

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005年11月17日 (17.11.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/107799 A1

- (51) 国際特許分類: **A61K 39/395**, 下京区中堂寺粟田町93番地サイエンスセンタービル第3号館 株式会社カン研究所内 Kyoto (JP).
A61P 35/00, 35/04, 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/008739
- (22) 国際出願日: 2005年5月6日 (06.05.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
60/569,469 2004年5月6日 (06.05.2004) US
特願2004-316199
2004年10月29日 (29.10.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1128088 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 盛本 浩二 (MORIMOTO, Koji) [JP/JP]; 〒6008815 京都府京都市下京区中堂寺粟田町93番地サイエンスセンタービル第3号館 株式会社カン研究所内 Kyoto (JP). 山口 啓子 (YAMAGUCHI, Keiko) [JP/JP]; 〒6008815 京都府京都市下京区中堂寺粟田町93番地サイエンスセンタービル第3号館 株式会社カン研究所内 Kyoto (JP). 今井 俊夫 (IMAI, Toshio) [JP/JP]; 〒6008815 京都府京都市
- (74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。



WO 2005/107799 A1

(54) Title: REMEDY FOR CANCER CONTAINING ANTI-Necl-5 ANTIBODY AS THE ACTIVE INGREDIENT

(54) 発明の名称: 抗Necl-5抗体を有効成分として含む癌治療剤

(57) Abstract: It is intended to provide a remedy for cancer which contains, as the active ingredient, anti-Necl-5 antibody having a neutralization activity of inhibiting the binding of Necl-5 to at least one member selected from the group consisting of Nectin-3, CD226 and CD96.

(57) 要約: 本発明により、Necl-5と、Nectin-3、CD226およびCD96からなる群から選択される少なくとも1つとの結合を抑制する中和活性を有する抗Necl-5抗体を有効成分として含む癌治療剤が提供される。

明 細 書

抗 Necl-5 抗体を有効成分として含む癌治療剤

5 技術分野

本発明は、細胞接着分子 Necl-5 に対する抗体を有効成分として含む癌治療剤に関するものである。

背景技術

10 癌の悪性度は、腫瘍の増殖性と周辺臓器への浸潤性ならびに遠隔臓器への転移性に依存する。腫瘍が浸潤・転移しなければ外科的に取り除くことで癌は完治する。癌による死因の大多数は転移による再発が原因であるため、転移に対しての適切な対処法が癌治療成績の向上には欠かせない。しかしながら、これまでに、癌転移を有効に抑制する薬剤は、知られていない。

15 多細胞動物において、隣接する細胞間での情報伝達は、細胞接着分子により行われており、細胞の増殖、分化、炎症などの生命現象の調節、維持に細胞接着分子は深く関係することが知られている。癌細胞の増殖や遠隔臓器への転移においても、多くのプロセスで細胞接着分子の機能の亢進や抑制が認められる。癌細胞では、正常細胞で見られるような細胞接着分子による細胞間接着が抑制されてお

20 り、その結果、癌細胞は、無秩序に増殖し細胞塊を形成する。また、一部の癌細胞は、増殖を繰り返すうちに、変異によって転移能を獲得する。これら転移性の癌細胞は、基底膜を破壊して細胞外基質層へ浸潤し、さらに血管内皮細胞間を通過して血管内へ遊出する。そして、血流によって遠隔臓器に運ばれた癌細胞は、癌細胞同士あるいは血小板との結合を介して細胞塊を形成して塞栓となる。そこ

25 で血管内皮細胞を通過して血管外に遊走し、細胞外基質層の通過と基底膜の破壊を経て、再び細胞増殖を行って転移層が形成される。

細胞間接着分子の一つである Nectin に類似した構造を持つ遺伝子としてマウスの Necl-5 が知られている¹⁾。Necl-5 は、正常のラットやマウスではほとんど

発現していないが、ラットやマウスの大腸癌細胞では発現が増強することが知られており、その遺伝子は、別名 TAGE4 としても報告されている^{2, 3)}。また、TAGE4 は、human poliovirus receptor/CD155 と相同性のある遺伝子であることも報告されている⁴⁾。

- 5 Necl-5 は、癌遺伝子 Ras により発現が誘導され、Nectin-3 との細胞接着活性を介して細胞運動を制御している¹⁾。また、Necl-5 は、CD226 とヘテロフィリックに結合することが知られている⁵⁾。さらに、Necl-5 は、血清因子や PDGF による Rac および cdc42 依存性のインテグリン $\alpha v \beta 3$ を介した細胞運動も制御している⁶⁾。Necl-5 の細胞外領域は、方向性を持った細胞運動に必要であり、一方、Necl-5 の細胞内領域は、方向性を持った運動とランダムな運動の両方に必要である⁶⁾。さらに、Necl-5 の細胞内領域を欠失した欠失型 Necl-5 を細胞に強制発現させると、細胞運動が抑制される^{1, 6)}。
- 10

また、癌遺伝子 Ras で形質転換したマウス NIH3T3 細胞(V12Ras-NIH3T3)のマウス尾静脈内投与による肺転移実験において、Necl-5 の細胞内領域を欠失した欠失型 Necl-5 を導入した細胞では、欠失型 Necl-5 を導入していない細胞に比べて、肺への転移が抑制された⁶⁾。これらの結果は、アップレギュレーションした Necl-5 が、少なくとも部分的には V12Ras-NIH3T3 の転移に影響をしていることを示している。したがって、Necl-5 は、癌細胞の転移に関与する可能性が示唆されている。さらには、Necl-5 を発現している癌細胞は、CD226 や CD96 を発現している免疫系の細胞により排除されることが知られている⁷⁾。

15

20

しかしながら、これまでに、癌細胞において、Necl-5 の機能を阻害する化合物および抗体などを投与することによって、癌細胞の転移を抑制することは証明されていなかった。また、Necl-5 の細胞外領域と癌細胞の転移との関係については、明らかにされていなかった。

25

参考文献

- 1) Ikeda W, Kakunaga S, Itoh S, Shingai T, Takekuni K, Satoh K, Inoue Y, Hamaguchi A, Morimoto K, Takeuchi M, Imai T, Takai Y. TAGE4/Nectin-like

- molecule-5 heterophilically trans-interacts with cell adhesion molecule Nectin-3 and enhances cell migration. *Journal of Biological Chemistry*. 278(30): 28167-28172. 2003.
- 2) Chadeneau C, LeMoullac B, Denis MG. A novel member of the immunoglobulin gene superfamily expressed in rat carcinoma cell lines. *Journal of Biological Chemistry*. 269(22): 15601-15605. 1994.
- 3) Chadeneau C, LeCabellec M, LeMoullac B, Meflah K, Denis MG. Over-expression of a novel member of the immunoglobulin superfamily in Min mouse intestinal adenomas. *International Journal of Cancer*. 68(6): 817-821. 1996.
- 4) Ravens I, Seth S, Forster R, Bernhardt G. Characterization and identification of Tage4 as the murine orthologue of human poliovirus receptor/CD155. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 312(4): 1364-1371. 2003.
- 5) Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *Journal of Experimental Medicine*. 198(4): 557-567. 2003.
- 6) Ikeda W, Kakunaga S, Takekuni K, Shingai T, Satoh K, Morimoto K, Takeuchi M, Imai T, Takai Y. Nectin-like molecule-5/Tage4 enhances cell migration in an integrin-dependent, nectin-3-independent manner. *Journal of Biological Chemistry*. 279(17): 18015-18025. 2004.
- 7) Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Onoda Y, Zhang H, Yamazaki S, Miyamoto A, Honda S, Lanier LL, Shibuya A. Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *Int Immunol*. 2004 Apr; 16(4): 533-8.

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その解決しようとする

る課題は、癌細胞において、Necl-5 の機能を阻害する抗体を投与することによって、癌細胞の転移を抑制することを証明し、癌治療剤として有用な薬剤を提供することにある。

5 本発明者は、上記課題を解決するため、鋭意検討を重ねた結果、細胞接着分子 Necl-5 に対する中和活性を有する抗 Necl-5 抗体が癌転移を抑制することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明者らは、Necl-5 の機能を阻害することによって、癌細胞の転移を抑制することができるか否かを明らかにするために、以下の検討を行った。

10 まず初めに、Necl-5 の細胞外領域に対する抗体を作製した。そして、Necl-5 と Nectin-3 および CD226 との結合を介した細胞接着を抑制する抗体を得た（以下、「抗 Necl-5 中和抗体」と称する場合がある）。

得られた抗体を用いて様々なマウス癌細胞での Necl-5 の細胞表面上への発現を調べたところ、Necl-5 は、卵巣腫瘍細胞株(OV2944-HM-1)、繊維肉腫細胞株
15 (Meth A)、大腸癌細胞株(CT26、colon 26)、メラノーマ(B16F1)のいずれにおいても強く発現が認められた。

次に、CT26 大腸癌細胞をマウスの皮下に移植した場合の当該腫瘍増殖に対する、抗 Necl-5 中和抗体の効果を調べた。その結果、腫瘍体積は、抗 Necl-5 抗体の投与によって影響を受けず、Necl-5 は癌細胞の増殖には関与していないことが
20 明らかになった。

さらに、CT26 大腸癌細胞のマウス経尾静脈内注入による肺転移実験において、肺転移に対する抗 Necl-5 中和抗体の効果を調べた。その結果、肺における転移癌細胞による結節は、Necl-5 の細胞外領域を認識する抗 Necl-5 中和抗体の投与によって顕著に抑制された。したがって、癌細胞の肺転移は、Necl-5 の機能を阻害
25 することによって抑制されることが明らかになった。

次に、癌細胞上で発現する Necl-5 が転移に関与するかどうか検討するために、全長 Necl-5 (Necl-5-full) および細胞内領域を欠失した欠失型 Necl-5 (Necl-5- Δ CP) を CT26 大腸癌細胞に発現させた。その結果、Necl-5-full、Necl-5- Δ CP

のいずれもが、内在性 Necl-5 に比べ 10 倍程度多く発現する細胞を得た。

Necl-5-full または Necl-5- Δ CP を導入した CT26 大腸癌細胞の経尾静脈内注入による肺転移実験において、Necl-5-full を導入した CT26 大腸癌細胞のみならず、意外にも Necl-5- Δ CP を導入した CT26 大腸癌細胞においても、肺における転移
5 癌細胞による結節は、顕著に増加した。

したがって、癌細胞の Necl-5 は、肺転移に関与することが示された。また、この転移の増強は、Necl-5 の細胞外領域に依存することが示された。

以上の結果より、本発明者は、Necl-5 が癌転移に関与すること、抗 Necl-5 抗体により癌転移を抑制できること、さらには、Necl-5 の細胞外領域が転移に重要
10 であることを初めて見だし、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下に関する。

- (1) Necl-5 と、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つとの結合を抑制する中和活性を有する抗 Necl-5 抗体を有効成分として含む癌治療剤。
15
- (2) 抗 Necl-5 抗体が、以下の (a) もしくは (b) のタンパク質またはその部分断片と親和性を有する抗体である、(1) に記載の癌治療剤。
 - (a) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列を含むタンパク質
 - (b) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、
20 CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つに対する親和性を有するタンパク質
- (3) 抗 Necl-5 抗体が、以下の (a) もしくは (b) のタンパク質またはその部分断片と親和性を有する抗体である、(1) に記載の癌治療剤。
25
 - (a) 配列番号：1 記載の塩基配列のうち、172 番目から 1425 番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質
 - (b) 配列番号：1 記載の塩基配列のうち、172 番目から 1425 番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌク

レオチドにストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質

- 5 (4) 抗 Necl-5 抗体が、以下の (a) もしくは (b) のタンパク質またはその部分断片と親和性を有する抗体である、(1) に記載の癌治療剤。

(a) 配列番号：4 記載のアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号：4 記載のアミノ酸配列において1 もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、

- 10 CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質

- (5) 抗 Necl-5 抗体が、以下の (a) もしくは (b) のタンパク質またはその部分断片と親和性を有する抗体である、(1) に記載の癌治療剤。

(a) 配列番号：3 記載の塩基配列のうち、73 番目から1299 番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質

15

(b) 配列番号：3 記載の塩基配列のうち、73 番目から1299 番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質

20

- (6) 部分断片が、以下の (a) または (b) のタンパク質である、(2) に記載の癌治療剤。

(a) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列のうち、29 番目から344 番目のアミノ酸配列を含むタンパク質

25

(b) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列のうち、29 番目から344 番目のアミノ酸配列において1 もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96

からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質

(7) 部分断片が、以下の (a) または (b) のタンパク質である、(3) に記載の癌治療剤。

5 (a) 配列番号：1 記載の塩基配列のうち、256番目から1203番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質

(b) 配列番号：1 記載の塩基配列のうち、256番目から1203番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質

10 (8) 部分断片が、以下の部分断片が、以下の (a) または (b) のタンパク質である、(4) に記載の癌治療剤。

15 (a) 配列番号：4 記載のアミノ酸配列のうち、30番目から347番目のアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号：4 記載のアミノ酸配列のうち、30番目から347番目のアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質

20 (9) 部分断片が、以下の (a) または (b) のタンパク質である、(5) に記載の癌治療剤。

25 (a) 配列番号：3 記載の塩基配列のうち、160番目から1113番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質

(b) 配列番号：3 記載の塩基配列のうち、160番目から1113番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質

チドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質

- 5 (10) 10. 抗 Necl-5 抗体が、抗 Necl-5 モノクローナル抗体である、(1) ~ (9) のいずれか1項に記載の癌治療剤。
- (11) 抗 Necl-5 モノクローナル抗体が、受託番号 FERM BP- 10018 であるハイブリドーマから生成されるものである、(10) に記載の癌治療剤。
- (12) 癌治療剤が、癌転移抑制剤である、(1) ~ (11) のいずれか1項に記載の癌治療剤。
- 10 (13) 癌が、脳腫瘍、頸癌、食道癌、舌癌、肺癌、乳癌、膵臓癌、胃癌、大腸癌、小腸または十二指腸の癌、結腸癌、直腸癌、膀胱癌、腎癌、肝癌、前立腺癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫（例えば、骨肉種、筋肉種、線維肉腫など）、リンパ腫、白血病およびメラノーマからなる群から選択される少なくとも1つである、(1) ~ (12) のいずれか1項に記載の癌治療剤。
- 15 (14) 癌が、大腸癌、卵巣癌、肉腫（例えば、線維肉腫）およびメラノーマからなる群から選択される少なくとも1つである、(13) に記載の癌治療剤。
- (15) 癌が大腸癌である、(13) に記載の癌治療剤。
- (16) 癌が、以下の (a) ~ (p) からなる群から選択される少なくとも1つの
- 20 タンパク質を発現している細胞を含むことを特徴とする、(1) ~ (15) のいずれか1項に記載の癌治療剤。
- (a) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列を含むタンパク質
- (b) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列において1または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有する
- 25 タンパク質
- (c) 配列番号：1 記載の塩基配列のうち、172番目から1425番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質

- (d) 配列番号：1記載の塩基配列のうち、172番目から1425番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
- 5
- (e) 配列番号：4記載のアミノ酸配列を含むタンパク質
- (f) 配列番号：4記載のアミノ酸配列において1または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および
- 10 CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
- (g) 配列番号：3記載の塩基配列のうち、73番目から1299番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質
- (h) 配列番号：3記載の塩基配列のうち、73番目から1299番目の塩基配
- 15 列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
- (i) 配列番号：2記載のアミノ酸配列のうち、29番目から344番目のアミノ酸配列を含むタンパク質
- 20
- (j) 配列番号：2記載のアミノ酸配列のうち、29番目から344番目のアミノ酸配列において1または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選
- 25 択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
- (k) 配列番号：1記載の塩基配列のうち、256番目から1203番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質
- (l) 配列番号：1記載の塩基配列のうち、256番目から1203番目の塩基配

列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質

5

(m) 配列番号：4記載のアミノ酸配列のうち、30番目から347番目のアミノ酸配列を含むタンパク質

(n) 配列番号：4記載のアミノ酸配列のうち、30番目から347番目のアミノ酸配列において1または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質

10

(o) 配列番号：3記載の塩基配列のうち、160番目から1113番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質

(p) 配列番号：3記載の塩基配列のうち、160番目から1113番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質

15

20 (17) 癌治療剤を製造するための(1)～(11)のいずれか1項に記載の抗 Necl-5 抗体の使用。

ここで、前記の癌は、例えば、脳腫瘍、頸癌、食道癌、舌癌、肺癌、乳癌、膵臓癌、胃癌、大腸癌、小腸または十二指腸の癌、結腸癌、直腸癌、膀胱癌、腎癌、肝癌、前立腺癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫（例えば、骨肉種、筋肉種、線維肉腫など）、リンパ腫、白血病およびメラノーマからなる群から選択される少なくとも1つがあげられる。前記の癌は、例えば大腸癌、卵巣癌、肉腫（例えば、線維肉腫）およびメラノーマからなる群から選択される少なくとも1つであってもよく、大腸癌であってもよい。また、前

25

記の癌は、(16)に記載の癌であってもよい。

(18) 癌治療剤が、癌転移抑制剤である、(17)に記載の使用。

(19) (1) ~ (16) のいずれか1項に記載の癌治療剤を患者に有効量投与することを特徴とする癌治療方法。

5 (20) 癌治療方法が、癌転移抑制方法である、(19)に記載の方法。

本発明により、癌転移を抑制する癌治療剤が提供され、癌患者の生活の質を向上させることが可能となった。

10 Necl-5 は、正常細胞ではあまり発現しておらず、癌細胞では過剰発現しているため、本発明の抗 Necl-5 抗体は、癌細胞特異的に作用させることができる点で癌の治療に極めて有用である。

図面の簡単な説明

15 図1は、抗 Necl-5 抗体が、B300/mNectin-3 細胞および B300/mCD226 細胞の Necl-5-AP キメラタンパク質への接着を抑制することを示した図である。

図2は、Necl-5 が様々な癌細胞の細胞表面上に発現していることを示した図である。

20 図3は、CT26 マウス大腸癌細胞皮下移植モデルにおける腫瘍増殖に対する抗 Necl-5 抗体の効果を示した図である (n = 3)。上パネルは腫瘍体積の経時的変化を示し、下パネルは14日目の解剖時における腫瘍体積を示す。

図4は、CT26 マウス大腸癌細胞の肺転移に対する抗 Necl-5 抗体の効果を示した図である (n = 5)。

図5は、各種発現ベクターを導入した CT26 マウス大腸癌細胞の表面上に、強制発現した Necl-5 が発現していることを示した図である。

25 図6は、各種発現ベクターを導入した CT26 マウス大腸癌細胞の肺転移を示した写真である。

図7は、各種発現ベクターを導入した CT26 マウス大腸癌細胞の肺転移に対する Necl-5 の効果を示した図である (n = 5)。

図 8 は、抗 hNecl-5 抗体が、B300/hNectin-3 細胞、B300/hCD226 細胞および B300/hCD96 細胞の hNecl-5-AP キメラタンパク質への接着を抑制することを示した図である。(n = 3)

図 9 は、CT26 マウス大腸癌細胞の肺転移に対する抗 Necl-5 抗体の効果を示した図である。(n = 5)

図 10 は、各種発現ベクターを導入した OV2944-HM-1 卵巣腫瘍細胞の肺転移を示した図である。(n = 5)

図 11 は、各種発現ベクターを導入した CT26 マウス大腸癌細胞の、経尾静脈内注入 24 時間後の肺への初期転移に対する Necl-5 の効果を示した図である。(n = 3)

図 12 は、CFSE ラベルした CT26 マウス大腸癌細胞周辺に CD226 を発現している血小板が存在することを示した図である。

図 13 は、抗 Nectin-2 抗体が、B300/mCD226 細胞の Nectin-2-AP キメラタンパク質 (mNectin-2-AP) への接着を抑制することを示した図である。

図 14 は、CD226-AP キメラタンパク質の CT26 マウス大腸癌細胞への結合に対する抗 Necl-5 抗体および抗 Nectin-2 抗体の抑制効果を示した図である。抗 Necl-5 抗体は、CD226-AP キメラタンパク質の CT26 マウス大腸癌細胞への結合を抑制したが、抗 Nectin-2 抗体は、抑制しないことから、CD226-AP キメラタンパク質の CT26 マウス大腸癌細胞への結合には主に Necl-5 が関与していることが明らかになった。

図 15 は、抗 Necl-5 抗体が、CT26 マウス大腸癌細胞と血小板との接着を抑制することを示した図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施の形態について説明する。以下の実施の形態は、本発明を説明するための例示であり、本発明をこの実施の形態にのみ限定する趣旨ではない。本発明は、その要旨を逸脱しない限り、さまざまな形態で実施をすることができる。

なお、本明細書において引用した文献、公開公報、特許公報その他の特許文献は、参照として本明細書に組み込むものとする。

Necl-5 は接着因子であり、癌遺伝子 Ras によって発現が誘導され、Nectin-3、
5 CD226、CD96 などとの結合を介して、細胞運動を制御するタンパク質である。

これまでの研究により、癌遺伝子 Ras で形質転換したマウス NIH3T3 細胞 (V12Ras-NIH3T3) のマウス経尾静脈内注入による肺転移実験において、Necl-5- Δ CP を導入したマウス V12Ras-NIH3T3 細胞では、肺における転移癌細胞が顕著に減少することが示されている。すなわち、この V12Ras-NIH3T3 細胞
10 を用いた実験では、Ras によってアップレギュレーションした Necl-5 が V12Ras-NIH3T3 細胞の転移に影響をしていることを明らかにしている。しかし、この結果からは、細胞の転移に対する Necl-5 の細胞外領域の役割について何ら明らかにされていない。すなわち、マウス V12Ras-NIH3T3 細胞において Necl-5- Δ CP を発現させると V12Ras-NIH3T3 細胞の増殖および転移を抑制する、とい
15 う現象がどのような原因で生じるのかは不明であり、この現象が、細胞内領域の欠損した Necl-5 (Necl-5- Δ CP) が Necl-5 の優性抑制変異体 (dominant negative mutant) として機能し、細胞内情報伝達系が阻害されたことに起因するのか、または、過剰に発現した Necl-5 の細胞外領域が接着因子として機能したことに起因する
20 のか、あるいは、これら以外の原因に起因するのか、まったく明らかになっていなかった。また、癌細胞は、Necl-5 を介して CD226 および CD96 を発現した免疫系の細胞により排除されることも知られている。しかし、癌細胞に発現している Necl-5 が、癌細胞の転移に対してどのような役割を果たしているのかは明らかではなかった。そのため、抗 Necl-5 抗体が癌細胞転移に対してどのような作用を及ぼすのかについてはまったく予想できなかった。

25 しかしながら、このような状況の中で、本発明者は、細胞外領域を認識する抗 Necl-5 抗体が、意外にも癌細胞の転移を抑制することを初めて見出した。このことは、当業者にとって全く予測し得ないことであった。

また、本発明者は、癌細胞上で発現する Necl-5 が転移に関与するかどうかを検

討したところ、これまでの V12Ras-NIH3T3 細胞の検討や免疫系の細胞による検討の結果とは反対の結果を得た。すなわち、Necl-5-full や Necl-5- Δ CP を導入した CT26 大腸癌細胞の経尾静脈内注入による肺転移実験において、Necl-5-full や Necl-5- Δ CP を導入した CT26 大腸癌細胞では、肺における転移癌細胞が顕著に
5 増大することが示された。

これらの異なる実験結果は、用いた細胞種の性質の違いに起因すると考えられる。すなわち、正常細胞の一種である NIH3T3 細胞由来の V12Ras-NIH3T3 細胞では、Necl-5 を介した細胞内情報伝達は細胞の増殖、運動能、凝集に重要であると
10 考えられる。そのため、Necl-5 の細胞内領域を欠失させると、Necl-5 の優性抑制変異体として機能するため、Necl-5 を介した情報伝達系が機能しなくなると考えられる。正常細胞の細胞内伝達系には、細胞の増殖や運動能などの転移に必要な要素が含まれているため、当該細胞内伝達系が機能しなくなったことにより、肺への転移が顕著に抑制したと考えられる。一方、癌細胞の 1 種である CT26 などの異常な細胞では、Necl-5 は細胞内情報伝達よりもむしろ細胞外領域を介した
15 接着機能が、癌細胞の転移に重要であると考えられる。そのため、Necl-5 の細胞内領域を欠失したことによる転移への影響は少なく、欠失型であっても Necl-5 を多く発現させることにより、肺への転移が顕著に増加したと考えられる。この CT26 大腸癌細胞を用いた実験によって、転移に重要な Necl-5 の細胞外領域を認識する抗 Necl-5 抗体が、癌細胞の接着を抑制し、癌細胞の転移を抑制することを、
20 初めて説明することが可能となった。

細胞種による Necl-5 の機能の差異、癌細胞の転移における細胞外領域の役割については、これまでの文献に記載も示唆もなく、V12Ras-NIH3T3 の結果からは、Necl-5 の細胞外領域を認識する抗体が、癌細胞の転移を抑制する機能を有することは全く想定できないことであった。

