

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3553936号
(P3553936)

(45) 発行日 平成16年8月11日(2004.8.11)

(24) 登録日 平成16年5月14日(2004.5.14)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09
C 0 7 K 14/475
C 1 2 N 5/10
C 1 2 P 21/02

C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 K 14/475
C 1 2 P 21/02 C
C 1 2 N 5/00 B

請求項の数 3 (全 20 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平6-508177 (86) (22) 出願日 平成5年9月15日(1993.9.15) (65) 公表番号 特表平8-504093 (43) 公表日 平成8年5月7日(1996.5.7) (86) 国際出願番号 PCT/US1993/008531 (87) 国際公開番号 W01994/006909 (87) 国際公開日 平成6年3月31日(1994.3.31) 審査請求日 平成12年3月30日(2000.3.30) (31) 優先権主張番号 07/946,061 (32) 優先日 平成4年9月18日(1992.9.18) (33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者 アメリカ合衆国 アメリカ合衆国メリーランド州20892 ー9902、ベセスダ、ボックス・オーテ ィーティー、オフィス・オブ・テクノロジ ー・トランスファー、ナショナル・インス ティテューツ・オブ・ヘルス(番地の表示 なし) (74) 代理人 弁理士 青山 稔 (74) 代理人 弁理士 田中 光雄</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HGF/SFの生産およびそれに有用な細胞系

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下のステップ：

- (a) NIH/3T3細胞を、HGF/SF^{h_u}およびMet^{h_u}をコードしているDNAでトランスフェクションし；
- (b) ステップ(a)によりトランスフェクションされた細胞を非ヒト哺乳動物内に導入し、それにより、1次腫瘍を生じさせ；
- (c) 該1次腫瘍細胞を外移植し、インビトロで増殖させ；
- (d) ステップ(c)により増殖した高レベルのHGF/SF^{h_u}および高レベルのMet^{h_u}を発現する細胞を選択し；
- (e) ステップ(d)により選択した細胞を非ヒト哺乳動物内に導入し、それにより、2次腫瘍を生じさせ；
- (f) 該2次腫瘍細胞を外移植し、インビトロで増殖させ；ついで
- (g) ステップ(f)の該細胞により産生されたHGF/SF^{h_u}を得るからなるHGF/SFの製造法。

【請求項2】

作動可能に連結されたレトロウイルスの末端反復配列由来のプロモーター、ヒト・Metの全コーディングドメインをコードしているDNAおよびポリアデニレーションシグナルからなる第1のDNAベクター、および作動可能に連結されたレトロウイルスの末端反復配列由来のプロモーター、ヒト・HGF/SFをコードしているDNAおよびポリアデニレーションシグ

ナルからなる第2のDNAベクターで同時トランスフェクションされた細胞系。

【請求項3】

NIH/3T3細胞細胞系である請求項2記載の細胞系。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

肝細胞増殖因子(HGF)は、ラット・肝細胞の有糸分裂生起を刺激する能力に基づいて、ヒトおよびウサギの血漿ならびにラットの血小板から最初に精製された(イー・ゴダ(E. Gohda)ら, ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.)第81巻:414頁(1988年); アール・ザーネガー(R. Zarnegar)およびジー・ミカロプーロス(G. Michalopoulos), キャンサー・リサーチ(Cancer Res.)第19巻:3314頁(1989年); ティー・ナカムラ(T. Nakamura)ら, FEBS・レターズ(FEBS Lett.)第224巻:311頁(1987年))。よって、HGFは、部分的肝切除または肝傷害後の肝臓の再生を促進する液体性因子として作用しうる(イー・エイチ・ゴダ(E. H. Gohda)ら, ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション第81巻:414頁(1988年); ジー・ケイ・ミカロプーロス(G. K. Michalopoulos), FASEB・ジャーナル(FASEB J.)第4巻:176頁(1990年))。同じ因子が、ヒト・繊維芽細胞培養液から精製され、メラノサイトならびに種々の上皮および皮内細胞に作用することが示された(ティー・イガワ(T. Igawa)ら, BBRC第174巻:831~838(1991年); エム・カン(M. Kan)ら, BBRC第174巻:331~337頁(1991年)およびジェイ・エス・ルビン(J. S. Lubin)ら, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユーエスエイ(Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.)第88巻:415頁(1990年))。いくつかの器官におけるHGF発現に関する証拠(ジェイ・エス・ルビン, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユーエスエイ第88巻:415頁(1990年); ケイ・タシロ(K. Tashiro)ら, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユーエスエイ第87巻:3200頁(1990年); アール・ザーネガーら, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユーエスエイ第87巻:1252頁(1990年); ティー・キノシタ(T. Kinoshita)ら, バイオケミ・バイオフィジ・リサーチ・コミュニ(Biochem. Biophys. Res. Comm.)第165巻:1229頁(1989年))とともに、HGFが、細胞形態に対する広いスペクトルを有する増殖についてのパラクリン伝達体として作用しうるということを示している。HGFの分子クローニングにより、プラスミノーゲンおよび関連セリンプロテアーゼに対する著しい構造上の相同性が明らかとなった(ジェイ・エス・ルビンら, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユーエスエイ第88巻:415頁(1990年); ティー・ナカムラ(T. Nakamura)ら, ネイチャー(Nature)第342巻:440頁(1989年); ケイ・ミヤザワ(K. Miyazawa)ら, バイオフィジ・リサーチ・コミュニ(Biophys. Res. Comm.)第163巻:967頁(1989年))。HGFが、無処理の標的細胞において蛋白のチロシンのすみやかなリン酸化を誘導するという最近の証拠は、チロシンキナーゼ受容体とその分裂シグナルを伝達するということを示唆するものである(ジェイ・エス・ルビンら, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユーエスエイ第88巻:415頁(1990年))。

HGFは、プラスミノーゲン、プロトロンピン、ウロキナーゼ、および組織プラスミノゲンアクチベータを包含するセリンプロテアーゼの族と構造的に関連している(ジェイ・エス・ルビンら, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユーエスエイ第88巻:415頁(1990年); ティー・ナカムラら, ネイチャー第342巻:440頁(1989年))。例えば、HGFは、特徴的なクリングルドメイン(kringle domain)(パシー(Patthy)ら, FEBS・レターズ第171巻:131~136頁(1984年))およびセリンプロテアーゼドメイン(ミヤザワら, バイオケミ・バイオフィジ・リサーチ・コミュニ(第163巻:697~973頁(1989年); ナカムラら, ネイチャー第342巻:440~443頁(1989年))を有するという点において構造的にプラスミノーゲンに類似している。本発明において定義するように、HGFは、プラスミノーゲン様増殖因子(PLGF)と呼ばれる広スペクトルのマイトジェン(米国特許出願第07/582,063号の主題物質である)として以前特徴付けられ

10

20

30

40

50

た増殖因子を包含する。セリンプロテアーゼ族をはじめとするいくつかのプロテアーゼは、おそらく、インスリン受容体のトリプシン活性化と同様の蛋白分解機構により、DNA合成を刺激するであろう(エス・イー・シェールソン(S.E.Shoelson)ら, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)第263巻:4852(1988年))。ウロキナーゼのみが、それ自体いかなる既知チロシンキナーゼ受容体とも相同性を有しない特異的な細胞表面受容体と関連があることが見いだされている(エイ・エル・ロルドン(A.L.Roldan)ら, ジ・EMBO・ジャーナル第9巻:467頁(1990年))。

散在因子(scatter factor)(SF)は、もともと、HGFと関連があるが、異なるものであると考えられていた。SFは、運動原性(運動性)と関連しており、さらにHGFは、細胞有糸分裂生起(増殖)に関連していると考えられていた。しかしながら、最近の研究により、実際には、SFおよびHGFは、同じアミノ酸配列、c-met腫瘍原遺伝子によりコードされる蛋白である同じ受容体、および同じ生物学的作用を有する同一蛋白であることが示された(イー・ジェラルディー(E.Gherardi)およびエム・ストーカー(M.Stoker), ネイチャー第346巻:228頁(1990年); ケイ・エム・ワイドナー(K.M.Weidner)ら, PNAS第88巻:7001~7005頁(1991年); エム・バルガヴァ(M.Bhargava)ら, セル・グロウス・アンド・ディファレンシエーション(Cell Growth & Diff.)第3巻(1):11~20頁(1992年); ナルディーニ(Naldini)ら, EMBO・ジャーナル第10巻(10):2867~2878頁(1991年); イー・ジェラルディーおよびエム・ストーク(M.Stoke), キャンサー・セルズ(Cancer Cells)第3巻(6):227~232頁(1991年)およびグラジアーニ(Graziani)ら, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(USA)第26巻)。

上記文献により取り込まれた米国特許出願第07/642,971号の主題物質は、HGF/SFおよびmet腫瘍原遺伝子蛋白(「Met」)よりなる複合体であることが記載されており、HGF/SFの受容体としてMetが同定されている。met腫瘍原遺伝子蛋白はチロシンキナーゼ増殖因子受容体族の1つである。この受容体/リガンドの関係に関する知識により、これらの分子の発現が重要な役割を果たしている可能性のある増殖性疾患および腫瘍原性についての研究が容易になる。さらに、met腫瘍原遺伝子受容体HGF/SF複合体の同定により、因子の結合により影響を受ける肝臓組織以外の組織を同定するための手段が提供される。

