

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4871740号  
(P4871740)

(45) 発行日 平成24年2月8日(2012.2.8)

(24) 登録日 平成23年11月25日(2011.11.25)

(51) Int.Cl.	F 1		
C 07 K 16/28	(2006.01)	C 07 K 16/28	Z N A
C 12 N 15/02	(2006.01)	C 12 N 15/00	C
C 12 P 21/08	(2006.01)	C 12 P 21/08	
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/00	1 O 2
A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 K 39/395	N

請求項の数 4 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-553034 (P2006-553034)	(73) 特許権者	501416243
(86) (22) 出願日	平成18年1月12日 (2006.1.12)	株式会社ジーンテクノサイエンス	
(86) 国際出願番号	PCT/JP2006/300676	北海道札幌市中央区北2条西9丁目1番地	
(87) 国際公開番号	W02006/075784	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開日	平成18年7月20日 (2006.7.20)	弁理士 小林 浩	
審査請求日	平成20年12月22日 (2008.12.22)	(74) 代理人	100126354
(31) 優先権主張番号	特願2005-6348 (P2005-6348)	弁理士 藤田 尚	
(32) 優先日	平成17年1月13日 (2005.1.13)	(74) 代理人	100104282
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	弁理士 鈴木 康仁	
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-10196	(72) 発明者	黒瀧 大翼
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-10197		北海道札幌市東区北36条東27-2-1
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-10198		-601
前置審査		(72) 発明者	金山 剛士
			北海道札幌市北区北19条西6-1-12
			シャルムあをき北 202号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗 $\alpha$ 9インテグリン抗体とその用途

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

受託番号 F E R M B P - 1 0 1 9 6 、 F E R M B P - 1 0 1 9 7 、 または F E R M B P - 1 0 1 9 8 で標示されるハイブリドーマ細胞により產生されるモノクローナル抗体。

## 【請求項2】

受託番号 F E R M B P - 1 0 1 9 6 、 F E R M B P - 1 0 1 9 7 、 または F E R M B P - 1 0 1 9 8 で標示されるハイブリドーマ細胞。

## 【請求項3】

受託番号 F E R M B P - 1 0 1 9 7 のモノクローナル抗体を含有する、肝炎の予防および/または治療剤である医薬組成物。

## 【請求項4】

さらに抗 $\alpha$ 4インテグリン抗体を含有する、請求項3に記載の医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は、ヒト $\alpha$ 9インテグリンおよびマウス $\alpha$ 9インテグリンを特異的に認識するモノクローナル抗体；前記モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ細胞；前記モノクローナル抗体を含有する医薬組成物；前記モノクローナル抗体を含有する診断剤；前記モノクローナル抗体の製造方法；前記ハイブリドーマ細胞の製造方法などに関する。

10

20

## 【背景技術】

## 【0002】

細胞はインテグリンとよばれる一群の細胞表面受容体を介して細胞外マトリックス (extracellular matrix; 以下、ECMと略称する) に結合する。インテグリンは鎖と鎖が1:1のヘテロ二量体を形成することによって機能する。現在までに少なくとも鎖18種類、鎖8種類およびヘテロ二量体24種類が同定確認されている。各インテグリンはそれぞれが特異的なリガンドを認識することが知られている。インテグリンはリガンドに対する特異性や機能からサブファミリーに分類され、コラーゲン受容体、ラミニン受容体、ファイブロネクチンやビトロネクチンなどに含まれるArg-Gly-Asp (RGD)配列を認識するRGD受容体、白血球にのみに存在する白血球特異的受容体に区別される(非特許文献1: Hynes RO. 2002. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 110: 673-87; 非特許文献2: Miyasaka M. 2000. New edition of Adhesion Molecule handbook. Shujunsya)。4と9インテグリンは、これらにどちらにも属さないサブファミリーであり、4インテグリンサブファミリーと呼ばれている(非特許文献3: Elise L. Palmer, Curzio Riegg, Ronald Ferrando, Robert Pytela, Sheppard D. 1993. Sequence and Tissue Distribution of the Integrin  $\alpha$ 9 Subunit, a Novel Partner of  $\alpha$ 1 That Is Widely Distributed in Epithelia and Muscle. *The Journal of Cell Biology* 123: 1289-97)。一方、これまでECMは細胞間の単なる詰め物としてしか考えられていなかったが、インテグリンを介したECMと細胞との相互作用が細胞の増殖、接着、運動などの調節に深く関与し、癌の進展や炎症増悪などの疾患発症に関わることが明らかとなってきた。

## 【0003】

ECMの一種であるオステオポンチン (osteopontin; 以下、OPNと略称する) は分子量約41kDaの分泌型酸性リン酸化糖タンパク質であり、乳汁、尿、腎尿細管、破骨細胞、骨芽細胞、マクロファージ、活性化T細胞、腫瘍組織など広く発現が認められている分子である。分子中央部に細胞接着配列RGDSとヒトOPNではSVVYGLR配列、マウスOPNではSLAYGLR配列、その直後にはトロンビン切断部位を有しており、RGDS配列を介してRGDインテグリンと、SVVYGLR配列あるいはSLAYGLR配列を介して4(41)と9(91)インテグリンと接着する。

## 【0004】

41はトロンビンで切断されていないOPN(非切断型OPN)とトロンビンで切断されたN末端フラグメント(切断型OPN)の両方に結合し、91は切断型OPNにのみ結合するという様式の差も見出されている(非特許文献4: Y. Yokosaki et al., (1999) *The Journal of Biological Chemistry* 274, 36328-36334; 非特許文献5: P. M. Green et al., (2001) *FEBS Letters* 503, 75-79; 非特許文献6: S. T. Barry et al., (2000) *Experimental Cell Research* 258, 342-351)。

## 【0005】

4および9インテグリンは、OPN以外にも多くの共通するリガンドを有している。ファイブロネクチンのEDA部位、プロペプチド-フォンビルプラントファクター(p-p-vWF)、組織型トランスグルタミナーゼ(tTG)、第XIII血液凝固因子そしてVascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)などが知られている。また4インテグリンが特異的に認識するリガンドとしてファイブロネクチンのCS-1ドメイン、MadCAM-1(47)などが知られている。9インテグリンが特異的に認識するリガンドは、テネイシンC、プラスミンなどが知られている。

## 【0006】

9、4および1のインテグリンサブユニットのアミノ酸配列は公知である。例えば、ヒト9はNM\_002207、マウス9はNM\_133721、ヒト4はNM\_000885、マウス4はNM\_010576、ヒト1はX07979、マウス1はNM\_010578としてGenBankに登録されている。また、これらのインテグリンは種間でアミノ酸配列間の類似性が高いことが知られている。

10

20

30

40

50

## 【0007】

WO 02/081522 (特許文献1)には、OPN欠損マウスやOPNに対する中和抗体を用いたOPN機能抑制による、リウマチ様関節炎や肝炎の治癒効果について開示されている。また、この公報には、炎症性疾患発症には9インテグリン、4インテグリン認識配列であるSVVYGLR配列が重要であること、OPNに対する受容体が免疫担当細胞などにおいて発現し、炎症性疾患に関連していることが開示されている。

## 【発明の概要】

## 【0008】

現在、癌、炎症性疾患、自己免疫疾患の治療薬は種々知られているが、より改善された治療効果を有する癌、炎症性疾患、自己免疫疾患の予防薬および/または治療薬等を開発することが望まれていた。

10

## 【0009】

そこで、本発明者らはインテグリンに着目し、種々の研究を行った結果、9インテグリンに対する特異的阻害抗体が癌抑制効果、抗炎症効果を有することを見出し、本発明を完成した。すなわち、具体的には、本発明は以下に記載のモノクローナル抗体、ハイブリドーマ細胞、医薬組成物等を提供する。

(1)ヒト 9インテグリンおよびマウス 9インテグリンを特異的に認識するモノクローナル抗体。

(2)ヒトおよび/またはマウス 9インテグリンと 9インテグリンのリガンドとの結合を阻害する上記(1)に記載のモノクローナル抗体。

20

(3) 9インテグリンのリガンドがオステオポンチンである上記(2)に記載のモノクローナル抗体。

(4)受託番号 FERM\_BP-10195、FERM\_BP-10196、FERM\_BP-10197、または FERM\_BP-10198 で標示されるハイブリドーマ細胞により產生される上記(1)から(3)のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

(5)上記(1)から(4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ細胞。

(6)上記(1)から(4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を含有する医薬組成物。

(7)請求項1から4のいずれかに記載のモノクローナル抗体および抗 4インテグリン抗体の両者を含有する医薬組成物。

30

(8)炎症性疾患の予防および/または治療剤である、上記(6)または(7)に記載の医薬組成物。

(9)上記(1)から(4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体を含有する、炎症性疾患の診断剤。

(10) 9インテグリンを過剰発現する細胞を抗原として用いることを特徴とする、上記(1)から(4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体の製造方法。

(11) 9インテグリンを過剰発現する抗原として用いた細胞とは別の種の細胞を用いることを特徴とする、上記(5)に記載のハイブリドーマ細胞の製造方法。

(12) 9インテグリン結合性機能分子(例えば、OPN、VCAM-1、テネイシンC、ファイブロネクチン、pp-vWF、tTGなど)を有効成分として含有する、細胞および/または組織のリモデリングの抑制および/または促進剤。

40

(13) 9インテグリン発現細胞および/または組織(例えば、腫瘍細胞、好中球、平滑筋など)と 9インテグリン結合性機能分子(例えば、OPN、VCAM-1、テネイシンC、ファイブロネクチン、pp-vWF、tTGなど)とを接触させることを特徴とする細胞および/または組織のリモデリングの抑制および/または促進方法。

## 【0010】

本発明の抗 9インテグリン抗体は 9インテグリン機能抑制により、癌、例えば癌細胞の増殖、転移、そして炎症性疾患、例えばリウマチ関節炎、変形性関節症、肝炎、気管支喘息、線維症、糖尿病、動脈硬化、多発性硬化症、肉芽腫、炎症性腸疾患(潰瘍性大腸

50

炎、クローン病)、さらには自己免疫疾患等に対する治療効果を奏する。

また、本発明の抗 9 インテグリン抗体と抗 4 インテグリン抗体の両者を含有する医薬組成物は、さらに改善された炎症性疾患の治療効果を奏する。本発明ではマウス 9 インテグリン、ヒト 9 インテグリンに対するそれぞれのモノクローナル抗体を作製した。抗マウス 9 インテグリン抗体では、動物実験に使用することができ、抗ヒト 9 インテグリン抗体では治療薬として使用することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図 1】図 1 はインテグリン遺伝子導入細胞における mRNA 発現量の解析結果を示す図である。

10

【図 2】図 2 は抗マウス 9 インテグリン抗体のFACS解析の結果を示す図である。

【図 3】図 3 は抗マウス 9 インテグリン抗体による正常組織の染色像を示す図である。

【図 4】図 4 は免疫染色の結果を一覧した図である。

【図 5】図 5 は抗マウス 9 インテグリン抗体 4 クローンの細胞接着阻害効果を示す図である。

【図 6】図 6 は抗マウス 9 インテグリン抗体クローンの細胞接着阻害効果を比較した図である。

【図 7】図 7 は競合阻害試験による抗体のエピトープ解析の結果を示す図である。

【図 8】図 8 はマウスメラノーマ細胞株における 4 および 9 インテグリンの発現解析の結果を示す図である。

20

【図 9】図 9 は単球系細胞株における 9 インテグリンの発現解析の結果を示す図である。

【図 10】図 10 はマウス好中球の FACS 解析の結果を示す図である。

【図 11】図 11 はマウス肝臓浸潤白血球の FACS 解析の結果を示す図である。

【図 12】図 12 は抗 4 インテグリン抗体および 9 インテグリン抗体による B16 - BL6 の細胞接着阻害効果を示す図である。

【図 13】図 13 は抗 4 インテグリン抗体および抗 9 インテグリン抗体による肝炎治療効果を示す図である。

【図 14】図 14 は腱線維芽細胞の 9 インテグリン発現を示す図である。

【図 15】図 15 はトロンビン切断型OPNにより腱線維芽細胞のMMP-13 mRNAの転写が増加することを示す図である。

30

【図 16】図 16 は抗 9 インテグリン抗体により腱線維芽細胞からのMMP-13 mRNA転写が抑制されていることを示す図である。

【図 17】図 17 はB16-BL6細胞の増殖を抗 9 インテグリン抗体で抑制したことを示す図である。

【図 18】図 18 はVCAM-1刺激によるB16-BL6細胞の増殖を抗 9 インテグリン抗体と抗 4 インテグリン抗体との併用で抑制したことを示す図である。

【図 19】図 19 は抗ヒト 9 インテグリン抗体のFACS解析の結果を示す図である。

【図 20】図 20 は抗ヒト 9 インテグリン抗体 4 クローンとY9A2との細胞接着阻害効果を示す図である。

40

【発明を実施するための形態】

【0012】

抗インテグリン抗体として、4 インテグリンに対する中和抗体はすでに臨床試験に進んでいる。例えば、2004年7月には米食品医薬品局(FDA)が、バイオジェン・アイデック(Biogen Idec Inc.、米マサチューセッツ州)とエラン(Elan Corporation、アイルランド)による多発性硬化症治療薬Tysabri(登録商標)(natalizumab)の承認申請を受理し、Tysabri(登録商標)は優先審査の対象に指定されている。Tysabri(登録商標)はまた、クローン病、リウマチ様関節炎等の疾患を対象としている。また、P4C2という抗ヒト 4 1 インテグリンモノクローナル抗体が実験室レベルで用いられている。

【0013】

50

しかし、9インテグリンに対する抗体はヒト9インテグリンを抗原とし、ヒトおよびモルモットの9インテグリンに特異性を示すY9A2と呼ばれる中和抗体(A. Wang et al., (1996) Am. J. Respir., Cell. Mol. Biol. 15, 664-672)が実験室レベルで用いられてはいるものの、臨床的に用いられているわけではない。

#### 【0014】

一方、抗ヒト9インテグリン抗体をヒトに対する医薬として用いる場合、開発段階では直接ヒトへの投与はできず、その効果を確認できない。すなわち、効果を確認するための動物実験が必要となり、この効果が確認できれば、ヒト化抗体等を作製することとなる。マウスはその遺伝的背景が明らかとなっている系統が多く、また世代あたりの時間が短い特徴を有する。さらに、マウスはヒトの疾患とほぼ同一の疾患を観察することができるところが知られているので、実験動物として好適であるが、マウス9インテグリンと交叉反応を示す中和抗体はこれまで報告されていない。10

#### 【0015】

本発明では、以下の4工程を注意深く進めることにより、ヒト、マウスそれぞれに対する9インテグリンに特異的に反応する阻害抗体を得ることができた。

#### 【0016】

##### (1) 9インテグリン過剰発現株の作製

遺伝子発現細胞のスクリーニングは通常であれば、タンパク質レベルや遺伝子レベルで行うが、今回は、9インテグリンの機能である細胞接着能を用いたスクリーニングにより、ヒトまたはマウス9インテグリンをそれぞれ細胞膜上に過剰発現する細胞株を樹立した。20

ヒトまたはマウス9インテグリン発現細胞は、マウスあるいはハムスターへそれぞれ免疫に使用することができた。

#### 【0017】

##### (2) 細胞の選択

マウス9インテグリンに対する抗体を作製するために、シリアンハムスターに免疫することを考えた。そのために、ハムスターの卵巣由来細胞であるCHO-K1細胞へマウス9インテグリンの遺伝子導入を行い、ハムスター内で主にマウス9インテグリンに対する抗体のみの抗体価を増加させる実験系を構築した。

