胞の溶解を、放射線放射を測定することによって評価する。標的がん細胞および／またはＮＫ細胞株における、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つの過剰発現は、ＮＫ媒介性殺傷活性をダウンレギュレートする。

【０８５４】

（ii）PLoS ONE; 2010; Vol. 5; p. 1-10の記載に従い、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ　ＥＣＤ－ＦＣタンパク質の存在下において、ｋｉｌｌｉｎｇ　ａｓｓａｙを実施する。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲのいずれかのＥＣＤ－Ｆｃを用いた処置は、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲとこれらのカウンターレセプターとの相互作用を妨害することによって、これらの相互作用による阻害活性を減少させ、これによって殺傷活性が増強される。

【０８５５】

（iii）PNAS, 2009, vol. 109; 17858-17863の記載に従い、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つに対する中和抗体の存在下において、ｋｉｌｌｉｎｇ　ａｓｓａｙを実施する。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲのいずれかに対する中和抗体を用いた処置によって、ＮＫ殺傷活性が増強される。

【０８５６】

（iv）「リダイレクトされたｋｉｌｌｉｎｇ　ａｓｓａｙ」は以下のように行う。PNAS, 2009, vol. 109; 17858-17863に記載されているように、Ｆｃレセプターを高密度に発現する標的がん細胞を、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つに対する活性化抗体でコーティングし、（使用されたＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質を発現している）ＮＫ細胞と接触させる。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲのいずれか１つと活性化抗体との架橋によって、ＮＫ媒介性殺傷活性が低減される。

【０８５７】

３）発現分析

ａ）ヒト腫瘍生検から単離した細胞における、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質の発現

ｉ）ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つに対する特異的抗体を使用した、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５お

よび／またはＬＳＲタンパク質のいずれか１つの発現の検証は、腫瘍から得られた別々の細胞集団において実施する。J. Exp. Med. ; 2006; Vol. 203; p.871-881およびCancer res. 2007; 67; 8900-8905に記載されているように、様々な細胞集団（たとえば、腫瘍細胞、内皮、腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）および樹状細胞（ＤＣ）、Ｂ細胞、ならびに種々のＴ細胞（ＣＤ４、ＣＤ８およびＴｒｅｇ））を腫瘍生検から新たに単離し、腫瘍細胞、腫瘍間質、および免疫浸潤物におけるＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲのいずれかの発現を実証する。

【０８５８】

ii）結合アッセイは、腫瘍から得られた別々の細胞集団において、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ　ＥＣＤ－ＦＣタンパク質を用いて実施する。腫瘍生検から種々の細胞集団を単離し（たとえば、J. Exp. Med. ; 2006; Vol. 203; p.871-881およびCancer res. 2007; 67; 8900-8905に記載されているように腫瘍から新たに単離した、腫瘍細胞、内皮、腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）および樹状細胞（ＤＣ）、Ｂ細胞、ならびに種々のＴ細胞（ＣＤ４、ＣＤ８およびＴｒｅｇ））、腫瘍細胞、腫瘍間質および免疫細胞における、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲのいずれかのカウンターレセプターの発現を示す。

【０８５９】

ｂ）担がんマウスの排出リンパ節および脾臓から単離された細胞における、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質の発現

（ｉ）Clinical Cancer Research 1996 Vol. 2, 811-820に記載されているように、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質に対する特異的抗体を使用した、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質の発現の検証は、上皮がん細胞および腫瘍排出リンパ節から得られた免疫細胞と、担がんＣ５７マウスの脾臓とを比較することにより実施される。Ｂ１６（メラノーマ）、ＩＤ８（卵巣がん）およびＭＣ３８（結腸がん）の３つの異なるタイプのがんを試験して、腫瘍細胞、腫瘍排出リンパ節、および免疫細胞における、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲのいずれかの発現を示す。

【０８６０】

ii）上皮がんから単離された細胞および腫瘍排出リンパ節から得られた免疫細胞と、担がんＣ５７マウスの脾臓とを比較することによる、マウスＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ　ＥＣＤ－ＦＣタンパク質を使用した結合アッセイを上記のように実施し、腫瘍細胞、免疫細胞および腫瘍排出リンパ節における、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲのいずれかのカウンターレセプターの発現を示す。

【０８６１】

ｃ）Ｍ２極性化マクロファージにおける、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質の発現

（ｉ）ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質に対する特異的抗体を使用した、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質の発現の検証は、Nat. Immunol. 2010; Vol. 11; p. 889-896の記載に従い、末梢血から単離された初代単球をマクロファージへと分化させ、次いで「Ｍ２誘導化刺激」（たとえば、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、グルココルチコイド、ＴＧＦ－β）に接触させたマクロファージにおいて実施し、Ｍ２分化マクロファージにおける、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲのいずれかの発現を示す。

【０８６２】

ii）末梢血から単離された初代単球をマクロファージへと分化させ、次いで「Ｍ２誘導化刺激」（たとえば、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、グルココルチコイド、ＴＧＦ－β）に接触させたマクロファージにおける、ヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ　ＥＣＤ－ＦＣタンパク質を使用した結合アッセイを上記のように実施し、Ｍ２分化マクロファージにおける、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／

またはＬＳＲのいずれかのカウンターレセプターの発現を示す。

【０８６３】

実施例５０

完全長ヒト抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および／または抗ＬＳＲ抗体の開発

ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原および／またはＬＳＲ抗原に対するヒトモノクローナル抗体の作製

マウスＩｇＧ２　Ｆｃポリペプチドに連結された、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲの細胞外ドメインから構成される融合タンパク質を、標準的な組換え法によって作製し、抗原として免疫化に使用する。

【０８６４】

トランスジェニックＨｕＭａｂマウス：

ヒト抗体遺伝子を発現する、トランスジェニックＨｕＭａｂマウスのＨＣｏ７株マウスを使用して、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲに対する完全長ヒトモノクローナル抗体を作製する。このマウス株は、Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820に記載された方法によって内因性マウスκ軽鎖遺伝子がホモ欠損しており、ＰＣＴ国際公開第０１／０９１８７号の実施例１に記載された方法によって内因性マウス重鎖遺伝子がホモ欠損している。さらに、このマウス株は、Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851に記載された方法によってヒトκ軽鎖遺伝子（ＫＣｏ５）が導入されており、米国特許第５，５４５，８０６号；第５，６２５，８２５号；および第５，５４５，８０７号に記載された方法によってヒト重鎖導入遺伝子（ＨＣｏ７）が導入されている。

【０８６５】

ＨｕＭａｂ免疫化：

ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲに対する完全長のヒトモノクローナル抗体を作製するために、組換えＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ融合タンパク質をコードする遺伝子を含む発現ベクターでトランスフェクトした哺乳動物細胞由来の、精製された組換えＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ融合タンパク質を用いて、ＨＣｏ７　ＨｕＭａｂマウス株のマウスを免疫することができる。ＨｕＭａｂマウスを用いた一般的な免疫化スキームは、Lonberg, N. et al (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851およびＰＣＴ国際公開第９８／２４８８４号に記載されている。６～１６週齢のマウスに最初の抗原の点滴を行う。組換えＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ抗原の精製調製物（５～５０μｇ；ＬＹ６Ｇ６Ｆ融合タンパク質、ＶＳＩＧ１０融合タンパク質、ＴＭＥＭ２５融合タンパク質および／またはＬＳＲ融合タンパク質を発現するトランスフェクトされた哺乳動物細胞から精製されたもの）を使用して、ＨｕＭａｂマウスを腹腔内投与により免疫する。

【０８６６】

完全フロイントアジュバントまたはＲｉｂｉアジュバントを加えた抗原を腹腔内投与することにより、トランスジェニックマウスを２回免疫し、次いで、不完全フロイントアジュバントまたはＲｉｂｉアジュバントを加えた抗原を３～２１日間にわたり腹腔内投与する（計１１回まで免疫する）。免疫応答は後眼窩出血によってモニタリングする。（後述の）ＥＬＩＳＡによって血漿をスクリーニングし、抗ＬＹ６Ｇ６Ｆヒト免疫グロブリン、抗ＶＳＩＧ１０ヒト免疫グロブリン、抗ＴＭＥＭ２５ヒト免疫グロブリンおよび／または抗ＬＳＲヒト免疫グロブリンの力価が十分に高いマウスを融合に使用する。屠殺および脾臓摘出の３日前にマウスに抗原を静脈内投与することによりブーストを行う。

【０８６７】

抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および／または抗ＬＳＲ抗体を産生するＨｕＭａｂマウスの選択：

免疫したマウスから、ＬＹ６Ｇ６Ｆ血清、ＶＳＩＧ１０血清、ＴＭＥＭ２５血清および

／またはＬＳＲ血清を結合する抗体を産生するＨｕＭａｂマウスを選択するために、最初にＦｉｓｈｗｉｌｄ，Ｄ．ら（１９９６）により記載されたＥＬＩＳＡ変法を用いて、免疫したマウスを試験する。簡潔に述べると、ＰＢＳ中１～２μｇ／ｍｌの精製した組換えＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ融合タンパク質を１ウェルあたり５０μｌ加えて４℃で一晩インキュベートすることによりマイクロタイタープレートをコーティングし、次いで、ＰＢＳ中５％ＢＳＡを１ウェルあたり２００μｌ加えることによりブロッキングする。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲで免疫したマウスから得た血漿を希釈したものを各ウェルに加え、環境温度において１～２時間インキュベートする。プレートをＰＢＳ／ツウィーンで洗浄し、次いで、アルカリホスファターゼに結合させたヤギ抗ヒトκ軽鎖ポリクローナル抗体とともに室温で１時間インキュベートする。洗浄後、プレートをｐＮＰＰ基質で発色させ、ＯＤ４１５～６５０において分光光度計で分析する。抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および／または抗ＬＳＲ抗体の力価が最も高いマウスを融合に使用する。後述するように融合を行い、また、ハイブリドーマ上清の抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ活性、抗ＶＳＩＧ１０活性、抗ＴＭＥＭ２５活性、および／または抗ＬＳＲ活性をＥＬＩＳＡにより試験する。

【０８６８】

ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲに対するヒトモノクローナル抗体を作製するハイブリドーマの作製：

標準的なプロトコルに基づいて、ＨｕＭａｂマウスから単離したマウス脾細胞をＰＥＧとともにマウス骨髄腫細胞株に融合させる。次いで、この結果生じるハイブリドーマを抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングする。免疫したマウスから得た脾リンパ球の単一細胞懸濁液を、５０％ＰＥＧ（シグマ）とともに、４分の１の細胞数のＰ３Ｘ６３Ａｇ８．６．５３（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１５８０）非分泌性マウス骨髄腫細胞と融合させる。平底マイクロタイタープレートにおいて細胞を約1×10^{5}個／ウェルで平板培養し、次いで、ＲＰＭＩ中ｏｒｉｇｅｎ（ＩＧＥＮ）、Ｌ－グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、ＨＥＰＥＳ、ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、１×ＨＡＴ、およびβ－メルカプトエタノールを添加した１０％ウシ胎仔血清含有選択培地中で約２週間インキュベートする。１～２週間後に、ＨＡＴをＨＴで置き換えた培地中で細胞を培養する。次いで、ＥＬＩＳＡ（上述の）を用いて、各ウェルのヒト抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ、抗ＶＳＩＧ１０、抗ＴＭＥＭ２５および／または抗ＬＳＲモノクローナルＩｇＧ抗体のスクリーニングをする。ハイブリドーマの増殖が広範囲に起これば、通常１０～１４日後に培地を観察する。抗体を分泌するハイブリドーマを再び平板培養し、再度スクリーニングを行い、ヒトＩｇＧがなお陽性であれば、抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ、抗ＶＳＩＧ１０、抗ＴＭＥＭ２５および／または抗ＬＳＲモノクローナル抗体を限界希釈法により少なくとも２回サブクローニングする。次いで、安定なサブクローンをインビトロで培養し、特性評価用の組織培養培地において少量の抗体を作製する。

【０８６９】

ハイブリドーマのクローンをさらなる分析のために選択する。

【０８７０】

所望の抗ＬＹ６Ｇ６Ｆヒトモノクローナル抗体、抗ＶＳＩＧ１０ヒトモノクローナル抗体、抗ＴＭＥＭ２５ヒトモノクローナル抗体および／または抗ＬＳＲヒトモノクローナル抗体の構造特性の評価

得られた抗ＬＹ６Ｇ６Ｆモノクローナル抗体、抗ＶＳＩＧ１０モノクローナル抗体、抗ＴＭＥＭ２５モノクローナル抗体および／または抗ＬＳＲモノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするｃＤＮＡ配列およびこれらの抗体の軽鎖可変領域をコードするｃＤＮＡ配列は、上記で得られたハイブリドーマから標準的なＰＣＲ技術を使用して得られ、標準的なＤＮＡ塩基配列決定技術を使用して配列が決定される。

【０８７１】

重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列と、軽鎖可変領域のヌクレオチド

配列およびアミノ酸配列とが同定される。これらの配列は、公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列および重鎖配列と比較してもよく、得られた抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ配列、抗ＶＳＩＧ１０配列、抗ＴＭＥＭ２５配列および／または抗ＬＳＲ配列の軽鎖のＣＤＲとこれらの配列の重鎖のＣＤＲが同定される。

【０８７２】

抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ、抗ＶＳＩＧ１０、抗ＴＭＥＭ２５および／または抗ＬＳＲヒトモノクローナル抗体の結合特異性および結合動態の特性評価

抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ、抗ＶＳＩＧ１０、抗ＴＭＥＭ２５および／または抗ＬＳＲ抗体の結合親和性、結合動態、結合特異性および交差競合性をＢｉａｃｏｒｅ分析によって試験する。さらに、結合特異性はフローサイトメトリーによって試験する。

【０８７３】

結合親和性および結合動態

本発明に従って作製された抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ、抗ＶＳＩＧ１０、抗ＴＭＥＭ２５および／または抗ＬＳＲ抗体の親和性および結合動態を、Ｂｉａｃｏｒｅ分析（Ｂｉａｃｏｒｅ ＡＢ（スウェーデン国ウプサラ））によって特性評価する。Ｂｉａｃｏｒｅより提供されているキットおよび標準的なアミンカップリング法を使用して、精製された組換えヒトＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ融合タンパク質を、第一級アミンを介してＣＭ５チップ（カルボキシメチルデキストランをコーティングしたチップ）に共有結合で連結する。（ＢＩＡｃｏｒｅ ＡＢによって提供されている）ＨＢＳＥＰバッファー中の２６７ｎＭの抗体を５０μｌ／分の流速で流すことによって結合を測定する。抗原結合抗体の結合動態は３分間追跡し、解離動態は７分間追跡する。ＢｌＡｅｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェア（Ｂｉａｃｏｒｅ ＡＢ）を使用して、結合曲線および解離曲線を１：１ラングミュア結合モデルに適合させる。結合定数の評価におけるアビディティの影響を最小限にするため、結合相および解離相に相当する最初セグメントのデータのみをモデルへの適合に使用する。

【０８７４】

得られた抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ、抗ＶＳＩＧ１０、抗ＴＭＥＭ２５および／または抗ＬＳＲ抗体のエピトープマッピング

Ｂｉａｃｏｒｅを使用して、抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ、抗ＶＳＩＧ１０、抗ＴＭＥＭ２５および／または抗ＬＳＲヒトモノクローナル抗体（ＨｕＭＡｂ）のエピトープのグループ分けを決定する。得られた抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ、抗ＶＳＩＧ１０、抗ＴＭＥＭ２５および／または抗ＬＳＲ抗体を使用して、ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原および／またはＬＳＲ抗原におけるこれらの抗体のエピトープをマッピングする。これらの異なる抗体をそれぞれ、同じチップ上の異なる３つの表面に８０００ＲＵまでコーティングする。各モノクローナル抗体の希釈を１０μｇ／ｍＬから開始して作製し、Ｆｃ融合ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ（５０ｎＭ）とともに１時間インキュベートする。インキュベートした複合体を、３つの表面すべて（およびブランク面）に流速２０μＬ／分で１．５分間にわたり同時にインジェクトする。１．５分間の終了時における各表面からのシグナルから適切なブランクを差し引いた後、複合体中のモノクローナル抗体の濃度に対してプロットする。データの分析後、エピトープマッピングの結果に基づいて、抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および／または抗ＬＳＲ抗体を、種々のエピトープ群に分類する。これらの機能特性も比較する。

【０８７５】

ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲタンパク質を細胞表面に発現するチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞株を作製し、フローサイトメトリーによりＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲヒトモノクローナル抗体（ＨｕＭＡｂ）の特異性を決定するために使用する。ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／もしくはＬＳＲ抗原またはこれらの変異体の膜貫通形態をコードする完全長ｃＤＮＡを含む発現プラスミドでＣＨＯ細胞をトランスフェクトする。

Ｎ末端にエピトープタグを含むトランスフェクトされたこのタンパク質を、エピトープ特異的抗体による検出に使用する。トランスフェクトした細胞を、１０μｇ／ｍｌの濃度のＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ抗体のそれぞれとインキュベートすることによって、抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ、抗ＶＳＩＧ１０、抗ＴＭＥＭ２５および／または抗ＬＳＲモノクローナル抗体の結合を評価する。細胞を洗浄し、ＦＩＴＣ標識抗ヒトＩｇＧ抗体で結合を検出する。標識抗マウスＩｇＧによって検出されるマウス抗エピトープタグ抗体をポジティブコントロールとして使用する。非特異的ヒト抗体および非特異的マウス抗体をネガティブコントロールとして使用する。得られたデータを使用して、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲ標的抗原に対するヒトモノクローナル抗体（ＨｕＭＡｂ）の特異性を評価する。

【０８７６】

上記の抗体、ならびにＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、ＴＭＥＭ２５および／またはＬＳＲに特異的な他の抗体は、抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ、抗ＶＳＩＧ１０、抗ＴＭＥＭ２５および／または抗ＬＳＲに関連する上記の治療法において使用してもよく、このような治療法としては、たとえば、ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原および／またはＬＳＲ抗原が差次的に発現されて、かつ／または、ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原および／またはＬＳＲ抗原の関与を伴うＢ７免疫共刺激が調節（増強または抑制）されるがんの治療、ならびに、たとえば、上記の抗体が所望の標的がん細胞に対するＴ細胞活性の負の刺激を妨げたり、Ｔ細胞活性の正の刺激を妨げたりすることによって、所望の抗自己免疫作用が誘導される、がんおよび自己免疫疾患の治療が挙げられる。

【０８７７】

ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原および／またはＬＳＲ抗原に関連した疾患または病態のための治療剤および診断法として使用される、所望の抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および／または抗ＬＳＲ抗体の製造および選択に関連して、本発明について説明し、様々な実施形態を提供した。本明細書において示された明示的な組み合わせおよびサブコンビネーションの範囲を超えて、本明細書において様々な実施形態を任意の適切な方法で組み合わせてもよい。以下の請求項によって本発明をさらに説明する。

【図１Ａ】

LYG6F- 配列番号１

MAVLFLLLFLCGTPQAADNMQAIYVALGEAVELPCPSPPTLHGDEHLSWFCSPAAGSFTTLVAQVQVGRP
APDPGKPGRESRLRLLGNYSLWLEGSKEEDAGRYWCAVLGQHHNYQNWRVYDVLVLKGSQLSARAADGSP
CNVLLCSVVPSRRMDSVTWQEGKGPVRGRVQSFWGSEAALLLVCPGEGLSEPRSRRPRIIRCLMTHNKGV
SFSLAASIDASPALCAPSTGWDMP**WILMLLLTMGQGVVILALSIVLW**RQRVRGAPGRDASIPQFKPEIQV
YENIHLARLGPPAHKPR

SP - aa 1-16: ***MAVLFLLLFLCGTPQA***

TM - aa 235-257: **WILMLLLTMGQGVVILALSIVLW**

LYG6F ECD (SPを含まず) - aa 17-234 (配列番号2):

ADNMQAIYVALGEAVELPCPSPPTLHGDEHLSWFCSPAAGSFTTLVAQVQVGRPAPDPGKPGRESRLRLL
GNYSLWLEGSKEEDAGRYWCAVLGQHHNYQNWRVYDVLVLKGSQLSARAADGSPCNVLLCSVVPSRRMDS
VTWQEGKGPVRGRVQSFWGSEAALLLVCPGEGLSEPRSRRPRIIRCLMTHNKGVSFSLAASIDASPALCA
PSTGWDMP

LYG6F ECDをコードするNA (配列番号33):

GCAGACAACATGCAGGCCATCTATGTGGCCTTGGGGGAGGCAGTAGAGCTGCCATGTCCCTCACCACCTA
CTCTACATGGGGACGAACACCTGTCATGGTTCTGCAGCCCTGCAGCAGGCTCCTTCACCACCCTGGTAGC
CCAAGTCCAAGTGGGCAGGCCAGCCCCAGACCCTGGAAAACCAGGAAGGGAATCCAGGCTCAGACTGCTG
GGGAACTATTCTTTGTGGTTGGAGGGATCCAAAGAGGAAGATGCCGGGCGGTACTGGTGCGCTGTGCTAG
GTCAGCACCACAACTACCAGAACTGGAGGGTGTACGACGTCTTGGTGCTCAAAGGATCCCAGTTATCTGC
AAGGGCTGCAGATGGATCCCCCTGCAATGTCCTCCTGTGCTCTGTGGTCCCCAGCAGACGCATGGACTCT
GTGACCTGGCAGGAAGGGAAGGGTCCCGTGAGGGGCCGTGTTCAGTCCTTCTGGGGCAGTGAGGCTGCCC
TGCTCTTGGTGTGTCCTGGGGAGGGGCTTTCTGAGCCCAGGAGCCGAAGACCAAGAATCATCCGCTGCCT
CATGACTCACAACAAAGGGGTCAGCTTTAGCCTGGCAGCCTCCATCGATGCTTCTCCTGCCCTCTGTGCC
CCTTCCACGGGCTGGGACATGCCT

【図１Ｂ】

VSIG10- 配列番号３

MAAGGSAPEPRVLVCLGALLAGWVAVGLEAVVIGEVHENVTLHCGNISGLRGQVTWYRNNSEPVFLLSSN
SSLRPAEPRFSLVDATSLHIESLSLGDEGIYTCQEILNVTQWFQVWLQVASGPYQIEVHIVATGTLPNGT
LYAARGSQVDFSCNSSSRPPPVVFWWFQALNSSSESFGHNLTVNFFSLLLISPNLQGNYTCLALNQLSKR
HRKVTTELLVYYPPPSAPQCWAQMASGSFMLQLTCRWDGGYPDPDFLWIEEPGGVIVGKSKLGVEMLSES
QLSDGKKFKCVTSHIVGPESGASCMVQIRGPSLLSEPMKTCFTGGNVTLTCQVSGAYPPAKILWLRNLTQ
PEVIIQPSSRHLITQDGQNSTLTIHNCSQDLDEGYYICRADSPVGVREMEIWLSVKEPLNIGGIVGTIVS
LLLLGLAIISGLLLHYSPVFCWKVGNTSRGQNMDDVMVLVDSEEEEEEEEEEEEDAAVGEQEGARERREL
PKEIPKQDHIHRVTALVNGNIEQMGNGFQDLQDDSSEEQSDIVQEEDRPV

SP - aa 1-30: ***MAAGGSAPEPRVLVCLGALLAGWVAVGLEA***

TM - aa 414-434: **IVGTIVSLLLLGLAIISGLLL**

VSIG10 ECD (SPを含まず) - aa 31-413 (配列番号4):

VVIGEVHENVTLHCGNISGLRGQVTWYRNNSEPVFLLSSNSSLRPAEPRFSLVDATSLHIESLSLGDEGI
YTCQEILNVTQWFQVWLQVASGPYQIEVHIVATGTLPNGTLYAARGSQVDFSCNSSSRPPPVVEWWFQAL
NSSSESFGHNLTVNFFSLLLISPNLQGNYTCLALNQLSKRHRKVTTELLVYYPPPSAPQCWAQMASGSFM
LQLTCRWDGGYPDPDFLWIEEPGGVIVGKSKLGVEMLSESQLSDGKKFKCVTSHIVGPESGASCMVQIRG
PSLLSEPMKTCFTGGNVTLTCQVSGAYPPAKILWLRNLTQPEVIIQPSSRHLITQDGQNSTLTIHNCSQD
LDEGYYICRADSPVGVREMEIWLSVKEPLNIGG

VSIG10 ECDをコードするNA (配列番号34):

GTTGTCATTGGAGAAGTTCATGAGAATGTTACTCTGCACTGTGGCAACATCTCGGGACTGAGGGGCCAGG
TGACCTGGTACCGGAACAACTCGGAGCCTGTCTTCCTTCTCTCGTCCAACTCTAGCCTCCGGCCAGCTGA
GCCTCGCTTCTCTCTAGTGGATGCCACCTCCCTGCACATTGAATCGCTGAGCCTGGGAGATGAGGGAATC
TACACCTGCCAGGAGATCCTGAATGTGACTCAGTGGTTCCAAGTGTGGCTGCAGGTGGCCAATCCCCCTCC
ATCAGATTGAGGTCCACATCGTGGCCACCGGCACACTCCCCAACGGCACCCTCTATGCAGCCAGGGGCTC
CCAGGTGGACTTCAGCTGCAACAGCAGCTCCAGGCCACCACCCGTGGTTGAATGGTGGTTCCAGGCCCTG
AATTCCAGCAGCGAGTCCTTTGGCCACAACCTGACAGTCAACTTTTTCTCACTGTTACTGATATCGCCAA
ACCTCCAAGGGAACTACACCTGTTTAGCCTTGAATCAGCTCAGCAAGAGACATCGAAAGGTGACCACCGA
GCTCCTGGTCTACTATCCCCCTCCATCAGCTCCCCAGTGCTGGGCACAGATGGCATCAGGATCGTTCATG
TTGCAGCTTACCTGTCGCTGGGATGGGGGATACCCTGACCCTGACTTCCTGTGGATAGAAGAGCCAGGAG
GTGTAATCGTGGGGAAGTCAAAGCTGGGGGTGGAAATGCTGAGCGAGTCCCAGCTGTCGGATGGCAAGAA
GTTCAAGTGTGTTACAAGCCACATAGTTGGGCCAGAGTCGGGCGCCAGCTGCATGGTGCAGATCAGGGGT
CCCTCCCTTCTCTCTGAGCCCATGAAGACTTGCTTCACTGGGGGCAATGTGACGCTTACATGCCAGGTGT
CTGGGGCCTACCCCCCTGCCAAGATCCTGTGGCTGAGGAACCTTACCCAGCCCGAGGTGATCATCCAGCC
TAGCAGCCGCCATCTCATTACCCAGGATGGCCAGAACTCCACCCTCACTATCCACAACTGCTCCCAGGAC
CTGGATGAGGGCTACTACATCTGCCGAGCTGACAGCCCTGTAGGGGTGAGGGAGATGGAAATCTGGCTGA
GTGTGAAAGAACCTTTAAATATCGGGGGG

【図１Ｃ－１】

エクソン３スキッピング変異体(エクソン３：上記の図において下線を引いたイタリック体で示した101個のアミノ酸) (配列番号5):

MAAGGSAPEPRVLVCLGALLAGWVAVGLEAVVIGEVHENVTLHCGNISGLRGQVTWYRNNSEPVFLLSSN
SSLRPAEPRFSLVDATSLHIESLSLGDEGIYTCQEILNVTQWFQVWLQVANPPPSAPQCWAQMASGSFML
QLTCRWDGGYPDPDFLWIEEPGGVIVGKSKLGVEMLSESQLSDGKKFKCVTSHIVGPESGASCMVQIRGP
SLLSEPMKTCFTGGNVTLTCQVSGAYPPAKILWLRNLTQPEVIIQPSSRHLITQDGQNSTLTIHNCSQDL
DEGYYICRADSPVGVREMEIWLSVKEPLNIGG**IVGTIVSLLLLGLAIISGLLL**HYSPVFCWKVGNTSRGQ
NMDDVMVLVDSEEEEEEEEEEEEDAAVGEQEGARERREELPKEIPKQDHIHRVTALVNGNIEQMGNGFQDL
QDDSSEEQSDIVQEEDRPV

SP - aa 1-30: ***MAAGGSAPEPRVLVCLGALLAGWVAVGLEA***

TM - aa 313-333: **IVGTIVSLLLLGLAIISGLLL**

エクソン３スキッピング変異体 ECD (SPを含まず) - aa 31-312 (配列番号6):

VVIGEVHENVTLHCGNISGLRGQVTWYRNNSEPVFLLSSNSSLRPAEPRFSLVDATSLHIESLSLGDEGI
YTCQEILNVTQWFQVWLQVANPPPSAPQCWAQMASGSFMLQLTCRWDGGYPDPDFLWIEEPGGVIVGKSK
LGVEMLSESQLSDGKKFKCVTSHIVGPESGASCMVQIRGPSLLSEPMKTCFTGGNVTLTCQVSGAYPPAK
ILWLRNLTQPEVIIQPSSRHLITQDGQNSTLTIHNCSQDLDEGYYICRADSPVGVREMEIWLSVKEPLNI
GG

【図１Ｃ－２】

エクソン３スキッピングVSIG10変異体をコードするNA (配列番号35):