細胞増殖に対する正の影響は、細胞内(モーゼス(Moses)ら, セル(Cell)第63巻:245~247頁(1990年))および細胞表面(ハナム(Hannum)ら, ネイチャー第343巻:336~340頁(1990年); アイゼンベルク(Eisenberg)ら, ネイチャー第343巻:341~346頁(1990年); カーター(Carter)ら, ネイチャー第344巻:633~637頁(1990年))の両方で、種々の濃度において妨げられることが、証拠によって示唆されている。

ヒト・HGFの種々の源が同定されており(ナカムラ, ティー, プログレス・イン・グロウス・ファクター・リサーチ(Progress in Growth Factor Research)第3巻:67~86頁(1992年))、Cos細胞中またはパキユロウイルス宿主系中にトランスフェクションされた場合、遺伝子産物が過剰産生されることが示されている(ナカムラら, ネイチャー第342巻:440~443頁(1989年); クーパー(Cooper)ら, ジ・EMBO・ジャーナル(The EMBO J.)第5巻(10):2623~2628頁(1986年))。大量のヒト・HGF/SFを連続的に産生する哺乳動物細胞系は、まだ同定されていない。

発明の概要

したがって、本発明は、HGFおよびSFが同じ蛋白であって、その受容体へのHGF/SFの結合を阻害することにより腫瘍細胞転移を防止することができるという認識を基礎とした転移を阻害する方法を包含する。

より詳細には、HGF/SFがMetと結合するのを妨げるHGF/SF変種、HGF/SF模擬体、またはHGF/SFに対する抗体または抗体フラグメントである物質により、結合が阻害される。同様にHGF/SF-Met結合を妨げるMet変種、Met模擬体およびMetに対する抗体または抗体フラグメントによっても結合が阻害されうる。

そのうえ、大量のHGF/SF源を連続的に産生する必要性の観点において、出願人らは、意外にも、組み換え法により、高レベルのHGF/SFを発現しうるマウス・NIH/3T3細胞系を見いだし、本明細書に記載した。よって、本発明の1の具体例は、以下のステップ:

10

20

30

40

50

- (a) NIH/3T3細胞を、HGF/SF^{h_u} (^{h_u}はヒト由来) およびMet^{h_u}をコードしているDNAでトランスフェクションし ;
- (b) ステップ (a) によりトランスフェクションされた細胞を哺乳動物内に導入し、それにより、1次腫瘍を生じさせ ;
- (c) 1次腫瘍細胞を外移植し、インビトロで増殖させ ;
- (d) ステップ (c) により増殖した高レベルのHGF/SF^{h_u}および高レベルのMet^{h_u}を発現する細胞を選択し ;
- (e) ステップ (d) により選択した細胞を哺乳動物内に導入し、それにより、2次腫瘍を生じさせ ;
- (f) 2次腫瘍細胞を外移植し、インビトロで増殖させ ; ついで
- (g) ステップ (f) の細胞により産生されたHGF/SF^{h_u}を得る

10

からなるHGF/SFの製造法を提供する :

さらにもう1つの本発明の具体例は、作動可能に連結されたレトロウイルスの末端反復配列由来のプロモーター、ヒト・Metの全コーディングドメインをコードしているDNAおよびポリアデニレーションシグナルからなる第1のDNAベクター、および作動可能に連結されたレトロウイルスの末端反復配列由来のプロモーター、ヒト・HGF/SFをコードしているDNAおよびポリアデニレーションシグナルからなる第2のDNAベクターで同時トランスフェクションされた細胞系に関する。

【図面の簡単な説明】

図1は、トランスフェクションされたNIH/3T3細胞におけるmet産物を示す。(A) 免疫沈降分析 細胞を[³⁵S]メチオニンおよび[³⁵S]システイン(ICN社製、トランスラベル(Translabel))で、5分間、メチオニンおよびシステインを欠くDMEM(ギブコ(Gibco) 社製)中で代謝的にラベルし、細胞溶解物をMet^{h_u}-特異的モノクローナル抗体19S(ファレット, ディー・エル(Faletto, D.L.) ら, オンコジーン(Oncogene) 第7巻:149~1157頁(1991年)) (レーン1および2)、またはMet^{m_u} (^{m_u}はネズミ由来) - 特異的ペプチド抗体SP260(アイヤー, エイ(Iyer, A.) ら, セル・グロウス・アンド・ディファレンシエーション第1巻:87~95頁(1990年)) (レーン3) のいずれかと免疫沈降させた。プロテインG-セファロース(ギブコ社製)で免疫沈降を完了させ、複合体を、5% -メルカプトエタノールを含有するSDS試料用緩衝液に可溶化し、7.5%アクリルアミドゲル上で分離した。レーン1は、細胞をpSV2neoのみでトランスフェクションした場合; レーン2は、細胞をmet^{h_u}でトランスフェクションした場合; レーン3は、細胞をmet^{m_u}でトランスフェクションした場合である。(B) パルス・チェイス分析 細胞を[³⁵S]メチオニンおよび[³⁵S]システインで45分間代謝的にラベルし(レーン1および3)、ついで、チェイス時間を3時間間とした(レーン2および4)。Metを、Met^{h_u}に対する19Sモノクローナル抗体(レーン1および3)またはMet^{m_u}に対するモノクローナル抗体(レーン2および4)と免疫沈降させ、パネルAに示す電気泳動を行った。レーン1および2は、細胞をMet^{h_u}でトランスフェクションした場合; レーン3および4は、細胞をMet^{m_u}でトランスフェクションした場合である。(C) 細胞表面におけるmetのヨウ素化 集密的に近い細胞をペレット化し、ヨードゲン(Iodo - Gen (ピアス(Pierce) 社製) の存在下においてNa¹²⁵Iでラベルした。ラベルされた細胞をPBSで3回洗浄し、RIPA緩衝液で溶解し、19Sモノクローナル抗体(レーン1および2)またはSP260ペプチド抗体(レーン3および4) のいずれかと免疫沈降させた。Met^{h_u}を発現するNIH/3T3細胞はレーン1および3である。Met^{m_u}を発現するNIH/3T3細胞はレーン2および4である。矢印は、p170^{met}およびp140^{met}の位置を示す。

20

30

40

図2は、抗 - P - Tyr抗体との精製物の反応性を示す。100mmディッシュ上の集密的に近い細胞を冷TBSで2回洗浄し、溶解用緩衝液(25mM Tris - HCl, pH8.0、100mM NaCl、50mM NaF、1%トリトンX - 100、10μg/mlアプロチニン、10μg/mlロイペプチン、1.25mM PMSF、1mMオルトバナジウムナトリウム) 1ml中で溶解した。Met^{h_u}に対する抗 - C28ペプチド抗体(ゴンザッティ - ハセス, エム(Gonzatti - Haces, M.) ら、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエイ第85巻:21~25頁(1

50

988年) (パネルAおよびC) またはMet^mに対するペプチド抗体SP260 (アイヤーエーら, セル・グロウス・アンド・ディファレンシエーション第1巻:87~95頁(1990年)) (パネルBおよびD) でもって蛋白1ミリグラムが免疫沈降した。SDS緩衝液に溶解した後、試料を7.5%ゲル上のSDS-PAGEにより分離し、インモビロン-P (Immobilon-P) (ミリポア (Millipore) 社製) に移し、ついで、抗-P-Tyr抗体、4G10 (モリソン・ディー・ケイ (Morrison, D.K.) ら, セル第58巻:649~657頁(1989年)) (パネルAおよびB)、19Sモノクローナル抗体 (パネルC)、またはマウス・metペプチド抗体 (パネルD) をプローブとして反応させた。ついで、インモビロンフィルターを¹²⁵I-プロテインA (ICN社製) とインキュベーションし、オートラジオグラフィを行った。パネルAおよびCのレーン1~3には、met^hでトランスフェクションした細胞の3本の異なる線があり; レーン4は対照細胞である。パネルBおよびDのレーン1は、met^mでトランスフェクションした細胞である。レーン2はNIH/3T3対照細胞である。

10

図3は、NIH/3T3細胞におけるMet^hおよびHGF/SF^hの性質を示す。腫瘍細胞を外移植し、[³⁵S]メチオニンおよび[³⁵S]システインで6時間代謝的にラベルした。細胞溶解物を、19Sモノクローナル抗体 (パネルA)、またはペプチド抗体SP260 (パネルB) のいずれかと免疫沈降させた。ついで、「6時間」上清0.25mlを、セントリコン (Centricon) (アミコン (Amicon) 社製 10Kカットオフ) で3倍に濃縮し、RIPA緩衝液で体積を0.3mlに調節し、試料を、抗-HGFモノクローナル抗体A3.1.2 (パネルC) と免疫沈降させた。レーン1および3は、注入前に同時トランスフェクションされた2種の異なる細胞系からの試料である。レーン2は、レーン1で分析される細胞由来の腫瘍外移植体である。レーン4および5は、レーン3で分析される細胞由来の腫瘍外移植体である。レーン6は、対照NIH/3T3細胞から調製した試料である。矢印は、p170^{met}およびp140^{met}の位置 (パネルAおよびB) ならびに87kDa (前駆体)、69kDa、および34kDaのHGFポリペプチドの位置 (パネルC) を示す。