25 Necl-5 の細胞外領域には、接着因子である Necin-3、CD226、および CD96 との結合に重要な領域が含まれている。Necl-5 とこれらの接着因子との結合を抑制する中和活性を有する抗 Necl-5 抗体は、効果的に細胞接着や転移を抑制することが可能となる。

以上のことから、本発明は、Necl-5 の接着活性を中和する抗体であって、好ましくは、Necl-5 の細胞外領域を認識する抗 Necl-5 抗体を含む癌治療剤を提供する。

以下に、本発明をさらに詳細に説明する。

5

1. Necl-5

本発明において、Necl-5 とは、配列番号：2（ヒト、GenBank アクセッション番号：NM_006505）または配列番号：4（マウス、GenBank アクセッション番号：NM_027514）で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質を含むものである。

以下、本発明で使用する Necl-5（以下「本発明の Necl-5」ともいう）について詳細に説明する。

配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と約 90% 以上、好ましくは約 95% 以上、より好ましくは約 98% 以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、細胞接着活性を有するタンパク質のアミノ酸配列などがあげられる。

特に、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、上記のアミノ酸配列のほか、配列番号：2 で表わされるアミノ酸配列において 1 個または複数個（例えば 1 個または数個）のアミノ酸に欠失、置換または付加等の変異が生じたアミノ酸配列であって、細胞接着活性を有するタンパク質のアミノ酸配列があげられる。

本明細書において、「細胞接着活性を有する」とは、タンパク質が Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つに対する親和性を有することを意味し、親和性の大きさ（Kd 値）は、300 nM 以下、好ましくは 100 nM 以下、より好ましくは 30 nM 以下である。Nectin-3、CD226 および CD96 は単体または多量体であってもよいし、他のタンパク質との複合体であってもよい。また、本明細書において細胞接着活性とは、当該タンパク質が細胞上で当該活性を示す場合だけでなく、広く、例えば *in vitro* において当該タンパク質が

Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対して親和性を示す場合も含まれる。

- 前記の配列番号：2で表わされるアミノ酸配列において1個または複数個（例えば1個または数個）のアミノ酸に欠失、置換または付加等の変異が生じたアミノ酸配列としては、例えば、(i) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

また、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列であって、細胞接着活性を有するタンパク質のアミノ酸配列などがあげられる。

- 特に、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、上記のアミノ酸配列のほか、配列番号：4で表わされるアミノ酸配列において1個または複数個（例えば1個または数個）のアミノ酸に欠失、置換または付加等の変異が生じたアミノ酸配列であって、細胞接着活性を有するタンパク質のアミノ酸配列があげられる。

- 前記の配列番号：4で表わされるアミノ酸配列において1個または複数個（例えば1個または数個）のアミノ酸に欠失、置換または付加等の変異が生じたアミノ酸配列としては、例えば、(i) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個）の

5 アミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは1個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

10 配列番号2もしくは4で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質、または配列番号2もしくは4で表されるアミノ酸配列中の1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加等されたアミノ酸配列を含む変異タンパク質であって、元のタンパク質と同じ生物学的活性が維持されるタンパク質も、本発明の範囲に含まれる。例えば、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有する限り、本発明で使用する Necl-5 は配列番号2
15 もしくは4で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質と Fc 領域、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質(MBP)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、アルカリフォスファターゼ(AP)などとの融合タンパク質であってもよい。配列番号2または4で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質も、本発明においては使用することができる。

20 ここで、アミノ酸の置換とは、配列中のアミノ酸残基の一つ以上が、異なる種類のアミノ酸残基に変えられた変異を意味する。このような置換により Necl-5 のアミノ酸配列を改変する場合、タンパク質の機能を保持するためには、保存的な置換を行うことが好ましい。保存的な置換とは、置換前のアミノ酸と似た性質のアミノ酸をコードするように配列を変化させることである。アミノ酸の性質は、
25 例えば、非極性アミノ酸(Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val)、非荷電性アミノ酸(Asn, Cys, Gln, Gly, Ser, Thr, Tyr)、酸性アミノ酸(Asp, Glu)、塩基性アミノ酸(Arg, His, Lys)、中性アミノ酸(Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val)、脂肪族アミノ酸(Ala, Gly)、分枝アミノ酸(Ile, Leu,

Val)、ヒドロキシアミノ酸(Ser, Thr)、アミド型アミノ酸(Gln, Asn)、含硫アミノ酸(Cys, Met)、芳香族アミノ酸(His, Phe, Trp, Tyr)、複素環式アミノ酸(His, Trp)、イミノ酸(Pro, 4Hyp)等に分類することができる。

従って、例えば、非極性アミノ酸同士、あるいは非荷電性アミノ酸同士で置換
5 させることが好ましい。中でも、Ala、Val、Leu および Ile の間、Ser および Thr の間、Asp および Glu の間、Asn および Gln の間、Lys および Arg の間、Phe および Tyr の間の置換は、タンパク質の性質を保持する置換として好ましい。変異されるアミノ酸の数および部位は特に制限ない。

本発明において、Necl-5 とは、配列番号：1 (ヒト、GenBank アクセション
10 ン番号：NM_006505) 記載の塩基配列のうち、172番から1425番目の塩基配列 (以下、当該部分配列を「配列番号：1(172~1425)」と記載する場合があります) または配列番号：3 (マウス、GenBank アクセション番号：NM_027514) 記載の塩基配列のうち、73番から1299番目の塩基配列 (以下、当該部分配列を「配列番号：3(73~1299)」と記載する場合があります) と同一のまたは実質的に
15 同一の塩基配列を有するポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含むものである。

配列番号：1(172~1425)または3(73~1299)で表される塩基配列と実質的に
同一の塩基配列としては、配列番号：1(172~1425)または3(73~1299)で表さ
れる塩基配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%
20 以上の相同性を有する塩基配列などであって、コードするタンパク質が細胞接着
活性を有する塩基配列が挙げられる。配列番号：1(172~1425)または3(73~
1299)で表される塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされるタン
パク質も、本発明においては使用することができる。

本発明において、ポリヌクレオチドは、例えば DNA または RNA を挙げるこ
25 とができるが、好ましくは DNA である。

特に、配列番号：1(172~1425)または3(73~1299)で表される塩基配列と実
質的に同一の塩基配列としては、上記の塩基配列のほか、配列番号：1(172~
1425)または3(73~1299)で表わされる塩基配列において1個または複数個(例

例えば1個または数個)の塩基に欠失、置換または付加等の変異が生じた塩基配列であり、コードするタンパク質が細胞接着活性を有する塩基配列があげられる。

前記の配列番号：1(172~1425)または3(73~1299)で表わされる塩基配列において1個または複数個(例えば1個または数個)の塩基に欠失、置換または付加等の変異が生じた塩基配列としては、例えば、(i)配列番号：1(172~1425)または3(73~1299)で表される塩基配列中の1~5個(好ましくは1~3個、さらに好ましくは1~2個、より好ましくは1個)の塩基が欠失した塩基配列、(ii)配列番号：1(172~1425)または3(73~1299)で表される塩基配列に1~5個(好ましくは1~3個、さらに好ましくは1~2個、より好ましくは1個)の塩基が付加した塩基配列、(iii)配列番号：1(172~1425)または3(73~1299)で表される塩基配列に1~5個(好ましくは1~3個、さらに好ましくは1~2個、より好ましくは1個)のアミノ酸が挿入された塩基配列、(iv)配列番号：1(172~1425)または3(73~1299)で表される塩基配列中の1~5個(好ましくは1~3個、さらに好ましくは1~2個、より好ましくは1個)のアミノ酸が他の塩基で置換された塩基配列、(v)上記(i)~(iv)を組み合わせた塩基配列などがあげられる。

また、配列番号：1(172~1425)または3(73~1299)で表される塩基配列と実質的に同一の塩基配列としては、配列番号1(172~1425)もしくは3(73~1299)で表される塩基配列または当該塩基配列に相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつ細胞接着活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドの塩基配列が挙げられる。ここで、ストリンジентな条件としては、例えば、「2×SSC、0.1%SDS、50℃」、「2×SSC、0.1%SDS、42℃」、「1×SSC、0.1%SDS、37℃」、よりストリンジентな条件としては、例えば「2×SSC、0.1%SDS、65℃」、「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」、「0.2×SSC、0.1%SDS、65℃」等の条件を挙げることができる。

本発明において、Necl-5は、Necl-5を発現している癌細胞などの細胞由来であってもよい。細胞由来のNecl-5は、例えば細胞を破碎または溶解し、細胞破碎液または細胞溶解液からカラムや透析などによって精製したものをを用いることができる。また、本発明において、Necl-5は、アミノ酸配列に基づいてペプチド合成

機で合成した Necl-5 であってもよい。また、例えば実施例 1、2、9、11 に示した通り、遺伝子工学的に作製したものであってもよい。

5 本発明において、Necl-5 としては、以上のようなタンパク質が挙げられ、例えば、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有し、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つに対する親和性（配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の親和性）を有するタンパク質であることが好ましい。または、配列番号：4 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有し、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つに対する親和性（配列番号：4 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の親和性）を有するタンパク質であることが好ましい。

10 ここで、本発明において、Nectin-3 とは、GenBank アクセッション番号：NM_015480 で表されるタンパク質（ヒト）または GenBank アクセッション番号：NM_021495 で表されるタンパク質（マウス）を、CD226 とは、GenBank アクセッション番号：NM_006566 で表されるタンパク質（ヒト）または GenBank アクセッション番号：AF416980 で表されるタンパク質（マウス）を、CD96 とは、GenBank アクセッション番号：NM_005816 で表されるタンパク質（ヒト）または GenBank アクセッション番号：BC052865 で表されるタンパク質（マウス）をいう。

Nectin-3 は、細胞接着において機能するタンパク質である。CD226 は DNAM-1 ともいい、細胞接着因子として機能するタンパク質である。CD96 は tactile ともいい、細胞接着因子として機能するタンパク質である。

25 Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つに対する、実質的に同質の親和性とは、その親和性がもとのタンパク質と比較して同程度であることを示す。「同程度」とは、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つに対し、配列番号：2 または 4 で表されるア

ミノ酸配列と同一のまたは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質の有する親和性 (Kd 値) が、配列番号 : 2 または配列番号 : 4 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質が有する同親和性 (Kd 値) の 1 % 以上あればよいことを意味し、好ましくは 3 % 以上、より好ましくは 10 % 以上、より好ましくは 30 % 以上有する場合に実質的に同質の親和性を有するということができる。

Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つに対する親和性の具体的な測定方法は、以下に示すものがあげられる。

Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つに対する親和性は、吸光度測定、蛍光抗体法、酵素免疫測定法 (EIA)、放射免疫測定法 (RIA)、ELISA 等により測定することができる。例えば、ELISA 法による測定の場合、被検タンパク質をプレート等の担体に固相化し、次いで Nectin-3、CD226 または CD96 を添加する。ここで、Nectin-3、CD226 または CD96 としては、常法にしたがい遺伝子工学により作製されたタンパク質等であってもよい。続いて、Nectin-3、CD226 または CD96 を認識する抗体を添加し、プレートのインキュベーションを行う。その後、プレートを洗浄し、抗体に付加された標識を検出する。即ち、例えば、抗体がアルカリフォスファターゼで標識されている場合には、p-ニトロフェニルリン酸等の酵素基質を添加して吸光度を測定することで、抗原結合活性を測定することができる。また、Nectin-3、CD226 または CD96 を認識する抗体を認識する二次抗体を用いて定量することもできる。

被検タンパク質としては、被検タンパク質を発現した細胞を用いることもできる。

また、Nectin-3、CD226 または CD96 の代わりに、Nectin-3、CD226 または CD96 を発現している細胞を用いることもできる。この場合には、細胞溶解液を加えて溶解し、例えば、Calcein-AM(3',6'-Di(O-acetyl)-4',5'-bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein, tetraacetoxymethyl ester)、CFSE(5-or 6-(N-Succinimidylloxycarbonyl)-3',6'-O,O'-diacetylfluorescein)などの色素を用いて定量することができる。

被検タンパク質、Nectin-3、CD226 または CD96 を発現している細胞は、特に限定されないが、好ましくは動物細胞である。また、Nectin-3、CD226 または CD96 を発現している細胞は、遺伝子工学的手法により発現させた細胞を用いることができる。当該宿主細胞としては、特に限定されないが、細胞株が好ましく、
5 例えば、B300、CHO、BHK、COS7、NIH3T3、HEK293 などを用いることができる。

また、ELISA 法の別の態様としては、Nectin-3、CD226 または CD96 をプレート等の担体に固相化し、次いで被検タンパク質を添加してもよい。ここで、Nectin-3、CD226 または CD96 としては、常法にしたがい遺伝子工学により作製
10 されたタンパク質等であってもよい。続いて、被検タンパク質を認識する抗体を添加し、プレートのインキュベーションを行う。その後、プレートを洗浄し、抗体に付加された標識を検出する。即ち、例えば、抗体がアルカリフォスファターゼで標識されている場合には、p-ニトロフェニルリン酸等の酵素基質を添加して吸光度を測定することで、抗原結合活性を測定することができる。また、被検タンパク質を認識する抗体を認識する二次抗体を用いて定量することもできる。
15

被検タンパク質としては、被検タンパク質を発現した細胞を用いることもできる。

また、Nectin-3、CD226 または CD96 の代わりに、Nectin-3、CD226 または CD96 を発現している細胞を用いることもできる。

被検タンパク質、Nectin-3、CD226 または CD96 を発現している細胞は、特に限定されないが、好ましくは動物細胞である。また、Nectin-3、CD226 または CD96 を発現している細胞は、遺伝子工学的手法により発現させた細胞を用いることができる。当該宿主細胞としては、特に限定されないが、細胞株が好ましく、
20 例えば、B300、CHO、BHK、COS7、NIH3T3、HEK293 などを用いることができる。
25

ELISA 法において、担体に固相化するタンパク質は、Fc 領域、GST、MBP、AP などとの融合タンパク質であってもよく、結合させた Fc 領域、GST、MBP、AP に対するモノクローナル抗体を介して担体に固相化することもできる。例え

ば、AP 融合被検タンパク質を担体に固相化する場合、まず担体に抗 AP モノクローナル抗体を固相化し、次いで AP 融合被検タンパク質を固相化することもできる。Nectin-3、CD226 または CD96 を担体に固相化する場合も、同様に、固相化したモノクローナル抗体に結合する融合タンパク質として固相化することができる。

<Necl-5 の部分断片>

Necl-5 において、その細胞外領域は、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つに対する親和性を有するために重要な領域である。当該細胞外領域としては、例えば、配列番号：2 記載のアミノ酸配列のうち、29 番目から 344 番目のアミノ酸配列、もしくは、配列番号：4 記載のアミノ酸配列のうち、30 番目から 347 番目のアミノ酸配列を含むタンパク質、またはこれらのアミノ酸配列において 1 もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列などの前記実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質があげられる。上記配列番号：2 記載のアミノ酸配列のうち、29 番目から 344 番目のアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号：4 記載のアミノ酸配列のうち、30 番目から 347 番目のアミノ酸配列からなるタンパク質も、本発明において使用可能である。これらのアミノ酸配列を有する Necl-5 の部分断片も、本発明において使用することができる。また、例えば、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つに対する親和性を有する限り、上記のアミノ酸配列を含むタンパク質と Fc 領域、GST、MBP、GFP、AP などとの融合タンパク質であってもよい。当該 Necl-5 の部分断片も、本発明の Necl-5 に含まれる。

Necl-5 の部分断片は、Necl-5 を適当なペプチダーゼで処理することで得ることができる。あるいは、当該部分断片はペプチド合成機で合成することもできる。

また、当該細胞外領域としては、例えば、配列番号：1 記載の塩基配列のうち、256 番目から 1203 番目の塩基配列、もしくは、配列番号：3 記載の塩基配列のうち、160 番目から 1113 番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによ

ってコードされるタンパク質、またはこれらの塩基配列と前記実質的に同一の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質などが挙げられる。上記配列番号：1記載の塩基配列のうち、256番目から1203番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質、配列番号：5 3のうち、160番目から1113番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質も、本発明において使用することができる。

Necl-5の部分断片は、当業者であれば、上記塩基配列情報に基づいて遺伝子工学的な手法により得ることができる。当該部分断片作製の具体的例示を、実施例1、2、8および11に示す。

10

2. 抗 Necl-5 抗体

本発明の抗 Necl-5 抗体は、前記 Necl-5 またはその部分断片と親和性を有する抗体であり、好ましくは前記 Necl-5 と、Necin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つとの結合を抑制する中和活性を有する抗体であり、さらに好ましくは前記 Necl-5 と CD226 との結合を抑制する中和活性を有する抗体である。本発明の抗 Necl-5 抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体(scFV)(Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83; The Pharmacology of Monoclonal Antibody, vol.113, Rosenberg and Moore ed., Springer Verlag (1994) pp.269-315)、ヒト化抗体、多特異性抗体 (LeDoussal et al. (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62; Paulus (1985) Behring Inst. Mitt. 78: 118-32; Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9; Zimmermann (1986) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)、並びに、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fv 等の抗体断片が含まれ、好ましくはモノクローナル抗体である。さらに、25 本発明の抗 Necl-5 抗体は必要に応じ、ポリエチレングリコール(PEG)等により修飾されていてもよい。その他、本発明の抗 Necl-5 抗体は、 β -ガラクトシダーゼ、MBP、GST、GFP 等との融合タンパク質として製造されることができ、ELISA 法などにおいて二次抗体を用いずに検出できるようにしてもよい。また、ビオチ

ン等により抗体を標識することによりアビジン、ストレプトアビジン等を用いて抗体の回収を行い得るように改変されていてもよい。

本発明の抗 Necl-5 抗体は、Necl-5 またはその部分断片（以下、「本発明のポリペプチド断片」と称する場合がある）、もしくはそれらを発現する細胞を感作抗原として製造することができる。この場合、Necl-5 またはその部分断片は、Fc 領域、GST、MBP、GFP、AP などとの融合タンパク質であってもよい。

本発明のポリペプチド断片は、前記の Necl-5 のアミノ酸配列の一部と同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドであればよい。例えば、配列番号:2 または配列番号:4 記載のアミノ酸配列を有するタンパク質の一部と同一であり、少なくとも6 アミノ酸残基以上(例えば、8、10、12、または15 アミノ酸残基以上)を含むポリペプチド断片である。さらに、本発明のポリペプチド断片は、上記のポリペプチドの置換等の変異体であってもよい。

特に好ましい断片としては、配列番号:2のうち、アミノ酸:29から344までの間の少なくとも6 アミノ酸残基以上(例えば、8、10、12、または15 アミノ酸残基以上)を含むポリペプチド断片、または、配列番号:4のうち、アミノ酸:30から347までの間の少なくとも6 アミノ酸残基以上(例えば、8、10、12、または15 アミノ酸残基以上)を含むポリペプチド断片を挙げることができる。配列番号:2のうち、アミノ酸:29から344までの間の少なくとも6 アミノ酸残基以上(例えば、8、10、12、または15 アミノ酸残基以上)からなるポリペプチド断片、または、配列番号:4のうち、アミノ酸:30から347までの間の少なくとも6 アミノ酸残基以上(例えば、8、10、12、または15 アミノ酸残基以上)からなるポリペプチド断片も、本発明において使用可能である。

あるいは、特に好ましいポリペプチド断片としては、例えば、配列番号:1のうち、ポリヌクレオチド:256から1203までの間の少なくとも18 核酸長以上(例えば、24、30、36 または45 核酸長以上)を含むポリヌクレオチド、または、配列番号:3のうちポリヌクレオチド:160から1113までの間の少なくとも18 核酸長以上(例えば、24、30、36 または45 核酸長以上)を含むポリヌクレオチドのコードするポリペプチド断片を挙げることができる。配列番

号：1のうち、ポリヌクレオチド：256から1203までの間の少なくとも18
核酸長以上（例えば、24、30、36または45核酸長以上）からなるポリヌクレオ
チド、または、配列番号：3のうちポリヌクレオチド：160から1113まで
の間の少なくとも18核酸長以上（例えば、24、30、36または45核酸長以上）
5 からなるポリヌクレオチドのコードするポリペプチド断片も、本発明において使用可能である。

例えば、感作抗原に用いる Necl-5 またはその部分断片は、実施例2に記載のよ
うに作製することもできる。すなわち、マウス cDNA を鋳型として、配列番号：
17および配列番号：18（後述の実施例2に記載）に記載のオリゴヌクレオチ
10 ドをプライマーとする PCR で得られた断片を、ベクターに挿入する。ベクター
から組換えバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞に感染させ、培養上清中に分泌
されたタンパク質を精製して得ることもできる。

本発明のポリペプチド断片は、Necl-5 としての抗原性さえ有すればどのような
断片であってもよい。ポリペプチドの抗原決定部位は、タンパク質のアミノ酸配
15 列上の疎水性／親水性を解析する方法(Kyte-Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157:
105-22)、二次構造を解析する方法 (Chou-Fasman (1978) Ann. Rev. Biochem
47: 251-76) により推定し、さらにコンピュータープログラム (Anal. Biochem.
151: 540-6 (1985))、または短いペプチドを合成しその抗原性を確認する
PEPSCAN 法(特表昭 60-500684 号公報)等により確認することができる。

20 また、本発明の Necl-5 または本発明のポリペプチド断片のうち分子量の小さい
ものは、例えば、ウシ血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、卵
白アルブミン等のキャリアに結合して免疫原として用いてもよい。また、本発明
の Necl-5 または本発明のポリペプチド断片と共に、アルミニウムアジュバント、
完全(または不完全)フロイントアジュバント、TiterMax gold、百日咳菌アジュバ
25 ント等の公知のアジュバントを、抗原に対する免疫応答を強化するために免疫原
に用いてもよい。

本発明のポリクローナル抗体は、例えば、本発明の Necl-5 または本発明のポリ
ペプチド断片を所望によりアジュバントと共に哺乳動物に免疫し、免疫した動物

より血清を得ることで作製することができる。ここで用いる哺乳動物は、特に限定されないが、ゲッ歯目、ウサギ目、霊長目の動物およびロバ、ヤギ、ニワトリ、ウズラなどの動物が一般的である。マウス、ラット、モルモット、ハムスター等のゲッ歯目、ウサギ等のウサギ目、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等の霊長目の動物が挙げられる。動物の免疫化は、感作抗原を Phosphate-Buffered Saline(PBS)または生理食塩水等で適宜希釈、懸濁し、必要に応じてアジュバントを混合して乳化した後、動物の腹腔内または皮下に注射して行われる。その後、好ましくは、フロイント不完全アジュバントに混合した感作抗原を 4~21 日毎に数回投与する。抗体の産生を、血清中の所望の抗体レベルを慣用の方法により測定することにより確認することができる。最終的に、血清そのものをポリクローナル抗体として用いても良いし、さらに精製して用いてもよい。具体的な方法として、例えば、「Current Protocols in Molecular Biology」(John Wiley & Sons (1987) Section 11.12-11.13)を参照することができる。

本発明のモノクローナル抗体を産生するためには、まず、上述のようにして免疫化した動物より脾臓やリンパ節を摘出し、当該脾臓やリンパ節より免疫細胞を分離し、例えば P3 ミエローマ細胞などの適当なミエローマ細胞と PEG 等を用いて融合してハイブリドーマを作製する。細胞の融合は、Milstein の方法(Galfre and Milstein (1981) Methods Enzymol. 73: 3-46)に準じて行うことができるがこれに限定されない。ここで、適当なミエローマ細胞として特に、融合細胞を薬剤により選択することを可能にする細胞を挙げることができる。このようなミエローマを用いた場合、融合されたハイブリドーマは、融合された細胞以外は死滅するヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液(HAT 培養液)で培養して選択する。次に、作製されたハイブリドーマの中から、本発明の Necl-5 に対して結合する抗体を産生するクローンを選択する。Necl-5 への結合力価をクローン選択の指標とすることができ、例えば、ハイブリドーマの培養上清を用いたウェスタンブロットや ELISA などの免疫化学的手法によりクローンを選択することができる。その後、選択したクローンをマウス等の腹腔内に移植し、腹水を回収してモノクローナル抗体を得る。また、具体的な方法として、「Current

Protocols in Molecular Biology」(John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11)を参照することもできる。

ハイブリドーマは、その他、最初に EB ウイルスに感染させたヒトリンパ球を *in vitro* で免疫原を用いて感作し、感作リンパ球をヒト由来のミエローマ細胞 (U266 等) と融合し、ヒト抗体を産生するハイブリドーマを得る方法(特開昭 5 63-17688 号公報)によっても得ることができる。また、ヒト抗体遺伝子のレポーターを有するトランスジェニック動物を感作して製造した抗体産生細胞を用いても、ヒト抗体を得ることができる(WO92/03918; WO93-02227; WO94/02602; WO94/25585; WO96/33735; WO96/34096; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15: 10 146-56 等)。ハイブリドーマを用いない例としては、抗体を産生するリンパ球等の免疫細胞に癌遺伝子を導入して不死化する方法が挙げられる。