ATGGCCGCAGGCGGCAGTGCGCCC
GAGCCCCGCGTCCTCGTCTGCCTCGGGGCGCTCCTGGCCGGCTGGGTCGCCGTAGGATTGGAGGCTGTTG
TCATTGGAGAAGTTCATGAGAATGTTACTCTGCACTGTGGCAACATCTCGGGACTGAGGGGCCAGGTGAC
CTGGTACCGGAACAACTCGGAGCCTGTCTTCCTTCTCTCGTCCAACTCTAGCCTCCGGCCAGCTGAGCCT
CGCTTCTCTCTAGTGGATGCCACCTCCCTGCACATTGAATCGCTGAGCCTGGGAGATGAGGGAATCTACA
CCTGCCAGGAGATCCTGAATGTGACTCAGTGGTTCCAAGTGTGGCTGCAGGTGGCCAATCCCCCTCCATC
AGCTCCCCAGTGCTGGGCACAGATGGCATCAGGATCGTTCATGTTGCAGCTTACCTGTCGCTGGGATGGG
GGATACCCTGACCCTGACTTCCTGTGGATAGAAGAGCCAGGAGGTGTAATCGTGGGGAAGTCAAAGCTGG
GGGTGGAAATGCTGAGCGAGTCCCAGCTGTCGGATGGCAAGAAGTTCAAGTGTGTTACAAGCCACATAGT
TGGGCCAGAGTCGGGCGCCAGCTGCATGGTGCAGATCAGGGGTCCCTCCCTTCTCTCTGAGCCCATGAAG
ACTTGCTTCACTGGGGGCAATGTGACGCTTACATGCCAGGTGTCTGGGGCCTACCCCCCTGCCAAGATCC
TGTGGCTGAGGAACCTTACCCAGCCCGAGGTGATCATCCAGCCTAGCAGCCGCCATCTCATTACCCAGGA
TGGCCAGAACTCCACCCTCACTATCCACAACTGCTCCCAGGACCTGGATGAGGGCTACTACATCTGCCGA
GCTGACAGCCCTGTAGGGGTGAGGGAGATGGAAATCTGGCTGAGTGTGAAAGAACCTTTAAATATCGGGG
GGATTGTGGGAACCATTGTGAGCCTCCTTCTGCTGGGACTGGCCATTATCTCAGGGCTTCTGTTGCATTA
TAGCCCTGTGTTCTGCTGGAAAGTAGGAAACACTTCCAGGGGACAAAACATGGATGATGTCATGGTTTTG
GTGGATTCAGAAGAGGAAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAGATGCTGCAGTAGGGGAACAGGAGG
GAGCACGTGAGAGAGAGGAGTTGCCAAAAGAAATACCTAAGCAGGACCACATTCACAGAGTGACCGCCTT
GGTGAATGGGAACATAGAACAGATGGGAAATGGATTCCAGGATCTTCAAGATGACAGCAGTGAGGAGCAA
AGTGACATTGTTCAAGAAGAAGACAGGCCAGTCTGA

【図１Ｃ－３】

エクソン３スキッピングVSIG10変異体 ECDをコードするNA(配列番号36):

GTTGTCATTGGAGAAGTTCATGAGAATGTTACTCTGCACTGTGGCAACATCTCGGGACTGAGGGGCCAGG
TGACCTGGTACCGGAACAACTCGGAGCCTGTCTTCCTTCTCTCGTCCAACTCTAGCCTCCGGCCAGCTGA
GCCTCGCTTCTCTCTAGTGGATGCCACCTCCCTGCACATTGAATCGCTGAGCCTGGGAGATGAGGGAATC
TACACCTGCCAGGAGATCCTGAATGTGACTCAGTGGTTCCAAGTGTGGCTGCAGGTGGCCAATCCCCCTC
CATCAGCTCCCCAGTGCTGGGCACAGATGGCATCAGGATCGTTCATGTTGCAGCTTACCTGTCGCTGGGA
TGGGGGATACCCTGACCCTGACTTCCTGTGGATAGAAGAGCCAGGAGGTGTAATCGTGGGGAAGTCAAAG
CTGGGGGTGGAAATGCTGAGCGAGTCCCAGCTGTCGGATGGCAAGAAGTTCAAGTGTGTTACAAGCCACA
TAGTTGGGCCAGAGTCGGGCGCCAGCTGCATGGTGCAGATCAGGGGTCCCTCCCTTCTCTCTGAGCCCAT
GAAGACTTGCTTCACTGGGGGCAATGTGACGCTTACATGCCAGGTGTCTGGGGCCTACCCCCCTGCCAAG
ATCCTGTGGCTGAGGAACCTTACCCAGCCCGAGGTGATCATCCAGCCTAGCAGCCGCCATCTCATTACCC
AGGATGGCCAGAACTCCACCCTCACTATCCACAACTGCTCCCAGGACCTGGATGAGGGCTACTACATCTG
CCGAGCTGACAGCCCTGTAGGGGTGAGGGAGATGGAAATCTGGCTGAGTGTGAAAGAACCTTTAAATATC
GGGGGG

【図１Ｄ】

TMEM25 - 配列番号7

MALPPGPAALRHTLLLLPALLSSGWGELEPQIDGQTWAERALRENERHAFTCRVAGGPGT
PRLAWYLDGQLQEASTSRLLSVGGEAFSGGTSTFTVTAHRAQHELNCSLQDPRSGRSANA
SVILNVQFKPEIAQVGAKYQEAQGPGLLVVLFALVRANPPANVTWIDQDGPVTVNTSDFL
VLDAQNYPWLTNHTVQLQLRSLAHNLSVVATNDVGVTSASLPAPGLLATRVE**VPLLGIVV**
AAGLALGTLVGFSTLVACLVCRKEKKTKGPSRHPSLISSDSNNLKLNNVRLPRENMSLPS
NLQLNDLTPDSRAVKPADRQMAQNNSRPELLDPEPGGLLTSQGFIRLPVLGYIYRVSSVS
SDEIWL

SP - aa 1-26: ***MALPPGPAALRHTLLLLPALLSSGW***

TM - aa 233-261: **VPLLGIVVAAGLALGTLVGFSTLVACLVC**

TMEM25 ECD (SPを含まず) - aa 27-232 (配列番号8):

ELEPQIDGQTWAERALRENERHAFTCRVAGGPGTPRLAWYLDGQLQEASTSRLLSVGGEA
FSGGTSTFTVTAHRAQHELNCSLQDPRSGRSANASVILNVQFKPEIAQVGAKYQEAQGPG
LLVVLFALVRANPPANVTWIDQDGPVTVNTSDFLVLDAQNYPWLTNHTVQLQLRSLAHNL
SVVATNDVGVTSASLPAPGLLATRVE

TMEM25 ECDをコードするNA(配列番号37):

GAGTTGGAGCCACAAATAGATGGTCAGACCTGGGCTGAGCGGGCACTTCGGGAGAATGAACGCCACGC
CTTCACCTGCCGGGTGGCAGGGGGGCCTGGCACCCCCAGATTGGCCTGGTATCTGGATGGACAGCTGCA
GGAGGCCAGCACCTCAAGACTGCTGAGCGTGGGAGGGGAGGCCTTCTCTGGAGGCACCAGCACCTTCA
CTGTCACTGCCCATCGGGCCCAGCATGAGCTCAACTGCTCTCTGCAGGACCCCAGAAGTGGCCGATCAGC
CAACGCCTCTGTCATCCTTAATGTGCAATTCAAGCCAGAGATTGCCCAAGTCGGCGCCAAGTACCAGGAA
GCTCAGGGCCCAGGCCTCCTGGTTGTCCTGTTTGCCCTGGTGCGTGCCAACCCGCCGGCCAATGTCACCT
GGATCGACCAGGATGGGCCAGTGACTGTCAACACCTCTGACTTCCTGGTGCTGGATGCGCAGAACTACC
CCTGGCTCACCAACCACACGGTGCAGCTGCAGCTCCGCAGCCTGGCACACAACCTCTCGGTGGTGGCCAC
CAATGACGTGGGTGTCACCAGTGCGTCGCTTCCAGCCCCAGGGCTTCTGGCTACCCGG

【図１Ｅ】

LSRアイソフォームa(配列番号11):

MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTST
PTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQGNAVTLGD
YYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQGNNEAYA**ELIVLGRTSGVAELLPGFQAGPIE**
DWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWCQCCPHTCCCYVRCPCCPDKCCCPEALYAAGKAATSGVPSIYAPSTY
AHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQ
DDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSP
RGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYDQD
DSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRPHK
EEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV

SP - aa 1-41: ***MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARA***

TM - aa 212-234: **WLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWC**

LSRアイソフォームa ECD (SPを含まず) - aa 42-211 (配列番号12):

IQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPG
YNPYVECQDSVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQGN
NEAYAELIVLGRTSGVAELLPGFQAGPIED

LSRアイソフォームa ECDをコードするNA(配列番号40):

ATCCAGGTGACCGTGTCCAACCCCTACCACGTGGTGATCCTCTTCCAGCCTGTGACCCTGCCCTGTACCT
ACCAGATGACCTCGACCCCCACGCAACCCATCGTCATCTGGAAGTACAAGTCTTTCTGCCGGGACCGCAT
CGCCGATGCCTTCTCCCCGGCCAGCGTCGACAACCAGCTCAATGCCCAGCTGGCAGCCGGGAACCCAGGC
TACAACCCCTACGTCGAGTGCCAGGACAGCGTGCGCACCGTCAGGGTCGTGGCCACCAAGCAGGGCAACG
CTGTGACCCTGGGAGATTACTACCAGGGCCGGAGGATTACCATCACCGGAAATGCTGACCTGACCTTTGA
CCAGACGGCGTGGGGGGACAGTGGTGTGTATTACTGCTCCGTGGTCTCAGCCCAGGACCTCCAGGGGAAC
AATGAGGCCTACGCAGAGCTCATCGTCCTTGGGAGGACCTCAGGGGTGGCTGAGCTCTTACCTGGTTTTC
AGGCGGGGCCCATAGAAGAC

【図１Ｆ】

LSRアイソフォームb (エクソン４(19アミノ酸残基)がスキップされている)
(配列番号13):

MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTST
PTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQGNAVTLGD
YYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQGNNEAYA**ELIVLDWLFVVVVCLAAFLIFLLL**
GICWCQCCPHTCCCYVRCPCCPDKCCCPEALYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGP
AYNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFDP
SRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRAR
RPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSR
ERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETD
SQASRERRLKKNLALSRESLVV

SP - aa 1-41: ***MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARA***

TM - aa 193-215: **WLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWC**

LSRアイソフォームb ECD (SPを含まず) - aa 42-192 (配列番号14):

IQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPG
YNPYVECQDSVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQGN
NEAYAELIVLD

LSRアイソフォームb ECDをコードするNA(配列番号41):

ATCCAGGTGACCGTGTCCAACCCCTACCACGTGGTGATCCTCTTCCAGCCTGTGACCCTGCCCTGTACCT
ACCAGATGACCTCGACCCCCACGCAACCCATCGTCATCTGGAAGTACAAGTCTTTCTGCCGGGACCGCAT
CGCCGATGCCTTCTCCCCGGCCAGCGTCGACAACCAGCTCAATGCCCAGCTGGCAGCCGGGAACCCAGGC
TACAACCCCTACGTCGAGTGCCAGGACAGCGTGCGCACCGTCAGGGTCGTGGCCACCAAGCAGGGCAACG
CTGTGACCCTGGGAGATTACTACCAGGGCCGGAGGATTACCATCACCGGAAATGCTGACCTGACCTTTGA
CCAGACGGCGTGGGGGGACAGTGGTGTGTATTACTGCTCCGTGGTCTCAGCCCAGGACCTCCAGGGGAAC
AATGAGGCCTACGCAGAGCTCATCGTCCTTGAC

【図１Ｇ】

LSRアイソフォームｃ(エクソン４および５(19アミノ酸残基およびTM)がスキップされている)配列番号15:

MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARALQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTST
PTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQGNAVTLGD
YYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQGNNEAYA**E**LIVLVYAAGKAATSGVPSIYAPS
TYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQAS
QQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPR
SPRGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYD
QDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRP
HKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV

SP - aa 1-41: ***MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARA***

LSRアイソフォームｃをコードするNA(配列番号42):

***ATGGCGCTGTTGGCCGGCGGGCTCTCCAGAGGGCTGGGCTCCCACCCGGCCGCCGCAGGCCGGGACGCGG
TCGTCTTCGTGTGGCTTCTGCTTAGCACCTGGTGCACAGCTCCTGCCAGGGCC***ATCCAGGTGACCGTGTC
CAACCCCTACCACGTGGTGATCCTCTTCCAGCCTGTGACCCTGCCCTGTACCTACCAGATGACCTCGACC
CCCACGCAACCCATCGTCATCTGGAAGTACAAGTCTTTCTGCCGGGACCGCATCGCCGATGCCTTCTCCC
CGGCCAGCGTCGACAACCAGCTCAATGCCCAGCTGGCAGCCGGGAACCCAGGCTACAACCCCTACGTCGA
GTGCCAGGACAGCGTGCGCACCGTCAGGGTCGTGGCCACCAAGCAGGGCAACGCTGTGACCCTGGGAGAT
TACTACCAGGGCCGGAGGATTACCATCACCGGAAATGCTGACCTGACCTTTGACCAGACGGCGTGGGGGG
ACAGTGGTGTGTATTACTGCTCCGTGGTCTCAGCCCAGGACCTCCAGGGGAACAATGAGGCCTACGCAGA
GCTCATCGTCCTTGTGTATGCCGCCGGCAAAGCAGCCACCTCAGGTGTTCCCAGCATTTATGCCCCCAGC
ACCTATGCCCACCTGTCTCCCGCCAAGACCCCACCCCCACCAGCTATGATTCCCATGGGCCCTGCCTACA
ACGGGTACCCTGGAGGATACCCTGGAGACGTTGACAGGAGTAGCTCAGCTGGTGGCCAAGGCTCCTATGT
ACCCCTGCTTCGGGACACGGACAGCAGTGTGGCCTCTGAAGTCCGCAGTGGCTACAGGATTCAGGCCAGCC
CAGCAGGACGACTCCATGCGGGTCCTGTACTACATGGAGAAGGAGCTGGCCAACTTCGACCCTTCTCGAC
CTGGCCCCCCCAGTGGCCGTGTGGAGCGGGCCATGAGTGAAGTCACCTCCCTCCACGAGGACGACTGGCG
ATCTCGGCCTTCCCGGGGCCCTGCCCTCACCCCGATCCGGGATGAGGAGTGGGGTGGCCACTCCCCCCGGT
AGTCCCAGGGGATGGGACCAGGAGCCCGCCAGGGAGCAGGCAGGCGGGGGCTGGCGGGCCAGGCGGCCCC
GGGCCCGCTCCGTGGACGCCCTGGACGACCTCACCCCGCCGAGCACCGCCGAGTCAGGGAGCAGGTCTCC
CACGAGTAATGGTGGGAGAAGCCGGGCCTACATGCCCCCGCGGAGCCGCAGCCGGGACGACCTCTATGAC
CAAGACGACTCGAGGGACTTCCCACGCTCCCGGGACCCCCACTACGACGACTTCAGGTCTCGGGAGCGCC
CTCCTGCCGACCCCAGGTCCCACCACCACCGTACCCGGGACCCTCGGGACAACGGCTCCAGGTCCGGGGA
CCTCCCCTATGATGGGCGGCTACTGGAGGAGGCTGTGAGGAAGAAGGGGTCGGAGGAGAGGAGGAGACCC
CACAAGGAGGAGGAGGAAGAGGCCTACTACCCGCCCGCGCCGCCCCCGTACTCGGAGACCGACTCGCAGG
CGTCCCGAGAGCGCAGGCTCAAGAAGAACTTGGCCCTGAGTCGGGAAAGTTTAGTCGTC

【図１Ｈ】

LSRアイソフォームｄ(エクソン４および５(19アミノ酸残基に相当するエクソン+TM+１アミノ酸残基に相当するスキッピング)がスキップされている)配列番号16:

MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARALQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTST
PTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQGNAVTLGD
YYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQGNNEAYA**E**LIVLVYAAGKAATSGVPSIYAPS
TYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASVRSGYRIQASQ
QDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRS
PRGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYDQ
DDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRPH
KEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV

SP - aa 1-41: ***MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARA***

LSRアイソフォームｄをコードするNA(配列番号43):

***ATGGCGCTGTTGGCCGGCGGGCTCTCCAGAGGGCTGGGCTCCCACCCGGCCGCCGCAGGCCGGGACGCGG
TCGTCTTCGTGTGGCTTCTGCTTAGCACCTGGTGCACAGCTCCTGCCAGGGCC***ATCCAGGTGACCGTGTC
CAACCCCTACCACGTGGTGATCCTCTTCCAGCCTGTGACCCTGCCCTGTACCTACCAGATGACCTCGACCC
CCACGCAACCCATCGTCATCTGGAAGTACAAGTCTTTCTGCCGGGACCGCATCGCCGATGCCTTCTCCCC
GGCCAGCGTCGACAACCAGCTCAATGCCCAGCTGGCAGCCGGGAACCCAGGCTACAACCCCTACGTCGA
GTGCCAGGACAGCGTGCGCACCGTCAGGGTCGTGGCCACCAAGCAGGGCAACGCTGTGACCCTGGGAGAT
TACTACCAGGGCCGGAGGATTACCATCACCGGAAATGCTGACCTGACCTTTGACCAGACGGCGTGGGGGG
ACAGTGGTGTGTATTACTGCTCCGTGGTCTCAGCCCAGGACCTCCAGGGGAACAATGAGGCCTACGCAGA
GCTCATCGTCCTTGTGTATGCCGCCGGCAAAGCAGCCACCTCAGGTGTTCCCAGCATTTATGCCCCCAGC
ACCTATGCCCACCTGTCTCCCGCCAAGACCCCACCCCCACCAGCTATGATTCCCATGGGCCCTGCCTACA
ACGGGTACCCTGGAGGATACCCTGGAGACGTTGACAGGAGTAGCTCAGCTGGTGGCCAAGGCTCCTATGT
ACCCCTGCTTCGGGACACGGACAGCAGTGTGGCCTCTGTCCGCAGTGGCTACAGGATTCAGGCCAGCCAG
CAGGACGACTCCATGCGGGTCCTGTACTACATGGAGAAGGAGCTGGCCAACTTCGACCCTTCTCGACCTG
GCCCCCCCAGTGGCCGTGTGGAGCGGGCCATGAGTGAAGTCACCTCCCTCCACGAGGACGACTGGCGATC
TCGGCCTTCCCGGGGCCCTGCCCTCACCCCGATCCGGGATGAGGAGTGGGGTGGCCACTCCCCCCGGAGT
CCCAGGGGATGGGACCAGGAGCCCGCCAGGGAGCAGGCAGGCGGGGGCTGGCGGGCCAGGCGGCCCCGGG
CCCGCTCCGTGGACGCCCTGGACGACCTCACCCCGCCGAGCACCGCCGAGTCAGGGAGCAGGTCTCCCAC
GAGTAATGGTGGGAGAAGCCGGGCCTACATGCCCCCGCGGAGCCGCAGCCGGGACGACCTCTATGACCAA
GACGACTCGAGGGACTTCCCACGCTCCCGGGACCCCCACTACGACGACTTCAGGTCTCGGGAGCGCCCTC
CTGCCGACCCCAGGTCCCACCACCACCGTACCCGGGACCCTCGGGACAACGGCTCCAGGTCCGGGGACCT
CCCCTATGATGGGCGGCTACTGGAGGAGGCTGTGAGGAAGAAGGGGTCGGAGGAGAGGAGGAGACCCCAC
AAGGAGGAGGAGGAAGAGGCCTACTACCCGCCCGCGCCGCCCCCGTACTCGGAGACCGACTCGCAGGCGT
CCCGAGAGCGCAGGCTCAAGAAGAACTTGGCCCTGAGTCGGGAAAGTTTAGTCGTC

【図１Ｉ－１】

LSRアイソフォームｅ(エクソン3､4および5(40アミノ酸残基に相当するエクソン+19アミノ酸残基に相当するエクソン+TM)がスキップされている)配列番号17:

MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTST
PTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQGNAVTLGD
YYQGRRITITGMYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSA
GGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTS
LHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTA
ESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRD
NGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRES
LVV

SP - aa 1-41: ***MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARA***

【図１Ｉ－２】

LSRアイソフォームｅをコードするNA(配列番号45):

***ATGGCGCTGTTGGCCGGCGGGCTCTCCAGAGGGCTGGGCTCCCACCCGGCCGCCGCAGGCCGGGACGCGG
TCGTCTTCGTGTGGCTTCTGCTTAGCACCTGGTGCACAGCTCCTGCCAGGGCC***ATCCAGGTGACCGTGTC
CAACCCCTACCACGTGGTGATCCTCTTCCAGCCTGTGACCCTGCCCTGTACCTACCAGATGACCTCGACC
CCCACGCAACCCATCGTCATCTGGAAGTACAAGTCTTTCTGCCGGGACCGCATCGCCGATGCCTTCTCCC
CGGCCAGCGTCGACAACCAGCTCAATGCCCAGCTGGCAGCCGGGAACCCAGGCTACAACCCCTACGTCGA
GTGCCAGGACAGCGTGCGCACCGTCAGGGTCGTGGCCACCAAGCAGGGCAACGCTGTGACCCTGGGAGAT
TACTACCAGGGCCGGAGGATTACCATCACCGGAATGTATGCCGCCGGCAAAGCAGCCACCTCAGGTGTTC
CCAGCATTTATGCCCCCAGCACCTATGCCCACCTGTCTCCCGCCAAGACCCCACCCCCACCAGCTATGAT
TCCCATGGGCCCTGCCTACAACGGGTACCCTGGAGGATACCCTGGAGACGTTGACAGGAGTAGCTCAGCT
GGTGGCCAAGGCTCCTATGTACCCCTGCTTCGGGACACGGACAGCAGTGTGGCCTCTGAAGTCCGCAGTG
GCTACAGGATTCAGGCCAGCCAGCAGGACGACTCCATGCGGGTCCTGTACTACATGGAGAAGGAGCTGGC
CAACTTCGACCCTTCTCGACCTGGCCCCCCCAGTGGCCGTGTGGAGCGGGCCATGAGTGAAGTCACCTCC
CTCCACGAGGACGACTGGCGATCTCGGCCTTCCCGGGGCCCTGCCCTCACCCCGATCCGGGATGAGGAGT
GGGGTGGCCACTCCCCCCGGAGTCCCAGGGGATGGGACCAGGAGCCCGCCAGGGAGCAGGCAGGCGGGGG
CTGGCGGGCCAGGCGGCCCCGGGCCCGCTCCGTGGACGCCCTGGACGACCTCACCCCGCCGAGCACCGCC
GAGTCAGGGAGCAGGTCTCCCACGAGTAATGGTGGGAGAAGCCGGGCCTACATGCCCCCGCGGAGCCGCA
GCCGGGACGACCTCTATGACCAAGACGACTCGAGGGACTTCCCACGCTCCCGGGACCCCCACTACGACGA
CTTCAGGTCTCGGGAGCGCCCTCCTGCCGACCCCAGGTCCCACCACCACCGTACCCGGGACCCTCGGGAC
AACGGCTCCAGGTCCGGGGACCTCCCCTATGATGGGCGGCTACTGGAGGAGGCTGTGAGGAAGAAGGGGT
CGGAGGAGAGGAGGAGACCCCACAAGGAGGAGGAGGAAGAGGCCTACTACCCGCCCGCGCCGCCCCCGTA
CTCGGAGACCGACTCGCAGGCGTCCCGAGAGCGCAGGCTCAAGAAGAACTTGGCCCTGAGTCGGGAAAGT
TTAGTCGTC

【図１Ｊ－１】

LSRアイソフォームｆ(TMがスキップされている)(配列番号18):

MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTST
PTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQGNAVTLGD
YYQGRRIIITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQGNNEAYELIVLGRTSGVAELLPGFQAGPIE
VYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLR
DTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPS
RGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNG
GRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYD
GRLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV

SP- aa 1-41: ***MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARA***

LSRアイソフォームｆをコードするNA(配列番号46):

***ATGGCGCTGTTGGCCGGCGGGCTCTCCAGAGGGCTGGGCTCCCACCCGGCCGCCGCAGGCCGGGACGCGG
TCGTCTTCGTGTGGCTTCTGCTTAGCACCTGGTGCACAGCTCCTGCCAGGGCC***ATCCAGGTGACCGTGTC
CAACCCCTACCACGTGGTGATCCTCTTCCAGCCTGTGACCCTGCCCTGTACCTACCAGATGACCTCGACC
CCCACGCAACCCATCGTCATCTGGAAGTACAAGTCTTTCTGCCGGGACCGCATCGCCGATGCCTTCTCCC
CGGCCAGCGTCGACAACCAGCTCAATGCCCAGCTGGCAGCCGGGAACCCAGGCTACAACCCCTACGTCGA
GTGCCAGGACAGCGTGCGCACCGTCAGGGTCGTGGCCACCAAGCAGGGCAACGCTGTGACCCTGGGAGAT
TACTACCAGGGCCGGAGGATTACCATCACCGGAAATGCTGACCTGACCTTTGACCAGACGGCGTGGGGGG
ACAGTGGTGTGTATTACTGCTCCGTGGTCTCAGCCCAGGACCTCCAGGGGAACAATGAGGCCTACGCAGA
GCTCATCGTCCTTGGGAGGACCTCAGGGGTGGCTGAGCTCTTACCTGGTTTTCAGGCGGGGCCCATAGAA

【図１Ｊ－２】

GTGTATGCCGCCGGCAAAGCAGCCACCTCAGGTGTTCCCAGCATTTATGCCCCCAGCACCTATGCCCACC
TGTCTCCCGCCAAGACCCCACCCCCACCAGCTATGATTCCCATGGGCCCTGCCTACAACGGGTACCCTGG
AGGATACCCTGGAGACGTTGACAGGAGTAGCTCAGCTGGTGGCCAAGGCTCCTATGTACCCCTGCTTCGG
GACACGGACAGCAGTGTGGCCTCTGAAGTCCGCAGTGGCTACAGGATTCAGGCCAGCCAGCAGGACGACT
CCATGCGGGTCCTGTACTACATGGAGAAGGAGCTGGCCAACTTCGACCCTTCTCGACCTGGCCCCCCCAG
TGGCCGTGTGGAGCGGGCCATGAGTGAAGTCACCTCCCTCCACGAGGACGACTGGCGATCTCGGCCTTCC
CGGGGCCCTGCCCTCACCCCGATCCGGGATGAGGAGTGGGGTGGCCACTCCCCCCGGAGTCCCAGGGGAT
GGGACCAGGAGCCCGCCAGGGAGCAGGCAGGCGGGGGCTGGCGGGCCAGGCGGCCCCGGGCCCGCTCCGT
GGACGCCCTGGACGACCTCACCCCGCCGAGCACCGCCGAGTCAGGGAGCAGGTCTCCCACGAGTAATGGT
GGGAGAAGCCGGGCCTACATGCCCCCGCGGAGCCGCAGCCGGGACGACCTCTATGACCAAGACGACTCGA
GGGACTTCCCACGCTCCCGGGACCCCCACTACGACGACTTCAGGTCTCGGGAGCGCCCTCCTGCCGACCC
CAGGTCCCACCACCACGGTACCCGGGACCCTCGGGACAACGGCTCCAGGTCCGGGGACCTCCCCTATGAT
GGGCGGCTACTGGAGGAGGCTGTGAGGAAGAAGGGGTCGGAGGAGAGGAGGAGACCCCACAAGGAGGAGG
AGGAAGAGGCCTACTACCCGCCCGCGCCGCCCCCGTACTCGGAGACCGACTCGCAGGCGTCCCGAGACGG
CAGGCTCAAGAAGAACTTGGCCCTGAGTCGGGAAAGTTTAGTCGTC

FIG. 1J-2

【図２Ａ－１】

配列番号5(エクソン3スキッピングVSIG10異性体T95617 P6)と
配列番号3(野生型VSIG10, 受託番号:NP_061959.2)の比較

```
  1 MAAGGSAPEPRVLVCLGALLAGWVAVGLEAVVIGEVHENVTLHCGNISGL 50
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
  1 MAAGGSAPEPRVLVCLGALLAGWVAVGLEAVVIGEVHENVTLHCGNISGL 50
          .       .       .       .       .
 51 RGQVTWYRNNSEPVFLLSSNSSLRPAEPRFSLVDATSLHIESLSLGDEGI 100
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 51 RGQVTWYRNNSEPVFLLSSNSSLRPAEPRFSLVDATSLHIESLSLGDEGI 100
          .       .       .       .       .
101 YTCQEILNVTQWFQVWLQVAN..................................... 121
    ||||||||||||||||||||:
101 YTCQEILNVTQWFQVWLQVASGPYQIEVHIVATGTLPNGTLYAARGSQVD 150
          .       .       .       .       .
121 ..................................................... 121

151 FSCNSSSRPPPVVEWWFQALNSSSESFGHNLTVNFFSLLLISPNLQGNYT 200
          .       .       .       .       .
122 ....................PPPSAPQCWAQMASGSFMLQLTCRWDGG 149
                        ||||||||||||||||||||||||||||
201 CLALNQLSKRHRKVTTELLVYYPPPSAPQCWAQMASGSFMLQLTCRWDGG 250
          .       .       .       .       .
150 YPDPDFLWIEEPGGVIVGKSKLGVEMLSESQLSDGKKFKCVTSHIVGPES 199
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

【図２Ａ－２】

```
251 YPDPDFLWIEEPGGVIVGKSKLGVEMLSESQLSDGKKFKCVTSHIVGPES 300
          .       .       .       .       .
200 GASCMVQIRGPSLLSEPMKTCFTGGNVTLTCQVSGAYPPAKILWLRNLTQ 249
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
301 GASCMVQIRGPSLLSEPMKTCFTGGNVTLTCQVSGAYPPAKILWLRNLTQ 350
          .       .       .       .       .
250 PEVIIQPSSRHLITQDGQNSTLTIHNCSQDLDEGYYICRADSPVGVREME 299
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
351 PEVIIQPSSRHLITQDGQNSTLTIHNCSQDLDEGYYICRADSPVGVREME 400
          .       .       .       .       .
300 IWLSVKEPLNIGGIVGTIVSLLLLGLAIISGLLLHYSPVFCWKVGNTSRG 349
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
401 IWLSVKEPLNIGGIVGTIVSLLLLGLAIISGLLLHYSPVFCWKVGNTSRG 450
          .       .       .       .       .
350 QNMDDVMVLVDSEEEEEEEEEEEDAAVGEQEGARERREELPKEIPKQDHI 399
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
451 QNMDDVMVLVDSEEEEEEEEEEEDAAVGEQEGARERREELPKEIPKQDHI 500
          .       .       .       .
400 HRVTALVNGNIEQMGNGFQDLQDDSSEEQSDIVQEEDRPV 439
    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
501 HRVTALVNGNIEQMGNGFQDLQDDSSEEQSDIVQEEDRPV 540
```

FIG. 2A-2

【図２Ｂ－１（１）】

配列番号11(LSRアイソフォームa)と
配列番号62(LSR, 受託番号:NP_991403)の比較