20

図4は、NIH/3T3細胞腫瘍中のMetキメラ蛋白の性質を示す。細胞を、[³⁵S]メチオニンおよび[³⁵S]システインで6時間代謝的にラベルし、細胞溶解物を、19Sモノクローナル抗体で免疫沈降させた (レーン1~4)。レーン1は、マウス・N-末端/ヒト・C-末端キメラmetでトランスフェクションした注射していないG418 (ギブコ社製) - 耐性細胞であり、レーン2および3は、レーン1で分析される細胞由来の腫瘍であり、レーン4は、NIH/3T3対照細胞であり、レーン5は、抗-P-Tyr抗体 (4G10) で分析し、ついで、ヒト・抗-C28ペプチド抗体とともに免疫沈降したレーン1~4と同じ細胞のウェスタンブロットである。

30

図5は、Met^mの細胞外ドメインがMet^hに形質転換能を付与すること (第2行と第3行を比較)、およびHGF^hとともに同時トランスフェクションした場合にMet^h細胞外ドメインのみが形質転換能があること (第4行と第5行を比較) を示す。さらに、最後の2行は、Met^hに形質転換能を付与する領域としてのNde I - Pbu II部位間のmet^m領域を示す (第6行と第4行を比較)。

図6は、ヒト・Metの保存されたNde I - Pbu II部位 (上側) とマウス・Met配列 (下側) とのコンピューターによる予測構造での比較を示す。ヒトおよびマウスのMet (Nde I - Pbu II部位の間) のアミノ酸配列をボックス内に示す。アミノ酸配列がより保存的でない領域が強調されている (保存性を、ヒトとマウスの配列の間の線で示す)。Metに形質転換能を付与するcDNAのNde I - Pbu IIセグメント内のより保存性の少ないドメインは、リガンド結合に直接用いられるドメインを反映しているか、あるいは構造的な特性によってリガンド結合またはリガンド結合後の受容体の活性化のいずれかを調節しているかである。それゆえ、出願人は、これらの配列に対応する合成ペプチドに対するポリクローナル抗体を作った。第1のドメインに対する抗体は、ヒト・配列 (1240) およびマウス・配列 (1241) に対してウサギ中で産生された。第2のドメインに対する抗体は、ヒト・配列 (1242) およびマウス・配列 (1243) に対して産生された。1242および1243のみが、ヒトおよびネズミのc-met蛋白それぞれに対して沈降を生じた。

40

図7は、ヒト (C28、19S、1242) およびマウス (260、1243) の特異的抗体に対するヒト

50

およびマウスのMetの反応性の対比を示す(パートA)。パートBは、マウス・met cDNAをNIH/3T3細胞中にトランスフェクションした場合(該細胞はHGF/SF^{h_u}を発現する)、該細胞は、ボイデン・チェンバー・アッセイ(Boyden chamber assay)において侵略的であることを示す(アルビーニ(Albini)ら、*キャンサー・リサーチ(Cancer Res.)*第47巻:3239~3245頁(1987年))。すなわち、細胞は、マトリゲル(matrigel)でコーティングしたフィルターを越えて移動するのである。metの腫瘍形態(tpr-met)でトランスフェクションした細胞もまた、このアッセイにおいて非常に侵略的である。フィルターを越えて移動する細胞に関しては、それらは、単に運動性があるだけでなく、基礎となる膜成分を分解しうるにちがいない(よって、コラゲナーゼまたはプラスミノゲナーゼのごとき酵素を分泌する)。Met^{h_u}トランスフェクション体(第2行)は、ヒト・リガンドであるHGF/SF^{h_u}の不存在下では侵略的ではないが、HGF産生細胞を培養したならし培地を添加した場合は侵略的である。一方、met^{h_u}およびHGF/SF^{h_u}の同時トランスフェクション体(第5行)は、このアッセイにおいて侵略的である。この図の第2欄は、上記ドメイン中のヒト・Metに対する1242抗体が、HGF/SF^{h_u}を含有するならし培地で同時培養されたmet^{h_u}トランスフェクション体のフィルター侵入を阻害することを示す。最終欄は、この阻害が、競争的なペプチドの存在下でブロックされることを示す。一方、Met^{h_u}およびHGF^{h_u}を産生する同時トランスフェクション体の侵略能(第4行)は、1242抗体によってはブロックされず、このことは、内部の、同時に産生されたHGF/SFリガンドによる受容体の細胞内オートクリン活性化を示唆するものである。結局、この図は、1243抗体は、met^{h_u}トランスフェクション体によるフィルターの侵略をブロックしなかったことを示す(第3行、第3欄)。

図8は、met^{h_u}およびtpr-metトランスフェクション体が、インビボにおいて腫瘍原性であり(図5)、これらの細胞もまた、いくつかの形式のアッセイにおいては転移的であること(パネルAおよびB)を示すインビボでの転移データを示す。さらに、Met^{h_u}(パネルA)は、HGF^{h_u} cDNAで同時トランスフェクションされないかぎり、インビボにおいて転移的でない。

10

20

図9は、実施例2において記載するように、HGF/SFの生産において、NIH/3T3細胞中に同時トランスフェクションされるプラスミドpRS2およびpRS24の構築を示すダイアグラムである。

好ましい具体例の詳細な説明

1の具体例において、本発明は、HGF/SFのMetとの結合を阻害することがらなる腫瘍細胞の転移を防止する方法を包含する。「防止」なる語は、腫瘍の転移を減少または阻止することを意味する。

30

「転移性」となる腫瘍細胞に関しては、多くの相関のある事柄が起こらなくてはならない。例えば、転移は、癌細胞が血管およびリンパ循環系の壁を透過し、循環系に侵入し、下流毛細血管床またはリンパ節に定着(「付着」)し、循環系を去り(「移動/運動性」)正常な支質組織中に透過していくプロセスを包含する。起こるべきこれらのプロセスのためには、腫瘍細胞が侵略的特性を獲得しなければならない。侵略的特性としては、(1)外部マトリックスに付着する細胞の能力(インテグリンのごとき細胞表面上の受容体による);(2)コラゲナーゼ類およびプラスミノゲナーゼ類のごとき外部マトリックスを突き破る破壊酵素(「メタロプロテアーゼ類」)の誘導;および(3)酵素による破壊によってできた「穴」を通る細胞の移動が挙げられる。細胞により分泌されるメタロプロテアーゼ類のレベルの上昇、細胞の運動原性の増加、および受容体(付着体(インテグリン)に包含される)発現のパターンの変化は、すべて記載されており、いくつかの場合、ヒト・癌腫細胞の転移能と関連がある(エル・エイ・リオッタ(L.A.Liotta),サイエンティフィック・アメリカン(Scientific American)54~63頁(1992年2月))。

40

HGF/SFが、これらの事柄のうちの最後の2つ(すなわち、コラゲナーゼ類およびプラスミノゲナーゼ類の分泌ならびに運動原性)における活性レベルを増加させることが知られている。さらに、HGF/SFは、脈管形成性であることが知られており、血管形成は腫瘍細胞の生存にとり重要である(ジェイ・ベーレンス(J.Behrens)ら、*ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー(J.Cell Biol.)*第108巻:2435~2447頁(1989年));ケイ・エム・ウェイ

50

ドナー (K.M.Weidner) ら, ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー第111巻:2097~2108頁(1990年)。「運動原性」なる語は、連続した細胞のシートが凝集せず、形態を変化させ、運動性となるプロセスをいう(イー・ジェラルディおよびエム・ストーカー、キャンサー・セルズ第3巻:227~232頁(1991年))。この現象は「散在化」とも呼ばれる。出願人は、HGF/SFが運動原性を2通りの様式で誘導することを示した。下記実施例1参照。まず、表1に示すように、HGF/SFに対して古典的な散在化応答を示す細胞は、内在性met受容体のチロシンのすみやかなリン酸化を示し、このことは、met受容体を通して散在化が活性化されることを示唆する。

表1

細胞系	分裂インデックス	散在化 (W/HGF)
Bix2NMA	1	+++
Calu-1	1	±
SW620	1.7	++
HT29	1	+
HCT116	1.5	+

10

20

¹運動原性インデックス = HGF存在下における³H-チミジン取り込み / HGF

不存在下における³H-チミジン取り込み

次に、マウスおよびヒトのmet cDNAがコードしているmet腫瘍原遺伝子産物でトランスフェクションしたマウス・乳癌「上皮」細胞系(C127細胞)について活発性の試験が行われ、外部から導入されたmet cDNA由来のmet産物を発現する細胞においてのみ(トランスフェクションしていない細胞においてではない)、HGF/SFに応答した散在化を示した。これらの結果を表2に示す。

