

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-285040

(P2004-285040A)

(43) 公開日 平成16年10月14日(2004.10.14)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28	C07K 16/28	4B063
A61K 39/395	A61K 39/395	4B064
A61P 29/00	A61P 29/00	4B065
A61P 35/02	A61P 35/02	4C085
C07K 14/715	C07K 14/715	4H045
	審査請求 有 請求項の数 21 O L	(全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-283186 (P2003-283186)	(71) 出願人	503235972
(22) 出願日	平成15年7月30日 (2003.7.30)		ドナーファーバー キャンサー インステ テュート インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願平5-517529の分割		アメリカ合衆国 02115 マサチュー セッツ州 ボストン ビネイ ストリート 44
原出願日	平成5年3月24日 (1993.3.24)	(74) 代理人	100062225
(31) 優先権主張番号	862,483		弁理士 秋元 輝雄
(32) 優先日	平成4年4月2日 (1992.4.2)	(72) 発明者	テダー, トーマス エフ・
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 02760-5627 マサチューセッツ州 サウス ナティック ファイブ インディアン リッジ ウエ イ (番地無し)
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞表面レセプター白血球粘着因子-1の特異的検出

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】白血球粘着分子-1 (LAM-1、L-セレクチン)の放出形と細胞表面結合形を識別する。

【解決手段】LAM-1の放出形はヒト血漿中に高レベルで存在する。ウェスタンブロットおよびELISA分析によって放出LAM-1 (sLAM-1)を検出する定量方法が開示される。放出LAM-1の存在下で細胞表面結合LAM-1の特異的検出方法、および細胞表面結合LAM-1と反応するが放出LAM-1とは反応しない単クローン性抗体を用いる免疫治療の方法もまた開示される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞表面結合性 L A M - 1 の E G F 様領域中に存在し放出 L A M - 1 中には存在しない抗原決定基へ結合する単クローン性抗体であって、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 H B 1 0 8 4 4 のハイブリドーマ細胞株により産生される抗 L A M 1 - 1 単クローン性抗体以外の前記単クローン性抗体。

【請求項 2】

単クローン性抗体を産生する請求項 1 項記載のハイブリドーマ細胞株。

【請求項 3】

(a) 細胞表面結合性 L A M - 1 と反応性の単クローン性抗体集団を分離する工程、 (b) 前記集団をスクリーニングして放出 L A M - 1 に非反応性な単クローン性抗体を得る工程、及び (c) 細胞表面結合性 L A M - 1 には反応性であるが放出 L A M - 1 には非反応性である前記単クローン性抗体を採集する工程、から構成される細胞表面結合性 L A M - 1 と反応性であるが放出 L A M - 1 とは非反応性である単クローン性抗体の分離方法。 10

【請求項 4】

請求項 3 項記載の方法によって分離された、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号 H B 1 0 8 4 4 のハイブリドーマ細胞株により産生される抗 L A M 1 - 1 単クローン性抗体以外の単クローン性抗体。

【請求項 5】

(a) 放出 L A M - 1 を含有すると見られる媒質中の細胞集団を細胞表面結合性 L A M - 1 には反応性であるが放出 L A M - 1 には非反応性である単クローン性抗体と接触させる工程、及び 20

(b) 前記抗体が結合する細胞を可視化させる工程、から構成される放出 L A M - 1 を含有すると見られる媒質中において L A M - 1 を発現させる細胞の識別方法。

【請求項 6】

前記媒質が生物学的液体であることを特徴とする請求項 5 項記載の方法。

【請求項 7】

(a) 放出 L A M - 1 を含有すると見られる媒質中の細胞集団を細胞表面結合性 L A M - 1 には反応性であるが放出 L A M - 1 には非反応性である単クローン性抗体と接触させる工程、及び 30

(b) 前記抗体が結合する細胞を分離する工程、から構成される放出 L A M - 1 を含有すると見られる媒質から L A M - 1 を発現させる細胞の分離方法。

【請求項 8】

前記媒質が生物学的液体であることを特徴とする請求項 7 項記載の方法。

【請求項 9】

(a) 画像化剤を細胞表面結合性 L A M - 1 には反応性であるが放出 L A M - 1 には非反応性である単クローン性抗体へカプラー結合させる工程、

(b) 放出 L A M - 1 を含有すると見られる媒質中の細胞集団を前記画像化剤と結合した抗体と接触させる工程、及び

(c) 前記画像化剤を検出する工程、から構成される放出 L A M - 1 を含有すると見られる媒質中において L A M - 1 を発現させる細胞の識別方法。 40

【請求項 10】

前記媒質が生物学的液体であることを特徴とする請求項 9 項記載の方法。

【請求項 11】

(a) サンプルを細胞表面結合性 L A M - 1 には結合するが放出 L A M - 1 には結合しない単クローン性抗体と接触させる工程、及び

(b) 結合した前記抗体量を測定する工程、から構成されるサンプル中の細胞表面結合性 L A M - 1 量の測定方法。

【請求項 12】

(a) サンプルを細胞表面結合性 L A M - 1 には結合するが放出 L A M - 1 には結合しな 50

い第一の単クローン性抗体と接触させる工程、

(b) 前記サンプルを放出LAM-1と結合する第二の単クローン性抗体と接触させる工程、及び

(c) 結合した前記第二の抗体量を測定する工程、から構成されるサンプル中の放出LAM-1量の測定方法。

【請求項13】

前記サンプルが生物学的液体であることを特徴とする請求項11項または12項記載の方法。

【請求項14】

細胞表面結合性LAM-1には結合するが放出LAM-1には結合しない抗体を含有するサンプル中に存在する細胞表面結合性LAM-1量あるいは放出LAM-1量の測定に用いられるキット。 10

【請求項15】

放出LAM-1の存在下でLAM-1依存性細胞の付着を阻害する薬物製剤への細胞表面結合性LAM-1と反応性で放出LAM-1と非反応性な単クローン性抗体の利用。

【請求項16】

放出LAM-1の存在下においてリンパ球の組織への移入を阻害する薬物製剤への、細胞表面結合性LAM-1とは反応性であるが放出LAM-1とは非反応性である単クローン性抗体の利用。

【請求項17】

細胞表面結合性LAM-1のEGF様領域中に存在するが放出LAM-1中には存在せず、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション寄託番号HB10844のハイブリドーマ細胞株により産生される抗LAM-1単クローン性抗体と反応性であることを特徴とする抗原決定基。 20

【請求項18】

抗体産生細胞を請求項17項記載の抗原決定基と接触させ次いで抗体を採集する工程を含むことを特徴とする、細胞表面結合性LAM-1と反応性で放出LAM-1と非反応性な抗体の生成方法。

【請求項19】

前記抗体が単クローン性抗体であることを特徴とする請求項18項記載の方法。 30

【請求項20】

細胞表面結合性LAM-1と反応性で放出LAM-1と非反応性な抗体の生産への請求項17項記載の抗原決定基の利用。

【請求項21】

前記抗体が単クローン性抗体であることを特徴とする請求項20項記載の利用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、米国特許出願第07/730503号(Tedder, 1991年7月8日出願)(これは、米国特許出願07/313109号(1989年2月21日出願、現在出願放棄))の37CFR1.62に基づく継続出願である)、米国特許出願第07/700773号(Tedder, 1991年5月15日出願)、米国特許出願第07/737092号(Tedder, 1991年7月29日出願)および米国特許出願第07/770608号(Tedder, 1991年10月3日出願)の部分継続出願である。これら全ては参照により本明細書に含まれる。 40

【0002】

発明の分野

【0003】

本発明は、ヒト白血球関連細胞表面蛋白、特に白血球粘着分子-1(LAM-1)とその検出方法に関する。

【 0 0 0 4 】

本発明の基となった研究の一部は合衆国政府の基金で行われた。したがって、合衆国政府は本発明について一定の権利を有する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 5 】

循環系を離れ、組織中に移動する白血球の能力は、免疫反応の重要な特色である。通常、浸潤白血球は、侵入有機体または死細胞もしくは損傷細胞を貪食する。しかし、病的炎症では、浸潤白血球は重篤で、時には致死的な障害を引き起こす可能性がある。白血球仲介性炎症は、成人呼吸窮迫症候群、多臓器不全および再灌流性障害を含むヒトの臨床的徴候の多くに関与している。