```
Query: 1   MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 60
           MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT
Sbjct: 49  MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 108

Query: 61  LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 120
           LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD
Sbjct: 109 LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 168

Query: 121 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 180
           SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG
Sbjct: 169 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 228

Query: 181 NNEAYAELIVLGRTSGVAELLPGFQAGPIEDWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWCQCCPHT 240
           NNEAYAELIVLGRTSGVAELLPGFQAGPIEDWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWCQCCPHT
Sbjct: 229 NNEAYAELIVLGRTSGVAELLPGFQAGPIEDWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWCQCCPHT 288

Query: 241 CCCYVRCPCCPDKCCCPEALYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPA 300
           CCCYVRCPCCPDKCCCPEALYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPA
Sbjct: 289 CCCYVRCPCCPDKCCCPEALYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPA 348
```

【図２Ｂ－１（２）】

```
Query: 301 YNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYM 360
           YNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYM
Sbjct: 349 YNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYM 408

Query: 361 EKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSP 420
           EKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSP
Sbjct: 409 EKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSP 468

Query: 421 RGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRS 480
           RGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRS
Sbjct: 469 RGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRS 528

Query: 481 RSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDG 540
           RSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDG
Sbjct: 529 RSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDG 588

Query: 541 RLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLV 600
           RLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLV
Sbjct: 589 RLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLV 648

Query: 601 V 601
           V
Sbjct: 649 V 649
```

FIG. 2B-1(2)

【図２Ｂ－２（１）】

配列番号11(LSRアイソフォームa)と
配列番号68(LSR, 受託番号:XP_002829104[スマトラオランウータン])の比較

```
Query: 1   MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 60
           MALLAGGLSRGLGSHPAA GRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT
Sbjct: 1   MALLAGGLSRGLGSHPAAPGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 60

Query: 61  LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 120
           LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD
Sbjct: 61  LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 120

Query: 121 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 180
           SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG
Sbjct: 121 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 180

Query: 181 NNEAYAELIVLGRTSGVAELLPGFQAGPIEDWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWCQCCPHT 240
           NNEAYAELIVLGRTSGVAELLPGFQAGP+EDWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWCQCCPHT
Sbjct: 181 NNEAYAELIVLGRTSGVAELLPGFQAGPMEDWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWCQCCPHT 240

Query: 241 CCCYVRCPCCPDKCCCPEALYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPA 300
           CCCYVRCPCCPDKCCCPEALYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPA
Sbjct: 241 CCCYVRCPCCPDKCCCPEALYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPA 300
```

【図２Ｂ－２（２）】

```
Query: 301 YNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYM 360
           YNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYM
Sbjct: 301 YNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYM 360

Query: 361 EKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSP 420
           EKELANFDPSRPGPP+GRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSP
Sbjct: 361 EKELANFDPSRPGPPNGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSP 420

Query: 421 RGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGG-RSRAYMPPR 479
           RGWDQEP REQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTS+GG R RAYMPPR
Sbjct: 421 RGWDQEPPREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSSGGRRGRAYMPPR 480

Query: 480 SRSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYD 539
           SRSRDDLYDQDDSRDFPRSRD HYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRD+GSRSGDL YD
Sbjct: 481 SRSRDDLYDQDDSRDFPRSRDSHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDHGSRSGDLLYD 540

Query: 540 GRLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESL 599
           GRLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESL
Sbjct: 541 GRLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESL 600

Query: 600 VV 601
           VV
Sbjct: 601 VV 602
```

FIG. 2B-2(2)

【図２Ｃ－１（１）】

配列番号13(LSRアイソフォームb)と
配列番号63(LSR, 受託番号:NP_057009)の比較

```
Query: 1   MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 60
           MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT
Sbjct: 49  MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 108

Query: 61  LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 120
           LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD
Sbjct: 109 LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 168

Query: 121 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 180
           SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG
Sbjct: 169 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 228

Query: 181 NNEAYAELIVLDWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWCQCCPHTCCCYVRCPCCPDKCCCPEA 240
           NNEAYAELIVLDWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWCQCCPHTCCCYVRCPCCPDKCCCPEA
Sbjct: 229 NNEAYAELIVLDWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWCQCCPHTCCCYVRCPCCPDKCCCPEA 288

Query: 241 LYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAG 300
           LYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAG
Sbjct: 289 LYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAG 348
```

【図２Ｃ－１（２）】

```
Query: 301 GQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRV 360
           GQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRV
Sbjct: 349 GQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRV 408

Query: 361 ERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRAR 420
           ERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRAR
Sbjct: 409 ERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRAR 468

Query: 421 RPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRSR 480
           RPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRSR
Sbjct: 469 RPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRSR 528

Query: 481 DPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRPH 540
           DPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRPH
Sbjct: 529 DPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRPH 588

Query: 541 KEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV 582
           KEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV
Sbjct: 589 KEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV 630
```

FIG. 2C-1(2)

【図２Ｃ－２（１）】

配列番号13(LSRアイソフォームb)と
配列番号65(LSR, 受託番号:BAC11614)の比較

```
Query: 1   MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 60
           MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT
Sbjct: 1   MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 60

Query: 61  LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 120
           LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD
Sbjct: 61  LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 120

Query: 121 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 180
           SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG
Sbjct: 121 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 180

Query: 181 NNEAYAELIVLDWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWCQCCPHTCCCYVRCPCCPDKCCCPEA 240
           NNEAYAELIVLDWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWCQCCPHTCCCYVRCPCCPDKCCCPEA
Sbjct: 181 NNEAYAELIVLDWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWCQCCPHTCCCYVRCPCCPDKCCCPEA 240

Query: 241 LYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAG 300
           LYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDR+SSAG
Sbjct: 241 LYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRNSSAG 300
```

【図２Ｃ－２（２）】

```
Query: 301 GQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRV 360
           GQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRV
Sbjct: 301 GQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRV 360

Query: 361 ERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRAR 420
           ERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRAR
Sbjct: 361 ERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRAR 420

Query: 421 RPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGG-RSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRS 479
           RPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGG RSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRS
Sbjct: 421 RPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRS 480

Query: 480 RDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRP 539
           RDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRP
Sbjct: 481 RDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRP 540

Query: 540 HKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV 582
           HKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV
Sbjct: 541 HKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV 583
```

FIG. 2C-2(2)

【図２Ｄ－１（１）】

配列番号15(LSRアイソフォームc)と
配列番号66(LSR, 受託番号:NP_991404)の比較

```
Query: 1   MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 60
           MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT
Sbjct: 49  MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 108

Query: 61  LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 120
           LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD
Sbjct: 109 LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 168

Query: 121 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 180
           SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG
Sbjct: 169 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 228

Query: 181 NNEAYAELIVLVYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGY 240
           NNEAYAELIVLVYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGY
Sbjct: 229 NNEAYAELIVLVYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGY 288
```

【図２Ｄ－１（２）】

```
Query: 241 PGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFD 300
           PGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFD
Sbjct: 289 PGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFD 348

Query: 301 PSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPA 360
           PSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPA
Sbjct: 349 PSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPA 408

Query: 361 REQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYD 420
           REQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYD
Sbjct: 409 REQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYD 468

Query: 421 QDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVR 480
           QDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVR
Sbjct: 469 QDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVR 528

Query: 481 KKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV 533
           KKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV
Sbjct: 529 KKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV 581
```

FIG. 2D-1(2)

【図２Ｄ－２（１）】

配列番号15(LSRアイソフォームc)と
配列番号69(LSR, 受託番号:XP_002829105.1[スマトラオランウータン])の比較

```
Query: 1   MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 60
           MALLAGGLSRGLGSHPAA GRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT
Sbjct: 1   MALLAGGLSRGLGSHPAAPGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 60

Query: 61  LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 120
           LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD
Sbjct: 61  LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 120

Query: 121 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 180
           SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG
Sbjct: 121 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 180

Query: 181 NNEAYAELIVLVYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGY 240
           NNEAYAELIVLVYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGY
Sbjct: 181 NNEAYAELIVLVYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGY 240
```

【図２Ｄ－２（２）】

```
Query: 241 PGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFD 300
           PGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFD
Sbjct: 241 PGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFD 300

Query: 301 PSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPA 360
           PSRPGPP+GRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEP
Sbjct: 301 PSRPGPPNGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPP 360

Query: 361 REQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGG-RSRAYMPPRSRSRDDLY 419
           REQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTS+GG R RAYMPPRSRSRDDLY
Sbjct: 361 REQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSSGGRRGRAYMPPRSRSRDDLY 420

Query: 420 DQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAV 479
           DQDDSRDFPRSRD HYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRD+GSRSGDL YDGRLLEEAV
Sbjct: 421 DQDDSRDFPRSRDSHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDHGSRSGDLLYDGRLLEEAV 480

Query: 480 RKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV 533
           RKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV
Sbjct: 481 RKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV 534
```

FIG. 2D-2(2)

【図２Ｅ－１（１）】

配列番号16(LSRアイソフォームdの分泌形態 R36881 P20)と
配列番号66(LSR, 受託番号:NP_991404)の比較

```
Query: 1   MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 60
           MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT
Sbjct: 49  MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 108

Query: 61  LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 120
           LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD
Sbjct: 109 LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 168

Query: 121 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 180
           SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG
Sbjct: 169 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 228

Query: 181 NNEAYAELIVLVYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGY 240
           NNEAYAELIVLVYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGY
Sbjct: 229 NNEAYAELIVLVYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGY 288
```

【図２Ｅ－１（２）】

```
Query: 241 PGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVAS-VRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFD 299
           PGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVAS VRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFD
Sbjct: 289 PGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFD 348

Query: 300 PSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPA 359
           PSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPA
Sbjct: 349 PSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPA 408

Query: 360 REQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYD 419
           REQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYD

Sbjct: 409 REQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYD 468

Query: 420 QDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVR 479
           QDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVR

Sbjct: 469 QDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVR 528

Query: 480 KKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV 532
           KKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV
Sbjct: 529 KKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV 581
```

FIG. 2E-1(2)

【図２Ｅ－２（１）】

配列番号16(LSRアイソフォームdの分泌形態 R36881 P20)と
配列番号69(LSR, 受託番号:XP_002829105.1[スマトラオランウータン])の比較

```
Query: 1   MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 60
           MALLAGGLSRGLGSHPAA GRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT
Sbjct: 1   MALLAGGLSRGLGSHPAAPGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 60

Query: 61  LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 120
           LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD
Sbjct: 61  LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 120

Query: 121 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 180
           SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG
Sbjct: 121 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 180

Query: 181 NNEAYAELIVLVYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGY 240
           NNEAYAELIVLVYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGY
Sbjct: 181 NNEAYAELIVLVYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGY 240

Query: 241 PGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVAS-VRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFD 299
           PGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVAS VRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFD
Sbjct: 241 PGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFD 300
```

【図２Ｅ－２（２）】

```
Query: 300 PSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPA 359
           PSRPGPP+GRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEP
Sbjct: 301 PSRPGPPNGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPP 360

Query: 360 REQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGG-RSRAYMPPRSRSRDDLY 418
           REQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTS+GG R RAYMPPRSRSRDDLY
Sbjct: 361 REQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSSGGRRGRAYMPPRSRSRDDLY 420

Query: 419 DQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAV 478
           DQDDSRDFPRSRD HYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRD+GSRSGDL YDGRLLEEAV
Sbjct: 421 DQDDSRDFPRSRDSHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDHGSRSGDLLYDGRLLEEAV 480

Query: 479 RKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV 532
           RKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV
Sbjct: 481 RKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV 534
```

FIG. 2E-2(2)

【図２Ｆ－１】

配列番号17(LSRアイソフォームeの分泌形態 R36881 P27)と
配列番号67(受託番号:BAG59226.1)の比較

```
Query: 1   MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 60
           MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT
Sbjct: 1   MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 60

Query: 61  LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 120
           LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD
Sbjct: 61  LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 120

Query: 121 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGMYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKT 180
           SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGMYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKT
Sbjct: 121 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGMYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKT 180

Query: 181 PPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQAS 240
           PPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQAS
Sbjct: 181 PPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQAS 240
```

【図２Ｆ－２】

```
Query: 241 QQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIR 300
           QQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIR
Sbjct: 241 QQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIR 300

Query: 301 DEEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSN 360
           DEEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSN
Sbjct: 301 DEEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSN 360

Query: 361 GGRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRD 420
           GGRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRD
Sbjct: 361 GGRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRD 420

Query: 421 NGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRL 480
           NGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRL
Sbjct: 421 NGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRL 480

Query: 481 KKNLALSRESLVV 493
           KKNLALSRESLVV
Sbjct: 481 KKNLALSRESLVV 493
```

FIG. 2F-2

【図２Ｇ－１（１）】

配列番号18(LSRアイソフォームfの分泌形態 R36881 P14)と
配列番号62(LSR, 受託番号:NP991403)の比較

```
Query: 1   MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 60
           MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT
Sbjct: 49  MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT 108

Query: 61  LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 120
           LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD
Sbjct: 109 LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD 168

Query: 121 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 180
           SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG
Sbjct: 169 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG 228

Query: 181 NNEAYAELIVLGRTSGVAELLPGFQAGPIE---------------------------- 210
           NNEAYAELIVLGRTSGVAELLPGFQAGPIE
Sbjct: 229 NNEAYAELIVLGRTSGVAELLPGFQAGPIEDWLFVVVVCLAAFLIFLLLGICWCQCCPHT 288

Query: 211 ----------------VVYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPA 251
                           +YAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPA
Sbjct: 289 CCCYVRCPCCPDKCCCPEALYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPA 348
```

【図２Ｇ－１（２）】

```
Query: 252 YNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYM 311
           YNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYM
Sbjct: 349 YNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYM 408

Query: 312 EKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSP 371
           EKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSP
Sbjct: 409 EKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSP 468

Query: 372 RGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRS 431
           RGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRS
Sbjct: 469 RGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRS 528

Query: 432 RSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDG 491
           RSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDG
Sbjct: 529 RSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDG 588

Query: 492 RLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLV 551
           RLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLV
Sbjct: 589 RLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLV 648

Query: 552 V 552
           V
Sbjct: 649 V 649
```

FIG. 2G-1(2)

【図２Ｇ－２（１）】

配列番号18（LSRアイソフォームfの分泌形態 R36881 P14）と
配列番号66（LSR, 受託番号：NP_991404）の比較

```
Query: 1   MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT  60
           MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT
Sbjct: 49  MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVT  108

Query: 61  LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD  120
           LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD
Sbjct: 109 LPCTYQMTSTPTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQD  168

Query: 121 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG  180
           SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG
Sbjct: 169 SVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQG  228

Query: 181 NNEAYAELIVLGRTSGVAELLPGFQAGPIEVYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTP  240
           NNEAYAELIVL                   VYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTP
Sbjct: 229 NNEAYAELIVL-------------------VYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTP  269

Query: 241 PPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQ  300
           PPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQ
Sbjct: 270 PPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQ  329
```

【図２Ｇ－２（２）】

```
Query: 301 QDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRD 360
           QDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRD
Sbjct: 330 QDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRD 389

Query: 361 EEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNG 420
           EEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNG
Sbjct: 390 EEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNG 449

Query: 421 GRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDN 480
           GRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDN
Sbjct: 450 GRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDN 509

Query: 481 GSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLK 540
           GSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLK
Sbjct: 510 GSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLK 569

Query: 541 KNLALSRESLVV 552
           KNLALSRESLVV
Sbjct: 570 KNLALSRESLVV 581
```

FIG. 2G-2(2)

【図３Ａ】

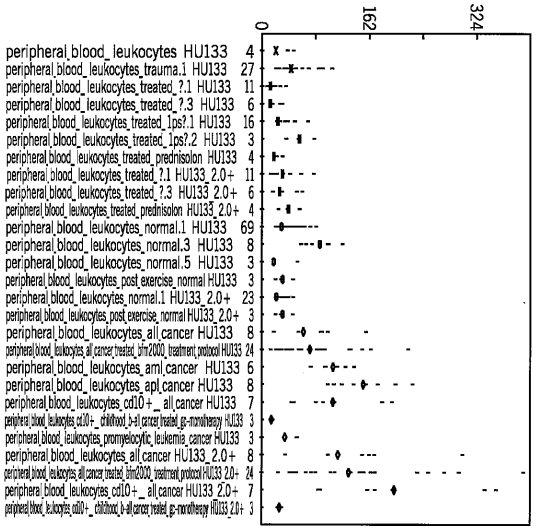


FIG. 3A

【図３Ｂ】

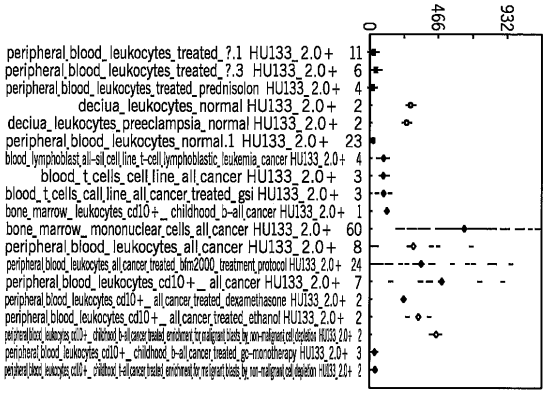


FIG. 3B

【図４Ａ－１】

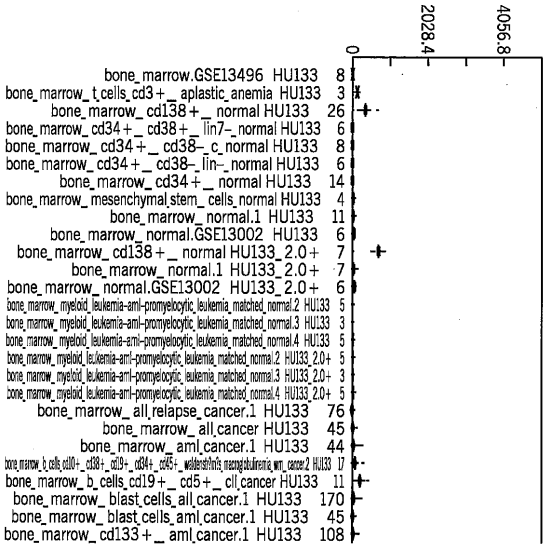


FIG. 4A-1

【図４Ａ－２】

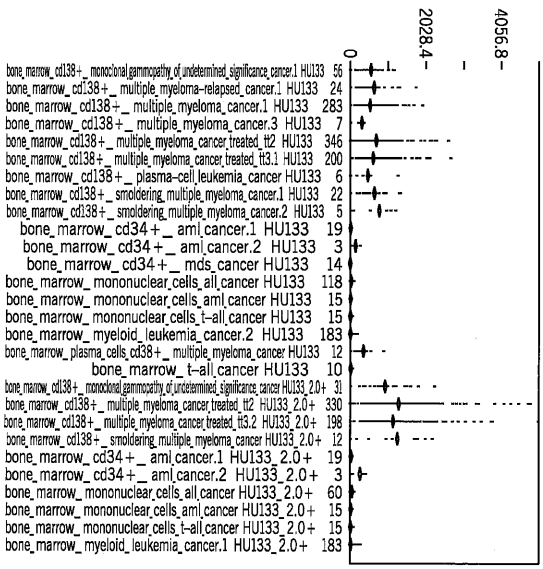


FIG. 4A-2

【図４Ｂ－１】

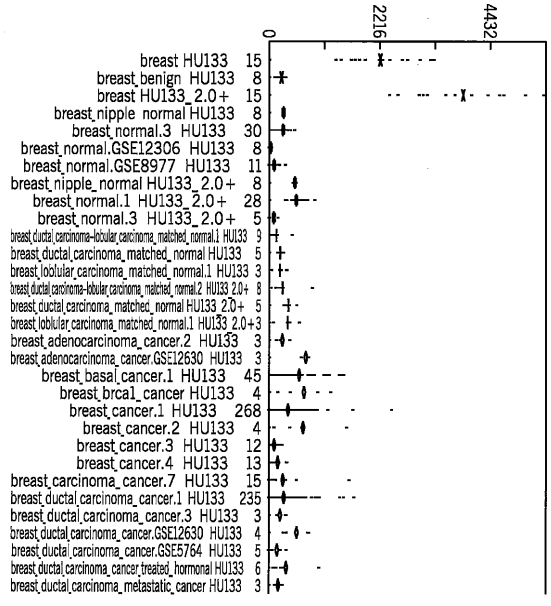


FIG. 4B-1

【図４Ｂ－２】

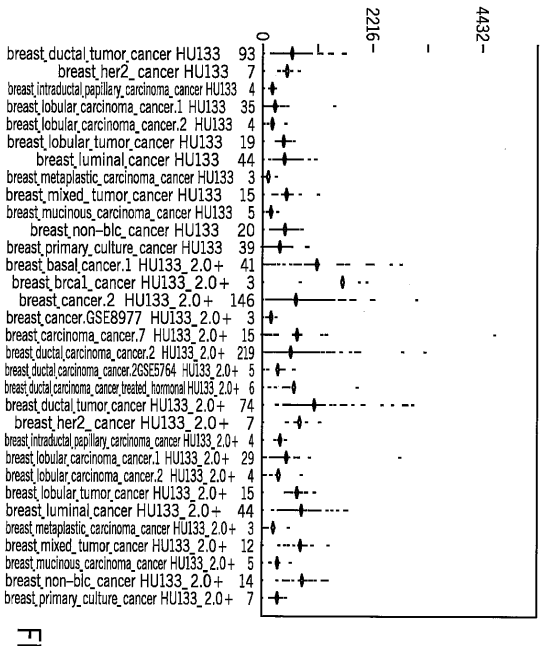


FIG. 4B-2

【図４Ｃ－１】

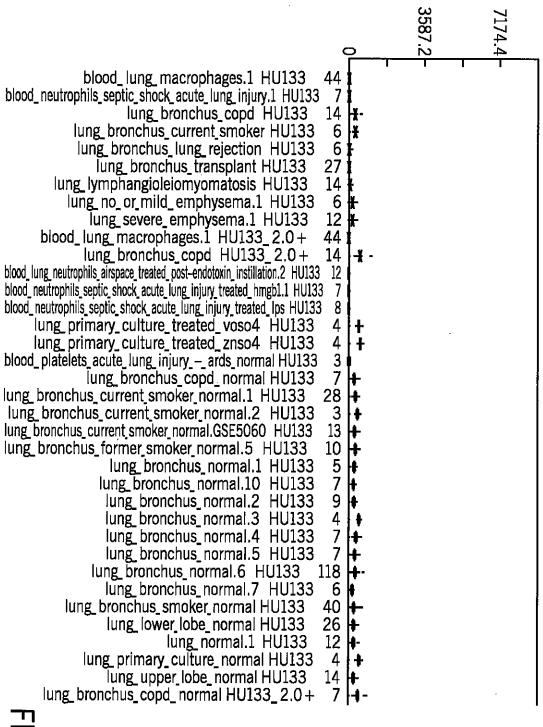


FIG. 4C-1

【図４Ｃ－２】

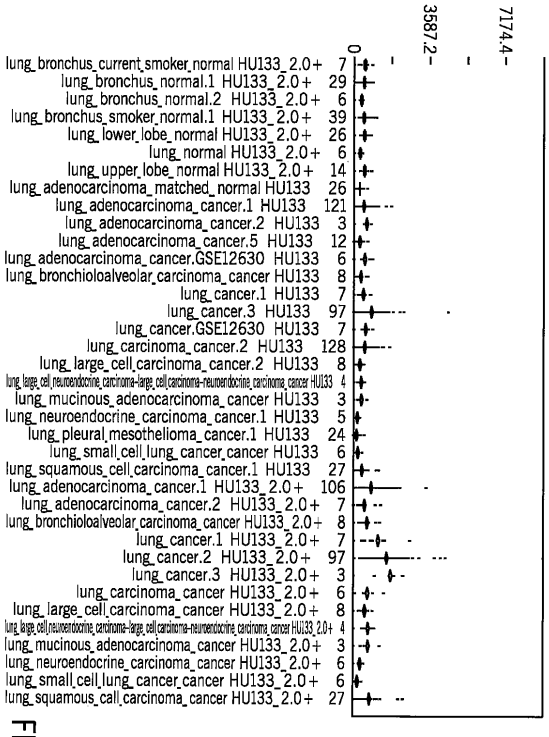


FIG. 4C-2

【図４Ｄ－１】

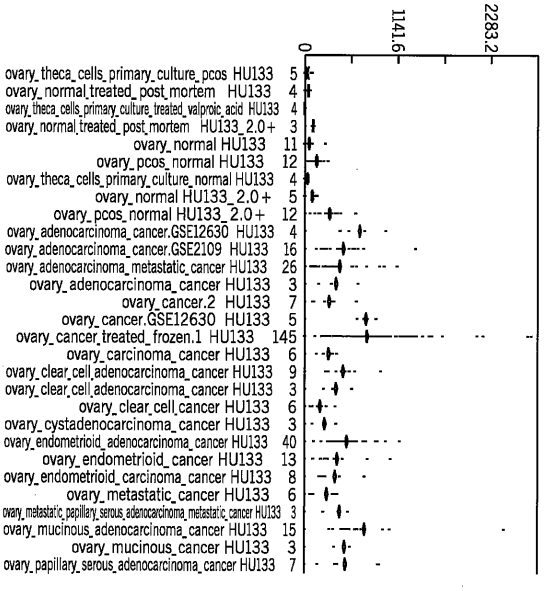


FIG. 4D-1

【図４Ｄ－２】

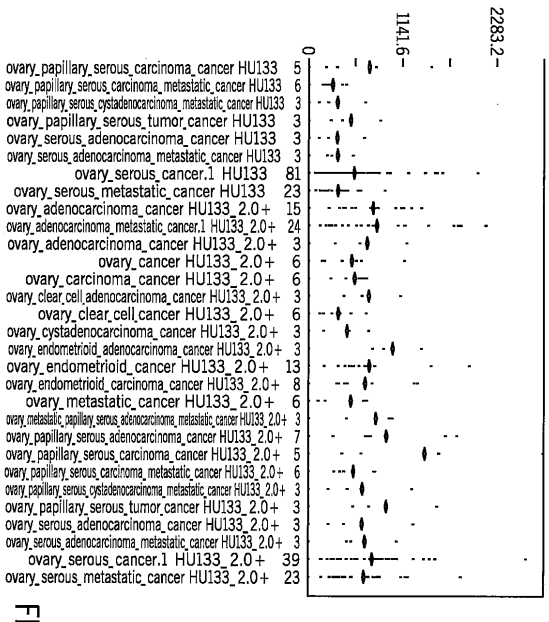


FIG. 4D-2

【図４Ｅ】

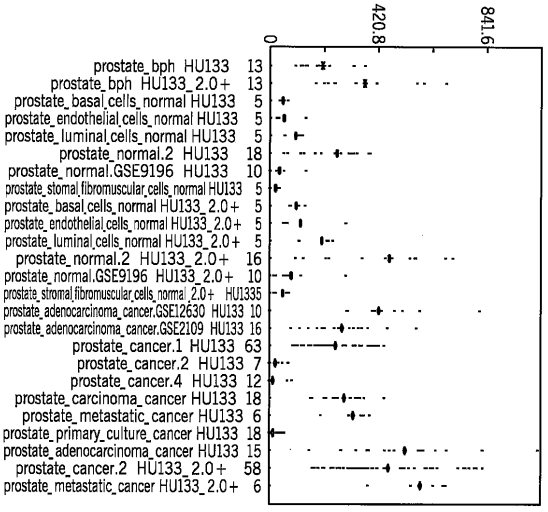


FIG. 4E

【図５Ａ】

ヒトLYG6FとマウスLY6GFのアミノ酸配列比較

```
Identities = 197/300 (65%), Positives = 230/300 (76%), Gaps = 3/300 (1%)

Query  1    MAVLFLLLFLCGTPQA-ADNMQAIYVALGEAVELPCPSPPTLHGDEHLSWFCSPAAGSFT  59
            MAV+  LLFLCG  QA AD++Q IYVA GE+VE+PCPSPP+L G + L+WF SP AGS  T
Sbjct  1    MAVVVFLLFLCGHSQAVADSIQTIYVASGESVEMPCPSPPSLLGGQLLTWFRSPVAGSST  60

Query  60   TLVAQWQVGRPAPDPGKPGRESRLRLLGNYSLWLEGSKEEDAGRYWCAVLGQHHNYQNWR  119
             LVAQWQV +P  D  KP  +SR +L GNYSLWLEGS++EDAGRYWC V+ Q+H YQNWR
Sbjct  61   ILVAQWQVDKPVSDLRKPEPDSRYKLFGNYSLWLEGSRDEDAGRYWCTVMDQNHKYQNWR  120

Query  120  VYDVLVLKGSQLSARAADGSPCNVLLCSVVPSRRMDSVTWQEGKGPVRGRVQSFWGSEAA  179
            VYDV VLKGSQ S ++ DG  C  LLCSVVP+RR+DSVTW EG+  VRG  Q FWG  AA
Sbjct  121  VYDVSVLKGSQFSVKSPDGPSCAALLCSVVPARRLDSVTWLEGRNTVRGHAQYFWGEGAA  180

Query  180  LLLVCPGEGLSEPRSRRPRIIRCLMTHNKGVSFSL-AASIDASPALCAPSTGWDMPWILM  238
            LLLVCP EGL E R+RRPR IRCL+  NK  SFSL AAS + SP +CA    WD+PWIL+
Sbjct  181  LLLVCPTEGLPETRARRPRNIRCLLPQNKRFSFSLAAASAEPSPTVCATLPSWDVPWILV  240

Query  239  LLLTMGQGVVILALSIVLW-RQRVRGAPGRDASIPQFKPEIQVYENIHLARLGPPAHKPR  297
            LL T GQGV I+ALSIVLW R+R +G+  R+ S+P FKPE+QVYENIHLARL PP HK R
Sbjct  241  LLFTAGQGVTIIALSIVLWRRRRAQGSRDREPSVPHFKPEVQVYENIHLARLSPPNHKTR  300
```

【図５Ｂ－１】

ヒトVSIG10とマウスVSIG10のアミノ酸配列比較