また、遺伝子組換え技術により抗体を製造することもできる(Borrebaeck and Larrick (1990) Therapeutic Monoclonal Antibodies, MacMillan Publishers LTD., UK 参照)。そのためには、まず、抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマまたは抗体産生細胞(感作リンパ球等)からクローニングする。得られた遺伝子を 15 適当なベクターに組み込み、宿主に当該ベクターを導入し、宿主を培養することにより抗体を産生させる。このような組換え型の抗体も本発明の抗 Necl-5 抗体に含まれる。代表的な組換え型の抗体として、非ヒト抗体由来可変領域およびヒト抗体由来定常領域とからなる本発明のキメラ抗体、並びに非ヒト抗体由来相補性決定領域(CDR)、ヒト抗体由来フレームワーク領域(FR)および定常領域とからなる本発明のヒト化抗体が挙げられる(Jones et al. (1986) Nature 321: 522-5; Reichmann et al. (1988) Nature 332: 323-9; Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-6; Methods Enzymol. 203: 99-121 (1991))。あるいは、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域(Fv)の遺伝子をハイブリドーマまたは抗体産生細胞 (感作リンパ球等) からクローニングし、得られた両遺伝子を適当なリンカーをコードする 20 遺伝子で結合させて適当なベクターに組み込み、宿主に当該ベクターを導入し、宿主を培養することにより本発明の一本鎖抗体(scFV)を産生させることもできる。

本発明の抗 Necl-5 抗体に含まれる抗体断片は、上述のポリクローナルまたはモ

ノクローナル抗体をパパイン、ペプシン等の酵素で処理することにより製造し得る。または、抗体断片をコードする遺伝子を用いて遺伝子工学的に製造することも可能である(Co et al., (1994) *J. Immunol.* 152: 2968-76; Better and Horwitz (1989) *Methods Enzymol.* 178: 476-96; Pluckthun and Skerra (1989) *Methods Enzymol.* 178: 497-515; Lamoyi (1986) *Methods Enzymol.* 121: 652-63; Rousseaux et al. (1986) 121: 663-9; Bird and Walker (1991) *Trends Biotechnol.* 9: 132-7 参照)。

本発明の多特異性抗体には、二特異性抗体(BsAb)、ダイアボディ(Db)等が含まれる。多特異性抗体は、(1)異なる特異性の抗体を異種二機能性リンカーにより化学的にカップリングする方法(Paulus (1985) *Behring Inst. Mill.* 78: 118-32)、(2)異なるモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを融合する方法(Millstein and Cuello (1983) *Nature* 305: 537-9)、(3)異なるモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖遺伝子(4種のDNA)によりマウス骨髄腫細胞等の真核細胞発現系をトランスフェクションした後、二特異性の一価部分を単離する方法(Zimmermann (1986) *Rev. Physio. Biochem. Pharmacol.* 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) *Int. J. Cancer* 43: 944-9) 等により作製することができる。一方、Dbは遺伝子融合により構築され得る二価の2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーの抗体断片であり、公知の手法により作製することができる(Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-8; EP404097; WO93/11161 参照)。

本発明の抗 Necl-5 抗体 (先に示したように、その抗体断片を含む。以下同様。) は、例えば、「@mNecl-5:1A8-8」と称し、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号 305-8566)) に、2004年4月27日付で受託番号: FERM BP-10018 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されたハイブリドーマから生成されるモノクローナル抗体またはその断片があげられる。

本発明の抗 Necl-5 抗体の回収および精製は、プロテイン A および/またはプロテイン G を用いて行うことができる。また、抗体および抗体断片の回収および精製は、公知の塩析、各種クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、ゲル濾過、限外

濾過、再結晶、酸抽出、透析、免疫沈降、溶媒沈澱、溶媒抽出、硫酸またはエタノール沈澱等を適宜組み合わせることにより所望の抗体を精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、アニオンまたはカチオン交換等のイオン交換、アフィニティー、逆相、吸着、ゲル濾過、疎水性、ヒドロキシアパタイト、ホスホセルロース、レクチンクロマトグラフィー等が公知である (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。HPLC、FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うこともできる。

例えば、本発明の抗 Necl-5 抗体の精製にプロテイン A を利用する場合、Hyper D、POROS、Sephacryl S4B (Pharmacia)等のプロテイン A カラムが公知であり、使用可能である。得られた抗体の濃度は、その吸光度を測定することにより、または酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)等により決定することができる。

本発明の抗 Necl-5 抗体の抗原結合活性は、吸光度測定、蛍光抗体法、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、ELISA 等により測定することができる。

15 ELISA 法による測定の場合、本発明の Necl-5 または本発明のポリペプチド断片を固相化し、目的とする抗体または抗体断片を含む試料を添加する。固相化する本発明の Necl-5 または本発明のポリペプチド断片は、Fc 領域、GST、MBP、AP などとの融合タンパク質であってもよく、結合させた Fc 領域、GST、MBP、AP に対するモノクローナル抗体を介して担体に固相化することもできる。ここで、

20 抗体または抗体断片を含む試料としては、抗体産性細胞の培養上清、精製抗体等が考えられる。続いて、本発明の抗 Necl-5 抗体を認識する二次抗体を添加し、プレート上でインキュベーションを行う。その後、プレートを洗浄し、二次抗体に付加された標識を検出する。即ち、二次抗体がアルカリフォスファターゼで標識されている場合には、p-ニトロフェニルリン酸等の酵素基質を添加して吸光度を

25 測定することで、抗原結合活性を測定することができる。また、抗体の活性評価に、BIAcore(Pharmacia)等の市販の系を使用することもできる。

本発明の抗 Necl-5 抗体は、中和活性を有することが好ましい。ここで、中和活性とは、Necl-5 と Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少

なくとも1つとの結合を抑制する活性をいい、好ましくは、Necl-5 と Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つを発現した細胞との接着を抑制する活性をいい、より好ましくは Necl-5 と CD226 を発現した細胞との接着を抑制する活性をいう。

- 5 抗体の中和活性は、吸光度測定、蛍光抗体法、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、ELISA 等により測定することができる。例えば、本発明の Necl-5 または本発明のポリペプチド断片をプレート等の担体に固相化し、次いで本発明の抗 Necl-5 抗体および Nectin-3、CD226 または CD96 を添加し、プレート上でインキュベーションを行う。担体に固相化する本発明の Necl-5 または本発明のポリペプチド断片は、Fc 領域、GST、MBP、AP などとの融合タンパク質であつてもよく、結合させた Fc 領域、GST、MBP、AP に対するモノクローナル抗体を介して担体に固相化することもできる。ここで、Nectin-3、CD226 または CD96 としては、常法にしたがい遺伝子工学により作製されたタンパク質等が考えられる。続いて、プレートを洗浄し、プレートに結合している Nectin-3、CD226 または CD96 を定量することで、中和活性を測定することができる。例えば、本発明の抗 Necl-5 抗体が、Necl-5 と Nectin-3、CD226 または CD96 との結合を 30 % 以上、好ましくは 50 % 以上、より好ましくは 70 % 以上抑制する活性を示す場合に、中和活性を有するということができる。

- また、Nectin-3、CD226 または CD96 の代わりに、Nectin-3、CD226 または CD96 を発現している細胞を用いることもできる。この場合には、細胞溶解液を加えて溶解し、例えば、Calcein-AM、CFSE などの色素を用いて定量することができる。また、この活性を細胞接着抑制活性とすることができる。例えば、本発明の抗 Necl-5 抗体が、Necl-5 と Nectin-3、CD226 または CD96 を発現した細胞との接着を 30 % 以上、好ましくは 50 % 以上、より好ましくは 70 % 以上抑制する活性を示す場合に、細胞接着抑制活性を有するということができる。

Nectin-3、CD226 または CD96 を発現している細胞は、特に限定されないが、好ましくは動物細胞である。また、Nectin-3、CD226 または CD96 を発現している細胞は、遺伝子工学的手法により発現させた細胞を用いることができる。当該

宿主細胞としては、特に限定されないが、細胞株が好ましく、例えば、B300、CHO、BHK、COS7、NIH3T3、HEK293などを用いることができる。

3. 抗 Necl-5 抗体を有効成分として含む癌治療剤

- 5 本発明は、本発明の抗 Necl-5 抗体を有効成分として含む癌治療剤を提供する。
本発明において、癌治療剤とは、癌予後改善剤、癌再発予防剤、癌転移抑制剤などを含み、好ましくは癌転移抑制剤である。

また、本発明において、抗 Necl-5 抗体は、ヒト化抗体が好ましい。

- 10 癌転移を抑制することは、原発巣を切除した後の再発予防、予後改善を期待しうるものであることは、当業者であれば容易に理解できる。

癌治療の効果は、レントゲン写真、CT、MRI、PET 等の所見や生検の病理組織診断により、あるいは腫瘍マーカーの値により確認することができる。

本発明の癌治療剤の有効成分である本発明の抗 Necl-5 抗体は、中和活性、好ましくは細胞接着抑制活性を有するものであればその種類は限定されない。

- 15 本発明の抗 Necl-5 抗体を有効成分として含む癌治療剤は、哺乳動物(例、ヒト、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して、投与することができる。

- 20 癌治療剤の対象となる癌種は、特に限定されず、例えば、脳腫瘍、頸癌、食道癌、舌癌、肺癌、乳癌、膵臓癌、胃癌、大腸癌、小腸または十二指腸の癌、結腸癌、直腸癌、膀胱癌、腎癌、肝癌、前立腺癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫(例えば、骨肉種、筋肉種、線維肉腫など)、リンパ腫、白血病およびメラノーマからなる群から選択される少なくとも1つなどがあげられ、好ましくは、大腸癌、卵巣癌、肉腫(例えば、線維肉腫)およびメラノーマからなる群から選択される少なくとも1つがあげられ、より好ましくは大腸癌があげられる。

- 25 また、癌治療剤の対象となる癌種は、特に限定されないが、Necl-5 を発現している細胞を含む癌であることが好ましく、以下の(a)～(p)から選択されるタンパク質を発現している細胞を含む癌であることが特に好ましい。

(a) 配列番号：2記載のアミノ酸配列を含むタンパク質

- (b) 配列番号：2記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226およびCD96からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
- 5 (c) 配列番号：1記載の塩基配列のうち、172番目から1425番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質
- (d) 配列番号：1記載の塩基配列のうち、172番目から1425番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226およびCD96
- 10 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
- (e) 配列番号：4記載のアミノ酸配列を含むタンパク質
- (f) 配列番号：4記載のアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226
- 15 およびCD96からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
- (g) 配列番号：3記載の塩基配列のうち、73番目から1299番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質
- 20 (h) 配列番号：3記載の塩基配列のうち、73番目から1299番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226およびCD96
- 25 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
- (i) 配列番号：2記載のアミノ酸配列のうち、29番目から344番目のアミノ酸配列を含むタンパク質
- (j) 配列番号：2記載のアミノ酸配列のうち、29番目から344番目のアミノ

酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質

- 5 (k) 配列番号：1記載の塩基配列のうち、256番目から1203番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質
- (l) 配列番号：1記載の塩基配列のうち、256番目から1203番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96
- 10 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
- (m) 配列番号：4記載のアミノ酸配列のうち、30番目から347番目のアミノ酸配列を含むタンパク質
- (n) 配列番号：4記載のアミノ酸配列のうち、30番目から347番目のアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群
- 15 から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
- (o) 配列番号：3記載の塩基配列のうち、160番目から1113番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質
- 20 (p) 配列番号：3記載の塩基配列のうち、160番目から1113番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
- 25

以上の (a) ~ (p) から選択されるタンパク質を発現している細胞を含む癌であるかどうかは、癌組織から細胞を採取し、常法にしたがい免疫学的手法、遺伝子工学的手法等により調べることができる。例えば、本発明の抗 Necl-5 抗体を用

いることもできる。

投与方法は、経口、非経口投与のいずれでも可能であるが、好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射剤、経鼻投与剤、経肺投与剤、経皮投与などが挙げられる。注射剤の例としては、例えば、静脈内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、
5 皮下投与、点滴静注などにより全身または局部的に投与することができる。

本発明において抗 Necl-5 抗体自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した薬剤として投与を行うことも可能である。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤の注射剤の形で使用できる。また、例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、
10 具体的には、滅菌水や生理食塩水、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、ベヒクル、防腐剤などと適宜組み合わせ、本発明の抗 Necl-5 抗体の有効量を製剤化することが考えられる。

上記乳化剤または界面活性剤としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、モノステアリン酸グリセリン、ショ糖脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル等を
15 挙げることができ、

上記懸濁剤としては、前記界面活性剤のほか、例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等の親水性高分子を
20 挙げるができ、

上記安定剤としては、一般に医薬に使用されるものを挙げるができ、

上記ベヒクルとしては、リポソーム、マイクロスフェア、脂質小胞体などの一般に医薬に使用されているものを挙げることができ、

上記防腐剤としては、例えばメチルパラベン、プロピルパラベン、クロロブタ
25 ノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等を挙げるができる。

注射のための無菌組成物は注射用蒸留水などの注射用水溶液や注射用の油性液を用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水溶液として

- は、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、
- 5 例例えばポリソルベート80™、HCO-50と併用してもよい。

注射用の油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。

- 10 調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。また、本発明の抗 Necl-5 抗体を凍結乾燥させたアンプルに、注射用の水溶液や油性液などの適当なベヒクルを使用時に適量添加するという、用事調製の形態でもよい。

- また、患者の年齢、症状により適宜本発明の癌治療剤の投与量を選択することができる。投与量としては、有効成分である本発明の抗 Necl-5 抗体を、例えば、
- 15 一日につき1～5回の範囲で、一回につき体重1kgあたり0.0001～1000mg、好ましくは0.01～100mg、より好ましくは0.1～10mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001～100000mg/body、好ましくは0.1～10000mg/body、より好ましくは1～100mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の癌治療剤は、これらの投与回数および投与
- 20 量に制限されるものではない。

- さらに、本発明には、癌治療剤の製造のための、本発明の抗 Necl-5 抗体の使用も含まれる。本発明の使用において、抗 Necl-5 抗体は、上記の通り、Necl-5 またはその部分断片と親和性を有する抗体であり、好ましくは中和活性を有する抗体である。本発明の抗 Necl-5 抗体にはその部分断片も含まれる。本発明の使用に
- 25 において、癌は、本発明の癌治療剤の対象となる癌腫として例示した癌を挙げることができる。

また、本発明は、抗 Necl-5 抗体を有効成分として含む癌治療剤を患者に投与することを特徴とする癌の予防または治療方法も含むものである。本発明の方法に

において、抗 Necl-5 抗体は、上記の通り、Necl-5 またはその部分断片と親和性を有する抗体であり、好ましくは中和活性を有する抗体である。本発明の抗 Necl-5 抗体にはその部分断片も含まれる。本発明の方法において、癌は、本発明の癌治療剤の対象となる癌腫として例示した癌を挙げることができる。本発明の癌の予防または治療方法において、抗 Necl-5 抗体、すなわち、Necl-5 またはその部分断片と親和性を有する抗体であって、好ましくは中和活性を有する抗体の投与経路および投与方法は特に限定されないが、上記本発明の治療剤の記載を参照することができる。

10 実施例

以下に、具体的な例をもって本発明を示すが、本発明はこれに限られるものではない。

実施例 1 接着分子 (Necl-5、Nectin-1、Nectin-2、Nectin-3、Necl-1、
15 Necl-2) の細胞外領域とアルカリフォスファターゼのキメラタンパク質の作製

Necl-5 の細胞外領域をコードする cDNA を得るために、それぞれ配列番号 : 5 (5' 端に XhoI を付加) および配列番号 : 6 (3' 端に XbaI を付加) 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、マウス cDNA (クロンテック社製) を鋳型として、常法に従い PCR で増幅した。

20

配列番号 : 5 cgctcgagg ccaccatggc tcaactgcc cgagc

配列番号 : 6 gcgtctagag tgtaatcttg tattttgct

得られた PCR 産物を XhoI および XbaI で消化した後、pDREF-SEAP(His)₆
25 ベクター (J. Biol.Chem.1997;272:5846-53.) の SalI-XbaI site に挿入した。これにより、接着分子の細胞外領域と分泌型ヒト胎盤性アルカリフォスファターゼとが、3 個のアラニンからなるアミノ酸リンカーで結合され、さらに C 末端に 6 個のヒスチジンからなるヒスチジンタグ(His)₆ のついた分泌キメラタンパク質

(以下「AP キメラタンパク質」と称する場合がある) の発現が可能となる。

同様に、接着分子 (Nectin-1、Nectin-2、Nectin-3、Necl-1、Necl-2) の細胞外領域をコードする cDNA を得るために、それぞれ Nectin-1 (GenBank アクセッション番号:AF297665)、Nectin-2 (GenBank アクセッション番号:M80206)、

5 Nectin-3 (GenBank アクセッション番号:NM_021495)、Necl-1 (GenBank アクセッション番号:AF195662)、Necl-2 (GenBank アクセッション番号:AB052293) で表される配列を基にプライマーを作製し、マウス cDNA (クロンテック社製) を鋳型として、常法に従い PCR で増幅した。Nectin-1 は配列番号:7 および配列番号:8、Nectin-2 は配列番号:9 および配列番号:10、Nectin-3

10 は配列番号:11 および配列番号:12、Necl-1 は配列番号:13 および配列番号:14、Necl-2 は配列番号:15 および配列番号:16 に記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた。そして、PCR 増幅産物から上述のように AP キメラタンパク質発現ベクターを作製した。

15 配列番号:7 Nectin-1 Sal cgcgctcgacg ccaccatggc tcggatgggg cttgc
配列番号:8 Nectin-1 XbaI gcgtctagag cgccgccgt gttcaggag
配列番号:9 Nectin-2 Sal cgcgctcgacg ccaccatggc ccgggccgca gtct
配列番号:10 Nectin-2 XbaI gcgtctagat cgcaccagga tgacctgct
配列番号:11 Nectin-3 Sal cgcgctcgacg ccaccatggc gcggacccc ggccc

20 配列番号:12 Nectin-3 XbaI gcgtctagag tcattcctaa gtgttgcca
配列番号:13 Necl-1 Sal cgcgctcgacg ccaccatggg ggccccttc gcct
配列番号:14 Necl-1 XbaI gcgtctagagg tactggagga cgagggca
配列番号:15 Necl-2 Sal cgcgctcgacg ccaccatggc gaggctgtg ctgcc
配列番号:16 Necl-2 NheI gcggctagcg tccactgcc caatggtcc

25

得られた各 AP キメラタンパク質発現ベクターを、TransIT LT1 (TAKARA 社製) を用いて 293/EBNA-1 細胞株へ導入し、4 から 5 日間培養を行った。培養上清中に分泌された AP キメラタンパク質を、遠心分離により培養上清を回収し、

0.22 μ m のフィルターでろ過した後、Hepes (pH 7.4) およびアジ化ナトリウムをそれぞれ最終濃度が 20 mM および 0.02% となるように加えて 4°C で保存した。AP キメラタンパク質の濃度は、the Great EscApe detection kit (CLONTECH 社製) を用いて、マニュアルにしたがい、アルカリフォスファターゼ活性を測定して算出した。このようにして得られたタンパク質をそれぞれ Necl-5-AP キメラタンパク質、Nectin-1-AP キメラタンパク質、Nectin-2-AP キメラタンパク質、Nectin-3-AP キメラタンパク質、Necl-1-AP キメラタンパク質、Necl-2-AP キメラタンパク質とした。

10 実施例 2 Necl-5 の細胞外領域と Fc とのキメラタンパク質の作製

Necl-5 の細胞外領域は、配列番号：17 (5' 端に BglIII を付加) および配列番号：18 (3' 端に BglIII を付加) 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、マウス cDNA (クロンテック社製) を鋳型として、常法に従い PCR で増幅した。

15

配列番号：17 gcagatctca tacgtgtgct ggtgcctac

配列番号：18 gcgagatctg ggtgtaatct tgtattttgc tgc

得られた cDNA 断片を BglIII で消化した後、pFastBac1 ベクター (Invitrogen 社製) にミツバチ Melittin のシグナルペプチド配列、BamHI site およびヒト IgG の Fc 領域を挿入した改変ベクターの BamHI site に挿入した。これにより、ミツバチ Melittin のシグナルペプチド配列、接着分子の細胞外領域、ヒト IgG Fc 領域が結合した分泌キメラタンパク質 (以下「Fc キメラタンパク質」ともいう) の発現が可能となる (Journal of Biological Chemistry. 278(30): 28167-28172. 2003.)。

次に、Bac-To-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen 社) を用いて得られた Fc キメラタンパク質発現ベクターから組換え Baculovirus を作製し、昆虫培養細胞 HighFive 株にその組換え baculovirus を感染させ、2 から 3 日間

培養を行った。培養上清中に分泌された Fc キメラタンパク質は、遠心分離により培養上清を回収し、0.22 μ m のフィルターでろ過した後、Protein A sepharose (Amersham Biosciences 社製) によりアフィニティー精製した。このようにして得られたタンパク質を Necl-5-Fc キメラタンパク質とした。

5

実施例 3 抗 Necl-5 抗体の作製

免疫用の抗原の Necl-5-Fc キメラタンパク質 (実施例 2 によって作製) を、TiterMax gold (CytRx Corporation 社製) と混合して WKY/Hos ラット (日本 SLC) に免疫した。免疫したラットからリンパ球を単離して、P3 ミエローマ細胞
10 とリンパ球の比率が 1 : 5 となるように混合し、PEG1500 溶液 (ベーリンガー社製) を用いて細胞融合を行った。HAT 培地 (GIBCO 社製) でハイブリドーマを選択した。得られたハイブリドーマの培養上清を、Necl-5 強制発現 L 細胞 (J. Biol. Chem. 2003; 278(30): 28167-72.) を用いた FMAT (ABI 社製) によりスクリーニングを行った。陽性ウェルからクローニングを行い、1 種類のクローン (1A8-8)
15 を得た (以下、本発明において、当該モノクローナル抗体を「抗 Necl-5 抗体 (1A8-8)」ともいう)。得られた抗 Necl-5 抗体 (1A8-8) を「@mNecl-5:1A8-8」と称して受託番号 : FERM BP- 10018 として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに国際寄託した。ELISA により特異性を検討した結果、抗
20 Necl-5 抗体 (1A8-8) は、Necl-5-AP キメラタンパク質に対してのみ反応し、Nectin-1-AP キメラタンパク質、Nectin-2-AP キメラタンパク質、Nectin-3-AP キメラタンパク質、Necl-1-AP キメラタンパク質、Necl-2-AP キメラタンパク質には反応しなかった。

実施例 4 接着分子 (Nectin-3、CD226) 全長発現細胞の作製

25 接着分子である Nectin-3 および CD226 の全長 cDNA のクローニングは、以下のようにして行った。鋳型には、mouse heart cDNA library (Clontech 社製)、mouse spleen cDNA、mouse small intestine cDNA および活性化リンパ球の cDNA を用いた。それぞれのプライマーは、GenBank の配列 (Nectin-3 (アク

セッション番号:NM_021495)および CD226 (アクセッション番号:AF416980))
をもとに設計し、PCR で増幅した。得られた PCR 産物を、発現ベクター-pMXII
IRES-EGFP(Oncogene. 22;19(27)3050-8.)に挿入した後、293/EBNA-1 細胞株
(Invitrogen 社製) にパッケージングベクター、pCL-Eco (Imgenex 社製) とと
5 もに導入し、組換えレトロウイルスを作製した。得られたウイルス液を B300 細
胞株に感染させ、EGFP 陽性細胞をセルソーティングにより分離することで発現
細胞を得た。ここで得られた細胞を、それぞれ B300/mNectin-3 細胞および
B300/mCD226 細胞とした。293/EBNA-1 細胞株は、10% FCS を含む Dulbecco's
modified Eagle's 培地で、B300 細胞株は、10% FCS および 55 μ M 2-メルカプ
10 トエタノールを含む RPMI-1640 培地で、それぞれ培養した。

実施例 5 抗 Necl-5 抗体による細胞接着抑制作用

Necl-5 は、Nectin-3 および CD226 とヘテロフィリックに結合することが知ら
れている (Journal of Experimental Medicine. 198(4):557-567. 2003.)。そこで、
15 Necl-5 と Nectin-3 および CD226 とのヘテロフィリックな結合を介した細胞接着
に対する抗 Necl-5 抗体 (1A8-8) の効果を調べるため、本実施例を行った。こ
こで、「ヘテロフィリックな結合」とは、異なる細胞接着因子同士の結合をいう。