表2

細胞系	分裂インデックス	散在化 (W/HGF)
C127	3 ^a	--
C127-met ^{hu}	3	++
C127-met ^{mu}	3	+

30

40

^a ³H-チミジン取り込みに対する刺激は、C127細胞における外来性c-met産物のレベルの低さによるものと推測される。

HGF/SF-Met経路の不活性化により、本発明の治療的方法論に関する基礎が提供される。これらの方法論は、HGF/SFとMetとの結合を妨げる物質の製造を包含する。かかる物質としては、HGF/SFまたはMetの変種、HGF/SFまたはMetの模擬体、およびHGF/SFとMetとの結合を妨げるHGF/SFまたはMetに対する抗体または抗体フラグメントが挙げられるが、これ

50

らに限定されない。

「変種」としては、例えば、met結合ドメインを欠いているかまたは損傷を受けたmet結合ドメインを有するか、もしくは活性化ドメインを欠いているかまたは損傷を受けた活性化ドメインを有するHGF/SF種（しかしHGF/SFの構造的および生物学的特徴を保持している）が挙げられる（ロッカー（Lokker）ら、ジ・EMBO・ジャーナル第11巻（7）：2503～2510頁（1992年））。

本発明の変種とされるHGF/SF種を、慣用的な遺伝子工学的方法により、本発明にしたがって製造することができる。例えば、部位特異的変異を含む方法により、変種を製造することができる。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（Current Protocols in Molecular Biology）,8.0.3中「ミュータジェネシス・オブ・クローンDNA（Mutagenesis of Cloned DNA）」およびその続きの部分；上記ロッカーらの文献参照。

本発明の変種としては、例えば、HGF/SFと結合する正常なMetに対するアンタゴニストとして作用する細胞外HGF/SF結合ドメインからなる可溶性系形態のMetも挙げられる。かかる変種を、本発明の分野においてよく知られた分子設計法により製造することができる。例えば、フー（Fuh）ら、サイエンス（Science）第256巻：1677～1680頁（1982年）参照。本発明の転移阻害性変種は、米国同時係属出願第07/655,502号に開示されたHGF/NK2またはHGF/NK1のごとき天然の変種であってもよい。該出願は文献により取り込まれる。HG/NK2は、N-末端および最初の2個のクリングルドメイン（kringle domain）を含む配列により特徴づけられる別のHGF転写物によりコードされるHGF/SFの切形形態である。HGF/NK1は、N-末端および最初の2個のクリングルドメイン（kringle domain）を含む配列により特徴づけられるHGF/SF転写物によりコードされるHGF/SFのもう1つの切形形態である。本発明の転移阻害性物質は、HGF/SFまたはMetのためには模擬体であってもよい。模擬体の一例は、抗-イディオタイプ抗体、すなわち、抗原上のエピトープに特異的に結合する抗体で動物を免疫することにより産生される抗体である。抗-イディオタイプ抗体は、第1の抗体の結合部位を認識し、確認する。それゆえ、その結合部位の形態は、第1の抗体の結合部位中に適合するエピトープに非常によく似ている。抗-イディオタイプ抗体が、もとの抗原に似た結合部位を有しているため、それを、もとの抗原に対する受容体との結合のためのリガンドとして用いることができる。ファインバーグ（Fineberg）およびアートル（Ertl）、CRC・クリティカル・レビューズ・イン・イミュノロジー（CRC Critical Reviews in Immunology）第7巻：269～284頁参照。HGF/SFの適当な模擬体を、HGF/SF抗体でスクリーニングしていずれの化合物がそれに結合するのか、あるいはいずれの化合物が分子設計により製造できるのかを調べることができる。モーガン（Morgan）ら、アニュアル・リポート・イン・メディシナル・ケミストリー（Annual Reports in Medicinal Chemistry）（アカデミック・プレス（Academic Press）,1989年）中「アプローチズ・トゥ・ザ・ディスカバリー・オブ・ザ・ノン・ペプチド・リガンド・フォー・ペプチド・リセプターズ・アンド・ペプチダーゼス（Approaches to the Discovery of the Non-Peptide Ligands for Peptide Receptors and Peptidases）」参照。

本発明の転移阻害性物質は、HGF/SFのMetとの結合を阻害するHGF/SFまたはMetに対する抗体または抗体フラグメントであってもよい。本発明にいう「抗体」は、抗体全体およびその一部、あるいはそれのみまたは他の部分を伴うものを包含する。抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、および単鎖抗体が挙げられる。抗体フラグメントは、HGF/SFまたはMetと結合するもの、とりわけ、FabおよびF(ab)₂フラグメントが挙げられる。本発明の抗体を、動物中で生産することができ、また、当業者によく知られた組換えDNA法により生産することができる。

本発明の1の具体例において、出願人らは、リガンド結合またはリガンド結合の調節に用いるMet細胞外ドメインに対応する合成ペプチドに対するポリクローナル抗体を製造する。図6および図7およびその説明参照。

出願人らは、腫瘍の侵略または転移をブロックする能力を測定するMetに対して指向されたリガンド結合阻害剤についてのインビトロ試験に関するプロトコールを開発した。例え

10

20

30

40

50

ば、出願人らは、 met^{mu} （内因的にネズミ・HGF/SFを産生する）および met の腫瘍形態である $tpr-met$ でトランスフェクションした細胞が侵略的であるのと同様に、HGF/SFおよび met^{hu} でトランスフェクションしたNIH/3T3細胞が、ポイデン・チェンバーアッセイにおいて侵略的であることを見いだした。同様に、「ならし培地」、すなわちHGF/SF hu を含有する培地中にある場合には、 met^{hu} トランスフェクション体は侵略的である。さらに出願人らは、Metの細胞外ドメイン中のペプチド配列に対して産生された「1242」抗体が、腫瘍細胞の侵略能をブロックすることを見いだした。

実際に、実施例2に開示され、図5を参照して議論されるようなキメラなマウス/ヒトに関する実験により、リガンド/受容体結合に包含されるMet受容体およびHGF/SFに関するドメインを明らかにすることが可能になる。図6に示され記載された数学的かつコンピューターによる計算により、マウスおよびヒトにおいて異なっているドメイン中の領域を明らかにすることが可能である。これらの「相違」により、HGF/SFに対する対応における種特異性が調節されている可能性があり、かかる領域に対する抗体を、そのHGF/SF結合を阻害する能力に関して試験することができる。よって、出願人らは、インビボ用途の組成物の開発に適用可能な、腫瘍転移阻害についてのインビトロ試験法を提供した。

作用すべき選択部位への本発明腫瘍転移阻害物質の送達を、ドラッグデリバリー、遺伝子導入、またはそれらのすべての組み合わせといった慣用的方法を用いて行うことができる。ケイ・ジェー・バン・ゼー（K.J. Van Zee）ら、PNAS第89巻:4845~4849頁（1992年）参照。送達手段としては、炭水化物またはキャリア蛋白と抱合体化；当該分野で認められているいかなる徐放複合体とともに行う投与；微小球またはリポソームのごとき他の送達システムとの組み合わせ；または発現ベクター系に導入しての投与が挙げられる。本発明に適用可能な送達方法の1つとしては、デイビス（Davis）ら、米国特許第4,479,337号の方法により、本発明の腫瘍転移阻害物質をポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールとカップリングさせて生理学的に活性な免疫原性のない水溶性組成物を製造することが挙げられる。

かかる組成物の投与を、当業者に知られたいかなる方法によっても行うことができる。例えば、組成物を水溶液中に入れ、哺乳動物の循環系内または筋肉内系に注射することができる。適正な用量の決定は、哺乳動物の年齢および体重をはじめとするそれぞれのケースに特異的な変数の数に依存し、当業者の技術・知識範囲内の通常の実験を必要とする。

本発明のもう1つの具体例において、HGF/SF経路の人工的な活性化により、本来の生物学的活性を回復、置換、または増強するための治療的方法論に関する根拠が提供される。これらの方法論としては、MetとHGF/SFとの間の結合相互作用を増強するHGF/SFまたはMet変種あるいは模擬体を活性化すべき部位へ送達し、そのことにより、人工的に支持されたHGF/SF相互作用を作り出すことが挙げられる。例えば、MetのHGF/SF結合ドメイン、またはHGF/SFのMet結合ドメイン（あるいはその両方）の部位特異的変異を用いて、他のペアーのメンバーに対するより高い親和性を有するHGF/SF-Metペアーのメンバーを作り出すことができ、よって、損傷組織の成長または再生の加速に影響が及ぶ。同様に、構成的に活性化されたチロシンキナーゼを有するMetの変異をはじめとする慣用的な組換えDNA法を用いて、通常はHGF/SF結合により調節されるMet蛋白のキナーゼ活性を増強または支援することができる。外部から投与されたHGF/SFと組み合わせた組換えDNA法によりMetの自然発現を補う手段によってHGF/SF-Met経路を活性化することも、本発明の範囲内に包含される。

作用すべき選択部位への遺伝子操作されたHGF/SFまたはMet種の送達を、腫瘍転移を阻害する物質の送達に関して上で議論されたような、ドラッグデリバリー、遺伝子導入、またはそれらのすべての組み合わせといった慣用的方法を用いて行うことができる。