```
Identities = 365/559 (65%), Positives = 429/559 (76%), Gaps = 34/559 (6%)

Query  11   RVLVCLGALLAGWVAVGL----------------------------EAVVIGEVHENVTLH  43
            RVL+CLGALLA   + GL                            EAV IGEVH+NVTL
Sbjct  5    RVLLCLGALLARQGSAGLQLLLNPSRANLSVRPNSEVLPGIHPDLEAVAIGEVHDNVTLR  64

Query  44   CGNISGLRGQVTWYRNNSEPVFLLSSNSSLRPAEPRFSLVDATSLHIESLSLGDEGIYTC  103
            CG+ SG RG VTWYRN+SEP FL+S NSSL PA PRFSL DA +L IE+L L D+G YTC
Sbjct  65   CGSASGSRGLVTWYRNDSEPAFLVSFNSSLPPAAPRFSLEDAGALRIEALRLEDDGNYTC  124

Query  104  QEILNVTQWFQVWLQVASGPYQIEVHIVATGTLPNGTLYAARGSQVDFSCNSSSRPPPVV  163
            QE+LN T WF V L+VASGP  +EV+I ATGTLPNGTLYAARGSQVDF+C S+++PPP V
Sbjct  125  QEVLNETHWFPVRLRVASGPAYVEVNISATGTLPNGTLYAARGSQVDFNCCSAAQPPPEV  184

Query  164  EWWFQALNSSSESFGHNLTVNFFSLLLISPNLQGNYTCLALNQLSKRHRKVTTELLVYYP  223
            EWW Q  +S  E  G NL+ N F+L+L+S NLQGNYTC A N LS R RKVTTELLVY+P
Sbjct  185  EWWIQT-HSIPEFLGKNLSANSFTLMLMSQNLQGNYTCSATNVLSGRQRKVTTELLVYWP  243
```

【図５Ｂ－２】

```
Query  224  PPSAPQCWAQMASGSFMLQLTCRWDGGYPDPDFLWIEEPGGVIVGKSKLGVEMLSESQLS  283
            PPSAPQC  +++S S  L+L C WDGGYPDP FLW EEPGG I+G SKL  + LS +QL
Sbjct  244  PPSAPQCSVEVSSESTTLELACNWDGGYPDPTFLWTEEPGGTIMGNSKL--QTLSPAQLL  301

Query  284  DGKKFKCVTSHIVGPESGASCMVQIRGPSLLSEPMKTCFTGGNVTLTCQVSGAYPPAKIL  343
            +GKKFKCV +HI+GPESGASC+V+  P L S+PM+TCF GGNVTLTC+VSGA PPA+I
Sbjct  302  EGKKFKCVGNHILGPESGASCVVKLSSPLLPSQPMRTCFVGGNVTLTCEVSGANPPARIQ  361

Query  344  WLRNLTQPEVIIQPSSRHLITQDGQNSTLTIHNCSQDLDEGYYICRADSPVGVREMEIWL  403
            WLRNLTQP   IQPSS ++ITQ GQ+S+LTIHNCSQDLDEG+Y C+A++ VGVR   IWL
Sbjct  362  WLRNLTQPA--IQPSSHYIITQQGQSSSLTIHNCSQDLDEGFYYCQAENLVGVRATNIWL  419

Query  404  SVKEPLNIGGIVGTIVSLLLLGLAIISGLLLHYSPVFCWKVGNTSRGQNMDDVMVLVDS-  462
            SVKEPLNIGGIVGT+VSLLLLGLA++SGL L+YSP F WK G+T RGQ+M DVMVLVDS
Sbjct  420  SVKEPLNIGGIVGTVVSLLLLGLAVVSGLTLYYSPAFWWKGGSTFRGQDMGDVMVLVDSE  479

Query  463  -EEEEEEEEEEEEDAAVGEQEGARERELPKEIPKQDHIHRVTALVNGNIEQMGNGFQDL  521
             EEEEEEEEE+ED A   ++   E EELPK I K  HIHRVTALVNGN+++MGNGFQ+
Sbjct  480  EEEEEEEEEEKEDVAEEVEQETNETEELPKGISKHGHIHRVTALVNGNLDRMGNGFQEF  539

Query  522  QDDSSEEQSDIVQEEDRPV  540
            QDDS  +QS IVQE+ +PV
Sbjct  540  QDDSDGQQSGIVQEDGKPV  558
```

FIG. 5B-2

【図５Ｃ－１】

ヒトLSRとマウスLSR(ref|NP_059101.1)のアミノ酸配列比較

```
Identities = 467/592 (79%), Positives = 496/592 (84%), Gaps = 15/592 (2%)

Query  62   SHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTSTPTQ  121
            SHPA       +FV L L  +C   A AIQVTV +PYHVVILFQPVTL CTYQM++T T
Sbjct  14   SHPAT-----TIFVCLFLIIYCPDRASAIQVTVPDPYHVVILFQPVTLHCTYQMSNTLTA  68

Query  122  PIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQG  181
            PIVIWKYKSFCRDR+ADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQG
Sbjct  69   PIVIWKYKSFCRDRVADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQG  128

Query  182  NAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQGNNEAYAELIVLGR  241
            NAVTLGDYYQGRRITITGNADLTF+QTAWGDSGVYYCSVVSAQDL GNNEAYAELIVLGR
Sbjct  129  NAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFEQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLDGNNEAYAELIVLGR  188

Query  242  TSGVAELLPGFQAGPIEDWLFVVVVVCLAAFLIFLLLGICWCQCCPHTCCCYVRCPCCPDK  301
            TS   ELLPGF+AGP+EDWLFVVVVVCLA+ L FLLLGICWCQCCPHTCCCYVRCPCCPDK
Sbjct  189  TSEAPELLPGFRAGPLEDWLFVVVVVCLASLLFFLLLGICWCQCCPHTCCCYVRCPCCPDK  248

Query  302  CCCPEALYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVD  361
            CCCPEALYAAGKAATSGVPSIYAPS Y HLSPAKT       P        P GYPGD
Sbjct  249  CCCPEALYAAGKAATSGVPSIYAPSIYTHLSPAKT----PPPPPAMIPMRPPYGYPGDFD  304
```

【図５Ｃ－２】

```
Query  362  RSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPG  421
            R+SS GG  S VPLLR+ D SV+SEVRSGYRIQA+QQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPG
Sbjct  305  RTSSVGGHSSQVPLLREVDGSVSSEVRSGYRIQANQQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPG  364

Query  422  PPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAG  481
            PP+GRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSR PALTPIRDEEW  HSPRSPR W+QEP +EQ
Sbjct  365  PPNGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRAPALTPIRDEEWNRHSPRSPRTWEQEPLQEQPR  424

Query  482  GGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSR  541
            GGW + RPRARSVDALDD+  P + ESG  SP S+G R RAY PPRSRSRDDLYD DD R
Sbjct  425  GGWGSGRPRARSVDALDDINRPGSTESGRSSPPSSGRRGRAYAPPRSRSRDDLYDPDDPR  484

Query  542  DFPRSRDPH-YDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGS  600
            D P SRDPH YDD RSR+ P ADPRS   R+ DPRD G RS D  YDGRLLEEA++KKG+
Sbjct  485  DLPHSRDPHYYDDLRSRD-PRADPRS-RQRSHDPRDAGFRSRDPQYDGRLLEEALKKKGA  542

Query  601  ---EERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV  649
                 R  +EEEEE +YPPAPPPYSETDSQASRERR+KKNLALSRESLVV
Sbjct  543  GERRRVYREEEEEEEEGHYPPAPPPYSETDSQASRERRMKKNLALSRESLVV  594
```

FIG. 5C-2

【図５Ｃ－３】

ヒトLSRとマウスLSR(ref|NP_001157656.1)のアミノ酸配列比較

```
Identities = 453/592 (77%), Positives = 480/592 (82%), Gaps = 34/592 (5%)

Query  62   SHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTSTPTQ  121
            SHPA       +FV L L  +C   A AIQVTV +PYHVVILFQPVTL CTYQM++T T
Sbjct  14   SHPAT-----TIFVCLFLIIYCPDRASAIQVTVPDPYHVVILFQPVTLHCTYQMSNTLTA  68

Query  122  PIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQG  181
            PIVIWKYKSFCRDR+ADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQG
Sbjct  69   PIVIWKYKSFCRDRVADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQG  128

Query  182  NAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQGNNEAYAELIVLGR  241
            NAVTLGDYYQGRRITITGNADLTF+QTAWGDSGVYYCSVVSAQDL GNNEAYAELIVL
Sbjct  129  NAVTLGDYYQGRRITITGNADLTFEQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLDGNNEAYAELIVL--  186

Query  242  TSGVAELLPGFQAGPIEDWLFVVVVVCLAAFLIFLLLGICWCQCCPHTCCCYVRCPCCPDK  301
                          DWLFVVVVVCLA+ L FLLLGICWCQCCPHTCCCYVRCPCCPDK
Sbjct  187  ----------------DWLFVVVVVCLASLLFFLLLGICWCQCCPHTCCCYVRCPCCPDK  229

Query  302  CCCPEALYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVD  361
            CCCPEALYAAGKAATSGVPSIYAPS Y HLSPAKT       P        P GYPGD D
Sbjct  230  CCCPEALYAAGKAATSGVPSIYAPSIYTHLSPAKT----PPPPPAMIPMRPPYGYPGDFD  285
```

【図５Ｃ－４】

```
Query  362  RSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPG  421
            R+SS GG  S VPLLR+ D SV+SEVRSGYRIQA+QQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPG
Sbjct  286  RTSSVGGHSSQVPLLREVDGSVSSEVRSGYRIQANQQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPG  345

Query  422  PPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAG  481
            PP+GRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSR PALTPIRDEEW  HSPRSPR W+QEP +EQ
Sbjct  346  PPNGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRAPALTPIRDEEWNRHSPRSPRTWEQEPLQEQPR  405

Query  482  GGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSR  541
            GGW + RPRARSVDALDD+  P + ESG  SP S+G R RAY PPRSRSRDDLYD DD R
Sbjct  406  GGWGSGRPRARSVDALDDINRPGSTESGRSSPPSSGRRGRAYAPPRSRSRDDLYDPDDPR  465

Query  542  DFPRSRDPH-YDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGS  600
            D P SRDPH YDD RSR+ P ADPRS   R+ DPRD G RS D  YDGRLLEEA++KKG+
Sbjct  466  DLPHSRDPHYYDDLRSRD-PRADPRS-RQRSHDPRDAGFRSRDPQYDGRLLEEALKKKGA  523

Query  601  ---EERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVV  649
                 R  +EEEEE +YPPAPPPYSETDSQASRERR+KKNLALSRESLVV
Sbjct  524  GERRRVYREEEEEEEEGHYPPAPPPYSETDSQASRERRMKKNLALSRESLVV  575
```

FIG. 5C-4

【図５Ｄ】

ヒトTMEM25とマウスTMEM25(ref:lc||4109)のアミノ酸配列比較

```
Query  1    MALPPGPAALRHTLLLLPALLSSGWGELEPQIDGQTWAERALRENERHAFTCRVAGGPGT  60
            M LP   A LRHTLLLLPALLSSG GEL PQIDGQTWAERALRENE HAFTCRVAGG  T
Sbjct  1    MELPLSQATLRHTLLLLPALLSSGQGELAPQIDGQTWAERALRENEHHAFTCRVAGGSAT  60

Query  61   PRLAWYLDGQLQEASTSRLLSVGGEAFSGGTSTFTVTAHRAQHELNCSLQDPRSGRSANA  120
            PRLAWYLDGQLQEA+TSRLLSVGG+AFSGGTSTFTVTA R+QHELNCSLQDP SGR ANA
Sbjct  61   PRLAWYLDGQLQEAFTSRLLSVGGDAFSGGTSTFTVTAQRSQHELNCSLQDPGSGRPANA  120

Query  121  SVILNVQFKPEIAQVGAKYQEAQGPGLLVVLFALVRANPPANVTWIDQDGPVTVNTSDFL  180
            SVILNVQFKPEIAQVGAKYQEAQGPGLLVVLFALVRANPPANVTWIDQDGPVTVN SDFL
Sbjct  121  SVILNVQFKPEIAQVGAKYQEAQGPGLLVVLFALVRANPPANVTWIDQDGPVTVNASDFL  180

Query  181  VLDAQNYPWLTNHTVQLQLRSLAHNLSVVATNDVGVTSASLPAPGLLATRVEVPLLGIVV  240
            VLDAQNYPWLTNHTVQLQLRSLAHNLSVVATNDVGVTSASLPAPGLLATR+EVPLLGIVV
Sbjct  181  VLDAQNYPWLTNHTVQLQLRSLAHNLSVVATNDVGVTSASLPAPGLLATRIEVPLLGIVV  240

Query  241  AAGLALGTLVGFSTLVACLVCRKEKKTKGPSRHPSLISSDSNNLKLNNVRLPRENMSLPS  300
            A GLALGTLVGFSTLVACLVCRKEKKTKGPSR PSLISSDSNNLKLNNVRLPRENMSLPS
Sbjct  241  AGGLALGTLVGFSTLVACLVCRKEKKTKGPSRRPSLISSDSNNLKLNNVRLPRENMSLPS  300

Query  301  NLQLNDLTPDSRAVKPADRQMAQNNSRPELLDPEPGGLLTSQGFIRLPVLGYIYRVSSVS  360
            NLQLNDLTPD R  K  +R MAQ++SRPELL+ EPGGLLTS+GFIRLP+LGYIYRVSSVS
Sbjct  301  NLQLNDLTPDLRG-KATERPMAQHSSRPELLEAEPGGLLTSRGFIRLPMLGYIYRVSSVS  359