96 ウェル ELISA プレート (Nunc 社製) に 10 μ g/ml の抗アルカリフォスファ
ターゼ抗体 (Seradyn MIA1802) を 50 μ l ずつ加え、37°C で 30 分間静置して
20 固相化した。PBS でプレートを洗浄した後、ブロックエース (大日本製薬社製)
で非特異的結合部位をブロックした。続いて、実施例 1 で作製した Necl-5-AP キ
メラタンパク質を最終濃度 10 nM になるように希釈してウェルに加え、室温で
30 分間静置し、固相化した。

次に、Necl-5-AP キメラタンパク質を固相化した 96 well プレートに、抗 Necl-5
25 抗体 (1A8-8) または Rat IgG (CHEMICON 社製) (図 1 「コントロール IgG」)
10 μ g/ml を加えた。続いて、B300/mNectin-3 細胞 (B300 細胞にマウス Nectin-3
を発現させたもの) および B300/mCD226 細胞 (B300 細胞にマウス CD226 を発
現させたもの) をバッファー (RPMI 1640、0.5% BSA、20 mM HEPES (pH 7.4))

に懸濁して、Calcein-AM (同仁社製) で蛍光標識した後、1 ウェルあたり 5×10^4 個ずつ加え、37°C で 1 時間反応させた。プレートから非接着細胞を洗浄して除き、細胞溶解液 (10 mM TrisHCl (pH 8.0)、1% TritonX-100) を加えて細胞を溶解した後、Wallac ARVO SX 1420 MULTILABEL COUNTER (Perkin Elmer 社製) を用いて、励起波長 485 nm、検出波長 535 nm でプレートの各ウェルの蛍光を測定し、結合した接着細胞の量を定量した。

その結果、B300/mNectin-3 細胞および B300/mCD226 細胞の Necl-5-AP キメラタンパク質への接着は、抗 Necl-5 抗体 (1A8-8) によって抑制されることが明らかになった (図 1 「抗 Necl-5 抗体」)。以下、この抗 Necl-5 抗体 (1A8-8) を用いて Necl-5 が、癌細胞の増殖、転移にどのように関与しているかを調べた。

実施例 6 Necl-5 の発現解析

様々なマウス癌細胞において、抗 Necl-5 抗体 (1A8-8) を用いて、Necl-5 が、細胞表面に発現しているか否かを調べた。様々なマウス癌細胞 (大腸癌細胞株 CT26 (ATCC 社)、大腸癌細胞株 colon26 (東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センター)、繊維肉腫細胞株 Meth A (RIKEN ジーンバンク・細胞開発銀行)、卵巣腫瘍細胞株 OV2944-HM-1 (RIKEN ジーンバンク・細胞開発銀行)、メラノーマ B16F1 (ATCC 社)) を 96 ウェルプレートに 2×10^5 cells/well になるように調製し、抗 Necl-5 抗体 (1A8-8)、Rat IgG (CHEMICON 社) (図 2 「コントロール IgG」) $10 \mu\text{g/ml}$ を氷上で 30 分反応させ、洗浄後、PE 標識した抗 Rat IgG 抗体 (SEROTEC 社) $2 \mu\text{g/ml}$ を氷上で 30 分反応させ、フローサイトメトリーにて、Necl-5 の発現を調べた。その結果、Necl-5 は、どの癌細胞にも強く発現していることが明らかになった (図 2 「抗 Necl-5 抗体」)。

実施例 7 CT26 マウス大腸癌細胞皮下移植モデルにおける腫瘍増殖に対する抗 Necl-5 抗体の効果

CT26 マウス大腸癌細胞を皮下移植する前日に、抗 Necl-5 抗体 (1A8-8) またはコントロールとして Rat IgG (CHEMICON 社製) それぞれ $500 \mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ を

雌マウス (Balb/c、6 週齢) に尾静脈内投与し、翌日、CT26 マウス大腸癌細胞 1×10^5 cells/匹を背部皮下に移植した。その後、それぞれ 2 日目、5 日目、8 日目、11 日目、13 日目に、事前投与したのと同じ抗体または IgG $500 \mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ を尾静脈内投与した。また、毎日、腫瘍体積 (腫瘍体積は、長径 \times 短径 \times 短径 $/ 2$ の計算式により求めた)、体重を計測した。さらに、14 日目に解剖し、腫瘍体積を計測した。

その結果、Rat IgG、抗 Necl-5 抗体 (1A8-8) を投与しても、いずれも癌細胞接種後および解剖時において腫瘍増殖に対する抗体の効果は認められなかった (図 3 「コントロール IgG」、「抗 Necl-5 抗体」)。これらの知見から、腫瘍の増殖に Necl-5 は関与していないことが考えられた。

実施例 8 CT26 マウス大腸癌細胞の肺転移に対する抗 Necl-5 抗体の効果

CT26 マウス大腸癌細胞を尾静脈内注入する前日に、抗 Necl-5 抗体 (1A8-8) またはコントロールとして Rat IgG (CHEMICON 社製)それぞれ $500 \mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ を雌マウス (Balb/c、6 週齢) に尾静脈内投与し、翌日、CT26 マウス大腸癌細胞 2×10^5 cells/匹を尾静脈内に注入した。その後、それぞれ 3 日目、5 日目、7 日目、12 日目に、事前投与したのと同じ抗体または IgG $500 \mu\text{g}/500 \mu\text{l}$ を尾静脈内投与し、14 日目に解剖して肺組織への転移数を計測した。

その結果、Rat IgG を投与した場合 (図 4 「コントロール IgG」) に比べて、抗 Necl-5 抗体 (1A8-8) を投与した場合 (図 4 「抗 Necl-5 抗体」) に、肺における転移癌細胞の結節は少なく、肺組織への癌細胞転移数 (肺組織における結節数) が減少した (図 4)。この知見により、Necl-5 が癌細胞の肺組織への転移に関与し、抗 Necl-5 抗体を投与することで、肺組織への転移が抑えられることが示された。

実施例 9 Necl-5-full または Necl-5- Δ CP を導入した CT26 マウス大腸癌細胞の作製

抗 Necl-5 抗体の癌細胞の転移に対する効果が、癌細胞に発現している Necl-5

に起因しているのか、あるいは、移植されるマウスが本来有する Necl-5 に起因しているのかを調べるため、Necl-5 を導入した CT26 マウス大腸癌細胞を作製し、肺組織への転移効果を調べた。

ここで、Necl-5-full とは、配列番号：4 に表されるアミノ酸配列のうち 30 番目から 408 番目のアミノ酸からなるタンパク質を表す。また、Necl-5- Δ CP とは、配列番号：4 に表されるアミノ酸配列のうち 30 番目から 374 番目のアミノ酸からなるタンパク質を表す。

(1) pCR4Blunt-TOPO/signal sequence-FLAG-Necl-5 発現プラスミドの作製

10 初めに、配列番号：19 (5' 端に NotI を付加) および配列番号：20 (3' 端に XhoI を付加) 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、マウス cDNA (クロンテック社製) を鋳型として、常法に従って PCR 反応を行い、Necl-5-full を増幅した。得られた PCR 産物を Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing (インビトロジェン社製) を用いて Zero Blunt TOPO ベクター
15 ーに導入し、得られたベクターを NotI および XhoI で消化した後、pFLAG-CMV1 ベクター (Sigma 社製) の NotI-XhoI site に挿入し、pFLAG-CMV1-Necl-5 を得た。

次に、FLAG-tag 付き Necl-5 を他の発現ベクターに組み込むために、作製した pFLAG-CMV1-Necl-5 を鋳型とし、配列番号：21 (5' 端に XhoI を付加) およ
20 び配列番号：22 (3' 端に XhoI を付加) 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、常法に従って PCR 反応を行い増幅した。得られた PCR 産物を Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing (インビトロジェン社製) を用いて導入し、pCR4Blunt-TOPO/signal sequence-FLAG-Necl-5, aa30-409 発現ベクターを作製した。使用したプライマーの塩基配列を以下に示す。

25

配列番号：19 gggcgggccg cgatacgtgt gctggtgcc tac

配列番号：20 gcgctcgagt caccttgtgc tgtttggtc

配列番号：21 ccgactcgag cccacatgt ctgcacttct gatcc

配列番号：2 2 gcgctcgagt caccttgtgc tgtttgctc

(2) Necl-5-full および Necl-5-△CP 発現プラスミドの作製

Necl-5-full および Necl-5-△CP 発現プラスミドの作製は、
5 pCR4Blunt-TOPO/signal sequence-FLAG-Necl-5,aa30-409をテンプレートにして、以下のように行った。

Necl-5-full の PCR 産物の作製については、まず、配列番号：2 3 (5'端に XhoI
を付加) および配列番号：2 4 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライ
マーとして、常法にしたがって PCR 反応を行い、シグナルペプチドおよび FLAG
10 タグを含む断片を増幅した。次に、配列番号：2 5 および配列番号：2 6 (3'端
に NotI を付加) 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、
常法にしたがって PCR 反応を行い、FLAG タグの一部と Necl-5 (aa30-408)の配
列を含む断片を増幅した。これらの断片を混合したものをテンプレートとし、配
列番号：2 3 および配列番号：2 6 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプ
15 ライマーとして、常法にしたがい PCR 反応を行い、シグナル配列、FLAG タグ、
Necl-5-full を含んだ PCR 産物を作製した (Necl-5-full の PCR 産物という)。

Necl-5-full と同様に、Necl-5-△CP の PCR 産物の作製については、配列番号：
2 3 (5'端に XhoI を付加) および配列番号：2 4 記載の配列を有するオリゴヌク
レオチドをプライマーとして、常法にしたがって PCR 反応を行い、シグナルペ
20 プチドと FLAG タグを含む断片を増幅した。次に、配列番号：2 5 および配列番
号：2 7 (3'端に NotI を付加) 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライ
マーとして、常法にしたがって PCR 反応を行い、FLAG タグの一部と Necl-5
(aa30-374)の配列を含む断片を増幅した。これらの断片を混合したものをテンプ
レートとし、配列番号：2 3 および配列番号：2 7 記載の配列を有するオリゴヌ
25 クレオチドをプライマーとして、常法にしたがい PCR 反応を行い、シグナル配
列、FLAG タグ、Necl-5-△CP (aa30-374)を含んだ PCR 産物を作製した (Necl-5
△CP の PCR 産物という)。使用したプライマーの塩基配列を以下に示す。

- 配列番号 : 2 3 gcgcgcggcc gccctgcatc ttcgtatagt gtatagtgc
 配列番号 : 2 4 cagcacacgt atgtcgacct tgtcgtcatc gtctttgtag tc
 配列番号 : 2 5 gatgacgaca aggtcgacat acgtgtgctg gtgccctaca at
 配列番号 : 2 6 gcgggcggcc gtcaccttg tgctgtttgg ct
 5 配列番号 : 2 7 gcgcgcggcc gccctgcatc ttcgtatagt gtatagtgc

一方、発現ベクターを以下のように作製した。

(3) pMX MCS2.2 EGFP-PURO ベクターの作製

- pEGFP-N1 (Clontech 社) を鋳型として、配列番号 : 2 8 および配列番号 : 2
 10 9 記載のオリゴヌクレオチド配列をプライマーとして、常法に従って PCR 反応
 を行い、EGFP をコードする断片を増幅した。また、配列番号 : 3 0 で表された
 配列を有するポリヌクレオチドを鋳型として、配列番号 : 3 1 および配列番号 :
 3 2 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、常法に従って
 PCR 反応を行い、puromycin 耐性カセット (PURO) をコードする断片を増幅した。
 15 それぞれ得られた PCR 産物 (EGFP 部分および PURO 部分) を混合し、PCR 産
 物 (MCS2.2 EGFP-PURO) とした。次に、得られた PCR 産物 (MCS2.2
 EGFP-PURO) を鋳型として配列番号 : 3 3 および配列番号 : 3 2 記載の配列を
 有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、常法に従って PCR 反応を行い
 増幅した。得られた PCR 産物を BamHI と XhoI で消化した後、pMX ベクター
 20 の BamHI-SalI site に挿入し、pMX MCS2.2 EGFP-PURO ベクターを作製した。
 使用したプライマーの塩基配列を以下に示す。

配列番号 : 2 8 gtcgacgaat tcgcggccgc cacgcgttcg cgagccacca tggtagcaa
 gggc

- 25 配列番号 : 2 9 cttgtactcg gtctacttgt acagctcgtc catgcc
 配列番号 : 3 1 gacgagctgt acaagatgac cgagtacaag cccacg
 配列番号 : 3 2 cgccctgagt ggcgcgcctc ctgcaggggg ccctcaggca ccgggcttgc gggt
 配列番号 : 3 3 cgcggatcct aattaattaa ggtttaaact gtcgacgaat tcgcggccgc c

(4) pMX MCS2.2 IRES-PURO ベクターの作製

配列番号：30で表された配列を有するポリヌクレオチドを鋳型として、配列番号：34および配列番号：32記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、常法に従ってPCR反応を行い増幅した。得られたPCR産物(IRES PURO)をNotIおよびSbfIで消化した後、pMX MCS2.2 EGFP-PURO ベクターのNotI-SbfI siteに挿入し、pMX MCS2.2 IRES-PURO ベクターを作製した。

配列番号：34 cgcgcgggccg ccacgcgttc gcgactcgag gtcaattccg ccccccccc ct

10

(5) 次に、常法にしたがい、Necl-5-fullのPCR産物を、pMX MCS2.2 IRES PUROのSall-NotI部位に挿入し、Necl-5 ΔCPのPCR産物を、pMX MCS2.2 IRES PUROのSall-NotI部位に挿入し、それぞれpMX MCS2.2 Necl-5-full IRES PUROおよびpMX MCS2.2 Necl-5-ΔCP IRES PUROを構築した。

15 (6) 次に、発現ベクター(pMX MCS2.2 IRES PURO、pMX MCS2.2 Necl-5-full IRES PUROまたはpMX MCS2.2 Necl-5-ΔCP IRES PURO)をウイルスパッケージングベクターpCL-Eco (Imgenex社製)と共に、TransIT LT1 (Mirus社製)を用いて、293/EBNA-1細胞 (Invitrogen社製)へ導入し、組換えレトロウイルスを作製した。組換えウイルスをCT26マウス癌細胞に感染させ、24時間後に、5~
20 10 μg/mlのpuromycin存在下で培養を開始し、耐性クローンを選択することで、Necl-5-fullおよびNecl-5-ΔCPを安定的に発現するCT26マウス癌細胞を得た。Necl-5の発現は、実施例6と同様の方法で、FLAG抗体、抗Necl-5抗体(1A8-8)を用いてフローサイトメトリーにより調べた。

その結果、ベクターのみを導入したCT26マウス癌細胞(図5「CT26/ベクター」)に比べて、Necl-5-fullまたはNecl-5-ΔCPを導入したCT26マウス癌細胞(図5「CT26/Necl-5-full」または「CT26/Necl-5-ΔCP」)では、細胞表面上でNecl-5の発現が10倍程度上がっていることが確認された(図5下パネル)。また、抗FLAG抗体を用いた発現解析において、ベクターのみを導入したCT26マ

ウス癌細胞では、FLAG の発現が認められず、Necl-5-full または Necl-5- Δ CP を導入した CT26 マウス癌細胞では、抗 Necl-5 抗体 (1A8-8) を用いた発現解析の結果と同程度に FLAG を発現していることが確認された (図 5 上パネル)。CT26 マウス癌細胞において Necl-5 が効率よく導入され、細胞表面上で発現していることが明らかになったので、以下、これらの CT26 マウス癌細胞を用いて、肺組織への転移における Necl-5 の関与を調べた。

実施例 10 Necl-5-full または Necl-5- Δ CP を導入した CT26 マウス大腸癌細胞を用いた、肺転移に対する Necl-5 の効果

10 Necl-5-full または Necl-5- Δ CP を導入した CT26 マウス癌細胞 2×10^5 cells/匹を雌マウス (Balb/c、6 週齢) に尾静脈内注入した。14 日目に解剖して肺組織への転移数を計測した。

その結果、コントロールとして用いたベクターのみを導入した CT26 マウス癌細胞 (図 6、7 「CT26/ベクター」) に比べて、Necl-5-full または Necl-5- Δ CP を導入した CT26 マウス癌細胞では、肺組織への転移数が増えていることが明らかになった (図 6、図 7 「CT26/ Necl-5-full」、「CT26/ Necl-5- Δ CP」)。この知見により、癌細胞の Necl-5 が肺組織への転移機能に重要であることが示された。また、Necl-5 の細胞外領域が転移に重要であることが示された。そして、抗 Necl-5 抗体は、癌細胞の Necl-5 に作用することにより、肺組織への転移を抑制していることが示された。

参考例 1 pcDNA3.1(+)-SEAP(His)₁₀-Neo ベクターの作製

pcDNA3.1(+)-SEAP(His)₁₀-Neo ベクターの改変は、以下のとおり行った。pcDNA3.1 (+) -Neo ベクター (CLONTECH 社製) を SalI で消化した後、平滑化を行うことにより SalI 部位を欠損させた。次に、SEAP (His)₁₀ の cDNA 断片を得るため、pDREF-SEAP (His)₆-Hyg (J. Biol. Chem., 1996, 271, 21514-21521) を鋳型として、配列番号 : 35 (5'端に HindIII を付加) および配列番号 : 36 (3'端に XhoI を付加) 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとし

て、常法にしたがって PCR 反応を行い増幅した。得られた PCR 産物を HindIII および XhoI で消化した後、SalI サイトを欠損させた pcDNA3.1 (+)-Neo ベクターに挿入し、pcDNA3.1(+)-SEAP(His)₁₀-Neo ベクターを得た。

5 配列番号 : 3 5 CGC AAG CTT GGA TCC GTC GAC CTG CAG GCG GCC
GCC ATC ATC CCA GTT GAG GAG GAG AAC

配列番号 : 3 6 CGC CTC GAG TCA GTG ATG GTG ATG GTG ATG GTG ATG
GTG ATG ACC CGG GTG CGC GGC GTC GGT

10 実施例 1 1 hNecl-5 および CD226 の細胞外領域とアルカリフォスファターゼのキメラタンパク質の作製

Necl-5 (GenBank アクセッション番号 : NM_006505) の細胞外領域をコードする cDNA を得るために、それぞれ配列番号 : 3 7 (5' 端に SalI を付加) および配列番号 : 3 8 (3' 端に NotI を付加) 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、ヒト cDNA (クロンテック社製) を鋳型として、常法に従い PCR で増幅した。また、CD226 (GenBank アクセッション番号 : AF416980) の細胞外領域をコードする cDNA を得るために、それぞれ配列番号 : 3 9 (5' 端に SalI を付加) および配列番号 : 4 0 (3' 端に NotI を付加) 記載の配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、マウス cDNA (クロンテック社製) を鋳型として、常法に従い PCR で増幅した。得られた PCR 産物を SalI および NotI で消化した後、pcDNA3.1(+)-SEAP(His)₁₀-Neo ベクターの SalI-NotI サイトに挿入した。これにより、接着分子の細胞外領域と分泌型ヒト胎盤性アルカリフォスファターゼとが 3 個のアラニンからなるアミノ酸リンカーで結合され、さらに C 末端に 10 個のヒスチジンタグ(His)₁₀ のついた分泌キメラタンパク質(以下「AP キメラタンパク質」と称する場合がある) の発現が可能となる。

得られた AP キメラタンパク質発現ベクターを、TransIT LT1 (TAKARA 社製) を用いて 293/EBNA-1 細胞株へ導入し、4 から 5 日間培養を行った。培養上清中に分泌された AP キメラタンパク質は、遠心分離により培養上清を回収し、0.22

μm のフィルターでろ過した後、Hepes (pH 7.4) とアジ化ナトリウムをそれぞれ最終濃度が 20 mM および 0.02% となるように加えて 4°C で保存した。AP キメラタンパク質の濃度は、the Great EscApe detection kit (CLONTECH 社製) を用いて、マニュアルにしたがい、アルカリフォスファターゼ活性を測定し算出した。

- 5 このようにして得られたタンパク質をそれぞれ hNecl-5-AP キメラタンパク質、CD226-AP キメラタンパク質とした。

配列番号 37 : CGC GTC GAC GCC ACC ATG GCC CGA GCC ATG GCC G

配列番号 38 : GCG GGC GGC CGC GTT ACG GGA TAT GCC TGA GTG

- 10 配列番号 39 : CGC GTC GAC GCC ACC ATG GCT TAT GTT ACT TGG CTT
TTG G

配列番号 40 : GCG GGC GGC CGC ATG TTT ATT GGT TCC ACC ATC AGT T

実施例 12 抗 CD226 抗体の作製

- 15 免疫用の抗原として用いるために、CD226-AP キメラタンパク質 (実施例 11 によって作製) の精製を行った。精製は、AP キメラタンパク質の C 末端に存在するヒスチジンタグを利用して、His Trap Kit (Amersham Biosciences 社製) を用いて行った。CD226-AP キメラタンパク質を含む培養上清を 1 ml の HiTrap chelating HP カラム (Amersham Biosciences 社製) に添加し、10 mM imidazol
- 20 溶液で洗浄した後、500 mM imidazol 溶液で CD226-AP キメラタンパク質をカラムから溶出した。CD226-AP キメラタンパク質の濃度は、the Great EscApe detection kit (CLONTECH 社製) を用いた酵素活性測定と Protein Assay kit II (BIO-RAD 社製) を用いたタンパク定量により算出した。

- 得られた CD226-AP キメラタンパク質は、TiterMax と混合して WKY ラット
- 25 に免疫した。免疫したラットからリンパ球を単離して、P3 ミエローマ細胞とリンパ球との比率が 1 : 5 となるように混合し、PEG1500 溶液 (ベーリンガー社製) を用いて細胞融合を行った。HAT 培地 (GIBCO BRL 社製) でハイブリドーマを選択し、得られたハイブリドーマの培養上清で、CD226-Fc キメラタンパク質を

用いたサンドイッチ ELISA によるスクリーニングを行った。陽性ウエルからクローニングを行い、クローンを得た。フローサイトメトリー (BECTON DICKINSON 社製) により特異性を検討した結果、得られたクローンは B300/mCD226 細胞に対して反応し、親株の B300 細胞には反応しなかった。

5

実施例 1 3 ヒト接着分子 (hNectin-3、hCD226 および hCD96) 全長発現細胞の作製

ヒト接着分子 (hNectin-3、hCD226 および hCD96) の全長 cDNA のクローニングは、以下のように行った。鋳型には、human total RNA の spleen、testis、
10 thymus (CLONTECH 社製) を用いた。それぞれのプライマーは、GenBank の配列 Nectin-3 (アクセッション番号: NM_015480)、CD226 (アクセッション番号: NM_006566)、CD96 (アクセッション番号: NM_005816) をもとに設計し、PCR で増幅した。得られた PCR 産物を、発現ベクター pMX MCS2.2 IRES-PURO ベクターに挿入した後、293/EBNA-1 細胞株 (Invitrogen 社製) に
15 パッケージングベクター、pCL-Eco (Imgenex 社製) とともに導入し、組換えレトロウイルスを作製した。得られたウイルス液を B300 細胞株に感染させ、24 時間後に、5 μ g/ml の puromycin 存在下で培養を開始した。ここで得られた耐性細胞を、それぞれ B300/hNectin-3 細胞、B300/hCD226 細胞および B300/hCD96 細胞とした。293/EBNA-1 細胞株は、10% FCS を含む Dulbecco's modified
20 Eagle's 培地で、B300 細胞株は、10% FCS および 55 μ M 2-メルカプトエタノールを含む RPMI-1640 培地で、それぞれ培養した。

実施例 1 4 抗 hNecl-5 抗体 (抗 PVR 抗体) による細胞接着抑制作用

Necl-5 (PVR/CD155) は、Nectin-3 (J. Biol.Chem.203;278(30):28167-72.)、
25 CD226/DNAM-1 (J. Exp. Med. 2003;198(4):557-67.) および CD96(Tactile) (J. Immunol. 2004;172(7):3994-8.) とヘテロフィリックに結合することが知られている。そこで、Necl-5 と Nectin-3、CD226 および CD96 とのヘテロフィリックな結合を介した細胞接着に対する抗ヒト Necl-5 抗体 (抗 hNecl-5 抗体) (抗 PVR

抗体 (LAB VISION 社) の効果を調べるため、以下の実験を行った。

96 ウェル ELISA プレート (Nunc 社製) に $10 \mu\text{g/ml}$ の抗アルカリフォスファターゼ抗体 (Seradyn MIA1802) を $50 \mu\text{l}$ ずつ加え、 37°C で 30 分間静置して固相化した。PBS で洗浄した後、ブロックエース (大日本製薬社製) で非特異的結合部位をブロックした。続いて、実施例 11 により作製した hNecl-5-AP キメラタンパク質を最終濃度 10 nM になるように希釈してウェルに加え、室温で 30 分間静置し、固相化した。