【 0 0 0 6 】

幾つかの異なる受容体（レセプター）粘着分子が、白血球が炎症部位の血管内皮を通過して移動し、粘着する過程に関与している（Springer, *Nature* 346:425-434 (1990)）。最初の白血球の内皮への粘着に関与する幾つかの分子の1つは、白血球粘着分子 - 1（L A M - 1, L - セレクチン）（Kishimoto ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2244-2248 (1990); Ley ら、*Blood* 77:2553-2555(1991); Spertini ら、*J. Immunol.* 147:2565-2573 (1991)）である。L A M - 1 は、粘着分子のセレクチン系の1種である（Brown ら、*J. Cell Biol.* 109:421-427 (1989); Siegelman ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:5562-5566 (1989); Tedder ら、*J. Exp. Med.*, 170:123-133 (1989)）。セレクチン系は、マウス L - セレクチン、M E L - 1 4（Gallatin ら、*Nature*, 304:30-34 (1983); Laskey ら、*Cell*, 56:1045-1055 (1989); Siegelman ら、*Science* 243:1165-1172 (1989)）、内皮 - 白血球粘着分子 - 1（E L A M - 1、E - セレクチン）（Bevilacqua ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:9238-9243 (1987); Bevilacqua ら、*Science* 243:1160-1164 (1989); Lusinskas ら、*J. Immunol.* 142:2257 (1989); Lusinskas ら、*J. Immunol.* 146:1617-1625 (1991)）および C D 6 2（P A D G E M、G M P - 1 4 0）（Geng ら、*Nature*, 343:757-760 (1990); Johnston ら、*Cell*, 56:1033-1044 (1989); Larsen ら、*Cell*, 59:305-312 (1989); Larsen ら、*Cell*, 63:467-474 (1990)）を含む。全てのセレクチンは、進化において

関連する遺伝子に由来する（Collins ら、*J. Biol. Chem.*, 266:2466-2478 (1991); Johnston ら、*J. Biol. Chem.*, 34:21381-21385 (1990); Ord ら、*J. Biol. Chem.*, 265:7760-7767 (1990); Watson ら、*J. Exp. Med.*, 172:263-272 (1990)）、N H₂ - 末端、C a⁺ - 依存レクチンドメイン、多数の短コンセンサスリピート（S C R）ドメインを伴う表皮性成長因子（E G F）様ドメイン、トランスメンブレン領域および細胞質性尾部という特徴を有する。

【 0 0 0 7 】

L A M - 1 は、リンパ球、好中球、単球、好酸球、原始造血細胞および未成熟胸腺細胞を含む殆どのリンパ球表面に発現されている（Griffin ら、*J. Immunol.* 145:576-584 (1990); Tedder ら、*J. Immunol.* 144:532-540 (1990)）。L A M - 1 は、高度に糖付加された好中球では 9 5 - 1 0 5 0 0 0 M_r、リンパ球では 7 4 0 0 0 M_r の蛋白である（Griffin ら、*J. Immunol.* 145:576-584(1990); Tedder ら、*Eur. J. Immunol.*, 20:1351-1355 (1990)）。ヒト L A M - 1 およびマウス M E L - 1 4 は、構造的に発現されたりガンドとの反応を介して、抹消リンパ節の高内皮性小静脈（H E V）へのリンパ球の結合を仲介し（Imai ら、*J. Cell Biol.* 113:1213-1221 (1991); Kishimoto ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2244-2248 (1990); Spertini ら、*Leukemia*, 5:300-308(1991); Stamper Jr. ら、*J. Exp. Med.*, 144:828-833 (1976); Tedder ら、*J. Immunol.* 144:532-540(1990)）、さらに炎症部位へのリンパ球、好中球および単球の付着に必要である（Hallmann ら、*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174:236-243 (1991); Jutila ら、*J. Immunol.* 143:3318-3324 (1989); Lewinsohn ら、*J. Immunol.* 138:4313-4321 (1987); Smith ら、*J. Clin. Invest.*, 87:609-618 (1991); Spertini ら、*J. Immunol.*, 147:2565-2573 (1991); Watson ら、*Nature*, 349:164-167 (1991)）。インビトロでは、L A M - 1 リガンドの内皮細胞表面

10

20

30

40

50

発現は、炎症性サイトカインに細胞を曝した後でのみ誘発され、内皮性リガンドは、H E Vによって発現されるL A M - 1リガンドと多くの共通の特徴を有する (Smithら、J. Clin. invest., 87:609-618 (1991); Spertiniら、J. Immunol. 147:2565-2573(1991))。炭水化物硫酸塩およびL A M - 1のレクチンドメインに結合するm A bは、L A M - 1特異的粘着を抑制する (Imaiら、J. Cell Biol. 113:1213-1221 (1991); Kansasら、J. Cell Biol. 114:351-358 (1991); Spertiniら、J. Immunol. 147:2565-2573 (1991); Stoolmanら、Blood 70:1842-1850 (1987); Yednockら、J. Cell Biol. 104:725-731 (1987); Yednockら、J. Cell Biol. 104:713-723 (1987))。L A M - 1のレクチンドメインは、特異性を決定するためのリガンド結合単位として作用するようであり、一方、E G F様ドメインおよびS C Rドメインはこの反応の親和性を調節しているらしい (Kansasら、J. Cell Biol. 114:351-358 (1991); Siegelmanら、Cell, 61:611-622 (1990); Spertiniら、J. Immunol. 147:942-949(1991); Watsonら、J. Cell Biol. 115:235 (1991))。

10

【0008】

病的炎症を起こしている患者を粘着レセプター機能に対する拮抗剤で処置すると、標的細胞が処理できる程度にまで白血球の移動を減少させ、その後の患者の劇的な回復をもたらすことができるということが提唱された。治療剤の局所投与は、白血球と炎症領域に近い内皮との間の粘着反応を競合的に阻害することができる。また治療剤は、播種性炎症をおこしている患者の治療に全身レベルで投与することもできる (Harlan & Liu編、粘着：炎症性疾患におけるその役割 (Adhesion: Its Role in Inflammatory Disease)、W. H. Freeman(印刷中))。

20

【0009】

L - セレクチン固有の特徴は、ヒトL A M - 1およびマウスM E L - 14は、インビトロで細胞を活性化させた後、細胞表面から放出されるということである (Griffinら、J. Immunol. 145:576-584 (1990); Jungら、J. Immunol. 144:3130-3136 (1990); Kishimotoら、Science 245:1238-1241 (1989); Kishimotoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2244-2248 (1990); Spertiniら、Leukemia, 5:300-308 (1991))。マウスについては、白血球からのM E L - 14の放出は、インビボで白血球が内皮を通り抜けて炎症部位へ移動することを可能にするために必要かもしれないと言われている (Jutilaら、J. Immunol. 143:3318-3324 (1989); Kishimotoら、Science 245:1238-1241 (1989))。これは、白血球粘着調節および内皮の脱粘着のための迅速な手段を提供するであろう。放出されたL A M - 1 (s - L A M - 1)分子のその後の運命と可能性のある機能は不明であるが、ラットの胸部リンパ管に存在する、H E Vへのリンパ球結合を抑制することができる可溶性因子の存在が明らかにされた (Chinら、J. Immunol. 125:1764-1769 (1980))。さらに、この因子は、リンパ球上に存在する構造物と抗原的に関連することが示された (Chinら、J. Immunol. 125:1764-1769 (1980); Chinら、J. Immunol. 131:1368-1374 (1983))。

30

【0010】

種々の細胞上に存在する多数の表面分子が放出され、それによって細胞外環境に遊離されることが知られている (Tedderら、Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 5:305-306 (1991))。これらには、成長因子レセプター、並びにインターロイキン - 1、インターロイキン - 2 (C D 2 5)、トランスフェリン (C D 7 2)、インシュリン、成長ホルモン、腫瘍壊死因子 (Porteuら、J. Exp. Med., 172:599-607 (1990))、コロニー刺激因子 - 1 (Downingら、Mol. Cell. Biol. 9:2890-2896 (1989)) および神経成長因子 (DiStefanoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:270-274 (1988))のためのレセプターが、C D 8およびC D 1 4同様含まれる。これらの蛋白は、構造およびアミノ酸配列が極めて多様で、現在理解されている機能的特徴について統一性をもたない。殆どの場合、プロテアーゼは膜の近くでレセプターを切断し、ほぼ無傷の細胞外ドメインを遊離させる (DiStefanoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:270-274 (1988); Downingら、Mol. Cell Biol., 9:2890-2896 (1989); Kishimotoら、Science 245:1238-1241(1989); Spertiniら、Leukemia, 5:300-308 (1991))。

40

【0011】

50

放出レセプターの多くはリガンド結合能を保持しているが、放出レセプターの明確な機能は解明されていない。したがって、レセプター機能は、細胞表面からレセプターの蛋白分解切断によるだけでなく、細胞外環境中の放出レセプターによってもまた調節される。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

しかしながら、LAM-1の放出形がリガンド結合能を保持している場合、それが存在する結果、LAM-1機能の拮抗剤の診断または治療的投与が干渉される可能性がある。レセプターの放出形は、大量に存在する場合、いずれの投与LAM-1拮抗剤とも競合的に結合する可能性があり、したがって、診断の成果または治療的養生プログラムの妨げとなる。