Query  361  SDEIWL  366
            SDEIWL
Sbjct  360  SDEIWL  365
```

【図６】

配列番号	プライマーID	プライマーの配列	制限部位
51	100-690	GAGAACTTGGCAGGCTCTCC	-
52	100-691	CACACTTCCCAGCAGATGTC	-
53	100-729	CTA GCTAGC CACC ATGGCAGTC TTATTCCTCCTC	NheI
54	100-730	CGC GAATTC GCCTGGGCTTGTG GGCAGGTG	EcoRI

【図７－１】

pIRESpuroベクターにおけるG6F_EGFP ORFのヌクレオチド配列

ATGGCAGTCTTATTCCTCCTCCTGTTCCTATGTGGAACTCCCCAGGCTGCAGACAACATG

CAGGCCATCTATGTGGCCTTGGGGGAGGCAGTAGAGCTGCCATGTCCCTCACCACCTACT

CTACATGGGGACGAACACCTGTCATGGTTCTGCAGCCCTGCAGCAGGCTCCTTCACCACC

CTGGTAGCCCAAGTCCAAGTGGGCAGGCCAGCCCCAGACCCTGGAAAACCAGGAAGGGAA

TCCAGGCTCAGACTGCTGGGGAACTATTCTTTGTGGTTGGAGGGATCCAAAGAGGAAGAT

GCCGGGCGGTACTGGTGCGCTGTGCTAGGTCAGCACCACAACTACCAGAACTGGAGGGTG

TACGACGTCTTGGTGCTCAAAGGATCCCAGTTATCTGCAAGGGCTGCAGATGGATCCCCC

TGCAATGTCCTCCTGTGCTCTGTGGTCCCCAGCAGACGCATGGACTCTGTGACCTGGCAG

GAAGGGAAGGGTCCCGTGAGGGGCCGTGTTCAGTCCTTCTGGGGCAGTGAGGCTGCCCTG

CTCTTGGTGTGTCCTGGGGAGGGGCTTTCTGAGCCCAGGAGCCGAAGACCAAGAATCATC

CGCTGCCTCATGACTCACAACAAAGGGGTCAGCTTTAGCCTGGCAGCCTCCATCGATGCT

TCTCCTGCCCTCTGTGCCCCTTCCACGGGCTGGGACATGCCTTGGATTCTGATGCTGCTG

CTCACAATGGGCCAGGGAGTTGTCATCCTGGCCCTCAGCATCGTGCTCTGGAGGCAGAGG

GTCCGTGGGGCTCCAGGCAGAGATGCCTCGATTCCTCAGTTCAAACCCGAAATCCAGGTC

TATGAGAACATCCATTTGGCCCGTCTTGGCCCACCTGCCCACAAGCCCAGGCGAATTCTG

【図７－２】

CAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCGGTCGCCACC*ATGGTGAGCAAGGGCGAG*

GAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCAC

AAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAG

TTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACC

TACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAG

TCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAAC

TACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTG

AAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTAC

AACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTC

AAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC

ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCC

GCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACC

GCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

FIG. 7-2

【図８】

pIRESpuroベクターにおけるG6F_EGFP ORFのタンパク質配列

MAVLFLLLFLCGTPQAADNMQAIYVALGEAVELPCPSPPTLHGDEHLSWFCSPAAGSFTT

LVAQVQVGRPAPDPGKPGRESRLRLLGNYSLWLEGSKEEDAGRYWCAVLGQHHNYQNWRV

YDVLVLKGSQLSARAADGSPCNVLLCSVVPSRRMDSVTWQEGKGPVKGRVQSFWGSEAAL

LLVCPGEGLSEPRSRRPRIIRCLMTHNKGVSFSLAASIDASPALCAPSTGWDMPWILMLL

LTMGQGVVILALSIVLWRQRVRGAPGRDASIPQFKPEIQVYENIHLARLGPPAHKPRRIL

QSTVPRARDPPVAT*MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLK*

FICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGN

YKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNF

KIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVT

AAGITLGMDELYK

【図９】

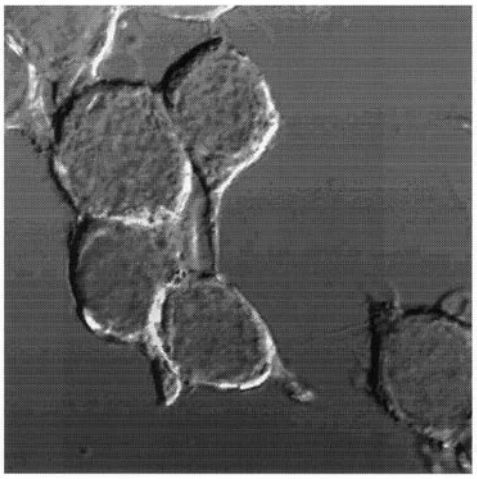


FIG. 9

【図１０】

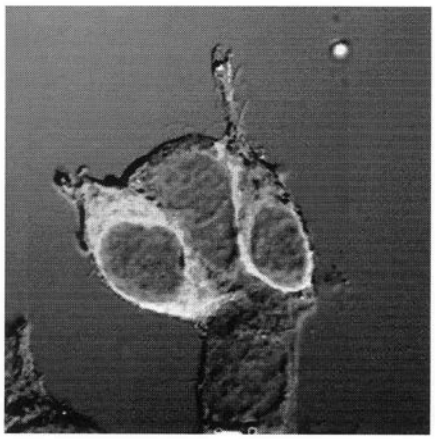


FIG. 10

【図１０Ａ】

LYG6F-マウス-ECD_FC_マウスIgG2a

SIQTIYVASGESVEMPCPSPPSLLGGQLLTWFRSPVAGSSTILVAQVQVDK

PVSDLRKPEPDSRYKLFGNYSLWLEGSRDEDAGRYWCTVMDQNHKYQNWRVYDVSVLKGSQFSVKSPDGP

SCAALLCSVVPARRLDSVTWLEGRNTVRGHAQYFWGEGAALLLVCPTEGLPETRARRPRNIRCLLPQNKR

FSFSLAAASAEPSPTVCATLPSWDVP**EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIV**

TCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPA

PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSD

GSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

【図１０Ｂ】

VSIG10-マウス-ECD_FC_マウスIgG2a

LQLLLNPSRANLSVRPNSEVLPGIHPDLEAVAIGEVHDNVTLRCGSASG

SRGLVTWYRNDSEPAFLVSFNSSLPPAAPRFSLEDAGALRIEALRLEDDGNYTCQEVLNETHWFPVRLRV

ASGPAYVEVNISATGTLPNGTLYAARGSQVDFNCCSAAQPPPEVEWWIQTHSIPEFLGKNLSANSFTLML

MSQNLQGNYTCSATNVLSGRQRKVTTELLVYWPPPSAPQCSVEVSSESTTLELACNWDGGYPDPTFLWTE

EPGGTIMGNSKLQTLSPAQLLEGKKFKCVGNHILGPESGASCVVKLSSPLLPSQPMRTCFVGGNVTLTCE

VSGANPPARIQWLRNLTQPAIQPSSHYIITQQGQSSSLTIHNCSQDLDEGFYYCQAENLVGVRATNIWLS

VKEPLNIGG**EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS**

WFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQ

VYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWV

ERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

【図１０Ｃ】

TMEM25-マウス-ECD_FC_マウスIgG2a

ELAPQIDGQTWAERALRENEHHAFTCRVAGGSATPRLAWYLDGQLQEATTSRLLSVGGDAFSGGTSTFTVT

AQRSQHELNCSLQDPGSGRPANASVILNVQFKPEIAQVGAKYQEAQGPGLLVVLFALVRANPPANVTWIDQ

DGPVTVNASDFLVLDAQNYPWLTNHTVQLQLRSLAHNLSVVATNDVGVTSASLPAPGLLATRIE**EPRGPTI**

KPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTH

REDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQV

TLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN

HHTTKSFSRTPGK

【図１０Ｄ】

LSR-マウス-ECD_FC_マウス IgG2a

IQVTVPDPYHVVILFQPVTLHCTYQMSNTLTAPI

VIWKYKSFCRDRVADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQGNAVTLGDYYQGR
RITITGNADLTFEQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLDGNNEAYAELIVLGRTSEAPELLPGFRAGPLED**EPRGP**
TIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQ
THREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKK
QVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL
HNHHTTKSFSRTPGK

【図１１Ａ】

LYG6F_ヒト ECD_ヒト IgG1-Fc (C220S)

MAVLFLLLFLCGTPQAADNMQAIYVALGEAVELPCPSPPTLHGDEHLSWFCSPAAGSFTTLVAQVQVGRP
APDPGKPGRESRLRLLGNYSLWLEGSKEEDAGRYWCAVLGQHHNYQNWRVYDVLVLKGSQLSARAADGSP
CNVLLCSVVPSRRMDSVTWQEGKGPVRGRVQSFWGSEAALLLVCPGEGLSEPRSRRPRIIRCLMTHNKGV
SFSLAASIDASPALCAPSTGWDMPEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【図１１Ｂ】

VSIG10_ヒト ECD_ヒト IgG1-Fc (C220S)

MAAGGSAPEPRVLVCLGALLAGWVAVGLEAVVIGEVHENVTLHCGNISGLRGQVTWYRNNSEPVFLLSSN
SSLRPAEPRFSLVDATSLHIESLSLGDEGIYTCQEILNVTQWFQVWLQVA*SGPYQIEVHIVATGTLPNGT*
LYAARGSQVDFSCNSSSRPPPVVEWWFQALNSSSESFGHNLTVNFFSLLLISPNLQGNYTCLALNQLSKR
HRKVTTELLVYYPPPSAPQCWAQMASGSFMLQLTCRWDGGYPDPDFLWIEEPGGVIVGKSKLGVEMLSES
QLSDGKKFKCVTSHIVGPESGASCMVQIRGPSLLSEPMKTCFTGGNVTLTCQVSGAYPPAKILWLRNLTQ
PEVIIQPSSRHLITQDGQNSTLTIHNCSQDLDEGYYICRADSPVGVREMEIWLSVKEPLNIGGEPKSSDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

【図１１Ｃ】

エクソン３スキッピングVSIG10_ヒト ECD_ヒト IgG1-Fc (C220S)

MAAGGSAPEPRVLVCLGALLAGWVAVGLEAVVIGEVHENVTLHCGNISGLRGQVTWYRNNSEPVFLLSSN
SSLRPAEPRFSLVDATSLHIESLSLGDEGIYTCQEILNVTQWFQVWLQVANPPPSAPQCWAQMASGSFML
QLTCRWDGGYPDPDFLWIEEPGGVIVGKSKLGVEMLSESQLSDGKKFKCVTSHIVGPESGASCMVQIRGP
SLLSEPMKTCFTGGNVTLTCQVSGAYPPAKILWLRNLTQPEVIIQPSSRHLITQDGQNSTLTIHNCSQDL
DEGYYICRADSPVGVREMEIWLSVKEPLNIGGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【図１１Ｄ】

TMEM25_ヒト ECD_ヒト IgG1-Fc (C220S)

MALPPGPAALRHTLLLLPALLSSGWGELEPQIDGQTWAERALRENERHAFTCRVAGGPGTPRLAWYLDGQL
QEASTSRLLSVGGEAFSGGTSTFTVTAHRAQHELNCSLQDPRSGRSANASVILNVQFKPEIAQVGAKYQEA
QGPGLLVVLFALVRANPPANVTWIDQDGPVTVNTSDFLVLDAQNYPWLTNHTVQLQLRSLAHNLSVVATND
VGVTSASLPAPGLLATRVEEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【図１１Ｅ】

LSRアイソフォームａ_ヒト ECD_ヒト IgG1-Fc (C220S)

MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTST
PTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQGNAVTLGD
YYQGRRITITG*NADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQGNNEAYAELIVLGRTSGVAELLPGFQAGPIE*
DEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【図１１Ｆ】

LSRアイソフォームｂ_ヒト ECD_ヒト IgG1-Fc (C220S)

MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTST
PTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQGNAVTLGD
YYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQGNNEAYAELIVLDEPKSSDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【図１１Ｇ】

LSRアイソフォームｃ_ヒト ECD_ヒト IgG1-Fc (C220S)

MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTST
PTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQGNAVTLGD
YYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQGNNEAYAELIVLVYAAGKAATSGVPSIYAPS
TYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQAS
QQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPR
SPRGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYD
QDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRP
HKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【図１１Ｈ】

LSRアイソフォームd_ヒト ECD_ヒト IgG1-Fc (C220S)

MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTST
PTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQGNAVTLGD
YYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQGNNEAYAELIVLVYAAGKAATSGVPSIYAPS
TYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQ
QDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRS
PRGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYDQ
DDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRPH
KEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【図１１Ｉ】

LSRアイソフォームe_ヒト ECD_ヒト IgG1-Fc (C220S)

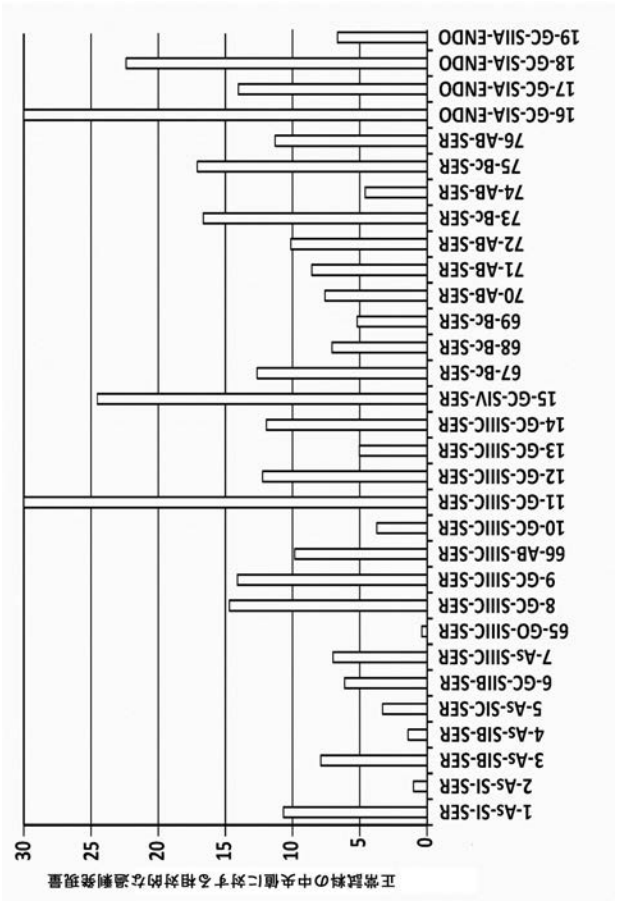
MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTST
PTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQGNAVTLGD
YYQGRRITITGMYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSA
GGQGSYVPLLRDTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTS
LHEDDWRSRPSRGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTA
ESGSRSPTSNGGRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRD
NGSRSGDLPYDGRLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRES
LVVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【図１１Ｊ】

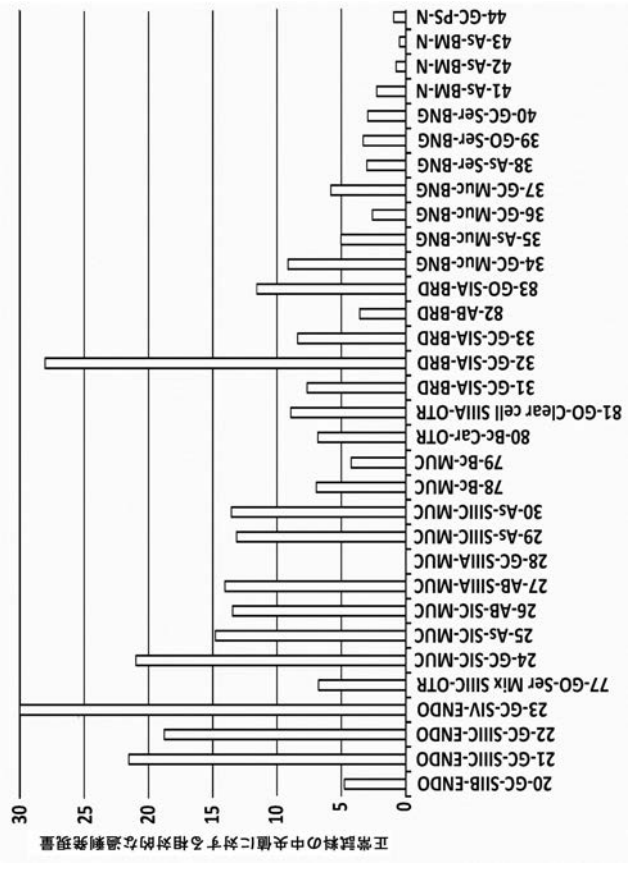
LSRアイソフォームf_ヒト ECD_ヒト IgG1-Fc (C220S)

MALLAGGLSRGLGSHPAAAGRDAVVFVWLLLSTWCTAPARAIQVTVSNPYHVVILFQPVTLPCTYQMTST
PTQPIVIWKYKSFCRDRIADAFSPASVDNQLNAQLAAGNPGYNPYVECQDSVRTVRVVATKQGNAVTLGD
YYQGRRITITGNADLTFDQTAWGDSGVYYCSVVSAQDLQGNNEAYAELIVLGRTSGVAELLPGFQAGPIE
VYAAGKAATSGVPSIYAPSTYAHLSPAKTPPPPAMIPMGPAYNGYPGGYPGDVDRSSSAGGQGSYVPLLR
DTDSSVASEVRSGYRIQASQQDDSMRVLYYMEKELANFDPSRPGPPSGRVERAMSEVTSLHEDDWRSRPS
RGPALTPIRDEEWGGHSPRSPRGWDQEPAREQAGGGWRARRPRARSVDALDDLTPPSTAESGSRSPTSNG
GRSRAYMPPRSRSRDDLYDQDDSRDFPRSRDPHYDDFRSRERPPADPRSHHHRTRDPRDNGSRSGDLPYD
GRLLEEAVRKKGSEERRRPHKEEEEEAYYPPAPPPYSETDSQASRERRLKKNLALSRESLVVEPKSSDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

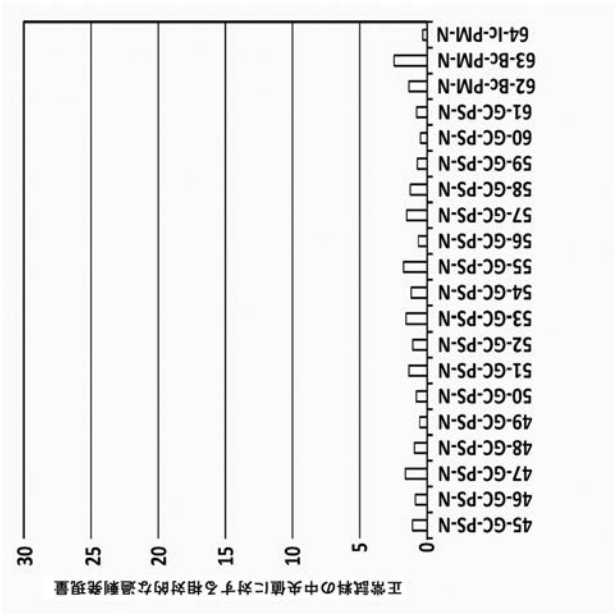
【図１２Ａ】



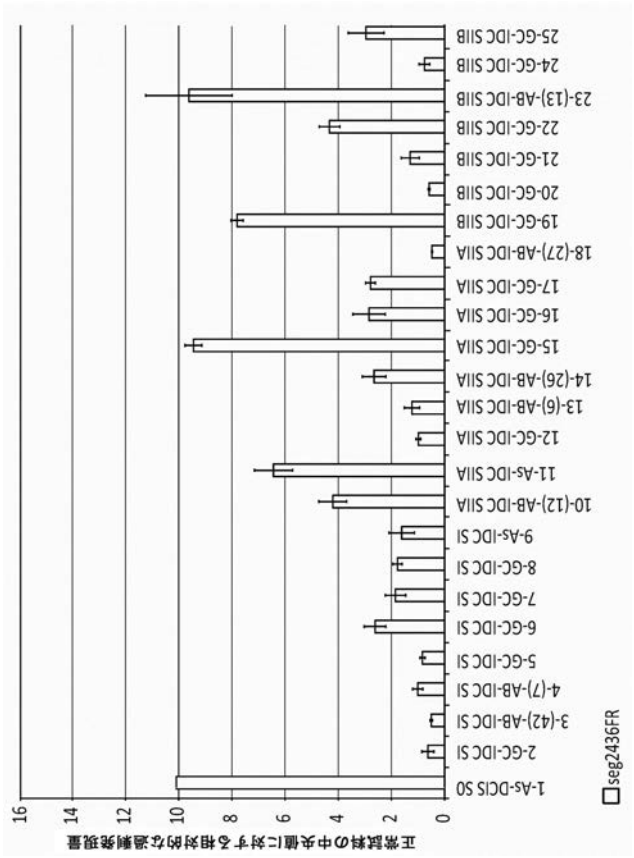
【図１２Ｂ】



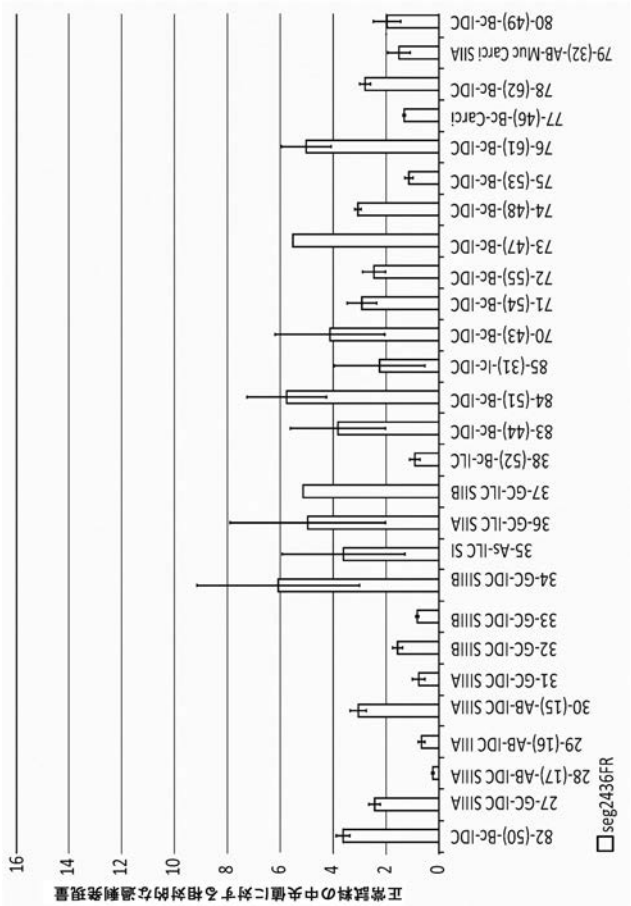
【図１２Ｃ】



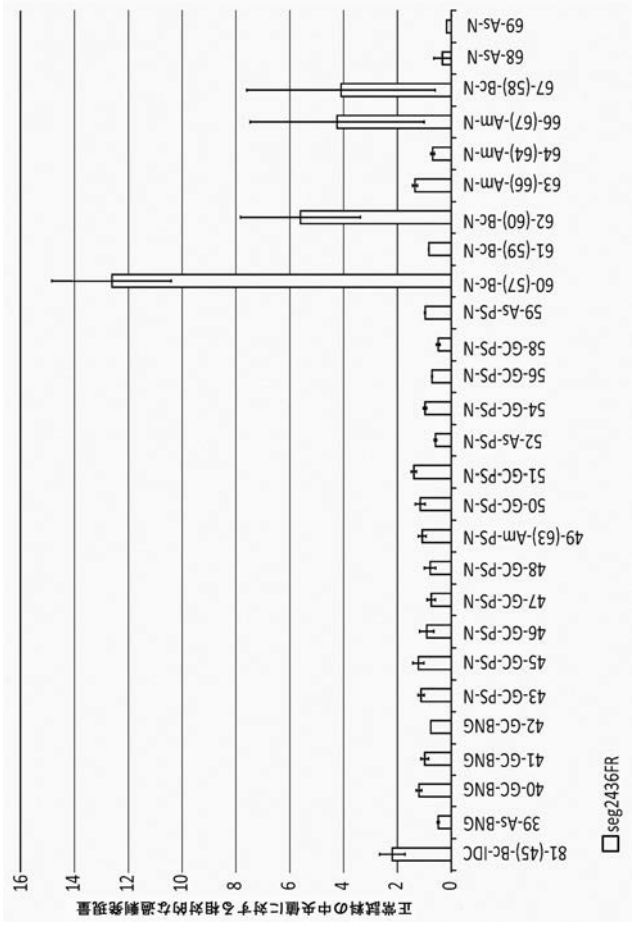
【図１３Ａ】



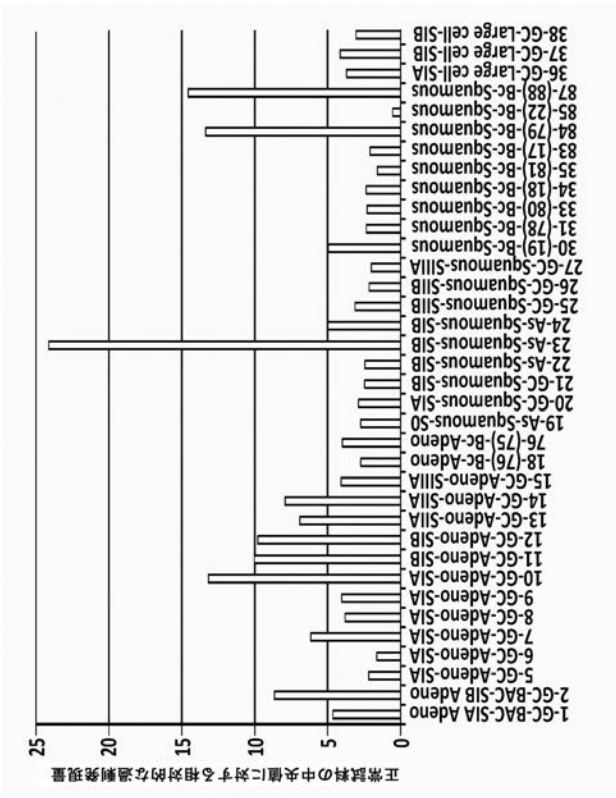