次に、hNecl-5-AP キメラタンパク質 (図 8 「hNecl-5-AP」) を固相化した 96 well プレートに、抗 hNecl-5 抗体またはマウス IgG1 (eBioscience 社製) $10 \mu\text{g/ml}$ を加えた。続いて、B300/hNectin-3 細胞、B300/hCD226 細胞および B300/hCD96 細胞をバッファー (RPMI 1640、0.5% BSA、20 mM HEPES (pH 7.4)) に懸濁して、Calcein-AM (同仁社製) で蛍光標識した後、1 ウェルあたり 5×10^4 個ずつ加え、 37°C で 1 時間反応させた。プレートから非接着細胞を洗浄して除き、細胞溶解液 (10 mM TrisHCl (pH 8.0)、1% TritonX-100) を加えて細胞を溶解した後、Wallac ARVO SX 1420 MULTILABEL COUNTER (Perkin Elmer 社製) を用いて、励起波長 485 nm、検出波長 535 nm で測定し、接着細胞を定量した。

その結果、B300/hNectin-3 細胞、B300/hCD226 細胞および B300/hCD96 細胞の hNecl-5-AP キメラタンパク質への接着は、抗 hNecl-5 抗体によって抑制されることが明らかになった (図 8)。

実施例 15 CT26 マウス大腸癌細胞の肺転移に対する抗 Necl-5 抗体の効果

CT26 マウス大腸癌細胞 ($2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$) に、抗 Necl-5 抗体 (1A8-8) またはコントロールとして Rat IgG (CHEMICON 社製) それぞれ 1 mg/ml (1 ml) を氷上で 15 分反応させ、PBS で 2 回細胞を洗浄後、雌マウス (Balb/c、6 週齢) に細胞 $4 \times 10^5 \text{ cells}/200 \mu\text{l}$ 匹で尾静脈内に注入した。その後、14 日目に解剖して肺組織への転移数を計測した。

その結果、Rat IgG で処理した場合に比べて、抗 Necl-5 抗体 (1A8-8) で処理

した場合に、肺組織への癌細胞転移数が減少した（図9「抗Necl-5抗体」）。

この知見により、癌細胞のNecl-5が、癌細胞の肺組織への転移に関与し、抗Necl-5抗体により癌細胞のNecl-5の接着を阻害することで、肺組織への転移が抑えられることが確認された。

5

実施例16 Necl-5-fullまたはNecl-5- Δ CPを導入したOV2944-HM-1マウス卵巣腫瘍細胞の作製

実施例9で作製した組換えレトロウイルスをOV2944-HM-1マウス卵巣腫瘍細胞に感染させ、24時間後に、5~10 μ g/mlのpuromycin存在下で培養を開始し、
10 耐性クローンを選択することで、Necl-5-fullおよびNecl-5- Δ CPを安定的に発現するOV2944-HM-1マウス卵巣腫瘍細胞を得た。

実施例17 Necl-5-fullまたはNecl-5- Δ CPを導入したOV2944-HM-1マウス卵巣腫瘍細胞を用いた、肺転移に対するNecl-5の効果

15 Necl-5-fullまたはNecl-5- Δ CPを導入したOV2944-HM-1マウス卵巣腫瘍細胞4 x 10⁵ cells/匹を雌マウス（B6C3F1、6週齢）に尾静脈内注入した。14日目に解剖して肺組織への転移数を計測した。

その結果、コントロールとして用いたベクターのみを導入したOV2944-HM-1マウス卵巣腫瘍細胞に比べて、Necl-5-fullを導入したOV2944-HM-1マウス卵巣腫瘍細胞では、肺組織への転移数が増えていることが明らかになった（図10「OVHM/Necl-5-full」）。この知見により、癌細胞のNecl-5が肺組織への転移機能に重要であることが示された。一方、Necl-5- Δ CPを導入したOV2944-HM-1マウス卵巣腫瘍細胞（図10「OVHM/Necl-5- Δ CP」）では、ベクターのみを導入したOV2944-HM-1マウス卵巣腫瘍細胞（図10「OVHM/ベクター」）に比べて、
20 肺組織への転移数は増えているが、Necl-5-fullを導入したOV2944-HM-1マウス卵巣腫瘍細胞（図10「OVHM/Necl-5-full」）ほど、顕著な肺転移の増加は見られなかった。実施例10における、Necl-5- Δ CPを導入したCT26マウス大腸癌細胞を用いた、肺転移に対するNecl-5の効果と、本実施例におけるNecl-5-
25

△CP の効果とをあわせて考えると、用いた細胞種の違いによって Necl-5-△CP の肺転移に対する効果に影響を及ぼす可能性があるといえる。しかしながら、OVHM/Necl-5-△CP においても、OVHM/ベクターに比べ、肺転移が増加したことには変わりがないため、Necl-5 が癌細胞の肺転移に重要であることが示唆された。

実施例 18 各種発現ベクターを導入した CT26 マウス大腸癌細胞を用いた、経尾静脈注入 24 時間後の肺転移に対する Necl-5 の効果

実施例 9 で得られた Necl-5-full または Necl-5-△CP を導入した CT26 マウス癌細胞 1×10^7 cells/ml を 37°C に温めた PBS に懸濁して、CFDA SE Cell Tracer Kit (Molecular Probes 社製) を最終濃度 $1 \mu\text{M}$ で CFSE 蛍光ラベルした。そして、細胞を 1×10^6 cells/ml になるように PBS に懸濁し、400 μl を雌マウス (Balb/c、6 週齢) に尾静脈内注入した。24 時間後に解剖してラベルされた細胞の肺組織への転移数を MetaMorph (Molecular Devices 社) を用いて計測した。

その結果、Necl-5-full を導入した CT26 マウス癌細胞では、肺組織への転移数が増えていることが明らかになった (図 11 「CT26/Necl-5-full」)。この知見により、癌細胞の Necl-5 が肺組織への転移の初期の段階にも重要であることが示された。

実施例 19 CT26 マウス大腸癌細胞と血小板との相互作用

実施例 18 で作製した肺組織について、抗 CD226 抗体および抗 CD41 抗体 (BD PharMingen 社製) を用いて、免疫蛍光染色を行った。

その結果、CT26 マウス大腸癌細胞を取り囲むように、CD226 および CD41 の双方を発現している細胞が存在していた (図 12 「マージ」)。図 12 の横棒は、 $10 \mu\text{m}$ を示す。CD41 は、血小板のマーカーであることが広く知られている。この知見により、CT26 マウス大腸癌細胞の Necl-5 と血小板の CD226 が接着することで、肺転移に重要であることが考えられた。

実施例 20 抗 Nectin-2 抗体による細胞接着抑制作用

CD226(DNAM-1)は、Necl-5 以外に Nectin-2 (CD112) に結合することが報告されている (J. Exp. Med. 2003;198(4):557-67.)。また、さまざまな癌種で Nectin-2 が発現していることが知られている (J. Exp. Med. 2003;198(4):557-67.)。そこで、Nectin-2 と CD226 との結合を介した細胞接着に対する抗 Nectin-2 抗体の効果を調べるため、以下の実験を行った。

96 ウェル ELISA プレート (Nunc 社製) に $10 \mu\text{g/ml}$ の抗アルカリフォスファターゼ抗体 (Seradyn MIA1802) を $50 \mu\text{l}$ ずつ加え、 37°C で 30 分間静置して固相化した。PBS で洗浄した後、ブロックエース (大日本製薬) で非特異的結合部位をブロックした。実施例 1 で作製した Nectin-2-AP キメラタンパク質を最終濃度 10 nM になるように希釈してウェルに加え、室温で 30 分間静置し、固相化した。

次に、Nectin-2-AP キメラタンパク質 (図 1 3 「mNectin-2 AP」) を固相化した 96 well プレートに、抗 Nectin-2 抗体 $10 \mu\text{g/ml}$ を加えた。続いて、B300/mCD226 細胞をバッファー (RPMI 1640、0.5% BSA、20 mM HEPES (pH 7.4)) に懸濁して、Calcein-AM (同仁社製) で蛍光標識した後、1 ウェルあたり 5×10^4 個ずつ加え、 37°C で 1 時間反応させた。非接着細胞を洗浄して除き、細胞溶解液 (10 mM TrisHCl (pH 8.0)、1% TritonX-100) を加えて溶解した後、Wallac ARVO SX 1420 MULTILABEL COUNTER (Perkin Elmer 社製) を用いて、励起波長 485 nm 、検出波長 535 nm で測定し、接着細胞を定量した。

その結果、B300/mCD226 細胞の Nectin-2-AP キメラタンパク質への接着は、抗 Nectin-2 抗体によって抑制されることが明らかになった (図 1 3 「抗 Nectin-2 抗体」)。

実施例 21 抗 Necl-5 抗体または抗 Nectin-2 抗体が、CD226-AP キメラタンパク質の CT26 マウス大腸癌細胞への結合を抑制する効果

抗 Necl-5 抗体または抗 Nectin-2 抗体が、CD226-AP キメラタンパク質の CT26 マウス大腸癌細胞への結合を抑制するか否かを検討した。CT26 マウス大腸癌細

胞を 96 well プレートに 2×10^5 cells/well になるように加えた。次に、抗 Necl-5 抗体 (1A8-8)、抗 Nectin-2 抗体または Rat IgG (CHEMICON 社製) $20 \mu\text{g/ml}$ を加え、氷上で 30 分反応させた。洗浄後、CD226-AP キメラタンパク質 $30 \mu\text{g/ml}$ を氷上で 30 分反応させた。洗浄後、抗アルカリフォスファターゼ抗体 (Placental Alkaline Phosphatase、biomeda 社) $1 \mu\text{g/ml}$ を氷上で 30 分反応させた。洗浄後、Cy5 標識した抗 Rabbit IgG 抗体 (Jackson 社) $1.5 \mu\text{g/ml}$ を氷上で 30 分反応させた。その後、フローサイトメトリー (BECTON DICKINSON 社製) にて、CT26 マウス大腸癌細胞に結合した CD226-AP キメラタンパク質の量を測定した。

10 結果を図 1 4 に示す。図 1 4 で塗りつぶしたピークは AP キメラタンパク質 (コントロール) を示し、白抜きのピークは CD226-AP キメラタンパク質を示す。その結果、抗 Necl-5 抗体 (1A8-8) は、CT26 マウス大腸癌細胞の CD226-AP キメラタンパク質への結合を抑制した (図 1 4 「抗 Necl-5 抗体」)。一方、抗 Nectin-2 抗体は、CT26 マウス大腸癌細胞の CD226-AP キメラタンパク質への結合を抑制しなかった (図 1 4 「抗 Nectin-2 抗体」)。また、抗 Necl-5 抗体 (1A8-8) による CT26 マウス大腸癌細胞の CD226-AP キメラタンパク質への結合の抑制効果は、抗 Nectin-2 抗体を加えても増強されなかった。よって、CT26 マウス大腸癌細胞の CD226-AP キメラタンパク質への結合には主に Necl-5 が関与していることが明らかになった (図 1 4)。

20 以上の結果から、癌細胞における Necl-5 は、血小板上の CD226 と結合することにより、癌細胞の転移を引き起こすと考えられ、抗 Necl-5 抗体は、癌治療剤として有用であることが強く示唆された。

実施例 2 2 抗 Necl-5 抗体による CT26 マウス大腸癌細胞と血小板との細胞

25 胞接着抑制作用

(1) 洗浄血小板の調製

Balb/c、雌マウスをジエチルエーテル (WAKO 社) 麻酔下で開腹し、採血用注射器にあらかじめ抗凝固剤 3.8%クエン酸ナトリウム (BD Biosciences 社) 1 vol.

を入れておき、腹部大静脈より 9 vol. の血液を採血した。採血後、室温、230 g で 7 分遠心し、血漿および血小板層を含む上清を回収した。回収した上清を室温で 1800 g で 10 分遠心し、上清を除き、沈査を 15% ACD-A (テルモ社)/HBSS 液にて 2 回遠心洗浄した後、15% ACD-A/HBSS 液にて懸濁した (これを「洗浄血小板」とした)。そして、フローサイトメトリー (BECTON DICKINSON 社製) にて、血小板数を測定した。

(2) 血小板を固相化したプレートの調製

96 ウェル ELISA プレート (Nunc 社製) に 1 ウェルあたり 3×10^5 個の洗浄血小板を加え、37°C で 1 時間静置した。そして、HBSS 液で洗浄した後、ブロッケー (大日本製薬) で非特異的結合部位をブロックした。

(3) 細胞の調製

CT26 マウス大腸癌細胞を 0.5% BSA を含む HBSS 液に懸濁した後、Calcein-AM (同仁社製) で蛍光標識した。次に、抗 CD16/CD32 抗体 (PharMingen 社製) 10 μ g/ml を加え 37°C で 10 分反応させた。その後、抗 Necl-5 抗体 (1A8-8) または Rat IgG (CHEMICON 社製) 10 μ g/ml を加え、37°C で 30 分反応させた。

(4) 細胞接着アッセイ

次に、前記血小板を固相化したプレートに、調製した CT26 マウス大腸癌細胞を 37°C で 1 時間反応させた。次に、非接着細胞を洗浄して除き、Wallac ARVO SX 1420 MULTILABEL COUNTER (Perkin Elmer 社製) を用いて、励起波長 485 nm、検出波長 535 nm で測定し、接着細胞を定量した。

その結果、Rat IgG で処理した細胞 (図 1 5 「ラット IgG」) に比べて、抗 Necl-5 抗体 (1A8-8) で処理した細胞 (図 1 5 「抗 Necl-5 抗体」) では、血小板との接着が抑制されることが明らかとなった (図 1 5)。

以上の結果から、癌細胞における Necl-5 は、血小板上の CD226 と結合することにより、癌細胞の転移を引き起こすと考えられる。したがって、癌細胞上の Necl-5 の血小板への接着を抑制する本発明の抗 Necl-5 抗体は、癌治療剤、特に癌転移抑制剤として有用であることが強く示唆された。

産業上の利用可能性

本発明により、癌転移を抑制する癌治療剤としての抗 Necl-5 抗体の有効性が確認され、当該治療剤を用いて癌患者の生活の質を向上させることが可能となった。

5 配列表フリーテキスト

配列番号 1 : ヒト Necl-5 の塩基配列 (GenBank アクセッション番号 : NM_006505)

配列番号 2 : ヒト Necl-5 のアミノ酸配列 (GenBank アクセッション番号 : NM_006505)

10 配列番号 3 : マウス Necl-5 の塩基配列 (GenBank アクセッション番号 : NM_027514)

配列番号 4 : マウス Necl-5 のアミノ酸配列 (GenBank アクセッション番号 : NM_027514)

配列番号 5 : プライマー

15 配列番号 6 : プライマー

配列番号 7 : プライマー

配列番号 8 : プライマー

配列番号 9 : プライマー

配列番号 10 : プライマー

20 配列番号 11 : プライマー

配列番号 12 : プライマー

配列番号 13 : プライマー

配列番号 14 : プライマー

配列番号 15 : プライマー

25 配列番号 16 : プライマー

配列番号 17 : プライマー

配列番号 18 : プライマー

配列番号 19 : プライマー

- 配列番号 20 : プライマー
- 配列番号 21 : プライマー
- 配列番号 22 : プライマー
- 配列番号 23 : プライマー
- 5 配列番号 24 : プライマー
- 配列番号 25 : プライマー
- 配列番号 26 : プライマー
- 配列番号 27 : プライマー
- 配列番号 28 : プライマー
- 10 配列番号 29 : プライマー
- 配列番号 30 : IRES-Puro
- 配列番号 31 : プライマー
- 配列番号 32 : プライマー
- 配列番号 33 : プライマー
- 15 配列番号 34 : プライマー
- 配列番号 35 : プライマー
- 配列番号 36 : プライマー
- 配列番号 37 : プライマー
- 配列番号 38 : プライマー
- 20 配列番号 39 : プライマー
- 配列番号 40 : プライマー

請求の範囲

1. Necl-5 と、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つとの結合を抑制する中和活性を有する抗 Necl-5 抗体を有効成分として含む癌治療剤。
5
2. 抗 Necl-5 抗体が、以下の (a) もしくは (b) のタンパク質またはその部分断片と親和性を有する抗体である、請求項 1 に記載の癌治療剤。
(a) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列を含むタンパク質
(b) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列において1 もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、
10 CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
3. 抗 Necl-5 抗体が、以下の (a) もしくは (b) のタンパク質またはその部分断片と親和性を有する抗体である、請求項 1 に記載の癌治療剤。
15 (a) 配列番号：1 記載の塩基配列のうち、1 7 2 番目から1 4 2 5 番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質
(b) 配列番号：1 記載の塩基配列のうち、1 7 2 番目から1 4 2 5 番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
20
4. 抗 Necl-5 抗体が、以下の (a) もしくは (b) のタンパク質またはその部分断片と親和性を有する抗体である、請求項 1 に記載の癌治療剤。
25 (a) 配列番号：4 記載のアミノ酸配列を含むタンパク質
(b) 配列番号：4 記載のアミノ酸配列において1 もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する

親和性を有するタンパク質

5. 抗 Necl-5 抗体が、以下の (a) もしくは (b) のタンパク質またはその部分断片と親和性を有する抗体である、請求項 1 に記載の癌治療剤。

5 (a) 配列番号：3 記載の塩基配列のうち、73 番目から 1299 番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質

10 (b) 配列番号：3 記載の塩基配列のうち、73 番目から 1299 番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つに対する親和性を有するタンパク質

6. 部分断片が、以下の (a) または (b) のタンパク質である、請求項 2 に記載の癌治療剤。

15 (a) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列のうち、29 番目から 344 番目のアミノ酸配列を含むタンパク質

20 (b) 配列番号：2 記載のアミノ酸配列のうち、29 番目から 344 番目のアミノ酸配列において 1 もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つに対する親和性を有するタンパク質

7. 部分断片が、以下の (a) または (b) のタンパク質である、請求項 3 に記載の癌治療剤。

25 (a) 配列番号：1 記載の塩基配列のうち、256 番目から 1203 番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質

(b) 配列番号：1 記載の塩基配列のうち、256 番目から 1203 番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つに対する親和性を有するタンパク質

よび CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つに対する親和性を有するタンパク質

8. 部分断片が、以下の部分断片が、以下の (a) または (b) のタンパク質である、請求項 4 に記載の癌治療剤。

5 (a) 配列番号：4 記載のアミノ酸配列のうち、30 番目から 347 番目のアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号：4 記載のアミノ酸配列のうち、30 番目から 347 番目のアミノ酸配列において 1 もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つに対する親和性を有するタンパク質

10

9. 部分断片が、以下の (a) または (b) のタンパク質である、請求項 5 に記載の癌治療剤。

(a) 配列番号：3 記載の塩基配列のうち、160 番目から 1113 番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質

15

(b) 配列番号：3 記載の塩基配列のうち、160 番目から 1113 番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも 1 つに対する親和性を有するタンパク質

20

10. 抗 Necl-5 抗体が、抗 Necl-5 モノクローナル抗体である、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の癌治療剤。

11. 抗 Necl-5 モノクローナル抗体が、受託番号 FERM BP-10018 であるハイブリドーマから生成されるものである、請求項 10 に記載の癌治療剤。

25

12. 癌治療剤が、癌転移抑制剤である、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の癌治療剤。

13. 癌が、脳腫瘍、頸癌、食道癌、舌癌、肺癌、乳癌、膵臓癌、胃癌、大腸癌、小腸または十二指腸の癌、結腸癌、直腸癌、膀胱癌、腎癌、肝癌、前立腺

癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫、リンパ腫、白血病およびメラノーマからなる群から選択される少なくとも1つである、請求項1～12のいずれか1項に記載の癌治療剤。

14. 癌が、大腸癌、卵巣癌、肉腫およびメラノーマからなる群から選択される少なくとも1つである、請求項13に記載の癌治療剤。

15. 癌が大腸癌である、請求項13に記載の癌治療剤。

16. 癌が、以下の(a)～(p)からなる群から選択される少なくとも1つのタンパク質を発現している細胞を含むことを特徴とする、請求項1～15のいずれか1項に記載の癌治療剤。

10 (a) 配列番号：2記載のアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号：2記載のアミノ酸配列において1または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226およびCD96からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質

15 (c) 配列番号：1記載の塩基配列のうち、172番目から1425番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質

(d) 配列番号：1記載の塩基配列のうち、172番目から1425番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226およびCD96からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質

(e) 配列番号：4記載のアミノ酸配列を含むタンパク質

25 (f) 配列番号：4記載のアミノ酸配列において1または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226およびCD96からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質

(g) 配列番号：3記載の塩基配列のうち、73番目から1299番目の塩基配

列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質

- 5 (h) 配列番号：3記載の塩基配列のうち、73番目から1299番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96
- 10 (i) 配列番号：2記載のアミノ酸配列のうち、29番目から344番目のアミノ酸配列を含むタンパク質
- (j) 配列番号：2記載のアミノ酸配列のうち、29番目から344番目のアミノ酸配列において1または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
- 15 (k) 配列番号：1記載の塩基配列のうち、256番目から1203番目の塩基配列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質
- (l) 配列番号：1記載の塩基配列のうち、256番目から1203番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96
- 20 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
- (m) 配列番号：4記載のアミノ酸配列のうち、30番目から347番目のアミノ酸配列を含むタンパク質
- (n) 配列番号：4記載のアミノ酸配列のうち、30番目から347番目のアミノ酸配列において1または複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から
- 25 選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
- (o) 配列番号：3記載の塩基配列のうち、160番目から1113番目の塩基配

列を含むポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質

- (p) 配列番号：3記載の塩基配列のうち、160番目から1113番目の塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドにストリンジентな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含み、かつ、Nectin-3、CD226 および CD96 からなる群から選択される少なくとも1つに対する親和性を有するタンパク質
- 5
17. 癌治療剤を製造するための請求項1～11のいずれか1項に記載の抗 Necl-5 抗体の使用。
- 10 18. 癌治療剤が、癌転移抑制剤である、請求項17に記載の使用。
19. 請求項1～16のいずれか1項に記載の癌治療剤を患者に有効量投与することを特徴とする癌治療方法。
20. 癌治療方法が、癌転移抑制方法である、請求項19に記載の方法。