本発明の別の具体例において、出願人らは、ヒト・HGF/SFの製造法を提供する。詳細には、出願人らは、驚くべきことに、マウス・繊維芽細胞NIH/3T3細胞が、ヒト・HGF cDNAを含むトランスフェクションされた末端反復配列（LTR）ベクター組み換え体から高レベルのHGF/SFを発現することを見いだした。出願人らは、LTRヒト・c-met腫瘍原遺伝子（cDNAベクター）がヒト・LTR/HGF構築物とともに同時トランスフェクションされ、かつ細胞

10

20

30

40

50

が2次腫瘍から由来する場合に、最高レベルのHGFがNIH/3T3中に検出されることを見いだした。下記実施例2参照。この細胞系の1の利点は、形質転換細胞が高密度にまで増殖することである。したがって、この細胞系は、非常に高レベルのHGF/SF、すなわちリットルあたりHGF/SF約1mg (mlあたり1250ユニット)を産生する。これに対し、ヒト・表皮ケラチン細胞由来の別の細胞系であるndk細胞は、48時間でリットルあたり約10 μ gを産生する。ジェイ・シーアダムス (J.C.Adams) ら, サイエンス第98巻:385~394頁 (1991年); イー・エム・ローゼン (E.M.Rosen) ら, BBRC第168巻 (3):1082~1088頁 (1990頁) 参照。それゆえ、本発明の組換えベクター構築物で同時トランスフェクションしたNIH/3T3細胞から、1mg/mlの収量でHGF/SFを得ることは予期されないことである。

よって、本発明の1の具体例は、以下のステップ:

(a) NIH/3T3細胞を、HGF/SF^{h_u}およびMet^{h_u}をコードしているDNAでトランスフェクションし;

(b) ステップ(a)によりトランスフェクションされた細胞を哺乳動物内に導入し、それにより、1次腫瘍を生じさせ;

(c) 1次腫瘍細胞を外移植し、インビトロで増殖させ;

(d) ステップ(c)により増殖した高レベルのHGF/SF^{h_u}および高レベルのMet^{h_u}を発現する細胞を選択し;

(e) ステップ(d)により選択した細胞を哺乳動物内に導入し、それにより、2次腫瘍を生じさせ;

(f) 2次腫瘍細胞を外移植し、インビトロで増殖させ; ついで

(g) ステップ(f)の細胞により産生されたHGF/SF^{h_u}を得る

からなるHGF/SFの製造法に関する。

本発明DNAは、作動可能に連結されたレトロウイルスの末端反復配列由来のプロモーター、ヒト・Metの全コーディングドメインをコードしているDNAおよびポリアデニレーションシグナルからなる第1のDNAベクター、および作動可能に連結されたレトロウイルスの末端反復配列由来のプロモーター、ヒト・HGF/SFをコードしているDNAおよびポリアデニレーションシグナルからなる第2のDNAベクターよりなる。

本発明DNAベクターの製造を、当業者に知られた種々の方法により行うことができるが、方法を実施例2のcDNAプラスミド構築物および細胞系の議論において例示する。本発明の好ましいDNAプラスミド構築物を図9に示す。

HGF/SF^{h_u}およびMet^{h_u} LTR - cDNAでトランスフェクションされた細胞を、当該分野でよく知られた方法により、好ましくは、注射により哺乳動物中に導入する。ブレイアー、ディー・ジー (Brair, D.G.) ら, サイエンス第218巻:1122~1125頁 (1982年) 参照。本発明の好ましい哺乳動物はヌードマウスである。これらの動物中で5~10週間増殖した後の1次腫瘍を外移植し、実施例2のヌードマウスアッセイ記載のごとくインビトロ培養で増殖させる。ついで、インビトロ増殖した1次腫瘍細胞を、免疫沈降分析に付してどの細胞が高レベルのHGF/SF^{h_u}および高レベルのMet^{h_u}を発現しているのかを確認する。図3およびその説明参照。例えば、外移植された細胞を代謝的にラベルし、ついで、Met^{h_u}モノクローナル抗体 (モノクローナル19S) とともに免疫沈降させ、濃縮し、ついで、HGF/SF^{h_u}モノクローナル抗体A3.1.2.とともに免疫沈降させる。高レベルのHGF/SF^{h_u}およびMet^{h_u}を、出発物質における発現レベルと比較して測定する。したがって、出発物質において観察されるよりも高い発現レベルのものすべてを、この方法の目的に照らし合わせて、「高い」とみなす。ついで、高レベルのHGF/SF^{h_u}およびMet^{h_u}を発現する細胞を哺乳動物に導入し、増殖する2次腫瘍を外移植し、当該分野でよく知られた方法によりインビトロ増殖させる。ブレイアー・ディー・ジーら, サイエンス第218巻:1122~1125頁 (1982年) 参照。

ついで、外移植された2次腫瘍細胞により発現されるHGF/SF^{h_u}を、ウェイドナーら, ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー第111巻:2097~2108 (1990年) 記載のごとく精製する (本発明の適用可能な他の方法は当業者によく知られている)。

さらにもう1つの具体例において、本発明は、met cDNAでトランスフェクションされたNIH/3T3細胞由来のマウスおよびヒトのMetのC - 末端イソ体 (isoform) に関する。これら

10

20

30

40

50

のイソ体は翻訳後のプロセッシングにより生じる可能性もっと高いが、出願人は、トランスフェクションされたDNAの可能な再配列を排除することはできない。C - 末端において切形されたいくつかのmet産物が報告されている(プラト, エム(Prat, M.)ら, モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.) 第11巻:5954~5962頁(1991年))が、これらの産物は本発明イソ体(isoform)とは異なる。その理由は、それらがC - 末端抗体と反応しないからである。そのうえ、これらのイソ体は、高レベルのmetを発現している細胞においてのみ検出され、そのことは、それらの存在量が少ないことを示すものである。

実施例1.c-met腫瘍原遺伝子は運動原性に関連した受容体である

c-met受容体を発現する多くのヒト・癌細胞系において転移および/または散在化(運動原性)を誘導するHGF/SFの能力を調べた。上記表1に示す細胞系を、 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 個/mlとなるよう96ウェル組織培養プレートに撒き、集密的に近くなるまで増殖させた。ウェルを洗浄して血清を除去し、無血清培地にて2日間細胞を飢餓状態とした。その翌日、細胞を、無血清、血清、またはHGF/SF10ng/mlで16~18時間処理し、ついで、ウェルあたり³H-チミジン1 μ Ci(5 μ Ci/ml)を添加して、さらに6時間置いた。氷冷PBSでウェルから標識を洗い落とすことによりアッセイを終了し、細胞を5%TCAで固定し、ついで、0.25M NaOHでDNAを可溶化した。運動原性インデックスは、血清不存在下におけるチミジンの取り込みとHGFによるチミジンの取り込みとの比である。運動原性アッセイ用に、細胞を、 2×10^3 個/mlとなるように16-ウェルチェンバースライド(ラプテック(LabTek)社製)に撒き、60%集密的になるまで増殖させた。ついで、細胞を洗浄して血清を除去し、HGF/SF添加/無添加無血清培地にて一晩インキュベーションした。スライドを氷冷アセトンで10分間固定し、クリスタルバイオレット染色した(5分間)。「散在化した表現形」における質的な変化が記録された。

c-metの上皮細胞系への導入により「散在化」活性が該細胞に付与されることを示すために、ヒト・met cDNAまたはネズミ・met cDNAのいずれかでリポフェクション(BRL)することにより、C127細胞をトランスフェクションした。表1のように分裂原性および/または動物原性を測定した。この研究結果を上記表2に示す。

実施例2.NIH/3T3細胞系におけるHGF/SF産生

cDNAプラスミド構築物および細胞系 met cDNAプラスミドを、pMEX(オスカム, アール(Pskam, R.)ら, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエイ第85巻:2964~2968頁(1988年))の誘導體(ポリリンカー配列なし)であるpMB1中で構築した。該プラスミドは、モロニー・ミュリン・サルコーマ・ウイルス(Molony murine sarcoma virus)(MSV)由来のLTRRプロモーターおよびシミアン・ウイルス40(simian virus 40)のポリアデニレーションシグナルを含んでいる。オーブンリーディングフレームを含む4.6kbのmet^{h^u}配列中において、内部の300bpのEcoR Iフラグメントをp0Kの250bpのEcoR Iフラグメントと置換することによりmet^{h^u}プラスミドを構築した。パーク, エム(Park, M)ら, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエイ第84巻:6379~6383頁(1987年); ロドリゲス(Rodriguez)ら, モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー第11巻:2962~2970頁(1991年)参照。met^{m^u}プラスミドは、4.6Kbのマウス・metオープンリーディングフレーム全体を含んでいる。アイヤー, エイら, セル・グロウス・アンド・ディファレンシエイション第1巻:87~95頁(1990年)参照。キメラなヒト/マウスmet構築物を、保存的なPvu II部位(アミノ酸807)を用いて構築した。pMEXのBamH I - Kpn I部位中にヒト・HGF配列の2.3KbのBamH I - Kpn Iフラグメントを挿入することによりHGF^{h^u}プラスミドを構築した。ナカムラ, ティーら, ネイチャー第342巻:440~443頁(1989年); オスカム, アールら, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエイ第85巻:2964~2968頁(1988年)参照。NIH/3T3 490細胞を、8%子ウシ血清(ギブコ社製)含有DMEM培地(ギブコ社製)中で増殖させた。