【図１３Ｂ】



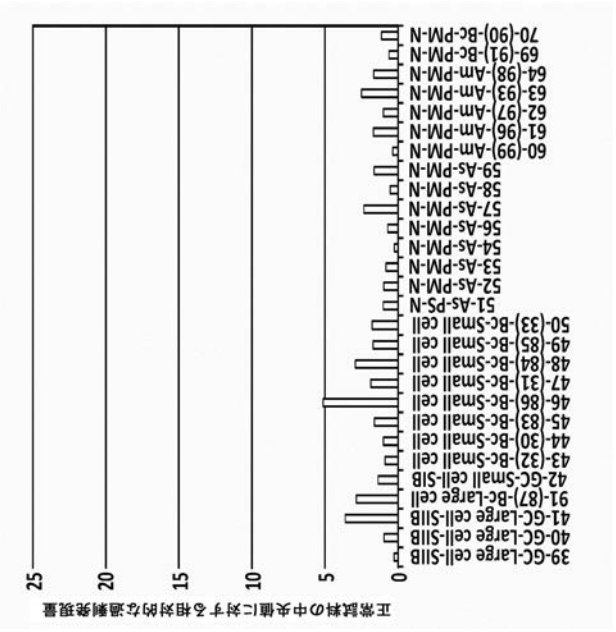
【図１３Ｃ】



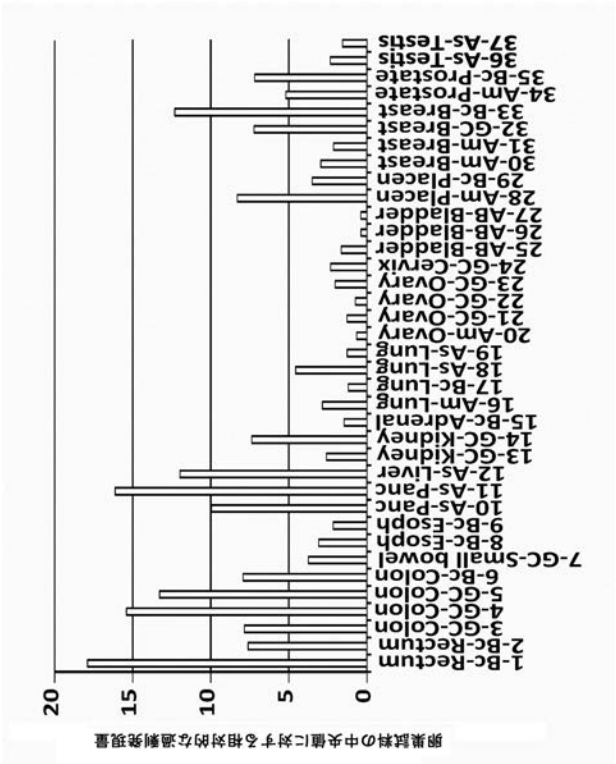
【図１４Ａ】



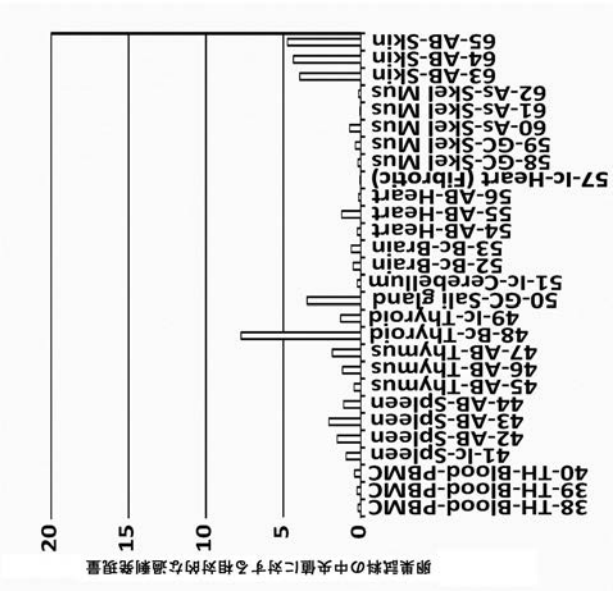
【図１４Ｂ】



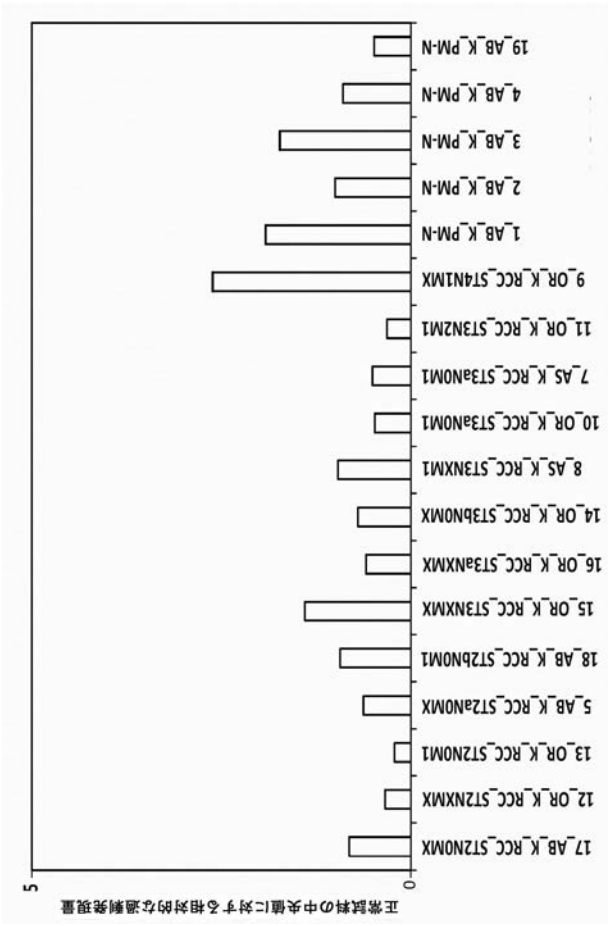
【図１５Ａ】



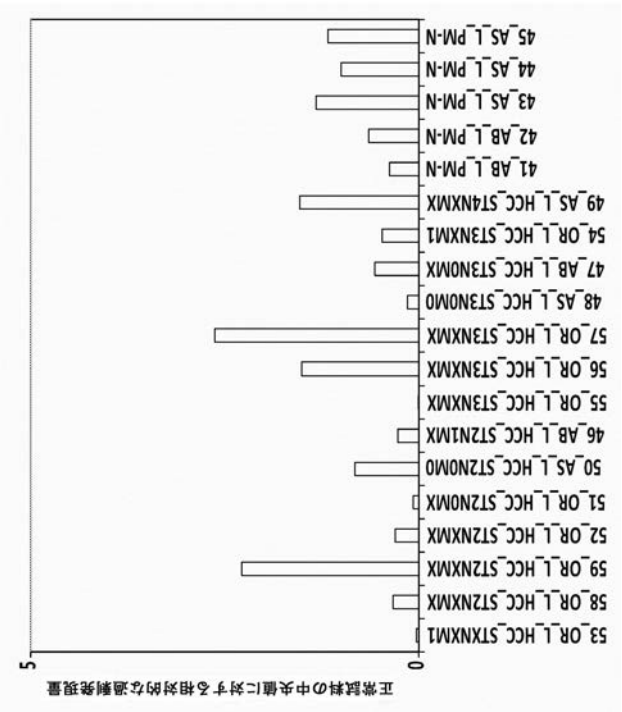
【図１５Ｂ】



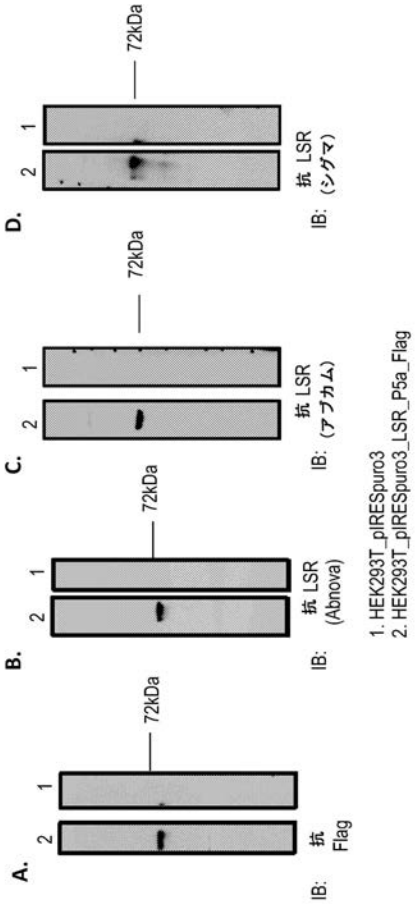
【図１６】



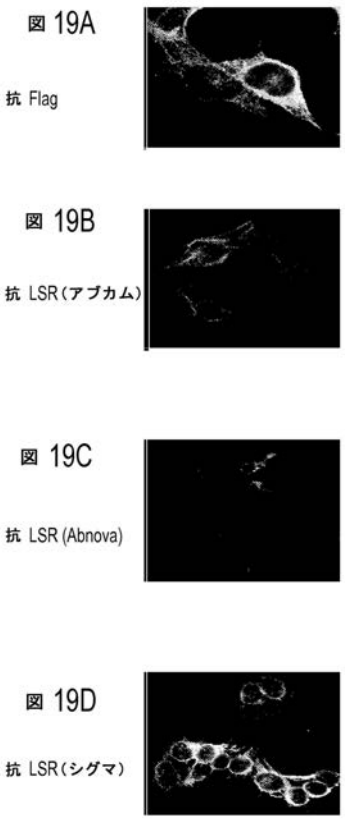
【図１７】



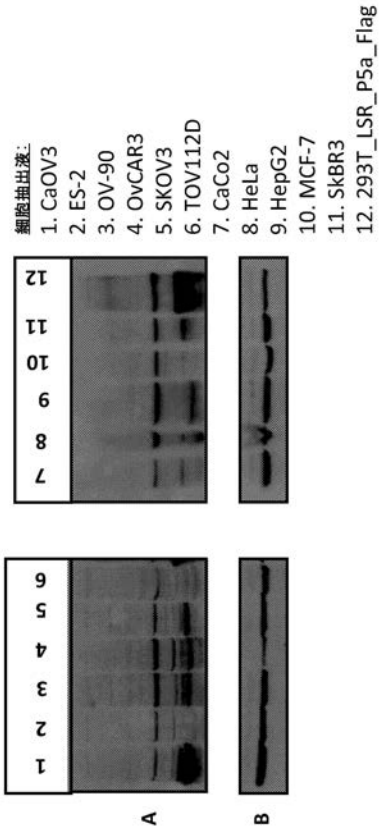
【図１８】



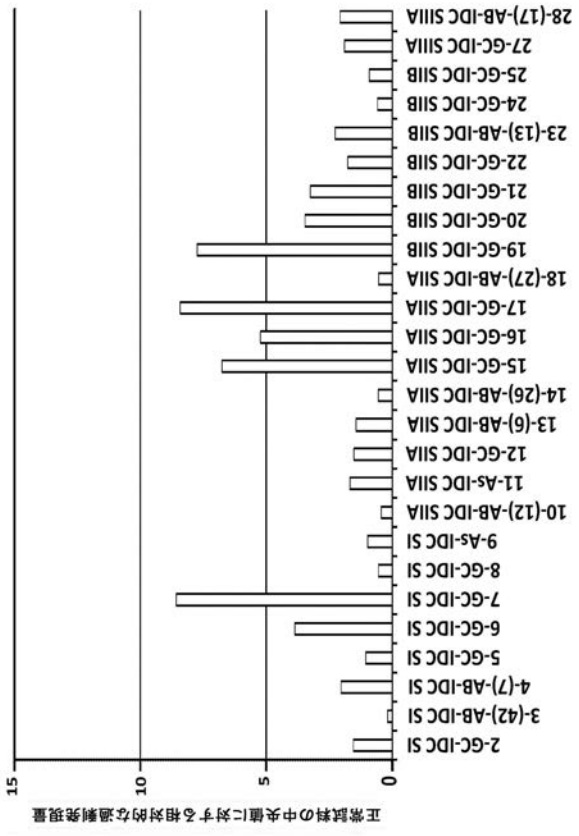
【図１９Ａ－Ｄ】



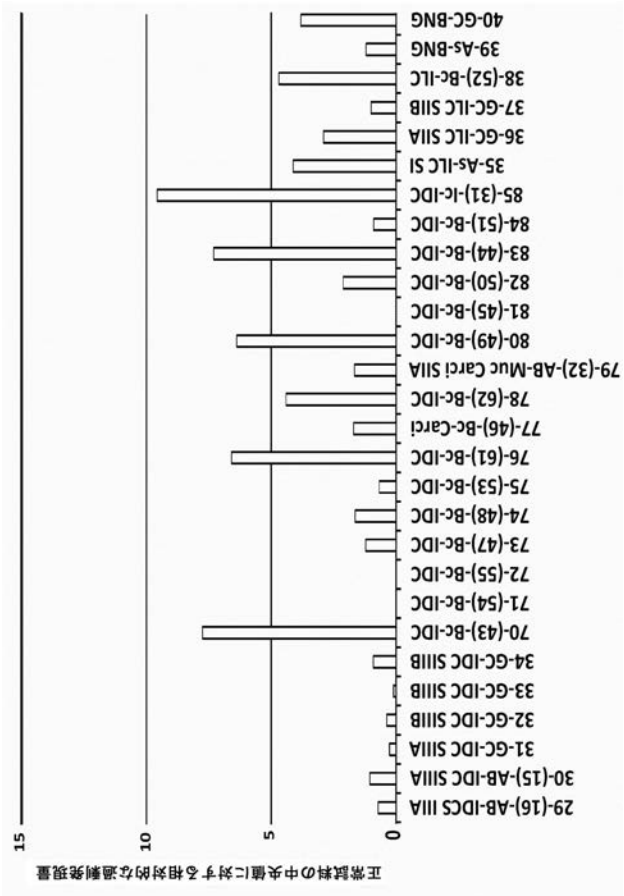
【図２０】



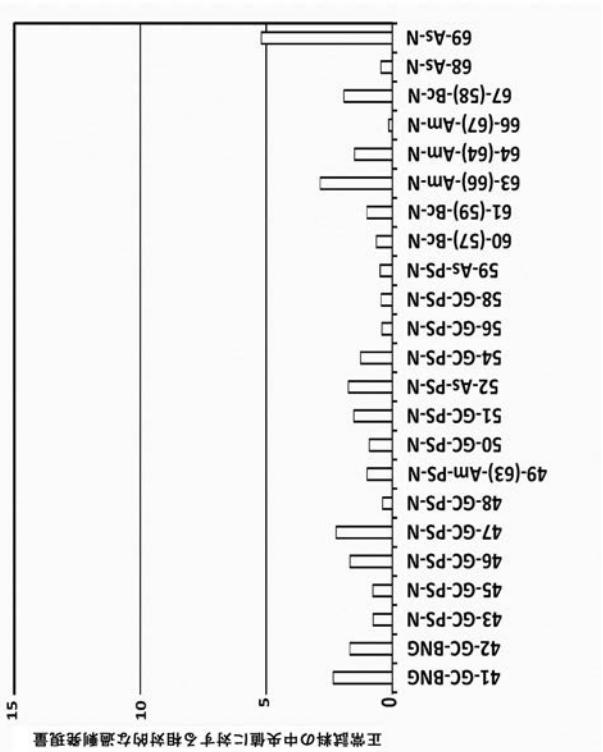
【図２１Ａ】



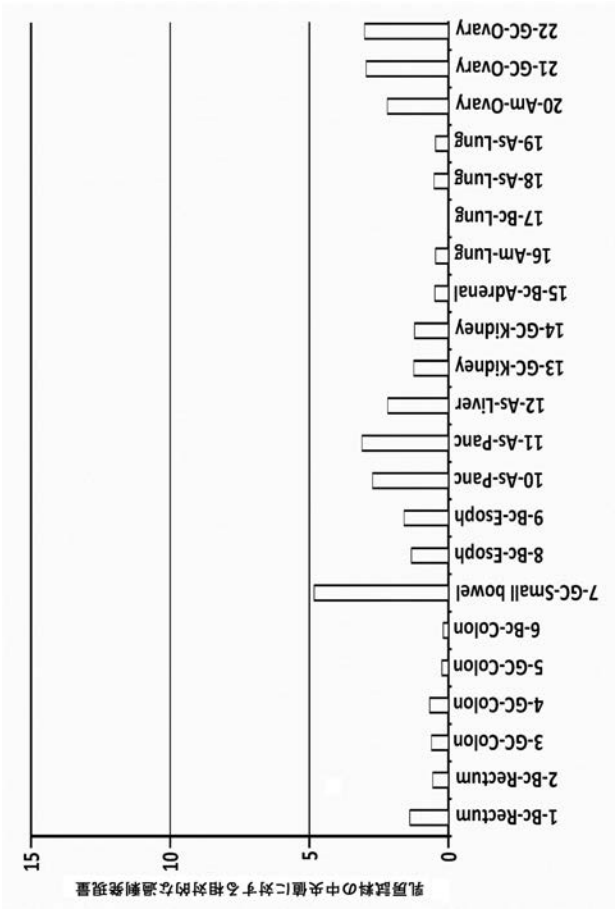
【図２１Ｂ】



【図２１Ｃ】



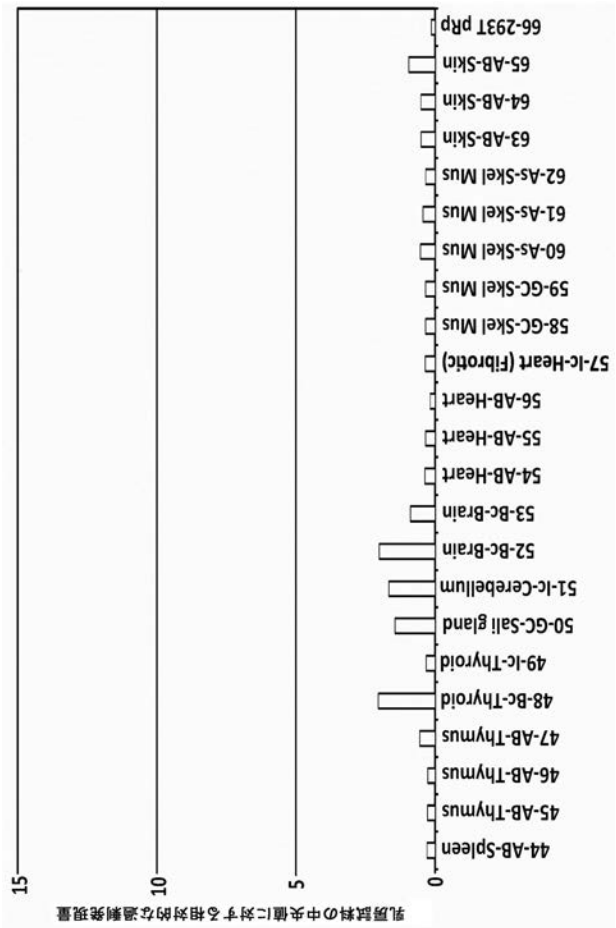
【図２２Ａ】



【図２２Ｂ】



【図２２Ｃ】



【図２３】

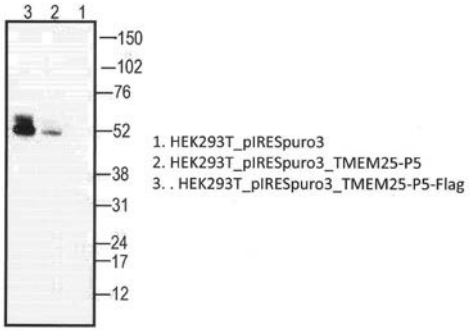


FIG. 23A

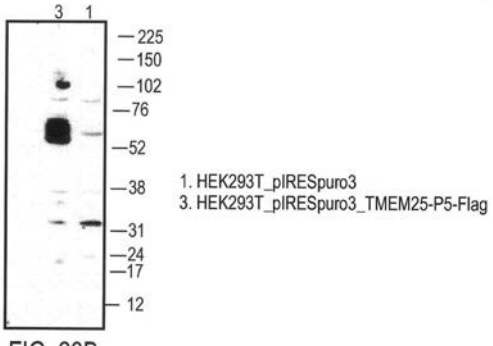


FIG. 23B

【図２４】

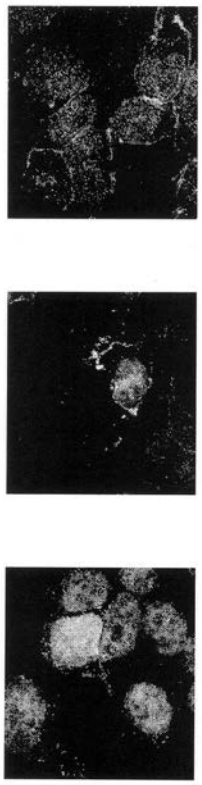
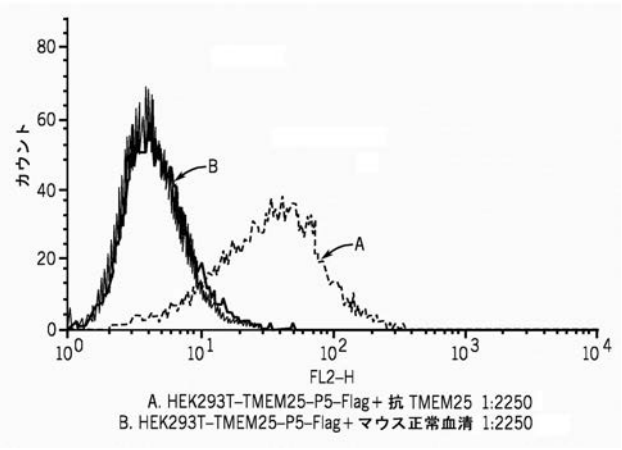


FIG. 24C

FIG. 24B

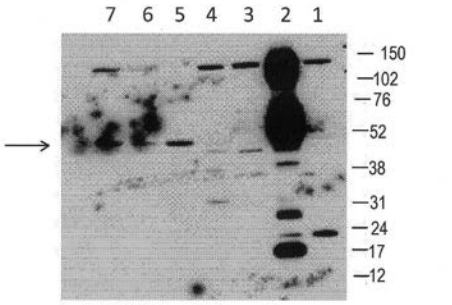
FIG. 24A

【図２５】



A. HEK293T-TMEM25-P5-Flag+ 抗 TMEM25 1:2250
B. HEK293T-TMEM25-P5-Flag+ マウス正常血清 1:2250

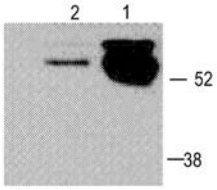
【図２６】



1. HEK293T_pIRESpuro3
2. HEK293T_pIRESpuro3_TMEM25-P5-Flag
3. KARPAS
4. G-361
5. RPMI8226
6. DAUDI
7. JURKAT

FIG. 26

【図２７】



1. HEK293T_pIRESpuro3_TMEM25-P5-Flag +Si スクランブル
2. HEK293T_pIRESpuro3_TMEM25-P5-Flag+ Si TMEM25

【図２８Ａ－Ｆ】

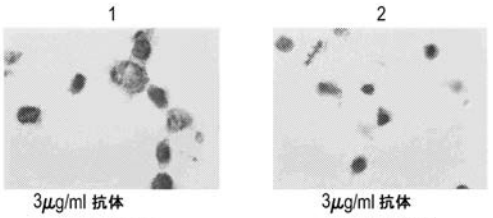


図 28A　図 28B

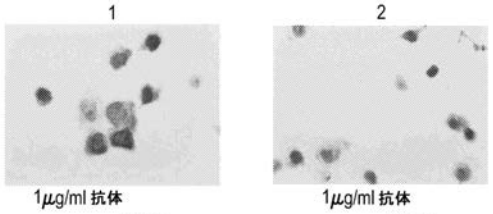


図 28C　図 28D

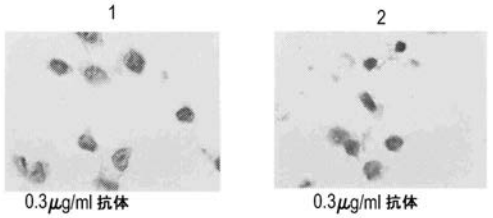
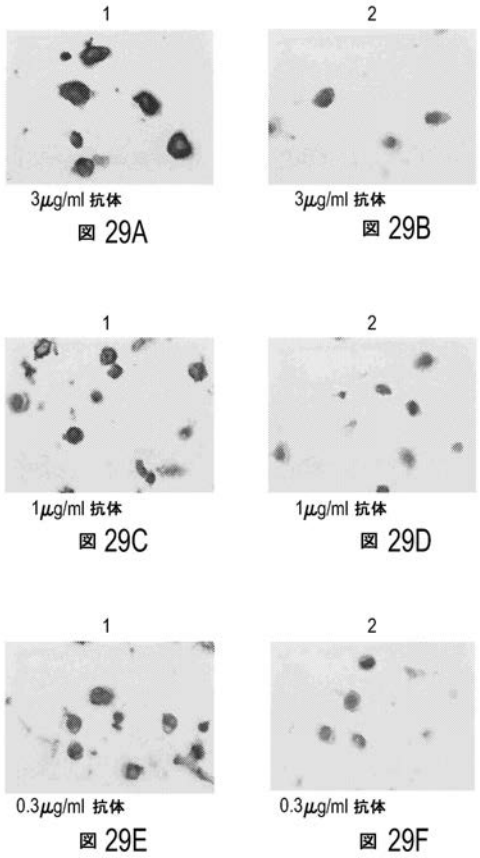
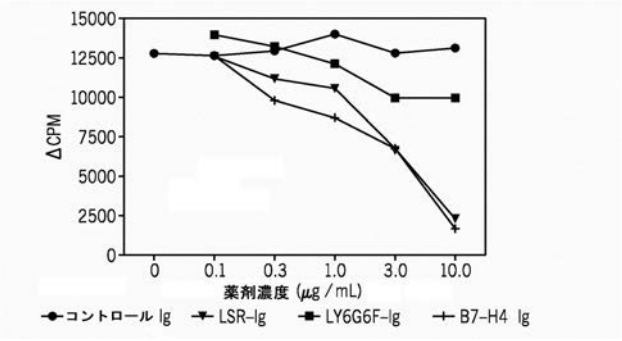


図 28E　図 28F

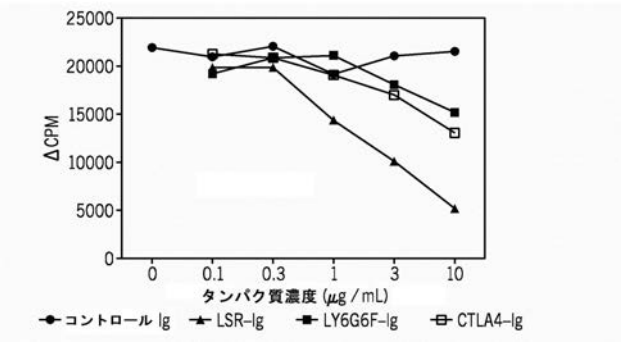
【図２９Ａ－Ｆ】



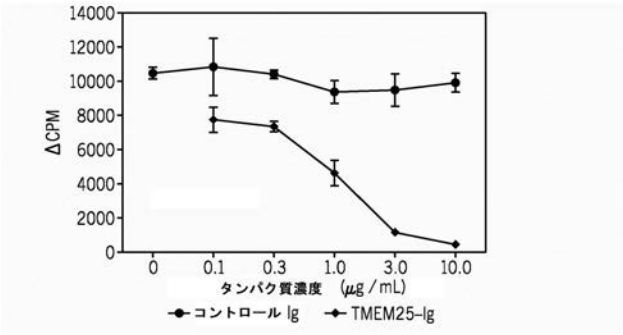
【図３０Ａ】



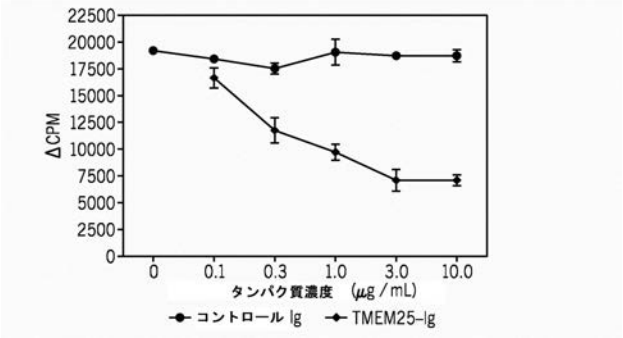
【図３０Ｂ】



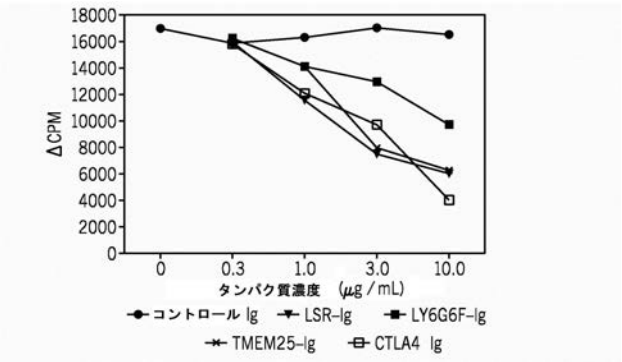
【図３０Ｃ】



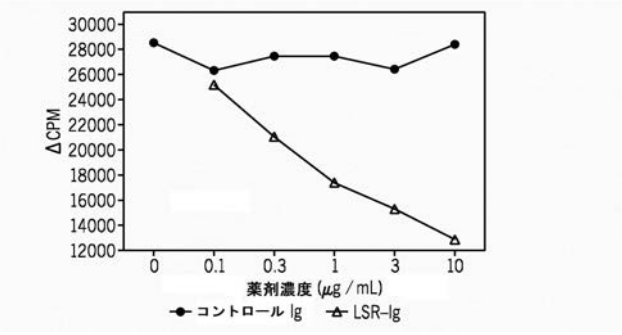
【図３０Ｄ】



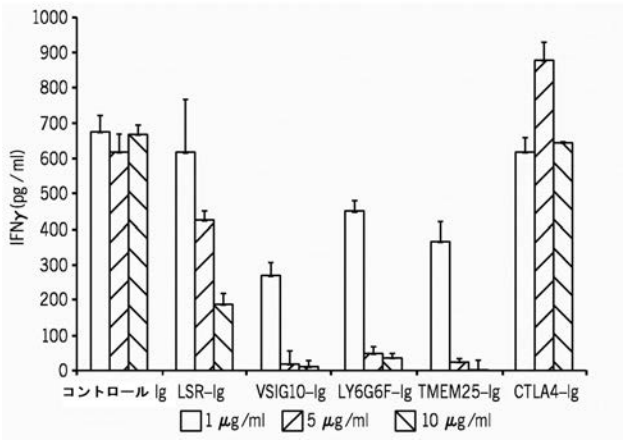
【図３０Ｅ】



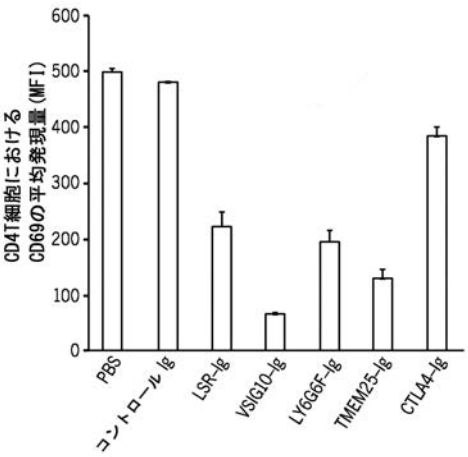
【図３１】



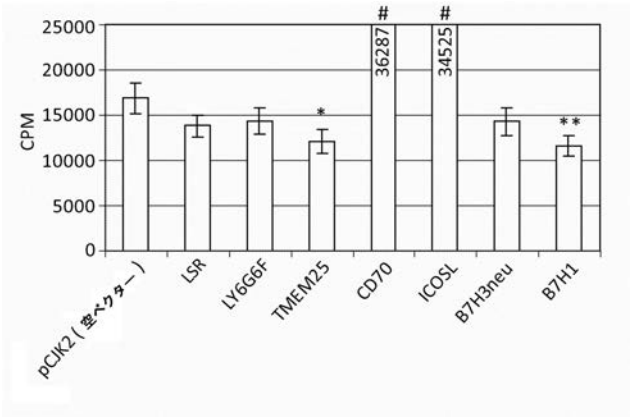
【図３２Ａ】



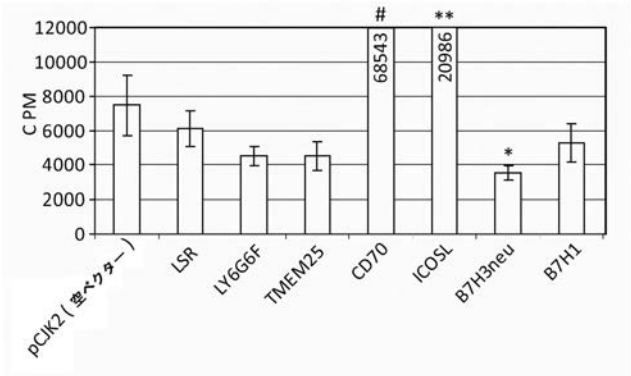
【図３２Ｂ】



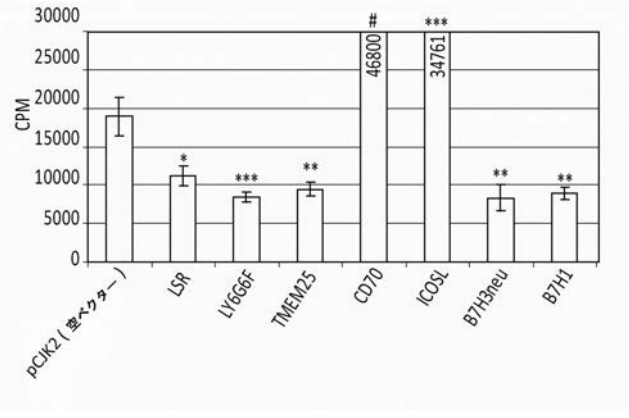
【図３３Ａ】



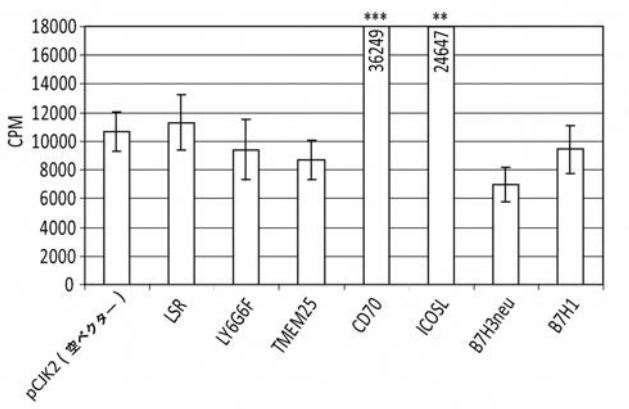
【図３３Ｂ】



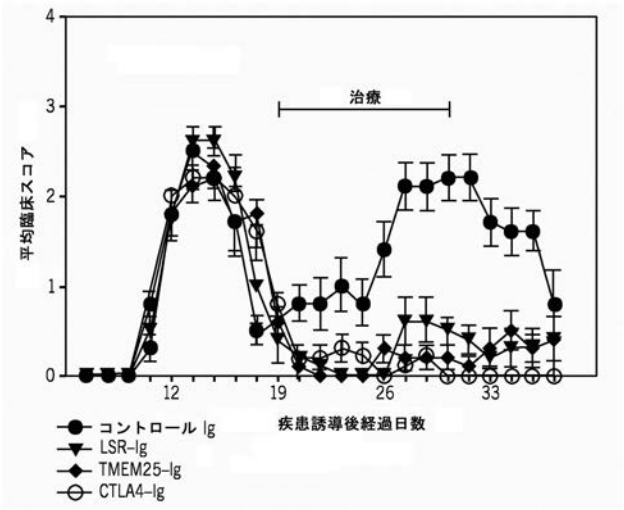
【図３３Ｃ】



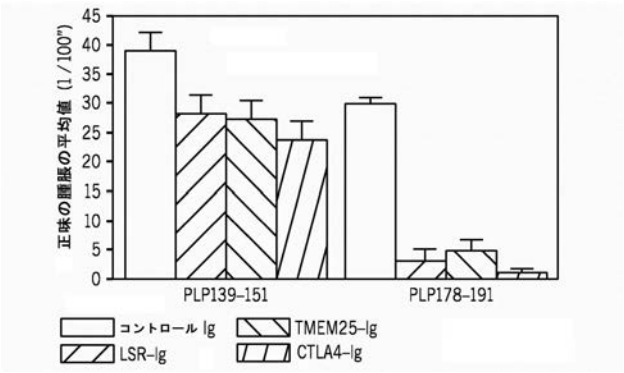
【図３３Ｄ】



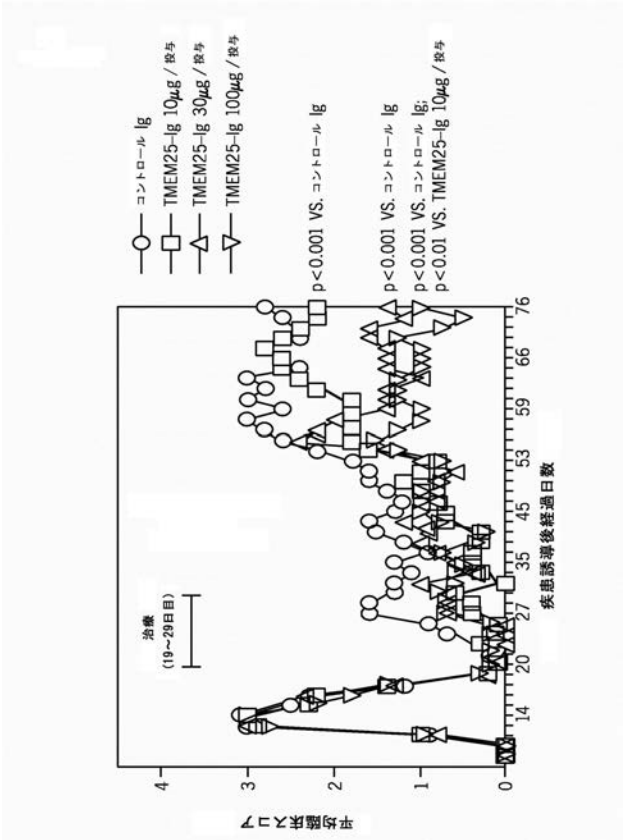
【図３４Ａ】



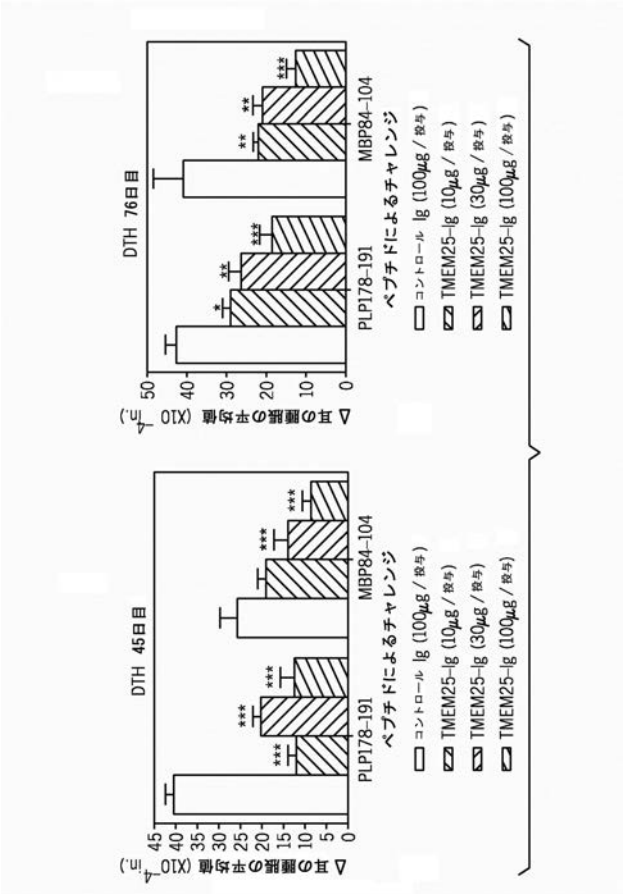
【図３４Ｂ】



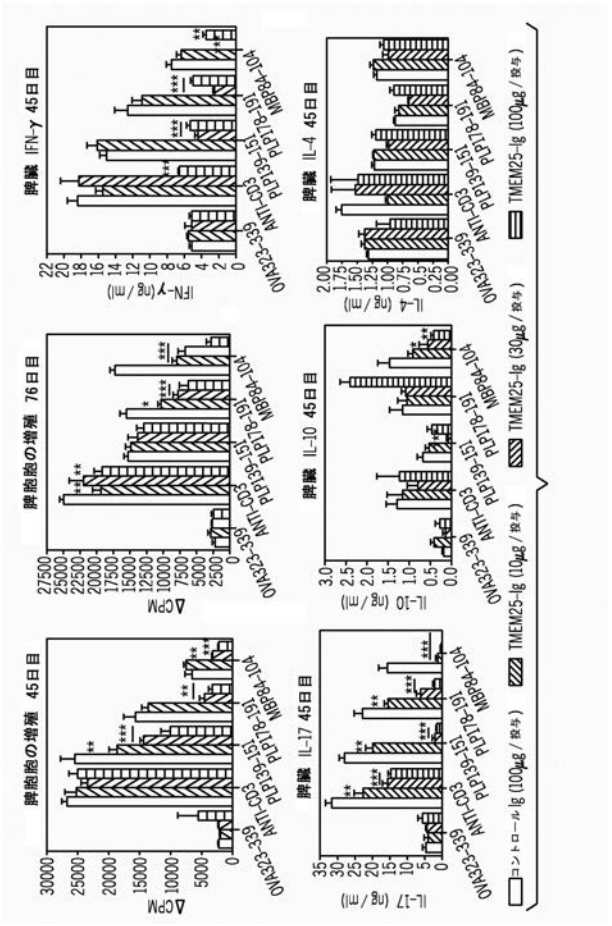
【図３５Ａ】



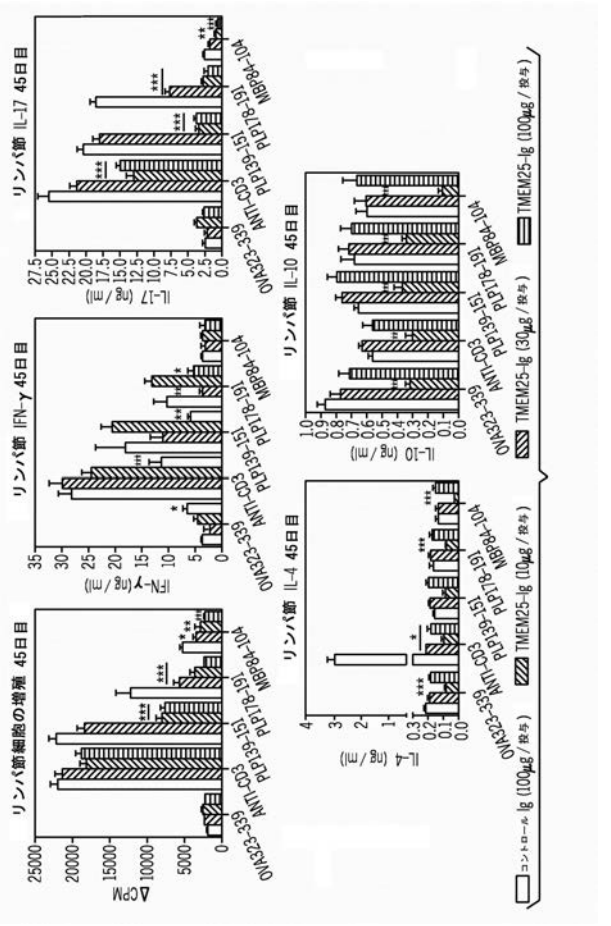
【図３５Ｂ】



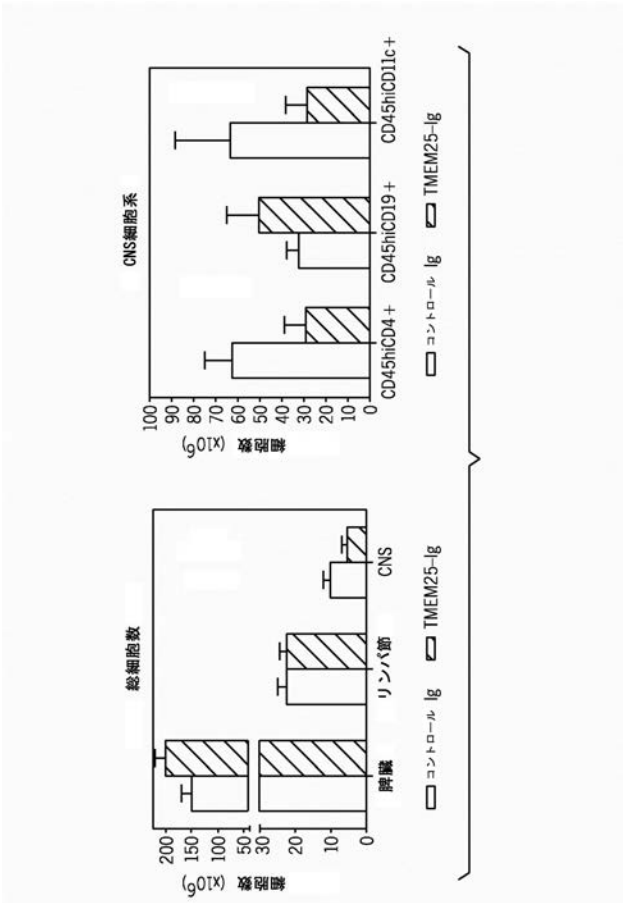
【図３５Ｃ】



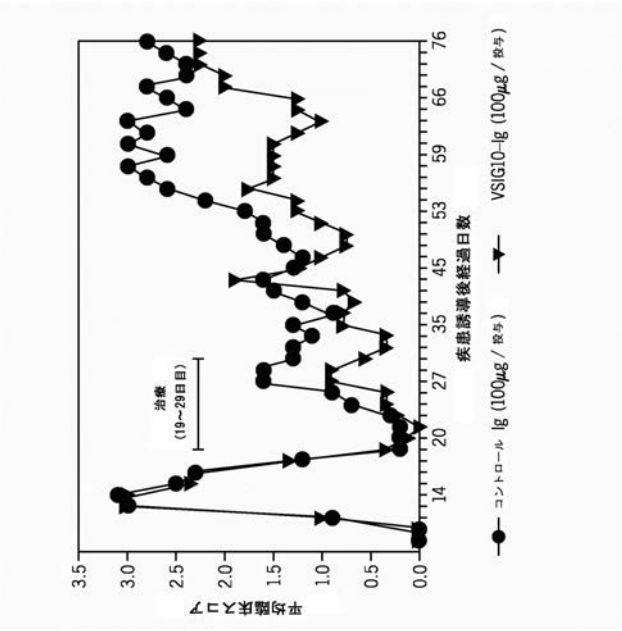
【図３５Ｄ】



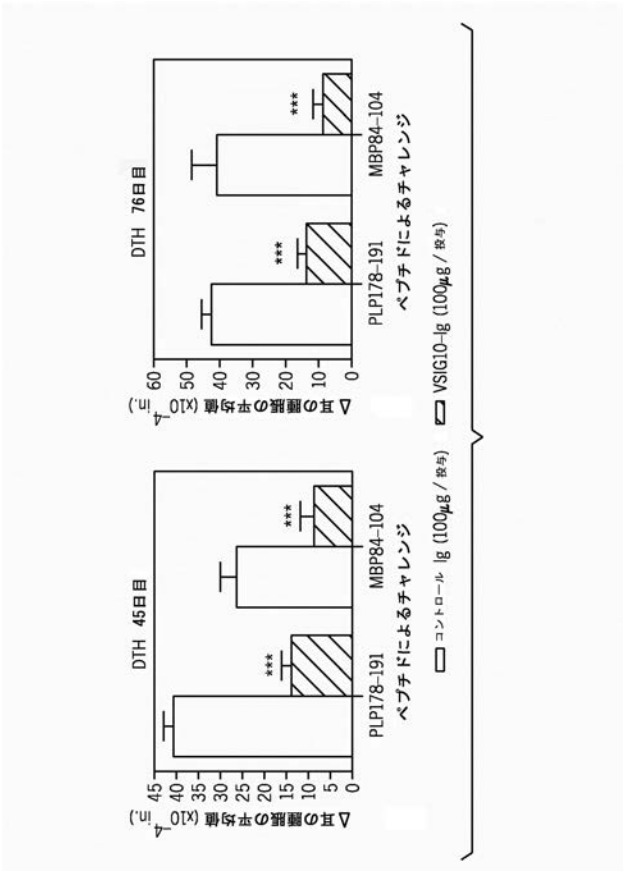
【図３５Ｅ】



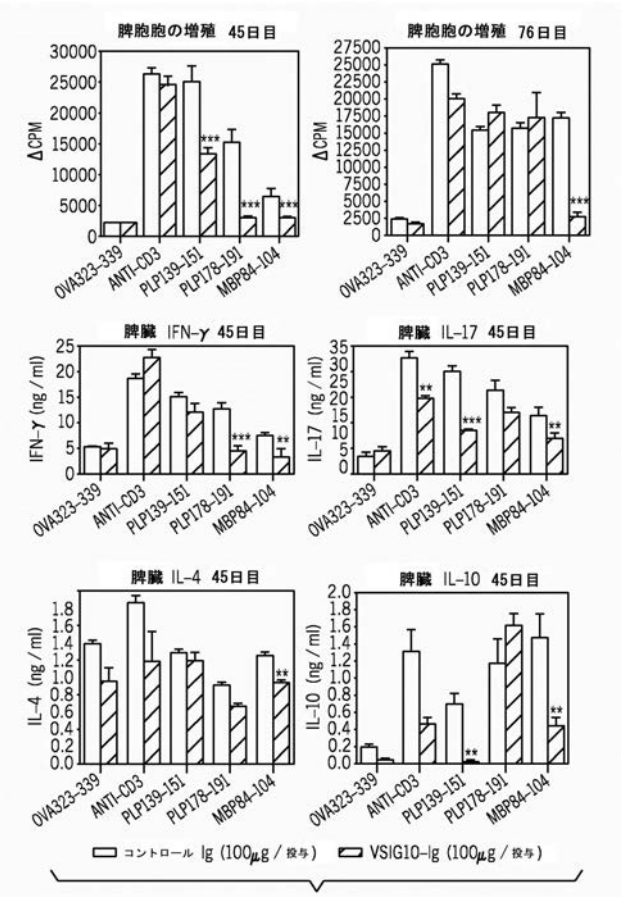
【図３６Ａ】



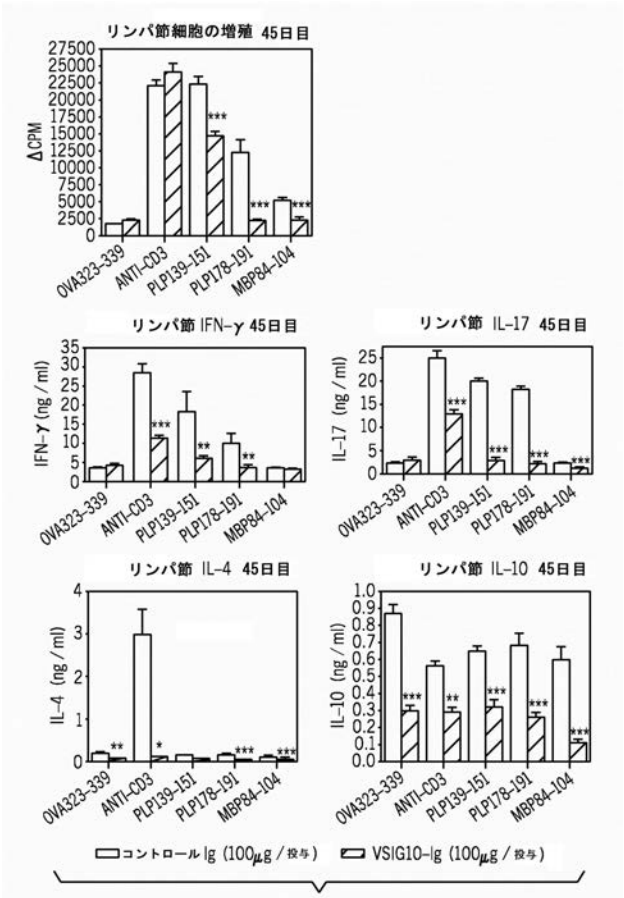
【図３６Ｂ】



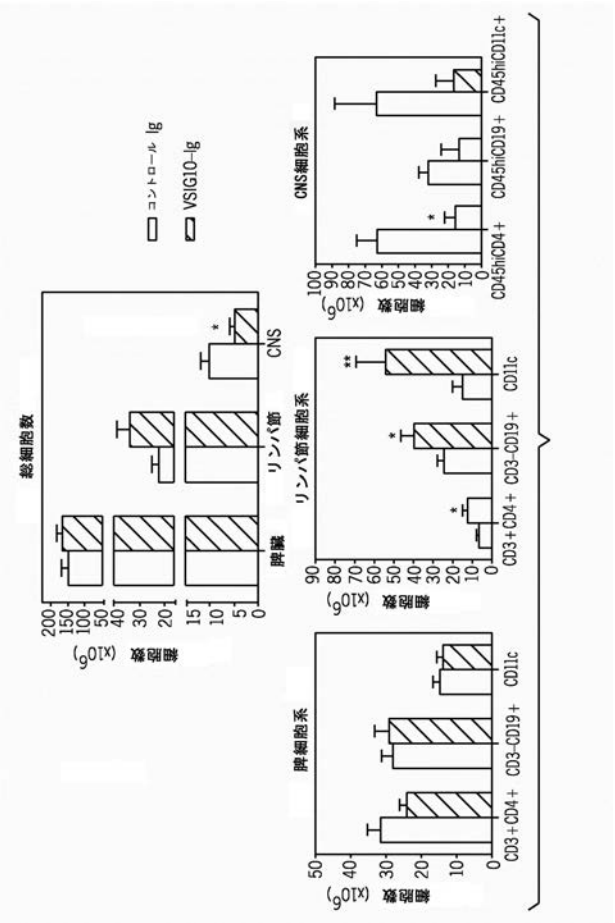
【図３６Ｃ】



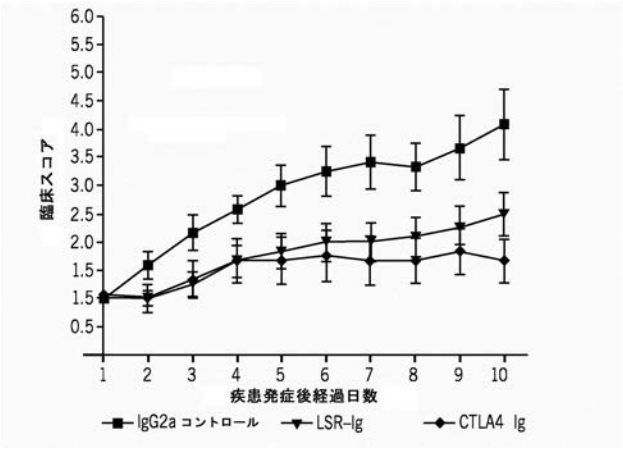
【図３６Ｄ】



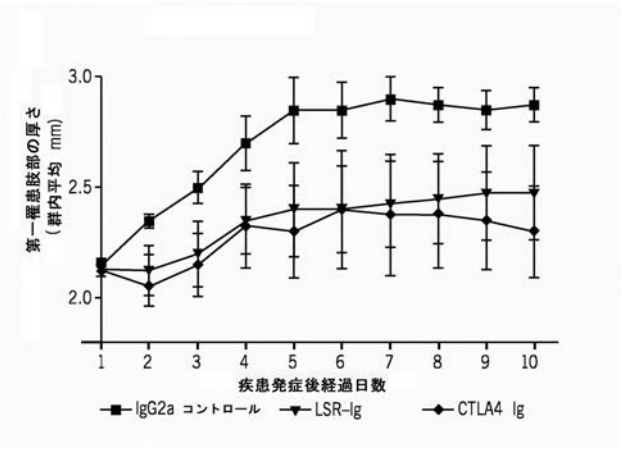
【図３６Ｅ】



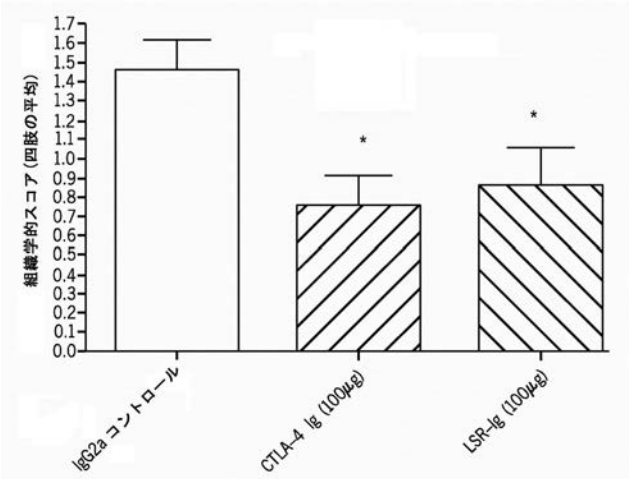
【図３７Ａ】



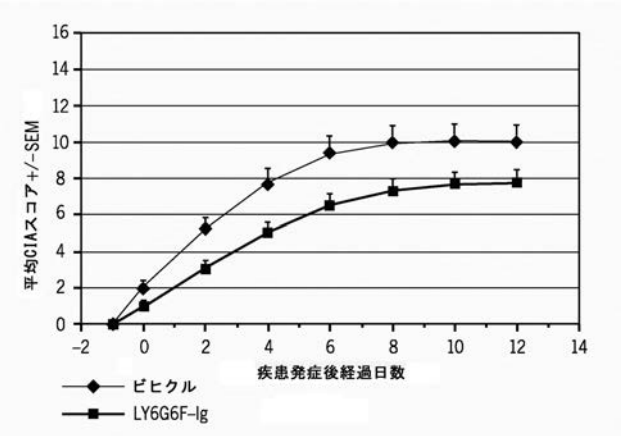
【図３７Ｂ】



【図３７Ｃ】



【図３８】



【配列表】
2017200908000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成29年5月16日(2017.5.16)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号１０のアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に結合する抗原結合領域を有する、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントの、卵巣がんであるがんの治療用薬剤の製造における使用。
【請求項２】
ＬＳＲを発現するがん細胞のアポトーシスまたは溶解を誘導する作用を有する前記薬剤の製造における、請求項１に記載の使用。
【請求項３】
前記アポトーシスまたは溶解に、前記抗体のＣＤＣ活性またはＡＤＣＣ活性が関与していることを特徴とする、請求項１に記載の使用。
【請求項４】
前記抗原結合部位が、立体構造エピトープまたは直線状エピトープを含み、かつ、約３～７個の連続したアミノ酸または不連続アミノ酸を含むことを特徴とする、請求項１に記載の使用。
【請求項５】
前記抗体が、完全ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または霊長類化抗体であることを特徴とする、請求項１に記載の使用。
【請求項６】
前記抗体が、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ）フラグメント、ＦｖフラグメントおよびｓｃＦｖフラグメントおよび最小認識単位からなる群から選択されることを特徴とする、請求項１に記載の使用。
【請求項７】
前記抗体が、薬物、放射性核種、発蛍光団、酵素、毒素、治療剤、および化学療法剤から選択される成分と結合されており；これらを検出するマーカーが、放射性同位元素、金属キレート剤、酵素、蛍光化合物、生物発光化合物、または化学発光化合物であることを特徴とする、請求項１に記載の使用。
【請求項８】
前記成分が、免疫抑制剤；細胞傷害剤；腫瘍ワクチン；抗体（たとえば、ベバシズマブ、アービタックス）；ペプチド；ペプチボディ；小分子；細胞傷害剤および細胞増殖抑制剤（たとえば、パクリタキセル、シスプラチン、ビノレルビン、ドセタキセル、ゲムシタビン、テモゾロミド、イリノテカン、５ＦＵ、カルボプラチン）などの化学療法剤；インターフェロンおよびインターロイキンなどの免疫調節剤；免疫刺激抗体；成長ホルモン；他のサイトカイン；葉酸；ビタミン；無機質；アロマターゼ阻害剤；ＲＮＡｉ；ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤；およびプロテアソーム阻害剤からなる群から選択されることを特徴とする請求項７に記載の使用。
【請求項９】
ａ．サイトカインのアップレギュレート；
ｂ．Ｔ細胞の増殖の誘導；
ｃ．抗原特異的Ｔ細胞免疫の促進；

ｄ．ＣＤ４＋Ｔ細胞および／またはＣＤ８＋Ｔ細胞の活性化の促進
の１以上の作用をさらに有する前記薬剤の製造における請求項１に記載の使用。
【請求項１０】
前記薬剤を別の治療法と組み合わせることをさらに含む、請求項１に記載の使用であって、該治療法が、放射線療法；抗体療法；化学療法；光線力学療法；養子Ｔ細胞療法；Ｔｒｅｇ除去；手術；または慣用の薬物との併用療法であることを特徴とする使用。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０８７７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０８７７】
ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗原、ＶＳＩＧ１０抗原、ＴＭＥＭ２５抗原および／またはＬＳＲ抗原に関連した疾患または病態のための治療剤および診断法として使用される、所望の抗ＬＹ６Ｇ６Ｆ抗体、抗ＶＳＩＧ１０抗体、抗ＴＭＥＭ２５抗体および／または抗ＬＳＲ抗体の製造および選択に関連して、本発明について説明し、様々な実施形態を提供した。本明細書において示された明示的な組み合わせおよびサブコンビネーションの範囲を超えて、本明細書において様々な実施形態を任意の適切な方法で組み合わせてもよい。以下の請求項によって本発明をさらに説明する。
非限定的に、本発明は以下の態様を含む。
［態様１］
配列番号１１、１３、１５～１８、６７および１４３からなる群から選択される配列の９８個、１０８個、１１８個、１３５個、１４５個、１５５個、１６０個、１７０個または１８０個のアミノ酸から実質的になる単離されたポリペプチド。
［態様２］
配列番号１２、１４、４７～５０、１０、２２および１０２のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列から実質的になる単離されたポリペプチド。
［態様３］
配列番号１２、１４、４７～５０、１０、２２および１０２のいずれかに示されるアミノ酸配列から実質的になることを特徴とする態様２に記載のポリペプチド。
［態様４］
ＬＳＲとその機能性対応物との相互作用をブロックまたは阻害することを特徴とする態様１～３のいずれかに記載のポリペプチド。
［態様５］
ＬＳＲとその機能性対応物との相互作用においてＬＳＲと置き換わること、またはＬＳＲとその機能性対応物との相互作用を増強することを特徴とする態様１～３のいずれかに記載のポリペプチド。
［態様６］
異種配列に連結された態様１～５のいずれかに記載のポリペプチドを含む融合タンパク質。
［態様７］
前記の異種配列が免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含むことを特徴とする態様６に記載の融合タンパク質。
［態様８］
前記の免疫グロブリン分子の一部分が、免疫グロブリン重鎖定常領域のＦｃフラグメントであることを特徴とする態様７に記載の融合タンパク質。
［態様９］
前記の免疫グロブリン重鎖定常領域が、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡおよびＩｇＤからなる群から選択される免疫グロブリンアイソタイ

プに由来することを特徴とする態様８に記載の融合タンパク質。
［態様１０］
配列番号７５～８０および１７６～１８１のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する態様９に記載の融合タンパク質。
［態様１１］
インビトロおよびインビボにおいて免疫細胞応答を調節することを特徴とする態様１０に記載の融合タンパク質。
［態様１２］
態様１～１１のいずれかに記載のポリペプチドをコードする核酸配列。
［態様１３］
配列番号４０～４６、１３２、４４、１５５、１８６～１８８、および１９３～１９８からなる群から選択される核酸配列、これと少なくとも９５％の配列同一性を有する変異体、またはこれらの変性変異体であることを特徴とする態様１２に記載の核酸配列。
［態様１４］
態様１２または１３に記載の核酸配列を少なくとも１つ含む発現ベクターまたはウイルス。
［態様１５］
組換え細胞であって、態様１４に記載の核酸配列を含む発現ベクターまたはウイルスを含み、該ＤＮＡセグメントにコードされたポリペプチドを構成的または誘導的に発現する組換え細胞。
［態様１６］
ＬＳＲの可溶性細胞外ドメインポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは融合タンパク質の製造方法であって、前記のＤＮＡセグメントまたは核酸にコードされたポリペプチドの発現が可能な条件下で、態様１５に記載の組換え細胞を培養すること、および該ポリペプチドを回収することを含む方法。
［態様１７］
態様１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６～１１のいずれかに記載の融合タンパク質、態様１２または１３に記載のヌクレオチド配列、態様１４に記載の発現ベクター、または態様１５に記載の宿主細胞と、薬学的に許容される希釈剤または担体とを含む医薬組成物。
［態様１８］
態様１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれか１つと特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントの、がんの治療薬の製造のための使用。
［態様１９］
ＬＳＲを発現するがん細胞のアポトーシスまたは溶解を誘導するための態様１８に記載の使用。
［態様２０］
態様１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれか１つと特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントの、感染症の治療薬の製造のための使用。
［態様２１］
態様１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれか１つと特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントの、Ｔ細胞活性化の阻害または抑制に関連した疾患の治療薬の製造のための使用。
［態様２２］
前記の抗原結合部位が、立体構造エピトープまたは直線状エピトープを含み、かつ、約３～７個の連続したアミノ酸または不連続アミノ酸を含むことを特徴とする、態様１８～２１のいずれかに記載の抗体または抗原結合フラグメントの使用。
［態様２３］

前記抗体が、完全ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または霊長類化抗体であることを特徴とする、態様１８～２２のいずれかに記載の抗体またはフラグメントの使用。
［態様２４］
前記抗体が、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ）フラグメント、ＦｖフラグメントおよびｓｃＦｖフラグメントおよび最小認識単位からなる群から選択されることを特徴とする、態様１８～２３のいずれかに記載の抗体またはフラグメントの使用。
［態様２５］
前記抗体が、薬剤、放射性核種、発蛍光団、酵素、毒素、治療剤、および化学療法剤から選択される成分と結合されており、
この検出可能なマーカーが、放射性同位元素、金属キレート剤、酵素、蛍光化合物、生物発光化合物、または化学発光化合物であることを特徴とする、態様１８～２４のいずれかに記載の抗体またはフラグメントの使用。
［態様２６］
前記アポトーシスまたは溶解が、前記抗体のＣＤＣ活性またはＡＤＣＣ活性に関与していることを特徴とする、態様２５に記載の抗体または抗原結合フラグメントの使用。
［態様２７］
態様１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６～１１のいずれかに記載の融合タンパク質、態様１２または１３に記載のヌクレオチド配列、態様１４に記載の発現ベクター、態様１５に記載の宿主細胞、および態様１７に記載の医薬組成物のいずれか１つの、がんの治療のための使用。
［態様２８］
態様１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６～１１のいずれかに記載の融合タンパク質、態様１２または１３に記載のヌクレオチド配列、態様１４に記載の発現ベクター、態様１５に記載の宿主細胞、および態様１７に記載の医薬組成物のいずれか１つの使用であって、対象への投与によりＴ細胞の活性化が阻害または抑制されることを特徴とする使用。
［態様２９］
対象において、
ａ．サイトカインのアップレギュレート；
ｂ．Ｔ細胞の増殖の誘導；
ｃ．抗原特異的Ｔ細胞免疫の促進；
ｄ．ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞および／またはＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の活性化の促進
の１以上を行う方法であって、
態様１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６～１１のいずれかに記載の融合タンパク質、態様１２または１３に記載のヌクレオチド配列、態様１４に記載の発現ベクター、態様１５に記載の宿主細胞、態様１７に記載の医薬組成物、および態様１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントのいずれか１つを対象に投与することを含む方法。
［態様３０］
がんを治療または予防する方法であって、
がんの治療または予防を必要とする対象に、態様１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６～１１のいずれかに記載の融合タンパク質、態様１２または１３に記載のヌクレオチド配列、態様１４に記載の発現ベクター、態様１５に記載の宿主細胞、態様１７に記載の医薬組成物、および態様１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントのいずれか１つを有効量で投与することを含む方法。
［態様３１］
前記の治療が、がんを治療するのに有用な別の成分または治療法と組み合わせられるこ

とを特徴とする、態様３０に記載の方法。
［態様３２］
前記治療法が、放射線療法；抗体療法；化学療法；光線力学療法；養子Ｔ細胞療法；Ｔｒｅｇ除去；手術；または慣用の薬剤との併用療法であることを特徴とする、態様３１に記載の方法。
［態様３３］
前記成分が、免疫抑制剤；細胞傷害剤；腫瘍ワクチン；抗体（たとえば、ベバシズマブ、アービタックス）；ペプチド；ペプチボディ；小分子；細胞傷害剤および細胞増殖抑制剤（たとえば、パクリタキセル、シスプラチン、ビノレルビン、ドセタキセル、ゲムシタビン、テモゾロミド、イリノテカン、５ＦＵ、カルボプラチン）などの化学療法剤；インターフェロンおよびインターロイキンなどの免疫調節剤；免疫刺激抗体；成長ホルモン；他のサイトカイン；葉酸；ビタミン；無機質；アロマターゼ阻害剤；ＲＮＡｉ；ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤；およびプロテアソーム阻害剤からなる群から選択されることを特徴とする態様３２に記載の方法。
［態様３４］
前記がんが、乳がん、子宮頸がん、卵巣がん、子宮内膜がん、メラノーマ、膀胱がん、肺がん、膵臓がん、結腸がん、前立腺がん、白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、骨髄性白血病、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病、甲状腺がん、濾胞性甲状腺がん、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、線維肉腫、横紋筋肉腫、メラノーマ、ぶどう膜メラノーマ、奇形癌、神経芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、皮膚の良性腫瘍、角化棘細胞腫、腎臓がん、未分化大細胞リンパ腫、食道扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、濾胞性樹状細胞癌、腸がん、筋層浸潤がん、精巣腫瘍、表皮癌、脾臓がん、膀胱がん、頭頸部がん、胃がん、肝臓がん、骨がん、脳がん、網膜がん、胆道がん、小腸がん、唾液腺がん、子宮がん、精巣がん、結合組織がん、前立腺肥大症、脊髄形成異常、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、鼻咽腔がん、神経内分泌がん、骨髄異形成症候群、中皮腫、血管肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド、食道胃がん、ファローピウス管がん、腹膜がん、漿液性乳頭状ミュラー管がん、悪性腹水、消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）、リー・フラウメニ症候群、およびフォンヒッペル・リンダウ症候群（ＶＨＬ）からなる群から選択される、非転移性、浸潤性、または転移性のがんであることを特徴とする態様３０～３３のいずれかに記載の方法。