図 1

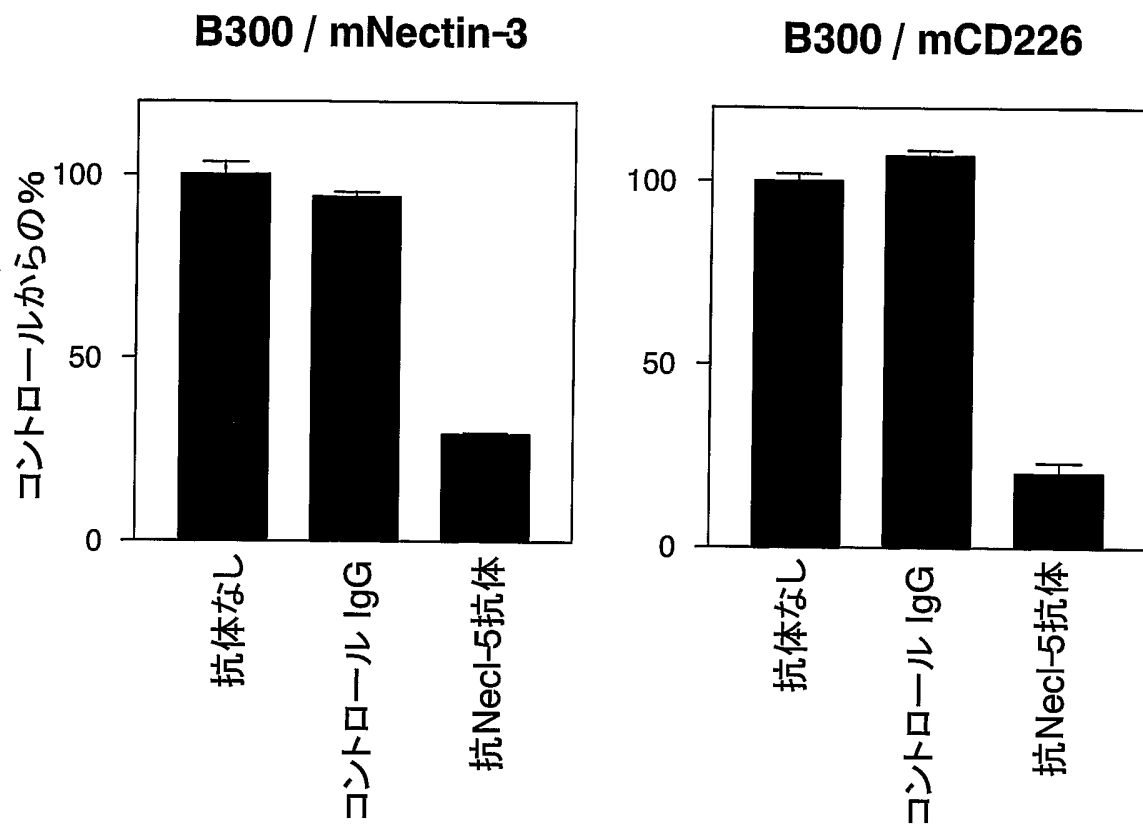


図 2

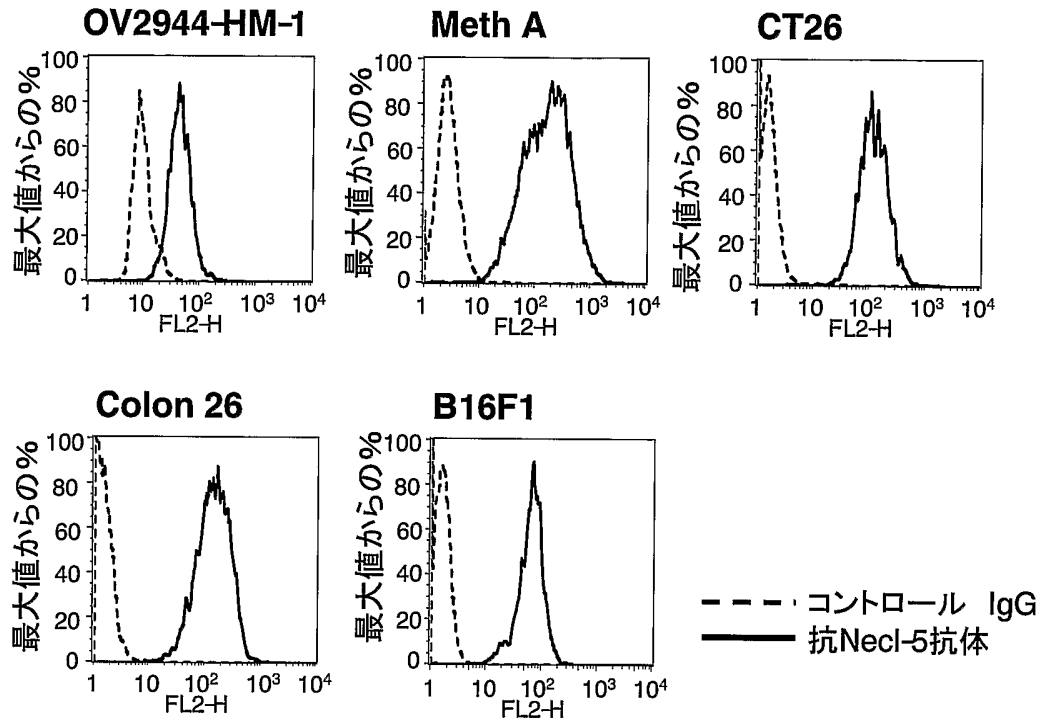


図 3

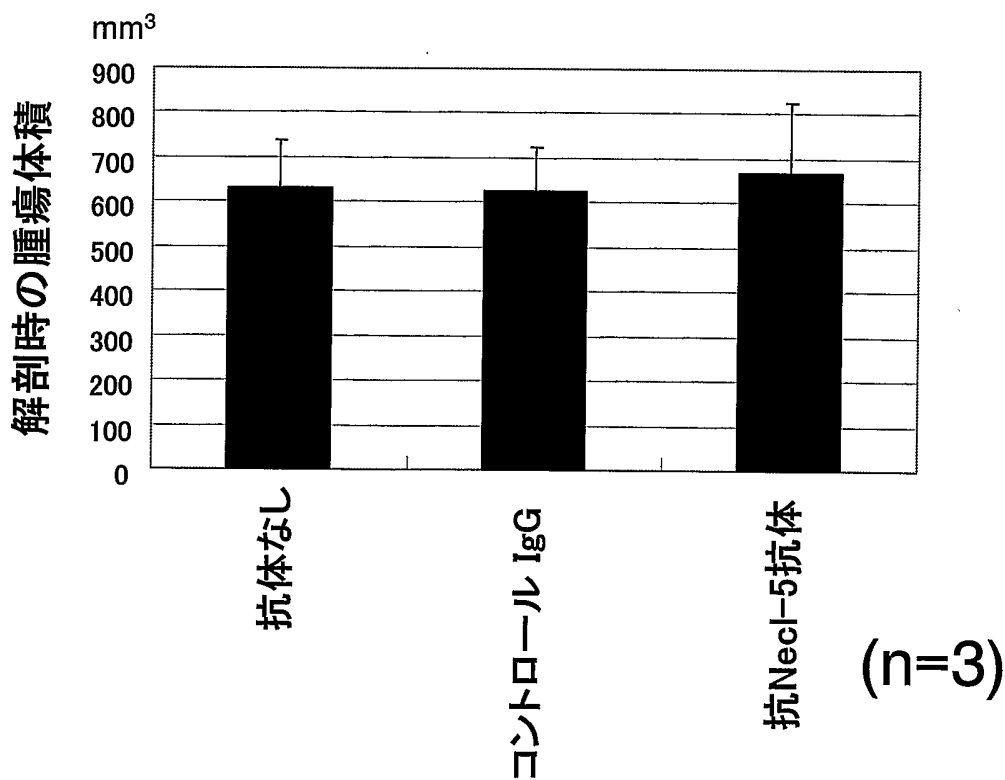
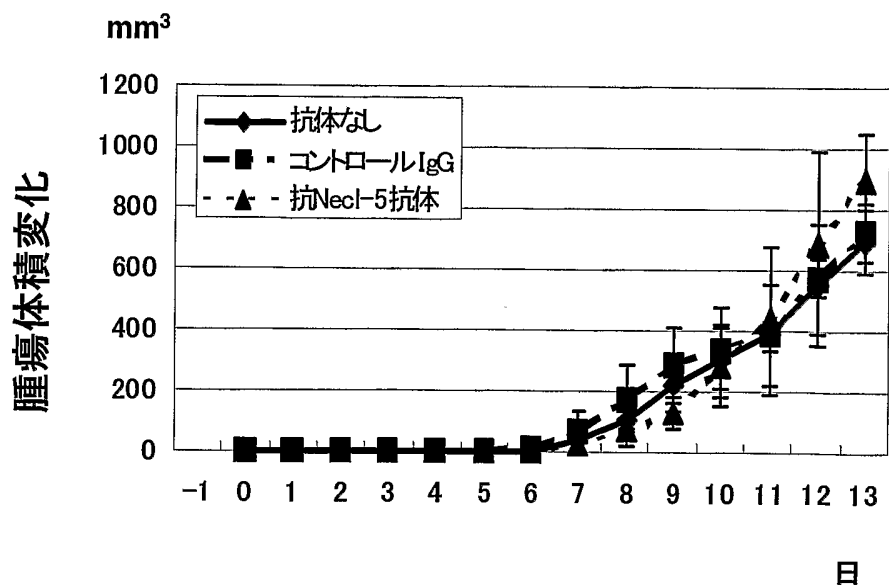


図 4

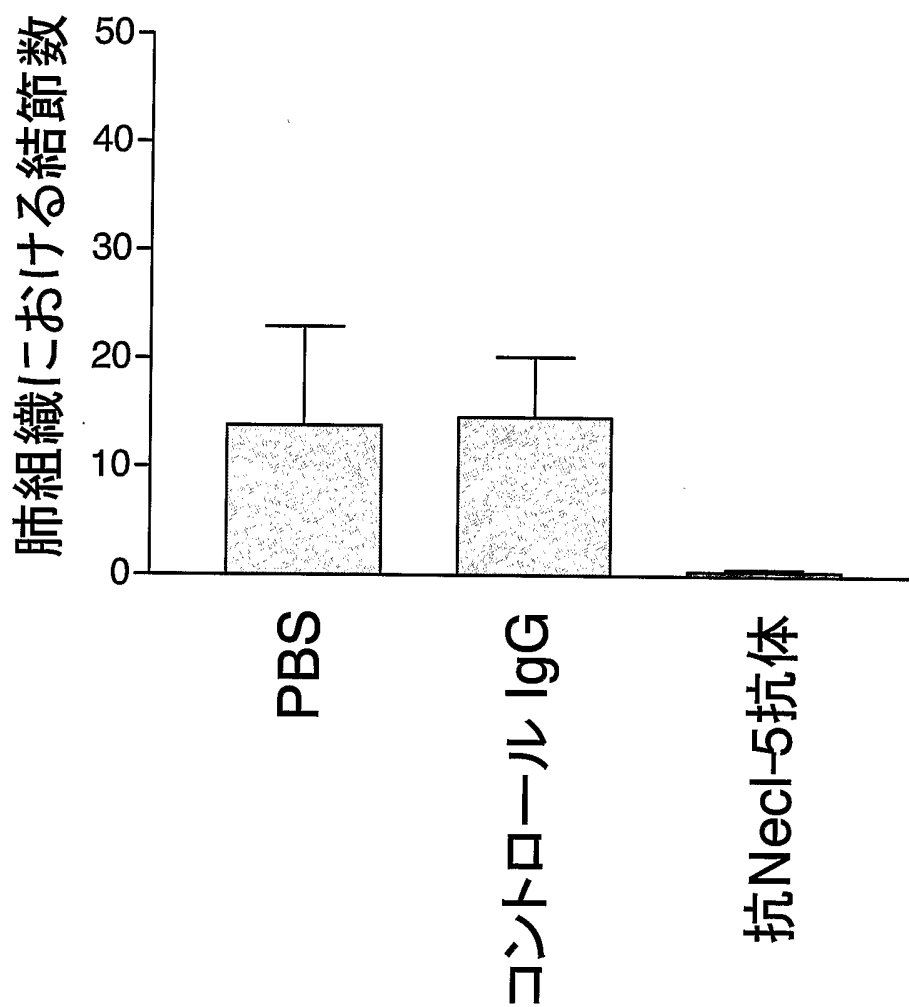


図 5

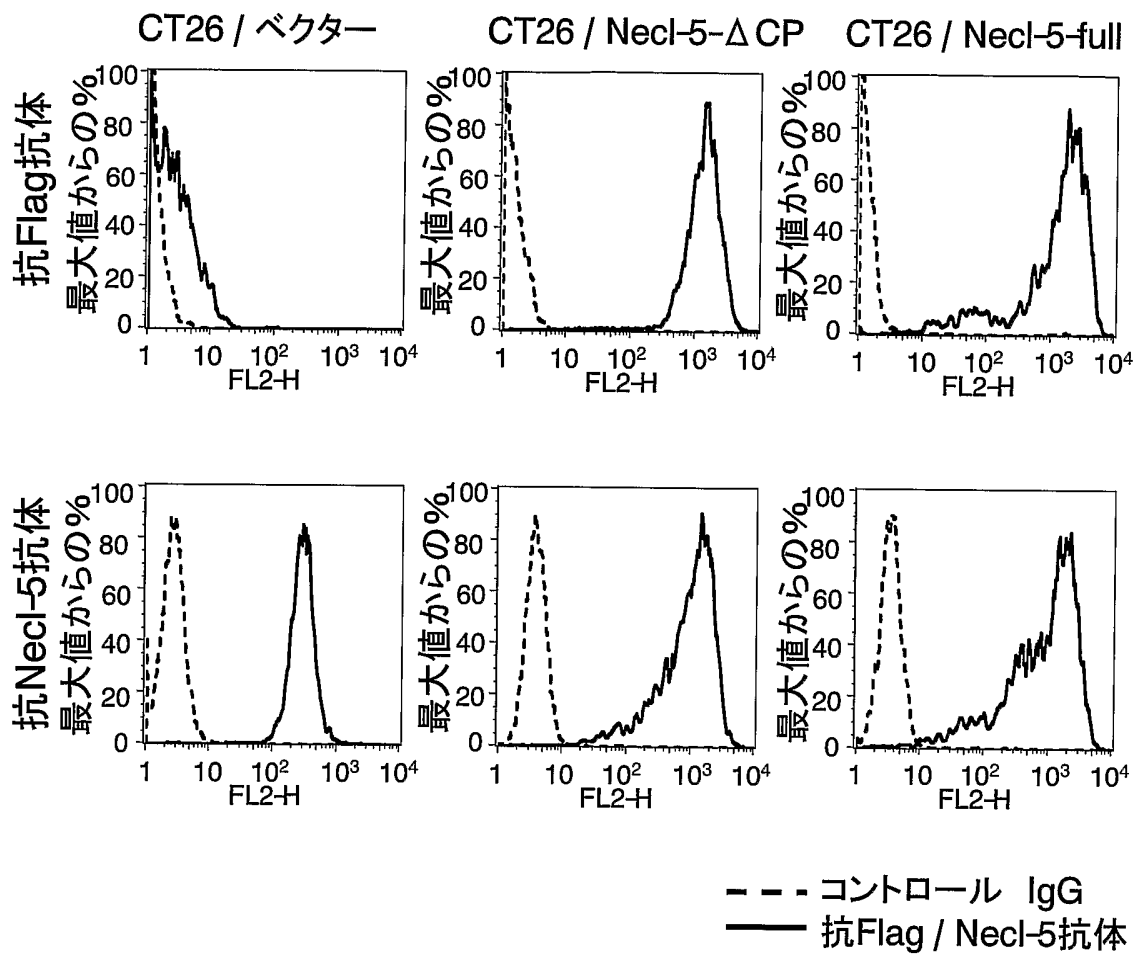
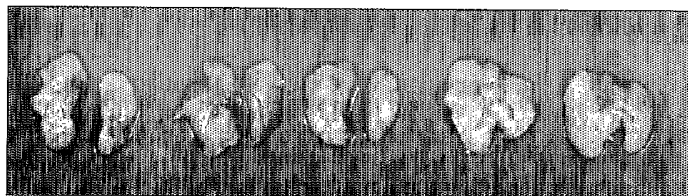
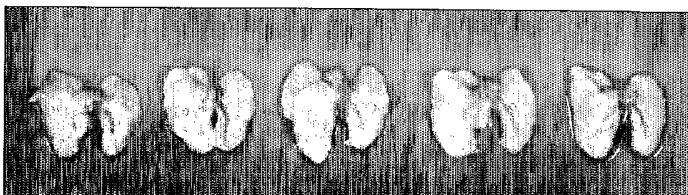


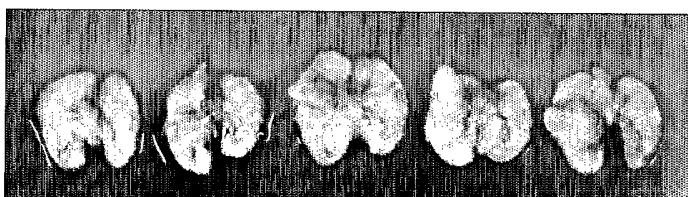
図 6



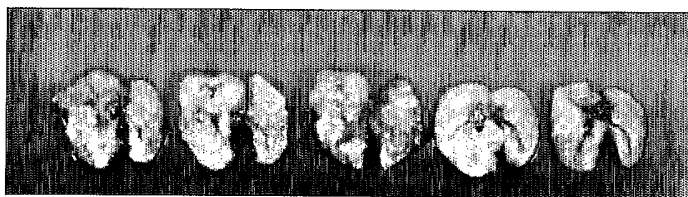
CT26



CT26 / ベクター



CT26 / Necl-5- Δ CP



CT26 / Necl-5-full

図 7

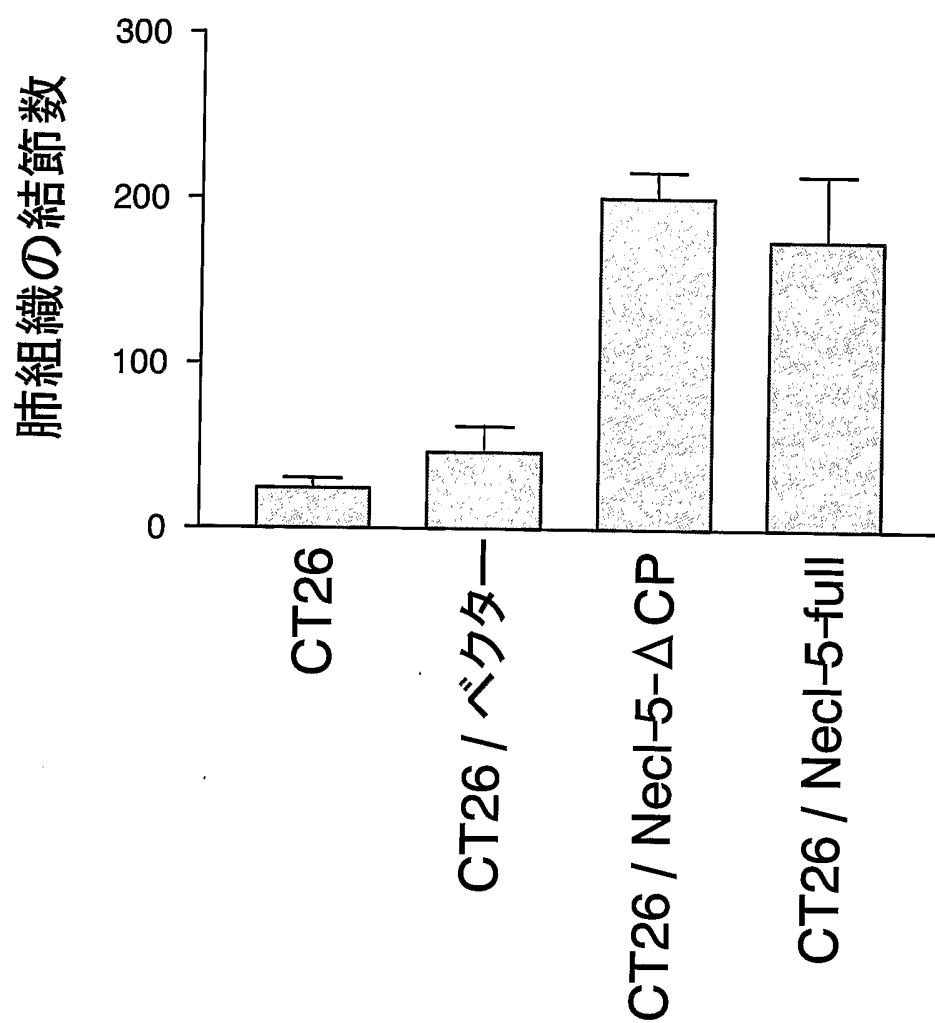


図 8

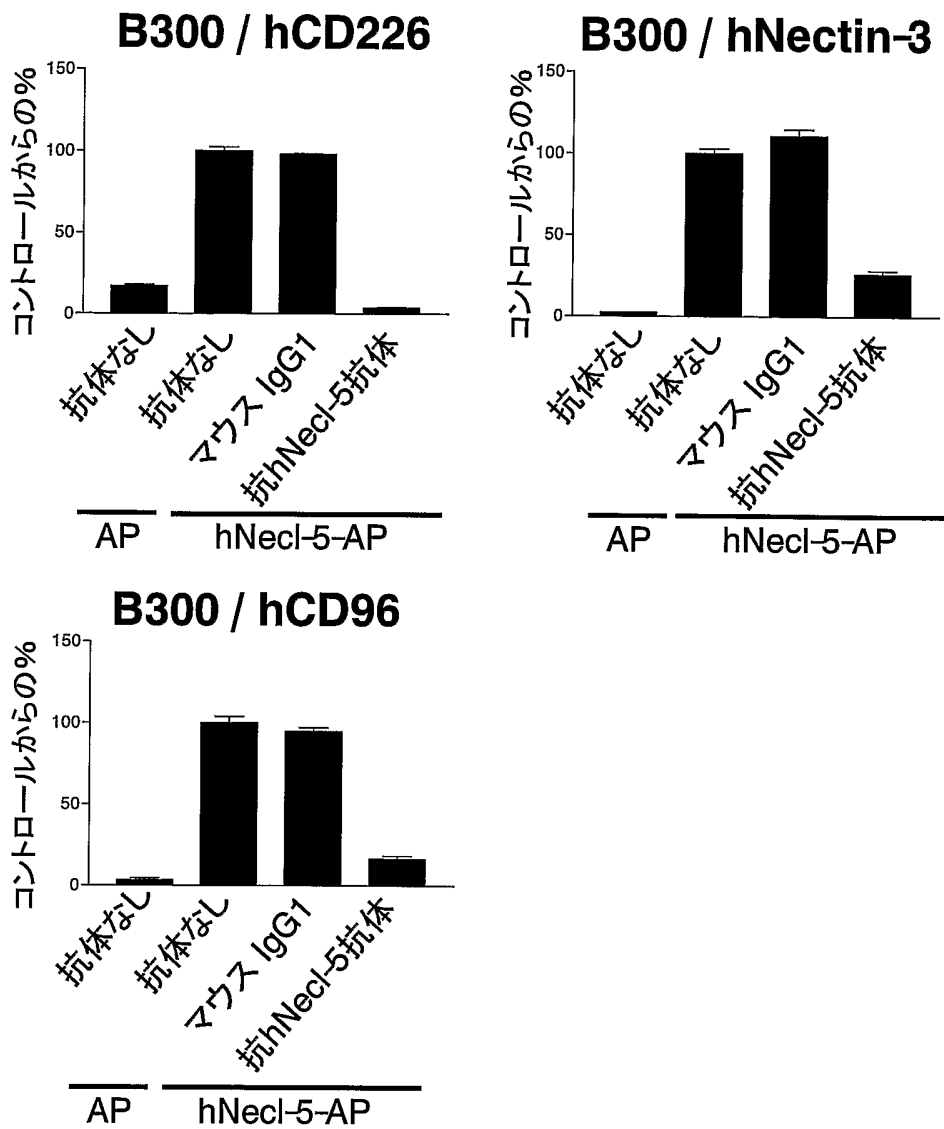


図 9

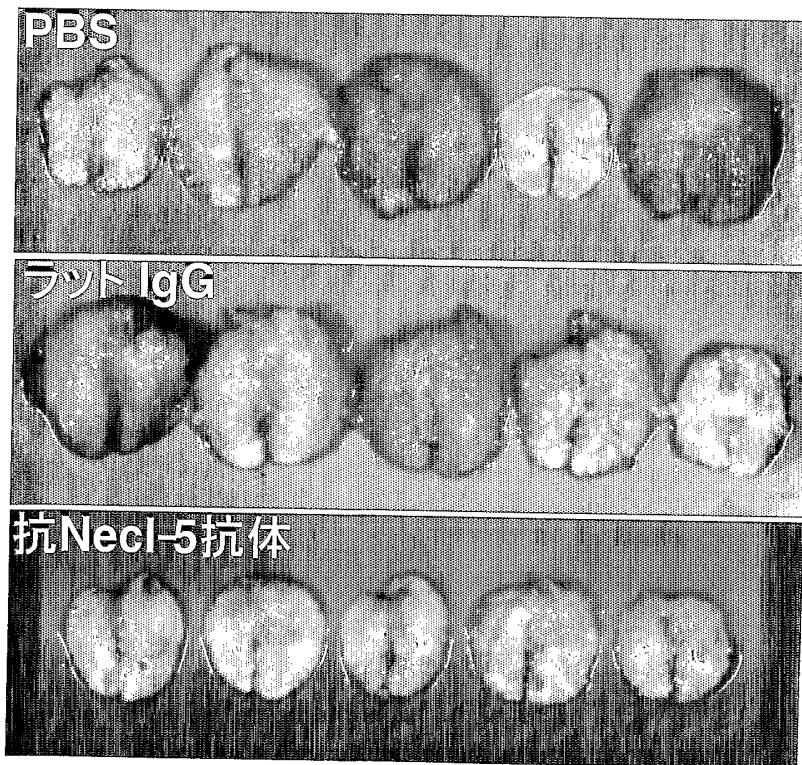
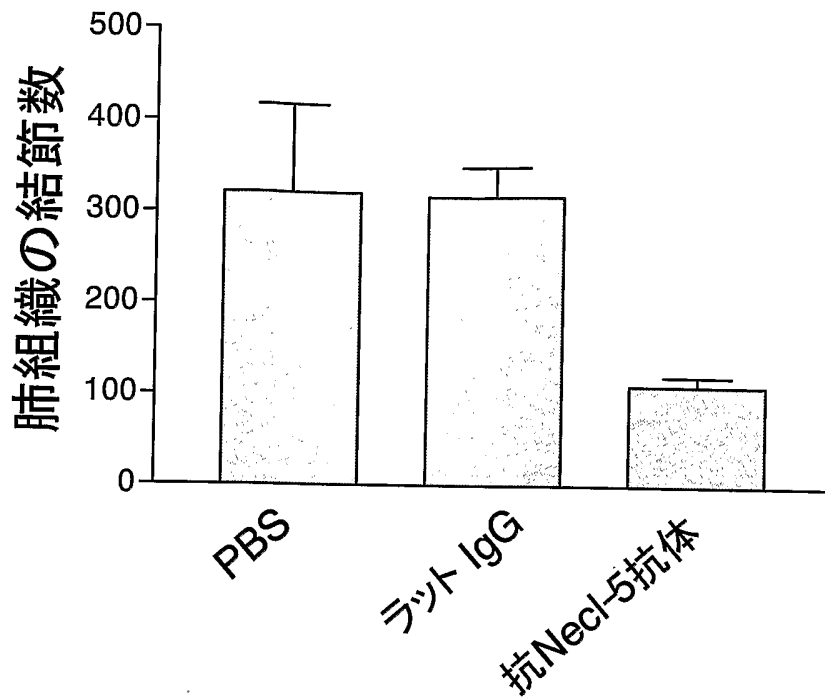