10

【0013】

発明の要旨

【0014】

リンパ球および好中球の両方から放出される白血球粘着分子-1 (sLAM-1) は、ヒトの血漿中に高水準で存在することが明らかにされたことを報告する。ウェスタンブロット分析および特別に開発した定量的酵素結合免疫吸着検定またはELISAの2種の方法を用いた。血漿由来の準精製sLAM-1は、サイトカイン活性化内皮へのリンパ球のLAM-1特異的結合を用量依存態様で抑制した。LAM-1依存リンパ球結合の完全な抑制は、8から15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のsLAM-1濃度で達成され、一方生理的濃度のsLAM-1は、弱いがしかし一定したリンパ球結合抑制を生じた。血漿中のsLAM-1はまた、殆どの抗LAM-1 mAb (2から5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の白血球表面への結合を抑制した。しかしながら、LAM-1のEGF様ドメイン内に存在する1つのエピトープはsLAM-1では消失し、放出後のレセプターの構造に形態的な変化が生じることを示唆した。

20

【0015】

sLAM-1の生理的濃度でさえもレセプターの放出形によってLAM-1依存リンパ球結合が抑制されるということ、さらに殆どの抗LAM-1 mAbの結合が抑制されるということは、LAM-1機能に対する拮抗剤の全身投与を必要とする治療計画、または診断技術について相当な問題を提起するであろう。sLAM-1の存在によって、そのような薬剤は有効であるためには過剰量を投与されなければならないであろう。しかしながら、LAM-1分子のEGF様ドメインとその放出形との間でエピトープに相違があるという出願人らの発見は、当該分子の放出形と結合することなく、細胞表面結合レセプターLAM-1と反応する診断および治療薬剤の開発を可能にした。

30

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明の1つの特徴は、一般に、LAM-1と反応するが放出形LAM-1とは反応しない単クローン性抗体、および該抗体を分離する方法である。

好ましくは、該抗体は、単クローン性抗体、抗LAM-1としてLAM-1に対して同じ反応パターンを有し、最も好ましくは、該抗体は、抗LAM-1単クローン性抗体である。本発明はまた、該選択的抗体を診断および治療に応用するために使用する方法を特徴とする。

40

【0017】

本発明のまた別の特徴は、サンプル中のLAM-1またはそのフラグメント量を定量する方法であり、該方法は、結合検定において結合剤またはLAM-1もしくはそのフラグメントに対するリガンドと該サンプルとを反応させ、さらに標準曲線と該結合検定の結果を比較することを含む。好ましくは、検出されるべきLAM-1のフラグメントは放出LAM-1であり；検定されるべきサンプルは生物学的サンプルで、最も好ましくは該サンプルは患者由来で、結合検定で決定されるLAM-1またはフラグメントの量は、診断

50

用数値として用いることができ、該結合検定はE L I S Aまたはウェスタンブロットのいずれかで、該結合剤はL A M - 1抗体である。

【0018】

本発明のまた別の特徴は、サンプル中のL A M - 1またはそのフラグメントの量を定量するために使用するキットである。該キットは、サンプルの抽出に必要な成分、結合検定に使用するために必要な成分を含む。後者はL A M - 1もしくはそのフラグメントに対する結合剤またはリガンドを含む。

【0019】

本発明の他の特徴および利点は、以下の好ましい具体例および請求の範囲から明白となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

まず第一に、s L A M - 1 - E L I S Aの開発は容易で、有効でかつ鋭敏なs L A M - 1の定量方法を可能にした。血漿中並びに活性化好中球およびリンパ球上清液のs L A M - 1の直接検出によって、インビゴおよびインビトロにおけるL A M - 1白血球表面発現の損失は放出によるものであることが確認された。放出の程度は強く、正常で健全な血液供与者集団では、s L A M - 1の平均血清レベルは、 $1.6 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$ と決定された。

【0021】

L A M - 1の放出形は、細胞結合形とは主要な事項において異なることが分かった。s L A M - 1は、抗L A M - 1 m A bによって識別されるL A M - 1のE G F様ドメイン内にエピトープを含まないが、一方、このエピトープは容易に細胞表面L A M - 1で認められる(Kansasら、*J. Cell Biol.* 114:351-358 (1991); Spertiniら、*J. Immunol.* 147:942-949 (1991); Tedderら、*J. Immunol.* 144:532-540 (1990))。これは、E L I S A分析および白血球の免疫蛍光染色における競合抑制の欠如の両方で明らかにされた。E G F様ドメインはs L A M - 1に保持されているので、抗L A M - 1 m A b結合の欠如をもたらす、L A M - 1の三次元構造における変化は放出に続いて生じるということはありそうなのである。L A M - 1エピトープは、可溶性L A M - 1 - I g G融合蛋白上に存在することが容易に示されたので、この反応性の消失は、技術的な問題とは思えない。

【0022】

s L A M - 1の検出と性状決定

【0023】

血清中のs L A M - 1は、リンパ球および好中球の両方に由来するようである。なぜならば、好中球から分離されたs L A M - 1 ($95 - 105000 M_r$)の分析およびリンパ球から分離されたs L A M - 1 ($74000 M_r$)の分析によって、対応する M_r のバンドが得られたからである。L A M - 1 m R N Aの単一種が同定されているだけなので(Ordら、*J. Biol. Chem.*, 265:7760-7767 (1990))、リンパ球s L A M - 1と好中球s L A M - 1との間の M_r の相違は、単一蛋白種の糖付加における相違に起因するということが最も可能性が高い。s L A M - 1を生じるL A M - 1の切断は、おそらくエクソンV I I Iでコードされるトランスメンブレン領域の基部であろう(Ordら、上掲書)。この領域における切断は、無傷の細胞性L A M - 1分子とその放出形との間の M_r の相違が小さいことの説明となるだろう(Kishimotoら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87:2244-2248 (1990); Laskeyら、*Cell*, 56:1045-1055 (1989); Spertiniら、*Leukemia*, 5:300-308 (1991))。s L A M - 1の濃度は、2種類の別個の手段によって標準化した、 0.85 から $1.9 \mu\text{g/ml}$ の間の範囲にある参考血漿サンプルと比較して決定した。値が $1.3 \mu\text{g/ml}$ の範囲の平均値は、血漿中に存在するs L A M - 1の実際の値より控えめな概数を表しているはずで、したがって、今後の全ての計算の基礎として選ばれた。K 5 6 2 - L A M - 1核酸感染体(トランスフェクタント)での放出実験から得られた実験データに基づく理論的考察によって、この概算の有効性はさらに確認される。各K 5 6 2 - L A M細胞に30から40000 L A M - 1分子が存在し、さらに、全ての分子($MW 7$

10

20

30

40

50

1000) が PMA 活性化に続いて放出されると仮定して、sLAM の血漿中の濃度は、K562 トランスフェクタント (1×10^7 細胞/ml) から放出される sLAM-1 の濃度 (標準血漿濃度の 1.7%) を標準血漿の定量曲線と比較することによって算出できる。この計算にしたがえば、血漿濃度は、2.1 から 2.8 $\mu\text{g/ml}$ の範囲に存在するであろう。同様な考えから、血清または血漿で見出される sLAM-1 量は、サンプル調製中に存在する血液白血球によって細胞表面 LAM-1 が放出されて出現したということは殆ど有り得ない。

【0024】

実際に血清中に見出される sLAM-1 の量は、サンプル中に存在する白血球 ($\sim 4 \times 10^6$ /ml) の細胞表面から最大限に放出される LAM-1 量 (その密度が 50 から 100000 レセプター/細胞と仮定して) より 10 から 25 倍多い。したがって、sLAM-1 は、インピボで白血球から細胞表面 LAM-1 の放出が進行することによって生じたにちがいない。

【0025】

血漿から準精製された sLAM-1 は、用量依存態様で、TNF 活性化内皮への LAM-1 仲介性リンパ球結合を抑制し、 ~ 8 から 15 $\mu\text{g/ml}$ で完全に抑制した。正常な血液供与者の血漿中に見出されるものと同じような sLAM-1 の濃度では、低いながらも明瞭な白血球内皮結合の抑制が認められた。循環 sLAM-1 は、おそらくインピボで機能するであろう。なぜならば、抗 LAM-1 mAb による組織免疫化学染色によって、内皮細胞 (HEV 内皮上および炎症部位の両方に) の管腔表面に特異的に結合した sLAM-1 が明らかにされたからである。