DNAトランスフェクション プラスミドDNA(子ウシ胸腺キャリアDNA8 μ gを含む水75 μ l中2 μ g)を0.67M CaCl₂75 μ lと混合することにより、DNAトランスフェクションに関

10

20

30

40

50

するリン酸カルシウム法 (クーパー, シー・エス (Cooper, C.S.) ら, ネイチャー第311巻:29~33頁 (1984年)) を行った。連続的に攪拌しながらこの混合物を、0.15mlの溶液H (0.27M NaCl、0.01M KCl、0.0014M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.012M デキストロース) に滴下した。室温に30分間置いた後、0.01M Hepesバッファーを含む培地1mlを入れた35mmディッシュ上で約70%の集密性を有する細胞に、該混合物を添加した。細胞を37°Cで4時間インキュベーションし、ついで、溶液H中の15%グリセロール (v/v) で2分間処理した。G418により選択のために、細胞を再度DMEMおよび8%子ウシ血清中に一晩フィードし、ついで、3個の60mmディッシュに移した。24時間インキュベーションした後、細胞を、40 $\mu\text{g/ml}$ のG418 (ギブコ社製) を含有する培地に、1週間に2度フィードした。

ノーザン分析 RNAsol (CINNA/BIOTECX社製) を用いてRNAを単離した。RNA20 μg を、10%変性的ホルムアミドアガロースゲル上の電気泳動に供し、ついで、ニトロセルロースフィルター (シュライヒャー・アンド・シュール (Schleicher and Schuell) 社製) に移した。30%ホルムアミド、6xセイラインクエン酸ナトリウム (SSC)、5xデンハート溶液 (Denhardt's solution)、50mMリン酸ナトリウム (pH6.8) および超音波処理したサケ・精子DNA (250 $\mu\text{g/ml}$) 中で、プロットを、 ^{32}P -標識ランダムプライマー-DNAプローブと42°Cで15時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダーゼーション後、フィルターを、1xSSC (0.1% SDS含有) 中、室温で2回洗浄し、ついで、1xSSC (0.1% SDS含有) 中、50°Cで洗浄した。フィルターを乾燥させて-70°Cで1~3日間、X線フィルムに暴露した。

免疫沈降 集密的に近い細胞を、メチオニンおよびシステイン不含DMEM中で、0.25mCiのトランスラベル (Translabel (ICN社製)) (1ml/35mmディッシュ) で4ないし6時間ラベルした。ラベルした細胞を、0.5mlのRIPA緩衝液 [1%トリトンX-100、1%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.15M NaCl、0.02M NaPO_4 , pH7.2、1mM フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF)、2mM EDTA、50mM NaF、30mM ピロリン酸ナトリウム] 中で溶解させた。等量の放射線カウントを有する清澄化した溶解物を、19Sモノクローナル抗-メチオニン抗体 (ファレット, ディー・エル (Faletto, D.L.)) ら, オンコジーン (Oncogene) 第7巻:1149~1157頁 (1991年)) と4°Cで一晩免疫沈降させた。免疫沈降物を、プロテインG-セファロース (ギブコ社製) に複合体化させ、ついで、RIPA緩衝液で2回洗浄し、ハイサルト緩衝液 (high-salt buffer) (1M NaCl、10mM Tris-HCl, pH7.2、0.5%トリトン) で洗浄した。5% β -メルカプトエタノール含有SDS試料用緩衝液中煮沸することにより、免疫沈降物を可溶化させた。試料をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析し、ついで、フルオログラフィックエンハンサー (fluorographic enhancer) (アンプリファイ (Amplify)TM, アマシャム (Amersham) 社製) で処理し、-70°Cにおいて増強スクリーンでフルオログラフィーを得た。

SP260は、ウサギ・抗血清から作られたペプチド抗体であり、met^hのC-末端の21個のアミノ酸に対して指向されている (アイヤー, エイラ, セル・グロウス・アンド・ディファレンシエイション第1巻:87~95頁 (1990年))。A.3.1.2は、抗-ヒト組み替え型HGFモノクローナル抗体 (IgG, サブクラスG2a) である。

パルスチェイス分析 集密的に近い細胞を、メチオニンおよびシステイン不含DMEM1ml中 (各35mmディッシュ)、0.25mCiのトランスラベルで45分間ラベルした。細胞を2回洗浄し、完全培地で3時間チェイスし、ついで、溶解し、免疫沈降分析に供した。

表面ヨウ素化 集密的に近い細胞を、ヨード-ジェン (Iodo-Gen (ピアス (Pierce) 社製)) の存在下で Na^{125}I でラベルした。ヨード-ジェン試薬20 μl (クロロホルム中10mg/ml) をI-ドラムバイアル (I-dram vial) の底に入れ、窒素の流れにより乾燥させた。ついで、ヨード-ジェンを10mM EDTAを含有する1M Tris (pH7.5) に溶解し、細胞ペレットに添加した。 Na^{125}I (0.5mCi) を添加した10分間反応した。ラベルした細胞をPBSで3回洗浄し、ついで、RIPA緩衝液で溶解し、免疫沈降分析に付した。

ウエスタン分析 100mmディッシュ上の集密的に近い細胞を、冷TBS (10mM Tris, pH8.0、150mM NaCl) で2回洗浄し、1mlの溶解用緩衝液 (25mM Tris-HCl, pH8.0、100mM NaCl、50mM NaF、1%トリトンX-100、10 $\mu\text{g/ml}$ アプロチニン、10 $\mu\text{g/ml}$ ロイペプチン、1.25mM PMSF、1mM バナジン酸塩) 中で溶解させた。蛋白1mgを、抗-C28抗-Met^hポリクロー

10

20

30

40

50

ーナル抗体（ゴンザッティ・ヘイセス，エム（Gonzatti - Haces, M.），プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユーエスエイ第85巻:21～25頁（1988年））とともに免疫沈降させ、抗 - ホスホチロシン（抗 - P - Tyr）抗体4G10（モリソン、ディー・ケイ（Morrison, D.K.）ら，セル第58巻:649～657頁（1989年））、またはヒトもしくはマウスのmet特異的抗体である19Sモノクローナル（ファレット，ディー・エルら，オンコジーン第7巻:1149～1157頁（1991年））あるいはSP260（アイヤー，エイら，セル・グロウス・アンド・ディファレンシエイション第1巻:87～95頁（1990年））のいずれかとウエスタン分析を行った。製造者の指示に従い、¹²⁵I-プロテインA（アマシャム社製）を用いて陽性バンドを検出した。

ヌードマウス腫瘍アッセイ すでに記載されているようにして（ブレイアー，ディー・ジャーら，サイエンス第218巻:1122～1125頁（1982年））、アッセイを行った。トランスフェクションされG418で選択されたNIH/3T3細胞（10⁶個）を2回洗浄し、無血清培地0.1ml中に再懸濁した。細胞を、離乳した胸腺除去ヌードマウス（ハーラン・スプラグ・ダウリー，インク（Harlan Sprague Dawley, Inc.）の背中に注射した。腫瘍形成を、毎週10週目までモニターした。腫瘍が15mmのサイズになった時、腫瘍を外移植し、腫瘍細胞を免疫沈降分析に供した。

軟寒天アッセイ 軟寒天増殖アッセイを、ブレイアら、ウイルス学（Virology）第95巻:303～316頁（1979年）の変法により行った。簡単に説明すると、トリプシン処理細胞を、10%子ウシ血清および0.24%精製寒天（DIFCO社製）を含有する8mlのDMEM中、2×10⁵および2×10⁴個となるように懸濁し、10%子ウシ血清および0.27%寒天を含有するDMEMの硬化下層を入れた2系の60mmディッシュに移した。1週間間隔で、10%子ウシ血清および0.27%寒天を含有するDMEM2mlをプレートにフィードした。37℃で3週間インキュベーションした後、顕微鏡でコロニーを数えた。

NIH/3T3細胞におけるMet^{h^u}およびMet^{m^u}の発現 met^{h^u}腫瘍原遺伝子cDNAを含んでいるプラスミドを、pSV2neoとともにNIH/3T3細胞に同時トランスフェクションし、免疫沈降分析により、ヒトまたはマウスのMet発現に関してG418耐性細胞をスクリーニングした。これらの分析により、トランスフェクションされたNIH/3T3細胞において、ヒトおよびマウスのp170^{m^et}およびp140^{m^et}が発現されることが示されている（図1Aのそれぞれレーン2および3）。NIH/3T3細胞における同等のレベルのmet^{m^u}発現が報告されている（アイヤー，エイら，セル・グロウス・アンド・ディファレンシエイション第1巻:87～95頁（1990年））