図 10

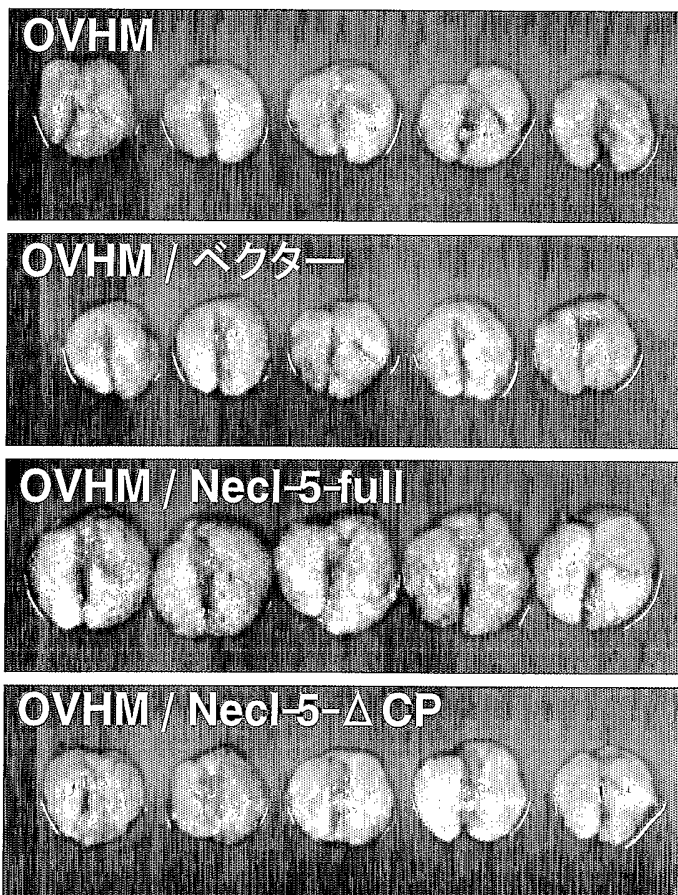
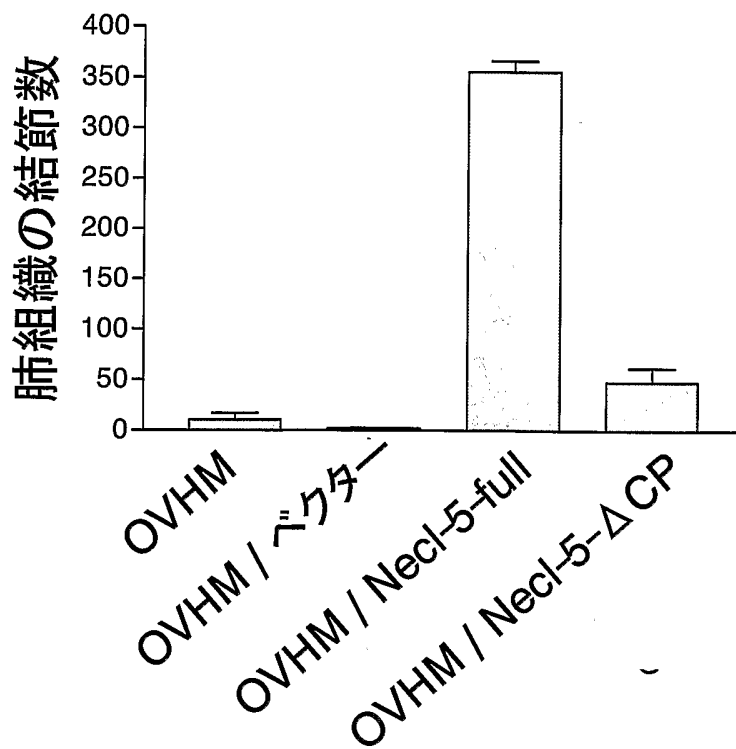


図 1 1

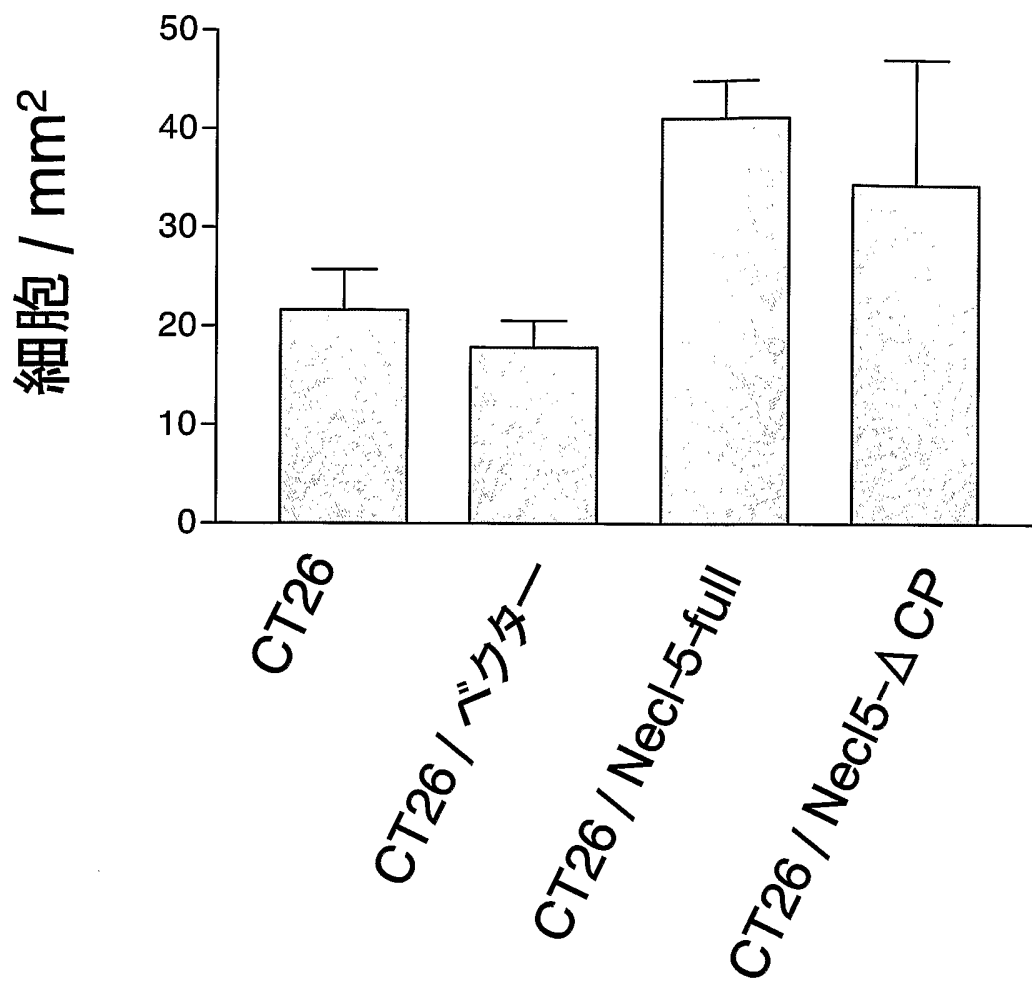
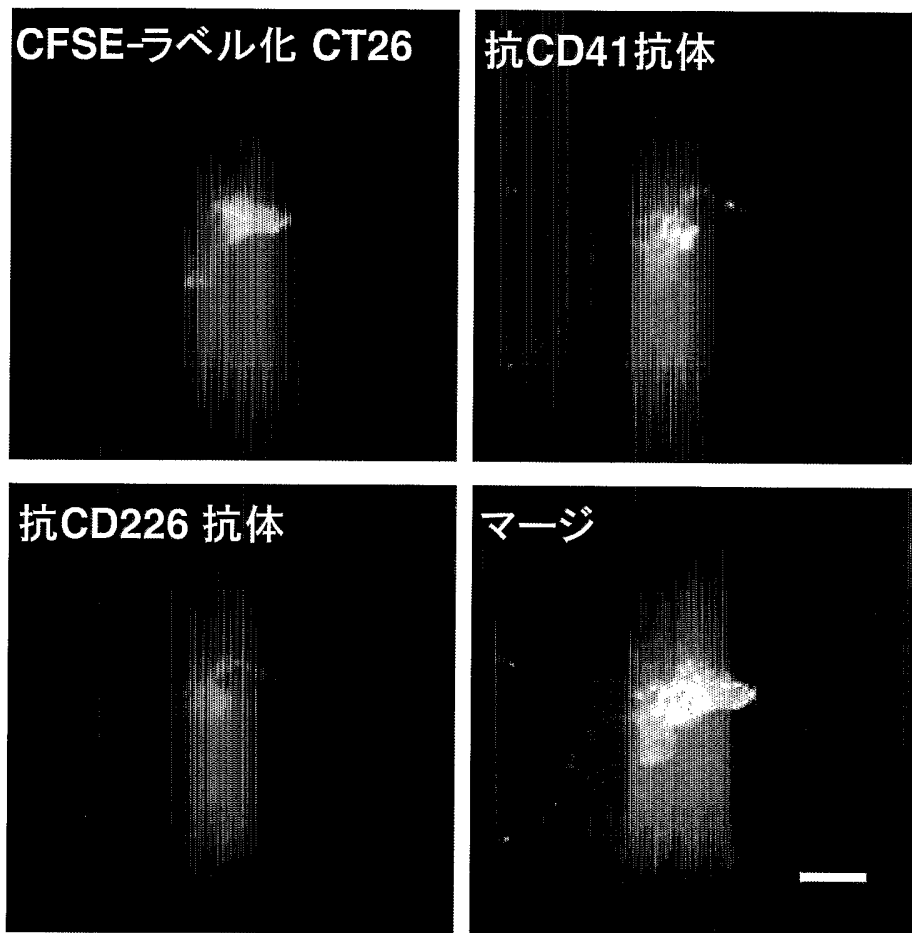


図 1 2 .



横棒; 10um

図 1 3

B300 / mCD226

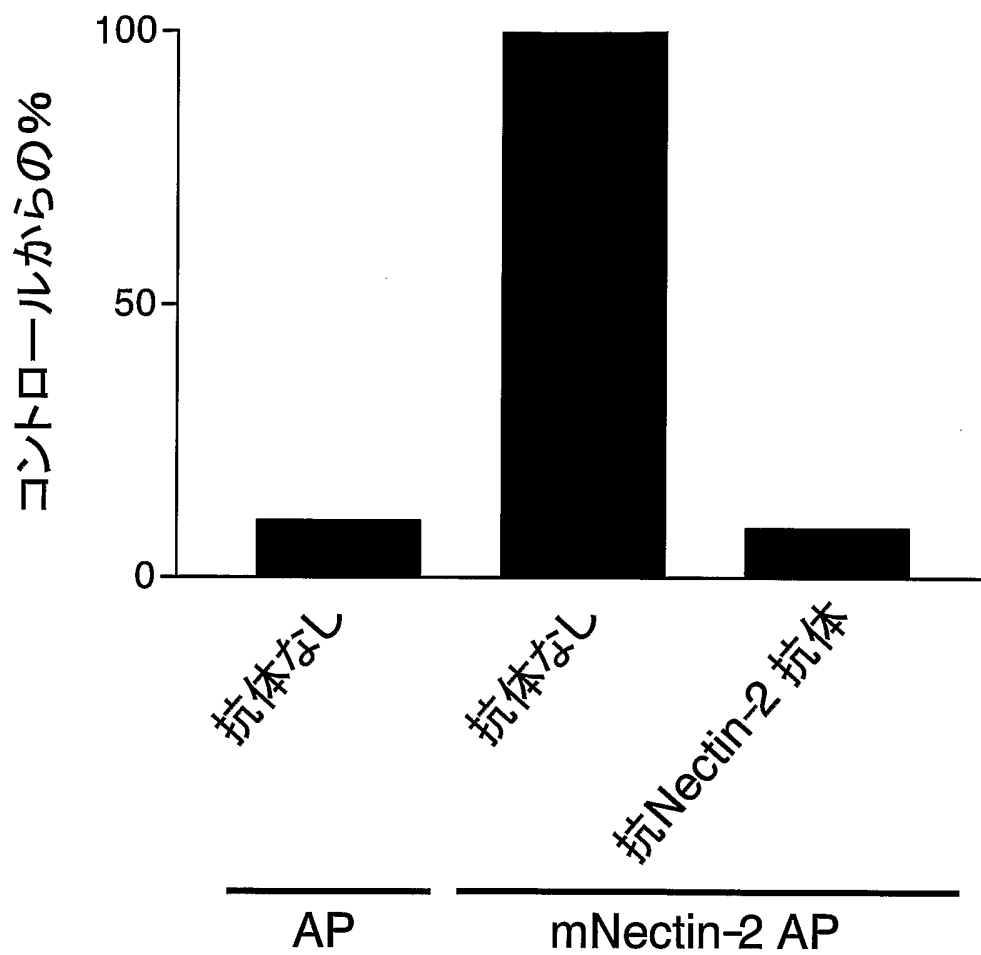


図 1 4

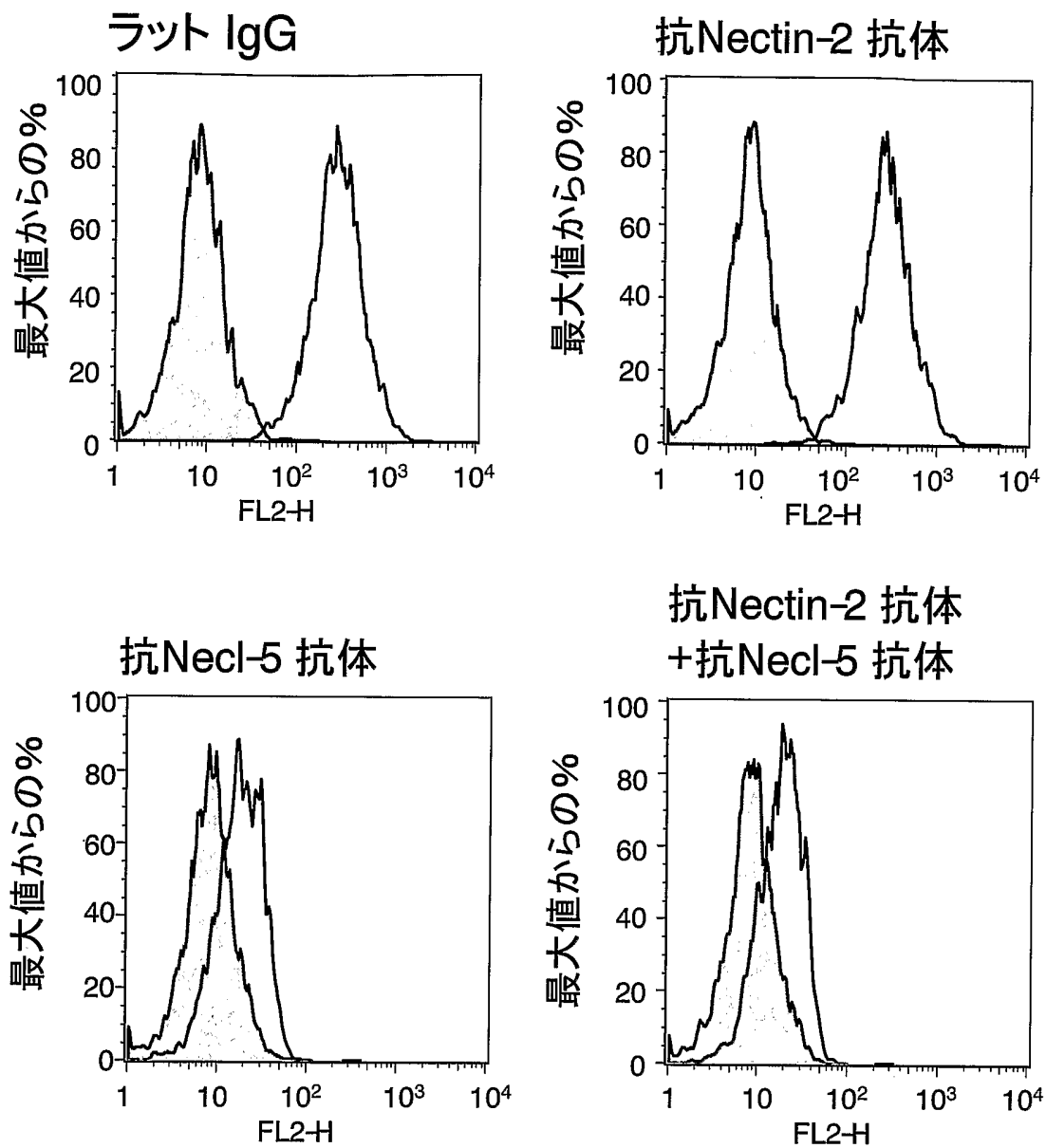
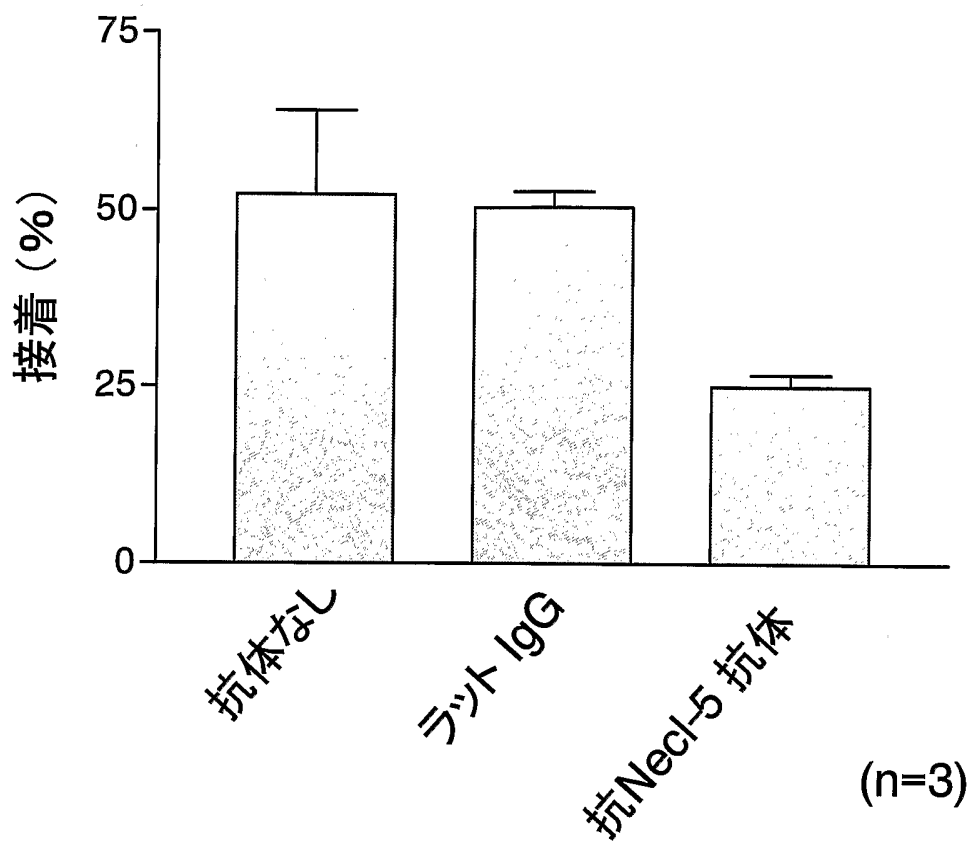


図 15



SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> A therapeutic agent for cancer containing an anti Necl-5 antibody
as an active ingredient

<130> PCT05-0021

<150> US 60/569,469

<151> 2004-05-06

<150> JP 2004-316199

<151> 2004-10-29

<160> 40

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 3215

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (172).. (1425)

<400> 1

cttgaagaag tgggtattcc ccttcccacc ccaggcactg gaggagcggc cccccgggga 60

ttccaggacc tgagctccgg gagctggact cgcagcgacc gcggcagagc gagctggcgc 120

cggggaagcga ggagacgccc gcgggaggcc cagctgctcg gagcaactgg c atg gcc 177

Met Ala

1

cga gcc atg gcc gcc gcg tgg ccg ctg ctg ctg gtg gcg cta ctg gtg	225
Arg Ala Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu Leu Val	
5 10 15	
ctg tcc tgg cca ccc cca gga acc ggg gac gtc gtc gtg cag gcg ccc	273
Leu Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln Ala Pro	
20 25 30	
acc cag gtg ccc gcc ttc ttg ggc gac tcc gtg acg ctg ccc tgc tac	321
Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro Cys Tyr	
35 40 45 50	
cta cag gtg ccc aac atg gag gtg acg cat gtg tca cag ctg act tgg	369
Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu Thr Trp	
55 60 65	
gcg cgg cat ggt gaa tct ggc agc atg gcc gtc ttc cac caa acg cag	417
Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln Thr Gln	
70 75 80	
ggc ccc agc tat tcg gag tcc aaa cgg ctg gaa ttc gtg gca gcc aga	465
Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala Ala Arg	
85 90 95	
ctg ggc gcg gag ctg cgg aat gcc tcg ctg agg atg ttc ggg ttg cgc	513
Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly Leu Arg	
100 105 110	
gta gag gat gaa gcc aac tac acc tgc ctg ttc gtc acg ttc ccg cag	561
Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe Pro Gln	
115 120 125 130	
ggc agc agg agc gtg gat atc tgg ctc cga gtg ctt gcc aag ccc cag	609
Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys Pro Gln	
135 140 145	

aac aca gct gag gtt cag aag gtc cag ctc act gga gag cca gtg ccc	657
Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro Val Pro	
150 155 160	
atg gcc cgc tgc gtc tcc aca ggg ggt cgc ccg cca gcc caa atc acc	705
Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln Ile Thr	
165 170 175	
tgg cac tca gac ctg ggc ggg atg ccc aat acg agc cag gtg cca ggg	753
Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val Pro Gly	
180 185 190	
ttc ctg tct ggc aca gtc act gtc acc agc ctc tgg ata ttg gtg ccc	801
Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu Val Pro	
195 200 205 210	
tca agc cag gtg gac ggc aag aat gtg acc tgc aag gtg gag cac gag	849
Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu His Glu	
215 220 225	
agc ttt gag aag cct cag ctg ctg act gtg aac ctc acc gtg tac tac	897
Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val Tyr Tyr	
230 235 240	
ccc cca gag gta tcc atc tct ggc tat gat aac aac tgg tac ctt ggc	945
Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr Leu Gly	
245 250 255	
cag aat gag gcc acc ctg acc tgc gat gct cgc agc aac cca gag ccc	993
Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro Glu Pro	
260 265 270	
aca ggc tat aat tgg agc acg acc atg ggt ccc ctg cca ccc ttt gct	1041
Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro Phe Ala	
275 280 285 290	
gtg gcc cag ggc gcc cag ctc ctg atc cgt cct gtg gac aaa cca atc	1089

atttgctaga aggactcact agactcagga aagctgtag gtcacagtt acagtttatt 1665
acagtaaaag gacagagatt aagatcagca aaggaggag gtgcacagca cacgttccac 1725
gacagatgag gcgacggctt ccatctgccc tcicccagtg gagccatata ggcagcacct 1785
gattctcaca gcaacatgtg acaacatgca agaagtactg ccaatactgc caaccagagc 1845
agctcactcg agatctttgt gtccagagtt tttgtttgt ctgagacag ggtctggctc 1905
tgttggcaga ctagagtaca gtggtgagat cacagttcat tgcagccttg acttctcaac 1965
gccaaagtcat cctcccacct cagcctcctg agtagctatg actacagga tgtgccacca 2025
cgctcggeta atctttttat tatttgtaaa gtcgaggttt cctgtgttg cccaggctgg 2085
tcttgaactc ttggetccaa gtgatacttc tgcttggcc tcccaaagtg ctgaattaag 2145
cagctcacea tccacacggc tgacctcata catcaagcca ataccgttg gcccaagacc 2205
cccaccataa atcacatcat tagcatgaac caccagagt ggcccaagac tcccagatca 2265
gtaccaggc aggatattcc aagggttag agatgaatgc ccaggagctg aggataaagg 2325
gcccgatctt tcttgggca aggttaagcc ttactgcat agcagaccac acagaagggt 2385
gtgggccacc agagaatfff ggtaaaaatt tggcctctgg ccttgagctt ctaaactctt 2445
gtatccgtca gatctctgtg gttacaagaa acagccactg accctggta cagaggctg 2505
caattcaggc cgcaagcagc tgcctagggg gtgtccaagg agcagagaaa actactagat 2565
gtgaacttga agaaggttgt cagctgcagc cactttctgc cagcatctgc agccacttc 2625
tgccagcatc tgcagccagc aagctgggac tggcaggaaa taaccacaa aagaagcaa 2685
tgcaatttcc aacacaaggg ggaaggatg cagggggagg cagcgtgca gttgctcagg 2745

acacgctcct ataggaccaa gatggatgcg acccaagacc caggaggccc agctgctcag 2805
 tgcaactgac aagttaaaaa ggictatgat ctigaggcca gacagcagaa ttcctcttat 2865
 aaagaaaact gtttgggaaa atacgttgag ggagagaaga ccttgggcca agatgctaaa 2925
 tgggaatgca aagcttgagc tgctctgcaa gagaaaataa gcaggacaga ggatttgctc 2985
 tggacagaga tggaagagcc gggaacagag aagtgtgggg aagagatagg aaccagcagg 3045
 atggcagggg caaagggctc aagggtgagg aggccagtgg gacccacag agttggggag 3105
 ataaaggaac attggttgct ttggtggcac gtaagctcct tgtctgtctc cagcaccag 3165
 aatctcatta aagcttattt attgtacctc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3215.