［態様３５］
前記がんが、メラノーマ、肝臓がん、腎臓がん、脳がん、乳がん、結腸がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、胃がん、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、急性および慢性リンパ芽球性白血病、ならびに急性および慢性骨髄白血病のいずれかであることを特徴とする態様３４に記載の方法。
［態様３６］
抗原に対する患者の二次免疫応答を増強する方法であって、
態様１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６～１１のいずれかに記載の融合タンパク質、態様１２または１３に記載のヌクレオチド配列、態様１４に記載の発現ベクター、求項１５に記載の宿主細胞、または態様１７に記載の医薬組成物、および態様１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントのいずれか１つを有効量で投与することを含む方法。
［態様３７］
前記抗原ががん抗原であり、前記患者が抗がんワクチンによる治療を受けたことのある患者であること、または、前記抗原がウイルス抗原であり、前記患者が抗ウイルスワクチンによる治療を受けたことのある患者であることを特徴とする、態様３６に記載の方法。
［態様３８］
態様１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６～１１のいずれかに記

載の融合タンパク質、態様１２または１３に記載のヌクレオチド配列、態様１４に記載の発現ベクター、態様１５に記載の宿主細胞、態様１７に記載の医薬組成物、および態様１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントの少なくとも１つをがんワクチンアジュバントとして使用する方法であって、
免疫応答を誘導できる量の標的とする腫瘍関連抗原調製物と、がんワクチンアジュバントとを免疫化に適した処方で患者に投与することを含み、
該がんワクチンアジュバント存在下における該腫瘍関連抗原に対する免疫応答が、該がんワクチンアジュバント非存在下におけるものよりも強力であることを特徴とする方法。
［態様３９］
免疫系に関連した病態を治療または予防する方法であって、
免疫系に関連した病態の治療または予防を必要とする対象に、態様１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチドのいずれか１つ、態様６～１１のいずれかに記載の融合タンパク質、態様１２または１３に記載のヌクレオチド配列、態様１４に記載の発現ベクター、態様１５に記載の宿主細胞、態様１７に記載の医薬組成物、および態様１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントのいずれかを有効量で投与することを含む方法。
［態様４０］
前記の免疫系に関連した病態が、免疫関連病態、自己免疫疾患、移植拒絶反応、移植片対宿主病、ＬＳＲポリペプチドによって媒介される免疫共刺激をブロックまたは促進するための状態、免疫関連疾患、および／または（免疫共刺激を促進または抑制する）免疫療法のための状態を含むことを特徴とする、態様３９に記載の方法。
［態様４１］
前記の治療が、免疫関連病態の治療に有用な別の成分と組み合わされることを特徴とする態様４０または４１に記載の方法。
［態様４２］
前記成分が、コルチコステロイド類、シクロスポリン、シクロホスファミド、プレドニゾン、アザチオプリン、メトトレキサート、ラパマイシン、タクロリムスなどの免疫抑制剤；ＴＮＦ－α遮断剤もしくはＴＮＦ－αアンタゴニスト、または任意の炎症性サイトカインを標的とする他の生物学的薬剤などの生物学的薬剤；非ステロイド性抗炎症剤／Ｃｏｘ－２阻害剤；ヒドロキシクロロキン；スルファサラゾピリン；金塩；エタネルセプト；インフリキシマブ；ミコフェノール酸モフェチル；バシリキシマブ；アタシセプト；リツキシマブ；シトキサン；インターフェロンβ－１ａ；インターフェロンβ－１ｂ；酢酸グラチラマー；塩酸ミトキサントロン；アナキンラ；他のバイオロジクス；静脈内免疫グロブリン（ＩＶＩＧ）；ＩＦＮ－β－１ａ（ＲＥＢＩＦ（登録商標）およびＡＶＯＮＥＸ（登録商標））、ＩＦＮ－β－１ｂ（ＢＥＴＡＳＥＲＯＮ（登録商標））などのインターフェロン；酢酸グラチラマー（ＣＯＰＡＸＯＮＥ（登録商標））；ポリペプチド；ナタリズマブ（ＴＹＳＡＢＲＩ（登録商標））；ミトキサントロン（ＮＯＶＡＮＴＲＯＮＥ（登録商標））；細胞毒性剤；カルシニューリン阻害剤（たとえばシクロスポリンＡまたはＦＫ５０６）；免疫抑制マクロライド（たとえばラパマイシンまたはその誘導体（たとえば４０－Ｏ－（２－ヒドロキシ）エチル－ラパマイシン））；リンパ球ホーミング剤（たとえばＦＴＹ７２０またはそのアナログ）；コルチコステロイド類；シクロホスファミド；アザチオプリン；メトトレキサート；レフルノミドまたはそのアナログ；ミゾリビン；ミコフェノール酸；ミコフェノール酸モフェチル；１５－デオキシスペルグアリンまたはそのアナログ；免疫抑制モノクローナル抗体（たとえば、ＭＨＣ、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８、ＣＤ７、ＣＤ２５、ＣＤ２７、Ｂ７、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ５８、ＣＤ１３７、ＩＣＯＳ、ＣＤ１５０（ＳＬＡＭ）、ＯＸ４０、４－１ＢＢまたはこれらのリガンドなどの白血球レセプターに対するモノクローナル抗体）；他の免疫調節化合物（たとえばＣＴＬＡ４－Ｉｇ（アバタセプト、ＯＲＥＮＣＩＡ（登録商標））、ＣＤ

２８－Ｉｇ、Ｂ７－Ｈ４－Ｉｇ、他の共刺激剤）；接着分子阻害剤（たとえばモノクローナル抗体（ｍＡｂ））；ＬＦＡ－１アンタゴニスト、セレクチンアンタゴニスト、ＶＬＡ－４アンタゴニストなどの低分子阻害剤；ならびに他の免疫調節剤からなる群から選択されることを特徴とする態様４１に記載の方法。

［態様４３］

前記の免疫関連病態が、自己免疫疾患、移植拒絶反応、および移植片対宿主病から選択されることを特徴とする態様３９～４２のいずれかに記載の方法。

［態様４４］

前記の自己免疫疾患が、再発寛解型多発性硬化症、一次進行型多発性硬化症および二次進行型多発性硬化症を含む多発性硬化症；乾癬；関節リウマチ；乾癬性関節炎；全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）；潰瘍性大腸炎；クローン病；良性リンパ球性血管炎；血小板減少性紫斑病；突発性血小板減少症；特発性自己免疫性溶血性貧血；赤芽球ろう；シェーグレン症候群；リウマチ性疾患；結合組織疾患；炎症性リウマチ；変形性リウマチ；非関節性リウマチ；若年性関節リウマチ；尿酸塩関節炎；筋肉リウマチ；慢性多発性関節炎；クリオグロブリン血管炎；ＡＮＣＡ関連血管炎；抗リン脂質症候群；重症筋無力症；自己免疫性溶血性貧血；ギラン・バレー症候群；慢性免疫性多発ニューロパチー；自己免疫性甲状腺炎；インスリン依存性糖尿病；１型糖尿病；アジソン病；膜性糸球体腎症；グッドパスチャー病；自己免疫性胃炎；自己免疫性萎縮性胃炎；悪性貧血；天疱瘡；尋常性天疱瘡；肝硬変；原発性胆汁性肝硬変；皮膚筋炎；多発性筋炎；線維筋炎；筋硬症；セリアック病；免疫グロブリンＡ腎症；ヘノッホ・シェーンライン紫斑病；エバンス症候群；アトピー性皮膚炎；乾癬；関節症性乾癬；グレーブス病；グレーブス眼症；強皮症；全身性強皮症；進行性全身性強皮症；喘息；アレルギー；原発性胆汁性肝硬変；橋本甲状腺炎；原発性粘液水腫；交感性眼炎；自己免疫性ぶどう膜炎；肝炎；慢性活動性肝炎；膠原病；強直性脊椎炎；肩関節周囲炎；結節性汎動脈炎；軟骨石灰化症；ヴェーゲナー肉芽腫症；顕微鏡的多発血管炎；慢性じんま疹；水疱性皮膚疾患；類天疱瘡；アトピー性湿疹；デビック病；小児自己免疫性溶血性貧血；難治性または慢性自己免疫性血球減少症；後天性血友病Ａにおける抗第VIII因子自己抗体の産生の予防；寒冷凝集素病；視神経脊髄炎；全身硬直症候群；歯肉炎；歯周炎；膵炎；心筋炎；血管炎；胃炎；痛風；痛風性関節炎；乾癬、アトピー性皮膚炎、湿疹、酒さ、蕁麻疹およびざ瘡からなる群から選択される炎症性皮膚疾患；正補体血症性蕁麻疹様血管炎；心膜炎；筋炎；抗合成酵素症候群；強膜炎；マクロファージ活性化症候群；ベーチェット症候群；ＰＡＰＡ症候群；Ｂｌａｕ症候群；痛風；成人および若年性スティル病；クリオピリン関連周期性症候群；マックル－ウェルズ症候群；家族性寒冷自己炎症性症候群；新生児期発症多臓器性炎症性疾患；家族性地中海熱；慢性乳児期発症神経皮膚関節症候群；全身型若年性特発性関節炎；高ＩｇＤ症候群；シュニッツラー症候群；自己免疫性網膜症；加齢黄斑変性症；アテローム性動脈硬化症；慢性前立腺炎；ならびにＴＮＦ受容体関連周期性症候群（ＴＲＡＰＳ）からなる群から選択されることを特徴とする態様４３に記載の方法。

［態様４５］

前記の自己免疫疾患が、任意の型および亜型の、多発性硬化症、関節リウマチ、１型糖尿病、乾癬、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、ぶどう膜炎およびシェーグレン症候群からなる群から選択されることを特徴とする態様４４に記載の方法。

［態様４６］

感染症を治療または予防する方法であって、

感染症の治療または予防を必要とする対象に、態様１～５のいずれかに記載の単離されたポリペプチドのいずれか１つ、態様６～１１のいずれかに記載の融合タンパク質、態様１２または１３に記載のヌクレオチド配列、態様１４に記載の発現ベクター、態様１５に記載の宿主細胞、態様１７に記載の医薬組成物、および態様１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントのいずれかを有効量で投与することを含む方法。

［態様４７］
前記の感染症が、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染および／または他の寄生虫感染によって引き起こされる疾患から選択されることを特徴とする、態様４６に記載の方法。
［態様４８］
前記の感染症が、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、伝染性単核症、ＥＢＶ、サイトメガロウイルス、ＡＩＤＳ、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、結核、マラリアおよび住血吸虫症から選択されることを特徴とする、態様４７に記載の方法。
［態様４９］
試料中の態様１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれか１つまたは該ポリペプチドと少なくとも９５％の同一性を有するその変異体を検出するためのアッセイ。
［態様５０］
対象の疾患を診断する方法であって、対象から得られた試料または対象において、態様１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれか、または該ポリペプチドと少なくとも９５％の同一性を有するその変異体、またはこれらのフラグメントを検出することを含む方法。
［態様５１］
前記ポリペプチドの検出がインビボまたはインビトロで行われることを特徴とする、態様５０に記載の方法。
［態様５２］
前記の検出がイムノアッセイによって行われることを特徴とする態様５０に記載の方法。
［態様５３］
前記の検出が、態様１～５のいずれかに記載のポリペプチドのいずれかに特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを使用して行われることを特徴とする、態様５０に記載の方法。
［態様５４］
配列番号１および５８からなる群から選択される配列の可溶性細胞外ドメインの少なくとも６２個のアミノ酸、配列番号３および５からなる群から選択される配列の可溶性細胞外ドメインの少なくとも３６個のアミノ酸、もしくは配列番号７の可溶性細胞外ドメインの少なくとも４６個のアミノ酸を含む単離されたポリペプチド；または、
配列番号５に示されるアミノ酸配列、該アミノ酸配列と少なくとも９５％の配列同一性を有する変異体、これらの変異体、これらのオーソログ、またはこれらのフラグメントから実質的になる単離されたポリペプチド。
［態様５５］
配列番号１および５８からなる群から選択される配列の６２個～２２８個のアミノ酸；配列番号３および５からなる群から選択される配列の３６個～３９３個のアミノ酸；または配列番号７の４６個～２１６個のアミノ酸のみを含むことを特徴とする態様５４に記載の単離されたポリペプチド。
［態様５６］
配列番号１および５８からなる群から選択される配列の６２個～８２個、９５個～１１５個、もしくは２０８個～２２８個のアミノ酸のみを含むポリペプチド；配列番号３および５からなる群から選択される配列の３６個～７０個、８０個～１００個、１７０個～２００個、２６５個～２９０個、もしくは３６５個～３９３個のアミノ酸のみを含むポリペプチド；または配列番号７の４６個～６６個、８４個～１０４個、もしくは１９６個～２１６個のアミノ酸のみを含むポリペプチドからなる群から選択されることを特徴とする、態様５５に記載の単離されたポリペプチド。
［態様５７］
配列番号１および５８からなる群から選択される配列の約７２個、１０６個、もしくは２１８個のアミノ酸；配列番号７の約５６個、９４個、もしくは２０６個のアミノ酸；または配列番号３および５の約４６個、４９個、５８個、６０個、８７個、８９個、９３個

、９４個、１７８個、１８２個、１８５個、１８７個、２７３個、２７９個、２８２個、３７４個もしくは３８３個のアミノ酸のみを含むことを特徴とする、態様５６に記載の単離されたポリペプチド。
［態様５８］
配列番号２、４～６、８、３９、５９～６１、および８１～１０１のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列から実質的になる態様５７に記載のポリペプチド。
［態様５９］
配列番号２、４～６、８、３９、５９～６１、および８１～１０１のいずれかに示されるアミノ酸配列から実質的になる態様５８に記載のポリペプチド。
［態様６０］
ＴＭＥＭ２５、ＶＳＩＧ１０、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、またはそのフラグメントもしくは変異体と、それぞれの機能性対応物との相互作用をブロックまたは阻害することを特徴とする態様５４～５９のいずれかに記載のポリペプチド。
［態様６１］
ＴＭＥＭ２５、ＶＳＩＧ１０、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、またはそのフラグメントもしくは変異体と、それぞれの機能性対応物との相互作用においてＴＭＥＭ２５、ＶＳＩＧ１０、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、またはそのフラグメントもしくは変異体と置き換わること、またはＴＭＥＭ２５、ＶＳＩＧ１０、ＬＹ６Ｇ６Ｆ、またはそのフラグメントもしくは変異体と、それぞれの機能性対応物との相互作用を増強することを特徴とする態様５４～５９のいずれかに記載のポリペプチド。
［態様６２］
前記のオーソログが、配列番号９および１９～２０から選択されるマウスポリペプチドであることを特徴とする態様５４～５９のいずれかに記載のポリペプチド。
［態様６３］
異種配列に連結された態様５４～５９のいずれかに記載のポリペプチドを含む融合タンパク質。
［態様６４］
前記の異種配列が免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含むことを特徴とする態様６３に記載の融合タンパク質。
［態様６５］
前記の免疫グロブリン分子の一部分が、免疫グロブリン重鎖定常領域のＦｃフラグメントであることを特徴とする態様６４に記載の融合タンパク質。
［態様６６］
前記の免疫グロブリン重鎖定常領域が、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡおよびＩｇＤからなる群から選択される免疫グロブリンアイソタイプに由来することを特徴とする態様６５に記載の融合タンパク質。
［態様６７］
配列番号７１～７４および１７２～１７５のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する態様６６に記載の融合タンパク質。
［態様６８］
配列番号２３～２６のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する態様６６に記載の融合タンパク質。
［態様６９］
インビトロおよびインビボにおいて免疫細胞応答を調節することを特徴とする態様６７に記載の融合タンパク質。
［態様７０］
態様５４～６９のいずれかに記載のポリペプチドをコードする核酸配列。
［態様７１］
配列番号３３～３７、１８２～１８５、および１８９～１９２、これらの配列と少なく

とも９５％の配列同一性を有するこれらの変異体、ならびにこれらの変性変異体からなる群から選択される、態様７０に記載の核酸配列。
［態様７２］
態様７０または７１に記載の核酸配列を少なくとも１つ含む発現ベクターまたはウイルス。
［態様７３］
組換え細胞であって、態様７２に記載の核酸配列を含む発現ベクターまたはウイルスを含み、該ＤＮＡセグメントにコードされたポリペプチドを構成的または誘導的に発現する組換え細胞。
［態様７４］
ＴＭＥＭ２５、ＶＳＩＧ１０、もしくはＬＹ６Ｇ６Ｆの可溶性細胞外ドメインポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは融合タンパク質の製造方法であって、前記のＤＮＡセグメントまたは核酸にコードされたポリペプチドの発現が可能な条件下で、態様７３に記載の組換え細胞を培養すること、および該ポリペプチドを回収することを含む方法。
［態様７５］
態様５４～５９のいずれかに記載のポリペプチド、これらのフラグメント、これらと少なくとも９５％の同一性を有する変異体、およびこれらのエピトープのいずれか１つと特異的に結合する抗原結合部位を含むモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。
［態様７６］
前記の抗原結合部位が立体構造エピトープまたは直線状エピトープを含み、かつ、約３～７個の連続したアミノ酸または不連続アミノ酸を含むことを特徴とする、態様７５に記載の抗体または抗原結合フラグメント。
［態様７７］
前記抗体が、完全ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または霊長類化抗体であることを特徴とする、態様７５または７６に記載の抗体またはフラグメント。
［態様７８］
前記抗体が、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ）フラグメント、Ｆｖフラグメント、ｓｃＦｖフラグメントおよび最小認識単位からなる群から選択されることを特徴とする、態様７５または７６に記載の抗体または抗原結合フラグメント。
［態様７９］
前記抗体が、薬剤、放射性核種、発蛍光団、酵素、毒素、治療剤、および化学療法剤から選択される成分と結合されており、
この検出可能なマーカーが、放射性同位元素、金属キレート剤、酵素、蛍光化合物、生物発光化合物、または化学発光化合物であることを特徴とする、態様７５～７８のいずれかに記載の抗体または抗原結合フラグメント。
［態様８０］
前記抗体が、ＴＭＥＭ２５ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、ならびにこれらのフラグメントおよび変異体のいずれか１つと、それぞれの対応物との相互作用をブロックまたは阻害することを特徴とする、態様７５～７８のいずれかに記載の抗体または抗原結合フラグメント。
［態様８１］
前記抗体が、ＴＭＥＭ２５ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、またはこれらのフラグメントもしくは変異体と、それぞれの対応物との相互作用においてＴＭＥＭ２５ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、またはこれらのフラグメントもしくは変異体と置き換わること、またはＴＭＥＭ２５ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチド、ＬＹ６Ｇ６Ｆポリペプチド、またはこれらのフラグメントもしくは変異体と、それぞれの対応物との相互作用を増強することを特徴とする、態様７５～７８のいずれかに記載の抗体または抗原結合フラグメント。

［態様８２］
前記抗体が、ＴＭＥＭ２５タンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質、およびＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質のいずれか１つを発現するがん細胞のアポトーシスまたは溶解を誘導することを特徴とする、態様７５～７８のいずれかに記載の抗体または抗原結合フラグメント。
［態様８３］
前記アポトーシスまたは溶解が、前記抗体のＣＤＣ活性またはＡＤＣＣ活性に関与していることを特徴とする、態様８２に記載の抗体または抗原結合フラグメント。
［態様８４］