ヒト9インテグリンに対する抗体は、CHO-K1細胞へヒト9インテグリンの遺伝子導入を行い、マウス内でヒト9インテグリンに対する抗体を増加させる実験系を構築した。30

#### 【0018】

##### (3) 抗マウス9インテグリン抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング

種々のハイブリドーマからマウス9インテグリンのみに反応するクローニングを効率よく得るために、免疫した細胞の親細胞(CHO-K1)とは異なる細胞(NIH3T3)に9インテグリンを発現させた細胞をスクリーニングに使用した。さらに9インテグリンと同じインテグリンファミリーに属するマウス4インテグリンをNIH3T3細胞に発現させた細胞を用いて、9インテグリン以外のインテグリンとは交差反応性を示さないクローニングを選抜することにより、効率的にマウス9インテグリンに特異的に反応する抗体を得た。40

#### 【0019】

##### (4) 抗ヒト9インテグリン抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング

種々のハイブリドーマからヒト9インテグリンのみに反応するクローニングを効率よく得るために、遺伝子導入CHO-K1に反応を示し、CHO-K1細胞に反応しないクローニングを選抜した。また、ヒト4インテグリン遺伝子導入CHO-K1細胞に反応しないことを確認することで、ヒト9インテグリンに特異的に反応する阻害抗体を得た。

#### 【0020】

##### [ 9インテグリンに対するモノクローナル抗体 ]

本発明は9インテグリンに対するモノクローナル抗体を提供する。本発明において「50

抗体」とは、抗原である 9インテグリンまたはその部分ペプチドに結合し得る抗体分子全体またはその断片（例えば、F<sub>a b</sub>またはF<sub>( a b ' )<sub>2</sub></sub>断片）を意味し、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。好ましくは、本発明においてはモノクローナル抗体を意味する。また、本発明において「抗体」は、ヒト抗体、ヒト型化抗体、キメラ抗体を包含する。

## 【0021】

上記「ヒト型化抗体」とはマウス等のヒト以外の種に由来する抗体を改変して、H鎖とL鎖の相補性決定部以外の一次構造をヒトの抗体の対応する一次構造で置き換えた抗体を言う。また、「キメラ抗体」とは、異種抗体由来のF<sub>a b</sub>領域とF<sub>c</sub>領域とを有する抗体を意味する。

10

## 【0022】

本発明において、「抗体断片」とは、全長抗体の一部を指し、一般に、抗原結合領域または可変領域のことである。例えば、抗体断片にはF<sub>a b</sub>、F<sub>a b '</sub>、F<sub>( a b ' )<sub>2</sub></sub>、およびF<sub>v</sub>断片が含まれる。抗体のパパイン消化により、F<sub>a b</sub>断片と呼ばれる、それぞれ1つの抗原結合部位を有する2つの同じ抗原結合断片、及び、残りの容易に結晶化するために「F<sub>c</sub>」と呼ばれる断片が生じる。また、ペプシン消化により2つの抗原結合部位を有し、抗原を交差結合し得るF<sub>( a b ' )<sub>2</sub></sub>断片、及び、残りの別な断片（pF<sub>c'</sub>と呼ばれる）が得られる。

## 【0023】

ここで、「F<sub>v</sub>」断片は最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位を含む。この領域は1つの重鎖及び軽鎖の可変ドメインが非共有結合により強く連結された二量体である（V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>二量体）。各可変ドメインの3つのCDRが相互作用し、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>二量体の表面に抗原結合部位を形成する。6つのCDRは、抗体に抗原結合部位を付与するものである。しかしながら、1つの可変ドメイン（または、抗原に特異的な3つのCDRのみを含むF<sub>v</sub>の半分）であっても、全結合部位よりは低い親和性ではあるが、抗原を認識し結合する能力を有する。

20

## 【0024】

また、F<sub>a b</sub>断片（F<sub>( a b )</sub>とも呼ばれる）はさらに、軽鎖の定常ドメイン、および、重鎖の細胞の定常ドメイン（CH1）を含む。F<sub>a b '</sub>断片はF<sub>a b</sub>断片と、抗体のヒンジ領域からの1またはそれ以上のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端由来する数個の残基を附加的に有する点で異なる。

30

## 【0025】

本発明における「モノクローナル抗体」とは、実質的に均質な抗体の集団、即ち、集団を構成する個々の抗体が、天然において起こり得る少量で存在する変異体を除いては均一である抗体集団から得られた抗体を指す。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に対して作用するものである。さらに、異なるエピトープに対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一のエピトープに向けられる。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンが混在しないハイブリドーマ培養により合成される点で有利である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一な抗体の集団より得られた抗体の特性を示唆するものであって、抗体が特定の方法により製造されることを限定するものではない。

40

## 【0026】

以下、抗 9インテグリンモノクローナル抗体の作製について詳述するが、該抗体の作製はこれに限定されることはない。

## 【0027】

## [ 9インテグリン（抗原）]

本発明において抗原として使用する 9インテグリンは、（1）ヒトやその他の哺乳動物の 9インテグリンを発現するあらゆる細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織に由来するタンパク質、（2） 9インテグリンをコードする遺伝子DNA、好ましくはcDNAを細菌、酵母、動物細胞等の細胞株に導入、発現させた組換えタンパク質で

50

あってもよく、また(3)合成タンパク質であってもよい。

【0028】

また、本発明の9インテグリンには、各種哺乳動物の9インテグリンのアミノ酸配列、特に好ましくはヒト9インテグリンのアミノ酸配列(配列番号:1)と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドも包含される。

【0029】

ここで「実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド」とは、天然型の9インテグリン、特に好ましくはヒト由来の9インテグリンと実質的に同等の生物学的性質を有する限り、該アミノ酸配列中の複数個のアミノ酸、好ましくは1ないし10個のアミノ酸、特に好ましくは1ないし数個(例えば、1ないし5個)のアミノ酸が置換、欠失および/または修飾されているアミノ酸配列を有する変異ポリペプチド、ならびに該天然型の

9インテグリン、特に好ましくはヒト由来の9インテグリンのアミノ酸配列中に、複数個のアミノ酸、好ましくは1ないし10個のアミノ酸、特に好ましくは1ないし数個(例えば、1ないし5個)のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有する変異ポリペプチドを意味する。さらに、そのような置換、欠失、修飾及び付加の複数を有する変異ポリペプチドであってもよい。

【0030】

本発明の9インテグリン、特にはヒト由来の9インテグリンは、遺伝子組換え技術のほか、化学的合成法、細胞培養方法等のような当該技術分野において公知の方法あるいはその修飾方法を適宜用いることにより製造することができる。

【0031】

また、変異ポリペプチドの製造方法としては、例えば、合成オリゴヌクレオチド部位突然変異導入法(gapped duplex法)、亜硝酸あるいは亜硫酸処理によってランダムに点突然変異を導入する方法、B a 1 3 1 酵素等により欠失変異体を作製する方法、カセット変異法、リンクアスキャニング法、ミスインコードレーション法、ミスマッチプライマー法、DNAセグメント合成法などを挙げることができる。

【0032】

また、本発明の9インテグリンには、該9インテグリンの「一部」も包含される。ここで「一部」とは、9インテグリンのリガンド、例えばOPNやVCAM-1、Tenascin-C等と結合するために必要な領域を含む部分であり、具体的には配列番号:1で表されるアミノ酸配列の14番目から980番目、配列番号:2で表されるアミノ酸配列の11番目から981番目を含む部分をいう。該9インテグリンの「一部」は、後述する当該技術分野において公知の方法あるいはその修飾方法に従って、遺伝子組換え技術または化学的合成法により製造することもできるし、また細胞培養方法により単離した9インテグリン、特に好ましくはヒト由来の9インテグリンをタンパク分解酵素等により適切に切断することで製造することができる。

【0033】

抗原としてはまた、9インテグリンを組換え技術により細胞膜上に過剰発現する細胞自体、あるいはその膜画分等を用いることができる。

【0034】

本発明の9インテグリンには、ヒト9インテグリンのアミノ酸配列(配列番号:1)と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドも包含される。配列番号:1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を有するポリペプチドとして、具体的には、配列番号:2で表されるアミノ酸配列を有する、マウス9インテグリンがあげられる。本発明では、疾患モデル動物としてマウスを考慮しているので、本発明の抗原としてマウス由来の9インテグリンが好適に用いられる。また、特に本発明では9インテグリンを組換え技術により細胞膜上に過剰発現する細胞自体が好適に用いられる。したがって、後述するような、9インテグリンをコードする遺伝子(例えば、cDNA)を公知の遺伝子工学技術を用いてクローニングし、9インテグリンを細胞膜上に過剰発現する細胞自体、またはその細胞膜画分を抗原として調製する場合もある。

10

20

30

40

50

## 【0035】

## [抗体産生細胞の調製]

抗原は、免疫される動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常1～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、マウス、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、ラット、ハムスター、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等が挙げられるが、本発明ではハムスターが好適に用いられる。

## 【0036】

治療の対象がヒトであり、OPN阻害抗体産生動物がマウスの場合には、ヒトマウスキメラ抗体やヒト化抗体を用いるのが望ましく、さらには、抗体産生に関与するヒト遺伝子を導入したマウス等のトランスジェニック動物を用いてヒト型モノクローナル抗体を作成して用いるのが望ましい。

10

## 【0037】

## [抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合]

ミエローマ細胞としては、マウス、ラット、ヒト等に由来する細胞が用いられる。例えばマウスミエローマP3U1、P3X63-Ag8、P3X63-Ag8-U1、P3NS1-Ag4、SP2/0-Ag14、P3X63-Ag8-653等があげられるが、抗体産生細胞とミエローマ細胞とは同種動物、特に同系統の動物由来であることが好ましい。ミエローマ細胞は凍結保存するか、ウマ、ウサギまたはウシ胎児血清を添加した一般的な培地で継代して維持することができる。細胞融合には対数増殖期の細胞を用いるのが好ましい。本発明ではP3X63-Ag8-653が好適に用いられる。

20

## 【0038】

抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを形成させる方法としては、ポリエチレングリコール(PEG)を用いる方法、センダイウイルスを用いる方法、電気融合装置を用いる方法などがあげられる。例えばPEG法の場合、約30～60%のPEG(平均分子量1000～6000)を含む適当な培地または緩衝液中に脾細胞とミエローマ細胞を1～10:1、好ましくは5～10:1の混合比で懸濁し、温度約25～37、pH6～8の条件下で、約30秒～3分間程度反応させればよい。反応終了後、PEG溶液を除いて培地に再懸濁し、セルウェルプレート中に播種して培養を続ける。

30

## 【0039】

## [ハイブリドーマ細胞の選別]

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常、HAT(ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマ細胞が生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含む RPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工業(株))あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地(SFM-101、日本製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20～40、好ましくは約37である。培養時間は、通常、5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%CO<sub>2</sub>下で行なうことができる。

40

## 【0040】

本発明のモノクローナル抗体の產生は、新臨床免疫実験操作法(part 3)、科学評論社、1997に記載される細胞ELISA法を用いて確認およびスクリーニングできる。免疫に用いた細胞をスクリーニングに使用するとバックグラウンドが高くなることや偽陽性が多くなることが予想される場合、免疫に用いた細胞とは別の細胞で過剰発現する9インテグリンに反応し、かつ、4インテグリンを過剰発現する細胞に反応しないクローニングを抗9インテグリン抗体とすることができる。このようなクローニングから限界希釈法を1から5回、好適には2から4回繰り返すことによりモノクローナル抗体を調製できる。

50

## 【0041】

## [抗体の分離精製]

得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばアフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、S D Sポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができるAntibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) が、これらに限定されるものではない。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えばプロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper 10 D, POROS, Sepharose F. F. (Amersham Biosciences) 等が挙げられる。

## 【0042】

## [抗体の標識化]

得られた抗体を、公知の方法または市販のキットを用いて各種標識化(例えば、ビオチン標識、F I T C 標識、A P C 標識)できる。本発明では、Biotin Labeling Kit(同仁化学)を用いたビオチン標識が好適に用いられる。

## 【0043】

## [本発明のモノクローナル抗体を含有する医薬組成物]

本発明は上記のモノクローナル抗体を含有する医薬組成物を提供する。本発明のモノクローナル抗体を有効成分として含有してなる医薬組成物は、癌、例えば癌細胞の増殖、転移、そして炎症性疾患、例えば関節リウマチ、変形性関節症、肝炎、気管支喘息、線維症、糖尿病、動脈硬化、多発性硬化症、肉芽腫、炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎、クローン病)および自己免疫疾患等の予防および/または治療剤として用いることができる。 20

本発明のモノクローナル抗体を含有してなる医薬組成物はまた、臓器移植後の慢性拒絶反応抑制、全身性自己免疫疾患・エリテマトーデス・ぶどう膜炎・ベーチェト病・多発性筋炎・糸状体増殖性腎炎・サルコイドーシス等の自己免疫疾患の治療にも用いることができる。

## 【0044】

本発明の抗体を含有する上記疾患の予防および/または治療剤は低毒性であり、適当な溶媒に配合して液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物(例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによって異なるが、例えば、成人の関節リウマチ患者の予防および/または治療のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて增量してもよい。 30

## 【0045】

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。このような組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。 40

## 【0046】

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。このような組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぶん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。 50

## 【0047】

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。このような注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、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などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレンギリコール、ポリエチレンギリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50（polyoxyethylene(50mol) adduct of hydrogenated castor oil）〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、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などを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

## 【0048】

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好適である。このような投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。

## 【0049】

前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

## 【0050】

なお、本発明は、9インテグリン結合性機能分子（例えば、OPN、VCAM-1、テネイシンC、ファイブロネクチン、pp-vWF、tTGなど）を有効成分として含有する、細胞および/または組織のリモデリングの抑制および/または促進剤；並びに、9インテグリン発現細胞および/または組織（例えば、腫瘍細胞、好中球、平滑筋など）と9インテグリン結合性機能分子とを接触させることを特徴とする細胞および/または組織のリモデリングの抑制および/または促進方法にも関する。このような治療剤の有効成分の投与量、投与方法、製剤化などについては上記抗体含有医薬の記載を参照して適宜決定することができる。

## 【0051】

## [本発明のモノクローナル抗体を含有する診断剤]

本発明のモノクローナル抗体を含有してなる医薬組成物は、癌、例えば癌細胞の増殖、転移、そして炎症性疾患、例えばリウマチ関節炎、変形性関節症、肝炎、気管支喘息、線維症、糖尿病、癌転移、動脈硬化、多発性硬化症、肉芽腫等の診断剤、また臓器移植後の慢性拒絶反応抑制、全身性自己免疫疾患・エリテマトードス・ぶどう膜炎・ベーチェト病・多発性筋炎・糸状体増殖性腎炎・サルコイドーシス等の自己免疫疾患の診断剤として用いることができる。本発明のモノクローナル抗体は、

9インテグリンを特異的に認識することができるので、被検液中の9インテグリンの定量、特にサンドイッチ免疫測定法、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどによる定量、免疫染色などに使用することができる。これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要としない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて測定系を構築すればよい。

これら的一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参考することができる。

## 【0052】

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、9インテグリンを感度良く定量

10

20

30

40

50

することができる。さらに、本発明の抗体を用いる、生体内での 9インテグリンの定量法を利用することにより、9インテグリンが関連する各種疾患の診断をすることができる。例えば、9インテグリンの発現量の増減が検出された場合は、9インテグリンが関連する疾患、例えば癌や炎症性疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、本発明のモノクローナル抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する9インテグリンを特異的に検出するために使用することができる。また、9インテグリンを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画に含まれる