<210> 2
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Arg Ala Met Ala Ala Ala Trp Pro Leu Leu Leu Val Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Val Leu Ser Trp Pro Pro Pro Gly Thr Gly Asp Val Val Val Gln
 20 25 30

Ala Pro Thr Gln Val Pro Gly Phe Leu Gly Asp Ser Val Thr Leu Pro
 35 40 45

Cys Tyr Leu Gln Val Pro Asn Met Glu Val Thr His Val Ser Gln Leu
 50 55 60

Thr Trp Ala Arg His Gly Glu Ser Gly Ser Met Ala Val Phe His Gln
 65 70 75 80

Thr Gln Gly Pro Ser Tyr Ser Glu Ser Lys Arg Leu Glu Phe Val Ala
 85 90 95

Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Arg Asn Ala Ser Leu Arg Met Phe Gly
 100 105 110

Leu Arg Val Glu Asp Glu Gly Asn Tyr Thr Cys Leu Phe Val Thr Phe
 115 120 125

Pro Gln Gly Ser Arg Ser Val Asp Ile Trp Leu Arg Val Leu Ala Lys
 130 135 140

Pro Gln Asn Thr Ala Glu Val Gln Lys Val Gln Leu Thr Gly Glu Pro
 145 150 155 160

Val Pro Met Ala Arg Cys Val Ser Thr Gly Gly Arg Pro Pro Ala Gln
 165 170 175

Ile Thr Trp His Ser Asp Leu Gly Gly Met Pro Asn Thr Ser Gln Val
 180 185 190

Pro Gly Phe Leu Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Ser Leu Trp Ile Leu

195

200

205

Val Pro Ser Ser Gln Val Asp Gly Lys Asn Val Thr Cys Lys Val Glu
 210 215 220

His Glu Ser Phe Glu Lys Pro Gln Leu Leu Thr Val Asn Leu Thr Val
 225 230 235 240

Tyr Tyr Pro Pro Glu Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Asn Asn Trp Tyr
 245 250 255

Leu Gly Gln Asn Glu Ala Thr Leu Thr Cys Asp Ala Arg Ser Asn Pro
 260 265 270

Glu Pro Thr Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Thr Met Gly Pro Leu Pro Pro
 275 280 285

Phe Ala Val Ala Gln Gly Ala Gln Leu Leu Ile Arg Pro Val Asp Lys
 290 295 300

Pro Ile Asn Thr Thr Leu Ile Cys Asn Val Thr Asn Ala Leu Gly Ala
 305 310 315 320

Arg Gln Ala Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Glu Gly Pro Pro Ser Glu
 325 330 335

His Ser Gly Met Ser Arg Asn Ala Ile Ile Phe Leu Val Leu Gly Ile
 340 345 350

Leu Val Phe Leu Ile Leu Leu Gly Ile Gly Ile Tyr Phe Tyr Trp Ser
 355 360 365

Lys Cys Ser Arg Glu Val Leu Trp His Cys His Leu Cys Pro Ser Ser
 370 375 380

Thr Glu His Ala Ser Ala Ser Ala Asn Gly His Val Ser Tyr Ser Ala
 385 390 395 400

Val Ser Arg Glu Asn Ser Ser Ser Gln Asp Pro Gln Thr Glu Gly Thr
 405 410 415

Arg

- <210> 3
- <211> 2862
- <212> DNA
- <213> Mus musculus

- <220>
- <221> CDS
- <222> (73).. (1299)

<400> 3
 ccacgcgtcc ggagataagg cgcttgccg ttactaactg gactacaaag agctggatcg 60
 gaccggaacc ac atg gct caa ctc gcc cga gcc acc cgc tcc ccg ctg tca 111
 Met Ala Gln Leu Ala Arg Ala Thr Arg Ser Pro Leu Ser

1	5	10	
tgg ctg ctg ctg ctg ttc tgc tat gca ctc cgg aaa gcg ggt ggg gat			159
Trp Leu Leu Leu Leu Phe Cys Tyr Ala Leu Arg Lys Ala Gly Gly Asp			
15	20	25	
ata cgt gtg ctg gtg ccc tac aat tcg aca ggc gtc ttg gga ggg tcg			207
Ile Arg Val Leu Val Pro Tyr Asn Ser Thr Gly Val Leu Gly Gly Ser			
30	35	40	45
acc acc ttg cac tgt agt ctg act tct aat gag aat gtg act atc act			255
Thr Thr Leu His Cys Ser Leu Thr Ser Asn Glu Asn Val Thr Ile Thr			
50	55	60	
caa ata acc tgg atg aag aag gat tca ggt gga tcc cac gct ctt gtg			303
Gln Ile Thr Trp Met Lys Lys Asp Ser Gly Gly Ser His Ala Leu Val			
65	70	75	
gct gtc ttc cac ccc aag aag ggg ccc aac atc aaa gag cca gag agg			351
Ala Val Phe His Pro Lys Lys Gly Pro Asn Ile Lys Glu Pro Glu Arg			
80	85	90	
gtg aaa ttc ttg gct gcc caa cag gat ctg agg aac gca tct ctg gcc			399
Val Lys Phe Leu Ala Ala Gln Gln Asp Leu Arg Asn Ala Ser Leu Ala			
95	100	105	
atc tcg aac tta agt gta gaa gac gaa ggc atc tat gaa tgt cag att			447
Ile Ser Asn Leu Ser Val Glu Asp Glu Gly Ile Tyr Glu Cys Gln Ile			
110	115	120	125
gcc aca ttc ccc aga ggc agt aga agc acc aat gcc tgg ctg aag gtg			495
Ala Thr Phe Pro Arg Gly Ser Arg Ser Thr Asn Ala Trp Leu Lys Val			
130	135	140	
caa gcc cga cct aag aac act gca gag gcc ctg gag ccc tct ccc acc			543
Gln Ala Arg Pro Lys Asn Thr Ala Glu Ala Leu Glu Pro Ser Pro Thr			
145	150	155	

ttg ata ctg cag gat gtg gct aaa tgc atc tct gcc aat ggt cac cct	591
Leu Ile Leu Gln Asp Val Ala Lys Cys Ile Ser Ala Asn Gly His Pro	
160 165 170	
cct gga cga atc tct tgg ccc tcg aat gtg aat gga agt cac cgt gaa	639
Pro Gly Arg Ile Ser Trp Pro Ser Asn Val Asn Gly Ser His Arg Glu	
175 180 185	
atg aag gaa cca ggg tcc cag ccg ggc acc acc aca gtt acc agc tac	687
Met Lys Glu Pro Gly Ser Gln Pro Gly Thr Thr Thr Val Thr Ser Tyr	
190 195 200 205	
ctc tcc atg gta cct tct cgc cag gca gac ggc aag aac atc acc tgc	735
Leu Ser Met Val Pro Ser Arg Gln Ala Asp Gly Lys Asn Ile Thr Cys	
210 215 220	
acg gtg gag cat gaa agc tta cag gag ctg gac cag ctg ctg gtg acc	783
Thr Val Glu His Glu Ser Leu Gln Glu Leu Asp Gln Leu Leu Val Thr	
225 230 235	
ctt tcc caa ccc tat cca cct gaa aac gtg tcc atc tct ggc tat gac	831
Leu Ser Gln Pro Tyr Pro Pro Glu Asn Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp	
240 245 250	
ggc aac tgg tat gtt ggc ctc act aac ttg acc ctg acc tgt gaa gct	879
Gly Asn Trp Tyr Val Gly Leu Thr Asn Leu Thr Leu Thr Cys Glu Ala	
255 260 265	
cac agc aaa cca gcg cct gac atg gct gga tat aac tgg agc acg aac	927
His Ser Lys Pro Ala Pro Asp Met Ala Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Asn	
270 275 280 285	
acg ggt gac ttt ccc aac tct gtt aag cgc cag ggc aat atg ctt cta	975
Thr Gly Asp Phe Pro Asn Ser Val Lys Arg Gln Gly Asn Met Leu Leu	
290 295 300	

atc tcc acc gta gag gat ggt ctc aat aac acg gtc att gtg tgc gaa 1023
 Ile Ser Thr Val Glu Asp Gly Leu Asn Asn Thr Val Ile Val Cys Glu
 305 310 315

gtc acc aat gcc cta ggg tct ggg cag ggc caa gtg cac atc att gtt 1071
 Val Thr Asn Ala Leu Gly Ser Gly Gln Gly Gln Val His Ile Ile Val
 320 325 330

aaa gag aaa cct gag aat atg cag caa aat aca aga tta cac cta ggc 1119
 Lys Glu Lys Pro Glu Asn Met Gln Gln Asn Thr Arg Leu His Leu Gly
 335 340 345

tac atc ttt ctt atc gtc ttt gtc ctc gct gta gtc atc atc atc gca 1167
 Tyr Ile Phe Leu Ile Val Phe Val Leu Ala Val Val Ile Ile Ile Ala
 350 355 360 365

gca cta tac act ata cga aga tgc agg cat ggt cgt gct ctg cag tcc 1215
 Ala Leu Tyr Thr Ile Arg Arg Cys Arg His Gly Arg Ala Leu Gln Ser
 370 375 380

aat ccc tca gag agg gag aac gtc cag tat tca tct gtg aac ggc gac 1263
 Asn Pro Ser Glu Arg Glu Asn Val Gln Tyr Ser Ser Val Asn Gly Asp
 385 390 395

tgt aga ctg aac atg gag cca aac agc aca agg tga cggctgctggg 1309
 Cys Arg Leu Asn Met Glu Pro Asn Ser Thr Arg
 400 405

tagacagaac taaggaactt gaaggcatag caactggaac cctactctca taaatgaaga 1369

agcctccaga gagactggct gctcagigtg atgagcatag caagtttggg gggctccca 1429

ggatgctgcc gaattccacg ttgtcaaaag gacccatgga ggccagigtg ttggctcact 1489

cttgacatct cagcaagctg gggggggggg ggggagcata aagcaaggtt gagctagct 1549

tgggctatag agcaaagccc tgtccataca caaacaagct aaggggcttt gagacggtca 1609

gaaactgaag tcttgctttg ggtaaggtaa atcctctacc gcatgtatgt gctagacttg 1669

aaagacttcc acacagacct ctttataagt tgactccatt ggggctatcc cctcctctct 1729

ggacaaggtc tctgtatgta gccaaaggcta ggctcaaact cacagagata tctctgcttc 1789

tacctcecca gtgctagagt tgaagattt tgtgccactg cacttttcta ggtcttcttt 1849

taatgaagta aagtataat ttataaaaag ctatttagtt atatatatat atatttttga 1909

gactatttca tagagcccaa gctaacctca aacttactat gtagccaaga gtagtgtaa 1969

actaatttat ttttaattat ttgtcttcaa ttttaacct cacccaacce ctgctccctt 2029

ccatatcttc tttcaatcca tttcattgct tttttcttcc cagacactat tctgacttac 2089

gtctccatta caaacatttt attgaactac ataaaaatgt gtgaaccaca aaaaaaaaaat 2149

gtatttgta aaattgtagt tgtctttctg aggctgacct gatttctctg ataccattct 2209

ctccagttgt atccagttc ctgtaaaca tgtgactttg ttttctcag tagctaaaac 2269

atccaatta tgtgagtgta cactttcttt actcattcct ctgtgggcca ccagctgggt 2329

tggttccata tctgagctat tgtcatgga attgtctctg tggggggttt agtaactcc 2389

caggaatgcc tgtacatggt ttagaggcc agaagaaggc aaaaatctt gagccaggct 2449

tacatgcact tgtgagtagc cccacatagg tgctaagaac ccagttcagg tcctctgctg 2509

tgggatggtg ggctgtgcac agaaagcctg gtcccgtct agcaaaggct tggaactccg 2569

gagccggtgg gctgtgatti acaccagcat gggatggaag gatttgacc tcgctctctg 2629

ggcacctggc tctgtcaca tagctacagc ctcccacagc ccccctatag ggaggtatgc 2689

agcatcaatc acatagtagc tgcactaagc cctccacat gcaaataagg ttccccaaa 2749

ctctcagtcc aagccaatga aaagtacctg cigtcaaacc ctaaateatc cccaaaactc 2809

tgtaagtctc atcagggaat aaaatgtgtg tgaaaactaa aaaaaaaaaa aaa 2862

<210> 4

<211> 408

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Ala Gln Leu Ala Arg Ala Thr Arg Ser Pro Leu Ser Trp Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Cys Tyr Ala Leu Arg Lys Ala Gly Gly Asp Ile Arg Val
 20 25 30

Leu Val Pro Tyr Asn Ser Thr Gly Val Leu Gly Gly Ser Thr Thr Leu
 35 40 45

His Cys Ser Leu Thr Ser Asn Glu Asn Val Thr Ile Thr Gln Ile Thr
 50 55 60

Trp Met Lys Lys Asp Ser Gly Gly Ser His Ala Leu Val Ala Val Phe
 65 70 75 80

His Pro Lys Lys Gly Pro Asn Ile Lys Glu Pro Glu Arg Val Lys Phe
 85 90 95

Leu Ala Ala Gln Gln Asp Leu Arg Asn Ala Ser Leu Ala Ile Ser Asn
100 105 110

Leu Ser Val Glu Asp Glu Gly Ile Tyr Glu Cys Gln Ile Ala Thr Phe
115 120 125

Pro Arg Gly Ser Arg Ser Thr Asn Ala Trp Leu Lys Val Gln Ala Arg
130 135 140

Pro Lys Asn Thr Ala Glu Ala Leu Glu Pro Ser Pro Thr Leu Ile Leu
145 150 155 160

Gln Asp Val Ala Lys Cys Ile Ser Ala Asn Gly His Pro Pro Gly Arg
165 170 175

Ile Ser Trp Pro Ser Asn Val Asn Gly Ser His Arg Glu Met Lys Glu
180 185 190

Pro Gly Ser Gln Pro Gly Thr Thr Thr Val Thr Ser Tyr Leu Ser Met
195 200 205

Val Pro Ser Arg Gln Ala Asp Gly Lys Asn Ile Thr Cys Thr Val Glu
210 215 220

His Glu Ser Leu Gln Glu Leu Asp Gln Leu Leu Val Thr Leu Ser Gln
225 230 235 240

Pro Tyr Pro Pro Glu Asn Val Ser Ile Ser Gly Tyr Asp Gly Asn Trp
 245 250 255

Tyr Val Gly Leu Thr Asn Leu Thr Leu Thr Cys Glu Ala His Ser Lys
 260 265 270

Pro Ala Pro Asp Met Ala Gly Tyr Asn Trp Ser Thr Asn Thr Gly Asp
 275 280 285

Phe Pro Asn Ser Val Lys Arg Gln Gly Asn Met Leu Leu Ile Ser Thr
 290 295 300

Val Glu Asp Gly Leu Asn Asn Thr Val Ile Val Cys Glu Val Thr Asn
 305 310 315 320

Ala Leu Gly Ser Gly Gln Gly Gln Val His Ile Ile Val Lys Glu Lys
 325 330 335

Pro Glu Asn Met Gln Gln Asn Thr Arg Leu His Leu Gly Tyr Ile Phe
 340 345 350

Leu Ile Val Phe Val Leu Ala Val Val Ile Ile Ile Ala Ala Leu Tyr
 355 360 365

Thr Ile Arg Arg Cys Arg His Gly Arg Ala Leu Gln Ser Asn Pro Ser
 370 375 380

Glu Arg Glu Asn Val Gln Tyr Ser Ser Val Asn Gly Asp Cys Arg Leu

385

390

395

400

Asn Met Glu Pro Asn Ser Thr Arg

405

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 5

cgccctcgagg ccaccatggc tcaactcgcc cgage

35

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 6

gcgtctagag tgtaatcttg tattttgct

29

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 7

cgcgctcgacg ccaccatggc tcggatgggg ctgc

35

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 8

cgctctagag cgccgcccggt gttcaggag

29

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 9

cgcgctcgacg ccaccatggc cggggccgca gtctt

35

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 10

gcgtctagat cgcaccagga tgacctgct

29

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 11

cgcgtcgacg ccaccatggc gggaccccg ggccc

35

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 12

gcgtctagag tcaccttaa gtgttgcca

29

<210> 13

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 13

cgcgctgacg ccaccatggg ggccccttcc gcctt

35

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 14

cgctctagag gtactggagg acgaggcca

29

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 15

cgcgctgacg ccaccatggc gaggctgtg ctgcc

35

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 16

gcggctagcg tccactgccc caatggccc

29

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 17

gcagatctca tacgtgtgct ggtgccctac

30

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 18

gcgagatctg ggtgtaatct tgtattttgc tgc

33

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 19

gcggcggccg cgatacgtgt gctggtgccc tac

33

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 20

gcgctcgagt caccttgtgc tgtttggctc

30

<210> 21

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 21

ccgactcgag cccaccatgt ctgcacttct gatcc

35

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 22

gcgctcgagt caccttgtgc tgtttggctc

30

<210> 23

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 23

gcgcgcggcc gccctgcatc ttcgtatagt gtatagtgc

39

<210> 24

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 24

cagcacacgt atgtcgacct tgcgtcatc gtctttgtag tc

42

<210> 25

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 25

gatgacgaca aggtcgacat acgtgtgctg gtgccctaca at

42

<210> 26

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 26

gcggcgcc gctcaccttg tctgtttgg ct

32

<210> 27

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 27

gcgcgcgcc gccctgcatc ttcgtatagt gtagtagtc

39

<210> 28

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 28

gtcgacgaat tcgcggccgc cacgcgttcg cgagccacca tggtagcaa ggc

54

<210> 29

<211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> pimer

<400> 29
 ctgtactcg gtctacttgt acagctcgtc catgcc 36

<210> 30
 <211> 1210
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> IRES-Puro

<400> 30
 ctcgagtcta gagtcaattc cgccccccc cctctcctt cccccccc taagttact 60
 ggccgaagcc gcttgaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt ttccaccata 120
 ttgccgtctt ttggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc ctgtcttctt gacgagcatt 180
 cctaggggtc tttcccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgttgaatgt cgtgaaggaa 240
 gcagttcctc tggaagcttc ttgaagacaa acaacgtctg tagcgacct ttgcaggcag 300
 cggaaccccc cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt ataagataca 360
 cctgcaaagg cggcacaacc ccagtccac gttgtgagtt ggatagtgt ggaaagagtc 420
 aatggctct cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgccagaa ggtacccat 480
 tgtatgggat ctgatctggg gcctcggcgc acatgcttta catgtgttta gtcgaggta 540

aaaaaacgtc taggcccccc gaaccacggg gacgtggitt tccttgaaa aacacgatga 600
 taatatgacc gagtacaagc ccacggtgcg cctcgccacc cgcgacgacg tccccgggc 660
 cgtacgcacc ctcgcccgcg cgttcgccga ctaccccgcc acgcgccaca ccgtcgatcc 720
 ggaccgccac atcgagcggg tcaccgagct gcaagaactic ttctcaccg cgcgcgggt 780
 cgacatcggc aaggtgtggg tcgcgacga cggcgcccg gtggcgtct ggaccacgcc 840
 ggagagcgtc gaagcggggg cgggttcgc cgagatcggc ccgcgatgg ccgagttgag 900
 cggttcccg ctcggccgc agcaacagat ggaaggcctc ctggcgccgc accggcccaa 960
 ggagcccgc tggttcctgg ccaccgtcgg cgtctcgccc gaccaccagg gcaagggtct 1020,
 gggcagcgc gtcgtgctcc ccggagtga ggcggccgag cgcgccggg tgcccgcctt 1080
 cctggagacc tccgcgccc gcaacctccc ctctacgag cggctcggt tcaccgtcac 1140
 cggcgacgtc gagtgcccc aaggaccgc caccgtgtgc atgaccgca agcccgtgc 1200
 ctgagtcgac 1210

<210> 31

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 31

gacgagctgt acaagatgac cgagtacaag cccacg 36

<210> 32

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 32

cgccctcgagt ggcgcgcctc ctgcaggggg ccctcaggca cgggcttgc ggt 54

<210> 33

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 33

cgcggatcct aattaattaa ggtttaaact gtcgacgaat tcgcgccgc c 51

<210> 34

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 34

cgcgcggccg ccacgcgttc gcgactcgag gtcaattccg ccccccccc ct 52

<210> 35

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 35

cgcaagcctg gatccgtcga cctgcaggcg gccgccatca tcccagttga ggaggagaac 60

<210> 36

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 36

cgccctcagat cagtgatggt gatggatg gtgatggiga tgaccgggt gcgcggcgtc 60

ggt

63

<210> 37

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pimer

<400> 37

cgcgtcgacg ccaccatggc ccgagccatg gccg 34

<210> 38
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> pimer

<400> 38
gcgggcggcc gcgttacggg atatgcctga gtg

33

<210> 39
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> pimer

<400> 39
cgcgctgacg ccaccatggc ttaigtact tggcttttgg

40

<210> 40
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> pimer

<400> 40
gcgggcggcc gcatgllat tggitecacc atcagtt

37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008739

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ A61K39/395, A61P35/00, 35/04, 43/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁷ A61K39/395		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) REGISTRY/CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	IKEDA, W. et al., Tage4/Nectin-like Molecule-5 Heterophically trans-Interacts with Cell Adhesion Molecule Nectin-3 and Enhances Cell Migration, J.Biol.Chem., 2003, Vol.278, No.30, pages 28167 to 28172	1-18
Y	Kyoji TAKEKUNI et al., "Gan Ten'i Soshi ni Kansuru Kenkyu Gan Saibo no Secchaku Sogai Busshitsu Nectin to Nectin-yo Bunshi", Japanese Journal of Clinical Medicine, 2003, Vol.61, special extra issue 8, pages 165 to 171	1-18
A	MASSON, D. et al., Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma, Gut, 2001, Vol.49, No.2, pages 236 to 240	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 26 May, 2005 (26.05.05)	Date of mailing of the international search report 21 June, 2005 (21.06.05)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008739

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Kazuyuki ITO et al., "Secchaku· Undo Sogaiyaku", Igaku no Ayumi, 2000, Vol.194, No.13, pages 975 to 978	1-18
A	Masami OKABE, "Ten'i Keisei ni Kakawaru Bunshi Hyoteki ni Taisuru Kotai Iyaku no Rinsho Kaihatsu", Igaku no Ayumi, 2000, Vol.194, No.13, pages 979 to 983	1-18
A	Ikuo SAIKI et al., "Saibo Secchaku Bunshi to Gan Ten'i", Experimental Medicine, 1992, Vol.10, No.4, pages 278 to 284	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008739

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.: 19, 20

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 19 and 20 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

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

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ A61K39/395, A61P35/00, 35/04, 43/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ A61K39/395		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2005年 日本国実用新案登録公報 1996-2005年 日本国登録実用新案公報 1994-2005年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) REGISTRY/CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus(JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	IKEDA, W. et al, TAGE4/Nectin-like Molecule-5 Heterophically trans-Interacts with Cell Adhesion Molecule Nectin-3 and Enhances Cell Migration, J. Biol. Chem., 2003, Vol.278, No. 30, pp. 28167-28172	1-18
Y	竹國 恭司 他, 癌転移阻止に関する研究 癌細胞の接着阻害物質 ネクチンとネクチン様分子, 日本臨床, 2003, 第6.1巻, 増刊号8, 第165-171頁	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 26.05.2005	国際調査報告の発送日 21.6.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JIP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 清野 千秋 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 3127

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	MASSON, D. et al, Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma, Gut, 2001, Vol.49, No.2, pp.236-240	1-18
A	伊藤 和幸 他, 接着・運動阻害薬, 医学のあゆみ, 2000, Vol.194, No.13, pp.975-978	1-18
A	岡部 正実, 転移形成に関わる分子標的に対する抗体医薬の臨床開発, 医学のあゆみ, 2000, Vol.194, No.13, pp.979-983	1-18
A	済木 育夫 他, 細胞接着分子と癌転移, 実験医学, 1992, Vol.10, No.4, pp.278-284	1-18