態様５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、態様７０または７１に記載のヌクレオチド配列、態様７２に記載の発現ベクター、態様７３に記載の宿主細胞、または態様７５～８３のいずれかに記載の抗体と、薬学的に許容される希釈剤または担体とを含む医薬組成物。
［態様８５］
態様５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、態様７０または７１に記載のヌクレオチド配列、態様７２に記載の発現ベクター、態様７３に記載の宿主細胞、態様７５～８３のいずれかに記載の抗体、および態様８４に記載の医薬組成物のいずれか１つの使用であって、対象への投与によりＴ細胞の活性化が阻害または抑制されることを特徴とする使用。
［態様８６］
態様５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、態様７０または７１に記載のヌクレオチド配列、態様７２に記載の発現ベクター、態様７３に記載の宿主細胞、態様７５～８３のいずれかに記載の抗体、および態様８４に記載の医薬組成物のいずれか１つの、がんの治療のための使用。
［態様８７］
態様５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、態様７０または７１に記載のヌクレオチド配列、態様７２に記載の発現ベクター、態様７３に記載の宿主細胞、態様７５～８３のいずれかに記載の抗体、および態様８４に記載の医薬組成物のいずれか１つの、感染性障害の治療のための使用。
［態様８８］
対象において、
ａ．サイトカインのアップレギュレート；
ｂ．Ｔ細胞の増殖の誘導；
ｃ．抗原特異的Ｔ細胞免疫の促進；
ｄ．ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞および／またはＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の活性化の促進
の１以上を行う方法であって、
態様５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、態様７０または７１に記載のヌクレオチド配列、態様７２に記載の発現ベクター、態様７３に記載の宿主細胞、態様７５～８３のいずれかに記載の抗体、および態様８４に記載の医薬組成物のいずれか１つを対象に投与することを含む方法。
［態様８９］
免疫系に関連した病態を治療または予防する方法であって、
免疫系に関連した病態の治療または予防を必要とする対象に、態様５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチドのいずれか１つ、態様６３～６９いずれかに記載の融合タンパク質、態様７０または７１に記載のヌクレオチド配列、態様７２に記載の発現ベクター、態様７３に記載の宿主細胞、態様７５～８３のいずれかに記載の抗体、および態様８４に記載の医薬組成物のいずれかを有効量で投与することを含む方法。
［態様９０］
前記の免疫系に関連した病態が、免疫関連病態；自己免疫疾患；移植拒絶反応；移植片対宿主病；前記のＴＭＥＭ２５ポリペプチド、ＶＳＩＧ１０ポリペプチドおよびＬＹ６Ｇ

６Ｆポリペプチドのいずれか１つによって媒介される免疫共刺激をブロックまたは促進するための状態；免疫関連疾患；ならびに／または（免疫共刺激を促進または抑制する）免疫療法のための状態を含むことを特徴とする、態様８９に記載の方法。

［態様９１］

前記の治療が、免疫関連病態の治療に有用な別の成分と組み合わされることを特徴とする態様８９または９０に記載の方法。

［態様９２］

前記成分が、コルチコステロイド類、シクロスポリン、シクロホスファミド、プレドニゾン、アザチオプリン、メトトレキサート、ラパマイシン、タクロリムスなどの免疫抑制剤；ＴＮＦ－α遮断剤もしくはＴＮＦ－αアンタゴニスト、または任意の炎症性サイトカインを標的とする他の生物学的薬剤などの生物学的薬剤；非ステロイド性抗炎症剤／Ｃｏｘ－２阻害剤；ヒドロキシクロロキン；スルファサラゾピリン；金塩；エタネルセプト；インフリキシマブ；ミコフェノール酸モフェチル；バシリキシマブ；アタシセプト；リツキシマブ；シトキサン；インターフェロンβ－１ａ；インターフェロンβ－１ｂ；酢酸グラチラマー；塩酸ミトキサントロン；アナキンラ；他のバイオロジクス；静脈内免疫グロブリン（ＩＶＩＧ）；ＩＦＮ－β－１ａ（ＲＥＢＩＦ（登録商標）およびＡＶＯＮＥＸ（登録商標））、ＩＦＮ－β－１ｂ（ＢＥＴＡＳＥＲＯＮ（登録商標））などのインターフェロン；酢酸グラチラマー（ＣＯＰＡＸＯＮＥ（登録商標））；ポリペプチド；ナタリズマブ（ＴＹＳＡＢＲＩ（登録商標））；ミトキサントロン（ＮＯＶＡＮＴＲＯＮＥ（登録商標））；細胞毒性剤；カルシニューリン阻害剤（たとえばシクロスポリンＡまたはＦＫ５０６）；免疫抑制マクロライド（たとえばラパマイシンまたはその誘導体（たとえば４０－Ｏ－（２－ヒドロキシ）エチル－ラパマイシン））；リンパ球ホーミング剤（たとえばＦＴＹ７２０またはそのアナログ）；コルチコステロイド類；シクロホスファミド；アザチオプリン；メトトレキサート；レフルノミドまたはそのアナログ；ミゾリビン；ミコフェノール酸；ミコフェノール酸モフェチル；１５－デオキシスペルグアリンまたはそのアナログ；免疫抑制モノクローナル抗体（たとえば、ＭＨＣ、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８、ＣＤ７、ＣＤ２５、ＣＤ２７、Ｂ７、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ５８、ＣＤ１３７、ＩＣＯＳ、ＣＤ１５０（ＳＬＡＭ）、ＯＸ４０、４－１ＢＢまたはこれらのリガンドなどの白血球レセプターに対するモノクローナル抗体）；他の免疫調節化合物（たとえばＣＴＬＡ４－Ｉｇ（アバタセプト、ＯＲＥＮＣＩＡ（登録商標））、ＣＤ２８－Ｉｇ、Ｂ７－Ｈ４－Ｉｇ、他の共刺激剤）；接着分子阻害剤（たとえばモノクローナル抗体（ｍＡｂ））；ＬＦＡ－１アンタゴニスト、セレクチンアンタゴニスト、ＶＬＡ－４アンタゴニストなどの低分子阻害剤；ならびに他の免疫調節剤からなる群から選択されることを特徴とする態様９１に記載の方法。

［態様９３］

前記の免疫関連病態が、自己免疫疾患、移植拒絶反応、および移植片対宿主病から選択されることを特徴とする態様９０～９２のいずれかに記載の方法。

［態様９４］

前記の自己免疫疾患が、再発寛解型多発性硬化症、一次進行型多発性硬化症および二次進行型多発性硬化症を含む多発性硬化症；乾癬；関節リウマチ；乾癬性関節炎；全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）；潰瘍性大腸炎；クローン病；良性リンパ球性血管炎；血小板減少性紫斑病；突発性血小板減少症；特発性自己免疫性溶血性貧血；赤芽球ろう；シェーグレン症候群；リウマチ性疾患；結合組織疾患；炎症性リウマチ；変形性リウマチ；非関節性リウマチ；若年性関節リウマチ；尿酸塩関節炎；筋肉リウマチ；慢性多発性関節炎；クリオグロブリン血管炎；ＡＮＣＡ関連血管炎；抗リン脂質症候群；重症筋無力症；自己免疫性溶血性貧血；ギラン・バレー症候群；慢性免疫性多発ニューロパチー；自己免疫性甲状腺炎；インスリン依存性糖尿病；１型糖尿病；アジソン病；膜性糸球体腎症；グッドパスチャー病；自己免疫性胃炎；自己免疫性萎縮性胃炎；悪性貧血；天疱瘡；尋常性天疱瘡；肝硬変；原発性胆汁性肝硬変；皮膚筋炎；多発性筋炎；線維筋炎；筋硬症；セリアック病；免疫グロブリンＡ腎症；ヘノッホ・シェーンライン紫斑病；エバンス症候群；アト

ピー性皮膚炎；乾癬；関節症性乾癬；グレーブス病；グレーブス眼症；強皮症；全身性強皮症；進行性全身性強皮症；喘息；アレルギー；原発性胆汁性肝硬変；橋本甲状腺炎；原発性粘液水腫；交感性眼炎；自己免疫性ぶどう膜炎；肝炎；慢性活動性肝炎；膠原病；強直性脊椎炎；肩関節周囲炎；結節性汎動脈炎；軟骨石灰化症；ヴェーゲナー肉芽腫症；顕微鏡的多発血管炎；慢性じんま疹；水疱性皮膚疾患；類天疱瘡；アトピー性湿疹；デビック病；小児自己免疫性溶血性貧血；難治性または慢性自己免疫性血球減少症；後天性血友病Ａにおける抗第VIII因子自己抗体の産生の予防；寒冷凝集素病；視神経脊髄炎；全身硬直症候群；歯肉炎；歯周炎；膵炎；心筋炎；血管炎；胃炎；痛風；痛風性関節炎；乾癬、アトピー性皮膚炎、湿疹、酒さ、蕁麻疹およびざ瘡からなる群から選択される炎症性皮膚疾患；正補体血症性蕁麻疹様血管炎；心膜炎；筋炎；抗合成酵素症候群；強膜炎；マクロファージ活性化症候群；ベーチェット症候群；ＰＡＰＡ症候群；Ｂｌａｕ症候群；痛風；成人および若年性スティル病；クリオピリン関連周期性症候群；マックル－ウェルズ症候群；家族性寒冷自己炎症性症候群；新生児期発症多臓器性炎症性疾患；家族性地中海熱；慢性乳児期発症神経皮膚関節症候群；全身型若年性特発性関節炎；高ＩｇＤ症候群；シュニッツラー症候群；自己免疫性網膜症；加齢黄斑変性症；アテローム性動脈硬化症；慢性前立腺炎；ならびにＴＮＦ受容体関連周期性症候群（ＴＲＡＰＳ）からなる群から選択されることを特徴とする態様９３に記載の方法。

［態様９５］

前記の自己免疫疾患が、任意の型および亜型の、多発性硬化症、関節リウマチ、１型糖尿病、乾癬、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患、ぶどう膜炎およびシェーグレン症候群からなる群から選択されることを特徴とする態様９４に記載の方法。

［態様９６］

感染症を治療または予防する方法であって、

感染症の治療または予防を必要とする対象に、態様５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、態様７０または７１に記載のヌクレオチド配列、態様７２に記載の発現ベクター、態様７３に記載の宿主細胞、態様７５～８３のいずれかに記載の抗体、および態様８４に記載の医薬組成物のいずれか１つを有効量で投与することを含む方法。

［態様９７］

前記の感染症が、細菌感染、ウイルス感染、真菌感染および／または他の寄生虫感染によって引き起こされる疾患から選択されることを特徴とする、態様９６に記載の方法。

［態様９８］

前記の感染症が、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、伝染性単核症、ＥＢＶ、サイトメガロウイルス、ＡＩＤＳ、ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２、結核、マラリアおよび住血吸虫症から選択されることを特徴とする、態様９７に記載の方法。

［態様９９］

がんを治療または予防する方法であって、

がんの治療または予防を必要とする対象に、態様５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチドのいずれか；態様６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質；態様７０または７１に記載のヌクレオチド配列；態様７２に記載の発現ベクター；態様７３に記載の宿主細胞；態様７５～８３のいずれかに記載の抗体；および態様８４に記載の医薬組成物のいずれか１つを有効量で投与することを含む方法。

［態様１００］

前記の治療が、がんを治療するのに有用な別の成分または治療法と組み合わされることを特徴とする、態様９９に記載の方法。

［態様１０１］

前記の治療法が、放射線療法；抗体療法；化学療法；光線力学療法；養子Ｔ細胞療法；Ｔｒｅｇ除去；手術；または慣用の薬剤との併用療法であることを特徴とする、態様１００に記載の方法。

［態様１０２］

前記成分が、免疫抑制剤；細胞傷害剤；腫瘍ワクチン；抗体（たとえば、ベバシズマブ、アービタックス）；ペプチド；ペプチボディ；小分子；細胞傷害剤および細胞増殖抑制剤（たとえば、パクリタキセル、シスプラチン、ビノレルビン、ドセタキセル、ゲムシタビン、テモゾロミド、イリノテカン、５ＦＵ、カルボプラチン）などの化学療法剤；インターフェロンおよびインターロイキンなどの免疫調節剤；免疫刺激抗体；成長ホルモン；他のサイトカイン；葉酸；ビタミン；無機質；アロマターゼ阻害剤；ＲＮＡｉ；ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤；およびプロテアソーム阻害剤からなる群から選択されることを特徴とする態様１０１に記載の方法。

［態様１０３］

前記がんが、乳がん、子宮頸がん、卵巣がん、子宮内膜がん、メラノーマ、膀胱がん、肺がん、膵臓がん、結腸がん、前立腺がん、白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、骨髄性白血病、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病、甲状腺がん、濾胞性甲状腺がん、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）、線維肉腫、横紋筋肉腫、メラノーマ、ぶどう膜メラノーマ、奇形癌、神経芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、皮膚の良性腫瘍、角化棘細胞腫、腎臓がん、未分化大細胞リンパ腫、食道扁平上皮細胞癌、肝細胞癌、濾胞性樹状細胞癌、腸がん、筋層浸潤がん、精巣腫瘍、表皮癌、脾臓がん、膀胱がん、頭頸部がん、胃がん、肝臓がん、骨がん、脳がん、網膜がん、胆道がん、小腸がん、唾液腺がん、子宮がん、精巣がん、結合組織がん、前立腺肥大症、脊髄形成異常、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、鼻咽腔がん、神経内分泌がん、骨髄異形成症候群、中皮腫、血管肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド、食道胃がん、ファローピウス管がん、腹膜がん、漿液性乳頭状ミュラー管がん、悪性腹水、消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）、リー・フラウメニ症候群、およびフォンヒッペル・リンダウ症候群（ＶＨＬ）からなる群から選択される、非転移性、浸潤性、または転移性のがんであることを特徴とする態様９９～１０２のいずれかに記載の方法。

［態様１０４］

前記がんが、メラノーマ、肝臓がん、腎臓がん、脳がん、乳がん、結腸がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、胃がん、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、急性および慢性リンパ芽球性白血病、ならびに急性および慢性骨髄白血病のいずれかであることを特徴とする態様１０３に記載の方法。

［態様１０５］

抗原に対する患者の二次免疫応答を増強する方法であって、
態様５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、態様７０または７１に記載のヌクレオチド配列、態様７２に記載の発現ベクター、態様７３に記載の宿主細胞、態様７５～８３のいずれかに記載の抗体、および態様８４に記載の医薬組成物のいずれか１つを有効量で投与することを含む方法。

［態様１０６］

前記の抗原が、がん抗原、ウイルス抗原または細菌抗原であり、前記患者が、抗がんワクチンまたはウイルスワクチンによる治療を受けたことのある患者であることを特徴とする、態様１０５に記載の方法。

［態様１０７］

患者に免疫療法を行う方法であって、
ａ．患者または患者から単離した白血球に、態様５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、態様７０もしくは７１に記載のヌクレオチド配列、態様７２に記載の発現ベクター、態様７３に記載の宿主細胞、態様７５～８３のいずれかに記載の抗体、または態様８４に記載の医薬組成物を有効量で投与し、寛容原性制御性細胞の分化を誘導することを含む、
インビボまたはエクスビボにおける寛容誘導；
ｂ．エクスビボにおける前記細胞の濃縮および増殖；ならびに

ｃ．前記患者への寛容原性制御性細胞の自己輸血
を含む方法。
［態様１０８］
態様５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、態様７０または７１に記載のヌクレオチド配列、態様７２に記載の発現ベクター、態様７３に記載の宿主細胞、態様７５～８３のいずれかに記載の抗体、および態様８４に記載の医薬組成物の少なくとも１つをがんワクチンアジュバントとして使用する方法であって、
免疫応答を誘導できる量の標的とする腫瘍関連抗原調製物と、がんワクチンアジュバントとを免疫化に適した処方で患者に投与することを含み、
該がんワクチンアジュバント存在下における該腫瘍関連抗原に対する免疫応答が、該がんワクチンアジュバント非存在下におけるものよりも強力であることを特徴とする方法。
［態様１０９］
感染症の治療を目的として、態様５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、態様７０または７１に記載のヌクレオチド配列、態様７２に記載の発現ベクター、態様７３に記載の宿主細胞、態様７５～８３のいずれかに記載の抗体、および態様８４に記載の医薬組成物のいずれか１つの投与と、抗原を用いた治療用ワクチン接種とを組み合わせる方法。
［態様１１０］
免疫応答を増強させる目的で、態様５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、態様７０または７１に記載のヌクレオチド配列、態様７２に記載の発現ベクター、態様７３に記載の宿主細胞、態様７５～８３のいずれかに記載の抗体、および態様８４に記載の医薬組成物のいずれかの１つと、アジュバントと、ワクチン中の抗原とを組み合わせる方法。
［態様１１１］
前記の抗原が、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、寄生虫抗原および／または別の病原体の抗原であることを特徴とする、態様１０９または１１０に記載の方法。
［態様１１２］
試料中の配列番号：１～８、および５８のいずれかで示されるポリペプチドのいずれか１つまたは該ポリペプチドと少なくとも９５％の同一性を有するその変異体を検出するためのアッセイ。
［態様１１３］
対象の疾患を診断する方法であって、対象から得られた試料または対象において、配列番号１～８、および５８のいずれかに示されるポリペプチドのいずれか、または該ポリペプチドと少なくとも９５％の同一性を有するその変異体、またはこれらのフラグメントを検出することを含む方法。
［態様１１４］
前記ポリペプチドの検出がインビボまたはインビトロで行われることを特徴とする、態様１１３に記載の方法。
［態様１１５］
前記の検出がイムノアッセイによって行われることを特徴とする態様１１３に記載の方法。
［態様１１６］
前記の検出が態様７５～８３のいずれかに記載の抗体またはフラグメントを使用して行われることを特徴とする態様１１３に記載の方法。
［態様１１７］
ＬＹ６Ｇ６Ｆ、ＶＳＩＧ１０、またはＴＭＥＭ２５媒介性シグナル伝達を調節することができる生物活性剤を、少なくとも１種の免疫細胞活性を調節するのに効果的な量で使用して、免疫細胞活性を調節する方法。
［態様１１８］

前記の薬剤が、免疫細胞活性を阻害または減弱することを特徴とする、態様１１７に記載の方法。
［態様１１９］
前記の薬剤が、免疫細胞活性を誘導または増強することを特徴とする、態様１１７に記載の方法。
［態様１２０］
ＬＹ６Ｇ６Ｆタンパク質、ＶＳＩＧ１０タンパク質またはＴＭＥＭ２５タンパク質の活性を調節することによりがんを治療または予防することを特徴とする態様１１７に記載の方法。
［態様１２１］
前記の投与される薬剤が、がん細胞に対するＴ細胞活性を増強する抗体またはフラグメントであることを特徴とする態様１１７に記載の方法。
［態様１２２］
前記の薬剤が、態様５４～５９のいずれかに記載の単離されたポリペプチド、態様６３～６９のいずれかに記載の融合タンパク質、態様７０もしくは７１に記載のヌクレオチド配列、態様７２に記載の発現ベクター、態様７３に記載の宿主細胞、態様７５～８３のいずれかに記載の抗体、または態様８４に記載の医薬組成物のいずれか１つを含むことを特徴とする、態様１１７～１２１のいずれかに記載の方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
A61K	***49/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｌ	
A61P	***37/04***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｃ	
A61K	***51/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｙ	
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
C12N	*15/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	49/00		
			Ａ６１Ｐ	37/04		
			Ａ６１Ｋ	51/00	１００	
			Ｃ０７Ｋ	19/00		
			Ｃ１２Ｎ	15/00	Ｃ	

(72)発明者　ノヴィク，アミト
イスラエル国　ビンヤミナ　３０５００　ハブロシュ　ストリート　５
(72)発明者　シュメシ，ロネン
イスラエル国　モディイン　７１７００　ハティヴァット　ギヴァティ　ストリート　２３／５

Ｆターム(参考)　4B065 AA94X AB01 BA02 CA24 CA25 CA44
4C084 AA12 NA13 ZB26
4C085 AA13 AA14 AA16 AA21 BB11 BB31 BB41 BB43 EE01 HH03
HH11 HH13 KA03 LL18
4H045 BA41 BA52 BA70 BA71 BA72 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74

【外国語明細書】
2017200908000001.pdf