

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6859498号
(P6859498)

(45) 発行日 令和3年4月14日 (2021.4.14)

(24) 登録日 令和3年3月30日 (2021.3.30)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 16/30 (2006.01)	C O 7 K 16/30 Z N A
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00
A 6 1 K 51/10 (2006.01)	A 6 1 K 51/10 2 O O
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 51/10 1 O O
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T

請求項の数 14 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-567991 (P2017-567991)	(73) 特許権者	510126379
(86) (22) 出願日	平成29年1月16日 (2017.1.16)		地方独立行政法人神奈川県立病院機構
(86) 国際出願番号	PCT/JP2017/001250		神奈川県横浜市中区本町2丁目22番地
(87) 国際公開番号	W02017/141604	(73) 特許権者	504137912
(87) 国際公開日	平成29年8月24日 (2017.8.24)		国立大学法人 東京大学
審査請求日	平成30年8月14日 (2018.8.14)		東京都文京区本郷七丁目3番1号
(31) 優先権主張番号	特願2016-25689 (P2016-25689)	(74) 代理人	230104019
(32) 優先日	平成28年2月15日 (2016.2.15)		弁護士 大野 聖二
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)	(74) 代理人	100119183
			弁理士 松任谷 優子
		(74) 代理人	100149076
			弁理士 梅田 慎介
		(74) 代理人	100173185
			弁理士 森田 裕

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膜型ムチン様タンパク質の認識とその医療応用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

中皮腫から得られる糖鎖修飾を有する H E G 1 タンパク質に糖鎖修飾依存的に結合するモノクローナル抗体であって、該結合はプロテナーゼ K 処理によって消失させることができる結合である、モノクローナル抗体、またはその抗原結合性断片。

【請求項2】

中皮腫から得られる糖鎖修飾を有する H E G 1 タンパク質の糖鎖部分およびペプチド部分の両方に結合する、中皮腫から得られる糖鎖修飾を有する H E G 1 タンパク質に結合するモノクローナル抗体、またはその抗原結合性断片。

【請求項3】

中皮腫から得られる糖鎖修飾を有する H E G 1 タンパク質に結合するモノクローナル抗体であって、

(1) 配列番号6のアミノ酸配列を有する C D R 1 と、配列番号8のアミノ酸配列を有する C D R 2 と、配列番号10のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号12のアミノ酸配列を有する C D R 1 と、配列番号14のアミノ酸配列を有する C D R 2 と、配列番号16のアミノ酸配列を有する C D R 3 を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体、または

(2) 上記(1)の抗体と前記 H E G 1 への結合において競合する抗体またはこれらの抗原結合性断片。

【請求項4】

10

20

中皮腫細胞株で発現された配列番号 53 のアミノ酸配列からなるペプチドに糖鎖修飾依存的に結合するモノクローナル抗体であって、該結合はプロテナーゼ K 処理によって消失させることができる結合である、モノクローナル抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 5】

抗原が、中皮腫から得られる糖鎖修飾を有する HEG1 タンパク質である、請求項 3 に記載のモノクローナル抗体、またはその抗原結合性断片。

【請求項 6】

請求項 1～5 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体の VH 領域または VH 領域および CH1 領域とヒトインテリクチンタンパク質との融合タンパク質と、該抗体の軽鎖とのタンパク質複合体。

【請求項 7】

請求項 1～5 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはこれらの抗原結合性断片、または請求項 6 に記載のタンパク質複合体を含む、中皮腫診断薬。

【請求項 8】

請求項 1～5 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはこれらの抗原結合性断片、または請求項 6 に記載のタンパク質複合体と、イメージングプローブとの結合体を含む、中皮腫の体内診断薬。

【請求項 9】

請求項 1～5 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはこれらの抗原結合性断片、または請求項 6 に記載のタンパク質複合体を含む、中皮腫診断用キット。

【請求項 10】

請求項 1～5 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはこれらの抗原結合性断片、または請求項 6 に記載のタンパク質複合体と、イメージングプローブとの結合体を含む、中皮腫の体内診断用キット。

【請求項 11】

請求項 1～5 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはこれらの抗原結合性断片と細胞傷害剤とのコンジュゲート、または請求項 6 に記載のタンパク質複合体と細胞傷害剤とのコンジュゲートを含む、中皮腫を処置することに用いるための医薬組成物。

【請求項 12】

HEG1 に対する発現抑制剤を含む、中皮腫を処置することに用いるための医薬組成物であって、発現抑制剤が、HEG1 に対する siRNA、shRNA またはアンチセンスオリゴである、医薬組成物。

【請求項 13】

生体から分離された試料において、糖鎖修飾を有する HEG1 タンパク質を検出することを含む、中皮腫の検出方法。

【請求項 14】

請求項 1～5 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはこれらの抗原結合性断片、または請求項 6 に記載のタンパク質複合体により、生体から分離された試料中の HEG1 タンパク質を検出することを含む、中皮腫の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、膜型ムチン様タンパク質の認識とその医療応用に関する。より具体的には、本発明は、中皮腫を検出する抗体および中皮腫に対する高い特異性および高い感受性を有する抗体に関する。本発明はまた、該抗体を用いた中皮腫の診断方法、並びに、該抗体を含む中皮腫診断用試薬および中皮腫診断用キットに関する。本発明はさらに、中皮腫の診断マーカーに関する。本発明はさらにまた、本発明の抗体若しくはその抗原結合性断片を含む中皮腫を処置することに用いるための医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

悪性中皮腫は、アスベストの曝露が主要原因で発生する悪性腫瘍として、大きな社会問題となっている疾患である。早期発見が困難であり、予後の悪い悪性腫瘍の一つに位置づけられている。悪性中皮腫は、転移性の腺癌や肉腫、良性の増殖である反応性中皮細胞と病理学的に類似する場合があります、病理学的鑑別にしばしば困難を伴う。また、上皮型、肉腫型など多彩な組織型をとり、診断に苦慮することも稀ではない。そのため、悪性中皮腫に特異性の高い免疫組織学的な病理診断マーカーの開発が続けられているが、頻用されている抗体でも悪性中皮腫に対する特異性が高いものばかりではなく、病理診断では陽性マーカーと陰性マーカーを組み合わせて多角的に鑑別を行うのが一般的である。

【0003】

悪性中皮腫の病理診断のための陽性マーカーとして、カルレチニン、サイトケラチン5／6（CK5／6）、メソテリン、ポドプラニン、ウィルムス腫瘍遺伝子産物-1（WT-1）などが頻用されている。これらのマーカーは一般的に高い感度（80－90％程度）で上皮型悪性中皮腫を検出する。しかし、その特異性に関しては必ずしも優れているとは言えず、肺線がんや上皮型悪性中皮腫の鑑別や、肉腫型悪性中皮腫の検出に利用できない場合がある。また、悪性中皮腫におけるカルレチニンやWT-1の核移行像は悪性中皮腫の鑑別において重要な要素となるが、これらの分子は種々の健常組織やがん細胞で細胞質に発現が認められ、発現が核内なのか細胞質なのかを判断する必要があり、病理診断マーカーとしては視認性に問題を有する。

【0004】

非特許文献1では、悪性中皮腫においてmRNAとして発現する遺伝子の解析がなされているが、分析されたmRNAレベルの上昇は統計学的に有意な現象ではないと結論付けられ、診断に利用可能な因子の特定には至っていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Melaiu O. et al., Mutation Research, 771: 6-12, 2015

【発明の概要】

【0006】

本発明は、中皮腫を検出する抗体および中皮腫に対する高い特異性および高い感受性を有する抗体を提供する。本発明はまた、該抗体を用いた中皮腫の診断方法、並びに、該抗体を含む中皮腫診断用試薬および中皮腫診断用キットを提供する。本発明はさらに、中皮腫の診断マーカーを提供する。本発明はさらにまた、本発明の抗体若しくはその抗原結合性断片を含む中皮腫を処置することに用いるための医薬組成物を提供する。

【0007】

本発明者らは、マウスにヒト中皮腫細胞を免疫して得たSKM9-2抗体が中皮腫を高感度かつ高い特異性を持って認識できることを見出した。本発明者らはまた、SKM9-2抗体の抗原がHEG1タンパク質であることを見出した。本発明者らは、この結果に基づいてHEG1タンパク質が中皮腫のマーカーとして用い得ることを見出した。本発明者らはさらに、SKM9-2抗体が糖鎖修飾依存的にHEG1タンパク質に結合することを見出した。本発明者らは、中皮腫において糖鎖修飾されたHEG1タンパク質もまた中皮腫のマーカーとして用い得ることを見出した。本発明はこのような知見に基づいてなされた発明である。

【0008】

すなわち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

[1] 中皮腫から得られる糖鎖修飾を有するHEG1タンパク質に結合する抗体、またはその抗原結合性断片。

[2] 中皮腫から得られる糖鎖修飾を有するHEG1タンパク質に糖鎖修飾依存的に結合する、上記[1]に記載の抗体、またはその抗原結合性断片。

[2'] 中皮腫から得られる糖鎖修飾を有するHEG1タンパク質の糖鎖部分およびペプチド部分の両方に結合する、上記[1]または[2]に記載の抗体、またはその抗原結合

10

20

30

40

50

性断片。

〔3〕中皮腫の細胞膜上のH E G 1 タンパク質に結合する抗体。

〔4〕請求項3記載の抗体であって、

（1）配列番号6のアミノ酸配列を有するC D R 1と、配列番号8のアミノ酸配列を有するC D R 2と、配列番号10のアミノ酸配列を有するC D R 3を含む重鎖可変領域を含む、抗体、

（2）配列番号12のアミノ酸配列を有するC D R 1と、配列番号14のアミノ酸配列を有するC D R 2と、配列番号16のアミノ酸配列を有するC D R 3を含む軽鎖可変領域を含む、抗体、

（3）配列番号6のアミノ酸配列を有するC D R 1と、配列番号8のアミノ酸配列を有するC D R 2と、配列番号10のアミノ酸配列を有するC D R 3を含む重鎖可変領域と、配列番号12のアミノ酸配列を有するC D R 1と、配列番号14のアミノ酸配列を有するC D R 2と、配列番号16のアミノ酸配列を有するC D R 3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体、

（4）上記（1）～（3）のいずれかの抗体と80%以上（例えば90%以上または95%以上）のアミノ酸配列の配列相同性を有する抗体、

（5）上記（1）～（4）のいずれかの抗体と結合において競合する抗体、若しくは

（6）上記（1）～（4）のいずれかの抗体と同じエピトープに結合する抗体

またはこれらの抗原結合性断片。

〔5〕中皮腫細胞株で発現された配列番号53のアミノ酸配列を有するペプチドに結合する抗体。

〔6〕抗原が、中皮腫から得られる糖鎖修飾を有するH E G 1 タンパク質である、上記〔4〕に記載の抗体、またはその抗原結合性断片。

〔7〕上記〔1〕～〔6〕のいずれか一項に記載の抗体のV_H領域またはV_H領域およびC H 1領域とヒトインテリクチンタンパク質との融合タンパク質と、該抗体の軽鎖とのタンパク質複合体。

〔8〕H E G 1 タンパク質に結合する抗体、上記〔1〕～〔6〕のいずれか一項に記載の抗体若しくはこれらの抗原結合性断片、または上記〔7〕に記載のタンパク質複合体を含む、中皮腫診断薬。

〔9〕H E G 1 タンパク質に結合する抗体、上記〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の抗体若しくはこれらの抗原結合性断片、または上記〔7〕に記載のタンパク質複合体と、イメージングプローブとの結合体を含む、中皮腫の体内診断薬。

〔10〕H E G 1 タンパク質に結合する抗体、上記〔1〕～〔6〕のいずれか一項に記載の抗体若しくはこれらの抗原結合性断片、または上記〔7〕に記載のタンパク質複合体を含む、中皮腫診断用キット。

〔11〕H E G 1 タンパク質に結合する抗体、上記〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の抗体若しくはこれらの抗原結合性断片、または上記〔7〕に記載のタンパク質複合体と、イメージングプローブとの結合体を含む、中皮腫の体内診断用キット。

〔12〕H E G 1 タンパク質に結合する抗体、上記〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の抗体若しくはこれらの抗原結合性断片、または上記〔7〕に記載のタンパク質複合体を含む、中皮腫を処置することに用いるための医薬組成物。

〔13〕H E G 1 に対する発現抑制剤を含む、中皮腫を処置することに用いるための医薬組成物。

〔14〕生体から分離された試料において、H E G 1 タンパク質を検出することを含む、中皮腫の検出方法。

〔15〕H E G 1 タンパク質に結合する抗体、上記〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の抗体若しくはこれらの抗原結合性断片、または上記〔7〕に記載のタンパク質複合体により、生体から分離された試料中のH E G 1 タンパク質を検出することを含む、中皮腫の検出方法。

〔16〕中皮腫から得られる糖鎖修飾を有するH E G 1 タンパク質または配列番号35の

10

20

30

40

50

アミノ酸配列において799番目～809番目のアミノ酸配列を含むその断片。

〔16'〕中皮腫から得られるO型糖鎖修飾を有するHEG1タンパク質または配列番号35のアミノ酸配列において799番目～809番目のアミノ酸配列を含むその断片。

〔17〕上記〔16〕に記載のHEG1タンパク質または前記その断片を含む、中皮腫の診断マーカー。

〔17'〕上記〔16'〕に記載のHEG1タンパク質または前記その断片を含む、中皮腫の診断マーカー。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、代表的な中皮腫のサブタイプに対するSKM9-2抗体を用いた免疫組織学染色像を示す。図1Aは上皮型中皮腫の免疫組織学染色像を示し、図1Bは肉腫型中皮腫の免疫組織学染色像を示す。図中の矢じりは、染色された箇所を示す。

10

【図2】図2は、精製SKM9-2抗原のウェスタンブロットとSDS-PAGEの結果を示す。

【図3】図3は、HEG1タンパク質をノックダウンした細胞抽出物と中皮腫細胞株で発現させた組換え可溶性HEG1タンパク質をSKM9-2抗体を用いてウェスタンブロットした結果を示す。

【図4】図4は、SKM9-2抗体の抗原認識が、脱シアル化酵素処理により弱まることを示す図である。

【図5】図5は、SKM9-2抗体の抗原が中皮腫の細胞表面に発現していることを示す図である。

20

【図6】図6は、SKM9-2抗体を産生するハイブリドーマの抗体遺伝子の重鎖および軽鎖それぞれの塩基配列およびアミノ酸配列を示す。図中では、V_H領域およびV_L領域が矢印により挟まれた領域として示されている。

【図7】図7は、SKM10-2抗体も糖鎖修飾依存的にHEG1タンパク質を検出できることを示す図である。

【図8】図8は、インテレクチン（ITLN）と融合したSKM9-2抗体のV_H領域およびCH1領域と、V_L領域およびCL領域（すなわち、SKM9-2抗体の軽鎖）とのタンパク質複合体が、SKM9-2抗体と同様にHEG1タンパク質を検出できることを示す図である。

30

【図9】図9は、インテレクチンがジオール結合を有するビーズに強く結合することを示す図である。

【図10】図10は、中皮腫細胞株の細胞増殖に対するHEG1遺伝子のノックダウンの経時的影響を示す図である。

【図11】図11は、中皮腫細胞株の細胞増殖に対するHEG1遺伝子のノックダウンの影響を示す図である。

【図12】図12は、他の中皮腫細胞株の細胞増殖に対するHEG1遺伝子のノックダウンの影響を示す図である。

【図13】図13は、SKM9-2抗体と、各ヒトHEG1断片との結合の陽性（+）および陰性（-）の別を示す図である。図13では、各ヒトHEG1断片のHEG1中での位置が示されている。図13の最下部ではアラニンスキニングの結果を示す。図13中では、改変していないアミノ酸は記号「-」で示された。

40

【図14A】図14Aは、HEG1全長、3kb断片、2kb断片および1kb断片それぞれとSKM9-2抗体との反応性を確認したウェスタンブロットの結果を示す。

【図14B】図14Bは、各HEG1断片とSKM9-2抗体との反応性を確認したウェスタンブロットの結果を示す。図14Bでは、7.6断片および7.62断片において陽性のシグナルが確認されている。

【図14C】図14Cは、各HEG1断片とSKM9-2抗体との反応性を確認したウェスタンブロットの結果を示す。図14Cでは、7.623断片と7.6231断片において陽性シグナルが確認されている。

50

【図14D】図14Dは、アラニンスキャニングの結果を示す。図中のS799Aは、配列番号35のアミノ酸配列におけるアミノ酸番号で799番目のセリンがアラニンに置換された断片を示す。

【図14E】図14Eは、ノイラミニダーゼ処理された7.6231断片とSKM9-2抗体とが反応しないことを示す。

【発明の具体的な説明】

【0010】

本明細書では、「対象」とは、哺乳動物であり得、好ましくは、ヒトである。対象は、中皮腫その他の腫瘍または癌に罹患している、またはそのリスクがある対象であり得る。

【0011】

本明細書では、「抗体」は、免疫グロブリンを意味し、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含む。好ましい抗体は、モノクローナル抗体である。抗体の由来は、特に限定されないが例えば、非ヒト動物の抗体、非ヒト哺乳動物の抗体、およびヒト抗体が挙げられる。また、抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体であってもよい。また、抗体は、二重特異性抗体であってもよい。

【0012】

本明細書では、「抗原結合性断片」とは、抗原への結合性が維持された抗体の一部を意味する。抗原結合性断片は、本発明の抗体の重鎖可変領域若しくは軽鎖可変領域またはその両方を含む。抗原結合性断片は、キメラ化またはヒト化されていてもよい。抗原結合性断片としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv（単鎖Fv）、ダイアボディー、sc(Fv)₂（単鎖(Fv)₂）が挙げられる。このような抗体の断片は、特に限定されないが例えば、抗体を酵素で処理して得ることができる。例えば、抗体をパインで消化すると、Fabを得ることができる。あるいは、抗体をペプシンで消化すると、F(ab')₂を得ることができ、これをさらに還元するとFab'を得ることができる。本発明ではこのような抗体の抗原結合性断片を用いることができる。

【0013】

本明細書では、「中皮腫」とは、中皮細胞由来の腫瘍を意味する。中皮腫としては、その発生部位から、胸膜中皮腫、腹膜中皮腫、心膜中皮腫、および精巣鞘膜中皮腫などが知られている。本明細書では、中皮腫は、良性の中皮腫および／または悪性の中皮腫を意味する。中皮腫は、組織型から、上皮型中皮腫、肉腫型中皮腫、二相型中皮腫、その他の中皮腫（線維形成型など）に大別される。

【0014】

HEG1タンパク質は、その発現や機能がほとんど分かっていないタンパク質であり、遺伝子オントロジー解析から膜タンパク質であると推定されている。ヒトHEG1タンパク質としては、米国立生物工学情報センター（NCBI）にNM_020733.1として登録された配列番号29の配列を有する遺伝子によりコードされるタンパク質（配列番号30）、配列番号31のアミノ酸配列を有するタンパク質、XM_005247666として登録された配列番号36の配列を有する遺伝子によりコードされるタンパク質（配列番号37）、配列番号32の配列を有する遺伝子によりコードされるタンパク質（配列番号33）、および配列番号34の配列を有する遺伝子によりコードされるタンパク質（配列番号35）が挙げられる。HEG1タンパク質の天然のバリエーションとしては、特に限定されないが例えば、配列番号30のアミノ酸配列においてQ145R、S305P、F602S、V980L、およびM1039Tなどの変異に対応するアミノ酸変異を有するHEG1タンパク質のバリエーションが知られている。本明細書では、HEG1タンパク質の天然のバリエーションもHEG1タンパク質に含まれる。また、ヒトHEG1タンパク質では、配列番号30のアミノ酸配列において1359番目のセリンがホスホセリンであり得る。本明細書では、配列番号30のアミノ酸配列において1359番目のセリンに対応するセリンがホスホセリンであるHEG1タンパク質も、HEG1タンパク質に含まれる。遺伝子オントロジー解析の結果から、HEG1タンパク質において、シグナルペプチド部分は、配列

10

20

30

40

50

番号30のアミノ酸配列の1～29番目に対応するドメインであり、細胞外ドメインは、配列番号30のアミノ酸配列の30～1248番目に対応するドメインであり、膜貫通ドメインは、配列番号30のアミノ酸配列の1249～1269番目に対応するドメインであり、細胞内ドメインは、配列番号30のアミノ酸配列の1270～1381番目に対応するドメインであると予想される。例えば、HEG1タンパク質には、配列番号29、32、34若しくは36により表されるDNA配列または配列番号30、31、33、35若しくは37のアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するDNAの相補鎖に対してストリンジントな条件でハイブリダイズできるDNA配列によりコードされるタンパク質も含まれ得る。ストリンジントな条件とは、例えば、ハイブリダイズ後の洗浄条件において、例えば、 $1 \times \text{SSC}$ (0.15 M NaCl 、 15 mM クエン酸三ナトリウムを含む水溶液)で 65°C で洗浄する条件を上げることができる。例えばまた、HEG1タンパク質には、配列番号30により表されるアミノ酸配列と90%以上、95%以上、98%以上、または99%以上相同なアミノ酸配列を有するタンパク質も含まれ得る。例えば、HEG1タンパク質には、配列番号30により表されるアミノ酸配列において、1または複数個のアミノ酸置換、挿入、付加および/または欠失を含んでいてもよい。

10

【0015】

本発明者らは、HEG1タンパク質は、主に中皮腫に発現することを見出した。また、本発明者らによれば、中皮腫は、HEG1タンパク質の発現量に基づき診断が可能である。従って、本発明によればHEG1タンパク質に結合する抗体を用いて中皮腫を検出することができる。本発明によればまた、HEG1タンパク質は、中皮腫の細胞膜表面上に発現し、細胞外ドメインを有する。従って、本発明の抗体は、中皮腫の細胞膜、中皮腫の細胞膜上の膜タンパク質、または中皮腫の細胞膜上のHEG1タンパク質に結合する。また、本発明の抗体は、HEG1タンパク質の細胞外ドメインに対する抗体またはその抗原結合性断片であり得る。本発明によれば、HEG1タンパク質は、高分化型乳頭状中皮腫(WDPM)にも発現するので、これらの中皮腫の検出に用いてもよい。

20

【0016】

後述の実施例によれば、HEG1タンパク質の細胞外ドメインは中皮腫ではシアル化された糖鎖修飾を受けている。従って、ある態様では、本発明の抗体またはその抗原結合性断片は、糖鎖修飾を受けたHEG1タンパク質に結合する。糖鎖修飾を受けたHEG1タンパク質は、精製してSDS-PAGEで分析すると見かけ上の分子量が $300 \text{ kDa} \sim 500 \text{ kDa}$ の範囲にブロードなバンドとして検出されうる。より詳細には、SDS-PAGEによる見かけ上の分子量は約 400 kDa であり得る。本発明のある態様では、糖鎖修飾は、中皮腫の細胞膜上に発現するHEG1タンパク質がを受けている糖鎖修飾である。

30

【0017】

ある態様では、本発明の抗体またはその抗原結合性断片は、中皮腫細胞で見出される糖鎖修飾を有するHEG1タンパク質に結合するが、その結合は糖鎖修飾依存的である。すなわち、この態様では、本発明の抗体またはその抗原結合性断片は、糖鎖修飾を有しないHEG1タンパク質(例えば、糖鎖を糖鎖分解処理によって分解したHEG1タンパク質)に対しては結合しないか、糖鎖修飾を有するHEG1タンパク質に対するよりも結合が弱い(親和性が低い)。あるいは、ある態様では、本発明の抗体またはその抗原結合性断片は、中皮腫細胞で見出される糖鎖修飾を有するHEG1タンパク質の糖鎖部分に結合する。このように本発明の抗体は、ある態様では、糖鎖修飾がなされたHEG1タンパク質に糖鎖修飾依存的に結合し得るが、糖鎖修飾は、中皮腫の細胞膜上に存在するHEG1タンパク質が有するものであり得る。ある態様では、本発明の抗体は、ディネーチャーした中皮腫細胞で見出される糖鎖修飾を有するHEG1タンパク質に結合する。ある態様では、本発明の抗体は、中皮腫細胞で見出される糖鎖修飾を有するHEG1タンパク質のディネーチャーした断片であって、配列番号35のアミノ酸配列において799番目～809番目のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有する断片に結合する。

40

【0018】

50

ある態様では、本発明の抗体またはその抗原結合性断片は、ヒト中皮腫細胞に発現するヒトH E G 1タンパク質の細胞外ドメインのエピトープには結合するが、 α 2-3ノイラミニダーゼまたは α 2-3, 6, 8ノイラミニダーゼ処理によりヒトH E G 1タンパク質に対する結合が低減するか消失する、抗体またはその抗原結合性断片である。この態様では、ヒト中皮腫細胞に発現するヒトH E G 1タンパク質の細胞外ドメインはシアル化された糖鎖修飾を受けている。本明細書では、「中皮腫から得られる糖鎖修飾を有するH E G 1タンパク質」は、中皮腫に特徴的な糖鎖修飾を有するH E G 1タンパク質であり得、例えば、シアル化されたO型糖鎖修飾であり得る。

【0019】

ある態様では、中皮腫の細胞膜、中皮腫の細胞膜上の膜タンパク質、または中皮腫の細胞膜上のH E G 1タンパク質に結合する抗体であって、

配列番号6のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 1、配列番号8のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 2、配列番号10のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 3、配列番号12のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 1、配列番号14のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 2、および、配列番号16のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 3のいずれか1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つを含む抗体が提供される。ある態様では、配列番号6のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 1、配列番号8のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 2、および、配列番号10のアミノ酸配列を有する重鎖C D R 3のいずれか1つ、2つ、または3つを含む重鎖可変領域と、配列番号12のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 1、配列番号14のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 2、および、配列番号16のアミノ酸配列を有する軽鎖C D R 3のいずれか1つ、2つ、または3つを含む軽鎖可変領域とを含む抗体が提供される。

【0020】

ある態様では、中皮腫の細胞膜、中皮腫の細胞膜上の膜タンパク質、または中皮腫の細胞膜上のH E G 1タンパク質に結合する抗体であって、

(1) 配列番号6のアミノ酸配列を有するC D R 1と、配列番号8のアミノ酸配列を有するC D R 2と、配列番号10のアミノ酸配列を有するC D R 3を含む重鎖可変領域を含む、抗体、

(2) 配列番号12のアミノ酸配列を有するC D R 1と、配列番号14のアミノ酸配列を有するC D R 2と、配列番号16のアミノ酸配列を有するC D R 3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体、

(3) 配列番号6のアミノ酸配列を有するC D R 1と、配列番号8のアミノ酸配列を有するC D R 2と、配列番号10のアミノ酸配列を有するC D R 3を含む重鎖可変領域と、配列番号12のアミノ酸配列を有するC D R 1と、配列番号14のアミノ酸配列を有するC D R 2と、配列番号16のアミノ酸配列を有するC D R 3を含む軽鎖可変領域とを含む、抗体、

(4) 上記(1)～(3)のいずれかの抗体と80%以上(例えば90%以上または95%以上)のアミノ酸配列の配列相同性を有する抗体、

(5) 上記(1)～(4)のいずれかの抗体と結合において競合する抗体、若しくは

(6) 上記(1)～(4)のいずれかの抗体と同じエピトープに結合する抗体
またはこれらの抗原結合性断片が提供される。

【0021】

ある態様では、本発明の抗体は、配列番号53の配列を有するペプチドに結合する抗体である。ある態様では、本発明の抗体は、中皮腫細胞株で発現した配列番号53の配列を有するペプチドに結合する抗体である。ある態様では、本発明の抗体は、中皮腫細胞株で発現した配列番号53の配列を有するペプチドに糖鎖修飾依存的に結合する抗体である。ある態様では、本発明の抗体は、中皮腫の細胞膜、中皮腫の細胞膜上の膜タンパク質、または中皮腫の細胞膜上のH E G 1タンパク質に結合する抗体であって、配列番号53の配列を有するペプチドに結合する抗体である。ある態様では、本発明の抗体は、中皮腫の細胞膜、中皮腫の細胞膜上の膜タンパク質、または中皮腫の細胞膜上のH E G 1タンパク質

に結合する抗体であって、中皮腫細胞株で発現した配列番号 53 の配列を有するペプチドに結合する抗体である。ある態様では、本発明の抗体は、中皮腫の細胞膜、中皮腫の細胞膜上の膜タンパク質、または中皮腫の細胞膜上の HEG1 タンパク質に結合する抗体であって、中皮腫細胞株で発現した配列番号 53 の配列を有するペプチドに糖鎖修飾依存的に結合する抗体である。

【0022】

配列相同性は、例えば、Pearson and Lipman, PNAS, 85:2444-2448, 1988 の FASTA プログラムにより、デフォルトパラメータで決定することができる。

【0023】

ある態様では、本発明の抗体は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する重鎖を有する。ある態様では、本発明の抗体は、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖を有する。ある態様では、本発明の抗体は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する重鎖と配列番号 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖とを有する。ある態様では、本発明の抗体は、重鎖可変領域（V_H 領域）として、配列番号 2 のアミノ酸配列の 20 番～132 番を有する。ある態様では、本発明の抗体は、軽鎖可変領域（V_L 領域）として、配列番号 4 のアミノ酸配列の 20 番～132 番を有する。ある態様では、本発明の抗体は、配列番号 2 のアミノ酸配列の 20 番～132 番を有する重鎖可変領域と配列番号 4 のアミノ酸配列の 20 番～132 番を有する軽鎖可変領域とを有する。ある態様では、本発明の抗体は、糖鎖修飾を受けた HEG1 タンパク質との結合において上記の抗体と競合する。

【0024】

また、本発明では、s c F v などの重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを含むキメラ抗原受容体も提供される。キメラ抗原受容体では、例えば、s c F v と T 細胞受容体 ζ 鎖とがスパーサーを介して連結する第 1 世代、C D 28 または 4-1 B B を介して連結する第 2 世代、C D 28 と 4-1 B B または O X 40 とを介して連結する第 3 世代などの様々なキメラ抗原受容体を用いることができる。

【0025】

本発明のある態様では、本発明の抗体またはその抗原結合性断片と細胞傷害剤との結合体（コンジュゲート）が提供される。本発明によれば、本発明の抗体またはその抗原結合性断片とイメージングプローブとの結合体（コンジュゲート）を含む、中皮腫を処置することに用いるための医薬組成物が提供される。本発明で用いられる細胞傷害剤としては、例えば、癌治療用の放射性同位体（例えば、P³²、Y⁹⁰、I¹³¹、I¹²⁵、Sm¹⁵³、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、At²¹¹、Bi²¹²、Pb²¹² および Lu の放射性同位体）が挙げられる。本発明で用いられる細胞傷害剤としては、例えば、抗癌剤が挙げられる。

【0026】

本発明のある態様では、HEG1 遺伝子に対する s i R N A、s h R N A、またはアンチセンスオリゴを含む、中皮腫を処置することに用いるための医薬組成物が提供される。s i R N A、s h R N A またはアンチセンスオリゴは、修飾核酸であってもよい。修飾核酸としては、例えば、蛍光色素修飾された核酸、ビオチン化された核酸、コレステリル基を導入した核酸が挙げられる。R N A は安定性を高めるために、塩基に対して 2'-O-メチル修飾または、2'-フルオロ修飾若しくは 2'-メトキシエチル（MOE）修飾をすることがあり、核酸バックボーンのホスホジエステル結合をホスホロチオエート結合に置き換えることもある。人工核酸としては、2'位の酸素原子と 4'位の炭素原子がメチレンを介して架橋型 DNA である locked nucleic acid（LNA）、デオキシリボースまたはリボースの代わりに N-（2-アミノエチル）グリシンがアミド結合したポリマーが主鎖となったペプチド核酸（PNA）などが挙げられる。s i R N A、s h R N A、またはアンチセンスオリゴは、ミセルやリポソームなどの小胞に内包されていてもよい。ミセルやリポソームなどの小胞は、例えば、20～100 nm の粒径を有するものとしてすることができる。ミセルやリポソームなどの小胞は、EPR 効果（Enhanced permeability and retention effect）により腫瘍組織に効率よく集積し、内容物を腫瘍組織に送達できるこ

10

20

30

40

50

とが知られている。このような小胞は、ポリエチレングリコールのような表面改質剤により修飾されていてもよい。本発明のある態様ではまた、H E G 1 遺伝子に対する s i R N A、s h R N A、またはアンチセンスオリゴの、中皮腫を処置することに用いるための医薬組成物の製造における使用が提供される。本発明のある態様ではさらに、中皮腫を処置する方法であって、その必要のある対象においてH E G 1 タンパク質の発現を低下させることを含む、方法が提供される。本発明のある態様では、中皮腫を処置する方法であって、その必要のある対象においてH E G 1 遺伝子に対する発現抑制剤（例えば、s i R N A、s h R N A、またはアンチセンスオリゴ）を投与することを含む、方法が提供される。

【0027】

本発明のある態様では、本発明の抗体は、抗体依存性細胞傷害活性（A D C C 活性）または補体依存性細胞傷害活性（C D C 活性）などの細胞傷害活性を有し得る。この場合、本発明の抗体は、中皮腫膜表面に発現したH E G 1 タンパク質に結合し、中皮腫細胞に対して細胞傷害活性を示し得る。このように、ある態様では、本発明の抗体またはその抗原結合性断片を有効成分として含む中皮腫を処置することに用いるための医薬組成物や中皮腫治療用薬剤が提供される。本明細書では、「処置」は治療を含む意味で用いられる。

【0028】

本発明の抗体を有効成分として含む医薬組成物または薬剤は、公知の製剤学的方法により製剤化することができる。例えば、本発明の医薬組成物または薬剤は、薬学上許容可能な賦形剤を含んでいてもよい。賦形剤は、有効成分である本発明の抗体の有効量を対象に与えるために適宜投与されうる賦形剤とすることができる。ある態様では、本発明の医薬組成物または薬剤は、注射剤とすることができ、注射用の賦形剤は、無菌の水性溶液、例えば、リンガー溶液、ハンクス溶液または生理食塩水などの薬学的に許容可能な緩衝液、ブドウ糖やその他の補助剤を含む等張液とすることができる。補助剤としては、エタノールなどのアルコール、ポリエチレングリコールなどのポリアルコール、ポリソルベート80などの非イオン性界面活性剤などが挙げられ、製剤化の際に添加することができる。注射用の油性液としては、ゴマ油、ヤシ油および大豆油を用いることができ、補助剤として、安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールを用いることができる。本発明の医薬組成物または薬剤は、注射剤の形で非経口投与（例えば、静脈内投与または胸腔内投与）することができる。

【0029】

抗体のA D C C 活性またはC D C 活性は、当業者に周知の方法により測定することができる。A D C C 活性は、例えば、中皮腫細胞とF c 受容体を発現するエフエクター細胞（例えば、N K 細胞や単球）を本発明の抗体の存在下で生理的条件下でインキュベートし、中皮腫細胞の生細胞数および／または死細胞数をカウントすることにより決定することができる。C D C 活性は、例えば、中皮腫細胞を補体を含む溶液（例えば、ヒト血清）と抗体存在下で生理的条件下でインキュベートし、中皮腫細胞の生細胞数および／または死細胞数をカウントすることにより決定することができる。

【0030】

細胞傷害活性は、当業者に周知の種々の方法によって増強することができる。例えば、F c 領域糖鎖のフコースが欠失した抗体、糖鎖にバイセクティングN-アセチルグルコサミン（G l c N A c）が結合した抗体、F c 領域のアミノ酸置換によりエフエクター細胞のF c 受容体と抗体との結合を増強し、これにより細胞傷害活性を増強する方法が知られ、このように改変した抗体も本発明の抗体として用いることができる。

【0031】

抗体は、ヒトにおける抗体自体の抗原性を低下させること等を目的として、当業者に周知の方法により、遺伝子改変抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体とすることができる。本発明の医薬組成物または薬剤においては、本発明の抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体であり得る。抗体はまた、二重特異性抗体であってもよい。

【0032】

本発明のある態様では、本発明の抗体またはその抗原結合性断片とイメージングプローブとの結合体（コンジュゲート）が提供される。本発明によれば、本発明の抗体またはその抗原結合性断片とイメージングプローブとの結合体（コンジュゲート）は、中皮腫の体外診断または体内診断に用いることができる。従って、本発明によれば、本発明の抗体またはその抗原結合性断片とイメージングプローブとの結合体（コンジュゲート）を含む、中皮腫の診断薬または診断キットが提供される。本発明によればまた、本発明の抗体またはその抗原結合性断片とイメージングプローブとの結合体（コンジュゲート）を含む、中皮腫の体内診断薬または体内診断キットが提供される。中皮腫の体内診断に用いることのできるイメージングプローブとしては、例えば、蛍光イメージングプローブ、核磁気共鳴イメージング（MRI）用造影剤などの増強剤（例えば、常磁性イオン）およびPET分子イメージングプローブなどのイメージング用の放射性核種が挙げられる。

10

【0033】

本発明の別の側面では、中皮腫から得られる糖鎖修飾（例えば、O型糖鎖修飾）を有するH E G 1タンパク質またはその断片（特に配列番号35のアミノ酸配列において799番目～809番目のアミノ酸配列を含むその断片）が提供される。本発明によれば、中皮腫から得られる糖鎖修飾（例えば、O型糖鎖修飾）を有するH E G 1タンパク質または上記その断片は、中皮腫を高感度、かつ高特異的に検出するマーカーとして用いることができる。従って、本発明のある態様では、中皮腫から得られる糖鎖修飾（例えば、O型糖鎖修飾）を有するH E G 1タンパク質または上記その断片からなる中皮腫の診断マーカーが提供される。中皮腫から得られるH E G 1タンパク質または上記その断片のO型糖鎖修飾は、シアル化されたO型糖鎖修飾であり得る。このようなH E G 1タンパク質は、例えば、配列番号30、31、33、35および37から選択されるいずれか1のアミノ酸配列と、80%以上、90%以上、95%以上または98%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列を有する中皮腫から得られるH E G 1タンパク質、または、これらの中皮腫から得られるバリエーションであり得る。中皮腫から得られる糖鎖修飾（例えば、O型糖鎖修飾）を有するH E G 1タンパク質または上記その断片は、中皮腫細胞から本発明の抗体（本発明の中皮腫から得られる糖鎖修飾（例えば、O型糖鎖修飾）を有するH E G 1タンパク質に結合する抗体）を用いて精製することができる。あるいは、H E G 1タンパク質または上記その断片は、シアル酸とG l c N A cを有するので、これらに特異的に結合するレクチン（例えば、シアル酸特異的であるW G A若しくはG l c N A c特異的であるD S Aまたはこれらの組合せ）に対するH E G 1タンパク質の親和性を利用してH E G 1タンパク質を精製することも考え得る。中皮腫から得られる糖鎖修飾（例えば、O型糖鎖修飾）を有するH E G 1タンパク質または上記その断片（特に配列番号35のアミノ酸配列において799番目～809番目のアミノ酸配列を含むその断片）は、ディネーチャーされていてもよい。断片（特にディネーチャーされた断片）は、中皮腫から得られる糖鎖修飾（例えば、O型糖鎖修飾）を有するH E G 1タンパク質において、配列番号35のアミノ酸配列において799番目～809番目のアミノ酸配列の周辺領域を含んでいてもよい。

20

30

【0034】

インテレクチン融合タンパク質および複合体

本発明では、インテレクチンと本発明の抗体のF a b断片またはs c F v断片との融合タンパク質が提供される。この融合タンパク質では、例えば、F a b断片の重鎖またはs c F v断片とインテレクチンとが融合形態として存在する。例えば、インテレクチンと本発明の抗体のV_H領域およびリンカー（例えば、C H 1領域）との融合タンパク質と本発明の抗体のL鎖との複合体が提供される。このような融合タンパク質またはタンパク質複合体は、中皮腫の細胞膜、細胞膜上の膜タンパク質、または細胞膜上のH E G 1タンパク質に結合する。本発明ではまた、本発明の抗体のs c F v断片とインテレクチンとの融合タンパク質が提供される。このような融合タンパク質またはタンパク質複合体は、インテレクチンを含み、インテレクチンはジオール構造に特異的かつ強く結合するので、ジオール構造を表出する樹脂を用いたカラム（例えば、エポキシド架橋剤で処理された多糖（デキストランやアガロース）を含むゲルやジオール修飾により親水化されたシリカゲルなど

40

50

のゲル濾過カラム)で簡単に精製することができる。例えば、表5に示すジオールセファロースビーズを用いたカラムを用いて融合タンパク質またはタンパク質複合体を精製することができる。複合体を精製した後は、抗原を連結したアフィニティークラムで融合タンパク質をさらに生成してもよい。

【0035】

本発明のある態様では、

(1) 配列番号6のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号10のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域とインテレクチンとの融合タンパク質、または

(2) 上記(1)の融合タンパク質と配列番号12のアミノ酸配列を有するCDR1と、配列番号14のアミノ酸配列を有するCDR2と、配列番号16のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域とを含む、タンパク質複合体

が提供される。上記タンパク質複合体は、中皮腫の細胞膜、中皮腫の細胞膜上の膜タンパク質、または中皮腫の細胞膜上のHEG1タンパク質に結合する。この態様では、例えば、重鎖可変領域は、CH1領域を介して、または介さずにインテレクチンと融合タンパク質を形成し得、好ましくは、重鎖可変領域はCH1領域を介してインテレクチンと融合タンパク質を形成し得る。この融合タンパク質は、生理的条件下で互いにインテレクチン部分を介して結合して多量体(主に3量体)を形成し得る。本明細書においては、単量体および多量体が、融合タンパク質に含まれる。

【0036】

本発明の上記インテレクチン融合タンパク質および複合体は、中皮腫から得られる糖鎖修飾を有するHEG1タンパク質に結合することができる。従って、本発明の上記インテレクチン融合タンパク質または複合体は、中皮腫の検出に用いることができる。従って、本発明によれば、本発明の上記インテレクチン融合タンパク質または複合体を含む、中皮腫の診断薬が提供される。本発明の上記インテレクチン融合タンパク質または複合体とイメージングプローブとの結合体は、中皮腫の体内イメージングに用いることができる。従って、本発明によれば、本発明の上記インテレクチン融合タンパク質または複合体とイメージングプローブとの結合体を含む、中皮腫の体内診断薬が提供される。また、本発明の上記インテレクチン融合タンパク質および複合体と上記で定義した細胞傷害剤との結合体は、中皮腫を処置することに用いることができる。従って、本発明によれば、本発明の上記インテレクチン融合タンパク質および複合体と上記で定義した細胞傷害剤との結合体を含む、中皮腫を処置することに用いるための医薬組成物が提供される。

【0037】

抗体の作製

抗体は、当業者に周知の方法により作成することができる。すなわち、抗原とアジュバントとを動物に免疫することと、免疫した動物の血漿を得ることによりポリクローナル抗体を得ることができる。あるいは、抗原とアジュバントとを動物に免疫し、免疫した動物からBリンパ球を得て、ミエローマと細胞融合させてハイブリドーマを形成させ、所望の抗体を産生するハイブリドーマをクローニングして得てもよい。免疫の工程は、HEG1タンパク質を中皮腫細胞株(例えば、ACC-MESO4細胞)に強制発現させ、細胞を動物に免疫してもよい。この場合、HEG1タンパク質は細胞表面に暴露するので免疫された動物はHEG1タンパク質に対する抗体を産生しうる。または、HEG1タンパク質を発現する細胞、好ましくは、中皮腫細胞株からHEG1タンパク質を精製して動物に免疫してもよい。あるいは、免疫の工程は、HEG1タンパク質の可溶化型(例えば、細胞外ドメイン)を中皮腫細胞株(例えば、ACC-MESO4細胞)に強制発現させ、培養上清から得られる可溶化型HEG1タンパク質を動物に免疫してもよい。本発明によれば、このような可溶化型HEG1タンパク質も糖鎖修飾を受けており、この糖鎖修飾は中皮腫細胞膜上でのHEG1タンパク質の修飾と類似している。

【0038】

キメラ抗体は、本分野において周知の方法により作製することができる。例えば、抗体

の定常領域をヒトの抗体の定常領域に置換することにより作製することができる。ヒト化抗体は、例えば、ヒト以外の動物由来の相補性決定領域（CDR）とヒト抗体由来のフレームワーク領域およびヒト抗体由来の定常領域とを含む。ヒト化抗体は、例えば、上記のCDRをヒト抗体に移植して得ることができる。ヒト抗体は、例えば、ヒト抗体を産生する遺伝子改変マウスに抗原を免疫することにより得ることができる。二重特異性抗体は、2つの異なるエピトープまたは抗原に結合することができる抗体であって、当業者に周知の方法で調製することができる。二重特異性抗体は、例えば、2つの異なる抗体を産生する細胞をさらに融合して、ハイブリッドハイブリドーマを作製する方法や、 V_H 領域と V_L 領域を、上記2つの領域間では対を形成できない短いリンカーを介して1本のポリペプチド鎖上で発現させ、別のポリペプチド鎖であって、前記 V_H 領域と V_L 領域と対形成する相補的な V_H 領域と V_L 領域を有するポリペプチド鎖と複合体を形成させることにより作製できる。

10

【0039】

ある抗体と抗原との結合において競合する抗体は、当業者に周知の競合アッセイなどにより得ることができる。競合アッセイで、例えば、少なくとも20%、好ましくは少なくとも20~50%、さらに好ましくは少なくとも50%、所望の抗体の結合をブロックすることができるならば、同じ抗原に対する結合において競合する抗体とすることができる。競合する抗体は、交差ブロッキングアッセイ、好ましくは、競合ELISAアッセイにより確認することができる。交差ブロッキングアッセイでは、抗原を、例えばマイクロタイタープレート上にコーティングし、ここに候補となる競合抗体存在を添加してインキュベートし、抗原と候補抗体との結合を形成させる。その後、所望の抗体を標識した上でさらにウェルに添加してインキュベートし、洗浄して、所望の抗体の結合量を定量することにより、抗体が競合したか否かを判断することができる。競合する場合には、ウェル中に残存する標識量が少なくなるはずである。

20

【0040】

本発明の別の側面では、HEG1タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片を用いて、中皮腫に罹患した患者または罹患しているリスクがある対象において中皮腫を診断する方法が提供される。

【0041】

本発明ではまた、HEG1タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片を用いて、中皮腫に罹患した患者または罹患しているリスクがある対象において中皮腫を診断するための予備的な方法（例えば、工業的方法）を提供する。本発明ではさらに、HEG1タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片を用いて、中皮腫に罹患した患者または罹患しているリスクがある対象において中皮腫細胞を検出する方法を提供する。これらの態様では、中皮腫の診断は医師により行われ、本発明は医師が診断するための方法として医師に診断の基礎情報を提供するものである。

30

【0042】

本発明の別の側面では、HEG1タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片を含む、中皮腫に罹患した患者または罹患しているリスクがある対象において中皮腫を診断するための診断薬または診断キットが提供される。診断キットは、HEG1タンパク質に結合する抗体またはその抗原結合性断片を用いて中皮腫を検出するための説明書を含んでいてもよい。また、ある態様では、上記診断薬またはキットは、本発明の抗体のいずれかまたはその抗原結合性断片を含むものであってもよい。本発明の診断薬や診断キットは下記のように中皮腫を検出するために用いることができる。

40

【0043】

中皮腫の検出

本発明では、本発明の抗体またはその抗原結合性断片と試料とを接触させることを含む、中皮腫の診断方法、中皮腫の検出方法、中皮腫の検出のための方法、および医師による中皮腫の診断を補助するための中皮腫の検出方法が提供される。

【0044】

50

本発明による中皮腫の検出は、本発明の抗体またはその抗原結合性断片と試料とを接触させて行うことができる。試料として、細胞、組織または組織切片などの生体から分離された試料を用いる場合には、当業者に周知の方法（例えば、免疫組織学染色法）により抗体の反応を検出することができる。そして、抗体の反応が観察された場合（例えば、陽性である場合）には、その試料が由来する対象が、中皮腫に罹患している可能性が高い。抗体の反応が陽性であるか否かは、Allred Score法に基づいて判定することができる（Allred DC et al., Mod Pathol, 11: 155-168, 1998参照）。Allred score法では、例えば、

合計スコア（TS）＝染色率スコア（PS）＋染色強度スコア（IS）

により合計スコアが3以上である場合に、反応が陽性であると判定することができる。PSおよびISは、以下のスコア表により求めることができる。

10

【0045】

Allred Score法によるスコア表

染色率スコア PS

- 0：染色性なし
- 1：染色率1%未満
- 2：染色率1%以上10%未満
- 3：染色率10%以上1/3未満
- 4：染色率1/3以上2/3未満
- 5：染色率2/3以上

染色強度スコア IS

- 0：陰性
- 1：弱染色性
- 2：中間染色性
- 3：強染色性

20

【0046】

本発明のある態様では、中皮腫の検出は、

本発明の抗体またはその抗原結合性断片と、中皮腫と疑われる対象から得られた試料とを接触させることと、

試料中に存在するH E G 1タンパク質（好ましくは、H E G 1タンパク質の細胞外ドメイン）の存在を、本発明の抗体を用いて検出することと

30

を含む。好ましい態様では、中皮腫の検出において、検出するH E G 1タンパク質は、糖鎖修飾を受けたH E G 1であり、より好ましくは、O型糖鎖修飾を有するH E G 1タンパク質であり、さらに好ましくは、中皮腫から得られる糖鎖修飾を有するH E G 1タンパク質である。中皮腫の検出はさらに、染色率および／または染色強度を指標として中皮腫が検出されたか否かを判定することを含んでいてもよい。ある態様では、Allred Score法に基づいて中皮腫が検出されたか否かを判定することを含んでいてもよい。ある態様では、Allred Score法に基づいて合計スコア（TS）が、2以上であるとき、好ましくは3以上である時に中皮腫が検出されたと判定することを含んでいてもよい。

本発明における中皮腫の検出においては、中皮腫から得られる糖鎖修飾を有するH E G 1タンパク質に糖鎖修飾依存的に結合する抗体を用いて、中皮腫から得られる糖鎖修飾を有するH E G 1タンパク質の存在を試料中で検出するものとして行うことができる。本発明における中皮腫の検出においては、中皮腫から得られる糖鎖修飾を有するH E G 1タンパク質に結合する抗体を用いて、中皮腫から得られる糖鎖修飾を有するH E G 1タンパク質の存在を試料中で検出するものとしてもよい。

40

本発明のある態様では、試料が組織または組織切片である場合には、抗原タンパク質またはその一部は、本発明の抗体を用いた免疫組織学染色によって検出することができる。

本発明の中皮腫の診断方法、中皮腫の検出方法、中皮腫の検出のための方法、または医師による中皮腫の診断を補助するための中皮腫の検出方法では、本発明の抗体が認識する抗原が試料中に含まれる場合には、対象から中皮腫が検出されたと決定することができる。

50

【0047】

本発明において、上皮型、二相型、肉腫型および線維形成型のいずれもが本発明の抗体によって検出できる。従って、本発明において検出対象となる中皮腫は、上皮型、二相型、肉腫型および線維形成型からなる群から選択される少なくとも1つの中皮腫である。特に従来の方法では、肉腫型中皮腫の検出は困難であったが、本発明の抗体を用いれば肉腫型中皮腫の検出が可能である。従って、本発明において検出対象となる中皮腫は、肉腫型中皮腫であり得る。

【0048】

本発明によれば、中皮腫（特に上皮型中皮腫）または肺腺癌に罹患している疑いのある対象において、中皮腫（特に上皮型中皮腫）に罹患しているか、肺腺癌に罹患しているかを鑑別することができる。従って、本発明による中皮腫の検出は、中皮腫（特に上皮型中皮腫）または肺腺癌に罹患している疑いのある対象に対して行うことができる。また、本発明によれば、中皮腫とその他の癌とを鑑別することができる。従って、本発明による中皮腫の検出は、中皮腫またはその他の癌に罹患している疑いのある対象に対して行うことができる。

10

【0049】

本発明では、中皮腫の検出は、本発明の抗体またはその抗原結合性断片の代わりに、イメージングプローブと本発明の抗体若しくはその抗原結合性断片との結合体、または上記で定義した本発明の抗体断片とインテレクチンとの融合タンパク質若しくは複合体を用いてもよい。上記で定義した本発明の抗体断片とインテレクチンとの融合タンパク質若しくは複合体はイメージングプローブとの結合体の形態であってもよい。

20

【実施例】

【0050】

実施例1：中皮腫特異的抗体の調製

【0051】

ヒト悪性胸膜中皮腫由来細胞株ACC-MESO1（RCB2292, RIKEN Cell Bank）、およびACC-MESO4（RCB2293, RIKEN Cell Bank）を10% FCSを含むRPMI 1640中で10cmディッシュにコンフルエントになるまで37℃で培養した。それぞれの細胞ディッシュ二枚分をスクレイパーで回収し、PBSで三回洗浄した。細胞を混合し、4等分して、遠心により細胞沈殿とし、-80℃で保存した。それぞれの細胞質量は一本あたり約10mgであった。

30

【0052】

冷凍保存されていた細胞沈殿を100μLのPBSに懸濁し、100μLのAddaVax（INVIVOGEN社）と混合した。六週齢のBalb/cマウス（雌）の腹腔内に全量投与し、二週間ごとに冷凍保存していた細胞沈殿を同様の方法で繰り返し投与した。計三回の免疫後、尾部静脈より血液を一滴採取し、血清を得た。AMeX固定（Sato Y et al. Am J Pathol 125:431-435 (1986)）されたACC-MESO1とACC-MESO4の細胞沈殿から作製した薄切切片を用いて免疫染色を行い、中皮腫細胞に対する抗体が産生されているかどうかを確認した。抗体価が高いマウスに対し、再度、前記と同様に細胞沈殿を用いて免疫を行い、一週間後に無菌的に脾臓を摘出した。

40

【0053】

脾臓をステンレスメッシュ上ですりつぶし、リンパ球を10mLのRPMI 1640に分散した。ピペッティングにより大きな細胞塊をほぐした後、15mLの遠心管に移し、3分静置した。大きな凝集塊を吸わないように細胞懸濁液を新しい遠心管に移し、RPMI 1640で細胞を2回洗浄し、細胞数を計測した。

【0054】

リンパ球（ 6.75×10^7 細胞）とあらかじめ培養していたミエローマ細胞（PAI）（ 5.25×10^6 細胞）を混合し、RPMI 1640で2回洗浄した後、細胞融合操作をおこなった。細胞融合はPEG 1500（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）を用い、製品付属のプロトコールに従い行った。融合後、細胞を15% FCS、10%

50

BM Condimed H1 (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)、1×HAT (Thermo Fisher Scientific社)を含むRPMI 1640 (76 mL)に懸濁し、1ウェルあたり200 μL (約 1.9×10^5 細胞/ウェル)ずつ、96穴プレート4枚にまきこんだ。37℃で3日間培養後、約100 μLの培養上清を除き、前述のHAT培養液100 μLを加え培地交換を行った。融合後5日目に約100 μLの培養上清を除き、15% FCS、10% BM Condimed H1、1×HT (Thermo Fisher Scientific社)を含むRPMI 1640を加え培地交換を行い、7日目以降、コロニーの直径が5 mm以上になっているウェルについてスクリーニングを行った。

【0055】

スクリーニングはAMeX固定されたACC-MESO1とACC-MESO4の細胞沈殿から作製した薄切切片を用いて、免疫染色により行った。薄切切片を0.5% カゼインで10分間ブロッキングし、一次抗体としてハイブリドーマの培養上清100 μLを2時間反応させた。PBSで洗浄した後、二次抗体としてthe EnVision+ kits (ダコ・ジャパン合同会社)を30分間反応させ、DABを用いて発色を行った。384ウェルをスクリーニングし、93クローンが免疫染色陽性クローンとして得られた。二次スクリーニングとして、AMeX固定されたA549の細胞沈殿から作製した薄切切片に反応しないクローン、三次スクリーニングとしてホルマリン固定された中皮腫の組織切片に反応するクローンを選別し、最終的にホルマリン固定された中皮腫以外のがんの組織切片にほとんど反応しないクローンが複数 (SKM9-2およびSKM10-2) 得られた。

【0056】

実施例2：得られたモノクローナル抗体による中皮腫の検出

上述のスクリーニングで得られたSKM9-2から産生されるモノクローナル抗体を用いて、様々なタイプの中皮腫を染色した。

【0057】

AMeX固定された細胞沈殿、またはホルマリン固定された組織をパラフィン包埋し、薄切切片を作製した。切片をスライドグラスに固定し、キシレンとエタノールで脱パラフィンと脱水を行い、各種条件下で抗原の賦活化を行った。切片を3% 過酸化水素で5分間処理して内在性ペルオキシダーゼを失活させた後、PBSで洗浄し、0.5% カゼインで10分間ブロッキングを行った。一次抗体を含む溶液を100 μL加えて室温で2時間処理した後、PBSで洗浄し、Histofine Simple Stain MAX-PO (Multi) (ニチレイバイオサイエンス社)、ベンタナ ultraView DAB ユニバーサルキット (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) またはthe EnVision+ kitsを用いて発色させた。切片をヘマトキシリン染色したあと脱水し、マリノール (武藤化学株式会社)を用いて封入して、顕微鏡にて観察を行った。抗原の賦活化条件は、カルレチニン、メソテリン、およびSKM9-2抗原が98℃ 40分間、サイトケラチン5/6 (CK5/6)、ポドプラニン、ウィルムス腫瘍遺伝子産物1 (WT-1)が95℃ 64分間とした。賦活化溶液はカルレチニン、CK5/6、ポドプラニンが1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)を含む10 mM Tris緩衝液 (pH 9.0)、WT-1、メソテリン、SKM9-2抗原が0.1% Tween-20を含む10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0)であった。一次抗体は以下の通りを用いた：カルレチニン、ウサギ抗カルレチニンポリクローナル抗体 (PAD:DC8) (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo, Japan); CK5/6, マウス抗サイトケラチン5, 6モノクローナル抗体 (D5/16B4) (ニチレイバイオサイエンス社); メソテリン, マウス抗ヒトメソテリンモノクローナル抗体 (5B2) (Leica Micro-systems, Inc., Bannockburn, IL); ポドプラニン, マウス抗ポドプラニンモノクローナル抗体 (D2-40) (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社); WT-1, マウス抗ヒトWT-1モノクローナル抗体 (6F-H2) (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)。

【0058】

中皮腫の代表的な染色像は、図1AおよびBに示される通りであった。SKM9-2抗体は上皮型 (図1A)、肉腫型 (図1B) それぞれを良好に染色できた。また、表1に示

されるようにSKM9-2抗体は、他のいずれの抗体よりも感度高く中皮腫を検出することができた。以下、陽性の判定は、Allred scoreに基づく判定で1以上となった細胞が細胞に占める割合が10%以上の場合に陽性とした。

【0059】

【表1】

表1：SKM9-2抗体による中皮腫の検出

中皮腫タイプ	SKM9-2 抗体	カルレ チニン	CK5/6	ボドブ ラニン	WT-1	メソテ リン
上皮型	62/66	52/60	57/66	56/66	60/66	53/60
肉腫型	7/9	2/9	3/9	4/9	7/9	2/9
二相型	12/13	10/11	11/13	10/13	11/13	8/11
線維形成型	3/4	0/4	0/4	2/4	1/4	0/4
感度 (%)	91.3	76.2	77.2	78.3	85.9	75.0

10

【0060】

上記の通りSKM9-2抗体が各型の中皮腫を高感度に検出できることが明らかになった。また、良性または悪性度の低い中皮腫である高分化型乳頭状中皮腫(WDPM)についてもSKM9-2抗体により良好に染色することができた(1例中1例)。

20

【0061】

次に、中皮腫に対する検出の特異性を確認するため、他の癌の検出特性をそれぞれの抗体と比較した。ここでは、「その他の癌」としては中皮腫との鑑別診断上問題となりやすい、胃癌、大腸癌、乳癌、卵巣癌、腎細胞癌、尿路上皮癌を、「軟部の肉腫」としては癌肉腫、脂肪肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、線維肉腫、滑膜肉腫、消化管間質肉腫(GIST)、ユーイング肉腫、胞巣状軟部肉腫(ASPS)、孤在性線維性腫瘍、悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNST)、血管肉腫、類上皮血管内皮腫、類上皮血管肉腫、2相性滑膜肉腫を、「骨の肉腫」としては軟骨肉腫、骨肉腫をそれぞれ複数種類ずつ測定した。結果は表2に示される通りであった。

30

【0062】

【表2】

表2：他のマーカーを抗原とする抗体と比較したSKM9-2抗体の中皮腫特異性

	SKM9-2 抗体	カルレ チニン	CK5/6	ボドブ ラニン	WT-1	メソテ リン
肺癌	0/98	23/98	41/98	13/98	0/98	44/98
その他の癌	1/60	5/60	24/60	7/60	4/60	7/60
軟部の肉腫	2/132	27/132	22/132	34/132	7/132	9/132
骨の肉腫	0/20	0/20	0/19	12/20	0/17	0/20
特異性 (%)	99.0	82.3	71.8	78.7	96.4	80.6

40

【0063】

表2に示されるように、SKM9-2抗体は、中皮腫に特異性が高く、他の種類の腫瘍または癌との鑑別が高い精度で行えることが明らかとなった。また、SKM9-2抗体は健常組織を認識することはほとんどなかった。なお、SKM9-2抗体において陽性となったのは、尿路上皮癌(1/10)、平滑筋肉腫(1/10)および類上皮血管内皮腫(1/6)のわずか3例であった。

【0064】

従来の中皮腫診断抗体として知られるカルレチニン抗体、サイトケラチン5/6抗体、

50

メソテリン抗体およびWT-1抗体はそれぞれ、高い感度で上皮型中皮腫を検出することができる。しかし、これらの抗体は表2から明らかなように、必ずしも特異性は優れておらず、肺腺癌と上皮型中皮腫の鑑別が困難であったり、肉腫型中皮腫の検出が困難であることが知られていた。さらには、カルレチニンやWT-1は種々の健常組織や癌組織で細胞質には発現が認められ、中皮腫で特徴的な核移行像と誤認するリスクがあり、この点で鑑別が容易な使いやすいマーカーでは無かった。対照的に、SKM9-2抗体は、陽性か陰性かにより簡便に中皮腫を鑑別できる上に、上皮型中皮腫および肉腫型中皮腫のどちらの検出も可能であるという点で従来の抗体よりも優れていた。また、中皮腫とそれ以外の癌との鑑別も可能であった。

【0065】

10

また、正常組織に対するSKM9-2抗体の反応性を免疫組織学染色により確認した。明らかな病変が見られない健常組織についてSKM9-2抗体を用いて免疫染色を行った。結果は、表3に示される通りであった。

【0066】

【表3】

臓器	陽性件数／ サンプル数	臓器	陽性件数／ サンプル数
食道	0/2	甲状腺	0/5
胃	0/3	大脳	0/29
十二指腸	0/2	リンパ節	0/4
大腸	0/6	乳腺	0/5
肝臓	0/8	卵巣	0/4
脾臓	0/10	精巣	1/5
胆嚢	0/5	前立腺	0/10
腎臓	0/10	筋	0/4
膀胱、尿管	0/5	心筋	0/12
胸膜	0/5	血管	*5/8
腹膜	0/2	気管支	0/12
精巣漿膜	0/1	肺	0/23
心膜	1/1		

20

*一部の細胞が陽性

【0067】

表3に示されるように、心膜中皮細胞と血管内皮細胞において陽性像が見られたが、大部分の組織において陰性となった。精巣では精細管が陽性となる例が一例あった。心膜中皮細胞以外の正常中皮細胞は陰性で、中皮腫細胞と正常組織の判別性に優れていると考えられた。また、血管内皮細胞も陰性の細胞が多くを占め、陽性細胞は一部の細胞であった。

【0068】

このことから、SKM9-2抗体の認識する抗原は、中皮腫診断において極めて有用なマーカーたり得ると示唆された。

40

【0069】

実施例3：得られたハイブリドーマの解析

実施例1および2において、中皮腫細胞に特異性の高いモノクローナル抗体が得られたことが明らかとなったので、SKM9-2抗体の抗原の同定および抗体の抗原認識特性の更なる解析を行った。

【0070】

(1) SKM9-2抗体の抗原精製

ACC-MESO4を大量に培養し、細胞溶解液より抗原の精製を行った。10cmディッシュ240枚分の細胞を1% Triton X-100, 1% CHAPS, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, プロ

50

テアーゼ阻害剤 (Complete ロシュ・ライフサイエンス社) を含む 50 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) で可溶化し、次いで遠心した。得られた上清を 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に 4℃ で 18 時間透析して酸性沈殿物を得た。沈殿を 0.1% Tween 20、150 mM NaCl を含む 20 mM Tris 緩衝液 (pH 7.2) で抽出し、遠心後の上清をアミコン ウルトラ-15, 100 kDa (メルク・ミリポア社) を用いて濃縮、および 6 M 塩酸グアニジンを含む 20 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) に溶液交換した。濃縮液に終濃度 10 mM の Tris (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩を加え 60℃、30 分間加熱した後、終濃度 40 mM のヨードアセトアミドを加え、室温で 3 時間反応させた。反応液を 6 M 塩酸グアニジン、0.05% Tween 20 を含む 20 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) 中でゲル濾過クロマトグラフィ (Superose 6 Increase 10/300GL (GE ヘルスケア社)) を行い、ドットプロットにて陽性となる画分を集めた。サンプルを 4 M 尿素、0.05% Tween 20 を含む 25 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対し室温で一晩透析し、Mono Q 5/50GL (GE ヘルスケア社) にアプライした。4 M 尿素、0.05% Tween 20 を含む 25 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) でカラムを洗浄後、0~1 M の NaCl 塩濃度勾配により溶出を行った。ドットプロットで強陽性となる画分を集め、150 mM NaCl、0.05% Tween 20 を含む 25 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) に対し、室温で一晩透析し、WG A-Sepharose (J オイルミルズ社) 1 mL にアプライした。緩衝液で洗浄後、0.2 M N-アセチルグルコサミン、150 mM NaCl、0.05% Tween 20 を含む 25 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) で溶出し、溶出液を Centricon (YM-30) (ミリポア社) を用いて濃縮した。3 M GdnHCl、0.5% CHAPS を含む 25 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中でゲル濾過クロマトグラフィ (Superose 6 Increase 10/300GL (GE ヘルスケア社)) を行い、ドットプロットで強陽性となる画分を 0.5% CHAPS を含む 20 mM NH_4HCO_3 に対して室温で一晩透析し、精製抗原を得た。

【0071】

ドットプロットは以下の通りに行った。PVDF 膜 (Immobilon-P メルク・ミリポア社) をメタノールに浸した後、純水にて洗浄、浸漬した。空気を挟まないよう水を含ませた濾紙上に親水化した PVDF 膜をおき、余分な水分を除去後、サンプルを 1~5 μL 、マイクロピペットでドット状にしみ込ませた。膜を室温で一晩乾燥させたのち、メタノールと純水で再度親水化し、5% スキムミルク、0.1% Tween 20、150 mM NaCl を含む 20 mM Tris 緩衝液 (pH 7.4) (ブロッキングバッファー) で、室温 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキングバッファーで 1,000 倍希釈した SK M9-2 ハイブリドーマのマウス腹水を室温で 1 時間、一次抗体として反応させた後、0.1% Tween 20、150 mM NaCl を含む 20 mM Tris 緩衝液 (pH 7.4) (TBST) によって膜を洗浄した。ブロッキングバッファーにて 30,000 倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG (Jackson ImmunoResearch 社) を室温で 1 時間反応させ、TBST で洗浄後、ECL prime (GE ヘルスケア社) にて発色、検出を行った。

【0072】

精製抗原をウェスタンブロッティングにより確認した。サンプルを 6% SDS-PAGE、または 4-15% ミニプロティアン TGX プレキャストゲル (Bio-Rad 社) にて分離し、0.01% SDS を含む 10 mM CAPS 緩衝液 (pH 10.5) を用いてサブマリン型転写装置によりサンプルを PVDF 膜に転写した。転写された膜は、ドットプロットと同様にブロッキング、抗体反応を行い、ECL prime (GE ヘルスケア社) にて発色、検出を行った。発色後、6 M 塩酸グアニジン、0.1% Tween 20、1% 2-メルカプトエタノールを含む 20 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) で膜を室温 15 分間洗浄し、純粋でよく洗浄した後、再度ブロッキング操作を行った。コントロール抗体として 5,000 倍希釈したマウス抗 β -アクチンモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich 社) を用い、同様の操作により検出を行った。

【0073】

結果は図2に示される通りであった。図2に示されるように、常法によりCBB染色すると約400kDaの位置にバンドが検出され、このバンドはウェスタンブロッティングによりSKM9-2抗体により認識された。従って、上記の操作によりSKM9-2抗体の抗原が精製できたことが明らかとなった。

【0074】

(2) SKM9-2抗原(HEG1)の同定

CBB染色で約400kDaを示した上記のバンドを切りだし、ペプチダーゼ処理後に質量分析(nano-LC MS/MS)を行い、Mascot searchにより候補蛋白質を同定した。その結果、候補タンパク質としてProtein HEG homolog 1(HEG1)が得られた。

10

【0075】

一方で、上記実施例ではSDS-PAGEによるSKM9-2抗体の抗原の分子量は約400kDaと見積もられており、推定されるHEG1タンパク質の分子量(約150kDa)と齟齬があった。そこで以下の実験により、SKM9-2抗体がHEG1タンパク質を認識しうるかを確認した。

【0076】

まず、ウェスタンブロット法によりSKM9-2抗体の認識するバンドが、HEG1に対する発現抑制で減弱するかを確認した。加えて、ACC-MESO4で産生された組換え可溶性HEG1がウェスタンブロット法によりSKM9-2抗体により検出できるかを確認した。

20

【0077】

ヒトHEG1に対する以下3種類のsiRNA(H1097, H2674, H3671)を作製し、HEG1の発現抑制を行った。

H1097センス鎖: GAUCUUUGACGGUCAGUCUGG (配列番号23)

H1097アンチセンス鎖: AGACUGACCGUCAAGAUCGC (配列番号24)

H2674センス鎖: CCUAUAGCCGUACAGACUACA (配列番号25)

H2674アンチセンス鎖: UAGUCUGUACGGCUAUAGGGC (配列番号26)

H3671センス鎖: GCAAGUCGGGAUACUUUCAGU (配列番号27)

H3671アンチセンス鎖: UGAAAGUAUCCCGACUUGCAC (配列番号28)

30

陰性対照としては、Mission Negative control SIC-001, confidential sequences (Sigma社製)を用いた。

具体的には、これらのsiRNAをそれぞれLipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific社)を用いてACC-MESO4にトランスフェクションした。72時間培養後、細胞をPBSで洗浄し、1% SDS、125mU/mL Benzonase nuclease (メルク・ミリポア社)を含む20mM Tris緩衝液(pH8.0)を25μL/cm²加え、氷上で5分間静置し、可溶化液を回収した。遠心後の上清をサンプルとし、6% SDS-PAGEで分離後、ウェスタンブロットを行った。また、ヒトHEG1に対するshRNAを発現するレンチウイルスを用いての発現抑制も行った。レンチウイルス粒子(sc-78365-V)はサンタクルズ社より入手したのを用い、製品プロトコールに従いACC-MESO4に感染させた。48時間後から10μg/mLのピューロマイシンを用いて薬剤選択を開始し、10日後まで生存し増殖している細胞をshRNA安定発現細胞として用いた。可溶化以降の操作はsiRNA処理の場合と同様に行った。陰性対照としては、cop GFP対照レンチウイルス粒子(sc-108084、サンタクルズ社製)を用いた。

40

【0078】

結果は図3に示される通りであった。中皮腫細胞のHEG1を3種類のsiRNAで発現抑制すると、いずれのsiRNAでもSKM9-2抗体が認識するバンドに対するSKM9-2抗体の反応性が減少した。また、市販のレンチウイルス粒子を用いたHEG1に対するshRNA発現でもSKM9-2抗体の反応性が減少した。このことから、SKM

50

9-2抗体は、HEG1タンパク質を認識することが示唆された。

【0079】

ACC-MESO4よりクローニングしたHEG1 cDNA（配列番号32および34）のうち、配列番号32に示される塩基配列の細胞外領域に対応する塩基配列（配列番号32の1～4059番）にFLAGタグおよびHisタグを接続した遺伝子（配列番号17）をpcDNA3.1（-）（Thermo Fisher Scientific 社）のXhoIサイトとNotIサイト間に挿入し、組換え可溶型HEG1発現プラスミドを作製した。このプラスミドを、ACC-MESO4に、Lipofectamine LTX Reagent with PLUS Reagent（Thermo Fisher Scientific 社）を用いてトランスフェクションし、750 μg/mLのジェネティシン（Thermo Fisher Scientific 社）により薬剤選択を行った。二週間後に生存、増殖している細胞を集め、組換え可溶型HEG1安定発現細胞とした。この細胞の培養上清40 mLをHisTrap excel（1 mL）（GEヘルスケア社）に添加し、10 mM イミダゾール、0.5 M NaClを含む25 mM リン酸緩衝液（pH 7.2）でカラムを洗浄後、同緩衝液中で、10～500 mMのイミダゾール濃度勾配により溶出を行った。ドットブロットによりSKM9-2抗体の結合が陽性となる画分を集め、アミコン ウルトラ-15, 100 kDa（メルク・ミリポア社）を用いて濃縮し、10 mM

EDTA、6 M塩酸グアニジンを含む20 mM Tris緩衝液（pH 8.0）に溶液交換後、0.1% Tween 20を含む25 mM リン酸緩衝液（pH 7.2）に溶液交換し、部分精製された組換え可溶型HEG1とした。組換え可溶型HEG1はSKM9-2抗原と同程度の分子量を示し、SKM9-2抗体により認識された（図3）。このことから、HEG1タンパク質は中皮腫で産生される際、翻訳後修飾等を受け、大幅に分子量が増加すること、SKM9-2抗体は中皮腫に発現する翻訳後修飾を受けたHEG1を認識していることが示唆された。

【0080】

（3）エピトープに含まれるHEG1の翻訳後修飾

HEG1タンパク質のSDS-PAGEによる見かけ上の分子量は約400 kDaであり、予想されるタンパク質の分子量である148 kDaと比較してかなり大きなものであった。この原因を探るため、HEG1タンパク質のアミノ酸一次配列を解析したところ、HEG1は多数のO型、N型糖鎖修飾を受けることが予想された。そこで、精製抗原を糖鎖切断酵素により処理し、SKM9-2抗体の反応性を解析した。

【0081】

具体的には、ACC-MESO4細胞から精製したHEG1タンパク質を、未処理で、または、各種酵素で処理した後にSKM9-2抗体の反応性を確認した。反応性は上記の通りドットブロット法により確認した。

【0082】

結果は図4に示される通りであった。図4に示されるように、抗原をノイラミニダーゼ処理すると、SKM9-2抗体は結合しなくなった（組換え可溶型HEG1でも同様。図省略）。α2-3ノイラミニダーゼ処理で抗原に対する抗体の反応性が消失することから、SKM9-2抗体のエピトープにはα2-3結合されたシアル化糖鎖が含まれることが示唆された。

【0083】

このように、ACC-MESO4細胞では、HEG1タンパク質はシアル化糖鎖修飾された状態で発現していることが明らかとなった。また、SKM9-2抗体は、HEG1タンパク質の糖鎖修飾依存的に認識することが明らかとなった。なお、実施例1においてヒト悪性胸膜中皮腫由来細胞株で免疫したマウスの血清からポリクローナル抗体を得て、ノイラミニダーゼによりHEG1タンパク質を処理した後にドットブロットを行ったところ、HEG1抗体の認識がノイラミニダーゼ処理により弱まった。このことから、得られた抗体には、HEG1タンパク質を糖鎖修飾依存的に認識する抗体が多数含まれると考えられる。

【0084】

さらに結果を詳細に解析すると、図4に示されるように、N-グリカナーゼ（PNGase F）処理では抗体の反応性は消失しないことから、エピトープに含まれる糖鎖はO型糖鎖と考えられた。さらに、Proteinase K処理によって抗体の反応性が消失する事から、エピトープにはペプチド領域も含まれることが予想された。これらの結果から、SKM9-2抗体は、HEG1タンパク質の糖鎖部分とペプチド部分とを認識する抗体であることが示唆された。一方で、市販の抗HEG1抗体は、ペプチド抗原に対する抗体であり、Santa Cruz Biotechnology社のヤギポリクローナル抗体である抗HEG1抗体（HEG1 (N-13): sc-102592）や、Bioss Inc.社のウサギポリクローナル抗体である抗HEG1抗体は、中皮腫から精製されるHEG1タンパク質には反応しなかった。

【0085】

10

(4) HEG1タンパク質の細胞膜上の局在

HEG1タンパク質が免疫組織学染色により細胞膜上に局在することから、SKM9-2抗体がHEG1タンパク質の細胞外領域に結合するのか、細胞内領域に結合するのかを調べた。

【0086】

まず、ACC-MESO4を培養し、ディッシュに接着した細胞をスクレイパーにて培養ディッシュより剥離した。剥離した細胞とSKM9-2抗体とを反応させ、次いでFITC標識抗マウスIgGで処理して、フローサイトメーターにて解析した。陰性対照としては細胞に結合することが無い2D2抗体を用いた。SKM9-2抗体がHEG1タンパク質の細胞外領域に結合する場合には、細胞がFITC標識されることになるのでフロー

20

【0087】

図5に示されるように、SKM9-2抗体は、細胞膜表面上に露出するHEG1タンパク質部分に結合することが明らかとなった。

【0088】

実施例4：SKM9-2抗体の配列決定

本実施例では、SKM9-2抗体のDNA配列およびアミノ酸配列を決定した。

【0089】

SKM9-2ハイブリドーマの培養上清をIsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)を用いて解析したところ、SKM9-2抗体のサブクラスはIgG1、L鎖はkappaであることが示唆された。そこでハイブリドーマよりTRIZOL (Life Technologies社)を用いてRNAを抽出し、マウスIgG1およびkappa鎖の遺伝子配列データベース情報をもとに設計したプライマーを用いて5'RACE (タカラバイオ株式会社)を行った。これにより、SKM9-2抗体のH鎖およびL鎖のオープンリーディングフレームの全塩基配列を決定した。結果は図6に示される通りであった。

30

【0090】

実施例5：SKM10-2抗体のHEG1タンパク質への反応性

実施例1において中皮腫を特異的に認識する抗体として得られたSKM10-2抗体について、その反応特異性を確認した。

40

【0091】

組換え可溶性HEG1（実施例3の(2)参照）およびACC-MESO4の細胞可溶化液を6%SDS-PAGEで分離し、SKM10-2の培養上清を用いてウェスタンブロットを行った。結果は、図7に示される通りであった。図7に示されるように、SKM10-2抗体は、HEG1タンパク質を認識した。また、図7に示されるように、糖鎖分解処理によりその反応性が消失することから、SKM10-2抗体は、SKM9-2抗体と同様にHEG1タンパク質に糖鎖依存的に結合する抗体であることが明らかになった。また、SKM10-2抗体は、SKM9-2抗体とHEG1タンパク質との結合に関して競合することができる。

50

【0092】

実施例6：インテレクチン融合Fabの作製

S KM 9-2 抗体の Fab 断片とインテレクチンとの融合タンパク質を作製して、このインテレクチン融合抗体が HEG 1 タンパク質を認識できるかどうかを確認した。

【0093】

S KM 9-2 抗体の H 鎖の V_H 領域および CH1 領域と、ヒトインテレクチン（配列番号 20）の 19～313 番目のアミノ酸とを融合させたタンパク質（配列番号 21）を、S KM 9-2 抗体の L 鎖と細胞に共発現させて、インテレクチン融合抗体を得た。インテレクチンは、ジオール構造と極めて高い特異性および高い親和性を有し、ジオール修飾ゲルを充填したカラムによって、高度に精製可能であることを発明者らは明らかにしている。そこで、インテレクチン融合抗体を含む培養上清をジオールセファロースを充填したカラムに添加し、1, 2-プロパンジオールを用いて溶出し、精製インテレクチン融合抗体を得た。ジオールセファロースは 1, 4-ビス（2, 3-エポキシプロピル）ブタンが導入されたセファロースビーズ（epoxy-activated Sepharose 6B（GEヘルスケアバイオサイエンス社）のエポキシ基をアルカリ加水分解し作製した。このインテレクチン融合抗体が HEG1 タンパク質を認識できるかをウェスタンブロット法により確認した。ウェスタンブロットは、インテレクチン融合抗体を 1 次抗体として用い、2 次抗体としては西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗ヒトインテレクチン抗体を用いた。結果は、図 8 に示される通りであり、インテレクチン融合抗体は、S KM 9-2 抗体と同じく糖鎖修飾 HEG 1 タンパク質を認識した。

【0094】

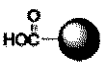
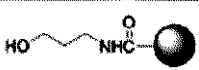
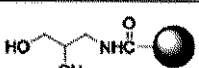
インテレクチンは、ジオール構造と結合することを本発明者らは解明した。すなわち、ヒトインテレクチン-1 を強制発現させた RK-13 細胞の培養上清（リコンビナントヒトインテレクチン-1 と 5% FCS を含む MEM 培地）500 μ L に、表 4 に示されるように、ジオール構造を含むビーズまたは含まないビーズを加え、25℃で 18 時間攪拌した。その後、遠心分離によりビーズを回収し、回収されたビーズを 0.1% Tween 20、150 mM NaCl を含む 20 mM Tris 緩衝液（pH 7.2）で一回洗浄し、15% グリセロールを含む緩衝液で溶出した。溶出されたサンプルを SDS-PAGE により分離して CBB 染色を行った。ここで、ジオールビーズとしては、ポリスチレンビーズの表面に 3-アミノ-1-プロパンジオールをアミノ基を介して結合させたビーズを用い、ジオールセファロースビーズとしては、1, 4-ビス（2, 3-エポキシプロピル）ブタンが導入されたセファロースビーズ（epoxy-activated Sepharose 6B（GEヘルスケアバイオサイエンス社）のエポキシ基をアルカリ加水分解したものを用いた。

【0095】

結果は図 9 に示される通りであった。すなわち、インテレクチンは、ジオールビーズおよびジオールセファロースビーズに強く結合し、ジオール構造を有しないビーズには結合しなかった。

【0096】

【表 4】

ポリスチレンビーズ	
ヒドロキシビーズ	
ジオールビーズ	
ジオールセファロースビーズ	

10

20

30

40

50

【0097】

また、インテレクチンとジオールセファロースビーズとの結合は、ジオール構造を有する他の化合物の存在下では阻害された。この実験は、ピアコア（GEヘルスケアバイオサイエンス社）を用いて、段階希釈された様々な種類の化合物の存在下で、3-アミノ-1-プロパンジオールをアミノ基を介して固定したセンサーチップに対するリコンビナントヒトインテレクチン-1の結合を測定することにより行った。インテレクチンは終濃度0.5 μg/mLで使用し、測定緩衝液として1 mM CaCl₂、150 mM NaCl、0.03% Tween 20を含む10 mM HEPES緩衝液（pH 7.0）を用いた。化合物を添加しなかった試料を用いて測定したインテレクチンの結合量を100%として、各試料におけるインテレクチンの結合率を測定した。

10

【0098】

結果は、表5に示される通りであった。表5に示されるように、例えば、L-リボース、D-リボース、L-アスコルビン酸、モノブチリン、グリセロール、1, 2-ブタンジオール、1, 2-プロパンジオール、および(R)-1, 2-プロパンジオールがインテレクチンとジオールセファロースビーズとの結合を阻害する際のIC₅₀は、1 mM以下であった（表5参照）。他方、エタノール、1-プロパノール、および3-アミノ-1-プロパノールなどのジオール構造を有しない化合物のIC₅₀は、100 mMを超えた。

【0099】

【表5】

化合物	IC ₅₀ (mM)
L-リボース	0.3
D-リボース	0.5
L-アスコルビン酸	0.8
モノブチリン	0.8
グリセロール	0.8
1, 2-ブタンジオール	0.8
1, 2-プロパンジオール	0.9
(R)-1, 2-プロパンジオール	1.0

20

30

【0100】

このように、インテレクチンは化合物のジオール構造に結合するため、上記ジオールセファロースビーズなどを用いて精製することができる。さらには、抗体のFab断片とインテレクチンとの融合タンパク質は、ジオールセファロースビーズで精製することができた。例えば、表5に記載の化合物を固相化したカラムやビーズを用いれば、インテレクチン融合タンパク質を精製できることは当業者であれば当然理解できる。ジオール構造を有するカラムは安価に調達できるため、インテレクチン融合タンパク質は、製造コストの観点で中皮腫の検出において有用である。

【0101】

40

実施例7A：HEG1のノックダウンによる中皮腫の増殖抑制効果

本実施例では、HEG1に対するsiRNAを用いて中皮腫細胞株でHEG1をノックダウンし、中皮腫の細胞増殖に与える影響を調べた。

【0102】

中皮腫細胞としては、ACC-MESO-4細胞株を用いた。細胞を96ウェルプレートに5×10³細胞/ウェルで播種し、100 μLの培地で24時間培養した。細胞をPBSで洗浄し、7.5 pmolのsiRNA、0.15 μLのLipofectamine 2000またはLipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific Inc.)を含む15 μL Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific Inc.)を各ウェルに添加した。24時間、48時間または72時間培養し、生存細胞数をCellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Prolifera

50

tion Reagent (Promega K.K., Tokyo, Japan)を用いて測定した。

siRNAとしては、siRNA1として上記H1097およびH2674の1:1混合物、siRNA2として市販のsc-78365 (Santa Cruz Biothechnology, Inc.)を用い、これらに加えて、S3816, SASI_Hs02_00353816; S3817, SASI_Hs02_00353817; S3818, SASI_Hs02_00353818 (Sigma-Aldrich Japan K.K.)を用いた。

また、H3059として、

H3059センス鎖: 5'-GCGAAUGCGUCGACAGACAACA-3' (配列番号38)

H3059アンチセンス鎖: 5'-UUGUCUGCGACGCAUUCGCCA-3' (配列番号39)

を用い、H9106として、

H9106センス鎖: 5'-CUGGCGUUCUAGUCAGUAAAA-3' (配列番号40)

H9106アンチセンス鎖: 5'-UUACUGACUAGAACGCCAGAC-3' (配列番号41)

を用いた。

また、対照として、MISSION siRNA Universal Negative Control (SIC-001) (Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan)を用いた。

【0103】

経時的な細胞増殖に与えるHEG1ノックダウンの影響は、図10に示される通りであった。図10に示されるように、HEG1をノックダウンした例(HEG1 siRNA1およびsiRNA2)ではいずれも、対照および未処理の中皮腫細胞株よりも、細胞増殖能が低下することが明らかとなった。また、HEG1 siRNA1では、細胞数が培養開始前よりも減少していた(図10)。HEG1 siRNA1で処理した中皮腫細胞の一部は、48時間目で細胞死を誘発していた。

【0104】

HEG1に対するsiRNAを導入して72時間後の細胞数を、上記のsiRNAを用いて確認した。siRNAの細胞への導入は上記の通り行った。結果は図11に示される通りであった。図11に示されるように、いずれのsiRNAを用いてHEG1をノックダウンした場合でも、中皮腫細胞は細胞増殖能を低下させた。

【0105】

なお、他の中皮腫細胞株であるNCI-H2452細胞やHEG1を発現しないHEK-293T細胞に対してH2674のsiRNAを導入した結果は、図12に示される通りであった。

図12に示されるように、他の中皮腫細胞株においても、HEG1 siRNAによりHEG1をノックダウンすると細胞増殖が抑制された。一方で、HEG1を発現しないHEK-293T細胞はsiRNAの影響を受けなかった。

【0106】

このことから、中皮腫の細胞増殖には、HEG1の発現が強く関与していることが明らかとなった。また、HEG1の発現を抑制することで、中皮腫の細胞増殖を抑制することができることも明らかとなった。このことからHEG1の発現や、HEG1の細胞増殖促進機能を阻害することにより、HEG1を発現するがん(例えば、中皮腫)の処置が可能になることが示唆された。

【0107】

HEG1分子を遺伝子オントロジー解析をすると、HEG1タンパク質は、細胞外領域に3つのEGFドメインを有することが分かる。例えば、MUC4というタンパク質は、細胞外にEGFドメインを有し、Erbb2(またはHER2/neu)に結合して発がんに関与することが知られている。このことから、HEG1タンパク質のEGFドメインも、同様に発がんに関与する可能性が示唆される。本実施例では、HEG1のノックダウンにより腫瘍細胞の細胞増殖が抑制された。すなわち、本実施例では、腫瘍細胞の増殖にはHEG1タンパク質が必要であるという結果が示された。このことから、HEG1タンパク質の細胞増殖促進機能には、EGFドメインが関与している可能性が考えられた。

また、HEG1の細胞内発現部位を確認すると、従来の非糖鎖修飾型HEG1は、上皮細胞間のタイトジャンクションの部位に発現するのに対して、中皮腫に特徴的な糖鎖修飾

10

20

30

40

50

を有するH E G 1は、糖鎖修飾故に親水性であり、上皮細胞の頂上部表面 (apical surface) に発現する。このことも、H E G 1が細胞増殖に関わる細胞間シグナルまたはシグナル伝達に関与している可能性を示唆するものである。

【0108】

実施例8A：エピトープ領域の決定

本実施例では、中皮腫細胞株A C C－M E S O－1の内在性H E G 1をノックダウンした上で、ヒトH E G 1断片を発現させ、S K M 9－2抗体との反応性を確認した。次いで、エピトープ領域についてアラニンスキャニングにより抗体との反応性を試験し、抗体との結合に重要なアミノ酸を決定した。

【0109】

(1) 結合ドメインの解析

中皮腫細胞株A C C－M E S O－1に、H E G 1 s i R N A (H 9 1 0 6) (配列番号40、41) とヒトH E G 1を遺伝子導入し、S K M 9－2の反応性をウェスタンブロット法で確認した。ヒトH E G 1は全長 (H E G 1 f u l l l e n g t h) または断片 (H E G 1 3 k b, H E G 1 2 k b, またはH E G 1 1 k b) を用いた。ここで、ヒトH E G 1全長は、配列番号35のアミノ酸配列を有するタンパク質であり、配列番号34の塩基配列をp F L A G－C M V 1 (シグマ社) に挿入して得たプラスミドを形質転換して上記中皮腫細胞株に発現させた。H E G 1 3 k b断片は、配列番号35の285番目のロイシンから1387番目のフェニルアラニンまでの断片をインフレームとなるようp F L A G－C M V 1 (シグマ社) に挿入して上記中皮腫細胞株に発現させた。H E G 1 2 k bおよびH E G 1 1 k bはそれぞれ、配列番号35の677番目のロイシンから1387番目のフェニルアラニンまでの断片および992番目のバリンから1387番目のフェニルアラニンまでの断片を同様にして上記中皮腫細胞株に発現させた。細胞溶解物をS K M 9－2抗体を用いたウェスタンブロットにより解析を行った。結果は、図13および図14Aに示される通りであった。

図13および図14Aに示されるように、H E G 1のエクソン7を含むH E G 1 f u l l l e n g t h、H E G 1 3 k b、H E G 1 2 k bが陽性 (+) となった。一方で、H E G 1 1 k bは抗体との結合が陰性 (-) であった (図13および図14A)。

このことから、S K M 9－2抗体は、H E G 1のエクソン7の領域に結合することが明らかとなった。

【0110】

(2) 結合ドメインの解析2

さらにH E G 1のエクソン7の領域を詳細に解析した。ヒトS L U R P 1にG P Iアンカーシグナルを接続したタンパク質 (配列番号42；以下、「S L U R P g p i」と呼ぶ) のN末端側にH E G 1のエクソン7の一部のアミノ酸配列を接続した融合タンパク質を用いて、S K M 9－2の反応性をウェスタンブロット法で確認した。融合タンパク質には、シグナル配列 (配列番号43) をN末端に付加して発現させた。

【0111】

ここで、用いたH E G 1のエクソン7の部分配列とS L U R P g p iとの融合タンパク質は、以下の通りとした。

アミノ酸番号783のアスパラギン酸から991番目のセリンまでの断片をS L U R P g p iに結合した断片 (7. 6) ；

アミノ酸番号832のグルタミンから991番目のセリンまでの断片をS L U R P g p iに結合した断片 (7. 7) ；

アミノ酸番号886のグルタミンから991番目のセリンまでの断片をS L U R P g p iに結合した断片 (7. 8) ；

アミノ酸番号941のアラニンから991番目のセリンまでの断片をS L U R P g p iに結合した断片 (7. 9) ；

配列番号44をS L U R P g p iに結合した断片 (7. 61) ；

配列番号45をS L U R P g p iに結合した断片 (7. 62) ；

配列番号 46 を S L U R P g p i に結合した断片 (7. 6 3) ;
 配列番号 47 を S L U R P g p i に結合した断片 (7. 6 4) ;
 配列番号 48 を S L U R P g p i に結合した断片 (7. 6 2 3) ;
 配列番号 49 を S L U R P g p i に結合した断片 (7. 6 2 3 1) ;
 配列番号 50 を S L U R P g p i に結合した断片 (7. 6 2 3 2) ;
 配列番号 51 を S L U R P g p i に結合した断片 (7. 6 2 4 1) ;
 配列番号 52 を S L U R P g p i に結合した断片 (7. 6 2 4 2) 。

【0112】

結果は、図 1 3 および図 1 4 B に示される通りであった。

図 1 3 および図 1 4 B に示されるように、融合タンパク質 (7. 6 および 7. 6 2) が陽性となった。このことから、S K M 9-2 抗体は、H E G 1 の E 7 9 3 ~ T 8 1 2 を含む領域に結合することが明らかとなった。

また、図 1 3 および図 1 4 C に示されるように、融合タンパク質 (7. 6 2 3 および 7. 6 2 3 1) が陽性となった。このことから、S K M 9-2 抗体は、H E G 1 の S 7 9 9 ~ E 8 1 0 を含む領域に結合することが明らかとなった。

【0113】

(3) アラニンスキャニングによる結合部位の解析

次に、S 7 9 9 ~ E 8 1 0 断片のアミノ酸を 1 アミノ酸ずつアラニンに改変した断片を作成し、上記と同様に S L U R P g p i に連結させて、S K M 9-2 抗体との反応性をウェスタンブロット法で確認した。

すると、図 1 3 および図 1 4 D に示されるように、S 7 9 9 ~ T 8 0 9 (S K S P S L V S L P T ; 配列番号 53) が S K M 9-2 抗体のエピトープ (線形エピトープ) であることが分かった。

【0114】

さらに、7. 6 2 3 1 断片を発現させた細胞の可溶化液をノイラミニダーゼ処理すると、当該断片と S K M 9-2 抗体との反応が消失した (図 1 4 E 参照)。このことから、S K M 9-2 抗体が認識するエピトープにはシアル酸修飾が含まれていることが明らかとなった。

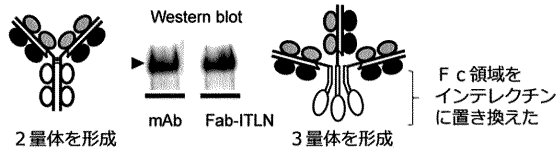
【0115】

配列表

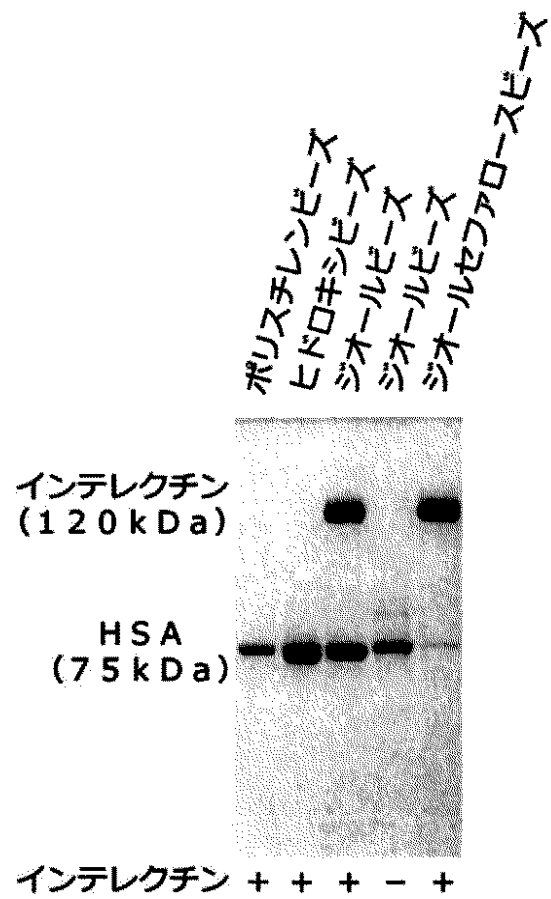
配列番号 1	: S K M 9-2 抗体重鎖核酸配列	
配列番号 2	: S K M 9-2 抗体重鎖アミノ酸配列	
配列番号 3	: S K M 9-2 抗体軽鎖核酸配列	
配列番号 4	: S K M 9-2 抗体軽鎖アミノ酸配列	
配列番号 5	: S K M 9-2 抗体の重鎖 C D R 1 の核酸配列	
配列番号 6	: S K M 9-2 抗体の重鎖 C D R 1 のアミノ酸配列	
配列番号 7	: S K M 9-2 抗体の重鎖 C D R 2 の核酸配列	
配列番号 8	: S K M 9-2 抗体の重鎖 C D R 2 のアミノ酸配列	
配列番号 9	: S K M 9-2 抗体の重鎖 C D R 3 の核酸配列	
配列番号 10	: S K M 9-2 抗体の重鎖 C D R 3 のアミノ酸配列	40
配列番号 11	: S K M 9-2 抗体の軽鎖 C D R 1 の核酸配列	
配列番号 12	: S K M 9-2 抗体の軽鎖 C D R 1 のアミノ酸配列	
配列番号 13	: S K M 9-2 抗体の軽鎖 C D R 2 の核酸配列	
配列番号 14	: S K M 9-2 抗体の軽鎖 C D R 2 のアミノ酸配列	
配列番号 15	: S K M 9-2 抗体の軽鎖 C D R 3 の核酸配列	
配列番号 16	: S K M 9-2 抗体の軽鎖 C D R 3 のアミノ酸配列	
配列番号 17	: F L A G タグおよび H i s タグを有する可溶型 H E G 1 c D N A の核酸配列	
配列番号 18	: F L A G タグおよび H i s タグを有する可溶型 H E G 1 c D N A によりコードされるアミノ酸配列	50

配列番号 19 : ヒトインテ렉チン-1 遺伝子の核酸配列	
配列番号 20 : ヒトインテ렉チン-1 タンパク質のアミノ酸配列	
配列番号 21 : S K M 9-2 抗体重鎖とインテ렉チンとの融合遺伝子の核酸配列	
配列番号 22 : S K M 9-2 抗体重鎖とインテ렉チンとの融合タンパク質のアミノ酸配列	
配列番号 23 : H 1 0 9 7 のセンス鎖の核酸配列	
配列番号 24 : H 1 0 9 7 のアンチセンス鎖の核酸配列	
配列番号 25 : H 2 6 7 4 のセンス鎖の核酸配列	
配列番号 26 : H 2 6 7 4 のアンチセンス鎖の核酸配列	
配列番号 27 : H 3 6 7 1 のセンス鎖の核酸配列	10
配列番号 28 : H 3 6 7 1 のアンチセンス鎖の核酸配列	
配列番号 29 : N M _ 0 2 0 7 3 3 . 1 として登録された H E G 1 遺伝子の核酸配列	
配列番号 30 : 配列番号 29 によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列	
配列番号 31 : H E G 1 タンパク質の天然の可溶型バリエーション	
配列番号 32 : H E G 1 タンパク質の天然のバリエーションをコードする核酸の核酸配列	
配列番号 33 : 配列番号 32 によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列	
配列番号 34 : H E G 1 タンパク質の天然のバリエーションをコードする核酸の核酸配列	
配列番号 35 : 配列番号 34 によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列	
配列番号 36 : H E G 1 タンパク質の天然のバリエーションをコードする核酸の核酸配列	
配列番号 37 : 配列番号 36 によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列	20
配列番号 38 : H 3 0 5 9 のセンス鎖の核酸配列	
配列番号 39 : H 3 0 5 9 のアンチセンス鎖の核酸配列	
配列番号 40 : H 9 1 0 6 のセンス鎖の核酸配列	
配列番号 41 : H 9 1 0 6 のアンチセンス鎖の核酸配列	
配列番号 42 : SLURPgi 部分のアミノ酸配列	
配列番号 43 : SLURPgi 融合蛋白質のシグナル配列 (アミノ酸配列)	
配列番号 44 : SLURPgi (7.61)断片中の H E G 1 部分のアミノ酸配列	
配列番号 45 : SLURPgi (7.62)断片中の H E G 1 部分のアミノ酸配列	
配列番号 46 : SLURPgi (7.63)断片中の H E G 1 部分のアミノ酸配列	
配列番号 47 : SLURPgi (7.64)断片中の H E G 1 部分のアミノ酸配列	30
配列番号 48 : SLURPgi (7.623)断片中の H E G 1 部分のアミノ酸配列	
配列番号 49 : SLURPgi (7.6231)断片中の H E G 1 部分のアミノ酸配列	
配列番号 50 : SLURPgi (7.6232)断片中の H E G 1 部分のアミノ酸配列	
配列番号 51 : SLURPgi (7.6241)断片中の H E G 1 部分のアミノ酸配列	
配列番号 52 : SLURPgi (7.6242)断片中の H E G 1 部分のアミノ酸配列	
配列番号 53 : H E G 1 タンパク質の S 7 9 9 から T 8 0 9 までのアミノ酸配列	
配列番号 54 : 図 1 3 の S 7 9 9 A 変異体ペプチドのアミノ酸配列	
配列番号 55 : 図 1 3 の K 8 0 0 A 変異体ペプチドのアミノ酸配列	
配列番号 56 : 図 1 3 の S 8 0 1 A 変異体ペプチドのアミノ酸配列	
配列番号 57 : 図 1 3 の P 8 0 2 A 変異体ペプチドのアミノ酸配列	40
配列番号 58 : 図 1 3 の S 8 0 3 A 変異体ペプチドのアミノ酸配列	
配列番号 59 : 図 1 3 の L 8 0 4 A 変異体ペプチドのアミノ酸配列	
配列番号 60 : 図 1 3 の V 8 0 5 A 変異体ペプチドのアミノ酸配列	
配列番号 61 : 図 1 3 の S 8 0 6 A 変異体ペプチドのアミノ酸配列	
配列番号 62 : 図 1 3 の L 8 0 7 A 変異体ペプチドのアミノ酸配列	
配列番号 63 : 図 1 3 の P 8 0 8 A 変異体ペプチドのアミノ酸配列	
配列番号 64 : 図 1 3 の T 8 0 9 A 変異体ペプチドのアミノ酸配列	
配列番号 65 : 図 1 3 の E 8 1 0 A 変異体ペプチドのアミノ酸配列	

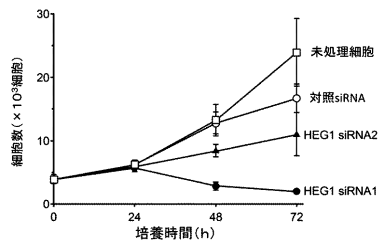
【図 8】



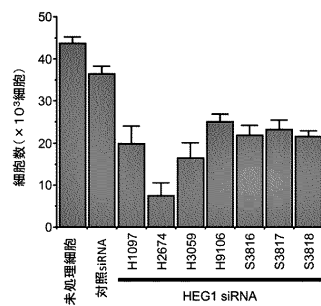
【図 9】



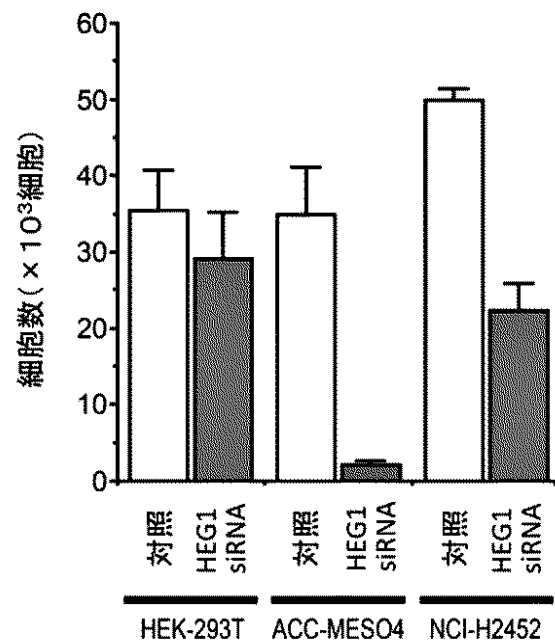
【図 10】



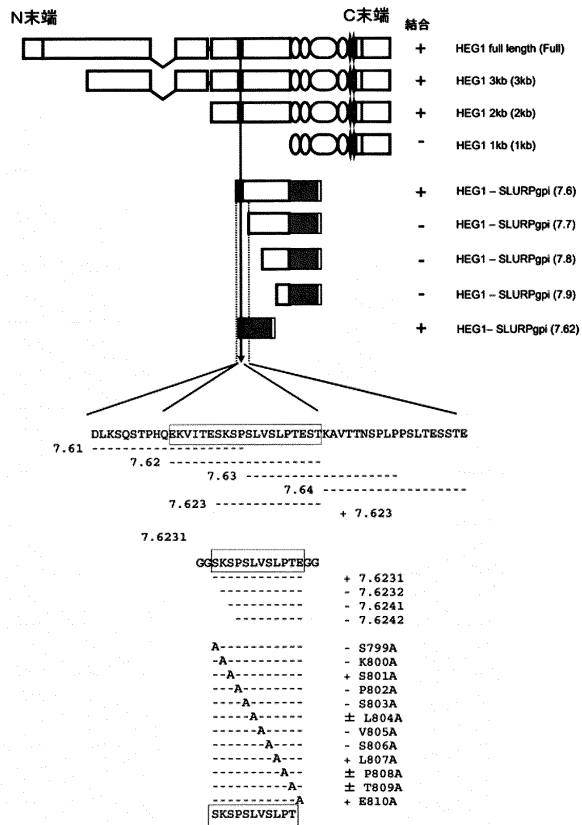
【図 11】



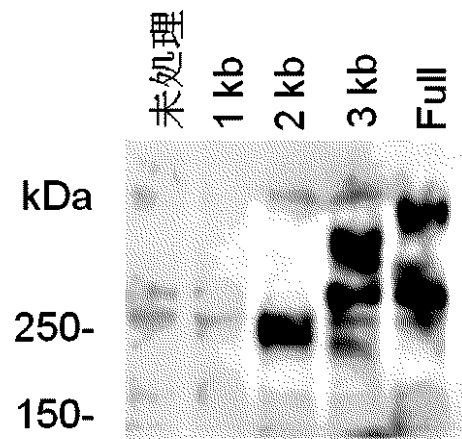
【図 12】



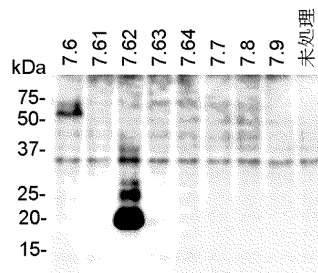
【図 1 3】



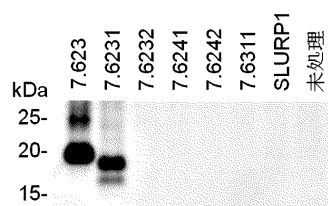
【図 1 4 A】



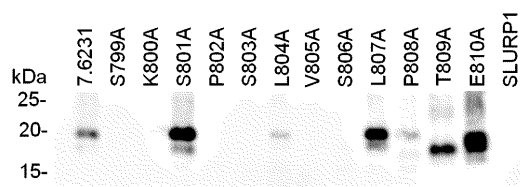
【図 1 4 B】



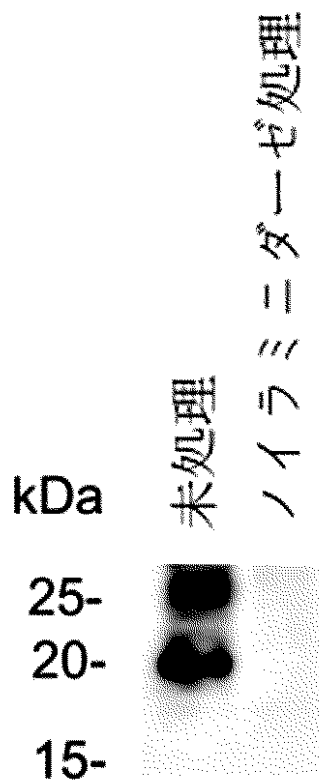
【図 1 4 C】



【図 1 4 D】



【図 1 4 E】



【配列表】

0006859498000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)		A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		A 6 1 K 47/68	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)		G 0 1 N 33/574	B
C 1 2 N 15/13 (2006.01)		G 0 1 N 33/574	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 0 7 K 14/705	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		C 1 2 N 15/13	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)		C 1 2 P 21/08	
		A 6 1 K 45/00	
		A 6 1 K 31/7088	

前置審査

- (72)発明者 辻 祥太郎
神奈川県横浜市旭区中尾二丁目3番2号 地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立がんセンター 臨床研究所内
- (72)発明者 影山 泰平
神奈川県横浜市旭区中尾二丁目3番2号 地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立がんセンター 臨床研究所内
- (72)発明者 鷺見 公太
神奈川県横浜市旭区中尾二丁目3番2号 地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立がんセンター 病理診断科内
- (72)発明者 辻 真紀子
神奈川県横浜市旭区中尾二丁目3番2号 地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立がんセンター 臨床研究所内
- (72)発明者 松浦 利絵子
神奈川県横浜市旭区中尾二丁目3番2号 地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立がんセンター 臨床研究所内
- (72)発明者 吉原 光代
神奈川県横浜市旭区中尾二丁目3番2号 地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立がんセンター 臨床研究所内
- (72)発明者 今井 浩三
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

審査官 松浦 安紀子

- (56)参考文献 特表2004-528828 (JP, A)
国際公開第2016/140344 (WO, A1)
和光純薬時報, 2012年, Vol.80, No.1, pp.2-4
化学と生物, 1988年, Vol.26, No.4, pp.220-234
Mutation Research, 2015年, Vol.771, pp.6-12
日本病理学会総会, 2013年, Vol.102nd, p.345, #3-G4-21
日本分子腫瘍マーカー研究会プログラム・講演抄録集, 2015年, Vol.35th, pp.74-75
日本分子腫瘍マーカー研究会プログラム・講演抄録集, 2016年 9月, Vol.36th, pp.38-39
Scientific Reports, 2017年 3月, Vol.7, #45768

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 K 1 6 / 3 0

A61K 39/395

A61K 47/68

A61K 51/10

A61P 35/00

C07K 14/705

C07K 19/00

G01N 33/574

A61K 31/7088

A61K 45/00

C12N 15/13

C12P 21/08

WPI

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)