【0026】

ウェスタンブロット分析による検出

【0027】

インピボでは、白血球および LAM-1 cDNA 核酸感染 (トランスフェクト) 細胞は、細胞表面から培養上清液で検出できる LAM-1 を放出する。この過程がインピボでも起こるか否かを決定するために、抗 LAM1-3 mAb (これはレクチンドメイン内のエピトープを識別する) を用いて、正常ヒト血漿から反応性物質を免疫沈降させた。沈澱した物質を続いて SDS-PAGE で分析し、ニトロセルロースに移し、SCR 領域内に位置する LAM-1 エピトープと結合する抗 LAM1-14 mAb を用いたウェスタンブロット分析によって、LAM-1 の可溶性の存在を可視化した。sLAM-1 の 2 種の主な sLAM-1 の同位形 (アイソフォーム) が認められたが、それらは $\sim 62000 \text{Mr}$ アイソフォームと $75-100000 \text{Mr}$ アイソフォームである。PMA 刺激リンパ球、好中球および LAM-1 cDNA でトランスフェクトした K562 細胞 (K562-LAM) の培養上清液の分析によって、sLAM-1 の異なる、細胞特異的アイソフォームが明らかになった。好中球は sLAM-1 の $75-100000 \text{Mr}$ アイソフォームを放出し、これは、おそらく顕著な糖付加によるものと思われるが、上部境界が不明瞭な幅の広いバンドとして移動する (Ord ら、J. Biol. Chem., 265:7760-7767 (1990))。リンパ球は 62000Mr アイソフォームを産生し、K562-LAM 細胞は sLAM-1 の 710001Mr アイソフォームを放出する。上記の分析を用いたとき、非トランスフェクト K562 細胞の上清液からは特異的蛋白は分離されなかった。さらに、血漿または上清液の抗 LAM1-3 mAb による予備除去によって、その後のウェスタンブロットの結果の可能性は排除された。したがって、血漿で確認された 2 種の主要な sLAM-1 同位形は、リンパ球および好中球の両方におそらく由来するであろう。さらに、レクチン (抗 LAM1-3) および SCR (抗 LAM1-14) ドメインと反応する mAb を用いた実験で可視化されたように、血清中の sLAM-1 はレクチン、EGF および SCR ドメインを含んでいた。しかし、先に記載されたように、sLAM-1 の Mr は、洗剤可溶化細胞から分離した LAM-1 のそれより小さい (Lasky ら、Cell, 56:1045-1055 (1989); Spertini ら、Leukemia, 5:300-308 (1991))。

【0028】

E L I S A による血漿と血清中の s L A M - 1 の定量

【 0 0 2 9 】

ヒト血漿中に見出される s L A M - 1 の量を、捕捉抗体として抗 L A M 1 - 5 m A b を、検出抗体としてビオチン化抗 L A M 1 - 3 m A b を用いて、サンドイッチ E L I S A で定量した。この m A b の特別な組み合わせは最高水準の感度を提供し、それによって ~ 5 n g の s L A M - 1 が容易に検出できた。健常で正常な血液供与者集団の血清中の E L I S A 測定 s L A M - 1 レベルは、 1.6 ± 0.8 $1.0 \mu\text{g} / \text{ml}$ ($n = 63$) であることが分かった。幾人かの供与者では、血漿中の s L A M - 1 レベルも同時に定量され、同様な結果が得られた ($1.9 \pm 1.0 \mu\text{g} / \text{ml}$, $n = 18$)。超遠心の前後で血清または血漿中で同じレベルの s L A M が見出されるので、血漿中または血清中の s L A M - 1 がなお膜に結合するという可能性は排除された。s L A M - 1 は、血清または血漿の分離前に少なくとも 24 時間まで 20 で放置された全血中で安定であった。4 でアザイドの存在下で血清もしくは血漿の 3 か月までの保存、または凍結融解の繰り返し (10 回まで) では、血清中の s L A M - 1 の検出能に影響は無かった。したがって、s L A M - 1 はヒト血漿および血清中に比較的高いレベルで存在するようである。

10

【 0 0 3 0 】

活性化白血球上清中の s L A M - 1 の定量

【 0 0 3 1 】

白血球の刺激または培養は細胞表面からの L A M - 1 の放出と関係があった。s L A M - 1 が蓄積するか否かを決定するために実施した実験では、p L A M - 1 c D N A をトランスフェクトした赤白血病細胞株 (K 5 6 2 - L A M) から得た培養上清液は、同じ密度に培養したトランスフェクトされていない細胞から得た上清液とは対照的に、検出可能な s L A M - 1 を含むことが分かった。同様に、新しく分離して 37 で 60 分培養した好中球の培養液も検出可能な s L A M - 1 を含んでいた。細胞表面の L A M - 1 発現に影響を与えない刺激、顆粒球コロニー刺激因子、インターロイキン 1、単球コロニー刺激因子、インターロイキン 6、インターフェロン、およびインターロイキン 4 は s L A M - 1 の増加を誘発しなかった。しかしながら、ホルミル化メチオニン - ロイシン - フェニルアラニン、リポポリサッカライド、顆粒球 / 単球コロニー刺激因子、インターロイキン 8 および T N F は、それらの細胞表面発現刺激能に対応して L A M - 1 放出を誘発した。37 で 60 分培養したリンパ球は、ある程度の L A M - 1 の放出を引き起こしたが、これは P M A 処理によって強力に増強された。好中球およびリンパ球の (1×10^7 細胞 / ml) の活性化に続いて上清液に見出される s L A M - 1 量の定量では、約 10 から 30 n g / ml の間を変動した。しかしながら、25 分以上のリンパ球の P M A 活性化および 10 分以上の活性化は、s L A M - 1 を徐々に分解した。分解は K 5 6 2 - L A M 細胞の上清では認められなかったが、ここでは s L A M は 22 ± 6 n g / ml ($1.7 \pm$ 標準血漿の 0.5%、 $n = 14$) の濃度で定常的に見出された。また、フィットヘマグルチニン、コンカナバリン A、およびアメリカヤマゴボウ由来有糸分裂促進剤で 3 から 6 日 37 で培養したリンパ球の培養上清では、増加レベルの s L A M - 1 が検出された。これらの有糸分裂促進剤は細胞表面の L A M - 1 低下を引き起こすことが知られている (Tedderら、J. Immunol. 144:532-540(1990))。したがって、細胞表面からの L A M - 1 の低下は、培養液中の s L A M - 1 の増加に正比例する。

20

30

40

【 0 0 3 2 】

s L A M - 1 による活性化内皮へのリンパ球結合の抑制

【 0 0 3 3 】

s L A M - 1 を、塩分画の後抗 L A M 1 - 3 m A b で記載したように血漿から準精製した。カラム溶出液を濃縮し、存在する s L A M - 1 レベルを E L I S A で定量し、~ 15 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (全溶出蛋白の 6 から 10%) に調整した。L A M - 1 を介した内皮へのリンパ球結合を調べる前に、R P M I 1640 / 10% F C S 中で種々の濃度で s L A M - 1 をサイトカイン活性化内皮細胞とともに保温 (15 分、4) した。生理的濃度の s L A M - 1 はリンパ球結合の部分的抑制 ($32.1 \pm 15.9\%$, $n = 10$) を示しただけ

50

で、一方、 $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では殆どのLAM-1依存リンパ球結合を抑制(52から100%)し、12から $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ ではLAM-1仲介結合はほぼ完全に抑制(93から100%)することが分かった。LAM-1仲介リンパ球結合は、与えられたsLAM-1の濃度における完全な結合と、LAM-1仲介粘着を完全に阻害する抗LAM1-3mAbの存在化で見出されるリンパ球結合との間の相違として算出した(Spertiniら、*J. Immunol.* 147:2565-2573 (1991))。重要なことには、 $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ のsLAM-1は、抗LAM1-3mAb単独で得られたものを越えるリンパ球結合抑制は引き起こさなかった。sLAM-1サンプルを検定前に抗LAM1-15mAb(これはLAM-1機能を阻害しない)で予備除去を行ったとき、この調製物は、sLAM-1が該抑制を仲介することを示すリンパ球結合を抑制することはできなかった。したがって、sLAM-1は、その仮説内皮リガンドと結合することによって、内皮へのLAM-1特異的リンパ球結合を抑制することができるように思える。

10

【0034】

正常な生理的濃度($1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)でのsLAM-1の抑制能をさらに調べ、リンパ球と内皮との相互反応を変化させることができるか否かを決定した。内皮をTNF($100 \text{U}/\text{ml}$)で種々の時間活性化し、炎症反応の開始時に起こりえるものと同様な態様でLAM-1リガンドを誘発した。LAM-1リガンドの誘発過程で、内皮のsLAM-1処理は、一定であるがしかし弱いLAM-1依存リンパ球結合の抑制を引き起こした(2時間で30%、3時間で43%、4時間で41%、5時間で15%、および6時間で22%)。繰り返せば、sLAM-1と抗LAM1-3mAbとの組み合わせは、mAb単独で認められたもの以上の抑制をもたらさなかった。したがって、炎症反応の進展時には、sLAM-1は白血球結合過程を変化させることができるが、その影響は、このインビトロ検定では小さいように思える。