出願人らは、Met^{h^u}を発現するG418耐性細胞において、外来性のMet^{m^u}の発現が見られないかまたは殆ど起こらないことを見いだした。Met^{h^u}およびMet^{m^u}の適当なプロセッシングについて、パルスチェイスラベリング実験により試験し、これらの研究により、45分のパルス間に合成されるp170^{m^et}（図1B、レーン1および3）が、3時間後に、効果的に成熟p410^{m^et}へとプロセッシングされる（レーン2および4）ことが示された。そのうえ、ヒトおよびマウスのMetは、細胞表面に局在化していた。出願人らは、無処理の細胞をNa¹²⁵Iでラベルし、その溶解物を免疫沈降して、p140^{m^et}およびp170^{m^et}両形態ともがヨウ素化されたことを示した（図1C）。よって、NIH/3T3細胞において発現されるヒトまたはマウスのMetは、正確にプロセッシングされ、細胞表面に局在化するのである。これらの分析は、p170^{m^et}が細胞表面に到達することも示す。p170^{m^et}のヨウ素化物は、溶解細胞からは生じなかった。なぜならば、同じヨウ素化条件において、細胞質性tpr - met腫瘍蛋白が検出されなかったからである（ゴンザッティ・ヘイセス，エム（Gonzatti - Haces, M.），プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユーエスエイ第85巻:21～25頁（1988年））。さらに、met^{h^u}を過剰産生するヒト・胃癌細胞系であるオカジマ細胞（Okajima cells）において発現されるp170^{m^et}もまた、表面ヨウ素化によりラベルされるが（データ示さず）、NIH/3T3細胞と比較した場合、ラベルされたp140^{m^et}に対するp170^{m^et}の割合は小さかった。

NIH/3T3細胞におけるmetの構造的なチロシンのリン酸化 ノーザンハイブリダイゼーション分析により、出願人らは、NIH/3T3細胞およびmet^{h^u}またはmet^{m^u}のいずれかでトランスフェクションされた細胞におけるHGF/SF mRNA発現を検出した。出願人らは、同レベルの

10

20

30

40

50

HGF/SF mRNA発現を観察した。そのことは、G418選択細胞系における met^{hu} または met^{mu} の過剰産生は外来性HGF/SF発現に影響しないことを示すものであった。これらの結果もまた、Metがオートクリン様式で活性化されうることを示すものであった。それゆえ、出願人らは、これらの細胞において発現した Met^{hu} および Met^{mu} が抗-P-Tyr抗体と反応するかどうかを調べた。 Met^{hu} および Met^{mu} を発現する細胞系からの抽出物を、ヒトまたはマウスに特異的なペプチド抗体との免疫沈降に供し、ついで、抗-P-Tyr抗体(図2Aおよび2B)、またはヒト(図2C)あるいはマウス(図2D)に特異的なMet抗体を用いたウエスタン分析を行った。これらの分析は、 Met^{hu} の $p170^{met}$ および $p140^{met}$ ならびに Met^{hu} が抗-P-Tyr抗体と強く反応したことを示すものである。これは、 $p170^{met}$ のチロシンリン酸化物が抗-P-Tyr抗体と反応することを示した最初の例である。1つの細胞系は Met^{hu} を非常に高レベルで発現した(図2AおよびCのレーン1)。これは例外である。なぜならば、他のすべての Met^{hu} 細胞系が、図2AおよびCのレーン2および3で分析された細胞系に匹敵するレベルの発現を示したからである。さらに、C-末端Met蛋白産物(p85、p75、およびp65)がマウスまたはヒトいずれかの met を発現する細胞におけるC-末端抗体でもって検出された(図2A~Dのレーン1)。

NIH/3T3細胞における met の腫瘍原性 出願人らは、図5に示すように、 Met^{mu} を発現するが Met^{hu} を発現しないNIH/3T3細胞培養物が形質転換されたこと(アイヤー、エイラ、セル・グロウス・アンド・ディファレンシエイション第1巻:87~95頁(1990年))を観察した。このことは、ヌードマウスにおける培養物の腫瘍原性について試験し、ついで、トランスフェクションし、G418選択を行うことによって確認された。 met^{mu} を発現するNIH/3T3細胞は、下表3に示すように非常に腫瘍原性があるが、 met^{hu} を発現する細胞は腫瘍原性が低く、試験した8系のうち1系のみが腫瘍を生成したにすぎなかった。

表3

met^{hu} または met^{mu} cDNAでトランスフェクションされたNIH/3T3細胞の腫瘍原性

細胞*	トランスフェクションされた遺伝子	試験マウス数 あたりの腫瘍マウス数	潜伏期 (週)
NIH/3T3	neo^r	0/8	
123-1	neo^r, met^{hu}	2/23	5
121-5	neo^r, met^{mu}	12/12	3~5

細胞(10^6 個)を、無血清培地で2回洗浄し、離乳した胸腺除去ヌードマウスの背中に皮下注射した。腫瘍形成を、毎週、10週間までモニターした。

注射する前は、これらの腫瘍原性細胞系(図2AおよびCのレーン1)は、腫瘍原性でない細胞系(図2AおよびCのレーン2および3)と比較すると、高レベルの Met^{hu} を産生していた。この系の腫瘍外移植も同様に高レベルの Met^{hu} を示した。比較のため、注射する前の Met^{mu} 系のレベルを示す(図2BおよびDのレーン1)。より低いレベルの Met^{mu} を発現する細胞系もまた、このアッセイにおいて腫瘍原性であった。細胞系123-1により生じた2個の腫瘍(表3)は、外来性 Met^{mu} の発現レベルの増加および Met^{hu} レベルの減少を示すものであった。このことは、すでに記載されたように(クーパー、シー・エス(Coop

er, C.S.)ら, ジ・EMBO・ジャーナル第5巻:2623~2628頁(1986年); ヘルデン, シー・エイチ(Helden, C.H.)ら, ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Eur. J. Biochem.)第184巻:487~496頁(1989年)、マウス・metの増幅により2個の腫瘍が生じたことを示唆するものである。出願人らは、Met^{h_u}は、NIH/3T3細胞においては殆ど腫瘍原性がないと結論する。

met^{h_u}およびHGF/SF^{h_u}で同時トランスフェクションされたNIH/3T3細胞の腫瘍原性 met^{h_u}でトランスフェクションされたNIH/3T3細胞の低い腫瘍原性に関する1の説明は、外来性のHGF/SF^{h_u}によってはmet^{h_u}受容体活性化により十分なシグナルを得ることができないということである。それゆえ、出願人らは、met^{h_u}およびHGF/SF^{h_u}両方のcDNAでのトランスフェクションが、オートクリン機構を通して腫瘍原性を増加させるかどうかを調べた。これらの分析により、met^{h_u}およびHGF/SF^{h_u}で同時トランスフェクションされたNIH/3T3細胞が高い腫瘍原性となることが示されている(表4)。

表4

met^{h_u}およびHGF/SF^{h_u}cDNAでトランスフェクションされたNIH/3T3細胞の腫瘍原性

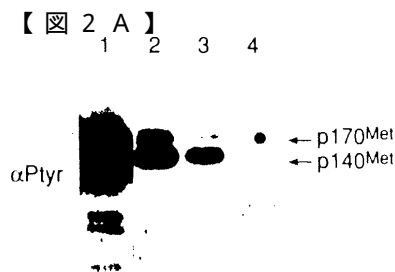
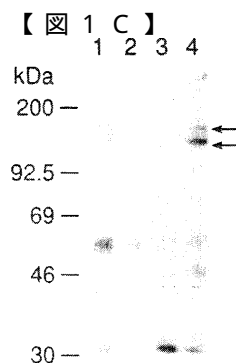
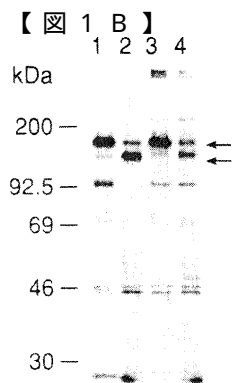
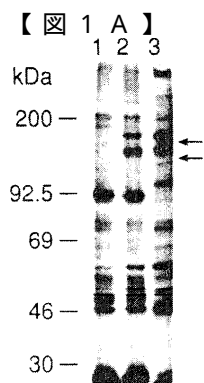
細胞*	トランスフェクションされた遺伝子	試験マウス数 あたりの腫瘍マウス数	潜伏期 (週)
NIH/3T3	neo ^r	0/6	-
132-4	neo ^r , met ^{h_u}	0/6	-
132-3, 137-5	neo ^r , met ^{h_u} , HGF ^{h_u}	17/19	4~6
137-4	neo ^r , HGF ^{h_u}	3/7	7

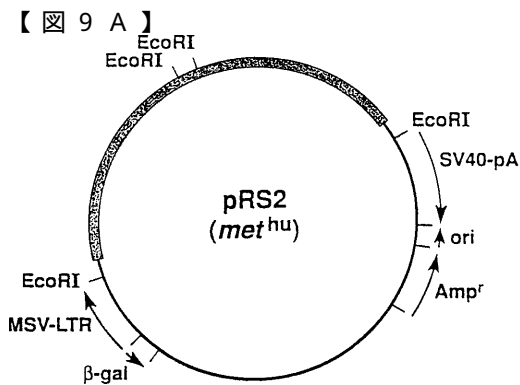
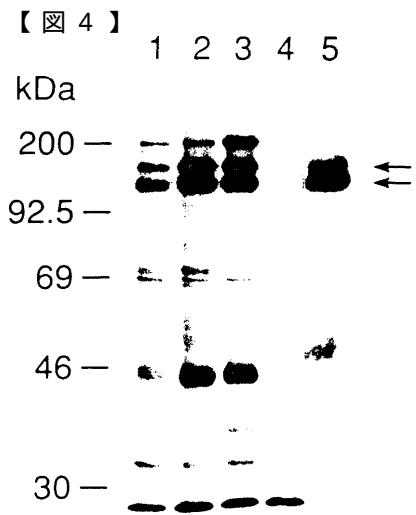
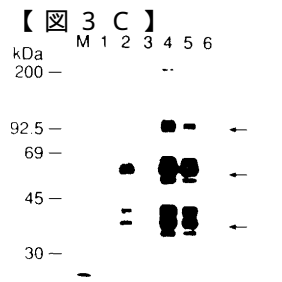
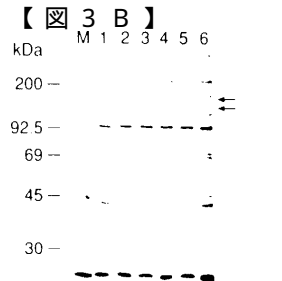
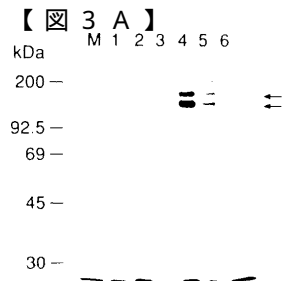
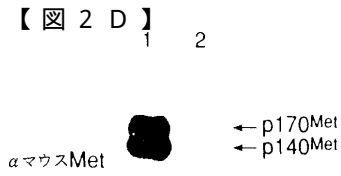
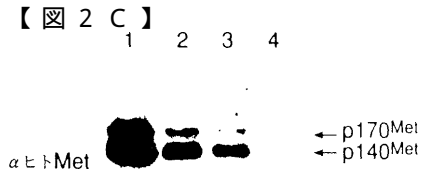
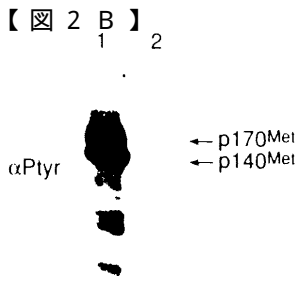
そのうえ、腫瘍細胞は、Met^{h_u}およびHGF/SF^{h_u}両方のレベルの増加を示した(それぞれ図3AおよびCのレーン2、4および5)。レーン4および5に示される腫瘍外移植体において、Met^{h_u}およびHGF/SF^{h_u}が両方とも高レベルで発現された。外来性のmet^{h_u}の増幅を示した細胞系はなかった(図3B)。出願人らは、HGF/SF^{h_u}でトランスフェクションされたNIH/3T3細胞もまた、いくつかの腫瘍を生じさせたが、外移植体由来の腫瘍細胞において発現したHGF/SF^{h_u}産物のレベルは、met^{h_u}-HGF/SF^{h_u}同時トランスフェクション実験(図3C)による腫瘍において発現したレベルほど高くなかった。5個のHGF/SF^{h_u}腫瘍のうち1個において、外来性のmet^{h_u}のレベル上昇が検出された。

NIH/3T3細胞におけるキメラなヒト/マウス・metの腫瘍原性 リガンド結合ドメインが腫瘍原性に影響するかどうかを調べるために、出願人らは、キメラなヒト/マウス・met受容体分子を得、ヌードマウスにおけるそれらの腫瘍原性を試験した(図5)。出願人らは、トランスメンブレンをコードしている部位に隣接した外部ドメイン中の保存されたPvuII部位を用いてこれらの組換え体を作った。マウス・外部リガンド結合ドメインをヒト・トランスメンブレンおよびチロシンキナーゼドメインに連結した場合、該キメラな受容体は、Met^{h_u}と同等の腫瘍原性を示した(図5)。これらの腫瘍の外移植体は、ヒト・チロシンキナーゼドメインに対して指向されたヒト・抗体でもって認識されるキメラなMet蛋白のレベルの増加を示した(図4のレーン2および3)。これらの腫瘍において、met^{h_u}の増幅に関する証拠は得られず、キメラな産物は、抗-P-Tyr抗体を用いたエウスタン分析によって認められた(図4のレーン5)。

マウス・Met外部リガンド結合ドメインを伴ったキメラの高い腫瘍原性とは対照的に、ヒ

ト・N - 末端 / マウス・C - 末端キメラは殆ど腫瘍原性がなかった。しかしながら、Met^h_uの場合と同様に、HGF/SF^h_ucDNAでこのキメラを同時トランスフェクションした場合、効果的な腫瘍形成が観察された(図5)。さらに出願人は、met^m_u - met^h_uキメラを発現する細胞が、ヌードマウスに注射する前に、形成転換され、met^m_uでトランスフェクションされた細胞と同様に軟寒天中にコロニーを形成することを示す。met^h_u - met^m_u細胞は、HGF/SFで同時発現されないかぎり、形質転換された表現形を示さない。出願人は、Met^m_u外部リガンド結合ドメインが、腫瘍原性を調べる主要因子であると結論した。上記発明を、明確および理解の目的で、いくらか詳細に記載したが、本発明は、この開示を読んだ当業者により理解されるであろう。また、本発明の真の範囲から離れることなく、形態および詳細において種々の変更がなされうる。





【 図 5 】

ヒト-マウス・キメラMET cDNAでトランスフェクションされたNIH/3T3細胞の形質転換特性

トランスフェクションされた遺伝子*	腫瘍を有するマウス数/試験動物数	潜伏期(週)	形質転換表現型	軟葉天でのコロニー形成
met ^{hu}	11/12	3-5	+	+
met ^{hu}	0/7	-	-	-
met ^{hu} , met ^{hu} (PvuII)	6/7	6-7	+	NDb
met ^{hu} , met ^{hu} (PvuII)	1/11	5	-	NDb
met ^{hu} , met ^{hu} (PvuII)	6/7	3-6	±	NDb
met ^{hu} , met ^{hu} (NdeI) + HGF ^{hu}	11/12	3-5	±	-
met ^{hu} , met ^{hu} (NdeI)	0/10	-	-	-

TM ↓

*すべてでトランスフェクションをneo^rで行った
N.D., 測定せず

【 図 8 】

A. インビトロでのMET-媒介性の肺への転移

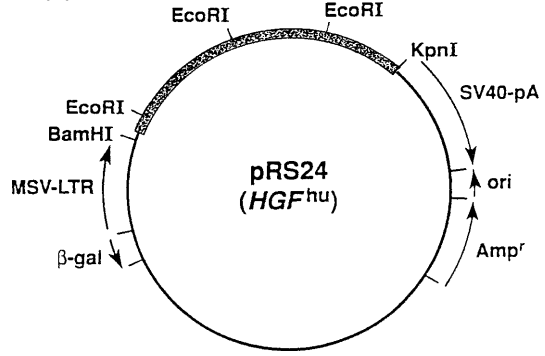
トランスフェクション遺伝子	転移を有する動物数/試験動物数	潜伏期 (週)
neof, lpr-met	3/4	3.4
neof, metmu	6/7	6.7
neof, methu	0/4	-
neof, methu, HGFhu (1*)	7/10	3.6

B. インビトロでのMET-媒介性の自発的転移

トランスフェクション遺伝子	注射部位	転移を有する動物数/試験動物数	標的器官	潜伏期 (週)
neof, lpr-met	S.Q.	1/3	肺	5
neof, metmu	K.C.	2/2	肺、 後腸腺	4
neof, methu, HGFhu	K.C.	1/1	脾臓、胃	6

細胞 (10⁶個) を無血清培地で洗浄し、尾の静脈内に注射 (A) ; または皮下注射 (S.Q.) ; あるいは腫瘍ヌードマウスの腎臓 (K.C.) に注射した。病状が現れた場合、主な器官を転移についてチェックした。

【 図 9 B 】



フロントページの続き

- (72)発明者 ファレット, ドンナ・エル
アメリカ合衆国メリーランド州21771、マウント・エアリー、トールポット・コート5551
番
- (72)発明者 ツアルファティ, イラン
アメリカ合衆国メリーランド州21702、フレデリック、ハモンド・コート1812番
- (72)発明者 ロング, シング
アメリカ合衆国メリーランド州21702、フレデリック、トニー・アベニュー1018番
- (72)発明者 オスカーソン, マリアンヌ
アメリカ合衆国メリーランド州20879、ゲイザースバーグ、フェイバー・コート19408番
- (72)発明者 ヴァンド・ウッド, ジョージ・エフ
アメリカ合衆国バージニア州22611、ベリービル、ボックス2905、ルート1番

審査官 北村 弘樹

- (56)参考文献 国際公開第92/013097(WO, A1)
国際公開第92/005184(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12N 15/09
C07K 14/475
C12N 5/10
C12P 21/02
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed