

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2006年8月3日 (03.08.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/080483 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C12N 1/15 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)

(30) 優先権データ:

特願2005-023252 2005年1月31日 (31.01.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 渡会 浩志 (WATARAI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 関根 悦子 (SEKINE, Etsuko) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 谷口 克 (TANIGUCHI, Masaru) [JP/JP]; 〒2300045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目7番22号 独立行政法人理化学研究所 横浜研究所内 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/301408

(22) 国際出願日: 2006年1月30日 (30.01.2006)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

[続葉有]

(54) Title: NOVEL DENDRITIC CELL MEMBRANE MOLECULE AND DNA ENCODING THE SAME

(54) 発明の名称: 新規樹状細胞膜分子及びそれをコードするDNA

AA マウス MWLSPALLLLSFPGCLSIQGPALVRGPEQGSVTVQCRYSSRWQTNKKWWCRGASWSTCRV
BB ヒト MWLPPALLLLSLSGCFSIQGPESVRAPEQGSITVQCHYKQGWETIYIKWWCRGVWDTCIKI
:**:.*:***** ** *****:*****:*. ** *****. *:***:

AA マウス LIRSTGSEKETKSGRLSIRDNQK\HSFQVTMEMLRQNDTDYWCGIEKFGTDRGTRVKVN
BB ヒト LIETRGSEQGEKSDRVSIKDNQKDRFTFTVMEGLRRDDADVYWCGIERRGPDLTQVKVI
*: : ***: ** *:***:*****:*** ***** **::*: *****: *. * **::***

AA マウス VYSGKDTMSTSNQLPWPTVDGSDTMVSSDLQKRTYYMLLVFVKVPALLILVGAVLWLKR
BB ヒト VDPEGAASTASS----PTXSNMAVFIGS--IHKRNIIYMLLVFVKVPILLILVTAILWLKG
* . * : :*: ** .. : :*. :*:***** ***** **::***

AA マウス STQKVPEEQWRIITLCSDLDSSELLAKDISP
BB ヒト S-QRVPEEPGEQPIYMNFS-EPLTKDMAT
* *:***** .: : :*. * *:***:.

AA MOUSE
BB HUMAN

(57) Abstract: The purpose of this invention is to defend against an infectious disease and control an autoimmune disease or the like by regulating the function of DC by targeting a molecule of the invention expressed on a mature DC, which is a strong APC. A protein comprising any of the following amino acid sequences is provided: (a) an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4; (b) an amino acid sequence in which one or more amino acid residues have been deleted, substituted, inserted and/or added in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4 and which can regulate an immune response; and (c) an amino acid sequence which has a homology of 80% or higher to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or 4 and can regulate an immune response.

(57) 要約: 本発明の目的は、強力なAPCである成熟DC上に発現している本発明の分子を標的としてDCの機能制御による感染症防御、自己免疫疾患等を制御することである。本発明によれば、以下の何れかのアミノ酸配列からなる蛋白質が提供される。(a) 配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列; (b) 配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列

[続葉有]

WO 2006/080483 A1



(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,

SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

において1個もしくは複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入および/または付加を含み、かつ免疫応答を制御し得るアミノ酸配列; 又は (c) 配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列と80%以上の相同性を有し、かつ免疫応答を制御し得るアミノ酸配列:

明 細 書

新規樹状細胞膜分子及びそれをコードするDNA

技術分野

- [0001] 本発明は、マウス又はヒト樹状細胞 (Dendritic Cell; 以下DCともいう) の膜分子、該膜分子をコードするDNA、該膜分子に対する抗体、並びに該抗体を用いた成熟DC分離法および成熟DC検出法に関する。

背景技術

- [0002] 自己免疫疾患の発症には(1) 遺伝的背景、(2) 組織炎症反応のため遊離された本来免疫系にさらされることのなかった自己抗原の曝露や、ウイルス・細菌などの炎症反応から派生する局所環境、すなわち活性化されたT細胞の認識ペプチドの相同性によるいわゆる交差反応性T細胞の活性化などからくる局所環境の変化、さらには(3) 細胞膜上での副刺激分子 (costimulatory molecule) の異常発現によるトレランスの破綻が起こり誘導された自己反応性T細胞の存在、などからなる要素が関わっていると想定される。
- [0003] 正常組織の刺激を受けていない抗原提示細胞は、自己抗原を提示していたとしても副刺激分子の発現が制御されているため、T細胞はアナジーに陥っており活性化されず自己寛容が維持されている。しかし、免疫異常状態においては過剰あるいは継続する副刺激分子の発現異常により自己反応性T細胞の活性化が生じた結果、自己免疫疾患が生じるのではないかという可能性が示唆されている。特にCD28/CD152とCD80/CD86間で生じるシグナルはT細胞活性化のコントロールに重要かつユニークな働きをしており、このシグナルを調節することによる免疫治療がマウス実験モデルにおいて試行され、実際ヒトに対する治験も行なわれ始めている。
- [0004] このような抗原ペプチドを認識する機構を基本とする所謂獲得免疫の機構がかなり解明されているのに対して、外来の糖脂質や蛋白質、DNA、RNAを認識する機構を基本とするいわゆる自然免疫は現在分子レベルで明らかにされつつある段階にある。また自然免疫から獲得免疫を繋ぐ分子機構についても不明な点が多い。
- [0005] 現在の哺乳類における自然免疫に対する理解はハエや植物の発生学・遺伝学に

において解析された感染防御機構に始まる。すなわちショウジョウバエの病原体認識分子Tollの哺乳類のホモログToll-like Receptor (TLR)が発見され、自然免疫における病原体認識を司ることが明らかとなった(Science、284巻、1313-1318頁(1999年))。この事実は自然免疫がハエからヒトまで共通する病原体認識機構であるという概念が成立することを意味する。獲得免疫が個体レベルで完結するシステムである(抗体やT細胞レセプターの特異性は個々に遺伝子を再構成することで獲得され、子孫に伝達されない)のに対して、自然免疫はゲノムに共有している進化の記録である。つまり獲得免疫の多様な特異性の中で、どの特異性に対して反応すればよいのかという方向付けをするのが自然免疫であり、最も重要な分子の一群がTLRであると考えられる。自然免疫におけるTLRの役割はアジュヴァントの認識およびシグナル伝達による副刺激分子の発現やサイトカイン産生である。獲得免疫において対象となるタンパク質自身は免疫原性が低いのに対し、病原体由来糖脂質(リポポリサッカライド(LPS)など)は免疫系を強く活性化する。例えば、抗体作製時に抗原のみでなくアジュヴァントが必要なのはよい例である。つまり獲得免疫発動の制御はTLRによる認識が入口になっているといっても過言ではない。

[0006] 獲得免疫発動の決定・制御の主役は樹状細胞(DC)であり、Th1/Th2 skewingと細胞傷害性T細胞(CTL)や活性化マクロファージの誘導(細胞性免疫)、抗体産生(体液性免疫)に関わる。この誘導される免疫反応は病原体の種類によって異なる。細菌感染の場合には細胞性免疫優位であるが、ある種の寄生虫やウイルスの場合には体液性免疫優位の場合もある。またアジュヴァントの場合にも水酸化アルミニウム(Alum)のように抗体産生優位になったりする。これにはTLRによる認識とDCによる獲得免疫の質的あるいは量的な変化が制御されている可能性が考えられる。

[0007] TLRは細胞外にLRRと呼ばれる蛋白質相互作用に関係するleucine-rich repeatを有するI型膜タンパク質で、細胞内にはTIR domain (Toll/IL-1R homology domain)と呼ばれるシグナル伝達に関係するドメインを有する(Trends Cell Biol.、11巻、304-311頁(2001年))。これまでにヒトにおいては10種類のTLR分子が報告されており(TLR1-TLR10)、同時にリガンドの同定も進んでいる。例えばTLR2は細菌由来ペプチドグリカン(PG)やリポ蛋白質を(J. Biol. Chem.、274巻、17406-17409頁(1999年)) ;及びJ.

Immunol.、163巻、2382-2386頁(1999年))、TLR4はグラム陰性細菌のLPSやグラム陽性細菌のリポテイコ酸(LTA)を(Science、282巻、2085-2088頁(1998年))TLR5は細菌鞭毛構成タンパク質を(Nature、410巻、1099-1103頁(2001年))、TLR2/6はマイコプラズマ由来リポペプチドや酵母由来ザイモザンを(Int. Immunol.、13巻、933-940頁(2001年))、TLR7とTLR8は細菌由来一本鎖RNAを(Science、303巻、1529-31頁(2004年))、TLR9は細菌由来CpG DNAを(Nature、408巻、740-745頁(2000年))、それぞれ認識することが報告されている。

[0008] TLRからのシグナル伝達についてはマクロファージあるいは樹状細胞においてTLR2(MALP-2刺激など)、TLR4(LPS刺激など)、TLR9(CpG DNA刺激など)を中心に解析されてきている。まずTIR domainと会合する分子としてIL-1R familyにおけるシグナル伝達において必須のアダプター分子であるMyD88がTLR4のシグナル伝達においても必須の分子であることが明らかとなり、LPSにより誘導されるマクロファージからのサイトカイン産生、B細胞ブラスト化、ショック症状の惹起等が全く欠如していた(Immunology、11巻、115-122頁(1999年))。しかし、MyD88欠損マウス由来マクロファージにおいてLPS刺激に対してNF-kappaBの活性化が見られることから、MyD88に依存しないNFkappaB経路の存在が示唆された。この経路に対する説明としてMyD88欠損マウスにおけるDCの解析結果がひとつの答えである。すなわちCD11c陽性のDCにおけるLPS刺激によるIL-12産生はMyD88欠損マウスにおいては全く見られなくなるが、CD40、CD80、CD86といった副刺激分子の発現上昇に関しては影響を受けない(J. Immunol.、166巻、5688-5694頁(2001年))。TLR4新規アダプター分子として報告されたTIRAP/MALはTLR4によるDCの成熟化を阻害することから、DCにおける副刺激分子発現に必要な経路に関与する可能性が示唆される(Nat. Immunol.、2巻、835-841頁(2001年))；及びNature、413巻、78-83頁(2001年))。またこの報告とは別にMyD88欠損マウス由来マクロファージおよびDCにおいてIP-10やISREといったIFN誘導遺伝子群の発現に必要なIRF3が活性化することが明らかとなった(J. Immunol.、167巻、5887-5894頁(2001年))。

[0009] 一方TLR2およびTLR9のシグナル伝達に関してはMyD88欠損マウスにおける解析結果ではサイトカイン産生、NF-kappaB活性化ともにMyD88は必須であった(J. Immu

nol., 164巻、554-557頁(2000年))。これとは別にPI3K familyに属し、SCIDマウスの原因遺伝子としても知られているDNA-PKcs欠損マウスがCpG DNAに不応答性であるとの報告もある(Cell, 103巻、909-918頁(2000年))。TLR9下流にDNA-PKcsが存在する、あるいは細胞の活性化にはTLR9、DNA-PKcsの両者が必要である可能性が示唆される。シグナル伝達に関しては、TLR欠損マウス及びMyD88欠損マウスを用いた解析が中心である。ヒトについてはMoDCにおいてTLR2およびTLR4刺激により異なるサイトカイン、ケモカインが誘導されるという報告もあり(J. Biol. Chem., 276巻、37692-37699頁(2001年))、ヒトDCにおけるTLR発現特異性を考えると、ヒトでの解析結果に興味を持たれる。

[0010] 上記のようにTLRからのシグナルが自然免疫の発動に重要であることは言を待たないが、TLRの自然免疫シグナルとは別に自然免疫の発動を受けて獲得免疫発動に必要な分子の存在があることが予想される。自然免疫反応を受けて獲得免疫反応をより高める分子としてTREM(Triggering Receptor Expressed by Myeloid Cells)-1が知られている(J. Immunol., 164巻、4991-4995頁(2000年))。TREM-1はCD14強陽性の単球及び好中球に発現する細胞外に1つのイムノグロブリンドメインを有するI型細胞膜蛋白質で、アダプター分子DAP12と会合してシグナルを伝えることが知られている。細菌や真菌あるいはその構成成分により刺激を受けたCD14強陽性の単球及び好中球においてTREM-1の発現は増強される。好中球に抗TREM-1アゴニスティック抗体を作用させると大量のIL-8やミエロペルオキシダーゼが産生され、単球からはIL-1betaやTNF-alphaあるいはMCP-1が産生されることが知られている。同時にICAM-1、CD11b、CD49e、CD29といった接着分子やCD40、CD86といった副刺激分子の発現も増強される。また、これらの炎症性サイトカインやケモカインの発現はLPS刺激と協調性をもって増強され、敗血症ショックを引き起こす。敗血症ショックのモデルにおいてはTREM-1が重要な機能を果たしていることが明らかにされている(Nature, 410巻、1103-1107頁(2001年))。

[0011] 樹状細胞(DC)は、生体内では骨髄に存在するCD34陽性細胞を前駆細胞として分化・成熟し、抗原提示細胞(APC)として、免疫応答の誘導、維持、拡大、調節において重要な役割を担っていることが知られている。プロフェッショナル APCであるDC

は、自然免疫反応による刺激を受けて活性化し、抗原特異的獲得免疫反応を惹起するばかりでなく、自ら様々なサイトカインを産生することによって感染時の自然免疫反応においても重要な役割を果たす。DCにおいては各TLRの発現は、MoDC、末梢血中のmyeloid DC (MDC)、plasmacytoid DC (PDC)間で明らかに異なり、リガンドを作用させた場合に産生されるサイトカインやケモカインレセプターの発現も異なることが明らかとなっている(J. Exp. Med., 194巻、863-869頁(2001年);及びEur. J. Immunol., 31巻、3388-3393頁(2001年))。またPDCにおいてCpG+CD40Lで大量のIL-12 p70を産生するという報告もあり(Eur. J. Immunol., 31巻、3026-3037頁(2001年))、実際の生体内において、どのDCサブセットがどのような自然免疫反応を受けて、autocrine/paracrineに作用するサイトカインの影響でどのようなphenotypeを有するDCへと成熟化していくのか、興味をもたれるところである。

- [0012] 1990年代に入って、DCを前駆細胞からサイトカインで分化・誘導できるようになり、大量のDCを扱えるようになって分子・細胞・生体レベルにおいてDCの免疫応答における役割の重要性が明らかになってくると共に、免疫制御の標的として注目されるようになった。
- [0013] これまでの生物学的研究成果から、ヒト単球(Monocyte; Moともいう)をGM-CSF及びIL-4存在下で培養することによりDC (Monocyte-derived DC; MoDCともいう)を誘導することが可能であることが明らかとなっている(J. Leucocyte Biol., 59巻、208-218頁(1996年))。このin vitro分化誘導系は人工的な部分があるものの、実際にDCとしての機能を有することが明らかとなってきた。DCの重要な機能は、自然免疫反応を受けるとともに抗原の細胞内への取り込み作用(食作用)及びその抗原の情報をT細胞に伝えてT細胞を刺激活性化することである。また、DCは分化の段階によって未成熟DC (Immature DC)と成熟DC (Mature DC)の二つに分別することができる。未成熟DC内に取りこまれた抗原は細胞内でプロセッシングを受け、抗原由来のペプチドとしてDC表面のMHCクラスII分子上に提示される。CD4陽性の抗原特異的ヘルパーT細胞は、抗原受容体で抗原由来のペプチドとMHCクラスII分子の複合体を認識し、副刺激分子からの刺激なども加わり、感作、活性化される。また、DCによりMHCクラスI分子を介してCD8陽性の細胞傷害性T細胞(CTL)も刺激、活性化される。食作用は

未成熟MoDCで強く、成熟 MoDCでは弱くなる。T細胞への抗原提示能は、それに関与するCD40、CD80、CD86、MHCクラスI分子、MHCクラスII分子の発現の程度と一致して、未成熟MoDCでは弱く、成熟MoDCになると強くなる。マウスに関しては骨髓細胞をGM-CSF存在下培養することによりミエロイド系の樹状細胞を(J. Immunol.、161巻、3096-3102頁(1998年))、Flt-3リガンド存在下培養することによりミエロイド系の樹状細胞およびプラズマサイトイド樹状細胞を(J. Exp. Med.、195巻、953-958頁(2002年))誘導することが可能であることが明らかとなっている。ミエロイド系の樹状細胞に関しては、上記ヒトMoDCとほぼ相同の機能を有することが知られている。

[0014] このDCにおける抗原取込能から抗原提示能という機能変化は、前述の自然免疫の反応を受けて獲得免疫を発動する部分を担っていると言っても過言ではない。この機能変化に伴って細胞表面上に提示される膜分子の変化が起こることは想像に難くないが、この成熟化(maturation)の過程でどのような事象が起こっているかを考えた場合に、細胞膜表面上に新たに発現した分子の発現はすべてmRNAの発現から起こるとは限らないという事実が存在する。例えば未熟な(Immature)段階から発現が見られるHLA-DRが成熟化に伴ってmRNA及びタンパク質の発現量の変化をほとんど伴わずに細胞内から細胞膜表面上に移動(translocation)するということが知られている。また、実際のmRNAの発現量とタンパク質の発現量を比較した場合にほとんど相関がない場合や、mRNAは発現しているのにタンパク質として翻訳されていない場合も存在する(Biochem. Biophys. Res. Commun.、231巻、1-6頁(1997年))。これまで遺伝子側からは増幅可能なこと、大量に解析することが可能なこと、ハンドリングが容易なこと、数々の手法が編み出せることなどから精力的に解析がなされてきたが、実際に発現しているタンパク質の変化を追うことができれば、そのような変化は細胞内の事象をよりよく反映しており現実に近いものということができるというのも事実である。

[0015] DCに関しては、上述の知見に加えて、DCにいくつかのサブセットが存在することも明らかになっているが、そのようなサブセットは成熟、未成熟で機能が異なることが知られている。しかしサブセット間でのそのような機能の違いが何に起因するのか、その答えは得られていない。少なくとも細胞内シグナリングに関与すると考えられる膜分

子、特にDCの成熟化に伴って発現する膜分子、の解明が待たれるところである。

- [0016] 前述のように、生体内に存在する強力なAPCであるDCは活性化刺激に伴い成熟化すると、B7ファミリーに属するCD80/CD86を高発現することが知られている。自己免疫疾患との関わりについては、例えば慢性関節リウマチの関節液や乾癬の病巣部組織内、アレルギー性接触性皮膚炎の皮膚組織に存在するDCはCD80/CD86が異常発現になっていることが知られている。
- [0017] CD28は、ナイーブT細胞の活性化を強力に増強させる特徴を有する。このCD28によるシグナルの存在によりIL-2の産生及びIL-2レセプターの発現が増強され、増殖反応が亢進し、結果的にT細胞の様々なエフェクター機能が増強されることになる。CD28シグナルはIL-2だけでなくIL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , TNF- α , GM-CSFなど様々なサイトカイン産生も増強させる。またCD40リガンドのようなT細胞活性化抗原やIL-8, RANTESなどのケモカイン発現にも関与している。CD80あるいはCD86のCD28への結合がCD4陽性T細胞のTh1あるいはTh2への分化誘導に関与していることを示す多くの報告がある。しかし、CD80はTh1、CD86はTh2といったような一面的なものではなく、ナイーブCD4陽性T細胞の分化方向の決定は、CD28およびCD152シグナル以外にも抗原あるいはAPCそのものから規定されてくる様々な因子によって影響を受けると考えられる。しかしながら、CD28シグナルが特にナイーブT細胞のTh2分化・活性化において他の分子の機能によって代償されない重要な役割を担っていることが、(1)CD28ノックアウトマウスにおけるTh2サイトカイン依存性の免疫グロブリンであるIgG1, IgG2bの選択的産生障害 (Science, 261巻, 609-612頁(1993年))や(2)DO11-10TCRトランスジェニックマウスCD4陽性T細胞とCD80/CD86ダブルノックアウトマウス由来APCによる抗原刺激によるTh2分化の選択的阻害 (J. Immunol., 161巻, 2762-2771頁(1998年))などの結果から裏付けられている。また、CD28シグナルのもうひとつの重要な役割として、bcl-xLのようなサバイバル因子の発現を増強させ、抗原刺激を受けた後のT細胞のアポトーシスを抑制することが挙げられる。
- [0018] CD28が恒常的にT細胞に発現しているにもかかわらず、組織細胞においてCD80/CD86の発現が制御されているために、たとえ自己抗原に反応するT細胞が存在しても過剰な免疫反応が起こらないような仕組みになっている。このトレランス誘導システ

ムが破綻した場合には、自己免疫疾患やアレルギー疾患等の様々な疾患が引き起こされる可能性を秘めている。膵島beta細胞にCD80あるいはCD86を強制発現させただけでは膵臓への炎症性リンパ球浸潤は認められるが、自己免疫性糖尿病であるインスリン依存性糖尿病(IDDM)の発症には至らず、主要組織適合抗原(MHC)クラスII分子、TNF- α 、あるいは自己抗原としてのウイルスタンパク質をCD80とともに発現させてはじめてbeta細胞の破綻を伴うIDDMを発症させることができる。このことはCD28-CD80/CD86シグナルに加え、T細胞レセプター(TCR)シグナルの強化を促すような環境下に置かれてはじめて自己免疫疾患が発症する可能性が示唆されている。

[0019] いくつかのヒト臓器特異的自己免疫疾患においてCD80/CD86の発現がプロフェッショナルAPCであるDCにおける発現が報告されている。このように正常組織のAPCにおいては制御下にあるCD80/CD86が、疾患局所においては異常発現している例が数多く見つかってきており、自己免疫疾患との関連が示唆されている。

[0020] 現在、自己免疫疾患の治療は副作用の多い非特異的な免疫抑制剤が中心である。副刺激(costimulation)阻害では、抗原特異的な抑制及び投与終了後における持続効果があり、投与期間短縮による副作用の軽減や感染症防御免疫反応の維持が期待できる。免疫系細胞の相互作用や機能が明らかになっていくのにしたがってより効果的な治療が行なわれることが期待される。活性化T細胞に発現がみられるCD28ファミリーの分子としてICOS(inducible T cell co-stimulator)やPD-1が見つかってきている。これらはそれぞれB7ファミリーに属するB7-H2、B7-H1がそのリガンドであることが明らかとなり、複数のB7ファミリーとCD28ファミリーを介したAPCによるT細胞costimulationの作用の差異の解明が待たれるところである。

[0021] また、感染症等に対する生体防御の観点から、自然免疫と獲得免疫を繋ぐ分子メカニズムの解明が待たれるところである。すなわち、LPSやCpGなどはIL-12の大量産生やCD40あるいはCD80/CD86の発現増強を伴って、DCのmaturationを誘導するが、これに関わる詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0022] 本発明者らは、DCの機能発現に重要となるDCの成熟化に着目し、DCの成熟によ

って発現量が上昇する膜分子の同定を中心とした探索研究を、プロテオミクス(Proteomics)によるDCの成熟に伴い発現が調節される膜分子の網羅的同定を基に実施してきた。プロテオミクスとは、タンパク質について、遺伝子のゲノミクス(Genomics)に対応した言葉であり、タンパク質の大規模研究を行うものである。タンパク質の発現量、翻訳後の修飾や相互作用などの性質を研究し、例えば正常細胞とがん細胞において発現タンパク質レベルで何が起こっているか、細胞内ネットワークやプロセスなどの全体的な生物学的情報を得るものである。DCに特異的に存在する膜分子が同定されるならば、該膜分子に対する抗体の作製や、医療分野での該抗体の利用が可能となるだろう。

- [0023] 本発明の目的は、強力なAPCである成熟DC上に発現している本分子を標的としてDCの機能制御による感染症防御、自己免疫疾患等の制御である。また、該分子は成熟DCなどのAPCに発現し、T細胞活性化に関わる分子と予想されることから、該分子を特異的に認識する抗体を使用して成熟DC等のAPCを分離する方法、および検出する方法を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0024] 本発明者らは、DCの成熟化により発現が調節される膜分子を探索研究した結果、未成熟DCと成熟DCとの間で、発現がみられる新規膜分子を同定し、この分子がDCの成熟化に伴い、そのタンパク質レベルでの発現が顕著に上昇することを今回見出した。この膜分子は従来知られているマクロファージや好中球で発現の見られるTREM-1にホモロジーを有していることが明らかとなった。また本膜分子はTREMファミリーに特徴的な1つのイムノグロブリン(Ig)ドメインを有することが推定されており、立体構造の保持に必須のS-S結合に関わるCys残基の位置が保存されていた。これらの事実から本膜分子群は自然免疫と獲得免疫を繋ぐ主役たるDCにおいて発現の見られるTREMファミリーに属する新規膜分子と考えられる。
- [0025] 最近の研究成果から(1)DCは不均一な細胞集団でありいくつかのサブセットが存在すること[Stem Cells、15巻、409-419頁(1997年)]、(2)DCサブセットはT細胞活性化において異なる機能(アポトーシス誘導、T細胞のTh1、Th2への分化誘導など)を持つこと[Science、283巻、1183-1186頁(1999年)]、(3)DCを介して免疫応答を制

御することが可能であること(DC療法、DC特異的な薬剤、抗体、サイトカインなど)、
が明らかになってきた。

[0026] ヒトDCサブセットとしては大別して、ミエロイド系DCとリンパ球系DCとがある。ミエロイド系DCには2つの分化経路が存在することが示されており[J. Exp. Med.、184巻、695-706頁(1996年)]、CD34陽性の造血幹細胞をGM-CSFとTNF- α で培養する系ではCD14陽性CD1a陰性およびCD14陰性CD1a陽性の前駆細胞が出現し、前者からは真皮(dermal)DC、後者からは表皮ランゲルハンス細胞に分化することが知られている。本発明者らが用いたMoDCは生体内では前者由来のDCと類似しており、ミエロイド系DCに属すると考えられている。一方、ヒトリンパ球系DCは、形質細胞様のCD4陽性T細胞がIL-3存在下で未熟なDC(CD11c陰性、CD14陰性)へと分化し、IL-3とCD40リガンドの刺激によりDCとして機能的に成熟することが知られている[J. Exp. Med.、185巻、1101-1111頁(1997年)]。また、MoDCはCD40リガンドあるいはエンドトキシンによる刺激により大量のIL-12を産生し、ナイーブT細胞をTh1に分化・誘導する機能を有するDCに分化するという報告がある[Science、283巻、1183-1186頁(1999年)]。このように本発明者らが用いたMoDCは少なくともナイーブT細胞をTh1タイプに分化し得る一群であることがわかる。また、末梢血には少なくとも2つのDCサブセットが存在しており、系統マーカー(CD3、CD19、CD56、CD14)陰性、HLA-DR陽性、CD11c陽性と系統マーカー(CD3、CD19、CD56、CD14)陰性、HLA-DR陽性、CD11c陰性、CD123強陽性の表現型を示す。それらDCは成熟後、前者は大量のIL-12を産生するMDC、ナイーブT細胞をTh1に、後者は大量のtype I IFNを産生するPD C/NIPC(natural type I interferon producing cell)であることが知られている[Science、284巻、1835-1837頁(1999年)]。

[0027] このように、本膜分子はMoDCの成熟化に伴い発現が顕著に上昇していることなどの知見から、免疫応答を制御するための標的分子としても期待される。

[0028] 一方、抗原をパルスした自己の末梢血DCを用いた癌ワクチンのパイロットスタディも行なわれており[Nature Med.、2巻、52-58頁(1996年)]、本膜分子の成熟DCでの発現の特異性を利用して、特異的抗体を用いてパルス後のDCの成熟化を確認することができる。また、その際の成熟DCと未成熟DCとの分離、成熟DCの検出などにも

有用である。

[0029] 本発明は上記の知見に基づいて完成したものである。即ち、本発明によれば、以下の何れかのアミノ酸配列からなる蛋白質が提供される。

(a) 配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列;

(b) 配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列において1個もしくは複数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入および/または付加を含み、かつ免疫応答を制御し得るアミノ酸配列;又は

(c) 配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列と80%以上の相同性を有し、かつ免疫応答を制御し得るアミノ酸配列:

[0030] 本発明の別の側面によれば、本発明の蛋白質をコードするDNAが提供される。

[0031] 本発明のさらに別の側面によれば、以下の何れかの塩基配列からなるDNAが提供される。

(a) 配列番号1又は3に記載の塩基配列;

(b) 配列番号1又は3に記載の塩基配列において1個もしくは複数個の塩基の欠失、置換、挿入および/または付加を含み、かつ免疫応答を制御し得るアミノ酸配列をコードする塩基配列;又は

(c) 配列番号1又は3に記載の塩基配列又はその相補配列とストリンジエンな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、かつ免疫応答を制御し得るアミノ酸配列をコードする塩基配列:

[0032] 本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNAを含む組み換えベクターが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNA又は組み換えベクターを有する形質転換体が提供される。

[0033] 本発明のさらに別の側面によれば、本発明の蛋白質又はその断片に特異的に免疫結合する抗体が提供される。

好ましくは、本発明の抗体は、免疫学的に樹状細胞を認識する。

好ましくは、本発明の抗体は、本発明の蛋白質の細胞外領域を認識する。

[0034] 好ましくは、本発明の抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。

[0035] 本発明のさらに別の側面によれば、本発明の抗体を用いてヒトまたは他の動物由来の免疫担当細胞を分離する方法が提供される。

好ましくは、樹状細胞が分離される。

[0036] 本発明のさらに別の側面によれば、本発明の抗体を用いて免疫担当細胞を検出する方法が提供される。

好ましくは、樹状細胞を検出する。

発明を実施するための最良の形態

[0037] 以下に本発明をさらに詳細に説明する。

(1)本発明の新規膜分子及びそれをコードするDNA

上述したように、本発明は、本膜分子がDCにおいて成熟化に伴って発現が上昇するという知見に基づいている。

[0038] 本発明のヒトおよびマウス樹状細胞膜分子は、マウス骨髄細胞をGM-CSF存在下培養することにより誘導したマウス骨髄由来未成熟樹状細胞(DC)をリポポリサッカライドで刺激し、その可否に基いて成熟DCを得たのち、細胞膜を調製し、その可溶性タンパク質についてコンカナバリンAセファロースクロマトグラフィー、小麦胚アグルチニンセファロースクロマトグラフィー、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動などの手法を用いて膜タンパク質を分画し、LC/MS(特にApplied Biosystems社製QTRAP)による微量分析にかけて同定された(後述の実施例1～5参照)。さらにLC/MS法で同定された複数の部分アミノ酸配列に基づくプライマーを合成し、マウス成熟DC由来cDNAライブラリーを鋳型にしてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い本発明の膜分子の遺伝子断片を増幅し取得し、この遺伝子断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションにより本発明の膜分子(A)の遺伝子を含むクローンを選抜し、その塩基配列(配列番号1)およびアミノ酸配列(配列番号2)を決定した(後述の実施例6参照)。

[0039] またヒトのオルソログと考えられる分子(B)については、マウスで同定された分子(A)の塩基配列(配列番号1)およびアミノ酸配列(配列番号2)をもとにBLAST法によるデータベース検索を実施することにより、候補となるオルソログを同定し、ヒト単球をGM-CSFおよびIL-4存在下培養することにより得られるヒト単球由来未成熟DCあるいはこれをリポポリサッカライドにより刺激することにより誘導したヒト単球由来成熟樹状

細胞からcDNAライブラリーを作製し、上記に記したと同じコロニーハイブリダイゼーションにより本発明の膜分子の遺伝子を含むクローンを選抜し、塩基配列(配列番号3)およびアミノ酸配列(配列番号4)を決定した。

[0040] 本発明の膜分子(A)および(B)は、ハイドロパシープロット解析[J. Exp. Med.、157巻、105-132頁、1982年]、シグナル配列予測解析[Protein Eng.、10巻、1-6頁、1997年]の結果、いずれもシグナル配列を有するI型膜蛋白質であることが示唆された。

[0041] 膜分子(A)

本膜分子は209アミノ酸残基からなり、ハイドロパシープロット解析(図1)及びシグナル配列予測解析の結果から、17アミノ酸残基のシグナル配列、140アミノ酸残基の細胞外領域、21アミノ酸残基の膜貫通領域、31アミノ酸残基の細胞内領域から構成されていると考えられる。さらにホモロジー検索並びにモチーフ検索の結果から、ジスルフィド結合形成に必要なシステイン(Cys)残基の位置から1つのIgドメイン(IgV set)を有すると予想され、潜在的なアスパラギン結合型糖鎖付加部位が2ヶ所存在する(84位および97位のアスパラギン残基)。また細胞膜貫通領域にはリジン(Lys)残基が存在することからイオン結合により何らかのアダプター分子と会合していることが予想される。

[0042] 膜分子(B)

本膜分子は201アミノ酸残基からなり、ハイドロパシープロット解析(図1)及びシグナル配列予測解析の結果から、17アミノ酸残基のシグナル配列、134アミノ酸残基の細胞外領域、21アミノ酸残基の膜貫通領域、29アミノ酸残基の細胞内領域から構成されていると考えられる。さらにホモロジー検索並びにモチーフ検索の結果から、ジスルフィド結合形成に必要なシステイン(Cys)残基の位置から1つのIgドメイン(IgV set)を有すると予想され、潜在的なアスパラギン結合型糖鎖付加部位は細胞外ドメインには存在しない。

[0043] 本膜分子(A)および(B)は、オルソログの関係にあると考えられ、CLUSTAL-Wによる解析の結果、細胞外領域全体にわたってはアミノ酸一致で55%のホモロジーを有することが明らかとなった(図2)。

[0044] 本発明の膜分子群は、遺伝子クローニングおよびDNA組換え技術を利用すること

によって、大量合成が可能である。そのための一般的な技術として、例えばSambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)やAusubelら, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.(1989)に記載されるような標準技術を使用できる。

[0045] 上記標準技術によりヒト成熟DCからmRNAを取り出しcDNAライブラリーを作製する。配列番号1又は3に記載された配列に基き合成した特異的プローブを用いて該ライブラリーをスクリーニングし目的のcDNAを得ることができる。あるいは、配列番号1又は3に記載された配列に基づいて目的分子の成熟配列を含む配列を増幅するためのセンスおよびアンチセンスプライマーを合成し、該cDNAライブラリーを鋳型にしてPCRを行い、目的のcDNAを増幅することができる。PCRは自動サーマルサイクラー(automated thermal cycler)を用いて実施するのがよく、その反応は、耐熱性ポリメラーゼ(Taqなど)、鋳型DNAおよびプライマーの存在下、DNAの変性(例えば94℃, 15～30秒)、プライマーのアニーリング(例えば55℃, 30秒～1分)、および4種類の基質(dNTP)の共存下での伸長反応(例えば72℃, 30秒～10分)を1サイクルとして約25～40サイクル実施し、さらに70～75℃で5～15分加熱することによって行うことができる。プライマーのサイズは通常少なくとも15ヌクレオチドである。

[0046] 上記した手法により、本発明の膜分子(A)および(B)をコードするDNAをクローニングすることができる。本発明の膜分子(A)および(B)をコードするDNAの具体例としては、配列番号1又は3に記載の塩基配列からなるDNAが挙げられる。

[0047] 変異体

上記した配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列を有するマウス又はヒト樹状細胞膜分子に加えて、本発明はさらに、配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列において1個もしくは複数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入および/または付加を含み、かつ免疫応答を制御し得るアミノ酸配列、並びに配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有し、かつ免疫応答を制御し得るアミノ酸配列から成る蛋白質(以下、変異体蛋白質とも称する)を提供する。

- [0048] 本明細書で言う「1個もしくは複数個」のアミノ酸残基とは、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～8個、特に好ましくは1～5個、最も好ましくは1～3個のアミノ酸残基を意味する。
- [0049] 本明細書中で使用する「相同性」という用語は、2つ以上のアミノ酸配列または塩基配列間での配列の同一性または類似性を意味し、配列は例えば対角線図形法や頻度分布法などを含む慣用的方法で比較しうる。
- [0050] 本明細書中で使用する「免疫応答を制御し得る」という用語は、本発明の天然型膜分子(A)および(B)と同じかまたは実質的に同じT細胞活性化能を有していてもよいし、あるいは、T細胞の活性化を抑制もしくは阻害する能力を有していてもよいことを意味する。
- [0051] 上記したような変異体蛋白質をコードするDNAも本発明の範囲内である。このようなDNAとしては、例えば、配列番号1又は3に記載の塩基配列において1個もしくは複数個の塩基の欠失、置換、挿入および/または付加を含み、かつ免疫応答を制御し得るアミノ酸配列をコードする塩基配列;又は配列番号1又は3に記載の塩基配列又はその相補配列とストリンジエンな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、かつ免疫応答を制御し得るアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAが挙げられる。
- [0052] 本明細書で言う「1個もしくは複数個」の塩基とは、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～8個、特に好ましくは1～5個、最も好ましくは1～3個の塩基を意味する。
- [0053] 本明細書で言う「ストリンジエンな条件下でハイブリダイズする塩基配列」とは、例えば、0.5M NaHPO₄, 7% SDS, 1mM EDTA, 65℃でハイブリダイゼーションを行い、その後0.1×SSC/0.1% SDS, 68℃で洗浄を行った場合に検出される塩基配列などが挙げられる。
- [0054] 本発明の変異体蛋白質は天然型膜分子の機能の全部または一部を有することができる。生体内では侵入したある種の外因性抗原に対し抗体の産生が起こるが、このとき抗原提示細胞とT細胞、B細胞が関与する。抗原提示細胞は抗原を細胞内に取り込み、これを小さくして抗原の性質を読み取る。抗原が自己以外の成分である場合

には、抗体産生のためにT細胞にシグナルを伝達しT細胞を活性化する。本発明の変異体は抗体産生過程のT細胞を活性化するために使用することができる。このような変異体の実際の応用例としては、変異体をコードする遺伝子を適当な発現ベクター(例えばアデノウイルスベクター)に組み込んだのち、相同組換えにより対象のDC内のゲノムに遺伝子導入し、該遺伝子を発現させてDC膜中に該膜分子変異体をもつDCを得ることが考えられる。

[0055] 或いは逆に、本変異体をT細胞の活性化を阻害もしくは抑制するために用いることも可能である。この場合、変異体は天然のDC膜上の膜分子と拮抗可能であるべきであり、例えばそのような変異体としてはT細胞の活性化に必須のドメインに欠陥を有しているものが挙げられる。

[0056] 天然型膜分子と高い相同性(80%以上)を有し、かつT細胞の活性化を制御する能力を有している限り、いかなる変異体も本発明の範囲内である。このような変異体は例えば、部位特異的突然変異法、PCR法などを用いて天然型膜分子に対し所望の改変(欠失、置換、挿入および/または付加)を導入することによって製造することができる(上記のMolecular Cloning、およびCurrent Protocols in Molecular Biologyを参照)。そのような改変として、例えば保存的アミノ酸間の置換、例えば酸性アミノ酸(アスパラギン酸とグルタミン酸)間、塩基性アミノ酸(リジンとアルギニン)間、疎水性アミノ酸(ロイシン、イソロイシン、バリンなど)間の置換が挙げられる。

[0057] 本発明の変異体を天然源等から得る場合には、塩基配列に基づいてプローブを作製し、中度または高度のストリンジент条件化でのハイブリダイゼーションの後、高ストリンジент条件下で洗浄することによって目的の変異体をコードする遺伝子を取り出し、これを適当なベクターに組み込み、発現させることによって目的の変異体を得ることができる。高ストリンジент条件の例は、0.5M NaHPO_4 , 7% SDS, 1mM EDTA, 65°Cでのハイブリダイゼーション、その後の0.1×SSC/0.1% SDS, 68°Cでの洗浄である(上記のCurrent Protocols in Molecular Biologyを参照)。ハイブリダイゼーション条件は温度およびイオン強度を適宜選択することによって決定できるが、通常、温度が高いほど、またイオン強度が低いほどストリンジエンシーが高まる。したがって当業者は適するハイブリダイゼーション条件を選択可能である。本発明には、塩基配列と80

%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、最も好ましくは98%の相同性を有する、上記変異体をコードするDNAも包含される。

[0058] (2)本発明の組み換えベクター及び形質転換体

本発明のDNAは適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター(例えばプラスミド等)でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

[0059] 好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターにおいて本発明の遺伝子は、適当な転写/翻訳調節配列(例えば、プロモーター等)に機能的に連結されている。発現ベクターの種類としては、例えばプラスミド、ファージ、コスミド、ウイルスなどが挙げられる。プロモーターは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜選択することができる。

[0060] 転写/翻訳調節配列には、使用する宿主/ベクター系に応じて選択されたプロモーターおよびエンハンサーを含めることができる。プロモーターとして、細菌系では例えば P_L , P_R , P_{trp}, Placなど、酵母系では例えばPHO5, GAP, ADH, AOX1プロモーターなど、動物細胞ではSV40初期プロモーター、レトロウイルスプロモーター、ヒートショックプロモーターなどを挙げることができる。昆虫細胞で作動可能なプロモーターとしては、ポリヘドリンプロモータ、P10プロモータ、オートグラフィア・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性タンパクプロモータ、バキュロウイルス即時型初期遺伝子1プロモータ、またはバキュロウイルス39K遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。

[0061] また、本発明のDNAは必要に応じて、適切なターミネーターに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル(例えばSV40またはアデノウイルス5E1b領域由来のもの)、転写エンハンサー配列(例えばSV40エンハンサ)などの要素を有していてもよい。

[0062] 本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にするDNA配列を具備してもよく、その一例としてはSV40複製起点(宿主細胞が哺乳類細胞のとき)が挙げられる。

[0063] 本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカ含有してもよい。選択マーカ

としては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) またはシゾサッカロマイセス・ポ
ンベTPI遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている遺伝子、または例えば
アンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若し
くはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。本発明の遺伝子、
プロモータ、および所望によりターミネータおよび／または分泌シグナル配列をそれ
ぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は当業者に周知である。

[0064] 発現ベクターは、宿主に応じて種々のものが市販または寄託されており、あるいは
文献等の刊行物に記載されており、それらを使用できる。例えば細菌用としてpQE(
キアゲン社)、pBluescript II SK+(ストラタジーン社)、pET(ノバジェン社)などである。

[0065] 本発明のDNA又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転
換体を作製することができる。

本発明のDNAまたは組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明の蛋白
質を発現できれば任意の細胞を使用できる。宿主細胞としては、原核細胞、酵母類、
動物細胞、真菌細胞、昆虫細胞又は植物細胞などが使用可能である。

[0066] 原核細胞の例としては、例えば、エシェリヒア属、バチルス属、シュードモナス属など
が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコン
ピテント細胞を用いることにより行えばよい。

[0067] 酵母細胞の例としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属またはピチア
属などの細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cer
evisiae*)またはサッカロマイセス・クルイベリ(*Saccharomyces kluyveri*)等が挙げられる
。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーショ
ン法、スフェロブラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

[0068] 動物細胞の例としては、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓
細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)などが挙げられる。哺乳類細胞を形
質転換し、該細胞に導入されたDNA配列を発現させる方法も公知であり、例えば、
エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることが
できる。

[0069] 真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスポラ、フザリウム、ま

たはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

[0070] 昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる(例えば、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual; 及びカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47(1988)等に記載)。

[0071] バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

[0072] 昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21〔バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー(W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク(New York)、(1992)〕、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHiFive(インビトロジェン社製)等を用いることができる。

[0073] 組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

[0074] 形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞は適当な培養培地中で培養されて目的遺伝子を発現させ、産生した本発明の膜分子を培地中から、または宿主細胞中から回収する。細胞から回収する場合には、培養終了後、細胞を遠心分離等により分離し、水性緩衝液に懸濁し、音波処理、フレンチプレス、ダイノミルなどにより細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。膜分子の単離精製は、タンパク質の精製に用いられる一般的方法、例えばゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー、HPLC、電気泳動法

、脱塩法、有機溶媒沈殿法などを任意に組合わせて行うことができる。

[0075] (3)本発明の抗体

本発明の抗体は、上記(1)に記載した本発明の蛋白質又はその断片に特異的に免疫結合する抗体である。

[0076] 本明細書中で使用する本発明の抗体に関する「特異的に免疫結合する」という用語は、本発明の抗体が本膜分子のみが有するエピトープと免疫学的に交差反応し、TREMファミリーなどの他のタンパク質と交差反応しないことを意味する。このようなエピトープは、例えば本発明の膜分子のアミノ酸配列と他のタンパク質のアミノ酸配列とを整列比較することによって、本質的に異なる配列部分(連続する少なくとも5アミノ酸、好ましくは少なくとも8アミノ酸、さらに好ましくは少なくとも15アミノ酸)を選択することによって決定できる。

[0077] TREMファミリーに属する膜分子は主に活性化に伴い発現が上昇し、前記記載のようにファミリーの性質から推測して成熟DC、活性化マクロファージ、活性化単球、活性化B細胞等にも本膜分子の発現が見られることが予想される。この知見を利用することにより活性化抗原提示細胞(APC)を特異的に認識する本膜分子に対する抗体を得ることができる。

[0078] 上記の特性を有するいずれの抗体も本発明に包含されるが、目的の抗体を得るための抗原エピトープは、本膜分子群のアミノ酸配列において抗原性の高い領域、表在性がある領域、二次構造をとらない可能性のある領域、他のタンパク質(特に各膜分子が属するファミリーの他のタンパク質)とホモロジーがないか又は低い領域から選択されうる。ここで抗原性の高い領域は、Parkerらの方法[Biochemistry、25巻、5425-5432頁(1986年)]によって推定可能である。表在性がある領域は、例えばハイドロパシーインデックスを計算しプロットすることによって推定可能である。二次構造をとらない可能性のある領域は、例えば、ChouとFasmanの方法[Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.、47巻 45-148頁(1978年)]によって推定可能である。さらに、特に各膜分子が属する他のタンパク質とホモロジーがないか又は低い領域は、各膜分子のアミノ酸配列と他のタンパク質のアミノ酸配列との相同性比較によって推定可能である。

[0079] 上記の手法で推定された本膜分子の部分アミノ酸配列を基に、ペプチド合成法を

利用することによって該アミノ酸配列からなるペプチドを合成することができる。目的のペプチドは、例えば、R.B. Merrifield[Science、232巻、341-347頁(1986年)]によって開発された固相ペプチド合成に基いた市販のペプチド合成機を使用して合成し、保護基を脱離後、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等を単独もしくは組合わせた方法により精製する。得られた精製ペプチドはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)やアルブミンなどのキャリアタンパク質と結合し免疫原として使用することができる。

[0080] さらに、遺伝子組換え本膜分子を免疫原として本膜分子に対するポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体を公知の手法により作製することもできる。この場合、本膜分子、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、または他のタンパク質に関して用いられる「組換え」という用語は、これらのタンパク質が宿主細胞内で組換えDNAによって生産されたものであることを意味する。宿主細胞としては、原核生物(例えば大腸菌のような細菌)及び真核生物(例えば酵母、CHO細胞、昆虫細胞等)のいずれも使用され得る。

[0081] 本発明の「抗体」はペプチド抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体いずれでもよい。「抗体」は、マウスまたは他の適した宿主動物を免疫に用いられたタンパク質に特異的に結合するであろう抗体を産生するか、産生するであろうリンパ球を引き出すために、皮下、腹腔内、または筋肉内の経路によって、抗原あるいは抗原発現細胞により免疫化することによって得られる。さらに宿主動物としてはヒト抗体遺伝子のレパトリーを有するトランスジェニック動物に抗原または抗原発現細胞を投与し、所望のヒト抗体を取得してもよい[Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97巻、722-727頁(2000年)、国際公開WO96/33735、WO97/07671、WO97/13852、WO98/37757参照]。そのかわりに、リンパ球をin vitroで免疫化してもよい。宿主動物から得られた血清から、抗原に結合する画分を集め、精製することにより、ポリクローナル抗体を取得することができる。また、ハイブリドーマ細胞を形成するために、ポリエチレングリコールのような適当な融合試薬を用いて、リンパ球を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体を作製することができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principals and Practice、59-103頁、Academic press、1986年)。例えば本発明のモノクローナル

抗体は、ハイブリドーマ法[Nature、256巻、495頁(1975年)]を用いても、組換えDNA法(Cabillyら、米国特許第4816567号)を用いても作製することができる。

- [0082] 抗原タンパク質は本膜分子のタンパク質の全てまたは部分配列をコードするDNAを、大腸菌や酵母、昆虫細胞、動物細胞などで発現させることにより調製することができる。遺伝子組換え本膜分子は、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等を単独もしくは組合わせた方法により精製し、この精製標品を免疫原として用いる。
- [0083] また、本発明の抗体は、無傷の抗体であってもよいし、あるいは(Fab')₂やFabなどの抗体断片であってもよい。
- [0084] また、定常領域をヒトの定常領域に置き換えたキメラ抗体(例えばマウス-ヒトキメラ抗体;Cabillyら、米国特許4816567及びMorrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89巻、6851頁(1984年))、定常領域および超可変領域(または、Complementary-determining region;CDR)を除く全ての可変領域をヒトの配列に置き換えたヒト化抗体(Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89巻、4285頁、1992年及びCarterら、BioTechnology、10巻、163頁、1992年)も本発明の抗体に含まれる。
- [0085] また、このようにして得られた本発明の抗体に対する抗体、すなわち抗イディオタイプ抗体もまた本発明に含まれる。
- [0086] このようにして得られた本膜分子に対する各種抗体は、その特徴を生かすことができる様々な用途に使用可能である。本膜分子が成熟DCに特異的に発現が見られる分子であることを利用して、本抗体を蛍光性物質(ローダミン、フルオレサミンなど)で標識し、周知のFACSを用いて目的のDCを検出・分離したり、mo-DCのin vitroでの分化を確認することができる。さらに、本膜分子はDCの成熟化に伴って発現量が顕著に上昇するタンパク質であることから、本抗体を用いてFACSにより未成熟DCと成熟DCを分離することもできる。本膜分子の検出に関しては、FACSでの検出にとどまるものではない。例えばウェスタンブロッティングにおいて本抗体を1次抗体として作用させることにより検出可能であることが予想されるし、タンパク質レベルでの発現確認を行うことができる。また本抗体を固相(ポリスチレンビーズ、マイクロタイターウエル表面、ラテックスビーズなど)に結合して不均一系で、あるいは均一系で、免疫学的反

応を行って相同な膜分子を検出、定量(蛍光抗体法、ELISA、ラジオイムノアッセイなどの方法使用)することができる。この場合、免疫学的反応は競合反応であってもよいし非競合反応であってもよい。また2つ以上の抗体(モノクローンまたはポリクローン)を用いるサンドイッチ法による反応も使用できる。上記における検出、定量のためには、当業界で公知のいずれの免疫学的手法も用いることができる。

[0087] その他、本膜分子の機能を評価する用途にも使用可能である。成熟DCは強力なAPCであり、MHCクラスII分子を介したCD4陽性のT細胞を刺激活性化及びMHCクラスI分子を介したCD8陽性細胞障害性T細胞を刺激活性化することが知られている。これら機能を制御し得るか否かを確認するために、アロジェニックMLR(Mixed Lymphocyte Reaction)での機能を抑制しうるか否かの確認、抗原特異的にCTLを誘導した場合にその機能を抑制しうるか否かの確認、さらにDCの抗原提示に関わる分子か否かの確認等のin vitroでのアッセイにも使用可能である。

[0088] 本発明の抗体はさらに、in vivoで免疫応答を制御するために使用することもできる。本膜分子群は、前述したとおり、副刺激に関与する分子であると予想され、T細胞活性化に関わる膜分子であると予想される。このため、本発明の抗体が本膜分子群とT細胞上のリガンドとの結合を阻害する抗体であればT細胞活性化を抑制することが期待される。このように本膜分子群の機能制御可能な抗体を作用させることでDCの機能さらにはT細胞の機能を制御することによる免疫応答を制御し得ることが期待される。

[0089] さらに本膜分子および本膜分子のリガンドの可溶化型分子(すなわち、細胞外領域に相当する分子)およびこれら分子に対する抗体にも免疫応答を制御する活性が期待される。

[0090] 本発明の抗体類または本膜分子の可溶化型分子を用いて本膜分子のリガンドを取得することも可能である。可溶化型本膜分子リガンドは直接本膜分子に作用し、DC上の本膜分子を介したシグナルを制御し得る。また、本膜分子のリガンドと本膜分子の相互作用をモジュレートできる低分子物質や本膜分子のリガンド及び本膜分子に関わる細胞内シグナル経路をモジュレートする低分子物質もシグナルの制御に有用である。

[0091] 本発明の抗体類または本膜分子の可溶化型分子、本膜分子のリガンドの可溶化型分子、上記低分子を治療に用いる場合には、例えば癌、自己免疫疾患、臓器移植、感染症、アレルギーなどの疾患の治療に適用可能である。

[0092] 投与方法および投与剤型は特に制限されないが、静脈、動脈内投与、筋内投与、経口投与、座剤投与などであり、薬学的に許容可能な賦形剤や希釈剤と組合わせて経口用または非経口用に処方することができるが、好ましくは非経口投与である。投与は1日あたり1回かまたは数回に分けて行い、投与量は患者の重篤度、年齢、性別、体重などの条件に応じて決定され、副作用を併発しない範囲である。

以下に本発明の実施例を記載するが、本発明はこれらの実施例によって限定されないものとする。

実施例

[0093] 実施例1 DCの細胞膜の調製

細胞膜タンパク質の場合、元々発現量が低いこと、またハンドリングが難しいことが挙げられる。これを解決する手段の一つとして、より純度の高い細胞膜を取得する方法を確立することが必要である。細胞膜表面をコートし、これを均一に破碎することで、比重の重くなった細胞膜を密度勾配遠心により取得する方法で純度の高い細胞膜を調製した[J. Biol. Chem., 258巻、10062-10072頁(1983年)]。

[0094] ターゲットとしている膜分子の発現量の少なさとハンドリングの難しさから、大量のマウスDCを集めるために骨髓細胞をGM-CSF存在下培養することで骨髓細胞由来未成熟DCを大量調製した。LPS(リポポリサッカライド)刺激あり、なしを同数の細胞で実施し、同数(5×10^8 細胞)の未成熟DCと成熟DCを得た。

[0095] 実施例2 タンパク質の高感度検出とin gel digestion

Mannら[Anal. Chem., 68巻、850-858頁(1996年)]の手法に従って銀染色によりタンパク質を検出した。酵素消化法についてはトリプシンを用いたin gel digestion法[Anal. Chem., 224巻、451-455頁(1995年)]により行い、以下で使用する分析サンプルとした。

[0096] 実施例3 膜タンパク質の分画

実施例1で得られた細胞膜より界面活性剤を用いて細胞膜タンパク質を可溶化した

後、コンカナバリンAセファロースにアプライし、界面活性剤含有緩衝液にて洗浄した。これら素通り画分をConA FTと称した。吸着画分はメチル- α -D-グルコピラノシドと界面活性剤を含有した緩衝液で溶出した(ConA EL)。ConA FTは小麦胚アグルチニンセファロースに再度アプライし、界面活性剤含有緩衝液にて洗浄した。これら素通り画分をWGA FTと称した。吸着画分はN-アセチルグルコサミンと界面活性剤を含有した緩衝液で溶出した(WGA EL)。ConA EL、WGA EL、WGA FTを分子同定サンプルとした。これら画分をSDS-PAGEにて展開した後、実施例2の手法によりタンパク質を検出し、短冊状に切ったゲルをin gel digestionして分析サンプルとした。

[0097] 実施例4 LC/MSによる微量分析

LC/MS(Applied Biosystems社製QTRAP)を用いて、実施例3で得たサンプルを分析した。95%溶液A(0.1%ギ酸)および5%溶液B(0.08%ギ酸、80%アセトニトリル)で平衡化したPepMap逆相カラム(内径0.075mm×長さ150mm)(LCパッキングス社製)にかけ、180ナノリットル/分の流速で、5分洗浄後、67.5分かけて溶液Bの比率を50%まで直線的に上げることにより順次溶出しMSに導入した。MSに導入されたサンプルは次の繰り返しサイクルでデータ取得を行い、その配列情報を得ることとした。1. Full MS Scan: $m/z=0\sim 2000$ のレンジでの親イオンの分子量の観測。2. Zoom MS Scan:Full MS Scanで同定された親イオンの価数の観測。3. MS/MS Scan:Zoom MS Scanで測定された分子にHeガスをあてた場合に生じる娘イオンの観測。理論的なb,yシリーズとどれだけの本数がどれだけの強度でマッチングするかをスコア化してランクをつける同定法(SEQUESTアルゴリズム)により同定した[アメリカン・ソサイアティ・フォー・マス・スペクトロメトリー、5巻、976-989頁(1994年)]。

[0098] 実施例5 本膜分子の同定

実施例4の手法により同定された分子のうち、新規分子である本膜分子が同定された。同定対象となったフラグメントは $m/z=1470.67$ の2価イオンであり、そのMS/MSのパターンは本膜分子の部分アミノ酸配列(27残基)DTMSTSNQLPWPTVDGSTD MVSSDLQK(配列番号5)に非常に良く帰属された。これら部分配列のnon-redundant D NA databaseに対するホモロジーサーチの結果、これら部分配列を有する塩基配列は他に存在しないことが明らかとなった。

[0099] 実施例6 本膜分子の遺伝子クローニング

実施例5で同定された部分アミノ酸配列(配列番号5)をマウス遺伝子データベースに対してサーチを実施したところ、唯一NM#199221が完全に一致する部分配列を有する遺伝子であることが判明した。そこで、実施例5で明らかとなった部分アミノ酸配列に対応する遺伝子配列をもとにプライマーを合成し、マウス成熟DCのcDNAライブラリーを鋳型としてRT-PCRを実施した。プライマーはそれぞれ30merおよび40merで、センスプライマー5'- ATGAGTAAGACACTCAGAGGCAACCTGGAC -3' (配列番号6)とアンチセンスプライマー5'- CTAAGGAGAAATGTCTTTAGCTAGAAGTTCA GAGTCCAAA -3' (配列番号7)を用いた。この結果、約800bp弱の本膜分子の遺伝子断片を取得した。この遺伝子断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションにより本膜分子の遺伝子を含むクローンを選抜し、塩基配列を決定した。推定open reading frame構造を配列番号1に、推定されるアミノ酸配列を配列番号2に示す。得られた遺伝子配列は既知遺伝子として報告のあるNM#199221と同じであるものの、報告とは1塩基欠失していることから、読み枠がずれており、途中からアミノ酸配列が異なっていることが明らかとなった。またヒト単球由来樹状細胞のcDNAライブラリーを鋳型として同様の手法でヒトオルソログを取得した。プライマーはそれぞれ28merおよび30merで、センスプライマー5'- ATGTGCAGAAGGTGCAAGCCAGAGCTCA -3' (配列番号8)とアンチセンスプライマー5'- CTAAGTGGCCATGTCTTTAGTCAGAGG TTC -3' (配列番号9)を用いた。推定open reading frame構造を配列番号3に、推定されるアミノ酸配列を配列番号4に示す。得られた遺伝子はNM#174892に一致する。

[0100] 本膜分子の推定アミノ酸配列の一次構造についてKyteとDoolittleの方法(J. Exp. Med., 157巻、105-132頁、1982年)に従い、ハイドロパシープロット解析を行なった(図1)。その結果、本膜分子はN末端にシグナル配列を有するI型の細胞膜貫通タンパク質であることが明らかとなった。本膜分子(A)および(B)はそれぞれ(A) 209、(B) 201アミノ酸残基からなり、ハイドロパシープロット解析結果から17残基のシグナル配列、(A) 140残基、(B) 134残基の細胞外領域、21残基の膜貫通領域、(A) 31残基、(B) 29残基の細胞内領域を有していると予想される。さらにホモロジー検索並びにモチーフ検索の結果から細胞外領域は(A) 2ヶ所、(B) 0ヶ所のアスパラギン

結合型糖鎖付加部位、2ヶ所のイムノグロブリン(Ig)ドメイン形成に必要なシステイン残基を持つ1つのイムノグロブリン様の構造を有していた。また、この細胞外のIgドメインはV set構造であることが類推された。さらに、(A)、(B)ともに細胞内領域にシグナルを伝達し得るモチーフを有しないものの、(A)、(B)ともに膜貫通領域にリジン残基を有することから、アダプター分子と会合していることが予想され、この会合したアダプター分子を介してシグナルを伝達することが予想された。また、本膜分子は細胞外にIgV setをひとつ有すること、細胞膜貫通領域にポジティブチャージを有するリジン残基を有すること、などから構造的にTREM-1と相同あるいは類似のファミリーに属することが予想される。本マウス膜分子のマウスTREM-1に対するアミノ酸一致は26%、本ヒト膜分子のヒトTREM-1に対するアミノ酸一致は26%、であり、IgV setの形成に必要なシステイン残基は保存されている。

[0101] 実施例7 本膜分子の可溶化型組換え体の作製

ハイドロパシープロット解析(図2)の結果から、細胞外ドメインと考えられる領域とヒトIgG1のFc領域を結合させた組換え体を作製した。なおヒトIgG1のFc領域は各種細胞表面上に存在するFc gamma receptorへの結合を防ぐために3ヶ所のアミノ酸置換を行った。具体的には細胞外領域として(A)の配列番号1のアミノ酸157位までを選択した。この可溶化型組換え体のアミノ酸配列を配列番号10に示す。Fc領域でアミノ酸置換を行った部位は配列番号10に示す177位(Ala→Leu)、178位(Glu→Leu)、344位(Asp→Val)に相当する。この遺伝子をCMVプロモータ制御下293T細胞で一過性に発現させ、得られた培養上清からFc領域に結合性を有するプロテインAを結合させた樹脂を用いたアフィニティクロマトグラフィにより発現産物を精製した(図3)。

[0102] 実施例8 本膜分子に対する内因性リガンドの検索

実施例7に記載の組換え体を用いてマウス脾細胞上に本膜分子と結合する分子が存在するか否かをフローサイトメーターを用いて検索した。具体的にはフィコエリスリン標識F(ab')₂化抗ヒトIgG Fc領域抗体(ベックマンコールター社製)を二次抗体として該組換え体を認識させる。その結果、CD3陽性T細胞、CD19陽性B細胞、NK1.1陽性NK細胞、CD11c陽性樹状細胞など確認した全ての細胞において本膜分子が結合することが確認された。(図4)

産業上の利用可能性

- [0103] 本発明により、DCを他の血球系細胞から選択的に高い純度で分離することができるのみならず、成熟DCと未成熟DCとの分離も可能とすることから、DC療法への該細胞の供給を可能とする。分離されたDCは、抗原をパルスしたのち、再び患者に戻すことにより癌ワクチンとして利用するなどの用途が期待される。また、本膜分子に対する抗体、あるいは本膜分子の可溶化型分子を用いてDCとT細胞との相互作用を阻害することで免疫応答を制御し得ることも期待される。

図面の簡単な説明

- [0104] [図1]図1は、KyteとDoolittleの方法を用いた本膜分子のハイドロパシープロット解析の結果を示す。
- [図2]図2は、CLUSTAL Wによる本膜分子のマウスとヒトとの間でのアライメント解析結果を示す。
- [図3]図3は、組換え体の発現と精製を示す。Protein A Sepharoseを用いた精製：銀染色：5／20グラジエントゲル： 1：インプット 2：フロースルー 3：溶出液
- [図4]図4は、組換え体を用いた内因性リガンドの検索を示す。

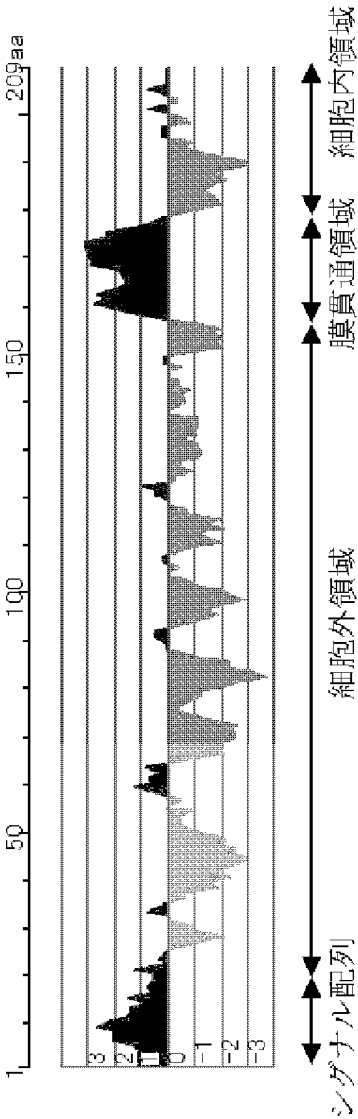
請求の範囲

- [1] 以下の何れかのアミノ酸配列からなる蛋白質。
 - (a) 配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列;
 - (b) 配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列において1個もしくは複数個のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入および/または付加を含み、かつ免疫応答を制御し得るアミノ酸配列;又は
 - (c) 配列番号2又は4に記載のアミノ酸配列と80%以上の相同性を有し、かつ免疫応答を制御し得るアミノ酸配列:
- [2] 請求項1に記載の蛋白質をコードするDNA。
- [3] 以下の何れかの塩基配列からなるDNA。
 - (a) 配列番号1又は3に記載の塩基配列;
 - (b) 配列番号1又は3に記載の塩基配列において1個もしくは複数個の塩基の欠失、置換、挿入および/または付加を含み、かつ免疫応答を制御し得るアミノ酸配列をコードする塩基配列;又は
 - (c) 配列番号1又は3に記載の塩基配列又はその相補配列とストリンジエンな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、かつ免疫応答を制御し得るアミノ酸配列をコードする塩基配列:
- [4] 請求項2又は3に記載のDNAを含む、組み換えベクター。
- [5] 請求項2又は3に記載のDNA又は請求項4に記載の組み換えベクターを有する、形質転換体。
- [6] 請求項1に記載の蛋白質又はその断片に特異的に免疫結合する抗体。
- [7] 免疫学的に樹状細胞を認識する、請求項6に記載の抗体。
- [8] 請求項1に記載の蛋白質の細胞外領域を認識する、請求項6に記載の抗体。
- [9] ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である、請求項6から8のいずれかに記載の抗体。
- [10] 請求項6から9の何れかに記載の抗体を用いてヒトまたは他の動物由来の免疫担当細胞を分離する方法。
- [11] 樹状細胞を分離する、請求項10に記載の方法。

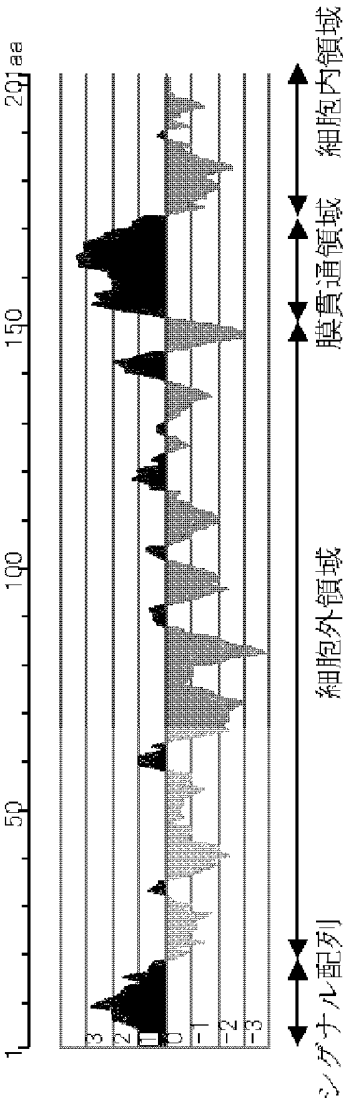
- [12] 請求項6から9の何れかに記載の抗体を用いて免疫担当細胞を検出する方法。
- [13] 樹状細胞を検出する、請求項12に記載の方法。

[図1]

膜分子(A)



膜分子(B)



[图2]

MMWLSPALLLSFPGCLSIQGPALVRGPEQGSVTVQCYSRWQTNNKWWCRGASWSTCRV
MMWLPPALLLSLSCFCSIQGPESVRAPEQGSLTVQCHYKQGWETYIKWWCRGVWDTCKI
*****::*****::*****::*****::*****::*****::*****::

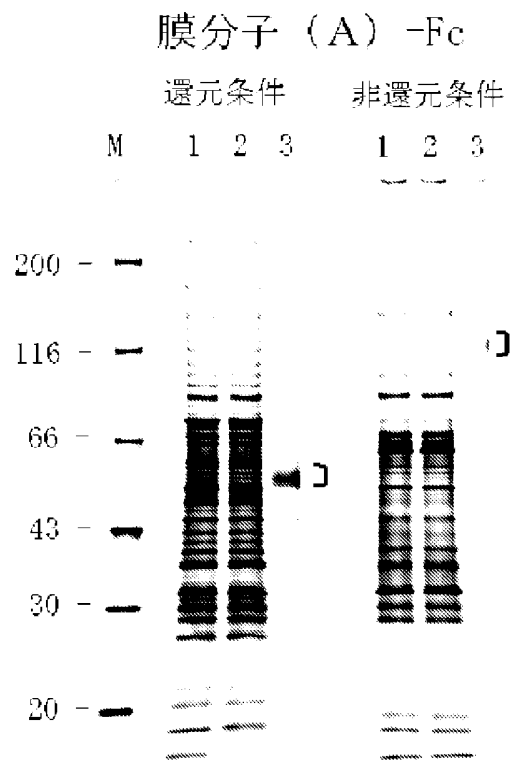
LIRSTGEKETSGRLSIRDNQKNHSFQVTMEMLRQNDDTYWCGIEKFGDTRGVKN
LIETRGEQGEKSDRVSIKDNQKDRTFTVMEGLRRDDADVWCGIERRGPDLTGTQVKVI

VYSGKDTMSTSNQLPWPTVDGSTDMVSSDLQKRITYMLLVFVKVPALLILVGAVLWLKR
VDPEGAASTASS----PTNSNMAVFIGS--HKRNHYMLLVFVKVPILLILVTAILWLKG

* * . : : *. ** . . : : . * .** . : : *.** . : : *.** . : : *

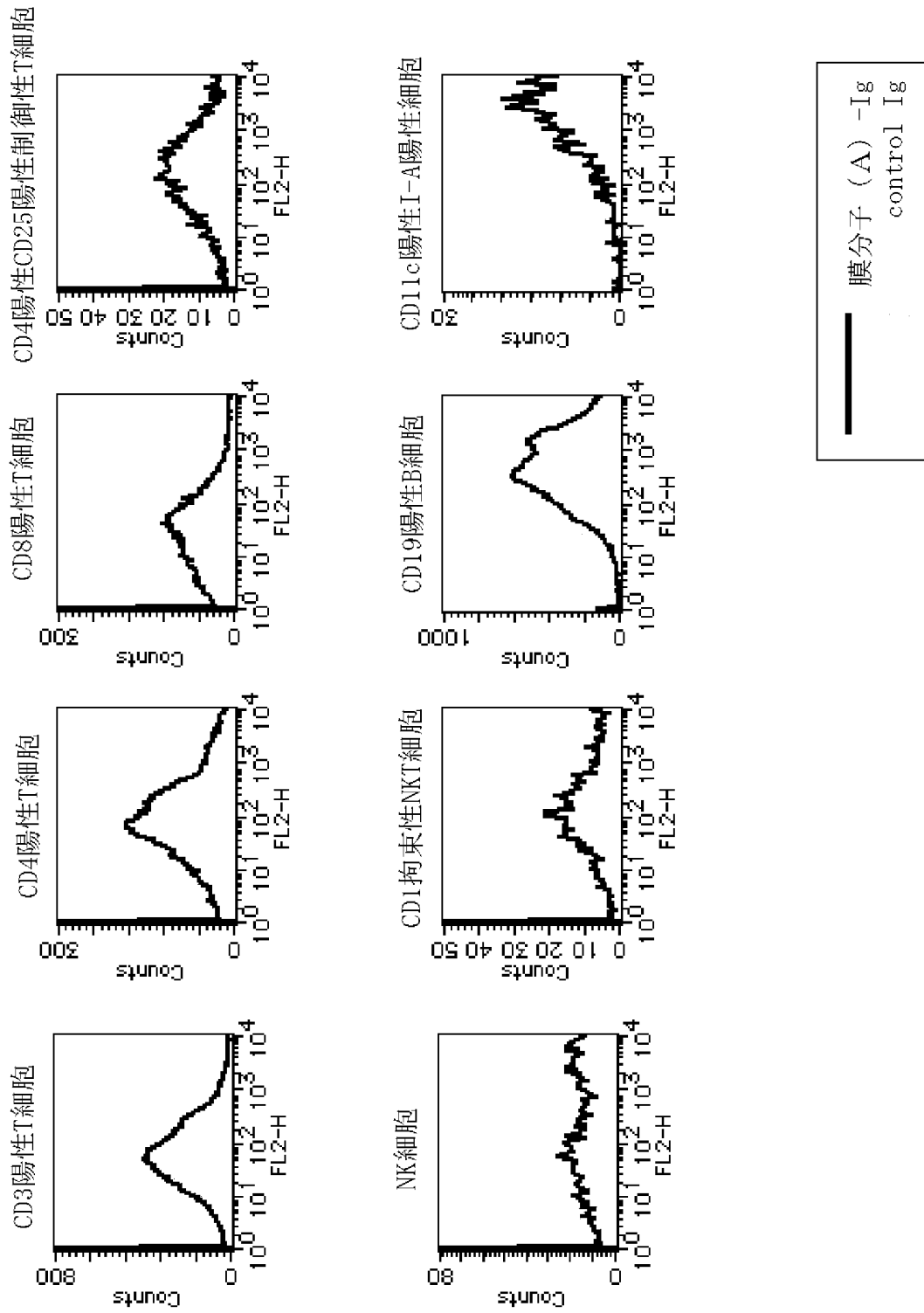
STQKVPEEQWRHTLCSDLSELLAKDISP
S-QRVPPEEGEQIYMNFS-EPLTKDMAT
***** : : : * : : : :
***** : : : * : : : :

[図3]



DTT+ (Monomer): 60 kDa
 DTT- (Dimer): 120 kDa

[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/301408

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09 (2006.01), C12N5/10 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61K45/00 (2006.01), A61P37/02 (2006.01), C07K14/47 (2006.01), C07K16/18 (2006.01), C12N1/15 (2006.01), C12N1/19 (2006.01), C12N1/21 (2006.01), According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09 (2006.01), C12N5/10 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61K45/00 (2006.01), A61P37/02 (2006.01), C07K14/47 (2006.01), C07K16/18 (2006.01), C12N1/15 (2006.01), C12N1/19 (2006.01), C12N1/21 (2006.01), Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PUBMED, MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), GeneBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2000/78962 A1 (BORGES, Luis, COSMAN, David), 14 April, 2000 (14.04.00), Full text & AU 2000/40821 A	1-13
X	CHUNG, D.H. et al., 'CMRF-35-like molecule-1, a novel mouse myeloid receptor, can inhibit osteoclast formation', The Journal of Immunology, 2003, Vol.171, pages 6451 to 6548. Full text	1-13
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 March, 2006 (01.03.06)		Date of mailing of the international search report 20 March, 2006 (20.03.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/301408

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

A61K38/00(2006.01), **C12Q1/04**(2006.01), **G01N33/53**(2006.01), **C12P21/08**
(2006.01)

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

A61K38/00(2006.01), **C12Q1/04**(2006.01), **G01N33/53**(2006.01), **C12P21/08**
(2006.01)

Minimum documentation searched (classification system followed by
classification symbols)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12N15/09 (2006.01), C12N5/10 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61K45/00 (2006.01), A61P37/02 (2006.01), C07K14/47 (2006.01), C07K16/18 (2006.01), C12N1/15 (2006.01), C12N1/19 (2006.01), C12N1/21 (2006.01), A61K38/00 (2006.01), C12Q1/04 (2006.01), G01N33/53 (2006.01), C12P21/08 (2006.01)			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12N15/09 (2006.01), C12N5/10 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61K45/00 (2006.01), A61P37/02 (2006.01), C07K14/47 (2006.01), C07K16/18 (2006.01), C12N1/15 (2006.01), C12N1/19 (2006.01), C12N1/21 (2006.01), A61K38/00 (2006.01), C12Q1/04 (2006.01), G01N33/53 (2006.01), C12P21/08 (2006.01)			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
PUBMED, MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), GeneBank/DBJ/EMBL/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	WO 2000/78962 A1 (BORGES, Luis, COS MAN, David) 2000.04.14 文献全体参照 & AU 2000/40821 A	1-13	
X	CHUNG, D.H. et al., 'CMRF-35-like molecule-1, a novel mouse myeloid receptor, can inhibit osteoclast formation', The Journal of Immunology, 2003, Vol.171, p.6451-6548. 文献全体参照	1-13	
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 01.03.2006		国際調査報告の発送日 20.03.2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 坂崎 恵美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 3644