20

【0035】

血清sLAM-1は抗LAM-1mAbの結合を阻害する

【0036】

循環sLAM-1の存在は、さらに、抗LAM-1mAbとLAM-1⁺細胞との反応性が血漿によって抑制することができることを示すことによって実証された。リンパ球を未希釈ヒト血漿中で抗LAM-1mAbを用いて染色したとき、RPMI/FCS中で飽和状態のmAbの濃度では顕著な染色は得られなかった。次に、リンパ球($1 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$)を、自家血漿または免疫沈降によって予備除去した自家血漿で希釈(1:100)した種々の濃度のLAM-1に対するmAbとともに保温した。間接免疫蛍光染色が完了した後、フローサイトメトリーで抗体結合を測定した。殆どの場合、血漿の存在によって、mAbを2から $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で用いたとき、抗LAM-1mAb染色は抑制された。したがって、 ~ 13 から 33pM IgG1 (MW150000)が、上記に該略したようにして求めた血漿中に存在するsLAM濃度($1.6 \mu\text{g}/\text{ml}$)に基づき、 $\sim 21 \text{pM sLAM-1}$ (MW75000)に結合した。mAb結合のsLAM依存抑制は、レクチンドメイン(抗LAM1-3、-4、および-10)およびEGF様ドメイン(抗LAM1-5、および-15)を認識するmAbについて血漿中で認められた。対照的に、抗LAM1-1mAb(これはEGF様ドメインのエピトープに結合する)の結合は、血漿の存在によって顕著には抑制されなかった。

30

40

【0037】

LAM1-1エピトープはヒト血漿のsLAM-1で検出されなかった

【0038】

リンパ球への抗LAM-1mAb結合が血漿によって抑制されなかったので、このmAbによって認識されるエピトープはsLAM-1には存在しないかもしれない。これをさらに調べるために、ELISAを実施した。この場合、異なるLAM-1に対するmAbが捕捉抗体として、検出抗体としての抗LAM1-3mAbとともにELISAプレートに結合させた。レクチンドメイン特異的抗体(抗LAM1-6、-7、-10および-11)およびEGFドメイン特異的mAb(抗LAM1-5および-15)は、強力に容

50

易に検出できる陽性シグナルを生じた。抗LAM1-3mAbおよび-4mAb（これらは互いに検出抗体（抗LAM1-3mAb）を阻害する）で被覆した凹み（ウェル）は、バックグラウンド反応のための内部コントロールとして供した。他の全てのmAbと対照的に、抗LAM1-1は、捕捉試薬としてBSAを用いて明らかにしたように、バックグラウンドと顕著には異なるシグナルを生じた。したがって、抗LAM1-1mAbによって特異的に認識されるEGF領域内に位置するエピトープは、放出後LAM-1から失われるように思われる。LAM-1は、免疫蛍光染色で全てのLAM-1特異的mAbによって容易に認識され、さらに、3種の全ての細胞外ドメインが血漿中に見出されるsLAM上に保存されているので、該sLAM-1蛋白の構造変化はEGFドメイン関連LAM1-1エピトープの損失をもたらすかもしれない。

10

【0039】

LAM-1のトランスメンブレン領域または細胞質領域がその細胞外ドメインの完全な三次元構造を支えるために必要であるか否かを決定するために、可溶性LAM-1の第二の形態、LAM-IgG融合蛋白をつくり、ELISAでエピトープの配列地図を作製した。融合蛋白を作製するために用いるキメラcDNAは、それが実質的に完全なLAM-1の細胞外領域を含むように構築した。一時的にキメラcDNAをトランスフェクトしたCOS細胞の培養上清液を、ELISAによってLAM-IgGの産生について調べた。抗LAM1-5、-7および-15mAb（これらは、血漿およびPMA刺激K652-LAM細胞の上清液中のsLAM-1を検出する）もまた同じ程度にLAM-IgGキメラに結合した。対照的に、抗LAM1-1mAbは、血漿およびK562-LAMトランスフェクタントのsLAM-1と顕著な反応を生じなかったが、一方、それは容易にLAM-IgG融合蛋白と結合した。したがって、インビボまたはインビトロで産生されたsLAM-1は、抗LAM1-1mAb結合に要求される構造決定基を失っているという可能性が高い。

20

【0040】

ヒト炎症組織におけるLAM-1の発現

【0041】

おそらくsLAM-1は、白血球が活性化されおよび/または内皮を通過するとき、インビボで産生される。種々の組織から分離された白血球は殆どLAM-1を発現しないということが観察されたが（Tedderら、J. Immunol.144:532-540（1990））、これは、該細胞が内皮を通過するときまたは組織に局在するときにLAM-1を放出すると考えられる。しかしながら、組織免疫化学的分析によって明らかにされたように、細胞表面LAM-1の存在は、血管内の白血球に厳格には限定されなかった。LAM-1陽性の血管外白血球が調べられた全ての組織において認められ、これらは（それが存在する場合は）、リンパ球、好中球および単球を含む。血管外遊出の過程は全細胞からの細胞表面LAM-1の完全な喪失をもたらすわけではない。なぜならば内皮細胞を通り抜けるらしいリンパ球がLAM-1⁺のままであり、さらに幾つかの遊走単球もまたLAM-1⁺と思えるからである。一般に、組織内に局在する単球/大食細胞（マクロファージ）および顆粒球は主にLAM-1陰性であったが、幾つかの血管外遊出好中球およびマクロファージはLAM-1⁺であった。非常に大切なことには、小静脈内皮細胞の病巣染色が、4例の過形成リンパ節のうち2例で、3例の類肉腫リンパ節のうち2例で、4例の類リウマチ滑液のうち1例で、3例の炎症皮膚標本のうち1例で、さらに4例の虫垂炎のうち2例で観察された。この内皮染色は、sLAM-1は内皮の先端表面にあるそのリガンドと結合することができるという考えと一致する。

30

40

【0042】

実験手順

【0043】

抗体

【0044】

LAM-1に対するmAbは、レクチンドメイン内のエピトープに対する抗LAM1

50

- 3、 - 4、 - 6、 - 7、 - 8、 - 10、 および - 12 mAb、 EGF様ドメイン内のエピトープと反応する抗LAM1-1、 - 5および - 15、 並びにLAM-1のSCR領域と反応する抗LAM1-14 mAbで、 すべてのIgG₁アイソタイプである (Spertiniら、 J. Immunol. 147:942-949 (1991))。 抗LAM-1 mAbは、 塩分画とそれに続く陰イオン交換クロマトグラフィーで精製され、 mAb濃度は光吸収で求めた。 抗LAM1-3 mAbは、 製造元の方法を用いて、 ビーズ1 mlにつき2.5 mgのmAbでCNBr活性化セファローズ4B (ファルマシア LKB バイオテクノロジー、 ピスカタウェー、 NY) (抗LAM-セファローズ) に結合させた。

【0045】

血液単球の分離

10

【0046】

ダナハーバー癌研究所 (Dana-Farber Cancer Institute、 ボストン、 マサチューセッツ) の患者保護委員会 (Human Protection Committee) によって承認されたプロトコルにしたがってヘパリン加血を得た。 単核球をフィコールハイパーク (Ficoll Hypaque) 密度勾配遠心で分離した。 直ちに細胞を10% FCS含有RPMI 1640 (Gibco-BRL、 ゲーザスバーグ、 メリーランド) に懸濁し、 使用まで4 で保存した。 ほとんどの例で、 これらの細胞は、 形態 (ライト染色) およびフローサイトメトリーで決定したとき、 細胞集団の85から95%がリンパ球であったのでリンパ球と呼ぶ。 好中球は、 モノ-ポリ分離培地 (Mono-poly Resolving Medium) (Flow Laboratories、 マクリーン、 バージニア) のクッションで遠心し、 続いて赤血球を氷冷高張0.2% (w/v) NaCl溶液で溶解して精製した。 顆粒球は、 最終的には5% FCS含有HBS (シグマ、 セントルイス、 ミズーリー) に懸濁した。 sLAMをウェスタンブロット分析のために調製したとき、 単核球を先ず37 で30分、 RPMI/10% FCS中でプラスチック皿で保温し、 粘着単球を除去した。 非粘着性細胞は表面LAM-1を有し、 主にリンパ球であった (~99%)

20

【0047】

細胞培養

【0048】

24ウェルの培養皿 (プレート) (Costar Corp.、 ケンブリッジ、 メリーランド) で、 10% FCS、 2% L-グルタミン、 ペニシリン、 およびストレプトマイシンを含むRPMI 1640培養液で 10^6 / mlでリンパ球を培養した。 培養液を採集する前に、 細胞をPMA (100 ng/ml) で60分培養し、 ELISAでsLAM-1について検査した。 好中球は、 HBS/5% FCS培養液単独、 または顆粒球/単球コロニー刺激因子 (25 ng/ml; スティーブン・クラーク博士およびゴードン・ワン博士 (Genetics Institute、 ケンブリッジ、 マサチューセッツ) により提供)、 単球コロニー刺激因子 (100 ng/ml; genetics Institute)、 腫瘍壊死因子-a (TNF- α ; 100 U/ml; Genzyme Corp.、 ケンブリッジ、 マサチューセッツ)、 リポポリサッカライド (1 μ g/ml; 大腸菌011:B4; シグマ)、 ホルミル-メチオニル-ロイシル-フェニルアラニン (10⁻⁸ M; シグマ)、 インターフェロン- γ (1000 U/ml; Genzyme Corp.、 ケンブリッジ、 マサチューセッツ) またはインターロイキン-1 (10 U/ml; Genzyme Corp.、 ケンブリッジ、 マサチューセッツ) を含有するHBS/5% FCS培養液のいずれかで培養した。 培養後、 上清をELISAでsLAM-1の存在について調べた。 ヒト赤白血球症細胞株K562を、 先に報告されたようにpLAM-1 cDNAでトランスフェクトし (Twdderら、 J. Immunol. 144:532-540 (1990))、 一貫してK562-LAMと呼んだ。 これらの細胞をRPMI 1640/10% FCSで培養し、 細胞数を0.2から 1×10^6 細胞/mlの間で維持した。 全ての細胞は5% CO₂、 湿度100%、 37 で培養した。

30

40

【0049】

間接免疫蛍光分析

【0050】

50

間接免疫蛍光分析は、細胞を3回洗浄した後実施した。細胞 (1×10^6 細胞) を、種々の濃度の表示 mAb を含む $100 \mu\text{l}$ の培養液に浮遊させ、4 で60分保温した。洗浄後、細胞を FITC 結合ヤギ抗マウス Ig 抗体 (Southern Biotechnology Associates、パーミンガム、アラバマ) で20分4 で処理した。細胞を洗浄して固定 (PBS 中の1%パラホルムアルデヒド) し、フローサイトメトリー (PROFILETM、Coulter Immunology、ハイアレ、フロリダ) で単一の蛍光色を決定した。各サンプルにつき1万個の細胞を調べ、陽性染色細胞のピークチャンネル数を直線スケールを用いて求めた。

【0051】

幾つかの実験では、ヒト血漿の存在下で染色した。sLAM は、同じ血漿の部分標本から抗LAM - セファローズ (血漿 4 ml につき 1 ml のビーズ) による免疫沈降によって予備除去した。免疫沈降の効率は ELISA で調べた ($< 20 \text{ ng/ml}$)。リンパ球 (1×10^6) を $100 \mu\text{l}$ の血漿または表示したような種々の濃度の精製 mAb を含む (1:100で添加) 予備除去血漿のいずれかに浮遊させた。細胞を2回洗浄し、染色して上記のように分析した。

【0052】

内皮白血球結合分析

【0053】

非休止条件下でサイトカイン活性化内皮へのリンパ球粘着を、凍結組織切片についてのスタンパー/ウッドラフ (Stamper/Woodruff) 検定を記載された通り正確に応用した検査系で調べた (Stamper Jr. ら、J. Exp. Med., 144:828-833 (1976))。該略すれば、記載のように (Spertini ら、J. Immunol. 147:2565-2573 (1991))、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を臍帯静脈から分離し、10% FCS、内皮細胞増殖因子 ($50 \mu\text{g/ml}$ 、Biomedical Technologies, Inc.、ストートン、マサチューセツ) およびブタ腸由来ヘパリン (50 mg/ml ; シグマ) 補充 M199 培養液で増殖させた。内皮細胞をゼラチン (0.1%) 被覆ガラススライド上に隙間無く増殖させ、TNF- (100 U/ml) で表示された時間37 で刺激した。一層の細胞を注意深く洗浄し、 $75 \mu\text{l}$ の RPMI / 10% FCS 単独または準精製 sLAM - 1 含有 RPMI / 10% FCS で15分4 で保温した。コントロールとして、幾つかの事例においては、準精製 sLAM - 1 含有培養液を抗LAM - セファローズで免疫沈降によって予備除去した。さらに洗浄することなく、 $75 \mu\text{l}$ のそれぞれの培養液中の 5×10^6 リンパ球を添加した。64 rpm で回転させながら、4 で20分保温した後、スライドを洗浄し、続いてグルタルアルデヒド (PBS 中で1% (v/v); ポリサイエンス、ウォーリントン、ペンシルバニア) で一晚固定し、ヘマトキシリンで染色した。粘着リンパ球の数を顕微鏡の6視野を (0.09 mm^2 / 視野) 計測することによって求め、結果は平均値 \pm SD として表した。

【0054】

組織免疫化学

【0055】

新鮮ヒト組織塊を急速凍結した。標本は抹消リンパ節 (非特異的過形成、4例)、類肉腫リンパ節 (3例)、急性虫垂炎 (4例)、類リューマチ滑液 (4例) および炎症皮膚 (昆虫咬傷、ツベルクリンに対する遅延性過敏反応、慢性苔癬状ひこう疹; 各1例) であった。抗LAM 1 - 3 mAb およびジアミノベンジジンによるアビジン - ビオチン - ペルオキシダーゼ法を用いて、凍結切片で組織免疫化学的に調べた (Rice ら、Am. J. Pathol., 138:385-393 (1991))。コントロールとして、特異性のないネズミ IgG₁ (Coulter Immunology、ハイアレ、フロリダ) を被験 mAb よりも3倍高い濃度で用いた。コントロール IgG は検出できる染色を示さず、したがって、全ての結果は被験 mAb で得られる特異的染色にのみ当てはまる。

【0056】

LAM - 1 と IgG キメラ cDNA および蛋白の製造

【0057】

10

20

30

40

50

ヒトIgG₁定常領域のCH1からCH3ドメインをコードするcDNAから1400bpのBanIIフラグメントを、pLAM-1cDNA(Chinら、J. Immunol. 125: 1770-1774 (1980))に導入したBanII部位にオリグヌクレオチド誘導変異によって挿入した。pLAM-1cDNAにおけるヌクレオチドのGAGGGT¹⁰⁷⁸からGAGCCCへの交換は、成熟蛋白の膜近接領域のアミノ酸番号370に対応するBanII部位を創出した。新規な制限部位を創出するために用いた反方向(アンチセンス)オリグヌクレオチドとpLAM-1cDNAのプラスミド5'末端由来の正方向(センス)オリグヌクレオチドアンカーを、pLAM-1cDNAの5'末端を増幅するために用いた。PCR産物をT4キナーゼで処理し、ゲル精製を行い、pSP65(Prpmega Biotech、マジソン、ウィスコンシン)でサブクロニングし、BanIIおよびKpnIで消化した。並行して、pSP65にサブクロニングしたLAM-1cDNAをKpnIおよびPvuIで消化し、さらにヒト重鎖IgG₁をコードするcDNAをBanIIおよびPvuIで消化した。ゲル精製の後、このようにして得たDNAフラグメントを、先にKpnIおよびBanIIで消化しておいたPCR産物と混合し共に結合させた。このPCR産物の配列を調べ、LAM-1およびIgG₁制限部位がpLAM-IgG₁DNAに保存されていることを制限地図で確認した。LAM-IgG₁DNAをAp^rM8発現ベクター(ロイド・リックステイン博士により提供(Dr. Lloyd Klickstein, Center for Blood Research、ボストン、メリーランド))でサブクロニングし、DEAEデキストラン法によってCOS細胞を一過性にトランスフェクトした。このトランスフェクトしたCOS細胞を血清非含有AIM-V培養液(Gibco-BRL0)で培養し、キメラLAM-1/IgG₁融合蛋白を含む上清液を3日後に採集した。

【0058】

可溶性LAM-1の精製

【0059】

ヘパリン加ヒト血液から得た血漿からsLAM-1を準精製した。Na₂SO₄(18%(w/v))で血漿を塩分画した後、sLAM-1含有上清分画を0.02Mトリス緩衝液(pH8.0)、0.5MNaClで透析した。このsLAM-1調製物をさらに抗LAM-セファローズを用いて親和性カラムクロマトグラフィーで精製した。sLAM-1は0.1M酢酸緩衝液(pH3.5)、0.15MNaClでカラムから溶出し、該溶出物の低pHは、2.0Mのトリス緩衝液(pH9.0)を添加して直ちに上昇させた。溶出ピークを集めた分画を限外濾過し、PBSに懸濁させた。sLAM-1の濃度はELISAで決定し、続いてPBSで約15μg/mlに調整した。このsLAM-1濃度では、サンプルの総蛋白量は、光吸収で決定したとき130から220μg/mlの間で変動し、sLAM-1は総蛋白の~6から10%を占めた。一般に、この工程はsLAM-1を22000から37000倍豊富にした。リンパ球-内皮粘着分析で使用するために、さらに限外濾過することによってRPMI1640/10%FCSに準精製sLAM-1を移した。

【0060】

ウェスタンブロット分析

【0061】

上記のように血漿からsLAM-1を準精製し、さらに、交互に高塩(0.5MNaCl、0.2%Na-デオキシコレート)と低塩(0.125MNaCl、0.05%Na-デオキシコレート)RIPA緩衝液(100mMトリス(pH8.0)、1%(v/v)トリトンX-100、10mMEDTA、10mMEGTA、10mMNaF、1mg/mlのBSA)中でビーズを繰り返し洗浄しながら、抗LAM-セファローズを用いて免疫沈降を行うことによって精製した。蛋白を0.1M酢酸緩衝液(pH3.5)、0.15MNaClでビーズから溶出させた。PMA刺激細胞の上清液をまた分析した。好中球(RPMI1640中の10ng/mlPMA、37で10分)、リンパ球(RPMI1640中の10ng/mlPMA、37で25分)およびK562-LAMトランスフェクタント(PBS中の100ng/mlPMA、37で120分)を含む細胞

(1×10^7 / ml) を実質的に全ての検出可能な細胞表面 LAM-1 を放出するように誘発し、その後遠心 (4、400 × g、10 分) して沈澱させた。上清液を残し、限外濾過 (Amicon Corp.、デンバー、メリーランド) によって 10 倍に濃縮した。蛋白サンプル (100 μl) 7.5% の SDS-ポリアクリルアミドゲルに添加し、電気泳動を行い、ニトロセルロースにブロットを転写した。ウェスタンブロット分析は、抗原検出抗体として抗 LAM1-14 mAb (腹水、1:2000) を用いて実施した。アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗マウス IgG1 抗体 (Southern Biotechnology Associates) および基質として NBT/BCIP (Promega、マジソン、ウィスコンシン) を用いて、このブロットを処理した。予備実験では、抗 LAM1-14 mAb が検査した 12 種の抗 LAM-1 mAb のうち最も感度が高く、それらのうち、抗 LAM1-3、-4、-8、-10、-14 および -15 mAb は陽性染色を生じることが分かった。

10

【0062】

可溶性 LAM-1 の ELISA

【0063】

微量定量プレート (96 ウェル、平底、E.I.A./R.I.A.プレート、コースター、ケンブリッジ、メリーランド) のウェルを、0.1 M 硼酸緩衝液 (pH 8.4) 中で 4 で 18 時間、抗 LAM-1 mAb (100 μg/ml) で被覆した。トリス緩衝食塩水 (TBS; 20 mM トリス (pH 7.5)、0.5 M NaCl) でウェルを 2 度洗浄した後、TBS 中の 100 μl の 2% ウシ血清アルブミンおよび 1% ゲラチンで 37 1 時間、このウェルを阻止処理した。ウェルを 0.05% トウイン 20 含有 TBS (TBST) で 3 度洗浄し、TBST (50 μl) で希釈した被験サンプルを 3 組のウェルに 20 で 90 分加えた。各検定には、標準希釈曲線を作製するために用いた、先に定量済みの標準血漿サンプルの定量が含まれていた。ウシ胎児血清またはブタ血清での希釈は、結果に顕著な影響を与えなかった。TBST で 4 度洗浄した後、プレートを TBST 中のビオチン化抗 LAM1-3 mAb (1 μg/ml) の 100 μl とともに 20、60 分保温した。さらに 4 度洗浄した後、100 μl のアビジン-セイヨウワサビペルオキシダーゼ (0.1 μg/ml、ピアース、ロックフォード、イリノイ) を 20 で 30 分加えた。TBST でさらに 4 度洗浄した後、最後に基質として 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.5) 中の 100 μl の o-フェニレンジアミン (0.125% (w/v)、シグマケミカルカンパニー) を用いて 0.015% の H₂O₂ の存在下でプレートを処理した。反応混合物の OD を ELISA 読み取り器 (v-max、キネティックマイクロプレートリーダー、Molecular Devices、メンローパーク、カリフォルニア) を用いて定量した。標準血漿の最高濃度を含むウェルの OD が 495 nM で ~ 0.8 のときの結果を用いた。OD のバックグラウンド値はアルブミンのみで被覆したウェルを用いて得た。ELISA は標準血漿を用いて定量的にし、各検定について定量曲線を作製した。個々のサンプル中の sLAM-1 の相対濃度は、3 組のウェルで得た平均 OD を直線回帰曲線を用いた定量標準血漿のセミログ標準曲線と比較することによって算出した。サンプル濃度は標準曲線にそれらの吸収を書き入れることによって得られた。標準血漿に存在する sLAM-1 の量は 2 種の方法で定量した。第一に、K562-LAM-1 細胞 (培養細胞 ~ 11 L (~ 1.1×10^{10} 細胞)) を PBS に懸濁し (1×10^7 細胞/ml)、PMA (100 ng/ml) で 2 時間 37 で刺激した。上清液を採集し、限外濾過で濃縮し、抗 LAM-セファロースを用いてカラムクロマトグラフィーでアフィニティー精製した。準精製サンプルを 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、ゲルを続いてクーマシーブルーで染色して、主要バンド (71000 Mr) および付加的バンド (~ 180 -、57 -、および 22000 Mr) を明らかにした。脱色したゲルをヒューレットパッカーデスクスキャナーで調べ、71000 Mr のバンドの濃度を、アップルマッキントッシュ I I c x コンピューターでエンハンスプログラム (Enhance^{T M} program) マイクロシステム社、デスモイン、アイオワ) を用いて BSA で作製した標準曲線で定量した。標準血漿中の sLAM-1 の濃度は、準精製 sLAM-1 のシグナルを標準血漿の LAM-ELISA 定量曲線と直線回帰曲線を用いて比較することによって ~ 1.3 μg/ml と算出された。L

20

30

40

50

A M - E L I S A の検出限界は 5 ng/ml と決定された。第二の実験様式では、C O S 細胞を L A M - I g G キメラ c D N A で一過性にトランスフェクトした後、血清非含有培養液で増殖させた。上清液を細胞から集め、蛋白 - A セファロース (ファルマシア L K B バイオテクノロジー) 親和性クロマトグラフィーカラムで処理し、融合蛋白を高塩 - 低 p H 緩衝液でカラムから溶出させた。S D S - P A G E 分析の後、染色蛋白バンドを B S A の標準曲線と比較して精製融合蛋白を定量した。この分析から、標準血漿の O D 値は L A M - I g G 融合蛋白の $\sim 1.9 \mu\text{g/ml}$ に匹敵するらしいということが分かった。融合蛋白の二量体特性によって、このサンドイッチ E L I S A では密度が二倍になる可能性があるので、標準血漿中の s L A M - 1 の量は $\sim 1.9 \text{ ng/ml}$ の半分の値であるかもしれない。

10

【0064】

ヒト血漿、ブタ血清並びに K 5 6 2 - L A M 細胞、L A M - I g G c D N A トランスフェクト C O S 細胞および擬似トランスフェクト C O S 細胞の培養上清液の被験サンプルを、s L A M - 1 の存在について E L I S A で調べた。顕著な反応性はヒト血漿並びに K 5 6 2 - L A M 細胞および L A M - I g G c D N A トランスフェクト細胞の上清液においてのみ認められた。10回の検定で、 $5 - 133 \text{ ng/ml}$ の範囲の標準血漿定量曲線を用いたとき、L A M - E L I S A は直線相関係数 0.97 を示した。3種の異なる日の血漿中の s L A M - 1 レベルの測定のための変数の検定間係数は 4.5% であった。凍結後または10回までの凍結融解後のサンプル間に s L A M - 1 レベルの顕著な相違は認められず、さらに数時間室温に放置された全血中の s L A M - 1 量の定量能にも明白な低下は存在しなかった。したがって、s L A M - 1 は全血中で極めて安定である。

20

【0065】

正常人集団で認められる s L A M - 1 量は血清について決定された ($1.92 \pm 0.96 \text{ ng/ml}$ 、 $n = 18$)。同一人から血漿が同時に分離し、L A M - E L I S A で定量したが、平均 s L A M - 1 レベルは $1.91 \pm 0.98 \mu\text{g/ml}$ であった。s L A M - 1 はまた組織培養上清中でも検出できた。有糸分裂促進剤でリンパ球を活性化した後、上清液 s L A M - 1 のレベル上昇が1日後に検出され、6日の培養期間に互ってこのレベルは上昇した。

【0066】

用途

30

【0067】

放出レセプター L A M - 1 を識別しないが細胞表面レセプターを識別する単クローン性抗体は、患者への直接投与用治療剤として用いることができる。本発明の抗体の使用は、抗体投与による二次的な副作用の多くを予防するであろう。このような副作用は、レセプターの可溶性に対する抗体の免疫複合体形成および交差反応または結合により生じる。また、レセプターの放出形は高レベルで存在する天然に生じる分子であるので、s L A M - 1 と構造が同じである組換え体蛋白生成物をデザインすることが可能である。すなわち、膜にかかる領域を含まない組換え体蛋白および細胞質尾部は天然の血清蛋白を模倣するものであろう。このような特性は、そのような組換え体の本来の種に対する免疫原性を減少させ、同様に治療用生成物として該レセプターを使用することを可能にする。リガンド結合領域におけるレセプターのアミノ酸一次配列に対する小さな変化は、リガンドに対するより高い結合定数または親和性を誘導するために導入することができる。続いて、この修飾され切り縮められた組換え体蛋白は、免疫原性は低い、結合能および細胞表面レセプター蛋白のリガンド結合阻止能はより高い治療剤として、可溶性で用いることができる。

40

【0068】

本発明の抗体は診断薬としてもまた有用である。例えば、細胞表面 s L A M - 1 を発現する白血球を同定する能力は、与えられた細胞集団の遊走能並びに細胞分化の状態および活性化を知るために重要である。s L A M - 1 の高いレベルのために、細胞表面分子の同定に生物学的液体の存在下で抗体を使用することは困難である。しかしながら、抗 L A

50

M1-1のような抗体は、血中または生物学的液体サンプル中に放出されたレセプターと反応しないので、細胞表面にのみ存在するレセプターを同定するために有用であろう。例えば、全血の間接免疫蛍光分析は促進され、レセプター分布のインビボ画像化または分析が、極めて少量の抗体を用いて可能になるであろう。

【0069】

また、sLAM-1レベルのモニタリングによって、炎症性疾患、白血球集合、悪性疾患または感染に関する診断的、予防的情報が提供されえる。例えば、正常人の血清においてsLAMのレベルは容易にかつ正確に定量できるので、患者のsLAM-1の血清レベルは全身性炎症または感染の種々の状態について測定できた。重篤な火傷をもつ患者は正常集団で見出されるsLAM-1レベルと同じsLAM-1レベルを有するが、一方、川崎症候群の患者は正常人のそれより一般に低いsLAMレベルを有していた。対照的に、敗血症またはHIV感染を罹患している患者は、正常な血液供与者集団のsLAM-1レベルと顕著に異なる($p < 0.005$)、極めて高い血清sLAM-1レベルを示した。sLAM-1はまた、脳脊髄液でも検出されたが、そのレベルは正常血清で見出されるものの0.6から6%であった。したがって、sLAM-1レベルの変化は、白血球集合または活性化によって示されるように、炎症性または感染性疾患についての診断的または予防的価値を有する。

10

【0070】

本明細書で開示した分析は、溶液中のsLAM-1レベルの検出が容易に達成できることを明らかにした。さらに、非常に正確な態様でのsLAM-1レベルの定量もまた、sLAM-1が生物学的液体中に含まれる場合ですら達成できる。また、患者由来の生物学的液体中のsLAM-1レベルの定量は診断的価値を有することも明らかにされた。

20

【0071】

前出の開示により、通常の技術でsLAM-1だけでなく、その元の蛋白LAM-1またはLAM-1フラグメントを検出する種々の手段に影響を与えることができるであろう。2種の結合分析、ウェスタンブロット分析および抗体を基にしたELISAの詳細な記載が提供された。しかしながら、選択的にLAM-1に結合する他の薬剤も、LAM-1またはそのフラグメントの存在を明らかにし、またそれを捕捉するために用いることができる。これらは、例えばPPME、フコイジンまたは他のLAM-1リガンドを含む炭水化物成分である。細胞を基材とする捕捉機序、LAM-1リガンドを含む例えばサイトカイン活性化内皮または組織標本もまた結合剤として利用することができる。

30

【0072】

さらに、LAM-1またはそのフラグメントの捕捉は、当業者にとって明白な種々の手段によって算定できる。例えば、構造の変化、捕捉試薬または検出試薬の共鳴もしくは光学特性をLAM-1結合を示すために測定することができる。捕捉試薬は、LAM-1またはそのフラグメントに特異的な多クローン性抗体でもよい。検出試薬はまた、放射性、免疫反応性、または酵素活性剤または化合物を用いて標識し、結合を可視化することができる。さらに、捕捉試薬はLAM-1またはそのフラグメントに特異的でなくてもよいが、LAM-1特異性はLAM-1特異的検出試薬の使用によって得ることができる。また検出試薬は特異的でなく、捕捉試薬が特異的であってもよい。

40

【0073】

サンプル中に存在するLAM-1またはそのフラグメントの量の定量もまた種々の手段を用いて達成できる。例えば、血清または血漿中の天然に生じるsLAM-1についての分析で示したように、組換え体LAM-1蛋白またはフラグメントを標準物として用いることができる。哺乳類、細菌または昆虫細胞の組織培養上清中に産生されたLAM-1またはそのフラグメントもまた用いることができる。捕捉試薬に結合する小さなペプチドフラグメントでさえ競合検定でLAM-1結合を算定し、定量するために用いることができる。また、LAM-1による捕捉試薬からの小分子の置換は存在するLAM-1量を定量するために用いることができる。

【0074】

50

本発明を好ましい具体例と合わせて詳述したので、前出の明細書を読むことによって通常の技術を有する者は、ここに述べた構成と方法に対する種々の変更、同等物の置き換え、およびその他の変更を実施することができる。したがって、特許権によって与えられる保護は、添付の請求の範囲およびそれと同等のものに含まれる範囲によってのみ制限される。

【0075】

寄託

【0076】

ハイブリドーマLAM-1はATCC No. HB10844としてアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に1991年7月28日に寄託された。出願人の譲受人、Dana-Farber Cancer Institute, Inc., はATCCが該寄託の永久に保存できる寄託所であり、特許が付与された場合、公衆がそれを容易に入手できることを明言する。このように寄託した物質の公衆の入手に関する全ての制限は、特許付与の際に完全に取り除かれる。特許出願中に、37CFR1.14および35USC122の下にそれに対して権利を有すると長官が認めた者は、該物質を入手することができる。該寄託物質は、そのサンプルの最も最近の供給の要請後少なくとも5年間、さらにいずれの場合においても寄託の日から少なくとも30年間または特許の有効期間の間(いずれか期間の長い方)は、活力を保持し、かつ汚染されないよう必要な全ての注意をもって維持されるであろう。出願人の譲り受け人は、該寄託所が、要請時に該寄託物の条件のためにサンプルを供給できない場合は、該寄託物を置き換える義務を負うことを承認する。

10

20

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/06	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 Q 1/04	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/577	B
	C 1 2 N 5/00	E

(72)発明者 シュレイフェンバウム, ポリス
 アメリカ合衆国 0 2 1 4 6 マサチューセッツ州 ブルックリン カルボーン クレセント 2
 8

(72)発明者 スパーチニ, オリビア
 スイス国 シーエイチ 1 0 4 2 アセス ルートド マラパラウド(番地無し)

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ08 QR48 QR66 QS33 QX02
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA90X BA25 CA44 CA46
 4C085 AA14 BB14 BB16 CC12 CC14 DD23 DD34 EE01
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 EA20 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	具体检测细胞表面受体白细胞粘附因子-1		
公开(公告)号	JP2004285040A	公开(公告)日	2004-10-14
申请号	JP2003283186	申请日	2003-07-30
[标]申请(专利权)人(译)	达那-法伯癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	达纳 - 法伯癌症酒店硬脂Teyuto公司		
[标]发明人	テダートーマスエフ シュレイフェンバウムボリス スパーチニオリビア		
发明人	テダー, トーマス エフ. シュレイフェンバウム, ボリス スパーチニ, オリビア		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K38/17 A61K39/395 A61K49/00 A61P29/00 A61P35/02 C07K14/705 C07K14/715 C07K16/00 C07K16/28 C12N5/06 C12N5/10 C12N5/20 C12N15/02 C12N15/09 C12P21 /04 C12P21/08 C12Q1/04 C12R1/91 G01N33/50 G01N33/569 G01N33/577		
CPC分类号	A61K49/0004 A61P29/00 C07K14/70564 C07K16/2854 C07K2319/00 C07K2319/30 C07K2319/32 G01N33/5091 G01N33/56972		
FI分类号	C07K16/28 A61K39/395.T A61P29/00 A61P35/02 C07K14/715 C12P21/08 C12Q1/04 G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/577.B C12N5/00.E C12N5/00.202.J C12N5/078		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QS33 4B063/QX02 4B064 /AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/BA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB14 4C085/BB16 4C085/CC12 4C085/CC14 4C085 /DD23 4C085/DD34 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	秋本照雄		
优先权	07/862483 1992-04-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

区别了白细胞粘附分子-1 (LAM-1 , L-选择素) 释放形式和细胞表面结合形式。LAM-1的释放形式在人体血浆中含量很高。公开了通过蛋白质印迹和ELISA分析检测释放的LAM-1 (sLAM-1) 的定量方法。在存在释放的LAM-1的情况下特异性检测细胞表面结合的LAM-1的方法和使用与细胞表面结合的LAM-1反应但不释放LAM-1的单克隆抗体的免疫疗法 还公开了。[选择图]无