9インテグリンの検出、被検細胞内における9インテグリンの挙動の分析等に使用することができる。

10

**【実施例】**

**【0053】**

以下に実施例を示して本発明をより詳細に説明するが、これは本発明の範囲を限定するものではない。

**【0054】**

実施例1

**[マウス 9、4インテグリンcDNAのクローニング]**

4インテグリン遺伝子はマウス12.5日胚、9インテグリンはB16-BL6細胞(マウスマエラノーマ細胞)の全RNAからランダムプライマーを用いて逆転写し、得られたcDNAを鑄型としてPCR法によりクローニングを行った。クローニングに用いたプライマーを以下に示す。

20

m 4Integin-5': 5'-CGTGGATCCGAGCGCATGGCTGCGGAAGCGAGGTGC-3' (配列番号:3)

m 4Integin-3': 5'-CAGCTCGAGTCAGTCATCATTGCTTTGCTGTTGAC-3' (配列番号:4)

m 9Integin-5': 5'-GTCAAGCTTCTGGGGATGGCGGCCGGCTGGGCTG-3' (配列番号:5)

m 9Integin-3': 5'-CGGTCTAGACACGGTGGGTCACTGGTTTTCTGGAC-3' (配列番号:6)

**【0055】**

PCRは以下の組成:鑄型cDNA 5μl、GCバッファーI 25μl、dNTPmix 5μl、10μM primer1 1μl、10μM primer2 1μl、DW 10.5μl、LA Taq (Takara LA Taq (登録商標)) 0.5μlの反応系を作製し、94 2分 (94 30秒 68 3分、30サイクル) 4の反応条件で、サーマルサイクラー(Gene Amp (登録商標) PCR System 2700 (アプライドバイオシステムズ))により反応を行った。反応後、1%アガロースゲル電気泳動により、4インテグリンの場合は3kb付近のバンドを、9インテグリンの場合は3kb付近のバンドを分離後、ゲルより切り出し、QIAquick (登録商標) Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いてPCR增幅産物を精製した。

30

**【0056】**

**[ヒト 9、4インテグリンcDNAのクローニング]**

4インテグリン遺伝子はヒト好中球、9インテグリンはヒト末梢单核球から抽出した全RNAからランダムプライマーを用いて逆転写し、得られたcDNAを鑄型としてPCR法によりクローニングを行った。クローニングに用いたプライマーを以下に示す。

40

h 4Integin-5': 5'-ACGCTCGAGTGTACCATGTTCCCCACCGAGAGCGCA-3' (配列番号:11)

h 4Integin-3': 5'-TCATCTAGATTAATCATCATTGCTTTACT-3' (配列番号:12)

h 9Integin-5': 5'-TCGAAGCTTCTGGGGATGGCGGCCGGCT-3' (配列番号:13)

h 9Integin-3': 5'-ACCTCTAGATCACTGGTTTTCTGGACCCA-3' (配列番号:14)

**【0057】**

上記のように、PCR法により増幅した4インテグリンおよび9インテグリンそれぞれのcDNAをPCR II - TOPO (登録商標)ベクター(Invitrogen)に組み込み、ABI PRISM (登録商標) 310 (アプライドバイオシステムズ)によりそれぞれの塩基配列を確認した。得られたcDNAの塩基配列は配列番号:7 (マウ

50

ス 9) および配列番号: 8 (マウス 4)、配列番号: 9 (ヒト 9) および配列番号: 10 (ヒト 4) の塩基配列とそれぞれ一致した。これらの cDNA を動物細胞へ導入するため、p cDNA™3.1 (+) (Invitrogen) に組み込んだ。その結果得られたベクターをそれぞれマウス 9 インテグリン / p cDNA 3.1、マウス 4 インテグリン / p cDNA 3.1、ヒト 9 インテグリン / p cDNA 3.1、ヒト 4 インテグリン / p cDNA 3.1 と命名した。

#### 【0058】

##### 実施例 2

###### [ 9 インテグリン、 4 インテグリン恒常発現細胞株の樹立 ]

ハムスターに免疫するために、ハムスター卵巣由来細胞株である CHO - K1 細胞に 10 4 インテグリン cDNA を含むマウス 4 インテグリン / p cDNA 3.1、またはマウス 9 インテグリン cDNA を含む 9 インテグリン / p cDNA 3.1 を導入し、OPN の SVVYGLR ペプチドとの接着効果能によるスクリーニングで、マウス 9 インテグリンを恒常的に発現する CHO - K1 細胞 (マウス 9 / CHO - K1 細胞) を 3 クローン (6F1、12C3、4N2)、NIH3T3 細胞 (マウス 9 / NIH3T3 細胞) を 4 クローン (21H、7A3、11C3、21D3) 樹立した。

#### 【0059】

マウス 9 インテグリンのコントロールとして同じインテグリンサブファミリーである 4 インテグリンをマウス胎児 12.5 日胚からクローニングし、マウス 4 インテグリンを恒常的に発現する NIH3T3 細胞 (マウス 4 / NIH3T3 細胞) を 3 クローン 20 (3G1、4A10、19F2) 樹立した。

#### 【0060】

樹立したマウス 9 インテグリン発現細胞の 9 インテグリン発現量を定量的に解析するため 9 / NIH3T3 細胞、9 / CHO - K1 細胞から抽出した cDNA を用いてリアルタイム PCR を行った。その結果、図 1A および図 1B に示すように、9 / NIH3T3 細胞では 21D3 が、9 / CHO - K1 細胞では 12C3 が最も高い 9 インテグリンの発現を示した。また、4 / NIH3T3 細胞は FACS にてタンパク質発現量の解析を行った結果を図 1C に示す。4A10 で最も高いマウス 4 インテグリン発現上昇が見られた。

#### 【0061】

同様な方法で、ヒト 9 インテグリンを恒常的に発現する CHO - K1 細胞 (ヒト 9 / CHO - K1 細胞) を 1 クローン (20J1)、ヒト 4 インテグリンを恒常的に発現する CHO - K1 細胞 (ヒト 4 / CHO - K1 細胞) を 1 クローン (9A5) を樹立した。

#### 【0062】

##### 実施例 3

###### [ 抗 9 インテグリン抗体を用いた FACS 解析 ]

マウス 9 / CHO - K1 細胞自体を抗原として用い、シリアンハムスター (7 - 8 週齢、雌) 3 匹に  $1 \times 10^7$  細胞 / 回 / 匹を合計 5 回免疫した。脾細胞を取り出し、マウス ミエローマ細胞である X63 - Ag8 - 653 と PEG 法にて細胞融合し、HAT 培地で選択した。モノクローナル抗体の產生は、細胞 ELISA 法にてスクリーニングを行った。免疫に使用した細胞をスクリーニングに使用するとバックグラウンドが高くなることや偽陽性が多くなることが予想されたので、マウス 9 / NIH3T3 細胞に反応し、且つ、マウス 4 / NIH3T3 細胞に反応しないクローンを抗 9 インテグリン抗体とした。限界希釈法を 2 回繰り返すことによりモノクローナル抗体を樹立した。その結果、抗マウス 9 インテグリン抗体を產生するハイブリドーマ細胞 4 クローン (11L2B、12C4'58、18R18D、55A2C) を樹立した。

#### 【0063】

ヒト 9 インテグリンに対する抗体作製は、subtractive immunization 法 (Williams C V, Stechmann CL, McLoon SC. Biotechniques. (1992) 12:842-7.) を参考にして BALB/c マウス 3 匹に対して免疫を行った。まず、CHO-K1 細胞を  $4 \times 10^6$  細胞 / 匹腹腔内投与し

10

20

30

40

50

、次の日とその次の日、シクロホスファミドを4mg/匹、腹腔内投与した。シクロホスファミド投与2週間後、ヒト9/CHO-K1細胞を $2 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内投与し、さらにその2週間後、ヒト9/CHO-K1細胞を $3 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内投与した。ヒト9/CHO-K1細胞に反応し、且つ、ヒト4/CHO-K1細胞に反応しないクローンを抗9インテグリン抗体とした。その結果、抗ヒト9インテグリン抗体を産生するハイブリドーマ細胞4クローン(1K11、21C5、24I11、25B6)を樹立した。

【0064】

ここで得られた抗マウス9インテグリン抗体を産生するハイブリドーマ細胞11L2Bは、2004年12月28日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、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受領番号F E R M B P - 10197として寄託されている。

10

【0065】

ここで得られたハイブリドーマ細胞12C4'58は、2004年12月28日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、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受領番号F E R M B P - 10196として寄託されている。

【0066】

ここで得られたハイブリドーマ細胞18R18Dは、2004年12月28日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、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受領番号F E R M B P - 10195として寄託されている。

20

【0067】

ここで得られたハイブリドーマ細胞55A2Cは、2004年12月28日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、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受領番号F E R M B P - 10198として寄託されている。

【0068】

抗マウス9インテグリン抗体がFACSにて使用可能かをマウス9/NIH3T3細胞、マウス4/NIH3T3細胞を用いて検討した。全て、細胞数は $1.0 \times 10^5$ 個にて行い、抗体との反応は氷上にて行った。また、Fc受容体との非特異反応をブロックするために、抗FcRII抗体(2.4G2)を添加した後に、一次抗体を添加した。2.4G2処理をした9/NIH3T3細胞、4/NIH3T3細胞あるいは、内在性の9インテグリンが発現するマウスマラノーマ細胞株であるB16-BL6細胞に、作製した抗体(5 $\mu$ g/ml)を一次抗体として50 $\mu$ lとして添加し30分反応させた。次にFITCラベルした抗ハムスターIgG抗体50 $\mu$ lを添加し30分反応後、ナイロンメッシュを通して後、FACS解析をFACSCalibur™(ベクトンアンドディッキンソン)にて行った。ビオチン化抗体を使用する際は、Fc受容体をブロックするために2.4G2処理をした細胞に、ビオチン化抗体(5 $\mu$ g/ml)50 $\mu$ lを添加、30分反応後、APCラベル、あるいはFITCラベルしたストレプトアビジンを50 $\mu$ l添加しFACS解析を行った。

30

【0069】

その結果、図2に示すようにすべての抗マウス9インテグリン抗体でマウス9/NIH3T3細胞とB16-BL6細胞上の9インテグリンを検出することができた。またすべての抗体は、マウス4/NIH3T3細胞には反応しなかった。これらの結果から、全ての抗マウス9インテグリン抗体が細胞上に発現するマウス9インテグリンタンパク質をFACSにて検出できることがわかった。

【0070】

実施例4

[細胞染色の検討]

免疫組織化学を行うためにマウスより種々の生体組織を摘出し、O.C.T. コンパウンド(テ

40

50

イシューテック)にて包埋し、液体窒素にて凍結後、コールドトーム(サクラ)にて5μm厚に薄切した。薄切した組織を一昼夜風乾した後、-20°のアセトンにて固定し、正常ヤギ血清にて非特異反応のブロックを行った。次に抗9インテグリン抗体クローン12C4'58をそれぞれ一次抗体として2μg/mlの濃度で室温1時間反応させ、PBSで500倍希釈したビオチン化ヤギ抗シリアンハムスターIgG抗体(ジャクソン)を二次抗体として添加し、室温で30分反応させた。ベクターステインABCキット(ベクターラボラトリ)を用いて室温で30分間反応後、DAB+基質キット(ダコ)を室温で1から5分間程度反応させ検出を行った。組織はその後、ヘマトキシリン(和光)による核染色を行いカバーガラスと包埋剤でマウントした。マウス脳、肝臓、肺、筋肉の染色像を図3に示す。染色像一覧(図4)に示したように、脳の脈絡叢、肺の血管内皮・平滑筋・肺胞マクロファージ、肝臓の類洞細胞、腎臓の血管内皮・平滑筋・糸球体、胃の平滑筋・粘膜筋板、筋肉の血管内皮・筋繊維芽細胞・リンパ管そして子宮の血管内皮・平滑筋・動脈平滑筋等の細胞で9インテグリンの発現が見られた。本結果より本発明で見出された抗9インテグリン抗体は、免疫染色に使用できることが分かり、診断薬としての有用性が期待できる。

#### 【0071】

##### 実施例5

###### [細胞接着阻害効果の検討]

樹立した4種類の抗マウス9インテグリン抗体が細胞接着阻害活性を有するか調べるために、GRGDS、テネイシンC、SVVYGLRペプチドとマウス9/NIH3T3細胞を用いて細胞接着阻害試験を行った。GRGDSペプチドに含まれるRGD配列は多くのECMに共通して存在する細胞接着部位である。テネイシンCの細胞接着部位であるAEIDGIEELペプチドは、9インテグリンは接着することができるが、4インテグリンは接着することができない。ヒトOPNのSVVYGLRペプチドは、4、9インテグリンと接着することができる。これら3種類のペプチド固相によるマウス9/NIH3T3細胞に対する細胞接着におけるそれぞれの抗9インテグリン抗体の接着阻害能を検討した。

#### 【0072】

OPN細胞接着領域SVVYGLR配列(配列番号:15)、GRGDS配列(配列番号:16)、テネイシンCのAEIDGIEEL配列(配列番号:17)を固相化し(10μg/ml、50μl/ウェル)、ブロッキング液(0.5%BSA/PBS)でブロッキングしたELISAプレートに、DMEM/0.25%BSA培地中の予め抗体と反応させた9/NIH3T3細胞(1.0×10<sup>5</sup>個/ml)を添加した。37°で1時間培養し、非接着細胞をPBSで洗浄し、接着細胞は、0.5%クリスタルバイオレット/20%メタノールで固定、染色し、室温30分放置、20%酢酸溶液を添加することにより転溶し、接着活性は波長590nmにおけるODを測定することにより定量化した。

#### 【0073】

その結果、図5に示すように、GRGDSペプチドの固相においては、9インテグリンはRGD非依存性の接着であるので、全ての抗9インテグリン抗体では阻害できなかった。Tenascin-C機能部位であるAEIDGIEELペプチドとOPN機能部位であるSVVYGLRペプチドを固相した場合には11L2B、12C4'58、55A2Cの3種類で顕著な細胞接着の阻害が見られた。18R18Dはほとんど阻害能を示さなかった。

次に図5で阻害効果の見られた11L2B、12C4'58、55A2Cの3種類の阻害効果の比較を行った。AEIDGIEELペプチドとSVVYGLRペプチドの固相を5μg/mlで固定し、阻害抗体の濃度を細胞接着阻害試験にて比較検討した。図6に示すように55A2Cが最も阻害能が高いことが分かった。50%阻害濃度(IC50)をも図6に示す。

#### 【0074】

##### 実施例6

###### [競合阻害試験によるエピトープ解析]

実施例5の細胞接着阻害試験により、各抗9インテグリン抗体の阻害活性に差がある

10

20

30

40

50

結果が得られている。このことは、これらの抗体は 9 インテグリン上のそれぞれ異なるエピトープを認識していることを示唆している。そこで、抗体のビオチン化を行い、競合阻害試験によるエピトープ解析を行った。ビオチン化抗体として 12C4'58 と 18R 18D を用いて、当該 2 クローンと全クローンとのエピトープの差異を検討した。図 7 に示したように、両抗体とも、同一クローンによる競合では完全にビオチン化抗体の結合は阻害された。ビオチン化 18R 18D を用いた際には、全クローンで阻害することができなかった。一方で 12C4'58 では 55A2C より一部、結合が阻害されることが分かり、12C4'58 と 55A2C では一部エピトープが重複していることが示唆された。

【0075】

実施例 7

10

[ 培養細胞株における 9 インテグリンの発現解析 ]

培養細胞上での 9 インテグリン発現を調べるために、マウスマラノーマ培養細胞である B16-F1 と B16-F10、B16-BL6 で FACS 解析を行った。その結果、図 8 に示すように、B16-F1、B16-F10、B16-BL6 全ての細胞において 9 インテグリンの発現を確認することができた。

【0076】

またヒトの末梢血単核球において低いレベルで発現が確認されていたことから、マウス骨髄単球性白血病細胞である WEHI-3B 細胞とマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞において FACS 解析を行った。図 9 に示すように、WEHI-3B 細胞では発現を検出できなかったが、RAW264.7 細胞では強い発現を確認できた。

20

【0077】

実施例 8

[ 好中球における 9 インテグリンの発現解析 ]

9 インテグリンはヒト好中球において高発現していることが既に報告されている。そこで、マウス好中球上における 9 インテグリン発現を解析するために、チオグチコレート誘導腹腔細胞を回収しマウス好中球の発現解析に使用した。Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> の細胞を好中球とし、その細胞群における 9 インテグリンの発現を FACS 解析した。図 10 に示すように、C57BL/6、BALB/c、CBA、C3H 全系統マウスで 9 インテグリン発現を確認することはできなかった。この結果からマウス好中球上には通常では 9 インテグリンが発現していないことが明らかとなった。

30

【0078】

実施例 9

[ 4 インテグリンと 9 インテグリンの発現様式の解析 ]

4 インテグリンと 9 インテグリンは同じインテグリンサブファミリーに属し、多くのリガンドを共有していることから、類似する機能を発揮することが示唆されている。また、マウス肝内白血球中に存在する NKT 細胞が、4 と 9 インテグリンを同時に発現する事が mRNA レベルの解析によって既に報告されている ( Diao H, Kon S, Iwabuchi K, Kimura C, Morimoto J, Ito D, Segawa T, Maeda M, Hamuro J, Nakayama T, Taniguchi M, Yagita H, Van Kaer L, Onoe K, Denhardt D, Rittling S, T. U. 2004. Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. Immunity 21: 539-50 ) )。そこで、4 インテグリンと 9 インテグリンは同一細胞上に実際に発現しているのかを確認するために、マウス肝浸潤白血球を分離し両インテグリン抗体による二重染色を行った。その結果、図 11 に示すように、4 インテグリンは全肝内白血球の約 39% 程度が発現しており、9 インテグリンは全肝浸潤白血球の約 12% 程度が発現していた。9 インテグリンは 4 インテグリン発現細胞の約 74% に発現している

40

ことが分かった。

【0079】

実施例 10

[ OPN の B16-BL6 細胞との接着様式の検討 ]

50

B16-BL6細胞をはじめ多くの細胞が4インテグリンと9インテグリンを同時に発現している。また4インテグリンと9インテグリンはOPNやVCAM-1等リガンドを共有していることから、現在臨床応用されつつある4インテグリン機能抑制だけでは、その機能が9インテグリンによりレスキューされてしまうことが予想される。そこで、抗4インテグリン抗体と抗9インテグリン抗体の併用によるSVVYGLRペプチドとB16-BL6細胞との接着阻害効果の相乗効果を検討した。

#### 【0080】

具体的には抗4、9インテグリン抗体によるB16-BL6細胞に対する接着阻害効果は、SVVYGLR配列固相(5μg/ml)の細胞接着試験で検討した。接着の際に、培地に1mM MnCl<sub>2</sub>を添加し反応させた。抗体は抗4インテグリン抗体(クローンR1-2)(Pharmingen)と抗9インテグリン抗体(クローン11L2B)を用いて行った。抗4インテグリン抗体のコントロール抗体として正常ラット抗体(NRG)、抗9インテグリン抗体のコントロール抗体として正常ハムスター抗体(NHG)を使用した。阻害活性は抗体50μg/ml、2種併用の際は抗体それぞれ25μg/mlで検討を行った。

#### 【0081】

その結果、図12に示すように、抗4インテグリン抗体と抗9インテグリン抗体それぞれ単独では、阻害効果をほとんど見出すことができなかった。一方、抗4インテグリン抗体と抗9インテグリン抗体を併用した際には阻害効果を見出した。この結果は、

4インテグリン、9インテグリンは片方のみでもSVVYGLR配列に対してほぼ完全なる細胞接着能を有することを示唆している。生体内では、4と9の両インテグリンを発現している細胞(好中球やNK細胞等)が疾患発症に関わっていることが示されており、さらに、これら両インテグリンは多くのリガンドを共有することから考えると、抗9インテグリン抗体と抗4インテグリン抗体とを併用することにより、より効率的に疾患治療効果を得ることができることが推察され、新たな治療法となりうる可能性を示すことができた。

#### 【0082】

##### 実施例11

###### [抗9インテグリン抗体による肝炎治療効果]

これまで我々は、OPN機能阻害により肝炎が治療できることを示している(特許文献1)。そこで、抗9インテグリン抗体クローン11L2Bおよび抗4インテグリン抗体R1-2(Pharmingen)を用いた治療実験を行った。肝炎はコンカナバリンA(ConA)(Vector社)を200μg静脈内投与し、12時間後の血中AST値、ALT値をGPT/ALT-PIIIとGOT/AST-PIII(富士フィルム)を用いて測定した。抗体は、ConAを投与する3時間前に200μgを静脈内投与した。図13に示すように、抗9インテグリン抗体によりAST値、ALT値の減少が見られ、治療効果を見出すことができた。さらに、その治療効果は抗4インテグリン抗体との併用により亢進させることができた。抗9インテグリン抗体により肝炎治療ができることが分かった。

#### 【0083】

##### 実施例12

###### [腱線維芽細胞を用いた抗9インテグリン抗体によるMMP-13の変化]

マウス膝蓋腱から、腱線維芽細胞を回収し9インテグリンの発現をFACSと細胞染色により検討した。抗9インテグリン抗体はクローン18R18D、抗4インテグリン抗体はR1-2を用いた。図14に示すように腱線維芽細胞には9インテグリンが発現していることが分かった。4インテグリンは発現していなかった。

#### 【0084】

リコンビナント全長型OPNとトロンビン切断型OPN(それぞれ10μg/ml)を固相し、腱線維芽細胞を48時間培養し、MMP-13 mRNA量をリアルタイムPCRを用いて定量化した。トロンビン切断型OPNで腱線維芽細胞を刺激した際に、MMP-13の転写が促進されることが分かった(図15)。次に抗9インテグリン抗体55A2Cを30μg/mlになるように培養液中

10

20

30

40

50

に添加して、MMP-13 mRNA量変化を調べた。図16に示すように、抗9インテグリン抗体（クローナー55A2C）によりMMP-13転写量を抑制することが分かった。コントロール抗体としては、ハムスターIgGを用いた。

MMP-13はコラゲナーゼとも呼ばれ、マウスにおけるコラゲナーゼはMMP-13が代表的なMMPであるが、ヒトにおいてはMMP-1やMMP-8、MMP-13が関係している。MMP-13は関節炎（特に関節リウマチ(RA)や変形性関節症(OA)）の増悪化に強く関与することが示されている(Skotnicki JS, DiGrandi MJ, Levin JI. Design strategies for the identification of MMP-13 and Tace inhibitors. *Curr Opin Drug Discov Devel.* (2003) 6:742-59. Review.). 抗9インテグリン抗体によりMMP-13の転写が抑制できるという本知見から、抗9インテグリン抗体を用いることにより、関節炎が治療できることが強く示唆できる。 10

#### 【0085】

##### 実施例13

###### [癌細胞株の増殖における抗9インテグリン抗体の機能]

図2で示すように、B16-BL6は9インテグリンが強く発現している。また、MMP-13は癌の増悪に関与している(Ala-aho R, Kahari VM. Collagenases in cancer. *Biochimie.* (2005) 87:273-86. Review.)という報告もある。そこで、樹立した4種類の抗マウス9インテグリン抗体の癌細胞の細胞増殖阻害活性を検討した。細胞培養用の96ウェルプレート（ベクトンアンドディッキンソン）にB16-BL6細胞を10% FCS/DMEMで $5 \times 10^4$  cells/mLに調製し、抗マウス9インテグリン抗体、抗マウス4インテグリン抗体を10 μg/mlで添加後、細胞-抗体懸濁液を100 μLずつウェルに添加した。37、5% CO<sub>2</sub>存在下で24時間培養し、各ウェルに10 μLずつセルカウンティングキット8（同仁化学研究所）を添加し、さらに37、5% CO<sub>2</sub>存在下で1時間培養し、O.D.450の吸光度を計測し細胞数を定量的に解析した。図17に示すように、12C4'58が最も阻害活性が高く、35%程度B16-BL6細胞の増殖を抑制した。55A2CとR1-2も20%程度、増殖を抑制することができた。 20

#### 【0086】

次に、より生体の条件に近い条件における細胞増殖の抑制効果を解析するために、VCAM-1を固相化し同様の検討を行った。VCAM-1は9インテグリンのリガンドであり、VCAM-1の可溶型リコンビナントタンパクであるrhVCAM-1-Fc chimera(ロシュ)を使用した。rhVCAM-1-Fc chimeraを10 μg/mlで固相して使用し、0.5% BSA/PBSで非特異的反応のプロックを行った。抗体単独の場合は10 μg/mlで、併用の場合はそれぞれ5 μg/mlの濃度を添加した。その後は、図17と同じ方法で行った。その結果、図18に示すように12C4'58抗体単独及び4阻害抗体であるクローナーR1-2単独投与では全く効果は得られないかあるいは微弱な効果しか得られなかつたのに対し、12C4'58とR1-2の同時投与においては、約20%程度の顕明な細胞増殖抑制効果を示した。 30

#### 【0087】

##### 実施例14

###### [抗ヒト9インテグリン抗体の機能解析]

抗ヒト9インテグリン抗体がFACSにて使用可能かをヒト9/CHO-K1細胞、CHO-K1細胞、内在的に9インテグリンを発現するヒト好中球を用いて検討した。ヒト好中球はFACSの方法は図2と同様な方法で行ったが、Fc受容体との非特異反応のプロックは、50%ヤギ血清を用いて行った。二次抗体はFITCラベルした抗マウスIgG抗体を使用した。その結果、図19に示すようにすべての抗ヒト9インテグリン抗体はヒト9/CHO-K1細胞とヒト好中球上の9インテグリンを検出することができた。またすべての抗体は、ヒト4/CHO-K1細胞には反応しなかった。これらの結果から、全ての抗ヒト9インテグリン抗体が細胞上に発現するヒト9インテグリンタンパク質をFACSにて検出できることがわかった。 40

#### 【0088】

##### 実施例15

9インテグリンのリガンドである、OPNとTenascin-C機能ペプチドを用いて、細胞接着試験を行った。細胞は、ヒト9/CHO-K1細胞を用いて、各種抗9インテグリン抗体の 50

阻害能の検討を行った。ペプチドは5 μg/mlで固相し、抗体は5 μg/mlで阻害を行った。図20に示すようにOPNに対する接着阻害試験では、クローン21C5が最も効果的な阻害活性を示した。1K11, 24I11の阻害効果は低かった。一方で、Tenascin-Cに対する接着阻害能は、Y9A2が最も効果的に阻害活性を示した。今回作製した抗9インテグリン抗体4クローンはTenascin-Cに対してはあまり阻害活性を示さなかった。

既にヒト9インテグリンに対する中和抗体Y9A2は報告され、Chemicon社から製品化されているが、Y9A2は、ヒト9インテグリンを遺伝子導入したマウス線維芽細胞株L cellを通常の免疫法（腹腔内投与）で作製している。本発明の抗ヒト9インテグリン抗体はsubtractive immunization法で作製しており、免疫方法が異なっている。さらに図19で示すように、クローン21C5は、ヒト9/CHO-K1細胞のFACS図の検出パターンが異なっており、また、図20で示すように、細胞接着試験の阻害効果様式も異なっていることから、今回作製した抗9インテグリン抗体4クローンはY9A2とはエピトープが異なっていると考えられる。

#### 【0089】

##### まとめ

マウス9インテグリンの機能を阻害する抗体の作製と疾患・病態における9インテグリンの機能を解明する目的で、マウス9インテグリンに対する4種のモノクローナル抗体と抗ヒト9インテグリン抗体を4種類作製した。これらの抗体を用いた研究で以下のことを明らかにすることができた。

#### 【0090】

(1) 作製した4種の抗マウス9インテグリン抗体は、全てFACS解析に利用可能であり、それぞれ異なる細胞接着阻害能を有した。

(2) 抗マウス9インテグリン抗体クローン12C4'58が免疫染色に利用できることが分かった。

(3) マクロファージ様細胞であるRAW264.7細胞、メラノーマ細胞であるB16-F1、B16-F10、B16-BL6細胞で9インテグリンは発現していた。マウス好中球では9インテグリン発現が観察されず、ヒトで発現が確認できることから、好中球上の9インテグリンの発現には種間で差があることが示された。脾細胞のB220<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>細胞群やB220<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>細胞群において、一部9インテグリンを発現する細胞群が存在した。また肝臓浸潤白血球の9インテグリン発現は、4インテグリン発現細胞上に多く見られた。

(4) 9と4インテグリンが同時に存在し、両者が認識するリガンドが存在する場合、その接着能は相補的であった。

(5) 抗マウス9インテグリン抗体により、肝炎治療効果を見出すことができ、その効果は抗マウス4インテグリン抗体により亢進した。

(6) 腱線維芽細胞上に9インテグリンの発現していることが分かり、腱線維芽細胞をトロンビン切断型OPNで刺激すると、MMP-13発現が亢進することが分かった。そのMMP-13亢進は、抗9インテグリン抗体で阻害がかかることが分かった。

(7) B16-BL6細胞の増殖を抗9インテグリン抗体で抑制できることが分かった。また、VCAM-1刺激による細胞増殖は、抗9インテグリン抗体と抗4インテグリン抗体を同時に併用投与することにより、単独投与を比べ、増殖抑制効果が亢進した。

(8) 作製した4種の抗ヒト9インテグリン抗体は、全てFACS解析に利用可能であり、それぞれ異なる細胞接着阻害能を有した。また、FACSや接着阻害試験により、既存の抗ヒト9インテグリン抗体Y9A2と異なる反応性を示したことから、エピトープが異なることが考えられた。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0091】

本発明のモノクローナル抗体は、9インテグリン機能抑制により、癌、例えば癌細胞の増殖、転移、そして炎症性疾患、例えば関節リウマチ、変形性関節症、肝炎、気管支喘息、線維症、糖尿病、癌転移、動脈硬化、多発性硬化症、肉芽腫、炎症性腸疾患（潰瘍性

10

20

30

40

50

大腸炎、クローン病)、自己免疫疾患等に対する治療効果を奏する。また、本発明の抗9インテグリン抗体と抗4インテグリン抗体の両者を含有する医薬組成物は、さらに改善された癌、炎症性疾患の治療効果を奏する。本発明のモノクローナル抗体は、マウス9インテグリンをも認識するので、マウスを用いた動物実験に利用できる。

【図2-2】

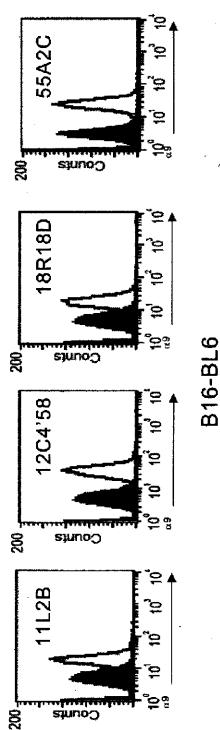


図2(その2)

【図5】

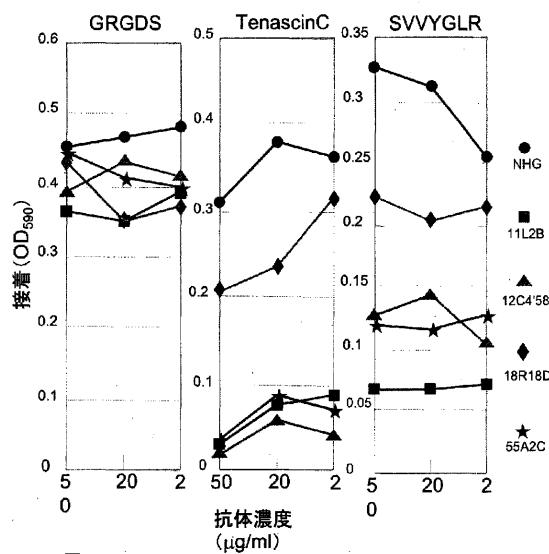


図5

【図7】

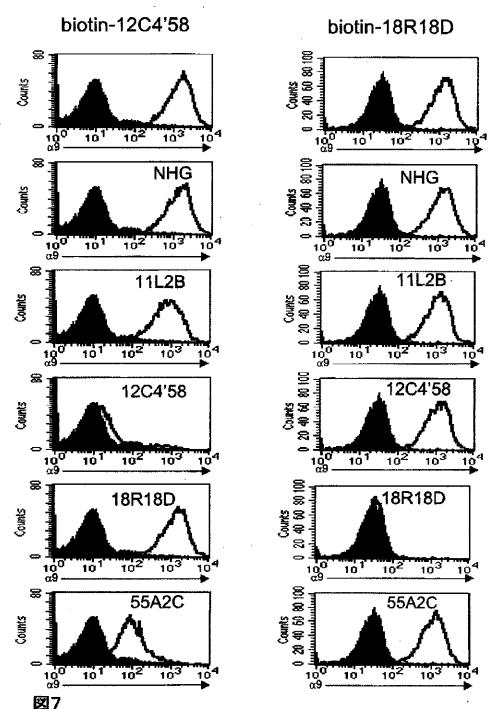


図7

【図15】

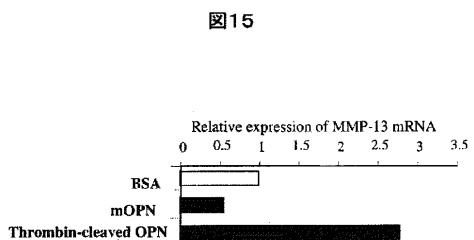
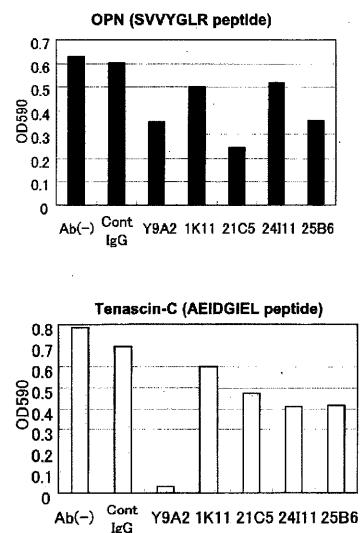


図15

【図20】

図20



【図1】

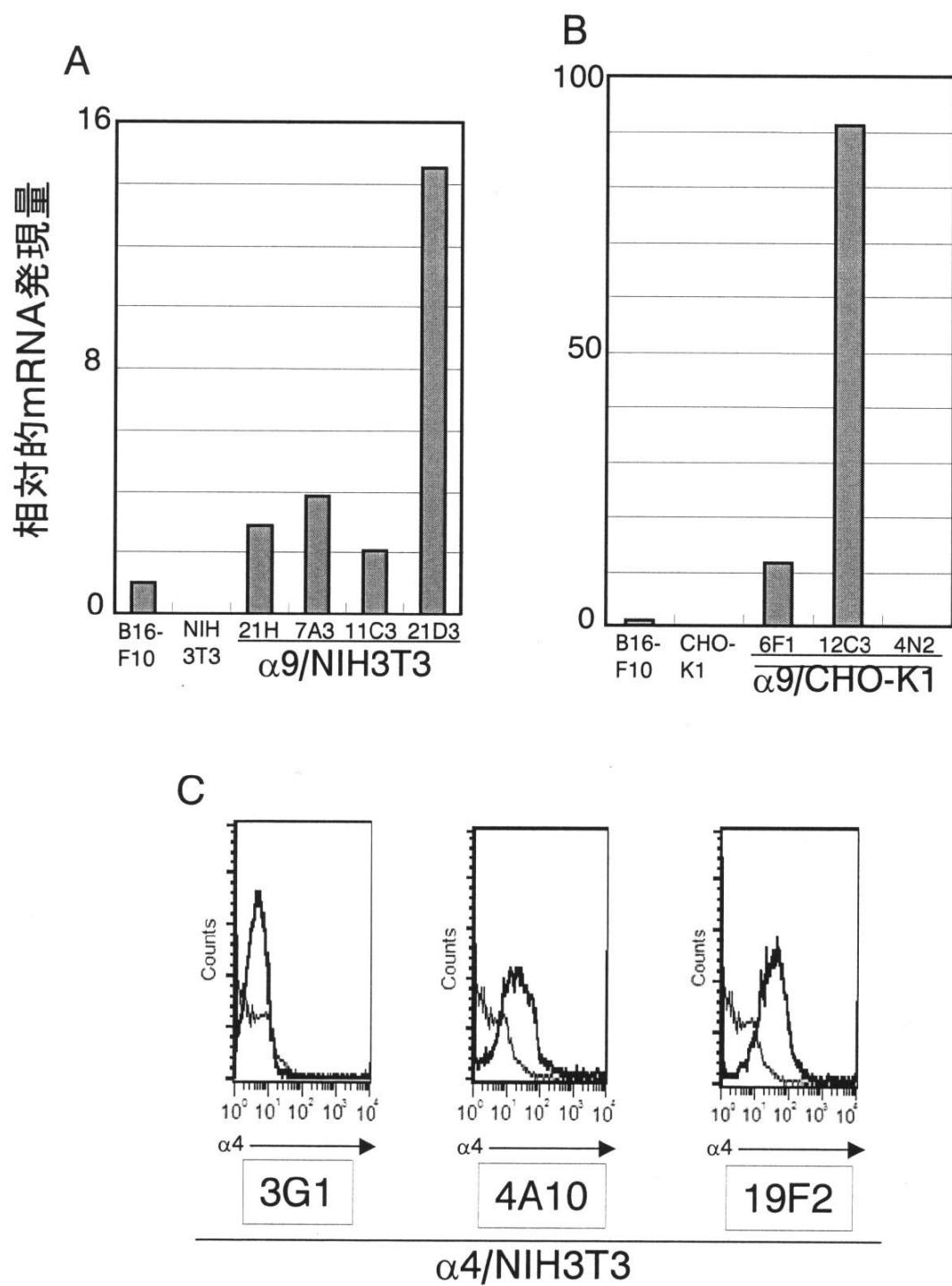
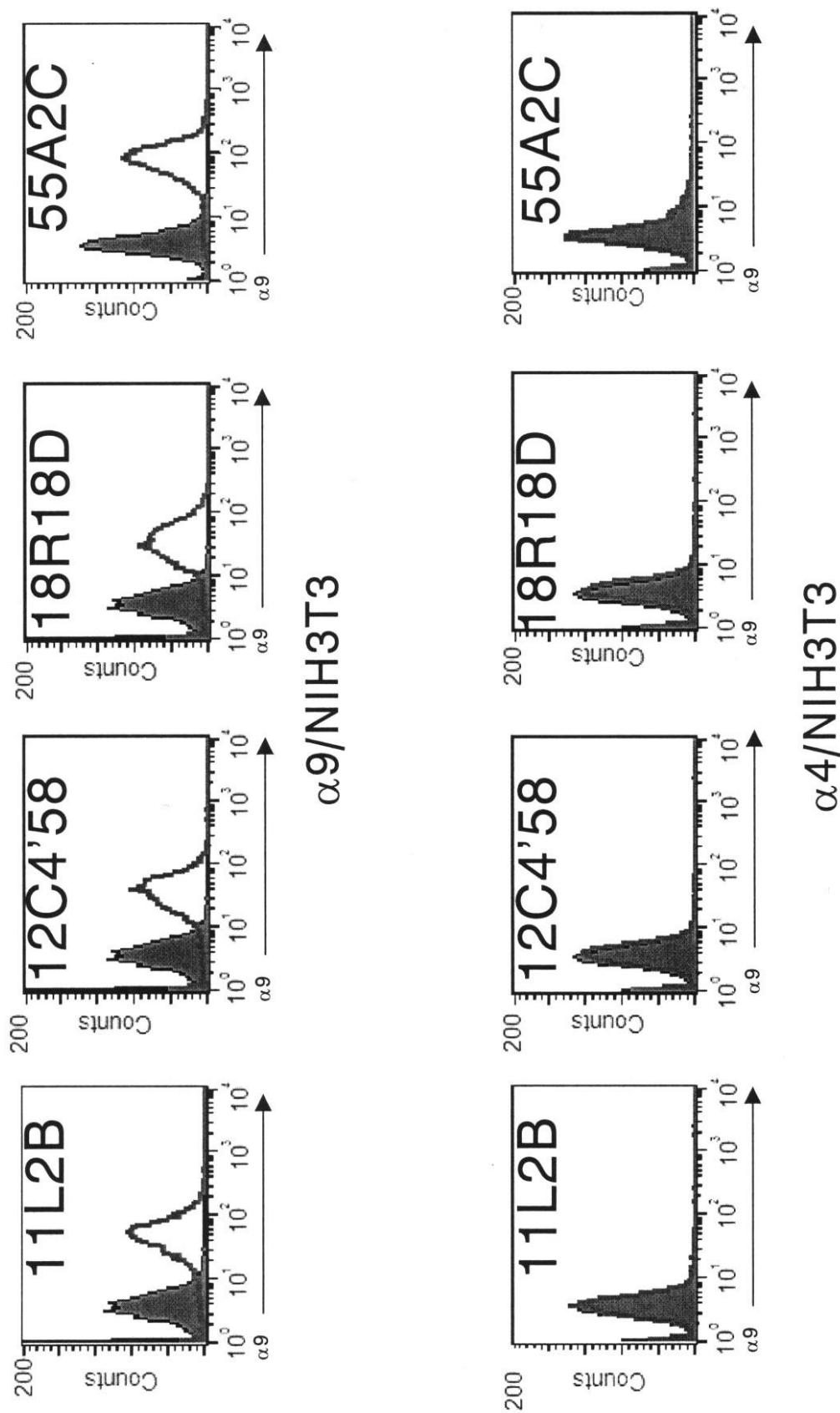


図1

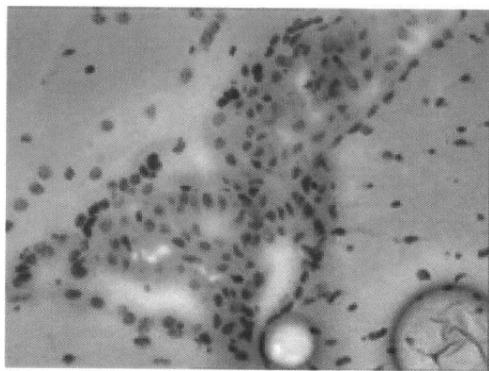
【図 2 - 1】

図 2 (その 1)

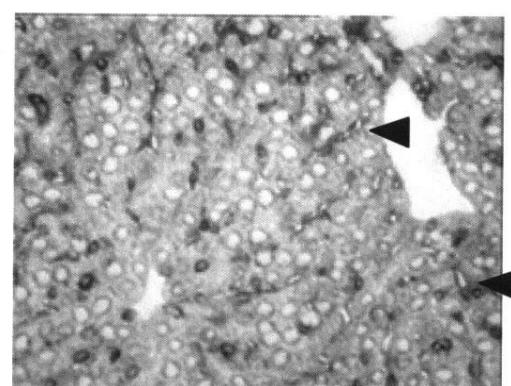
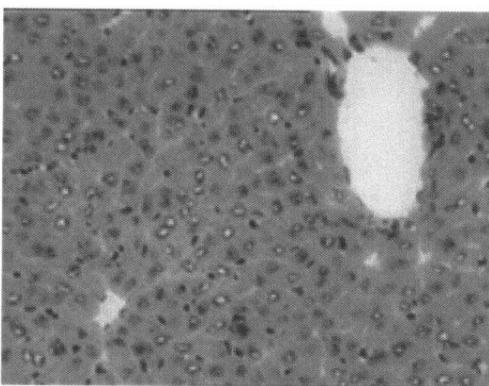


【図3】

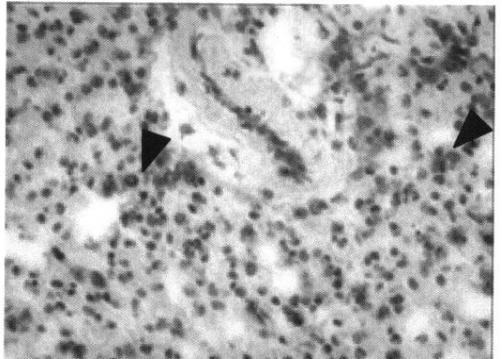
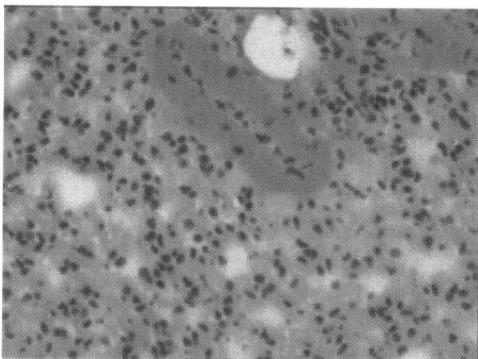
## 脳室 脈絡叢



## 肝臓 類洞細胞



## 肺胞 マクロファージ



## 筋肉 筋纖維芽細胞

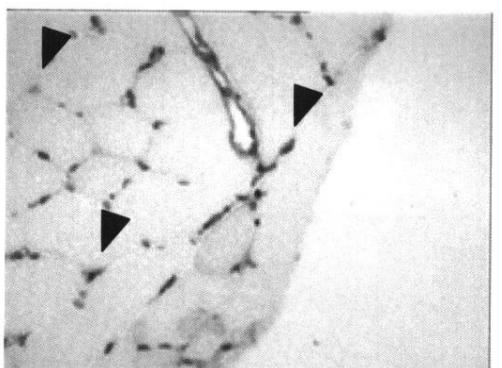
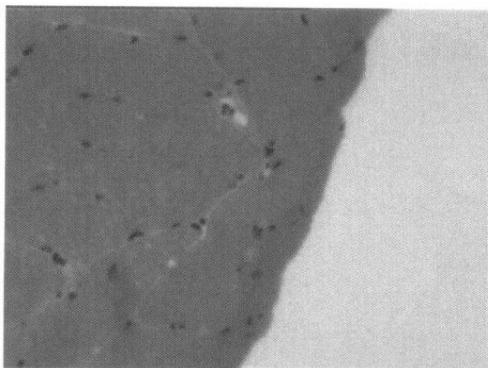


図3

【図4】

組織	$\alpha 9$ 染色性
脳	脈絡叢
眼球	—
肺	＋、血管内皮・平滑筋・肺胞マクロファージ
肝臓	＋、類洞細胞
心臓	—、(血管内皮)
腎臓	＋、血管内皮・平滑筋・糸球体
胃	＋、平滑筋・粘膜筋板
筋肉	＋、血管内皮・筋芽細胞・リンパ管
子宮	＋、血管内皮・平滑筋・動脈平滑筋

図4

【図6】

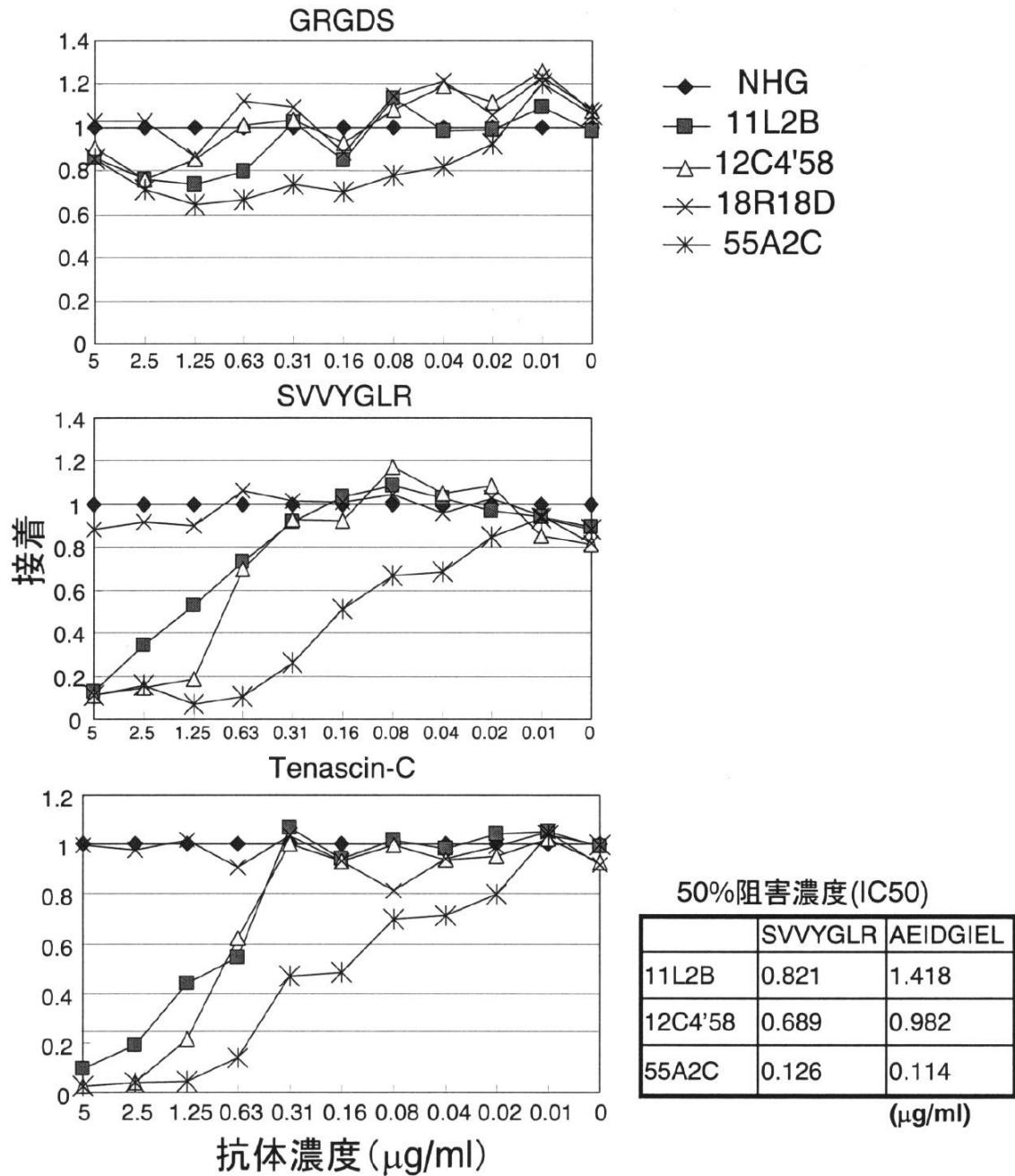


図6

【図8】

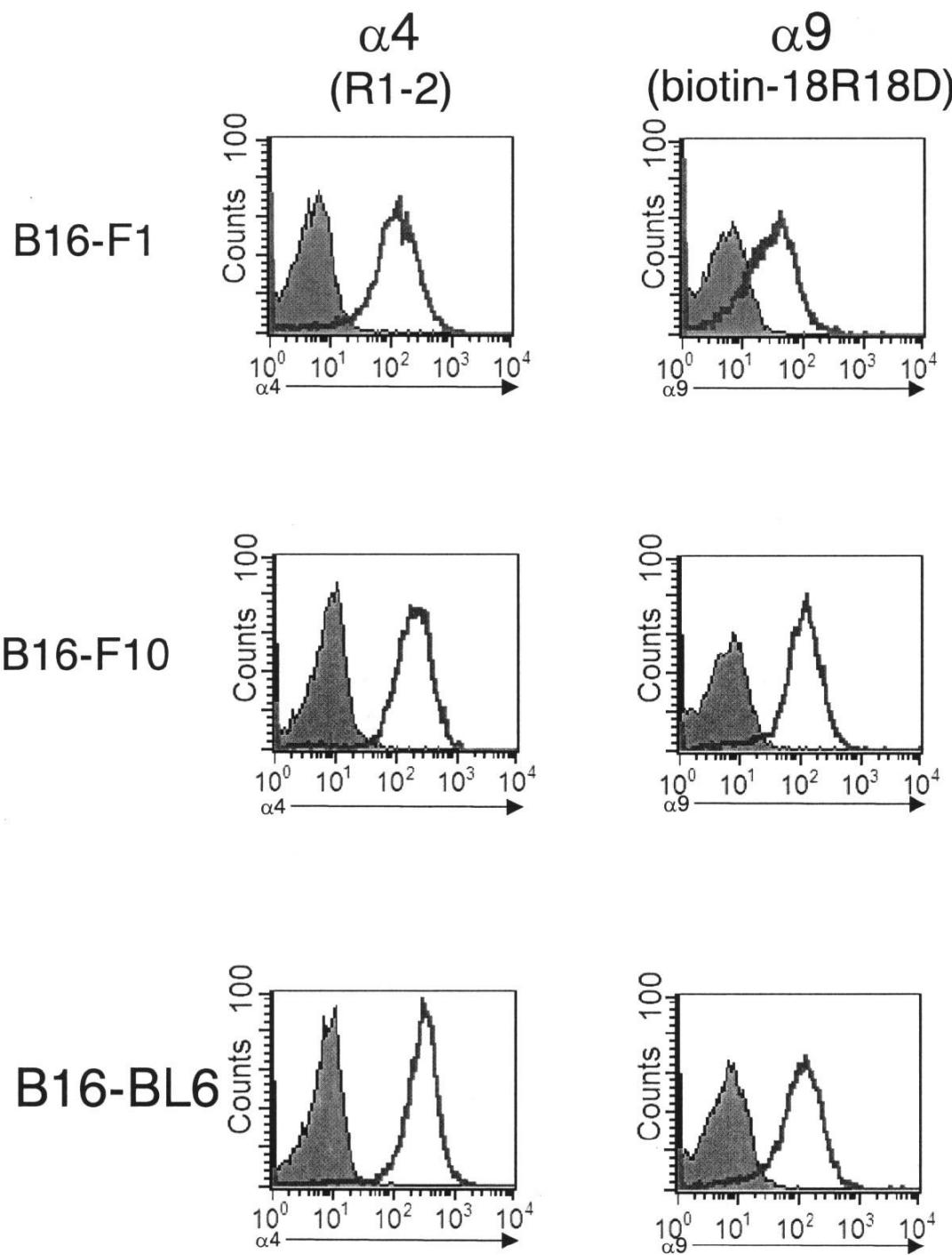


図8

【図9】

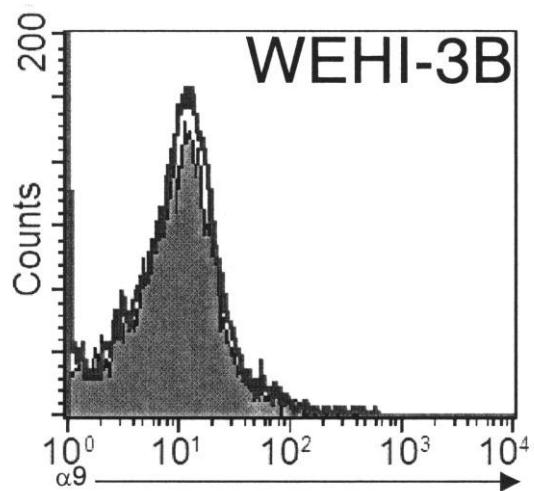
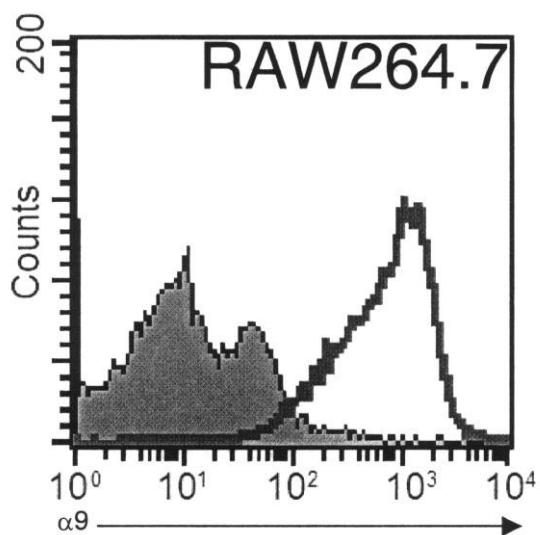


図9

【図10】

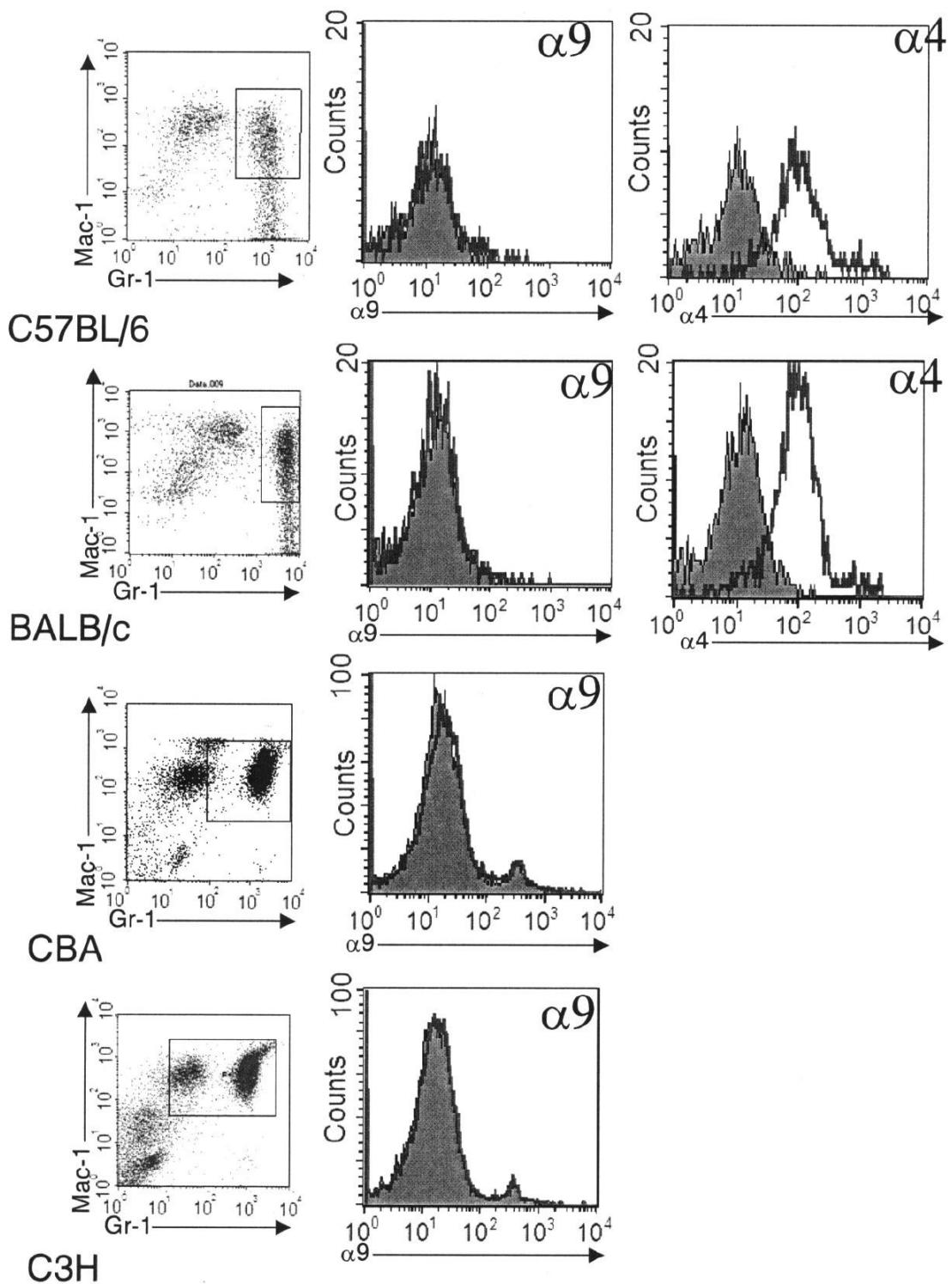
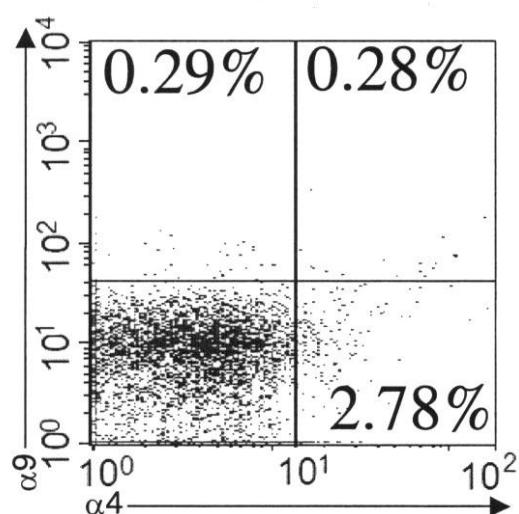


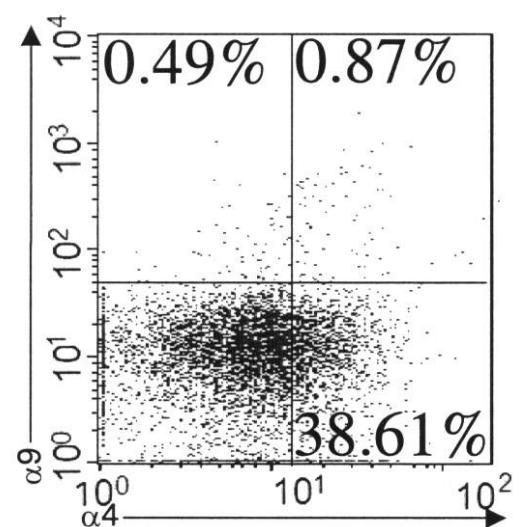
図10

【図11】

A  
 $\alpha 9$  Ab(-)  
 $\alpha 4$  Ab(-)



B  
 $\alpha 9$  Ab(-)  
 $\alpha 4$  Ab(+)



C  
 $\alpha 9$  Ab(+)  
 $\alpha 4$  Ab(+)

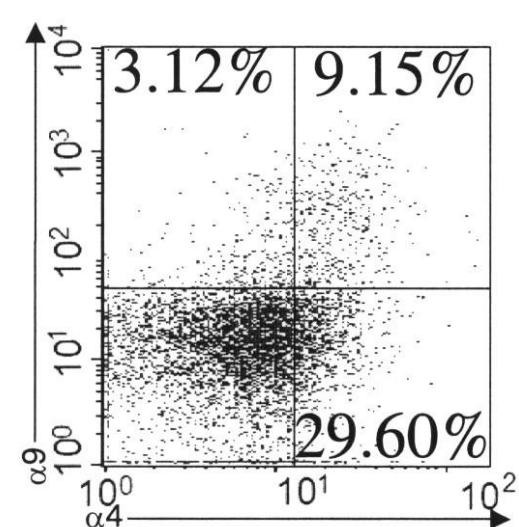
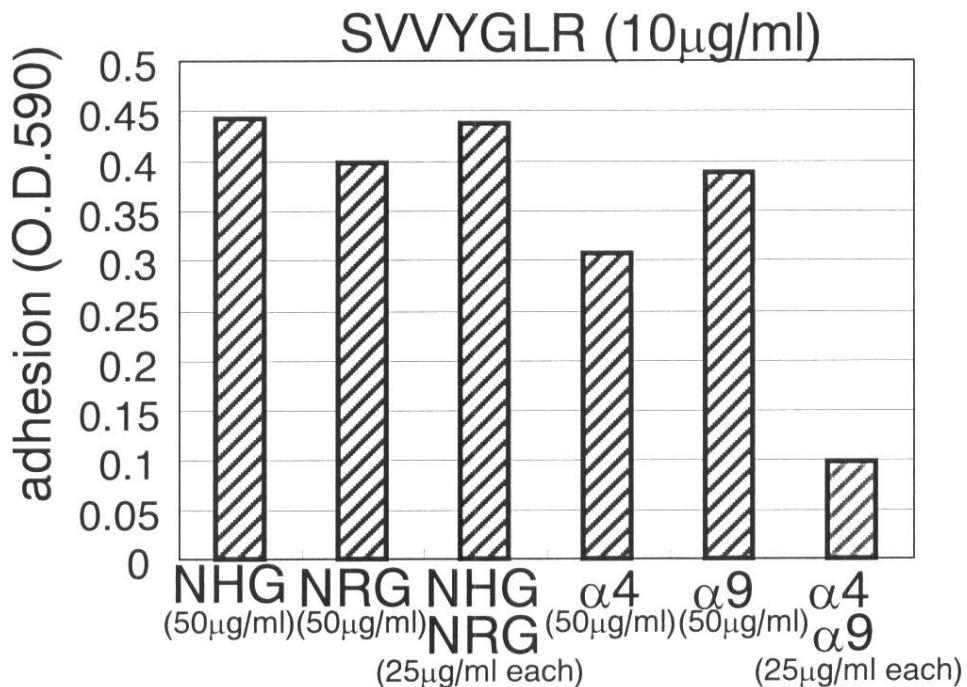


図11

【図12】

## 実験 1



## 実験 2

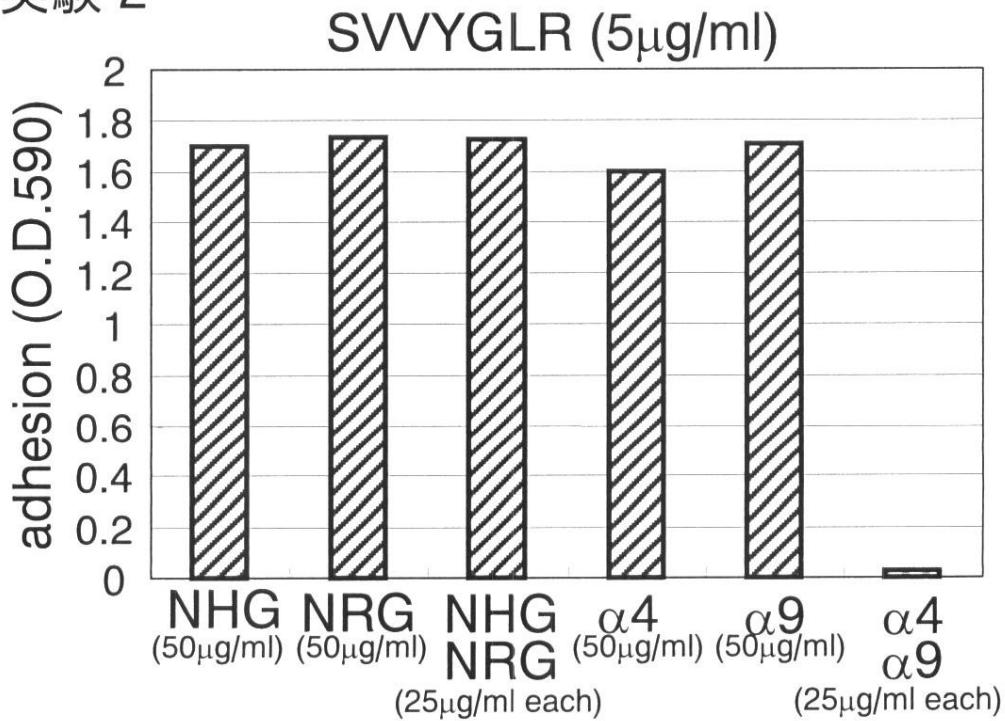


図12

【図13】

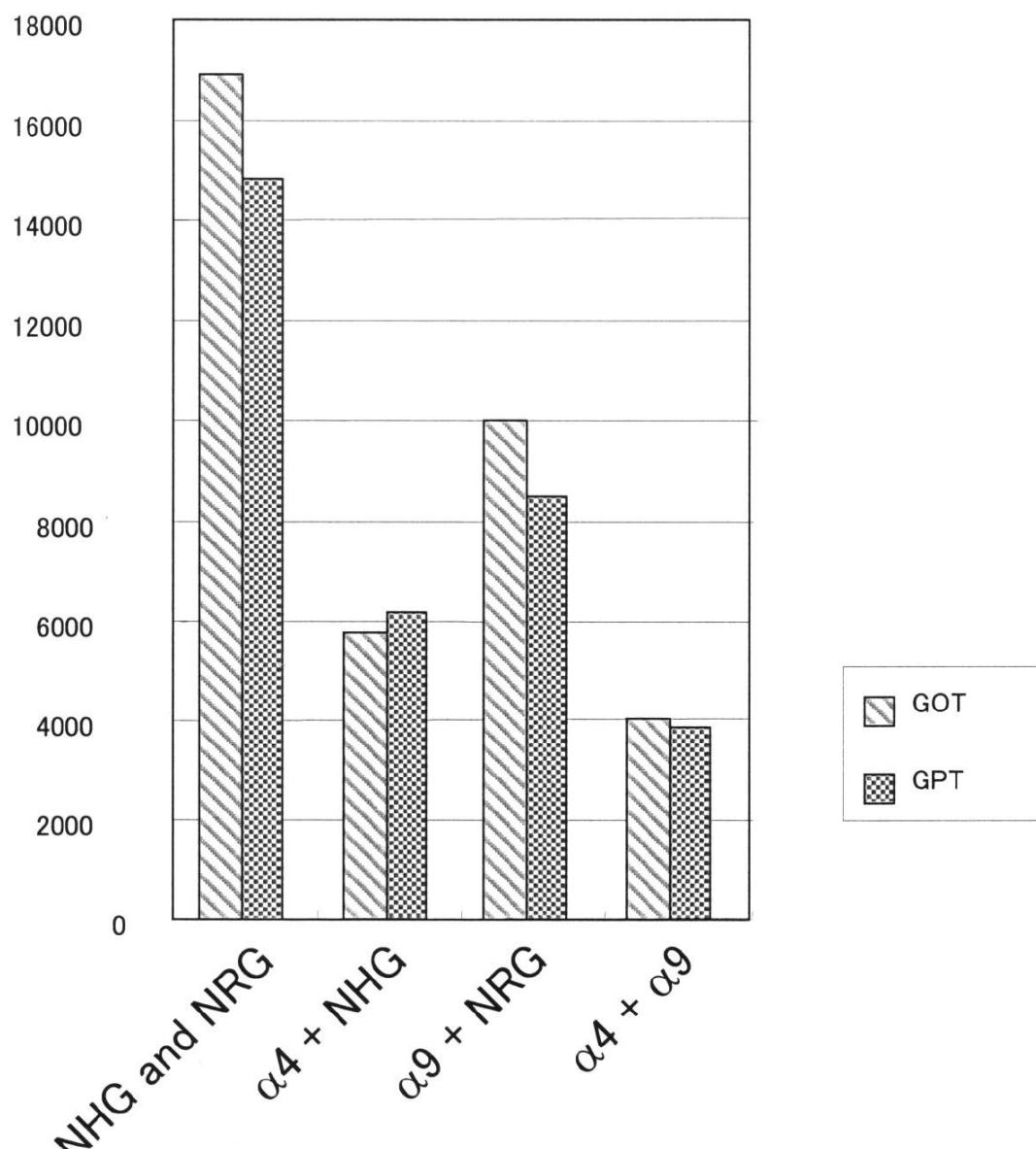


図13

【図14】

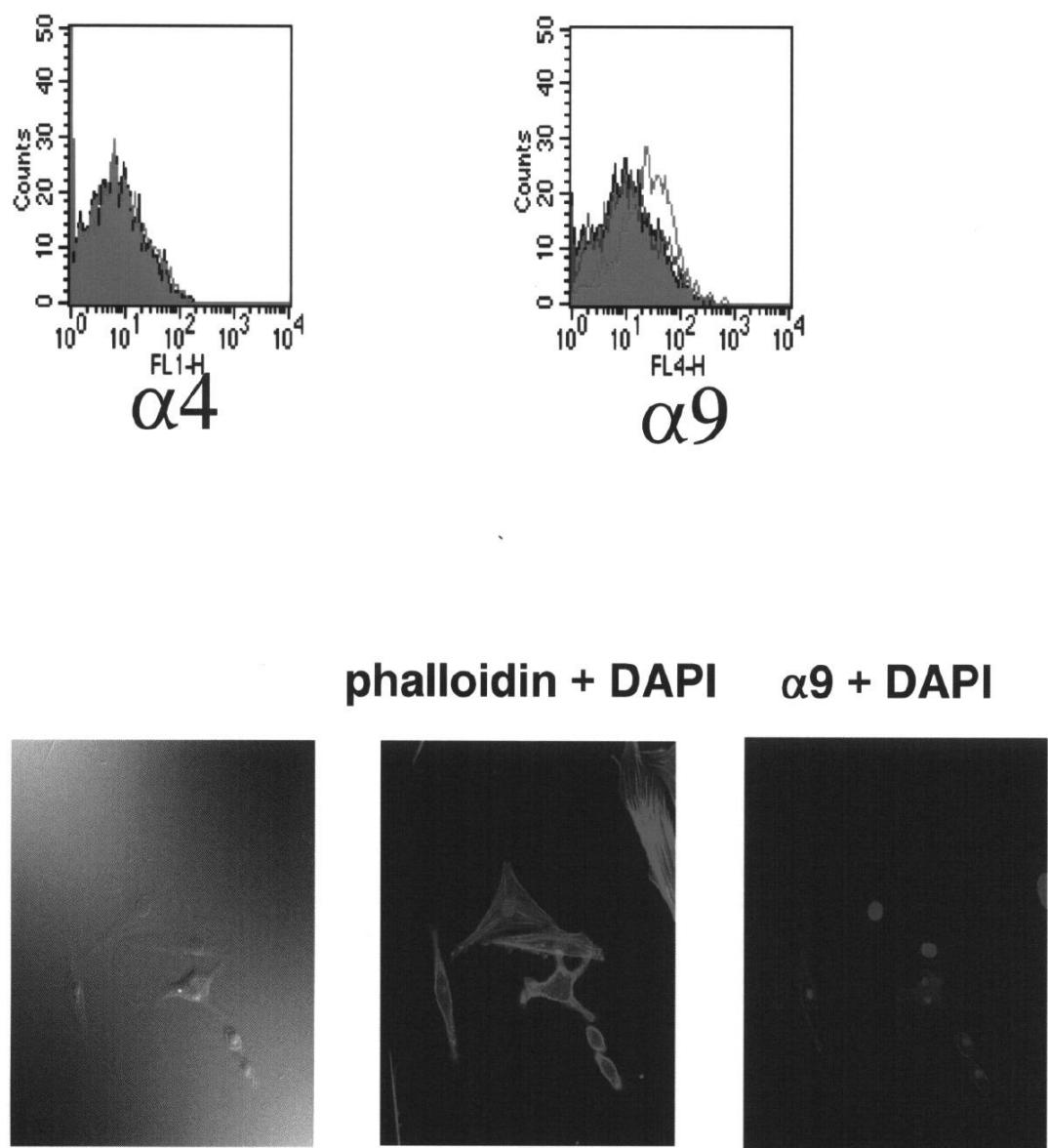
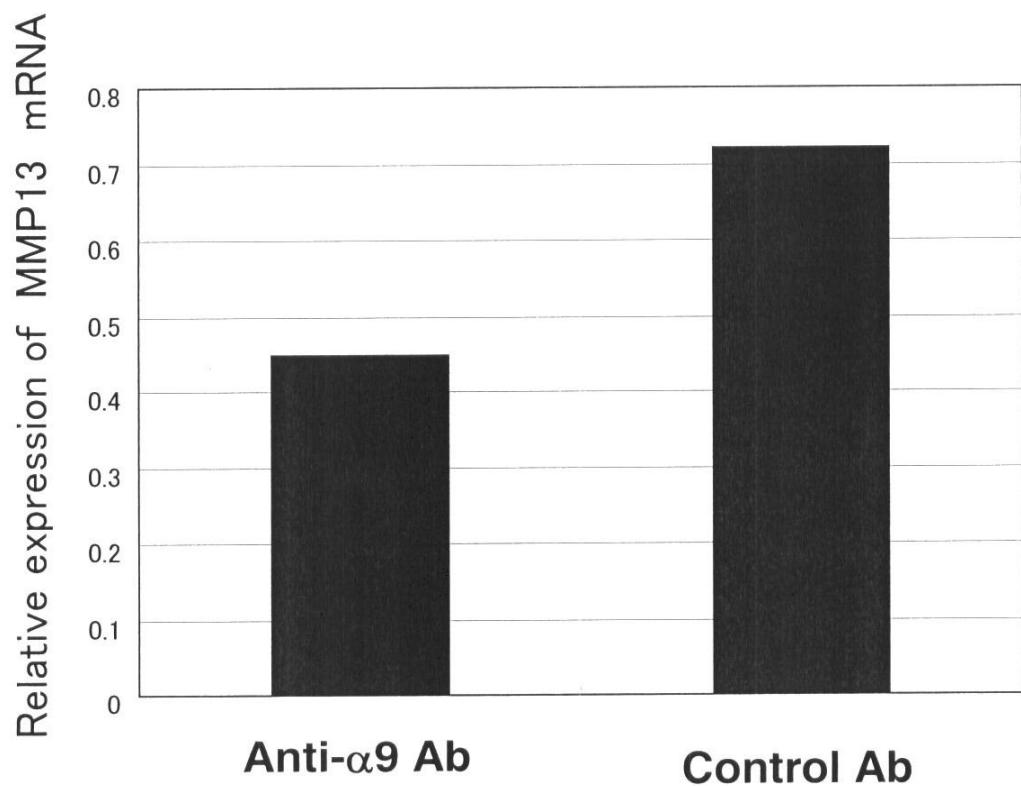


図14

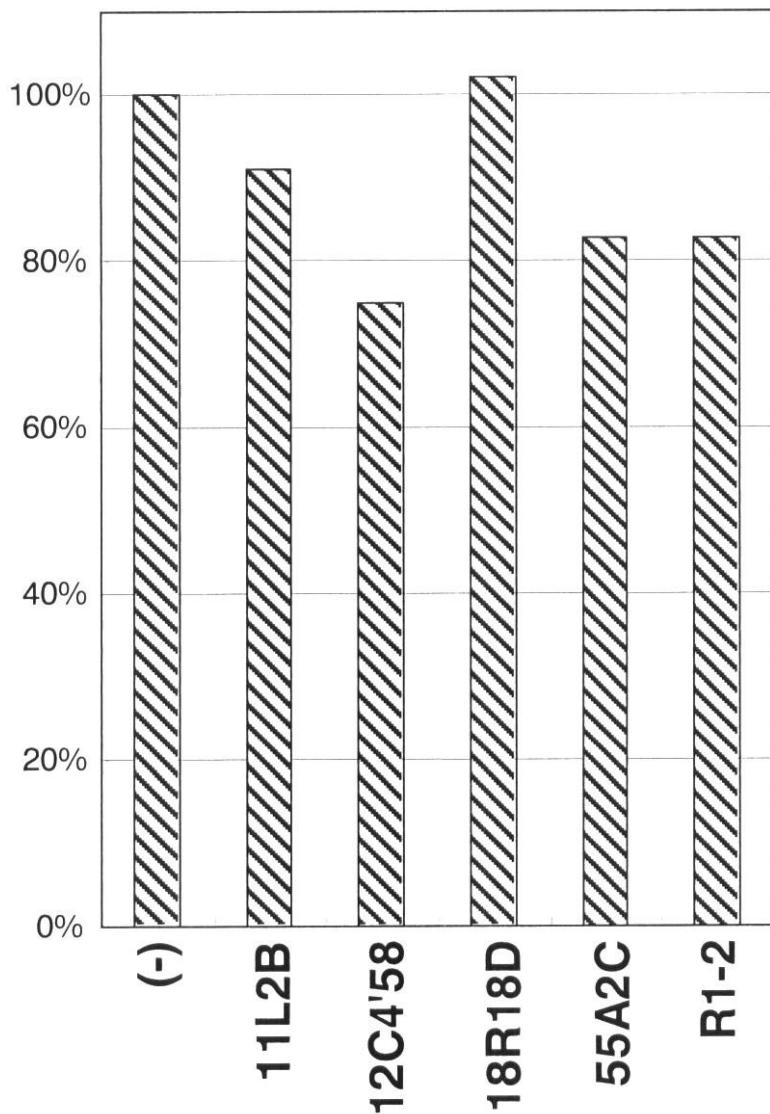
【図16】

図16



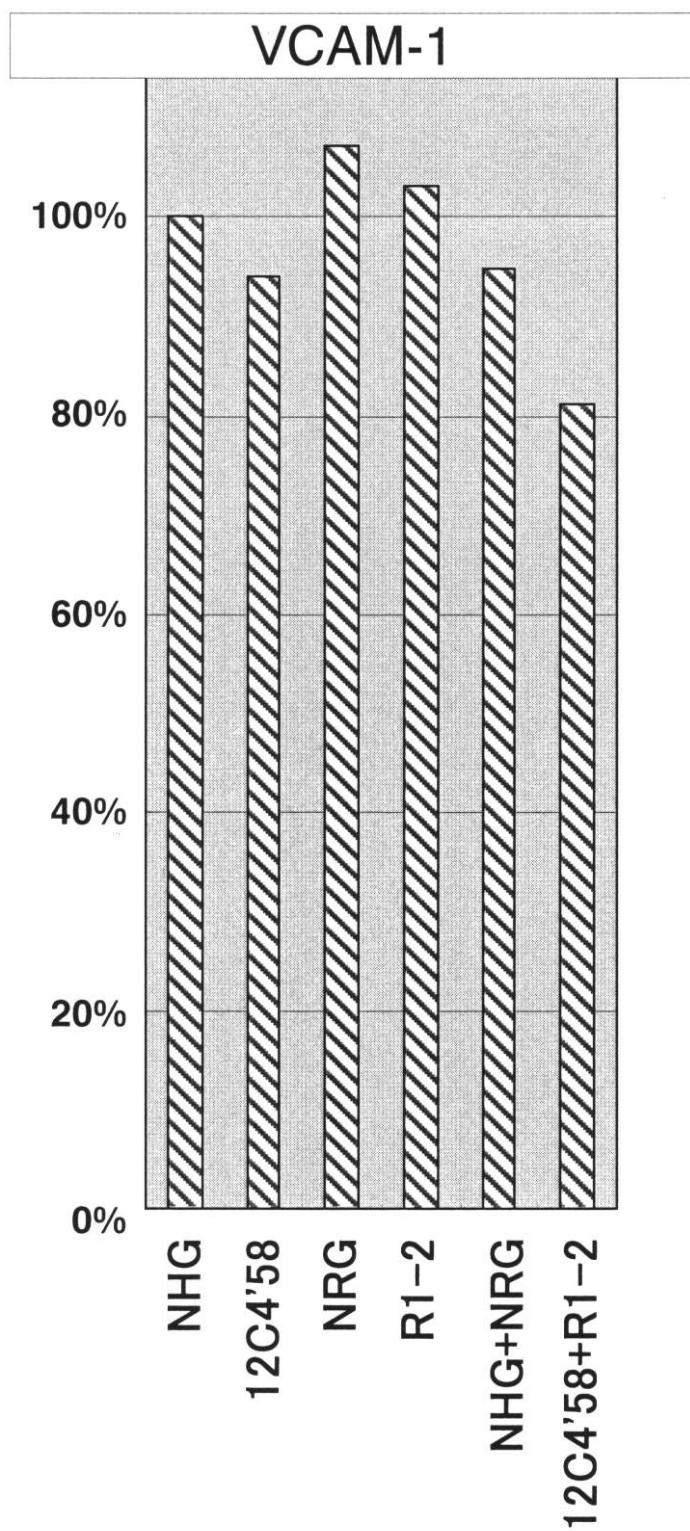
【図17】

図17



【図18】

図18

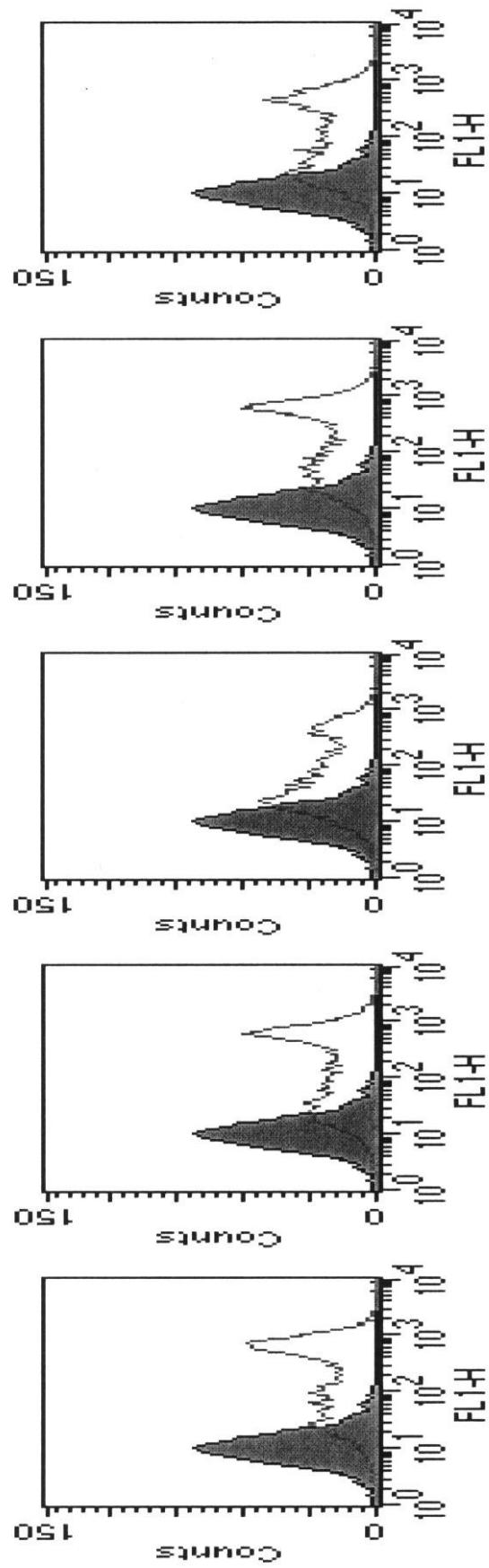


【図 19-1】

図 19 (その 1)

 $\Sigma \rightarrow \alpha_9/\text{CHO-K1}$ 

Y9A2 1K11 21C5 24I11 25B6

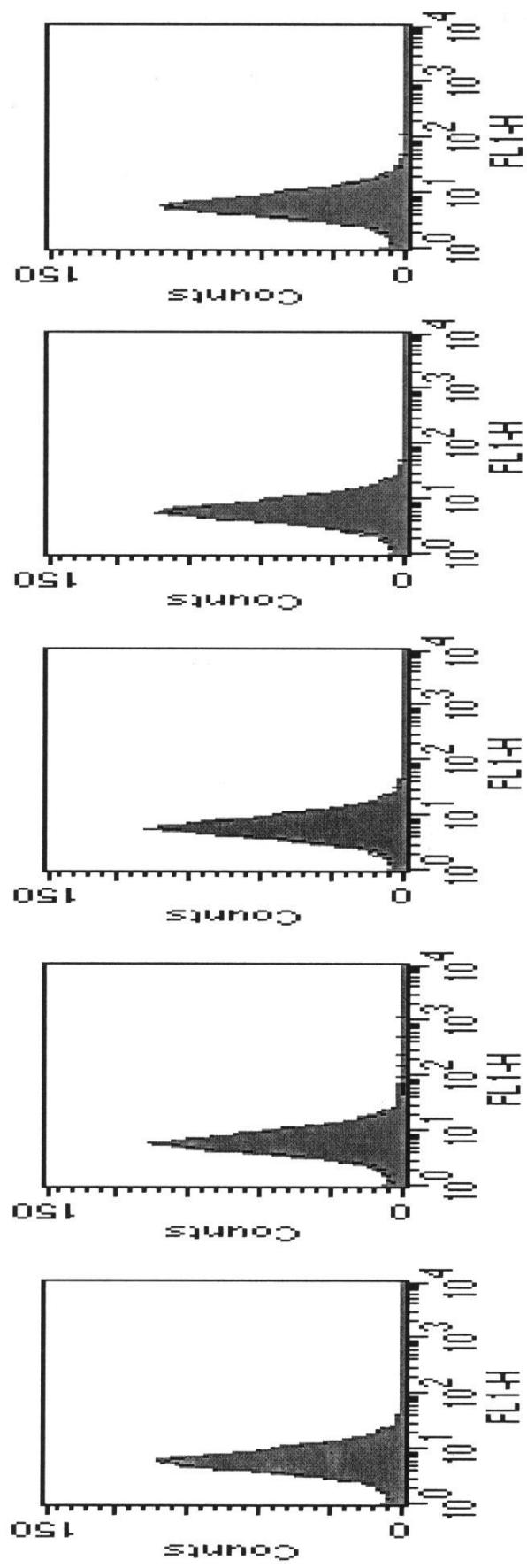


【図 19 - 2】

図 19 (その 2)

 $\Sigma \downarrow \alpha 4/\text{CHO-K1}$ 

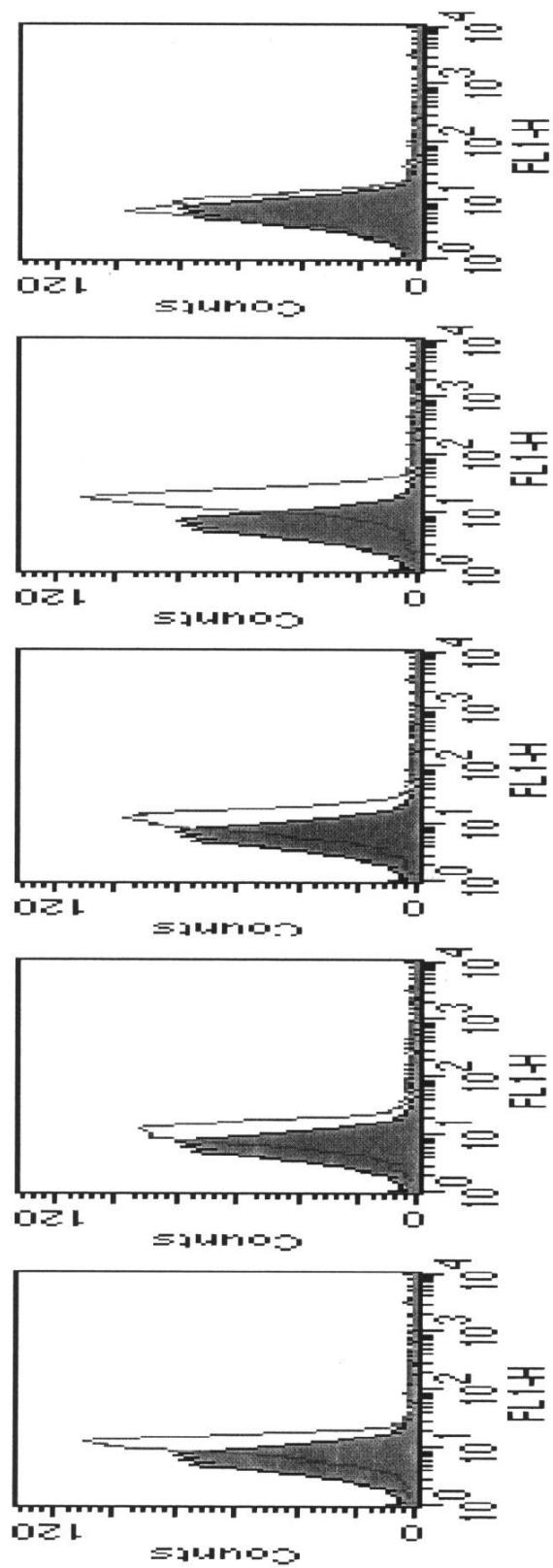
Y9A2 1K11 21C5 24I11 25B6



【図 19 - 3】

図 19 (その 3)  
Neutrophils

Y9A2 1K11 21C5 24I11 25B6



【配列表】

0004871740000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 P 1/16 (2006.01) A 6 1 P 1/16

(72)発明者 今 重之  
北海道札幌市北区北17条西6-1-1-803  
(72)発明者 上出 利光  
北海道札幌市清田区真栄5-3-8-2

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY. 1999, Vol.145, No.2, pages 413-420  
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 1996, Vol.271, No.45, pages 28485-28491  
AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY. 1996, Vol.15, No.5, pages  
664-672  
STRAUSBERG, R. L. et al., integrin alpha 9 [Mus musculus]. [online]. 27-OCT-2004. NCBI  
Entrez PROTEIN, ACCESSION NP\_598482[Retrieved on 2006-2-16]. Retrieved from the inter  
net:<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?19526904:NCBI:7445434>>

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C07K 14/00-19/00  
C12N 15/00-15/90  
PubMed  
JSTPlus(JDreamII)  
医学・薬学予稿集全文データベース  
SwissProt/PIR/GeneSeq  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq