

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4322504号
(P4322504)

(45) 発行日 平成21年9月2日(2009.9.2)

(24) 登録日 平成21年6月12日(2009.6.12)

(51) Int.Cl.

F 1

A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
GO1N 33/53 (2006.01)

A 61 K 39/395
C 07 K 16/28
A 61 P 31/18
C 12 Q 1/04
G O 1 N 33/53

N
Z N A
Y

請求項の数 10 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-552012 (P2002-552012)
(86) (22) 出願日 平成13年12月21日 (2001.12.21)
(65) 公表番号 特表2004-526685 (P2004-526685A)
(43) 公表日 平成16年9月2日 (2004.9.2)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2001/015392
(87) 國際公開番号 WO2002/050119
(87) 國際公開日 平成14年6月27日 (2002.6.27)
審査請求日 平成16年12月20日 (2004.12.20)
(31) 優先権主張番号 00128143.5
(32) 優先日 平成12年12月21日 (2000.12.21)
(33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号 01200944.5
(32) 優先日 平成13年3月13日 (2001.3.13)
(33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 503224769
スチビティング カソリーケ ユニバーシティ、 ラッドボウド ユニバーシティ
ネイメヘン メディカル センター
オランダ国 ネイメヘン 6500 ハーベー ヘルト フロー テ プライ 10
ペー オー ボックス 9101
(74) 代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74) 代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74) 代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】肝臓およびリンパ節中の類洞内皮細胞上において、新規な ICAM-3 結合レセプターの結合活性を調節するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

洞様内皮細胞層の細胞の HIV 感染を阻害することで HIV がその細胞に侵入することを阻害するための組成物であって、

洞様内皮細胞層の表面にある、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質 (L-SIGN) に結合する、L-SIGN 特異的抗体を含む、組成物。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記洞様内皮細胞層の細胞の HIV 感染の阻害が、洞様内皮細胞層の細胞の表面に HIV 表面タンパク質が接着することを阻害することである組成物。

10

【請求項 3】

前記 HIV 表面タンパク質が、 gp120 である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

洞様内皮細胞層の細胞から非感染 T 細胞への HIV の転移を妨げるための組成物であって、

洞様内皮細胞層の表面にある、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質 (L-SIGN) に結合する、L-SIGN 特異的抗体を含む、組成物。

【請求項 5】

20

生物学的サンプルまたは培養培地から、洞様内皮細胞層の細胞を、単離および／または精製するための方法であって、

a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質(L-SIGN)に対する抗体であって、L-SIGN特異的な抗体を、該細胞を含む生物学的サンプルまたは培養培地と接触させる工程；および

b) 該抗体に結合しない細胞から該抗体に結合する細胞を分離する工程を包含する、方法。

【請求項6】

請求項5に記載の方法であって、

前記工程b)が、さらに

10

前記サンプルまたは培養培地中のさらに他の成分のうち任意のものから前記抗体に結合する細胞を分離すること

を含む、方法。

【請求項7】

請求項5または6のうちいずれか1項に記載の方法であって、

c) 前記抗体に結合する細胞を該抗体から分離する工程を含む、方法。

【請求項8】

請求項5～7のうちいずれか1項に記載の方法であって、

前記抗体が、カラムまたはマトリクス、(パラ)磁性ビーズあるいは類似の固形支持体に結合している、方法。

20

【請求項9】

請求項5～8のうちいずれか1項に記載の方法であって、

前記生物学的サンプルは、血液、血漿またはリンパ液のような生物学的流体である、方法。

【請求項10】

前記洞様内皮層の細胞が、LSECである、請求項5に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、動物における免疫応答を調節するために、肝臓およびリンパ節中の類洞内皮細胞の表面に位置するC型レクチンに結合する化合物の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

分子DC-SIGNは、近年、ICAM-3への高親和性結合を介してDCと休止T細胞との間の相互作用を媒介し、その結果、一次免疫応答の開始を促進する、DC特異的接着レセプターとして同定された。DC-SIGNは、以前に報告されたII型膜関連C型レクチンと同一であると示され(Geijtenbeek, T. B.ら、2000, Cell 100: 575～585)、このII型膜関連C型レクチンは、CD4非依存的様式でHIV-1エンベロープ糖タンパク質gp120に結合する。DC-SIGNの親和性は、HIV-1 gp120に対するCD4の親和性を超える(Curtis, B. M.ら、1992, Proc Natl Acad Sci USA 89: 8356～8360)、そして、HIV-1の捕捉に関して、DC-SIGNはDC自身へのウイルス侵入を促進しそうではなく、むしろtransでのT細胞の感染を増強する(Geijtenbeek, T. B.ら、2000, Cell 100: 587～597)。DC-SIGN関連HIV-1は、恐らく、DCによる末梢からリンパ器官へのHIV-1の輸送の間、ウイルスの感染潜在力に寄与して、長期間わたって感染を残存させる。

40

【0003】

Yokoyama-kobayashiら(1999, Gene 228: 161～167)による、II型膜タンパク質をコードするcDNAクローンについての以前の研究

50

の結果としては、現在は D C - S I G N として既知の分子をコードする c D N A と相同であるが同一ではない部分的クローンの同定を示した。推定タンパク質生成物は、細胞質ドメイン中に 28 アミノ酸の欠失を含み、そして、 D C - S I G N をコードする c D N A に関する C 型レクチンドメインの全体が欠如していた。

【 0 0 0 4 】

さらに最近、 S o i l l e u x ら、 (2 0 0 0 、 J Immunol 165 : 293 7 - 2942) は、関連する遺伝子の全長 c D N A 配列について記述し、これを S o i l l e u x らは D C - D I G N R と呼んだ。 D C - S I G N および D C - S I G N R のゲノム構成が比較され、これは、高度の類似性を示した。胎盤、子宮内膜および刺激された K G 1 細胞 (骨髄系 D C と表現型的に類似する細胞株) における 2 つの遺伝子の同時発現は、 D C - S I G N R の発現が子宮内膜および刺激された K G 1 細胞の両方において非常に低度ではあるが、観察された。

10

【 0 0 0 5 】

本発明を導いた研究において、 C D - S I G N R 遺伝子が、単球誘導樹状細胞ではなく、 2 つの組織 (肝臓およびリンパ節) 中でのみ顕著に高レベルで発現されるということを、現在見出した。レセプターは「 L - S I G N 」と名称を変更された、なぜなら、このレセプターは、肝臓 / リンパ節特異的 I C A M - 3 捕獲非インテグリンであるからである。

【 0 0 0 6 】

相同なヒト C 型レクチン D C - S I G N および L - S I G N は、新しい遺伝子複製の生成物でありそうである。対応するタンパク質は、完全に同一のリガンド特異性を共有しないとしても、同一のドメイン構成および重複を共有する。この分子の最も多様な領域は、その細胞質の尾部中に生じる。

20

【 0 0 0 7 】

D C - S I G N についての遺伝子と L - S I G N についての遺伝子との間の別の明確な差異は、 L - S I G N のエキソン 4 における反復多型であり、これは、 D C - S I G N においては保存される (表 1) 。 L - S I G N のネックドメインは、 3 ~ 9 の反復を含み得る一方、 D C - S I G N は、試験された C a u c a s i a n の間で常に 7 個の反復からなる。 6 つの反復を含む L - S I G N 分子または 7 つの反復を含む L - S I G N 分子の間で、リガンド結合においても、 H I V - 1 捕捉および増強実験においても差異は観察されなかった。

30

【 0 0 0 8 】

S I G N 遺伝子は、それらの進化的歴史を超えて、配列および機能的類似性を保持するが、それらの組織区分を決定する調節エレメントが特有の経路に沿って進化するということが、現在は、本発明に基づいて、驚くほど見出された。 m R N A 発現の N o r t h e r n 分析は、単球誘導 D C においておよび D C が存在する組織において、 D C - S I G N の発現を明らかに示したが、 D C において L - S I G N の発現は、検出不可能であった (図 2) 。さらに、 L - S I G N は、 L - S I G N に対して特異的な抗体を使用して、単球誘導 D C 上で検出されなかった (図 3 C) 。従って、リンパ節中の特有の細胞型は、両方の S I G N 分子でなく 1 方の S I G N 分子を発現すること : L - S I G N は、肝臓中で存在する場合は、内皮細胞によって発現される一方、 D C - S I G N はリンパ節の T 細胞領域における D C によって発現されるということが見出された。発現パターンにおけるこの差異は、配列相同性に基づいて予測され得なかった。

40

【 0 0 0 9 】

肝臓洞様毛細血管は、内皮内層に接着する在住マクロファージの存在によって特徴付けられる特定の毛細血管である。 L S E C 白血球の相互作用 (これは、細胞表面上での接着分子の発現を必要とする) は、肝臓中の末梢免疫サーベイランスの中心的機構を構成する。マンノースレセプターならびに他の同時刺激レセプター (M H C クラス I I 、 C D 80 および C D 86) は、 L S E C 上で発現されること、およびリンパ器官中において D C に類似の様式で、循環からの多くの潜在的抗原性タンパク質のクリアランスを媒介することが知られている。

50

【発明の開示】**【課題を解決するための手段】****【0010】**

本発明者らは、L-SIGNがLSEC上のレセプターのこの分類に適合するということを確立した、なぜならその組織部位およびリガンド結合特性は、抗原クリアランスにおいて、ならびにLSEC白血球接着において、このレセプターに対する生理学的役割に強く関係しているからである。アポトーシス細胞上のICAM-3の高発現は、これらの細胞が肝臓内でL-SIGN発現細胞によって捕捉され、続いて除去される手段である。

【0011】

DC-SIGNのように、L-SIGNは、HIV-1感染を増強する膜関連レクチンである。肝臓洞様毛細血管におけるL-SIGNの発現は、LSEC(通過する白血球と頻繁に接触する)が血液からHIV-1を捕獲し、そして、T細胞のtrans感染を促進するということを示す。

【0012】

さらに、LSEC自身は、HIV-1感染に対して感受性であり得る。従って、L-SIGNがこれらの細胞の感染を促進し、その結果、肝臓洞様毛細血管を通過するT白血球を与えるような新しいウイルスの生成のためのレザバーを樹立することが、可能となる。

【0013】

上記の知見に基づいて、本発明は、動物(特に、ヒトまたは別の哺乳動物)中の免疫応答を調節する(特に減少させる)ための組成物の調製における、洞様毛細血管内皮層の細胞表面上のC型レクチンに結合する化合物の使用に関する。洞様毛細血管内皮層の細胞表面上のC型レクチンは、特にL-SIGNである。

【0014】

洞様毛細血管内皮層の細胞は、肝臓洞様毛細血管内皮の細胞(LSEC)またはリンパ節の洞様毛細血管領域の細胞のいずれかによって構成される。

【0015】

本発明の組成物は、洞様毛細血管内皮層の細胞(特にLSEC)とICAM-2および/またはICAM-3を発現する細胞(特にT細胞)との間の1つ以上の相互作用を調節する(特に減少させる)ために使用され得る。より特に、この組成物は、洞様毛細血管内皮層の細胞(特にLSEC)とICAM-2および/またはICAM-3を発現する細胞(特にT細胞)との間で、特に、LSECの表面上のC型レクチンとT細胞の表面上のICAMレセプター(特にT細胞の表面上のICAM-2レセプターまたはICAM-3レセプター)との間での接着を調節する(特に減少させる)ために使用される。

【0016】

本発明に従って調製される組成物は、耐性誘導、免疫治療、免疫抑制、自己免疫疾患の処置、および/またはアレルギーの処置に関して、特異的抗体に対する免疫応答を予防または阻害するために、適用される。

【0017】

さらなるその局面に従って、本発明は、洞様毛細血管内皮層の細胞(特にLSEC)のHIV感染を阻害するため(特に、HIV表面タンパク質(すなわちgp120)の洞様毛細血管内皮層の細胞(特にLSEC)の表面への接着により、HIVの上記細胞への侵入を阻害するため)の、組成物の調製における、洞様毛細血管内皮層の細胞(特にLSEC)の表面上のC型レクチンに結合するか、または結合し得る化合物の使用に関する。

【0018】

本発明はさらに、洞様毛細血管内皮層の細胞(それ自身を感染させ得るかまたはさせ得ない)(特に、LSEC)由来のHIVの非感染T細胞への移動を阻害するための組成物の調製において、洞様毛細血管内皮層細胞(特に、LSEC)の表面上のC型レクチンに結合するか、または結合し得る化合物の使用に関する。

【0019】

あるいは、本発明は、調節するための組成物の調製において、(特に、上記抗原に対す

10

20

30

40

50

る動物（特に、ヒトまたは他の哺乳動物）における免疫応答を生成、増大、および／または促進する際に、）以下の組合せの使用を提供する：1）洞様内皮層細胞（特に、LSEC）の表面上のC型レクチンに結合し、そしてそれに付着する化合物：2）抗原またはそのフラグメントもしくは一部。好ましくは、この抗原は、C型レクチンに結合し得る化合物に共有結合されるか、または、融合され得る。この抗原は、例えば、この抗原もしくは感染症に対するワクチンで使用されるような抗原を含むか、または発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を生成するために使用され得る癌抗原から、選択される。

【0020】

洞様毛細血管内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面上のC型レクチンに結合し得る化合物は、好ましくは、以下からなる群から選択される：マンノース炭水化物（例えば、マンナンおよびD-マンノース）；フコース炭水化物（例えば、L-フコース）；植物レクチン（例えば、コンカナバリンA）；抗生物質（例えば、パラジミシンA）；糖（例えば、N-アセチル-D-グルコサミンおよびガラクトース）；タンパク質（例えば、gp120およびそのアナログまたはフラグメント）；および洞様毛細血管内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面で発現されるようなC型レクチンに対して特異的な抗体、またはその一部、フラグメントもしくはエピトープ。

10

【0021】

洞様毛細血管内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面のC型レクチンは、好ましくは、図7のアミノ酸配列を有するタンパク質、またはその天然の変異体もしくは等価物である。

20

【0022】

あるいは、洞様毛細血管内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面のC型レクチンに結合し得る化合物は、モノクローナル抗体、好ましくは、図7のアミノ酸配列を有するC型レクチンに対して特異的であるモノクローナル抗体、またはその天然の変異体もしくは等価物；および／またはその一部、フラグメントもしくはエピトープである。

【0023】

そのさらなる局面に従って、本発明は、抗体、好ましくは、図7のアミノ酸配列を有するC型レクチンに対して特異的であるモノクローナル抗体、またはその天然の変異体もしくは等価物；および／または、その一部、フラグメントまたはエピトープに関する。この抗体は、好ましくはAZN-D3であり、これは、実施例中に記載の方法によって取得可能である。

30

【0024】

本発明はさらに、少なくとも1つのこのような抗体、ならびに少なくとも1つのキャリア、賦形剤、アジュバントおよび／または処方物に関する。

【0025】

本発明の別の局面は、以下の組合せに関する：1）洞様毛細血管内皮層の細胞（特にLSEC）の表面上のC型レクチンに結合し、；そしてそれに付着する化合物：2）抗原またはそのフラグメントもしくは一部。好ましくは、この抗原は、C型レクチンに結合し得る化合物に共有結合されるか、またはこれと融合される。

【0026】

40

本発明に従う組合せにおいて、抗原は、例えば、この抗原、もしくは感染症に対するワクチンで使用されるような抗原を含むか、または発現する腫瘍細胞に対する免疫応答を生成するために使用され得る癌抗原から、選択される。

【0027】

洞様毛細血管内皮層の細胞（特に、LSEC）の表面上のC型レクチンに結合し得る化合物は、好ましくは、以下からなる群から選択される：マンノース炭水化物（例えば、マンナンおよびD-マンノース）；フコース炭水化物（例えば、L-フコース）；植物レクチン（例えば、コンカナバリンA）；抗生物質（例えば、パラジミシンA）；糖（例えば、N-アセチル-D-グルコサミンおよびガラクトース）；タンパク質（例えば、gp120およびそのアナログまたはフラグメント）；および洞様毛細血管内皮層の細胞（特

50

に、LSEC)の表面で発現されるようなC型レクチンに対して特異的な抗体、またはその一部、フラグメントまたはエピトープ。

【0028】

本発明の抗体はさらに、生物学的サンプルにおける洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）の検出、ならびに生物学的サンプルまたは培養培地からの洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）の単離、調製および／または精製において、使用され得る。

【0029】

あるいは、このような抗体は、C型レクチン（特に、図7のアミノ酸配列を有するC型レクチンまたはその天然変異体もしくは等価物）；および／または生物学的サンプル中のその一部、フラグメントまたはエピトープの、存在および／または発現を決定するためのアッセイにおける用途を見出しえる。

【0030】

さらに、本発明は、生物学的サンプルまたは培養培地から洞様内皮層の細胞（特に、LSEC）を生成、単離および／または精製するための方法に関連し、以下の工程：

a) 生物学的サンプルまたは上記細胞を含む培養培地を、本発明に従う抗体と接触させる工程；

b) 上記抗体に結合する細胞を、上記抗体に結合しない細胞、必要に応じて、サンプルまたは培地の任意のさらなる成分から分離する工程；

を包含し、そして、必要に応じて、さらに以下の工程：

c) 上記抗体由来の抗体に結合する細胞を分離する工程、を包含する。

【0031】

好ましくは、この抗体は、カラムもしくはマトリクスに、（常）磁性ビーズに、または同様の固体支持体に連結される。試験される生物学的サンプルは、生物学的流体（例えば、血液、血漿またはリンパ液）であり得る。

【0032】

最後に、本発明は、上記の方法を介して取得される洞様内皮層の細胞（例えば、LSEC）を提供する。

【0033】

本発明はさらに、続く実施例（そしてこれは、以下の図表に対して言及する）において、例示される。

【実施例】

【0034】

（材料および方法）

（1. DC-SIGN cDNAおよびLD2 cDNAの特徴付け）

全DC-SIGN cDNA配列およびL-SIGN cDNA配列を、それぞれ、登録番号AF290886およびAF290887でGenBankに提出した。L-SIGN cDNA配列は、エキソン4中に6つの繰り返しを含む改变体を表す。転写物の5'末端および3'末端（DC-SIGN mRNAの3'末端を除く）を、5'RACE（Clontech, Palo Alto, CA）によって決定した。DC-SIGN mRNAの3'末端の長さを、ノーザン分析データ（転写物サイズ）、ならびに1.3kbのDC-SIGN cDNA配列（Curtis, B.M.ら, 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89: 8356~8360）に特異的な順方向プライマーおよびDC-SIGNの断言的な3'末端の下流にマッピングされたいくつかのGenBank EST（例えば、AI472111、AA454170）に特異的な逆方向プライマーを用いたRT-PCRデータに基づいて見積もられる。L-SIGNの全コード配列(nt 39~1184、GenBank AF290887)を含むcDNAフラグメントを、ヒト胎盤mRNA（Clontech）から増幅し、そして発現ベクターp cDNA 3.1/V5-His/TOPO（p cDNA 3-L-SIGN）およびpCDM8（p CDM8-L-SIGN）中にクローニングした。

【0035】

10

20

30

40

50

(2. 放射性ハイブリッド (RH) マッピング)

DC-SIGN特異的プライマーおよびL-SIGN特異的プライマーを用いたPCRベースのRHマッピングを、Genebridge 4 RHパネル (Research Genetics, Huntsville, AL) を用いて実行した。PCRの結果を、Sangerセンターの遺伝子マップサーバー (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rhserver>) に提出した。遺伝子に連結されるマークの染色体位置を、Genatlasデータベース (<http://web.citizi2.fr/GENATLAS>) およびMarshfield Clinic (Marshfield, WI, <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/>) によって提供されるヒト第19染色体の遺伝子マップを検索することによって決定した。 10

【0036】

(3. L-SIGNおよびDC-SIGNエキソン4の遺伝子型分析)

エキソン4中の繰り返し領域を、以下のプライマー対を用いて増幅した：

1) L-SIGNについて、L28、TGTCCAAGGTCCCCAGCTCCC、およびL32、GAACTCACCAAATGCAGTCTTCAAATC；

2) DC-SIGNについて、DL27、TGTCCAAGGTCCCCAGCTCC、およびDI4R、CCCCGTGTTCTCATTTCACAG。

サイクルの条件は以下のとおりである：94℃で5秒間、および68℃で1分間。対立遺伝子を、アガロースゲル電気泳動およびエチジウムプロミド染色によって区別した。 20

【0037】

(4. ノーザンプロット分析)

培養されたヒト未熟DC由来の総RNA (以下を参照のこと)を、Trizol (Life Technologies, Rockville, MD) を用いて単離した。10μgの単離したRNAを、1%アガロースゲル上で電気泳動し、記載されるように (Chomczynski, P. 1992. Anal Biochem 201: 134~139)、Hybond-XL (Amersham Pharmacia Biotech, Bockinghamshire, England) に移し、そして2つのヒト多組織ノザンプロット (Clontech) と共にノーザン分析に使用した。3つのプローブを、経時的にプロットにハイブリダイズさせた： 30

1) L-SIGN特異的プローブ (nt 100~183, GenBank AF290887)、

2) DC-SIGNおよびL-SIGNの両方を認識するプローブ (nt 1~1233, GenBank AF290886)、ならびに

3) アクチンコントロールプローブ (Clontech)。

【0038】

ハイブリダイゼーション手順を、製造者の仕様書 (Clontech) に沿って実行した。

【0039】

(5. 抗体)

抗DC-SIGN mAb AZN-D1およびAZN-D2を、前述した (Geijtenbeek, T. B. ら、2000b, Cell 100: 575~585)。mAb AZN-D3を、DC-SIGNおよびL-SIGNの両方を染色する能力について、THP-1-DC-SIGN細胞 (Geijtenbeek, T. B. ら、2000a, Cell 100: 587~597) で、免疫化したBALB/cマウスのハイブリドーマの上清をスクリーニングすることによって得た。抗DC-SIGN mAb AZN-D2はまた、K562-L-SIGN細胞の染色によって最初に測定されたように (データは示されていない)、L-SIGNと交差反応する。抗L-SIGNウサギ抗血清を、2つのL-SIGN特異的ペプチド、PTTSGIRLFPRDおよびWNNDNRCDVDNYWを用いて免疫化することによって作製した (Veritas, Inc. Lab 40

o r a t o r i e s , R o c k v i l l e , M D) .

【 0 0 4 0 】

(6 . 細胞)

DCを、500U/ml IL4および800U/ml GM-CSF (Schering - Ploough , Brussels , Belgium) の存在下で単球から培養した (Sallusto , F . , および A . Lanzavecchia . 1994 . J Expt Med 179 : 1109 ~ 1118 ; Romani , N . ら , 1994 , J Expt Med 180 : 83 ~ 93) 。 7日目に、細胞は、高レベルのMHCクラスIおよびII、M2 (CD11b) 、X2 (CD11c) 、DC - SIGNおよびICAM - 1、中低度のレベルのLFA - 1およびCD86、ならびに低レベルのCD14、を、フローサイトメトリーによって測定されるように発現した。L - SIGNを発現する適切なK562トランスフェクト体 (K562 - L - SIGN) を、電気穿孔法によるpCDM8 - L - SIGNプラスミドおよびpGK - neoベクターとのK562の同時トランスフェクトによって作製した (Lub , M . ら、1997 , Mol Biol Cell 8 : 719 ~ 728) 。 適切なK562 - DC - SIGNトランスフェクト体を、pRc / CMV - DC - SIGN (2) を用いて同様の様式で作製した。THP - 1 - DC - SIGN細胞を、前述した (Geijtenbeek , T . B . ら、2000b , Cell 100 : 575 ~ 585) 。

【 0 0 4 1 】

適切なTHP - 1 - L - SIGNトランスフェクト体を、p cDNA3 - L - SIGNを用いたTHP - 1細胞の電気穿孔法、G418耐性についての選択、およびmAb AZN - D3を用いたL - SIGN発現についての陽性選別によって作製した。全ての細胞株を、示されたような特異的サイトカインまたは抗生物質要求物に加えて10%ウシ胎児血清を補充された RPMI 培地中で維持した。K562およびTHP - 1は、単球細胞株である。

【 0 0 4 2 】

HEK293Tは、SV - 40大T抗原の単一の温度感受性対立遺伝子を含むヒト胚性腎臓細胞である。GHOST細胞は、ヒト骨肉腫細胞由来のHIV - 指示細胞である (Cecilia , D . ら、1998 , J Virol 72 : 6988 ~ 6996) 。 Hu t / CCR5細胞は、CCR5で安定に形質導入される形質転換されたヒトT細胞株Hu t 78である。

(7 . 蛍光ビーズ接着アッセイ)

カルボキシレート修飾TransFluorSpheres (488 / 645nm 、 1 . 0 μ m ; Molecular Probes , Eugene , OR) を、ICAM - 1について前述したように、ICAM - 3でコートした (Geijtenbeek , T . B . ら、1999 , Blood 94 : 754 ~ 764) 。 萤光ビーズを、以下のようにM向性HIV - 1_{MN}エンベロープ糖タンパク質gp120でコートした：ストレプトアビジンでコートした蛍光ビーズを、ビオチン化F(ab')₂フラグメントウサギ抗ヒツジIgG (6 μ g / ml ; Jackson Immunoresearch) でインキュベートし、続いてヒツジ抗gp120抗体D7324 (Aalto Bio Reagents Ltd , Dublin , Ireland) と共に4で一晩インキュベートした。このビーズを洗浄し、そして250ng / mlの精製したHIV - 1 gp120 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Programを介してImmunodiagnostics , Inc によって提供される) と共に4で一晩インキュベートした。

【 0 0 4 3 】

蛍光ビーズ接着アッセイを、Geijtenbeekら (1999 , 前出) によって記載されるように実行した。手短には、細胞を、 5×10^6 細胞 / mlの最終濃度で接着緩衝液 (20mM Tris - HCl (pH 8 . 0) 、 150mM NaCl 、 1mM CaCl₂ 、 2mM MgCl₂ 、 0 . 5 % BSA) に再懸濁した。50,000の細胞

を、mAb (20 µg / ml) と共に室温で10分間プレインキュベートした。リガンドでコーティングした蛍光ビーズ (20ビーズ / 細胞) を添加し、そしてその懸濁物を、37で30分間インキュベートした。接着を、FACScan (Becton Dickinson, Oxnard, CA) 上でフローサイトメトリーを用いて、蛍光ビーズに結合した細胞のパーセントを測定することによって、決定した。

【0044】

(8.1次ヒト肝臓洞様毛細血管内皮細胞 (LSEC) におけるL-SIGNの検出)
肝臓組織を、書面による同意を受けた後に、肝臓手術を受けた患者から入手した。1次ヒト肝臓細胞の単離を、前述のように行なった (Hegenbarth, S.ら、2000, Hum Gene Ther 11: 481~486)。細胞を、Williams 10 E培地を補充されたコラーゲンI型コーティング組織培養プレート上で培養した (Hild, M.ら、1998, J Virol 72: 2600~2606)。単離の後日、肝臓細胞を、Texas-Red標識オボアルブミン (10 µg / ml) (Molecular Probes, Leiden, Netherlands) と共に2時間インキュベートし、そして穏やかなトリプシン処理によってマトリクスから分離した。細胞を、ウサギ抗-L-SIGN抗血清、続いてヤギ-抗ウサギIg FITC (Dianova, Hamburg, Germany) で染色し、そしてCellQuestソフトウェアを用いてFACScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) で分析した。オボアルブミン摂取は、共焦点顕微鏡を用いた、内皮細胞特異的マーカー (アセチル化LDL) とオボアルブミン陽性細胞との共染色によって立証されるように、LSECのみの特徴であり、Kupffer細胞の特徴ではない。 20

【0045】

(9. HIV-1 感染アッセイ)

感染アッセイを、以前に記載されるように (Geijtenbeek, 2000a、前出; Geijtenbeek 2000b、前出) 行なった。偽型HIV-1ストックを、ホタルルシフェラーゼリポーター遺伝子を含有するプロウイルスベクタープラスミドNL-Luc-E-R (Connor, R. I.ら、1995, Virology 206: 935-944)、および、ADAまたはJRFIいずれかのgp160エンベロープについての発現プラスミドを有する、HEK293T細胞のカルシウム-リン酸トランスフェクションによって產生した。ウイルス性ストックを、GHOST CXCR4/CCR5細胞および293T-CD4-CCR5細胞に対する限界希釈によって評価した。 30

【0046】

HIV-1細胞捕捉アッセイにおいて、THP-1トランスフェクト体 (250,000細胞) を発現するDC-SIGNまたはL-SIGNを、偽型HIV-1 (標的細胞濃度に関して約0.1の感染多重度) とともに、0.5mlの総体積で3時間プレインキュベートして、ウイルスを細胞吸収させた。3時間のインキュベーションの後、2容積のPBSで細胞を洗浄し、そして、1mlの細胞培養培地中の10 µg / mlのポリブレンの存在下で、Hut/CXCR5標的 (100,000細胞) とともにTHP-1トランスフェクト体を共培養した。3日後に細胞溶解物を得、そしてルシフェラーゼ活性について分析した。 40

【0047】

対照的に、最適以下のウイルス濃度 (代表的には、0.05m.o.i.未満) を用いて、洗浄工程なしでHIV-1増強アッセイを行なった。簡単に述べると、DC-SIGNまたはL-SIGNトランスフェクト体 (50,000細胞) を、同一のウイルス濃度 (偽型HIV-1または複製コンピテントM指向性株HIV-1JR-CSF) でインキュベートし、そして2時間後、活性化されたT細胞 (100,000細胞) を添加した。数日後に細胞溶解物を得、そしてルシフェラーゼ活性またはp24抗原レベルのいずれかについて分析した。IL-2 (10U / ml) およびPHA (10 µg / ml) の存在下で2日間、T細胞を培養することによって、T細胞を活性化した。

【0048】

(10. 免疫組織化学的分析)

以前に記載されたように (Geijtenbeek, 2000b, 前出)、組織凍結切片の染色を行った。組織の凍結切片 (8 μ) を、100%アセトン中で固定し (10分間)、PBSで洗浄し、そして1次抗体 (10 μg/ml) とともに37度60分間インキュベートした。洗浄後、ABC-PO/ABC-AP Vectastainキット (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いて、製造業者のプロトコルに従って最終的な染色を行った。ヘマトキシリンを用いて、核の染色を行った。

【0049】

(結果)

(1. DC-SIGNおよびL-SIGNのゲノムマップ)

ヒトBACクローンCTD-2102F19配列 (現在、GenBank (AC008812)において利用可能である) (図1)からの情報を用いて、DC-SIGN/L-SIGN遺伝子座の細密なマップを決定した。DC-SIGNおよびL-SIGNは、15.7 kb離れて、ヘッドを向かい合わせた (head to head) 方向で位置付けられる。RHマッピングは、DC-SIGNおよびL-SIGNが、よりテロメア方向に位置付けられたDC-SIGHを有するマーカーD19S912 (11.1を超えるロッドスコア値) の近くの染色体19p13.2-3に位置付けられていることを示した。RHデータと一致して、D19S912マーカーは、BAC配列におけるL-SIGNに対して、約37 kb動原体方向の距離で見出される。

【0050】

(2. L-SIGNのエキソン4における多型性)

DC-SIGNおよびL-SIGNの両方のエキソン4は、23アミノ酸の繰り返し単位をコードする69 bpの反復を含有する。これらの反復は、糖質認識ドメインとSIGN分子の膜貫通ドメインとの間にネックを形成する。胎盤mRNAから単離されたL-SIGN cDNAクローンは、遺伝子のコード領域全体を含有したが、Soilleuxら (2000, 前出) によって報告されたcDNAにおいて同定された7つの総反復と対照的に、エキソン4に対応する配列において6つのみの総反復しか存在しなかった。このことは、L-SIGNの反復領域が多型性であることを示した。350人の白人個体におけるエキソン4の分析は、反復の数 (3~9の範囲にわたる) に基づく7つの対立遺伝子の存在が示し、これらの対立遺伝子のうちの最も共通するものは、7つの反復 (表1) を含有する対立遺伝子であった。150人の白人におけるDC-SIGNエキソン4の分析からは、いかなる変動も示さなかった。

【0051】

(3. DC-SIGNおよびL-SIGNのノーザン分析)

L-SIGN mRNAは、コード領域全体にわたって、DC-SIGN mRNAに対して約90%の類似性を示すが、これらの遺伝子のエキソン2配列の間には53%のみの類似性しか存在しない。従って、エキソン2配列を用いて、ノーザン分析においてL-SIGN特異性であったプローブ (84 nt) を產生した。このプローブは、肝臓およびリンパ節において、約1.9 kb、2.6 kbおよび4.2 kbのサイズのmRNAにハイブリダイズし、そして胸腺において、弱い1.9 kbのバンドが検出された (図2A)。この1.9 kbのバンドは、リンパ節および胎児肝臓において顕著であり、L-SIGNの予測サイズに対応する。上側のバンド (このうちの1つ (2.6 kb)) は、成体肝臓において顕著である) は、選択的転写であるようであるが、RACE技術およびRT-PCR技術は、長さが変化する非翻訳領域の存在も、選択的スプライス改変体の存在も示していない。

【0052】

DC-SIGNのコード領域全体を含有する1.2 kbのフラグメント (このフラグメントは、DC-SIGN mRNAとL-SIGN mRNAとの両方を、それらの高い類似性に起因して認識する) を用いて、ノーザンプロットを再プローブした (図2B)。

10

20

30

40

50

再び、肝臓、リンパ節および胎児肝臓において、L-SIGN転写を表すバンドが観察された。さらに、DC-SIGNを表す4.3kbの転写物を、単球由来DCおよびリンパ節において検出し、胎盤、脾臓、胸腺、およびおそらく肝臓において、より低い量で検出した。

【0053】

L-SIGN mRNAはまた、より高感度のRT-PCR技術を用いて、胎盤およびDCにおいて検出されたが、これらの組織における発現レベルはあまりにも低すぎて、ノーザンハイブリダイゼーションにより検出できない。同じ程度の感度で、DC-SIGN転写物とL-SIGN転写物の両方を認識するプローブは、明らかに、2つの遺伝子産物の示差的組織分布を示した：L-SIGNは主に肝臓およびリンパ節において転写され、それに対しDC-SIGNは、DCおよびDCに適応する組織において特異的に発現される（図2）。L-SIGN mRNAは、DC、末梢血リンパ球、または脾臓のいずれにおけるノーザン分析によっても検出されない（図2）。

【0054】

（4. L-SIGNは、ヒトLSECによって発現され、そしてDCによっては発現されない）

インビオでL-SIGN分子を発現する細胞を同定するために、1対の抗DC-SIGN mAb（このうちの一方（AZN-D3）はL-SIGNと交差反応し、それに対して他方（AZN-D1）は、DC-SIGN特異的であった）を用いて免疫組織化学的分析を行った（図3A）。ノーザン分析から推測されるように、肝臓組織の弱い染色が、DC-SIGN特異的mAb AZN-D1を用いて観察され（図3B）、そしてこの抗体を用いて検出される希な細胞は、おそらく肝臓に存在するDCである。対照的に、mAb AZN-D3は、肝臓の類洞に沿った細胞を明るく染色した（図3B）。

【0055】

内皮細胞特異的マーカーCD31に対するモノクローナル抗体は、肝臓の連続切片において類似の染色パターンを呈し（データは示さず）、L-SIGNがLSECによって発現されることを示した。この考察を支持するために、一次ヒトLSECを、オプアルブミンの取り込み（これは、LSECに特有の性質である）によって他の肝臓細胞と区別し、そしてL-SIGNの発現について直接試験した。ポリクローナル抗L-SIGN抗体でのLSECの染色は、L-SIGNが、肝臓内のこれらの細胞によって排他的に発現されることを示した（図3C）。

【0056】

AZN-D1およびAZN-D3はともに、リンパ節を同程度によく染色した（データは示さず）。しかし本発明者らは、L-SIGN特異的ポリクローナル抗体を用いて、L-SIGNが単球由来のDCによっては発現されないことを見出した（図3D）。このことは、ノーザン分析からの結論を支持する。DC-SIGNおよびL-SIGNは、リンパ節において、異なる型の細胞によって発現される。

【0057】

（5. L-SIGNは、ICAM-3およびHIV-1gp120を結合させる）
ICAM-3およびHIV-1_{MN} gp120はともに、Ca²⁺依存様式で、高い親和性でDC-SIGNに結合することが示されている。フローサイトメトリーベースの接着アッセイ（Geijtenbeek、1999、前出）を用いて、L-SIGNを用いてトランスフェクトされたK562細胞は、高い親和性でICAM-3に結合することを示した（図4A）。このL-SIGN媒介結合は、DC-SIGN/L-SIGN特異的mAb（AZN-D2およびAZN-D3）、マンナン、またはEGTAによって阻害されたが、DC-SIGN特異的mAb（AZN-D1）によっては阻害されなかった。このことは、L-SIGNがICAM-3に対して高い親和性を有する、マンノース結合C型レクチンとして機能することを実証する。L-SIGNはまた、HIV-1_{MN} gp120にも結合し得た（図4B）。偽性トランスフェクト細胞は、ICAM-3にもHIV-1_{MN} gp-120にも結合しなかった（データは示さず）。

10

20

30

30

40

50

【0058】

(6. L - S I G N は H I V - 1 感染を増強する)

H I V - 1 g p 1 2 0 への、 L - S I G N の高親和性結合は、 L - S I G N が感染性 H I V - 1 と結合し得、そしてイントラスでの標的細胞の感染を増強し得る可能性を挙げた。 H I V - 1 感染におけるトランスレセプターとしての L - S I G N の役割を試験するため、 D C - S I G N または L - S I G N のいずれかを発現する T H P - 1 細胞を、 M 指向性 H I V - 1 _{J R F L} エンベロープ糖タンパク質で偽型化された、 単回感染性 H I V - ルシフェラーゼを用いてパルスし、洗浄して未結合のウイルスを除去し、そして H I V - 1 感染に対して許容的である標的細胞とともにインキュベートした。 3 日後に、 感染を評価した。 L - S I G N トランスフェクト化 T H P - 1 細胞および D C - S I G N トランスクレクト化 T H P - 1 細胞はともに、 感染性 H I V - 1 を捕捉し、そしてウイルスを標的細胞に透過させたが、偽性トランスフェクト化 T H P - 1 細胞は透過させなかつた(図 5 A)。 10

【0059】

次に、 L - S I G N が限界濃度の H I V - 1 を補足し得るか否か、 および、 感染を促進する許容細胞に対してウイルスが有効に存在するか否かを調査した。 D C - S I G N あるいは L - S I G N 、 または偽性トランスフェクト化細胞を発現する H E K 2 9 3 T 細胞を、 H I V - 1 _{A D A} エンベロープ糖タンパク質を用いて偽型化された、 低力価の H I V - ルシフェラーゼとともにインキュベートした。 次いで、 未洗浄の細胞を、 活性化 T 細胞とともに共培養した。 H I V - 1 でパルスされた、 偽性トランスフェクト化 H E K 2 9 3 T 細胞から、 標的細胞の最小感染を観察した(図 5 B)。 しかし、 L - S I G N を用いてトランスクレクトされた H E K 2 9 3 T 細胞は、 イントラスでの T 細胞の H I V - 1 感染を増強した(図 5 B)。 D C - S I G N 媒介増強は、 交差反応性 A Z N - D 2 抗体で阻害されたが、 L - S I G N については部分的な阻害が観察された。 マンナンは、 両方の S I G N 分子による増強を有効に阻害した。 20

【0060】

T 細胞の H I V - 1 感染を増強する L - S I G N の能力を評価するための類似の実験を、 複製コンピテントウイルスを用いて行った。 L - S I G N 、 D C - S I G N および空のベクターを用いてトランスクレクトされた K 5 6 2 細胞を、 M 指向性 H I V - 1 _{J R - c S F} 株とともに、 低ウイルス濃度で 2 時間インキュベートし、 次いで、 活性化 T 細胞とともに共培養した(図 5 C)。 ウイルス複製は、 偽性トランスクレクト化 K 5 6 2 細胞を用いて、 観察されなかつたが、 L - S I G N トランスクレクト体は、 H I V - 1 を標的細胞に透過させ、 ウイルス複製を生じた。 D C - S I G N / L - S I G N 特異的抗体である A Z N - D 2 を用いる H I V - 1 複製の殆ど完全な阻害は、 H I V - 1 感染を増強するこれらのレセプターの特異性を示した。 従って、 肝臓内で、 おそらくリンパ節内でも、 L - S I G N を発現する非 D C 系列細胞はまた、 H I V - 1 を捕捉し、 リンパ球に透過させる能力を有する。 30

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図 1】 D C - S I G N / L - S I G N 遺伝子マップの略図。 物理学的距離および遺伝子配向は、 B A C クローン C T D - 2 1 0 2 F 1 9 (G e n B a n k A C 0 0 8 8 1 2) から提供される配列に基づく。 40

【図 2】 D C - S I G N および L - S I G N のノーザンプロット分析。 4 . 3 k b (黒いヘッドを有する矢印) および 1 . 9 k b (白ぬきのヘッドを有する矢印) のサイズの位置は、 左に記される。 (A) L - S I G N 特異的プローブとのハイブリダイゼーションは、 肝臓、 リンパ節における遺伝子の発現、 および胸腺における遺伝子の弱い発現を示す。 (B) 両方の遺伝子を認識するプローブとのハイブリダイゼーション。 4 . 3 k b のバンドは、 D C - S I G N m R N A を表す。 L - S I G N 特異的プローブ(図 3 A)を用いる肝臓およびリンパ節において明白な明るい上部のバンド(約 4 . 2 k b)は、 プローブの特異性、 強度パターン、 およびサイズにおけるわずかな差異に起因して D C - S I G N 50

mRNA (4.3 kb) と異なる。(C) - アクチン cDNA コントロールプローブを用いたプロットの再プローブ化。

【図3A】L-SIGNは、LSEC上で発現され、そして単球由来のDC上で発現されない。(A)抗体AZN-D1は、DC-SIGN特異的であるが、AZN-D3は、L-SIGNと交差反応する。適切なDC-SIGNおよびL-SIGN K562トランフェクト体を、AZN-D1またはAZN-D3のいずれかで染色した。

【図3B】L-SIGNは、LSEC上で発現され、そして単球由来のDC上で発現されない。(B)ヒト肝臓におけるDC-SIGNおよびL-SIGN発現の免疫組織化学的分析。一連の区分を、AZN-D1 (DC-SIGN特異的) またはAZN-D3 (DC-SIGNおよびL-SIGNの両方を検出する) のいずれかを用いて染色した。AZN-D1は、DC (矢印) であり得る細胞を余り染色しないが、AZN-D3は、シヌソイドを描く細胞を染色する。

【図3C】L-SIGNは、LSEC上で発現され、そして単球由来のDC上で発現されない。(C)肝臓中のL-SIGNの発現は、LSECに制限される。単離の1日後、1次ヒト肝臓細胞を、蛍光色素標識オボアルブミンと共にインキュベートした。L-SIGN発現を、L-SIGN特異的ポリクローナル抗体を用いて間接的な免疫蛍光によって決定した。オボアルブミンを摂取した細胞 (LSEC) およびオボアルブミンを摂取しなかつた細胞 (肝細胞および他のレジデント肝細胞) は、それぞれ実線および破線によって表され、それぞれの細胞集団にゲーティングすることによって表される。 2×10^5 細胞を分析した。

【図3D】L-SIGNは、LSEC上で発現され、そして単球由来のDC上で発現されない。(D)L-SIGNは、単球由来のDCによって発現されない。GM-CSFおよびIL-4の存在下で単球から培養された、未熟DCは、FACScan分析によって決定されるように、抗L-SIGNポリクローナル抗体で染色されない。実線は、抗L-SIGNポリクローナル血清を用いた染色を示すが、点線 (実線の下に隠れる) は、ウサギ前免疫血清を用いた染色を表す。

【図4】L-SIGNは、ICAM-3 (A) およびHIV-1 gp120 (B) に結合する。K562-L-SIGN細胞およびK562-DC-SIGN細胞へのICAM-3 およびgp120の接着を、蛍光ビーズ接着アッセイ (Geijtenbeek, T. B. ら, 1999, Blood 94: 754~764) を用いて測定した。y軸は、リガンドでコーティングされた蛍光ビーズと結合する細胞のパーセントを表す。L-SIGN交差反応mAb AZN-D2 (20 μg/ml) およびAZN-D3 (20 μg/ml) は、DC-SIGN特異的mAb AZN-D1 (20 μg/ml) と対照的に、L-SIGNに対するICAM-3 およびgp120の接着を阻害する。K562トランフェクト体に対するICAM-3 およびgp120両方の接着はまた、マンナン (20 μg/ml) またはEGTA (5 mM) のいずれかによって阻害される。mockトランフェクト体に対する両方のリガンドの接着は、5%未満であった。3つのうち1つの代表的な実験が示される (SD < 5%)。

【図5A】L-SIGNは、輸送中のT細胞を捕獲し、そしてT細胞とHIV-1との感染を増強する。(A)L-SIGNは、HIV-1を捕獲し、そしてこれを標的細胞へ伝達する。適切なDC-SIGNまたはL-SIGN発現THP-1トランフェクト体を、HIV-1uc/JRFLシュードビリオンと共にプレインキュベートして、ウイルスの捕獲を可能にした。細胞を洗浄し、そしてTHP-1トランフェクト体を、Hut/CCR5標的細胞と共に同時培養した。細胞溶解物を、3日後に入手し、そしてルシフェラーゼ活性について分析した。用いられた各同時培養条件について、mock感染コントロールは、活性において一様に100計測数/秒未満であった。各データセットは、感染細胞の4つの別々のウェルの平均を表す。2つのうち1つの代表的な実験が示される。

【図5B】L-SIGNは、輸送中のT細胞を捕獲し、そしてT細胞とHIV-1との感染を増強する。(B)L-SIGNは、シュード型のHIV-1によってT細胞の感染を増強する。HEK293T細胞を、cDNAをコードするDC-SIGN、L-SIGN

10

20

30

40

50

または空のベクターで過渡的にトランスフェクトした。コントロール細胞を、AZN-D2 (20 µg / ml) またはマンナン (20 µg / ml) と共にプレインキュベートした。少量のシュード型 HIV-1_{ADA} を、前記のような活性化T細胞と一緒に添加した (Geijtenbeek, T. B. ら、2000, Cell 100: 587~597)。感染性を、ルシフェラーゼ活性を測定することによって2日後に決定した。実行された2つのうち1つの代表的な実験が示される。各実験を、3連のウェルで実行した。

【図5C】L-SIGNは、輸送中のT細胞を捕獲し、そしてT細胞とHIV-1との感染を増強する。(C) L-SIGNは、複製コンピテントHIV-1によってT細胞の感染を増強する。L-SIGNおよびDC-SIGN両方の適切なK562トランスフェクト体を、低ウイルス濃度の複製コンピテントM型性株HIV-1_{JR-CSF} (TCID₅₀ 100 / ml) と共にインキュベートした。特異性を決定するために、細胞を、AZN-D2 (20 µg / ml) と共にプレインキュベートした。2時間後、活性化T細胞を、上記のように添加した (Geijtenbeek, T. B. ら、2000, Cell 100: 575~585)。培養上清を、K562-T細胞同時培養の14日後に収集し、そしてHIV-1産生性をELISAを用いて測定してp24抗原レベルを決定した。コントロール実験において、同じ量のウイルスを、T細胞に直接添加した。3つのうち1つの代表的な実験が示される。各データセットは、感染細胞の3つの別々のウェルの平均を表す。

【図6】L-SIGNのコードDNA配列。

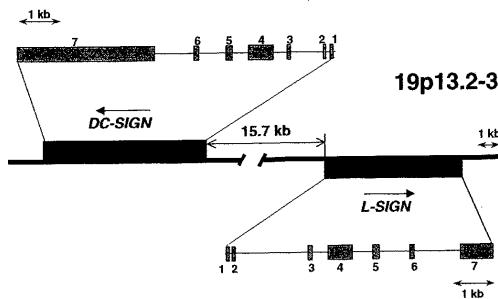
【図7】L-SIGNのアミノ酸配列。

10

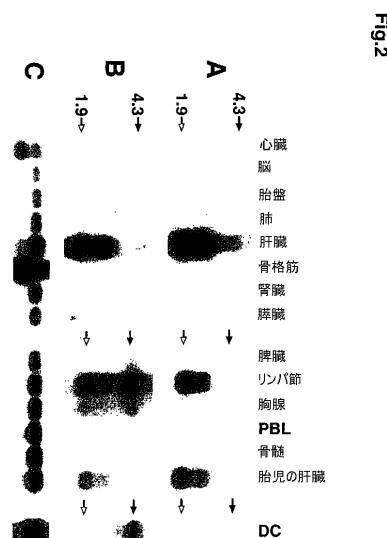
20

【図1】

Fig. 1



【図2】



【図3A】

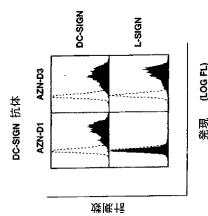


Fig.3A

【図3B】

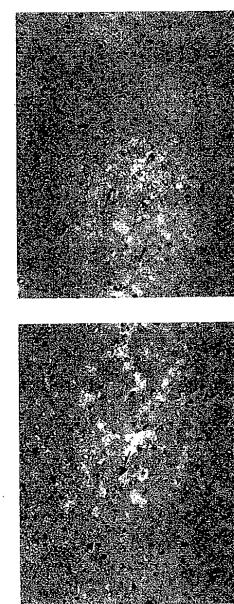


Fig.3B

【図3C】

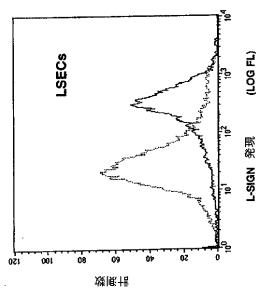


Fig.3C

【図3D】

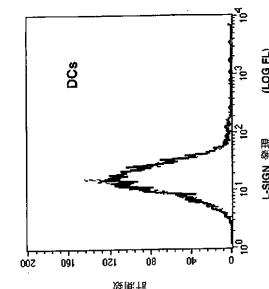
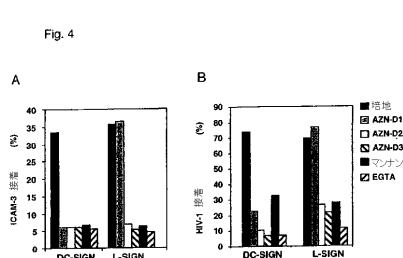
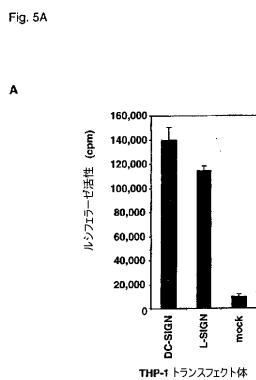


Fig.3D

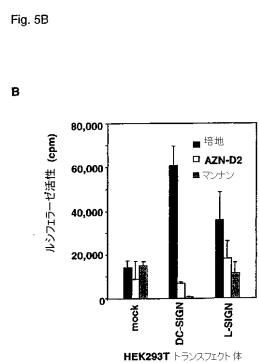
【図4】



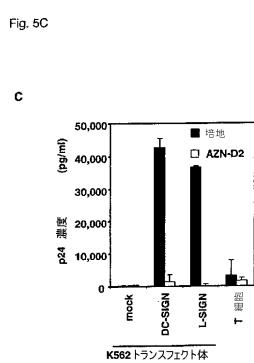
【図5A】



【図5B】



【図5C】



【図6】

DNA sequence 1200 b.p. atggatgtatcc ... agatggatgtatcc linear

Fig.6

1/11
 atg egt gac tcc aeg gaa cca agg gtg cgg ctg ggc ctc ctg gaa gaa gat cca aca
 M S D S K E P R V Q L G L L E E D P T
 31/11
 61/21
 aec egt ggc atc aca ctt ttt cca aca gac ttt aac ttc cag cag sta cat gac cac aag
 T G I R T P P R D P Q F Q Q I H G H K
 121/41 151/51
 aec tct aca ggg ttt ctt gtc cat ggg gcc ctt gtt ctt cca ctc tcc ttc atg ctc
 S T G C L G H G A 211/71
 ttt aac ggg gtc ctg gtc gco aac ctt gtc cat ggg tcc aag gtc ccc aac gtc cta aca
 L V V L V A N L V Q V S K V P S S L S 271/91
 241/81
 cgg gaa cca tcc gag caa gac gca atc tac tcc tcc ctt ctt aac gca gca gca
 Q S E Q D A I Y N L T Q L K A V 331/111
 301/101
 ctt gtc tcc tca gag aaa tcc aag ctt ctt ctt tcc tcc gag gag ctt aac ccc ctt aag
 G E L S E K S K L Q E 311/131
 361/121
 gtc gaa gtc ggt gag ttt cca gag aac tcc aag ctt cag gag atc tac cag gag ctt acc
 A V G E L P E K S K L Q E I Y Q E L T T
 421/141 451/151
 cgg ctt aag gtc gca gtt gag ttt cca gag aac tcc aag ctt cag gag atc tac cag
 R K A A V G E L F S K L Q E I Y Q 511/171
 481/151
 gag ctt acc cag ctt aag gtc gtt ggt gag ttt ccc gag aac tcc aag ctt cag gag
 E L T Q L K A A V G E L P E K S F K L Q E 571/191
 541/181
 acc tcc cag gag ctg acc cgg ctg aag gct aac gtt ggt gag ttt cca gag aac tcc aag
 I Q E L T R L K R A A G E L P E K S K 631/211
 601/201
 ctg ctt gag atc tac ctt gag ctg acc cgg ctg aac gtc gca gtt ggt gag ttt cca gag
 L Q E I Y Q E L T R A A V G E L P E 691/231
 661/221
 aac aac ctt gag gag atc tac gag gag ctg acc ctt ctt gtc acc gtc gca gtt ggt gag
 K S K L Q E I Y Q E L T Q L K A A V G E 931/313
 721/241 751/251
 ttg cca gag cat tcc aag ctt gag ctt gag acc acc gtc ttt aag aac gtc
 L D Q S K Q Q 811/273
 ttt gaa ccc ctg tcc ctt ccc ttt ccc aac ttt ccc aac aac aac ttt tac
 F E R L C R H C P K D L T F F Q G N C Y 841/281
 841/281 841/281
 ttg tcc ttt aac tcc cag ctt aac tgg ccc aac tcc gtc acc gtc ttt ccc
 F M S N S Q R N W H N S V T A C Q E V R 901/301
 gtc ccc gtc gta atc aac aat gtc ggg gag ctt ctt cta ctt ctt ctt
 A Q L V V I X T A E N F L Q I Q T S 991/331
 agg aat aac ccc ttc tcc tgg aat ggt ctt tcc gtc cta aat ctt gaa gtc aac tgg cca
 R S N R F S W M G L S D L N Q E G T W Q 1021/341 1051/351
 tgg tgg gac ggt tca ctt ctg tca ccc aac aac aac aac aac aac aac aac aac
 W M D G S F L S P S P Q R Y W N S G E P 1081/361 1111/371
 aac aat aac ccc aat gaa gac tgg ggg gaa ttt aat ggg aat ggg tgg aac gac aat cgg
 N N S G E D C A E F G G S G W N D N R 1141/381 1171/391
 tgg gac gtt gac aat tac tgg atc tgg aac
 C D V D N Y W I C K R P A A C F R D E *

【図7】

1 KSDSKEPAPVQGLLLEEDPTTSGIRLPPRDFPQQIINGHKKSTGCLGHGALVLOLLSPMS
 61 LAGGVVLPNLVGVVSKVPSSSLBQBQSEODATYQNLTLQKAAVGELSEKSKLQEVQELTOLK
 121 KAVGZLPEKSKLQEVQELTTLKAAVGELPEKSKLQEVQELTQKRAAVGELPEKSKLQK
 181 FVQELTRLKAAVGELPEKSKLQEVQELTQKRAAVGELPEKSKLQEVQELTQKRAAVG
 241 LWPQSKQOQIIVQELTDLKTAFERLCKNCFKDWTFFQNCVHSNSQSNWQ-BVTAQDIEVH
 301 RQWVWVWVKTABEQUHFLQLQTTSRNSRFSWQHLSPLNQEQBTQWVQVWNSPLSFSFQRYUNSGES
 361 RWSQHEDCAFSQSGQWNDNRCDVDRNVIICKHPAACFRDDE

Fig.7

【配列表】

0004322504000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/06 (2006.01) C 1 2 N 5/00 E
C 1 2 R 1/91 (2006.01) C 1 2 N 5/00 E
C 1 2 R 1:91

(72)発明者 フィグドー, カール グスタヴ
オランダ国 エヌエル- 5 2 1 1 ディーディー デン ボッシュ, ウエストワル 5 4
(72)発明者 ゲイジュテンピーク, テウニス ベルナルド ハーマン
オランダ国 エヌエル- 6 5 3 6 ジーアール ニジュメゲン, ウィーゼンホフ 3 4 7 1
(72)発明者 ヴァン クーイク, イヴェット
オランダ国 エヌエル- 6 8 1 3 ケイディー アーネム, ポッゲンピークストラート 5
(72)発明者 トレンスマ, ルアド
オランダ国 エヌエル- 6 5 3 1 アールピー ニジュメゲン, ノイシュアンストラート 6

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 国際公開第 0 0 / 0 6 3 2 5 1 (WO, A 1)
Clin.Exp.Immunol., 1998, Vol.114, p.427-433
J.Immunol., Sep.2000, Vol.165, No.6, p.2937-2942

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07K 1/00-19/00
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq