

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5641508号
(P5641508)

(45) 発行日 平成26年12月17日(2014.12.17)

(24) 登録日 平成26年11月7日(2014.11.7)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S
GO 1 N 33/566 (2006.01)	GO 1 N 33/566
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Z N A N
請求項の数 8 (全 30 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2012-501817 (P2012-501817)	(73) 特許権者 504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
(86) (22) 出願日 平成23年2月23日(2011.2.23)	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2011/053980	(74) 代理人 110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(87) 国際公開番号 W02011/105424	(74) 代理人 100077562 弁理士 高野 登志雄
(87) 国際公開日 平成23年9月1日(2011.9.1)	(74) 代理人 100096736 弁理士 中嶋 俊夫
審査請求日 平成24年8月22日(2012.8.22)	(74) 代理人 100117156 弁理士 村田 正樹
(31) 優先権主張番号 特願2010-37204 (P2010-37204)	(74) 代理人 100111028 弁理士 山本 博人
(32) 優先日 平成22年2月23日(2010.2.23)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	
(出願人による申告)平成20年度、独立行政法人科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業、産業技術力強化法第19条の適用を受けるもの	
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 樹状細胞免疫受容体刺激剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ケラタン硫酸 - II の存在下またはケラタン硫酸 - II を対照として、被検物質の樹状細胞免疫受容体への結合性を測定することを特徴とする樹状細胞免疫受容体刺激剤又は樹状細胞免疫受容体拮抗剤のスクリーニング方法。

【請求項2】

樹状細胞免疫受容体に対する結合性を測定する工程、及び破骨前駆細胞の破骨細胞への分化を測定する工程を含む、破骨細胞形成抑制剤又は破骨細胞形成促進剤のスクリーニング方法。

【請求項3】

樹状細胞免疫受容体刺激作用を有する樹状細胞免疫受容体に対する抗体を含有する骨代謝異常を伴う疾患又は炎症性疾患の予防治療剤。

【請求項4】

前記抗体が、モノクローナル抗体である請求項3記載の骨代謝異常を伴う疾患又は炎症性疾患の予防治療剤。

【請求項5】

骨粗鬆症、骨パジェット病、変形性骨炎及び関節リウマチから選ばれる疾患の予防治療剤である請求項3又は4記載の骨代謝異常を伴う疾患又は炎症性疾患の予防治療剤。

【請求項6】

破骨細胞形成抑制剤又はTNF - 産生阻害剤である請求項3～5のいずれかに記載の

骨代謝異常を伴う疾患又は炎症性疾患の予防治療剤。

【請求項 7】

樹状細胞免疫受容体拮抗作用を有する樹状細胞受容体に対する抗体を含有する破骨細胞形成促進剤。

【請求項 8】

前記抗体が、モノクローナル抗体である請求項 7 記載の破骨細胞形成促進剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、樹状細胞免疫受容体 (Dendritic Cell Immunoreceptor: DCIR) に対するリガンド、抗 DCIR 抗体及びそれらの利用に関する。 10

【背景技術】

【0002】

樹状細胞 (Dendritic Cell: DC) は主要な抗原提示細胞 (APC) であり、免疫系の調節において中枢的な役割を担っている。近年、幾つかの C 型レクチン受容体類 (CLR 類) が樹状細胞の表面に発現されるとのキャラクタリゼーションがなされた。I 型の CLR 類メンバーである MMR (CD206) 及び DEC-205 (CD205) は、その N 末端に複数のカルシウム依存性細胞外糖鎖認識ドメイン (CRD) を有する。樹状細胞上に発現する CLR の第 2 のファミリーは、C 末端に唯一の CRD を持つ II 型タンパク質であり、それらは DC-SIGN (CD209)、Langerin (CD207)、CLEC-1、Dectin-1 (-GR)、Dectin-2、DLEC、及び DCIR を含む。 20

【0003】

DCIR は LLIR と呼ばれ、ヒト及びマウスの主に樹状細胞上に発現する II 型膜タンパク質である。この分子は細胞外ドメインに一つの糖鎖認識ドメイン (CRD) を持ち、細胞内ドメインにコンセンサス ITIM を持つ。ITIM は細胞内に抑制的シグナルを伝達するので、マウス DCIR は抑制的な受容体として働き、樹状細胞機能を調節することが示唆された。

本発明者らは、先に DCIR ノックアウトマウスの作製に成功し、当該マウスを用いた検討により、DCIR が関節炎や関節リウマチの進展に関与していることを報告した (特許文献 1、非特許文献 1)。 30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開 2008-29319 号公報

【特許文献 2】特開 2009-19044 号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】Nature Medicine, Vol. 14, No. 2, p176-180, FEBRUARY 2008 40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、DCIR に対する内因性のリガンドは未だ発見されておらず、本来の意味での DCIR の生体内での作用メカニズムは解明されていない。また、DCIR 刺激剤や DCIR 拮抗剤も全く見出されていない。

【0007】

従って、本発明の課題は、DCIR のリガンドを見出し、その刺激剤及び拮抗剤を探索し、その応用を図ることにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

そこで本発明者は、DCIRのリガンドを見出すべく種々検討した結果、全く意外にもそのリガンドがケラタン硫酸 - I I (K S - I I) であることを見出し、さらに K S - I I と DCIR との結合による作用を検討したところ、K S - I I は DCIR に結合することにより、骨芽細胞及び破骨細胞の機能を制御しており、特に破骨細胞形成を強く抑制しており、また炎症を抑制していることを見出した。これらの知見に基づき、さらに、DCIR に対する抗体を作製し、その作用を検討したところ、抗 DCIR 抗体の中には、K S - I I 阻害性の DCIR 拮抗作用を有する抗体だけでなく、K S - I I 様の DCIR 刺激作用を有する抗体が存在することを見出した。また該 K S - I I 様の DCIR 刺激作用を有する抗 DCIR 抗体は優れた破骨細胞成形抑制作用、TNF - 産生抑制作用を有し、骨代謝異常を伴う疾患や炎症性疾患の予防治療剤として有用であることを見出し、本発明を完成した。

10

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明は、K S - I I を有効成分とする樹状細胞免疫受容体刺激剤を提供するものである。

また、本発明は、K S - I I の存在下または K S - I I を対照として、被検物質の樹状細胞免疫受容体への結合性を測定することを特徴とする樹状細胞免疫受容体刺激剤又は樹状細胞免疫受容体拮抗剤のスクリーニング方法を提供するものである。

【 0 0 1 0 】

また、本発明は、K S - I I 様の樹状細胞免疫受容体刺激作用を有する樹状細胞免疫受容体に対する抗体、及びこれを含む医薬を提供するものである。

20

さらに本発明は、K S - I I 阻害性の樹状細胞免疫受容体拮抗作用を有する樹状細胞免疫受容体に対する抗体、及びこれを含む医薬を提供するものである。

【 0 0 1 1 】

また、本発明は、樹状細胞免疫受容体を刺激するために使用する K S - I I を提供するものである。

また、本発明は、樹状細胞免疫受容体刺激剤製造のための、K S - I I の使用を提供するものである。

【 0 0 1 2 】

また、本発明は、骨代謝異常を伴う疾患又は炎症性疾患を予防又は治療するために使用する、K S - I I 様の樹状細胞免疫受容体刺激作用を有する樹状細胞免疫受容体に対する抗体を提供するものである。

30

また、本発明は、骨代謝異常を伴う疾患予防治療剤又は炎症性疾患予防治療剤製造のための、K S - I I 様の樹状細胞免疫受容体刺激作用を有する樹状細胞免疫受容体に対する抗体の使用を提供するものである。

【 0 0 1 3 】

また本発明は、がん治療又は免疫賦活のために使用する、K S - I I 阻害性の樹状細胞免疫受容体拮抗作用を有する樹状細胞免疫受容体に対する抗体を提供するものである。

また、本発明は、抗がん剤又は免疫賦活剤製造のための、K S - I I 阻害性の樹状細胞免疫受容体拮抗作用を有する樹状細胞免疫受容体に対する抗体の使用を提供するものである。

40

【 0 0 1 4 】

また、本発明は、K S - I I を投与することを特徴とする樹状細胞免疫受容体の刺激方法を提供するものである。

また、本発明は、K S - I I 様の樹状細胞免疫受容体刺激作用を有する樹状細胞免疫受容体に対する抗体を投与することを特徴とする骨代謝異常を伴う疾患又は炎症性疾患の予防治療方法を提供するものである。

また、本発明は、K S - I I 阻害性の樹状細胞免疫受容体拮抗作用を有する抗体を投与することを特徴とするがんの予防治療方法又は免疫賦活方法を提供するものである。

【 発明の効果 】

50

【 0 0 1 5 】

本発明によれば、K S - I I が D C I R のリガンドであることが見出され、これは破骨細胞の形成抑制作用等を有し、新たな医薬として有用である。また、抗 D C I R 抗体のうち、K S - I I 様作用を有する抗体は、D C I R 刺激作用を有し、骨代謝異常を伴う疾患、炎症性疾患等の予防治療剤として有用である。一方、K S - I I 阻害作用を有する抗体は、D C I R 拮抗作用を有し、抗がん剤、免疫賦活剤等として有用である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 6 】

【 図 1 】 (a) D c i r - / - マウスの作製における、マウス D c i r 部位 (野生型アレル)、D c i r ターゲティング構築物 (ターゲティングベクター)、及び予測される変異 D c i r 遺伝子 (変異体アレル) の構造を示す模式図。エキソンは黒色のボックスで示す。Neo : ネオマイシン耐性遺伝子、DT : ジフテリア毒素遺伝子、B : B a m H I サイト、E : E c o R I サイト。図中の 5 ' p r o b e、3 ' p r o b e と表記された黒いボックスはそれぞれサザンプハイブリダイゼーションにおける 5 ' プローブ及び 3 ' プローブの結合位置を示す。(b) ~ (d) E S クローンのサザンプロットハイブリダイゼーション解析結果を示す図。(b) : B a m H I 切断ゲノム DNA と 5 ' プローブを用いた解析、(c) : E c o R I 切断ゲノム DNA と 3 ' プローブを用いた解析、(d) : E c o R I 切断ゲノム DNA と Neo プローブを用いた解析。(e) マウスの D c i r 欠損を確認するためのゲノムサザンプロット分析結果を示す図。(f) ノーザンプロット解析によるマウス脾臓における D c i r mRNA の発現を示す図。+ / + : 野生型マウス。+ / - : D c i r + / - マウス、- / - : D c i r - / - マウス。

10

20

【 図 2 】 a . 8 週齢の W T マウス及び K O マウス大腿骨の 3 次元マイクロ C T 像 (上段) 及び横断面 (下段)。b . 左上 : 骨量対組織量比 (B V / T V)、右上 : 骨梁数 (T b . N)、左下 : 骨梁間隔 (T b . S p)、右下 : 骨梁中心距離 t (T b . S p a c)。データは $mean \pm s . d .$ ($n = 4$ 又は $5 / 群$)。c . 8 週齢 W T マウス及び K O マウスの大腿骨トルイジンブルー染色切片。d . 成長板 $growth\ plate$ 厚の定量測定値。e . 8 週齢 W T マウス及び K O マウスの脛骨 T R A P 染色切片。f . O C 数 (N . O c) 及び O C 表面対骨表面比 (O c . S / B S)。g . 8 週齢 W T マウス及び K O マウスの大腿骨の動的組織形態計測分析。h . 石灰化速度 (M A R) 及び骨形成速度 (骨梁表面) (B F R / B S)。データは $mean \pm s . d .$ ($n = 4$ 又は $6 / 群$)。* $P < 0 . 0 5$ 、** $P < 0 . 0 1$ 。スケールバー = $100\ \mu m$ 。

30

【 図 3 】 正常高齢 K O マウスのマイクロ C T 分析 : a . W T マウスと硬直症状のない 1 2 月齢の K O マウスの大腿骨横断面像 ; b . 骨量対組織量比 (B V / T V)。データは $mean \pm s . d .$ ($n = 3 / 群$)。

【 図 4 】 骨における D c i r (C l e c 4 a 2) 発現。a - b . O C (骨髄由来破骨細胞)、O B (初代頭蓋冠骨骨芽細胞)、及び軟骨細胞 (初代肋骨軟骨細胞) の R T - P C R 解析結果。軟骨細胞 (b) では、D c i r 発現が検出できなかったため、ポジティブコントロールとして C o l 2 a 1 及び C o l 1 0 a 1 を測定した。

【 図 5 】 K O マウスにおける骨発達。a . 鼻 - 肛門長に基づく成長曲線。データは $mean \pm s . d .$ ($n = 8 / 群$)。b . アルシアンブルーとアリザリンレッドによる新生マウスの骨染色像。

40

【 図 6 】 a . M - C S F 及び R A N K L で処理された骨髄細胞由来 O C の T R A P 染色像。b . T R A P 陽性多核細胞 (M N C ; 少なくとも 3 個 (左) 又は少なくとも 2 0 個 (右) の核を含む細胞) の定量測定値。データは $mean \pm s . d .$ ($n = 6$)。c . 吸収窩 pit 形成分析。O C は象牙質スライス上で培養された。d . 吸収ピット面積の定量測定値。データは 3 以上の別個の実験の代表例。e . O C 培養物上清の T R A P 活性。データは $mean \pm s . d .$ ($n = 3$)。f . O C 分化をコントロールする主要転写因子 (N f a t c 1 及び N f a t c 2) ならびに O C マーカー (A c p 5 及び C a s k) の半定量的 R T - P C R 分析。g . R A N K L 処理後の様々な時点での、骨髄由来マクロファージ (B M M) 細胞培養物における M A P K (p 3 8、E R K 及び J N K)、A k t、及び N E

50

- Bの活性。h. BMM細胞培養物におけるPLC 1及びPLC 2のRANKL誘導性チロシンリン酸化。i. 2日間のインビトロ培養後の単核細胞のTRAP染色。j. TRAP陽性単核細胞の定量測定値。データはmean ± s.d. (n = 5又は7/群)。k. M-CSF、又はM-CSF及びRANKLによる刺激後のpOCを用いた増殖アッセイ。データはmean ± s.d. (n = 3)。* P < 0.05。

【図7】a. M-CSF及びRANKLを含む骨髓細胞培養物からの培地におけるGM-CSF濃度。データはmean ± s.d. (n = 3)。b. M-CSFのみ、M-CSF及びRANKL、又はM-CSF及びGM-CSFによる刺激後のpOCを用いた増殖アッセイ。データはmean ± s.d. (n = 3又は7/群)。c. 破骨細胞形成に対するGM-CSFの影響。M-CSF (10 ng/mL)及びRANKL (100 ng/mL)を含む培地に横軸に示す濃度の組換えマウスGM-CSFを添加した。データはmean ± s.d. (n = 3)。d. 破骨細胞形成に対する抗GM-CSF中和抗体(Abs)の影響。M-CSF (10 ng/mL)及びRANKL (100 ng/mL)を含む培地に抗GM-CSF抗体(5 µg/mL)を添加した。データはmean ± s.d. (n = 4)。e. pOCにおけるStat5のGM-CSF介在性リン酸化。全細胞抽出物をGM-CSF刺激後、図示した時点で回収した。バンドの濃さはデンシトメトリーにより決定し、ウェスタンブロット像の上に示す。* P < 0.05, *** P < 0.001。

【図8】a. DCIR結合性カーボハイドレイトの構造。Gal:ガラクトース、GlcNAc: N-アセチル-D-グルコサミン、S:硫酸基。b. 組換えマウスDCIR (mDCIR)とKS-IIとの濃度依存性結合(mean ± s.d.)。c. KS-II非存在下(KS⁻)及び存在下(KS⁺)でのOCのTRAP染色。d. KS-II (100 ng/mL)非存在下及び存在下でのTRAP陽性MNC(細胞あたりの核数3個以上)数(mean ± s.d.)。e. 糖鎖(10 ng/mL)存在下における破骨細胞形成。KS-I:角膜由来KS-I、KS-II:軟骨由来KS-II、CS:コンドロイチン硫酸、DS:デルマトタン硫酸、LacNAc:非硫酸化LacNAc。データはmean ± s.d.。f. KS-II刺激後のpOC溶解物におけるITIMリン酸化とSHP-1動員に関するイムノブロット分析。複合体は抗DCIR抗体とともに免疫沈降させた。* P < 0.05, ** P < 0.01。

【図9】新生マウス由来初代頭蓋冠骨OBの増殖アッセイ。初代OBは新生マウスの頭蓋冠骨から単離し、骨形成誘導せずに培養した。データはmean ± s.d. (n = 5/群)。

【図10】a. 骨形成性の分化後の複数の時点での、OBにおけるDc1r(Clec4a2)発現のRT-PCR分析。b-d. 頭蓋冠骨OBの石灰化。骨形成性培養物のアリザリンレッド染色(b)、フォン・コッサ染色(c)、及びALP染色(d)。e. 頭蓋冠骨OBの骨形成性培養物(21日)におけるOBマーカーmRNA発現のリアルタイムRT-PCR分析。Runx2: Runt-related gene 2 (Cbfa1: Core binding factor 1)、Osx: Osterix (Sp7)、Alp: Alkaline phosphatase、Ibsp: Integrin-binding sialoprotein (BSP: bone sialoprotein)、Col1α1: Collagen type I alpha 1、Osc: Osteocalcin、Opn: Osteopontin。f. 頭蓋冠骨OB石灰化に対するKS-IIの影響: アリザリンレッド染色(上)、ALP染色(中、下)。g. Dc1r^{-/-}マウス由来のBMC及びOBを含む共培養系における破骨細胞形成。h-i. OBとBMCの共培養後のTRAP陽性MNC数。データはmean ± s.d. (n = 4-11/群)。*** P < 0.001。j. 頭蓋冠骨OBにおけるOPG/RANKL比に関するリアルタイムRT-PCR分析。k-l. WTマウス(k)及びKOマウス(l)由来の頭蓋冠骨OBにおけるOPG/RANKL比に対するKS-IIの影響に関するリアルタイムRT-PCR分析。

【図11】頭蓋冠骨OBにおけるOPG及びRANKL発現レベルのリアルタイムRT-PCR分析。

10

20

30

40

50

【図12】本発明のハイブリドーマ上清のTNF- α に対する影響を示す。

【図13】本発明のハイブリドーマ上清の破骨細胞分化に対する影響を示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明のDCIR刺激剤の有効成分はKS-IIである。ケラタン硫酸は、ガラクトース(Gal)にN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が結合した、Gal-GlcNAcの基本構造を有する硫酸化グリコサミノグリカンである。ケラタン硫酸には、骨や軟骨由来でO-グリコシド結合でタンパク質と結合するKS-Iと、角膜由来でN-グリコシド結合でタンパク質と結合するKS-Iとが存在するが、本発明ではKS-IIのみが使用できる。KS-Iには本発明の作用はない。KS-IIは、炎症等に関与することが知られている(特許文献1)が、DCIRとの関係については全く知られていなかった。

10

【0018】

KS-IIには、Gal-GlcNAcの繰り返し数及び硫酸残基数により種々の構造のものが存在するが、本発明ではいずれのものも使用できる。

これらのKS-IIは、骨や軟骨由来のもの、また市販のものを使用することができる。

【0019】

後記実施例に示すように、KS-IIは、DCIRのリガンドであり、DCIRに結合することにより種々の作用を示す。すなわち、KS-IIはDCIRに結合することにより、骨芽細胞の成熟化と骨基質形成を阻害し、オステオポンチンの生産を促進する作用を有する。一方で、KS-IIは、DCIRに結合することにより、破骨細胞の形成を強力に抑制することも判明した。また、その作用はGM-CSF依存性の破骨前駆細胞の増殖を阻害することによるものである。なお、KS-IはDCIRのリガンドではない。

20

従って、KS-IIは、骨形成調節剤として有用であり、種々の骨疾患、例えば骨粗鬆症、骨パジェット病、変形性骨炎等の予防治療剤として有用である。

【0020】

また、KS-IIはDCIRのリガンドであるから、KS-IIの存在下あるいはKS-IIを対照として、被検物質のDCIRへの結合性を測定すれば、DCIR刺激剤又はDCIR拮抗剤のスクリーニングが可能である。より具体的には、KS-II及び被検物質のDCIRへの結合性を測定し、KS-IIとDCIRとの結合性と対比すれば、被検物質がDCIRの刺激剤か拮抗剤かが判定できる。ここでDCIRへの結合性の測定は、KS-IIの作用、例えば破骨細胞形成能、TNF- α 産生に対する作用、I型IFN産生に対する作用により判定してもよい。

30

【0021】

DCIR刺激剤又はDCIR拮抗剤のスクリーニングは、インビトロでもインビボでも行うことができる。インビボの場合には、破骨細胞形成能、TNF- α 産生に対する作用、I型IFN産生に対する作用により判定するのが好ましい。

【0022】

本発明の抗DCIR抗体には、KS-II様のDCIR刺激作用を有する抗DCIR抗体(抗DCIRアゴニスティック抗体)と、KS-II阻害性のDCIR拮抗作用を有する抗DCIR抗体(抗DCIRアンタゴニスティック抗体)とがある。

40

本発明において、KS-II様のDCIR刺激作用を有するとは、KS-IIと同様のDCIR刺激作用を有すればよく、他の物質によりDCIR刺激作用を有する場合も含まれる。

【0023】

KS-II様のDCIR刺激作用を有する抗体のうち、DCIRに対する結合性がKS-IIと同等またはそれよりも高いものが好ましく、当該結合性は1.2倍以上高いものが好ましく、2倍以上がより好ましく、5倍以上高いものがさらに好ましい。当該結合性は、DCIRに対する結合性を直接測定してもよいが、破骨細胞形成抑制能、TNF- α

50

産生抑制作用などの活性を指標に測定してもよい。

【0024】

本発明におけるKS - II様のDCIR刺激作用を有する抗体は、破骨細胞形成抑制作用及びTNF - 産生阻害作用を有し、その作用はKS - IIと同等もしくはそれよりも強い。従ってKS - II様抗DCIR抗体は、骨吸収性疾患などの骨代謝異常を伴う疾患や炎症性疾患等の予防治療剤として有用である。骨代謝異常を伴う疾患や炎症性疾患の例としては、例えば、骨粗鬆症、骨パジェット病、変形性骨炎、関節リウマチなどを挙げることができる。KS - II様抗DCIR抗体が、これらの疾患に有効であることは、例えばコラーゲン誘発関節炎モデルを用いて確認することができる。

【0025】

KS - II阻害性のDCIR拮抗作用を有する抗体のうち、DCIRに対する結合性がKS - IIと同等もしくはそれよりも高いものが好ましく、当該結合性は1.2倍以上のものが好ましく、2倍以上のものがより好ましく、5倍以上のものがさらに好ましい。

【0026】

KS - II阻害性のDCIR拮抗作用を有する抗体は、強い破骨細胞形成促進作用及びTNF - 産生促進作用を有する。従ってKS - II阻害性抗DCIR抗体は、抗がん剤、免疫賦活剤等として有用である。

【0027】

本発明の抗DCIR抗体には、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体、ならびに抗原決定基に特異的に結合する能力を保持している抗体及びT - 細胞レセプターフラグメント等の、抗体の変種及び誘導体が含まれる。

【0028】

また、本発明の抗体の種類は特に制限されず、マウス抗体、ヒト抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヒツジ抗体、ラクダ抗体、トリ抗体等や、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、等を適宜用いることができる。遺伝子組換え型抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウス抗体の重鎖、軽鎖の可変領域とヒト抗体の重鎖、軽鎖の定常領域からなる抗体であり、マウス抗体の可変領域をコードするDNAをヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。ヒト化抗体は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域(CDR; complementarity determining region)をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域(framework region; FR)を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号EP239400、国際特許出願公開番号WO96/02576参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい(Sato, K. et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856.)。

【0029】

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。例えば、ヒトリンパ球をin vitroで所望の抗原又は所望の抗原を発現する細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエロマ細胞、例えばU266と融合させ、抗原への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる(特公平1-59878参照)。また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することで所望のヒト抗体を取得するこ

10

20

30

40

50

とができる (WO 93 / 12227, WO 92 / 03918, WO 94 / 02602, WO 94 / 25585, WO 96 / 34096, WO 96 / 33735 参照)。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (s c F v) としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードする DNA 配列を決定することができる。抗原に結合する s c F v の DNA 配列が明らかになれば、当該配列を適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に周知であり、WO 92 / 01047, WO 92 / 20791, WO 93 / 06213, WO 93 / 11236, WO 93 / 19172, WO 95 / 01438, WO 95 / 15388 を参考にすることができる。

10

【0030】

また、これらの抗体は、その特性を失わない限り、抗体断片 (フラグメント) 等の低分子化抗体や抗体の修飾物などであってもよい。抗体断片の具体例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Diabodyなどを挙げることができる。このような抗体断片を得るには、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させればよい (例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968 - 2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476 - 496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497 - 515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652 - 663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663 - 669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132 - 137 参照)。

20

【0031】

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

30

【0032】

本発明の抗体及び抗体フラグメントは、任意の適当な方法、例えば、インビボ、培養細胞、インビトロ翻訳反応、及び組換え DNA 発現系により製造することができる。

【0033】

モノクローナル抗体及びハイブリドーマを製造する手法は当該技術分野においてよく知られている (Campbell, "Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1984; St. Groth et al., J. Immunol. Methods 35: 1 - 21, 1980)。DCIR 又はそのフラグメントを免疫原として用いて、抗体を生成することが知られている任意の動物 (マウス、ウサギ等) に皮下又は腹腔内注射することにより免疫することができる。免疫に際してアジュバントを用いてもよく、そのようなアジュバントは当該技術分野においてよく知られている。

40

【0034】

ポリクローナル抗体は、免疫した動物から抗体を含有する抗血清を単離し、ELISA アッセイ、ウエスタンブロット分析、又はラジオイムノアッセイ等の当該技術分野においてよく知られる方法を用いて、所望の特異性を有する抗体の存在についてスクリーニングすることにより得ることができる。

【0035】

50

モノクローナル抗体は、免疫した動物から脾臓細胞を切除し、ミエローマ細胞と融合させ、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製することにより得ることができる。ELISAアッセイ、ウエスタンブロット分析、又はラジオイムノアッセイ等の当該技術分野においてよく知られる方法を用いて、目的とする蛋白質又はそのフラグメントを認識する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を選択する。所望の抗体を分泌するハイブリドーマをクローニングし、適切な条件下で培養し、分泌された抗体を回収し、当該技術分野においてよく知られる方法、例えばイオン交換カラム、アフィニティークロマトグラフィー等を用いて精製することができる。あるいは、ゼノマウス株を用いてヒト型モノクローナル抗体を製造してもよい(Green, J. Immunol. Methods 231: 11-23, 1999; Wells, Eek, Chem Biol 2000 Aug; 7(8): R185-6を参照)。また、免疫を行わないファージディスプレイに基づいたモノクローナル抗体の作製も現在行われており、本発明の抗体はこれらの方法のいずれで製造されてもかまわない。

10

【0036】

本発明の医薬は、当該技術分野においてよく知られる薬学的に許容しうる担体とともに、混合、溶解、顆粒化、錠剤化、乳化、カプセル封入、凍結乾燥等により、製剤化することができる。

【0037】

経口投与用には、KS-II又は抗DCIR抗体を、薬学的に許容しうる溶媒、賦形剤、結合剤、安定化剤、分散剤等とともに、錠剤、丸薬、糖衣剤、軟カプセル、硬カプセル、溶液、懸濁液、乳剤、ゲル、シロップ、スラリー等の剤形に製剤化することができる。

20

【0038】

非経口投与用には、KS-II又は抗DCIR抗体を、薬学的に許容しうる溶媒、賦形剤、結合剤、安定化剤、分散剤等とともに、注射用溶液、懸濁液、乳剤、クリーム剤、軟膏剤、吸入剤、座剤等の剤形に製剤化することができる。注射用の処方においては、本発明の治療剤を水性溶液、好ましくはハックス溶液、リンゲル溶液、又は生理的食塩緩衝液等の生理学的に適合性の緩衝液中に溶解することができる。さらに、組成物は、油性又は水性のベヒクル中で、懸濁液、溶液、又は乳濁液等の形状をとることができる。あるいは、KS-II又は抗DCIR抗体を粉体の形態で製造し、使用前に滅菌水等を用いて水溶液又は懸濁液を調製してもよい。吸入による投与用には、KS-II又は抗DCIR抗体を粉末化し、ラクトース又はデンプン等の適当な基剤とともに粉末混合物とすることができる。坐剤処方では、KS-II又は抗DCIR抗体をカカオバター等の慣用の坐剤基剤と混合することにより製造することができる。さらに、本発明の治療剤は、ポリマーマトリクス等に封入して、持続放出用製剤として処方することができる。

30

【0039】

KS-II又は抗DCIR抗体の投与量は、患者の症状、投与経路、体重、年齢等によっても異なるが、例えば成人1日あたり1 μ g~500mgであるのが好ましい。

【実施例】

【0040】

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明する。
(実験方法)

40

全ての動物実験は、東京大学医科学研究所動物使用委員会の承認を得、動物実験のための安全ガイドライン及び遺伝子複製実験のための倫理ガイドラインに従って行われた。

【0041】

1. Dcirノックアウト(KO)マウスの作製

Dcir^{-/-}(KO)マウスは、Nature Medicine, 2008, vol 14, no 2: 176-180に記載される手順に従って、通常の遺伝子ターゲティング法によって作製した。

5'末端相同領域、BamHIサイト、EcoRIサイト、ネオマイシン耐性遺伝子(Neo)、3'末端にネガティブセレクションのためのジフテリア毒素遺伝子(DT)を

50

含むターゲティングベクターを作製した。これを用いて、マウス由来ES細胞のDc ir 遺伝子のエキソン1及び2をNeoで置換することにより、immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)を含む細胞質領域及び膜貫通ドメインの大部分をコードするゲノム配列を欠損させた(図1a)。ESクローンからの遺伝子をBamHI及びEcoRI処理した後、サザンブロットハイブリダイゼーション解析によってスクリーニングし、5'プロンプ(図1b)、3'プロンプ(図1c)及びNeoプロンプ(図1d)を用いて遺伝子の欠損を確認した。Dc ir 欠損ESクローンを用いてDc ir^{+/−}マウスを作製し、Dc ir^{+/−}マウスの交配によりDc ir^{−/−}マウスを作製した。Dc ir^{−/−}マウスは実験に用いる前に、C57BL/6J(SLC)と8~9世代戻し交配させた。

10

マウスにおけるDc ir 遺伝子の欠損は、ゲノムサザンブロット解析によって確認した(図1e)。ノーザンブロットハイブリダイゼーション解析によって脾臓におけるDc ir mRNAの発現が欠損していることを確認した(図1f)。

【0042】

2. 骨表現型の解析

マウス骨表現型の解析は、以下の方法によって行った。

(1) コンピュータ断層撮影(CT)

大腿部及び関節部の3次元マイクロCTによる解析は、R_mCT(理学メカトロニクス社製)を使用して行なった。また、大腿部の2次元マイクロCTによる解析及び定量化は、Scan Xmate-A090S(コムスキャンテクノ社製)及びTRI/2D-BONシステム(ラトックシステムエンジニアリング社製)を使用して行なった。さらに、大腿部の末梢骨定量CT(PQCT)による解析及び定量化は、XCT Research SA+システム(Stratec Medizitechnik GmbH社製)を用いて行なった。

20

【0043】

(2) 組織学的検査

大腿部のHE染色は、Nature Medicine, 2008, vol 14, no 2: 176-180に記載されている方法に従って行なった。関節部はトルイジンブルー(TB)染色及びフォン・コッサ染色を行い、脛骨部はTB及びTRAP染色を行った。染色は、試料を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、それを脱灰なしでグリコールメタクリル樹脂又はパラフィンで処理した後、3µm切片にスライスした。脛骨近位端における成長板及び骨梁の組織形態学的解析をOsteoplan II(Carl Zeiss社製)を使用して行なった。動的組織形態計測(Dynamic histomorphometry analysis)のため、カルセイン(1.6mg/kg体重)を3日おきに2回皮下注射した。最初の注射から4日後、脛骨部を細分化し、70%エタノールで固定した。5µm厚の非脱灰凍結切片をLeica CM3050S cryostat(Leica Microsystems社製)を用いて作製した。骨石灰化速度及び骨形成速度は、Zeiss Axioskop及びOsteoplan II(Carl Zeiss社製)を使用して解析した。

30

【0044】

3. 骨発達の解析

マウスの鼻-肛門(nasoanal)長を週2回測定し、成長曲線を作成した。新生マウスを100%エタノールで4日間固定し、その後アセトン溶液に移し、3日後水で洗浄し、0.1%アリザリンレッドS(Sigma社製)/95%エタノール1重量部、0.3%アルシアンブルー6GX(Sigma社製)/70%エタノール1重量部、100%酢酸1重量部、及びエタノール17重量部からなる染色液で10日間染色した。96%エタノールで洗浄した後、骨格形成が明らかに視認できるまで標本を20%グリセロール/1%水酸化カリウム中に室温で保存し、その後100%グリセロールに移して保存した。

40

【0045】

4. インビトロ破骨細胞形成及びピット形成アッセイ

50

非接着骨髄細胞をウェルプレート(24ウェルプレート中 5×10^5 細胞/ウェル、又は6ウェルプレート中 3×10^6 細胞/ウェル)の中に播種し、10% FCS (Biowest社製)及び10 ng/mL M-CSF (R&D Systems社製)を含有するMEM (GIBCO)中で培養した。2日後、非接着細胞(リンパ球を含む)を洗い流し、残った接着細胞を骨髄由来マクロファージ(bone marrow-derived macrophage, BMM)として使用した。これらの破骨前駆細胞(pOC)を100 ng/mL溶解性RANKL (Peprotech社製又はOriental Yeast社製)及び10 ng/mL M-CSFの存在下でさらに培養することにより、破骨細胞を得た。3日後、破骨細胞を10%中性緩衝ホルマリン中で3分間固定し、さらにエタノール/アセトン混合液(50:50 v:v)中で1分間保存した後、TRAP染色液(Naphthol AS-MXリン酸塩5 mg; N,N-dimethylformamide 0.5 mL; fast red violet LB塩30 mg; 50 mM酒石酸ナトリウム含有0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0) 50 mL)中で室温でインキュベートした。TRAP陽性多核細胞(MNC; 3核)を計数した。

10

ピット形成アッセイにおいては、破骨細胞を30 ng/mL M-CSFの存在下で2日間にわたって生成させ、その後、30 ng/mL M-CSF及び150 ng/mL RANKLによりさらに3日間処理した。その後、トリプシンを使って細胞を回収し、回収した細胞を播種し(96ウェルプレート中 1×10^5 細胞/ウェル)、象牙質スライス上で30 ng/mL M-CSF及び150 ng/mL RANKLを用いて2日間培養した。試料を1モルNH₄OH中で超音波処理し、ヘマトキシリンで染色した。TRAP陰性MNC、及び吸収ピットによって浸蝕された領域を、Bio-revo BZ-9000 (Keyence社製)を使って観測、測定した。

20

GM-CSFが破骨細胞形成に及ぼす影響を調べるため、mouse GM-CSF enzyme immunoassay (PerSeptive Biosystems社製)、組換えGM-CSF (Peprotech社製)、抗マウスGM-CSF中和抗体(R&D Systems社製)を使用した。さらに増殖アッセイを行なうため、pOCを播種し(96ウェルプレート中 1×10^4 細胞/ウェル)、10 ng/mL M-CSFのみにより、又は、M-CSF + 100 ng/mL RANKL若しくは20 ng/mL GM-CSFにより3日間培養した。その後、細胞を[³H]TdR (0.5 µCi/mL)で一晩曝露した。

30

【0046】

5. 骨芽細胞の分化及び石灰化の検出

(1) 初代骨芽細胞の培養

初代骨芽細胞を新生マウスの頭蓋冠から単離した。頭蓋冠をPBSで洗浄し、0.25%トリプシン及び2 mg/mL collagenase P (Roche社製)を含有するMEM中、37°Cで20分間消化した。上清を除去した後、細胞をさらに60分間消化した。

骨形成を誘導するため、初代骨芽細胞(96ウェルプレート中 2×10^4 細胞/ウェル、24ウェルプレート中 5×10^4 細胞/ウェル、又は6ウェルプレート中 2×10^5 細胞/ウェル)をコンフルエントまで培養し、10 mM β-glycerophosphate及び50 µg/mLアスコルビン酸を添加した培地に置き換えた。培地は21日間で3回交換した。

40

21日間培養した骨芽細胞の、アリザリンレッド染色、フォン・コッサ染色、及びアルカリホスファターゼ(ALP)染色を行った。

(2) アリザリンレッド染色

21日間培養した骨芽細胞をPBSで溶液を取り除いた後、3.7%ホルマリン溶液(nacalaitesque)にて10分間固定した。その後PBSでもう1度洗い、ALP染色液(0.1 mg/mL Naphthol AS-MX phosphate (nacalaitesque)、0.6 mg/mLアゾイックジアゾコンポーネント2

50

0 (TGI)、5 μ L/mL N,N-dimethylformamide (nacalaitesque)、7.5 mL Tris-HCL (1.5 M、pH 8.8) (nacalaitesque) にて20分間反応させた。反応溶液を取り除きPBSで洗った後、乾燥させBIOREVO (KEYENCE) にて撮影を行った。

(3) フォン・コッサ染色

21日間培養した骨芽細胞をイオン交換水で溶液を取り除いた後、3.7%ホルマリン溶液にて30分間固定した。その後イオン交換水でもう1度洗い、5%硝酸銀溶液 (nacalaitesque) を直射日光下15分間反応させた。反応を停止させるため5%硝酸銀溶液を取り除き5%チオ硫酸ナトリウム (nacalaitesque) を加え2分間静置した。5%チオ硫酸ナトリウムをイオン交換水で洗浄し、乾燥させた後BIOREVO (KEYENCE) にて撮影を行った。

10

(4) ALP染色

初代骨芽細胞を96ウェルプレートにて21日間培養し、TRACP & ALP Assay Kit (Takara) を用い測定を行った。培養細胞上清を回収し、原液及び10倍希釈液をプレートとした。プレート50 μ L に反応基質溶液を加え、37で15分間反応させた。反応停止液50 μ L を加えて反応を停止させた後、MICROPLATE READER MTP-300 (CORONA ELECTRIC) を用いOD405にて活性の測定を行った。

【0047】

6. 初代骨芽細胞及び骨髄細胞 (BMC) の共培養

20

初代骨芽細胞及びBMC (それぞれ48ウェルプレート中 3×10^3 細胞/ウェル、 2×10^5 細胞/ウェル) は、 10^{-3} M 1.25 (OH) $_2$ D $_3$ (Sigma社製) 及び 10^{-7} M PGE $_2$ (Nacalaitesque社製) 中で8日間培養した。培地は、2日ごとに交換した。TRAP染色を行ない、MNCを計数した。

【0048】

7. RT-PCR解析

半定量RT-PCR及びリアルタイムRT-PCRは、若干変更を加えたものの、基本的にはNature Medicine, 2008, vol 14, no 2: 176-180及びArthritis Res Ther, 2006, 8, R100, 1-13に記載の方法に従って行った。トータルRNAを標準的なグアニジノ酢酸チオシアン酸塩/フェノールクロロホルム法、又はSepasol-RNA I Super (Nacalaitesque社製) を使用する方法によって調製した。調製したRNAは、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen社製) を使って逆転写し、cDNAを調製した。

30

半定量的RT-PCRは、上記で調製したcDNAを鋳型として行った。反応液は1試料あたり20 μ Lとし、10x PCR reaction buffer (Roche) 2 μ L、dNTPs (Roche) 1.6 μ L、表1に記載のプライマー0.4 μ L、Taq DNA polymerase (Roche) 0.2 μ L、template DNA 1 μ Lとなるように調整した後、iCycler (Bio-Rad) を用いて増幅反応を行った。PCR後の反応溶液は、1.5%アガロースゲルを用いて、定電圧100 V、30分間の電気泳動により分離し、15分間 (0.05 μ g/mL) エチジウムブロマイドで染色後、UVイルミネーター (BAS-III) でDNA断片を検出した。

40

リアルタイムRT-PCRは、表1に記載のプライマー、SYBR Green qPCRキット (Invitrogen社製) 及びiCycler (Bio-Rad社製) を使用して行った。

【0049】

【表1】

プライマーの配列		
collagen1a1		
Forward; 5' - GGTGCCCCCGGTCTTCAG -3'	(配列番号1)	
Reverse; 5' - AGGCCAGGGGTCCAGCATTTTC -3'	(配列番号2)	
Osteocalcin		
Forward; 5' - CTGACCTCACAGATCCCAAGC - 3'	(配列番号3)	
Reverse; 5' - TGGTCTGATAGCTCGTCACAAG - 3'	(配列番号4)	10
Osteopontin		
Forward; 5' - TAGCTTGGCTTATGGACTGAGG -3'	(配列番号5)	
Reverse; 5' - AGACTCACCGCTCTTCATGTG -3'	(配列番号6)	
bone sialo protein		
Forward; 5' - ACAATCCGTGCCACTCACT -3'	(配列番号7)	
Reverse; 5' - TTTCATCGAGAAAGCACAGG -3'	(配列番号8)	
ALP		
Forward; 5' - GGACAGGACACACACACA -3'	(配列番号9)	20
Reverse; 5' - CAAACAGGAGAGCCACTTCA -3'	(配列番号10)	
RunX2		
Forward; 5' - TGTTCTCTGATCGCCTCAGTG -3'	(配列番号11)	
Reverse; 5' - CCTGGGATCTGTAATCTGACTCT -3'	(配列番号12)	
Osterix		
Forward; 5' - CCCACCCTTCCCTCACTCAT -3'	(配列番号13)	
Reverse; 5' - CCTTGTACCAGCCATAGG -3'	(配列番号14)	
RANKL		
Forward; 5' - CAGCATcGCTCTGTTCCTGTA -3'	(配列番号15)	30
Reverse; 5' - CTGCGTTTTTCATGGAGTCTCA -3'	(配列番号16)	
OPG		
Forward; 5' - ACCCAGAACTGGTCATCAGC -3'	(配列番号17)	
Reverse; 5' - CTGCAATACACACTCATCACT -3'	(配列番号18)	
GAPDH		
Forward; 5' - TTCACCACCATGGAGAAGGC -3'	(配列番号19)	
Reverse; 5' - GGCATGGACTGTGGTCATGA -3'	(配列番号20)	40

【0050】

8. イムノプロット

(1) ウェスタンブロット

ウェスタンブロットは、Nature Medicine, 2008, vol 14, no 2: 176-180に記載された方法に従って行った。PVDF膜(BioRad)をメタノールで浸し、電気転写用緩衝液(25mM Tris-HCl(pH8)(nacalaitesque)、15mg/mL Glycine(nacalaitesque)、20%メタノール(Wako)に移し変え、30分程度浸透させて前処理を行った。TRANS-BLOTSD SEMI-DRY TRANSFER CELL(BioRad)を用い、ゲル面積1cm²あたり2mAで1時間通電し、PVDF膜に

転写した。転写後、一次抗体として以下のタンパクに特異的な抗体を使用して、P V D F 膜をプロットした。

Phospho - p 3 8 MAPK (Thr 1 8 0 / Tyr 1 8 2) ;
 p 3 8 MAPK ;
 Phospho - p 4 4 / 4 2 MAPK (Thr 2 0 2 / Tyr 2 0 4) ;
 p 4 4 / 4 2 MAPK (1 3 7 F 5) ;
 Phospho - SAPK / JNK (Thr 1 8 3 / Tyr 1 8 5 : 8 1 E 1 1) ;
 SAPK / JNK (5 6 G 8) ;
 Phospho - Akt (Thr 3 0 8 ; C 3 1 E 5) ;
 Akt (pan) (C 6 7 E 7) ;
 Phospho - NF - B p 6 5 (Ser 5 3 6 ; 9 3 H 1) ;
 NF - B p 6 5 (C 2 2 B 4) ;
 Phospho - PLC 1 (Tyr 7 8 3) ;
 PLC 1 ;
 Phospho - PLC 2 (Tyr 7 5 9) ;
 PLC 2 ; - tubulin (Abcam) ;
 Phospho - Stat5 (Tyr 6 9 4) (Cell Signaling Technology) ;

10

Stat5 (C 1 7) (Santa Cruz Biotechnology)
 二次抗体には抗ウサギIgG、HRP - Linked Antibody (Cell Signaling) を用いた。膜を洗浄後、ECL - Plus (GE Healthcare) を用いて発光させ、FLA - 5 0 0 0 (FUJIFILM) で解析を行った。

20

(2) 免疫沈降分析

免疫沈降分析においては、Protein G - Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare 社製)、マウスDCIR特異抗体 (3 2 0 5 1 1 : R & D Systems 社製)、phospho - Tyr (4 G 1 0 : ミリポア社製)、及びSHP - 1 (HG 2 1 3 ; Upstate) を使用した。また、ウサギIgG特異的HRP - 結合ポリクローナル抗体 (Cell Signaling 社製) 又はラットIgG特異的HRP - 結合ポリクローナル抗体 (Zymed 社製) を二次抗体として使用した。

30

【 0 0 5 1 】

9 . 糖鎖及び糖鎖結合アッセイ

牛関節軟骨由来ケラタン硫酸 (KS - II) 精製物は、K . Yoshida (理研) 及びA . Tawaza (Hydrox Inc .) より入手した。他の糖鎖 (牛角膜由来ケラタン硫酸、クジラ関節由来コンドロイチン硫酸A、豚皮膚由来コンドロイチン硫酸 (デルマタン硫酸)、及びN - acetyl lactosamine) は、Seikagaku Biobusiness 社より購入した。

糖鎖結合アッセイは、J Bio Chem , 2 0 0 4 , 2 7 9 , 2 9 0 4 3 - 2 9 0 4 9 に記載された方法に従って実施した。KS - II を 1 0 0 mM 酢酸ナトリウム (pH 5 . 5) によって 2 mg / mL の濃度に希釈し、氷上で 1 時間、2 mM メタ過ヨウ素酸ナトリウムによる酸化を行ない、反応性アルデヒド基を得た。さらに希釈を行なった後、KS - II を Covalink ELISA プレート上で 4 で一晩インキュベートし、その後、KS - II を室温で 1 . 5 時間、0 . 3 % シアン化ホウ化水素ナトリウムによる還元反応によって共有結合させた。プレートを洗浄し、2 % ウシ血清アルブミン (fraction V : Sigma 社製) により 3 7 で 2 時間ブロッキングした。細胞外ドメイン (9 9 ~ 2 3 8 番残基) を含む組み換えマウスDCIR (mDCIR) を、pGMT7 プラスミドを使用して E . coli BL 2 1 (DE 3) pLysS の封入体として発現させ、標準的希釈法によってリフォールドしたブロッキングしたプレートで、mDCIR を 4 で一晩インキュベートした。タンパク質の結合は、TMB 基質 (Dako 社製) の存在下で抗DCIR抗体 (3 2 0 5 0 7 及び 3 2 0 5 1 1 の混合物 : R & D System

40

50

ms社製)及びHRP-結合ラットIgG(Zymed社製)を使用して検出した。

【0052】

実施例1 Dcirl^{-/-}(KO)マウスにおける骨形成

Dcirl^{-/-}(KO)マウスは、加齢に伴い、付着部炎に由来する硬直症enthesitis-induced ankylosisを発症するとの報告があるが(Nature Medicine, 2008, vol 14, no 2: 176-180)、硬直症状が未発症の若齢KOマウス(8週齢)、及び硬直症状を示さない正常な高齢KOマウス(12月齢)の骨量を3次元マイクロCT測定し、野生型と比較したところ、若齢KOマウス、及び正常高齢KOマウスの骨量は、野生型(WT)に比べて増加していた(図2a, b及び図3)。従って、骨形成は、穏やかな骨硬化症を示すDcirl^{-/-}マウスにおいては促進されることが示された。

10

【0053】

次いで、マウスの骨におけるDCIRの発現をPT-PCRにより測定した。DCIRは、骨髄由来破骨細胞(OC)及び初代骨芽細胞(OB)において発現していたが、初代軟骨細胞では発現していなかった(図4)。この結果からも、Dcirlの骨代謝への関与が支持される。鼻-肛門(nasoanal)長に基づく成長曲線、及びアリザリンブルー及びアリザリンレッドによる新生マウスの骨染色の結果からは、Dcirl^{-/-}マウスにおいても骨は正常に発達することが示された(図5)。

【0054】

骨硬化症は、軟骨細胞、OC又はOBの異常を有する動物において観察される(Genes Dev, 1999, 13, 3037-3051)。Dcirl^{-/-}マウスにおける骨硬化症の原因を解明するため、組織形態計測によりマウスの骨を調べた。脛骨成長板近位部における増殖層の厚さは、WTとKOマウスとで差がなかったことから、軟骨細胞はKOマウスにおいても正常に形成されることが示された(図2c, d)。

20

TRAP陽性OCの数及び骨梁におけるOC表面積は、KOマウスにおいて有意に増加していた(図2e, f)。硬直変化を示さないKOマウスで骨形成が増加していたことを考慮すると、この結果は予想外である。

次に、これらのマウスにおける骨ターンオーバーを調べるため、生後8週のマウスにおいて新たに形成された骨を動的組織形態計測(Dynamic histomorphometry analysis)によって計測した。すなわち、マウスに3日おきに2回カルセインを投与して骨を標識し、その間に形成された骨を測定した。KOマウスの脛骨の形成速度及び石灰化は、WTマウスと比較して高かった(図2g, h)。従って、Dcirl^{-/-}マウスでは、破骨細胞骨吸収及び骨芽細胞による骨形成とがともに増進しており、骨ターンオーバーがより高まっていることが示された。Dcirl^{-/-}マウスでは全体としては骨密度が増大していたことから、生理的条件下では骨吸収に対する影響よりも骨形成に対する効果が上回ると考えられる。

30

【0055】

実施例2 破骨細胞形成におけるDCIRの役割

上記の実験からは、Dcirl^{-/-}マウスが破骨細胞(OC)を多く有していたことが示された。そこで、破骨細胞形成におけるDCIRの役割について調べた。WT及びKOマウス由来初代骨髄細胞(BMC)を、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)及び核因子Bリガンドの受容体活性化因子(RANKL)を用いた標準インビトロOC分化系で培養し、OC分化を誘導した。その結果、Dcirl^{-/-}BMC培養物においては、TRAP陽性多核OCへの分化が有意に増加した(図6a, b)。多くのKO由来OCは多核であり、骨ページェット病患者の骨の表現型に似ていた。Dcirl^{-/-}OCでは、骨吸収によってできた穴(pit)のサイズが拡大しており、Dcirl^{-/-}OCの骨吸収活性が大きく増強されたことが明らかとなった(図6c, d)。また、Dcirl^{-/-}細胞を含む培地においてはTRAP活性が上昇した(図6e)。これらの結果から、DCIRがBMCからの成熟OCの分化に関与していることが示された。

40

【0056】

50

次いで、DCIRの多核OC形成に対する影響を評価するため、 $Dc1r^{-/-}$ OCにおけるT細胞活性化核因子1 (Nfatc1)とT細胞活性化核因子2 (Nfatc2)の発現量を調べた。Nfatc1及びNfatc2は、ともにOC成熟のための主要な調節因子であり、Acps5 (TRAP)やCtsk (カテプシンK)と同様に、OC特異的なマーカーである。Nfatc1及びNfatc2遺伝子の発現量は、野生型OCと同等であった(図6f)。従って、DCIRはNFAT発現に影響しないことが示された。

【0057】

BMCからのOC分化はRANK及びimmunoreceptor tyrosine-based activation motif harboring adaptor (ITAM保有アダプタ)により活性化されるシグナル伝達経路により制御されることから(Nature, 2004, 428, 758-763)、これらの細胞におけるRANKの下流のシグナル伝達について調べた。MAPK (p38、ERK、JNK)、Akt及びNF- κ B (全てTRAF6の下流に位置する)のRANKL誘導性の活性化は正常であり、またPLC γ 1とPLC γ 2のRANKL誘導性ITAM保有アダプタ依存性チロシンリン酸化も、WTと成熟OCにおいて変化がなかった(図6g, h)。これらのデータは、DCIRがOC前駆細胞(pOC)からのRANKL依存性のOC分化に影響しないことを示す。

OC分化の初期段階における $Dc1r$ 欠損の影響をみるため、インビトロ培養2日後の、TRAP陽性単核OCの数を計測した。単核OCの数は、M-CSFで処理した $Dc1r^{-/-}$ BMCにおいて有意に増加し(図6i, j)、DCIRが、OC分化の初期段階で機能していることが示された。一方、WTと $Dc1r^{-/-}$ pOCをM-CSFとRANKLとで処理した場合の増殖反応には差は見られなかった(図6k)。この結果は、破骨細胞形成の主要シグナル伝達カスケードと考えられているRANKL依存性シグナル伝達を阻害することなく、DCIRがOC形成をネガティブに制御することを示している。

【0058】

さらに、GM-CSFに対するpOCの反応を調べた。従来の報告では、GM-CSFが骨髄細胞前駆体の樹状細胞への分化を促進することから、GM-CSFがOCの発現を抑制することが示されていた(Blood, 2001, 98, 2544-2554)。しかし最近、GM-CSFが、特定の条件下で、pOCの分化、増殖、生存及び融合を促進することが報告された(J Bone Miner Res, 2004, 19, 190-199、Nat Med, 2007, 13, 62-69、Nat Med, 2008, 14, 81-87、J Immunol, 2009, 183, 3390-3399、Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367, 881-887)。そこで、培養細胞を用いてGM-CSFの破骨細胞形成に対する影響を調べた。

WT pOCではなく $Dc1r^{-/-}$ pOCの分化が、GM-CSFによって有意に上昇した(図7a)。GM-CSF濃度は、WTと $Dc1r^{-/-}$ マウスの培養物との間で変化がなかった(図7b)。WT BMCと比較すると、 $Dc1r^{-/-}$ BMCからのOC分化は、0.1 ng/mLの組換えGM-CSF存在下で有意に上昇したが、1 ng/mL以上では上昇が見られなかった(図7c)。対照的に、抗GM-CSF中和抗体による処理によって、 $Dc1r^{-/-}$ マウスの破骨細胞形成は顕著に抑制された(図7d)。また、GM-CSF刺激後の $Dc1r^{-/-}$ pOCにおけるシグナル伝達因子と転写因子5 (Stat5)活性化因子のリン酸化について調べたところ、 $Dc1r^{-/-}$ 細胞のGM-CSF誘導型Stat-5リン酸化が顕著にアップレギュレートされた(図7e)。これらの結果からは、DCIRはGM-CSFシグナル伝達の阻害によってpOC増殖を抑制していることが示された。

【0059】

実施例3 DCIRリガンドの同定

DCIRのリガンドはこれまで報告されていなかった。そこで本発明者らは、破骨細胞形成に關与する生体内のDCIRリガンドを同定するため、公共のグリカンアレイデータ

10

20

30

40

50

ベースを用いてDCIRに結合する糖鎖を検索した。その結果、DCIRリガンドとして、硫酸化ガラクトース 1 - 4 N - アセチル - D - グルコサミン (N - アセチルラクトサミン又はLacNAc) 構造 (図8a) を有する糖鎖が特定された。硫酸化poly-LacNAcは、主に角膜 (N結合型KS - I) や関節軟骨 (O結合型KS - II) に存在するケラタン硫酸 (KS) の内部にプロテオグリカンの硫酸化グリコサミノグリカン (GAG) 側鎖として存在する分子である。そこでマウスの関節や骨髄細胞 (BMC) におけるKSの発現を調べたところ、これらの領域でKSが発現されていることを確認した。また、DCIRとKSとの結合をELISA法を利用した糖鎖結合アッセイにより調べた結果、組換えマウスDCIRはウシ関節軟骨由来のKS - IIと濃度依存的に結合することがわかった (図8b)。

10

さらに、KSのOC分化への影響を、インビトロでTRAP陽性OCの数を計測することにより評価した。KS - IIは、野生型 (WT) 骨髄細胞培養物におけるOC形成を著しく阻害したが、Dcirl^{-/-}の培養細胞では阻害しなかった (図8c及びd)。OC分化は、角膜由来のKS - I、非硫酸化LacNAc、又はコンドロイチン硫酸 (CS) やデルマタン硫酸 (DS) といった他の硫酸化グリコサミノグリカンには影響を受けなかった (図8e)。次に、DCIRがKSにより活性化されることを確認するため、免疫沈降分析を行った。その結果、DCIRにおけるimmunoreceptor tyrosine - based inhibitory motif (ITIM) のリン酸化、及びチロシンホスファターゼSHP - 1動員は、KS - IIによって濃度依存的に増加することが分かった (図8f)。これらの結果は、KS - IIがDCIRに特異的なリガンドであり、DCIRの活性化を介して破骨細胞形成の阻害に関与していることを示している。

20

【0060】

実施例4 骨芽細胞 (OB) 形成におけるDcirlの役割

骨芽細胞 (OB) 形成におけるDcirlの役割を調べた。初代頭頂骨OBの増殖は、WTマウスにおいてもDcirl^{-/-}マウスにおいても同様であった (図9)。頭蓋冠骨由来のOBにおいて、Dcirlは、 α - グリセロリン酸とアスコルビン酸による骨形成分化の誘導後に発現し、その発現は石灰化過程の間中続いた (図10a)。Dcirl^{-/-}OBにおいて、カルシウム (図10b) やリン酸カルシウム付加 (図10c) やアルカリホスファターゼ (ALP) 発現 (図10d) は、培養初期 (14日) に亢進されていたことから、石灰化はWTのOBに比べDcirl^{-/-}OBで促進されていることが分かった。これらの結果より、DCIRが末端OB分化と石灰化基質形成に関与していることが示唆された。

30

Runx2、Osterix、ALPといったOBマーカー、骨シアロタンパク質 (BSP)、I型コラーゲン (ColI)、オステオカルシンといった骨基質タンパク質をコードする遺伝子の発現量は、Dcirl^{-/-}マウスで高かった (図10e)。また、骨吸収に必要なオステオポンチン (OPN) の発現量が、WTの骨芽細胞に比べDcirl^{-/-}の骨芽細胞で顕著に低くなっていた。これらのデータにより、DCIRが骨芽細胞の成熟化と骨基質形成を阻害し、OPNの生産を促進することで、骨形成を負に制御していることが示唆された。さらに、骨形成性培養物のアリザリンレッド染色及びALP染色より、KS - II存在下でWTのOBでは石灰化が抑制されたのに対し、Dcirl^{-/-}OBでは抑制がみられないことが分かった (図10f)。

40

【0061】

次に、破骨細胞形成の制御における骨芽細胞の役割を、Dcirl^{-/-}マウス由来のBMCとOBとの共培養系において調べた。Dcirl^{-/-}BMCとWTのOBの共培養物では、通常の破骨細胞形成がみられた (図10g, h)。一方、WTのBMCとDcirl^{-/-}OBの共培養物では、破骨細胞形成が大きく減少した (図10g, i)。この結果より、DCIRが骨芽細胞と破骨細胞との正常なカップリングに関与していることが示された。OC形成は、骨芽細胞由来のRANKLとオステオプロテジェリン (OPG) により制御されるので、Dcirl^{-/-}OBにおけるこれらの発現量を調べた。RANKLの発現量には実質的な差はみられなかったが、OPGの発現量はWTのOBに比べてDcirl^{-/-}

50

r - / - O B で有意に増加し、変異骨芽細胞の O P G / R A N K L 比を増加させた (図 1 0 j 、 図 1 1) 。さらに、K S - I I 処理は、W T の O B でのみ O P G / R A N K L 比を減少させたことから (図 1 0 k , l) 、K S - I I が O P G の生産を D C I R 依存的に制御することが示された。従って、D C I R は、O P G の発現を抑制することで破骨細胞形成を促進しているようである。また、D C I R は破骨細胞だけでなく骨芽細胞でも機能し、生体の骨のターンオーバーを制御していると考えられる。

【 0 0 6 2 】

実施例 5 抗 D C I R 抗体の作製

(1) D C I R 発現細胞の作製

D c i r 遺伝子を含む発現ベクターは D c i r 遺伝子を含む配列 (N M _ 0 1 1 9 9 9) の 1 3 7 番目から 9 8 9 番目のヌクレオチドを P C R 法により増幅し、p c D N A 3 . 1 + ベクターに挿入して調製し、リポフェクトアミン 2 0 0 0 (インビトロジェン) を用いて 2 9 3 T 細胞及び C O S 7 細胞に形質導入した。約 4 8 時間後、細胞を回収し凍結保存した。

10

(2) D C I R の発現確認

(1) で作製した一過性発現細胞について、抗 D C I R 抗体を用いたウエスタンブロットを D C I R 発現細胞及びその野生株について行い、D C I R 発現細胞特異的に予想される 3 5 k D a 付近にバンドが検出できるか確認することにより、D C I R の発現確認を行い、D C I R 発現細胞株を取得した。

(3) マウスへの f o o t p a d 法による免疫

20

アジュバント (c o m p l e t e a d j u v a n t (F R E U N D) 三菱化学ヤトロン R M 6 0 6 - 1) と P B S を混ぜたエマルジョンを、マウス (4 匹) の片足の裏に免疫した。1 週間後、(2) で得た D C I R 発現細胞株でマウスを免疫した。毎週 1 回、計 5 回の免疫を行った。

【 0 0 6 3 】

(4) 細胞融合

5 回目の免疫の 3 日後に、免疫したマウスの両足から肥大したリンパ節を取り出し、その中から細胞を回収した。培養フラスコ (培地 : 1 0 % F B S - R P M I) でミエローマ細胞 (P 3 U 1) を増殖させ、細胞を回収した。回収したリンパ節由来細胞とミエローマ細胞を混和し、遠心した。ペレットに P E G (P E G 4 0 0 0 : M E R C K C a t N o 1 0 9 7 2 7 0 1 0 0 、 R P M I で等量希釈) を加え、細胞融合を行った。R P M I 血清無添加培地 (R P M I 1 6 4 0 、 S I G M A 、 C a t N o R 8 7 5 8) で細胞を洗浄後、1 5 % F B S - H A T 培地 (H A T s u p p l e m e n t (5 0 x) : G I B C O C a t N o 2 1 0 6 0 - 0 1 7 、初期の不安定なハイブリドーマをレスキューするため s u p p l e m e n t を添加) で懸濁し、9 6 ウェルプレート 4 枚に播種した。播種より 3 日後に培地を交換し、ハイブリドーマのコロニー形成が確認された後 (2 ~ 3 週間後) 、ウェルプレートから培養上清を採取し、1 次スクリーニングを行った。

30

【 0 0 6 4 】

(5) ハイブリドーマの 1 次スクリーニング

C e l l E L I S A / フローサイトメトリー法 (F C M) を用いてハイブリドーマを 1 次スクリーニングした。

40

C e l l E L I S A) 凍結ストックの細胞 (トランスフェクタント) を起眠させ、0 . 5 % B S A / 2 m M E D T A / P B S に懸濁し、C e l l E L I S A 用プレート (N U N C 2 4 9 5 7 0 9 6 V N W P S) に 1 0 0 μ L / ウェル分注した。9 6 ウェルプレート 1 枚あたり 1 × 1 0 ⁷ 個の細胞を使用した。2 0 0 0 r p m 、4 で 2 分間遠心後、上清を捨て、(4) で採取した培養上清を 5 0 μ L / ウェル加え、室温で 3 0 分間反応させた。0 . 5 % B S A / 2 m M E D T A / P B S で 2 回洗浄後 (2 0 0 0 r p m 、4 で 2 分間遠心後、上清捨てる) 、G o a t 抗マウス I g G - P O D 標識 (M B L 製品 C o d e . 3 3 0) を B u f f e r (M B L 製希釈液) で 1 0 , 0 0 0 倍希釈したものを加え、室温で 3 0 分間反応させた。3 回洗浄後、発色基質を加え 5 ~ 1 0 分間発色

50

させた。450 - 620 nmで吸光度測定を行った。

【0065】

FCM) Cell ELISAで陽性の可能性のあるクローンの培養上清について、(2)で得たDCIR発現細胞との反応性をFCMにより確認した。培養上清原液を細胞と室温で30分間反応させ、2回洗浄後、FITC標識抗マウスIgG抗体(MBL製品IM-0819)を100倍希釈で30分間反応させた。2回洗浄後、400 µlのbufferで懸濁し、FC500(ベックマンコールター)で測定した。洗浄及び細胞の懸濁Bufferは0.5 mM EDTA、5% BSA PBSを使用した。擬陽性等のアーティファクトを除くため、継代培養を行いながら何度か反応性を確認した。

【0066】

(6)単クローン化

(5)の1次スクリーニングで陽性と判断されたハイブリドーマの培養上清から選択されたハイブリドーマに対して、単クローン化を行った。

対数増殖期のハイブリドーマをパスツールピペットでピペティングした後採取し、培地で希釈後、1ウェルあたりの細胞数が1~32,000個になるように細胞濃度を調整し、96ウェルプレートに播種した。ハイブリドーマのシングルコロニーの形成が確認された後(1~2週間後)、ウェルプレートから培養上清を採取し、(5)の方法に従って活性を確認した。

(7)単クローナル(アイソタイプ)の確認

培養上清をPBSで100倍希釈したものをディベロップメントチューブに滴下し、着色ラテックスビーズを再懸濁する。チューブにアイソタイプ用ストリップ(Iso Strip マウスモノクローナル抗体アイソタイプングキット:Roche, Cat. No. 1-493-027)を浸漬し、5分後、特定のサブクラス部分に検出されたバンドを確認し、クローンを選択した。

(8)単クローン化ハイブリドーマの凍結

単クローン化されたハイブリドーマを96ウェルプレート1穴から、48ウェルプレート、24ウェルプレート、12ウェルプレートまで継代培養した。1ウェルの細胞を遠心回収し、セルバンカー(十慈フィールド、Cat No BLC-1)500 µLで懸濁し、ストックチューブ(SUMILON, Cat No MS-4601W)1本に入れ、-80℃で保存した。凍結時に回収した培養上清を最終評価培地として各10 mLの作製を行った。最終評価用培養上清を提供し、目的の活性が保持されているかどうかを最終確認した。

【0067】

実施例6 抗DCIR抗体の評価

実施例4で作製されたハイブリドーマ由来の抗DCIR抗体の、DCIRに対する結合能を評価した。DCIRは免疫反応の抑制に関与することが示されているため(Nature Medicine, 2008, vol 14, no 2:176-180)、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子(TNF-)の発現を基準に抗体のDCIR結合能を評価した。

実施例4で作製したハイブリドーマをCpG(濃度1 µM)を含む培地で12時間培養し、培養上清を回収した。同様に、CpG ODN 1668株(オペロン社)を同じ培地、又はさらにケラタン硫酸(KS-II; 10 ng/mL)を含む同じ培地で培養し、上清を回収した。コントロールとしてCpG非含有培地で細胞を培養した(NT)。上清中のTNF-産生量をELISA法によって測定した。

結果を図12に示す。CpG含有培地で細胞を培養することにより、TNF-産生が誘導された(CpG)。ネイティブなDCIRリガンドであるKS-IIを培地に添加した場合、TNF-産生は抑制された(CpG+KS)。複数のハイブリドーマ培養上清において、KS-II添加の場合よりもTNF-産生が抑制された(図12中の3、4、5株)。これらのハイブリドーマ由来の抗体は、ネイティブなDCIRリガンドであるKS-IIよりも高いDCIR結合能を有しており、DCIRの活性を促進するDCIR

10

20

30

40

50

アゴニストとして有用である。一方、一部のハイブリドーマ培養上清においては、逆にKS - II添加の場合よりもTNF - 産生が促進された(図12中の1、2株)。これらのハイブリドーマ由来の抗体は、DCIRの活性を抑制するDCIRアンタゴニストとして有用である。

また、上記結果に示されるように、ネイティブなDCIRリガンドであるKS - IIのDCIRに対する作用を指標として、DCIRを特異的に活性化又は抑制することができる物質を評価又は選択することができる。

【0068】

実施例7 破骨細胞生成に対する抗Dc ir 抗体の影響

さらに、ケラタン硫酸の作用を指標に、上記抗体の破骨細胞形成に対する作用を評価した。非接着骨髄細胞をウェルプレート(96ウェルプレート中 1×10^5 細胞/ウェル)の中に播種し、10%FCS(Biowest社製)及び10ng/mL M-CSF(R&D Systems社製)を含有するMEM(GIBCO)中で培養した。2日後、非接着細胞(リンパ球を含む)を洗い流し、残った接着細胞を骨髄由来マクロファージ(bone marrow-derived macrophage, BMM)として使用した。これらの破骨前駆細胞(pOC)を100ng/mL溶解性RANKL(Peprotech社製又はOriental Yeast社製)及び10ng/mL M-CSFの存在下でさらに培養することにより、破骨細胞を得た。培養期間中ハイブリドーマ上清(10分の1量)又はケラタン硫酸(KS - II; 10ng/mL)を加えた。3日後、細胞を回収し、TRAP染色を行い、TRAP陽性破骨細胞(核数3個以上)の数を計測した。未処理細胞をコントロールとした(NT)。

結果を図13に示す。ネイティブなDCIRリガンドであるKS - IIを添加した場合、破骨細胞への分化は抑制された(KS)。実施例5でケラタン硫酸よりも高いDCIR結合能を示したハイブリドーマ上清(DCIRアゴニスト(図13中3、4、5株))は、ケラタン硫酸に比べて破骨細胞分化を抑制した。実施例5でDCIRアンタゴニスト活性を示したハイブリドーマ上清は(図13中1、2株)、ケラタン硫酸に比べて破骨細胞分化を促進した。

これらの結果から、本発明のハイブリドーマ由来の抗体のようなDCIRアゴニストは、破骨細胞分化を抑制することにより骨量を増加させる作用を有し、骨粗鬆症等の骨減少性疾患、又は骨折などの骨の障害の治療に有用であることが示された。また、本発明の別のハイブリドーマ由来の抗体のようなDCIRアンタゴニストも、破骨細胞分化を促進することにより骨量を調整させる作用を有するので、各種骨疾患の治療に有用であることが示唆される。

【0069】

試験例

コラーゲン誘発関節炎に対する効果は、以下のようにして確認することができる。

材料と方法:

マウス

C57BL/6(B6)(H-2^b)

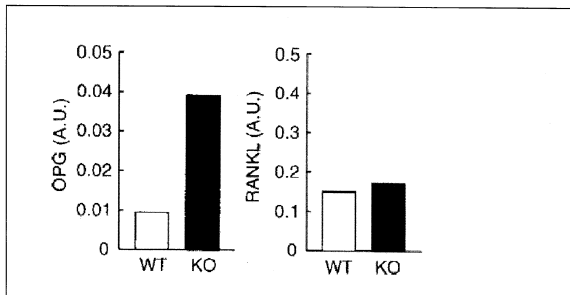
コラーゲン誘発関節炎(CIA):

完全プロイントアジュバント(CFA)は、20mLのIFA(Sigma Chemical社製, St. Louis, MO)に100mgの結核菌加熱死菌体(M. tuberculosis, H37Ra; Difco Laboratories社製, Detroit, MI)を破砕して調製する。エマルジョンは、2mg/mLチック(chick)II型コラーゲン(CII)(Sigma社製)を10mM酢酸に4で一晚溶解し、等容量のCFAに混ぜて調製する。該混合物を、シリンジ-シリンジ法を用いて乳化させる。CII溶液及びそのCFAエマルジョンは、常に新しいものを調製する。マウスは、尾部近傍の背基部の数か所に、総量で100µgのCII及び250µgの結核菌(M. tuberculosis)を含有100µlエマルジョンを皮内注射する。この注射を21日間繰り返す。

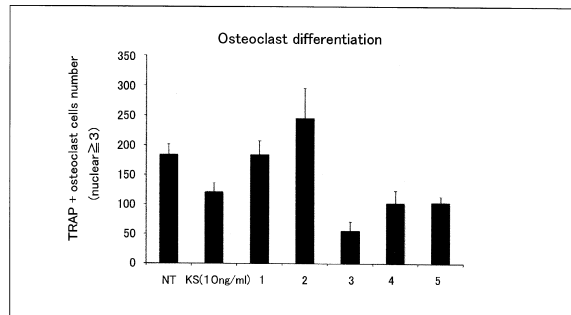
関節炎の臨床的評価：

動物について、肢の赤みと腫れについて評価する。

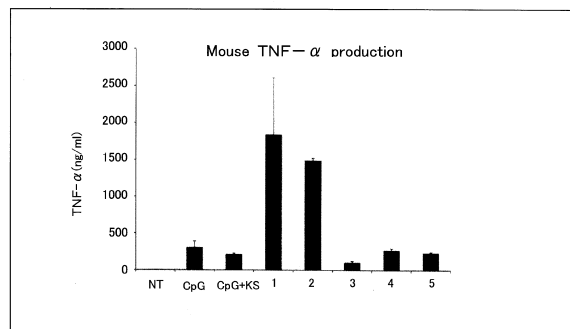
【図 1 1】



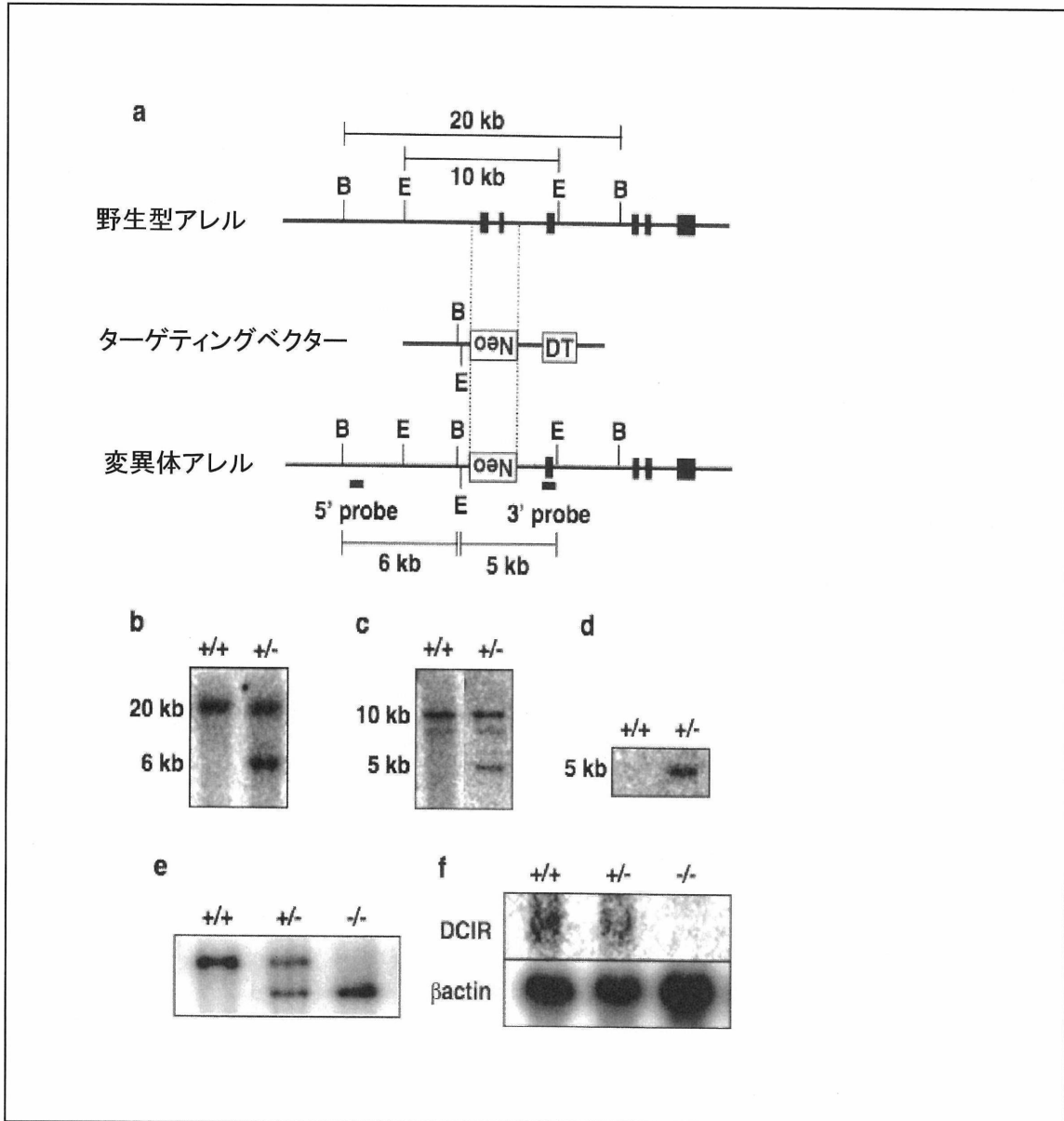
【図 1 3】



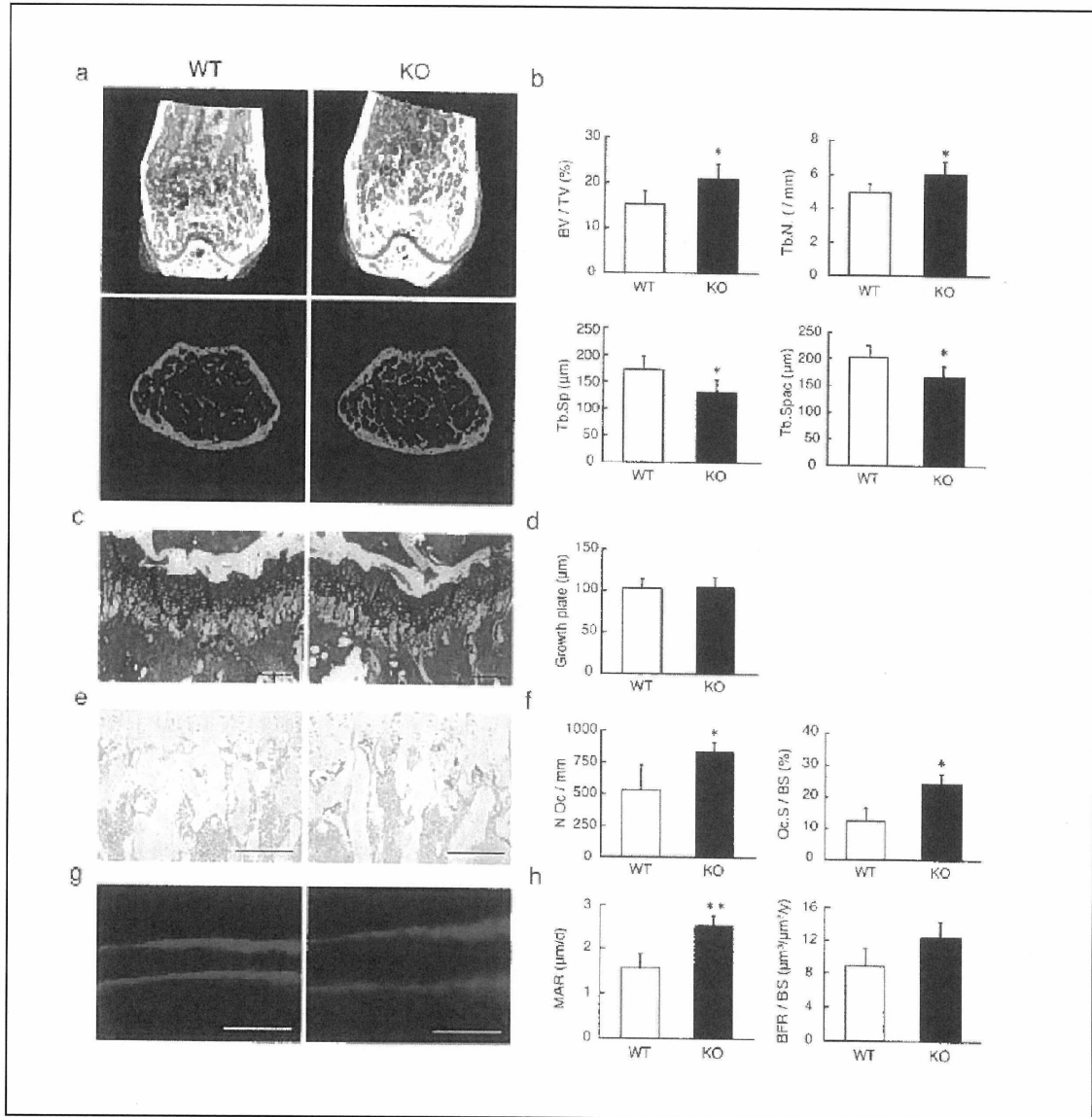
【図 1 2】



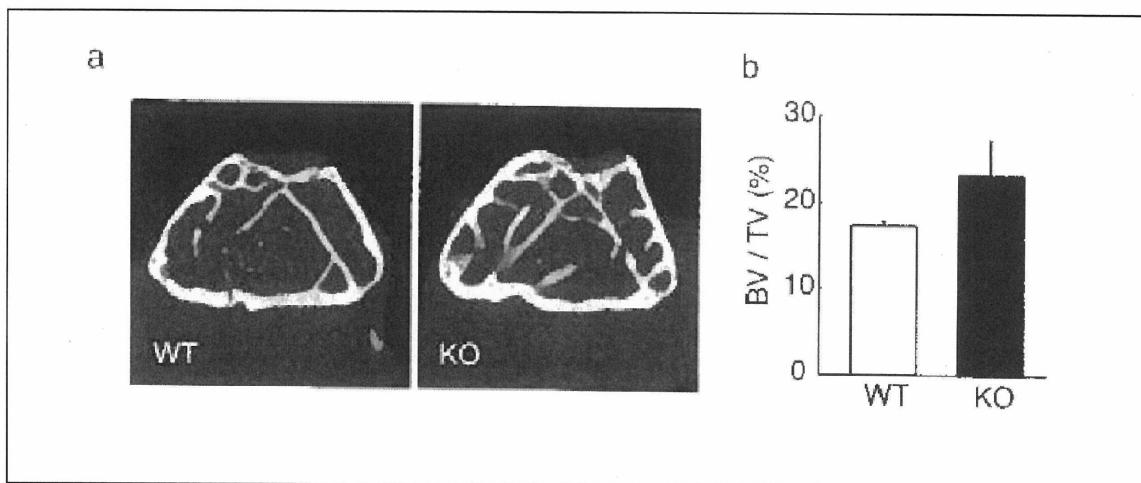
【 図 1 】



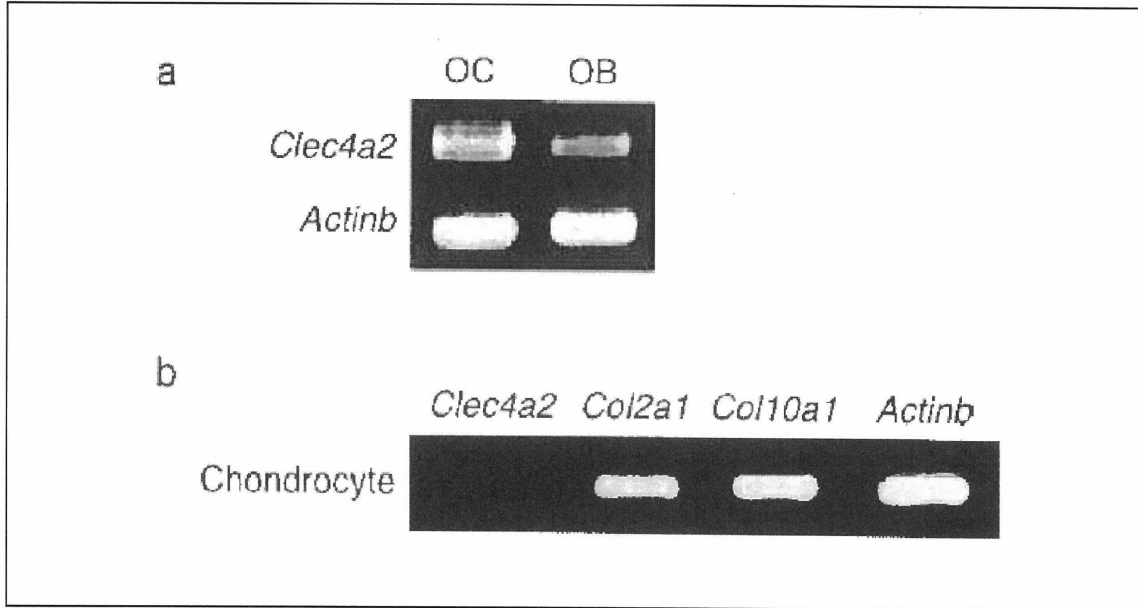
【 図 2 】



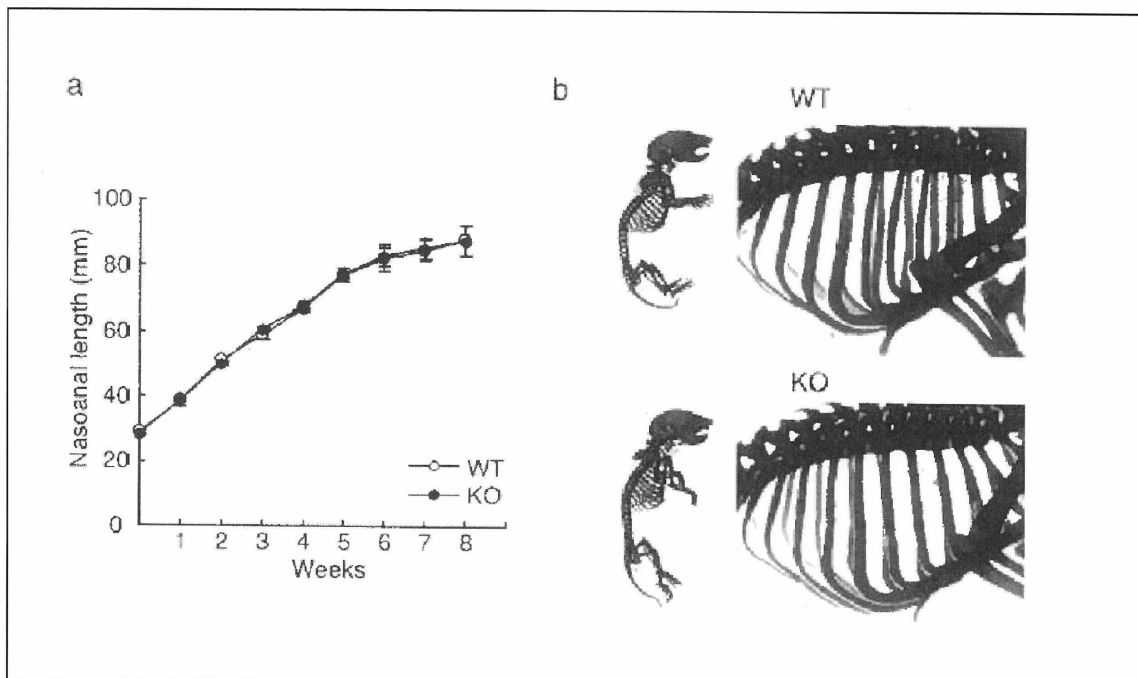
【 図 3 】



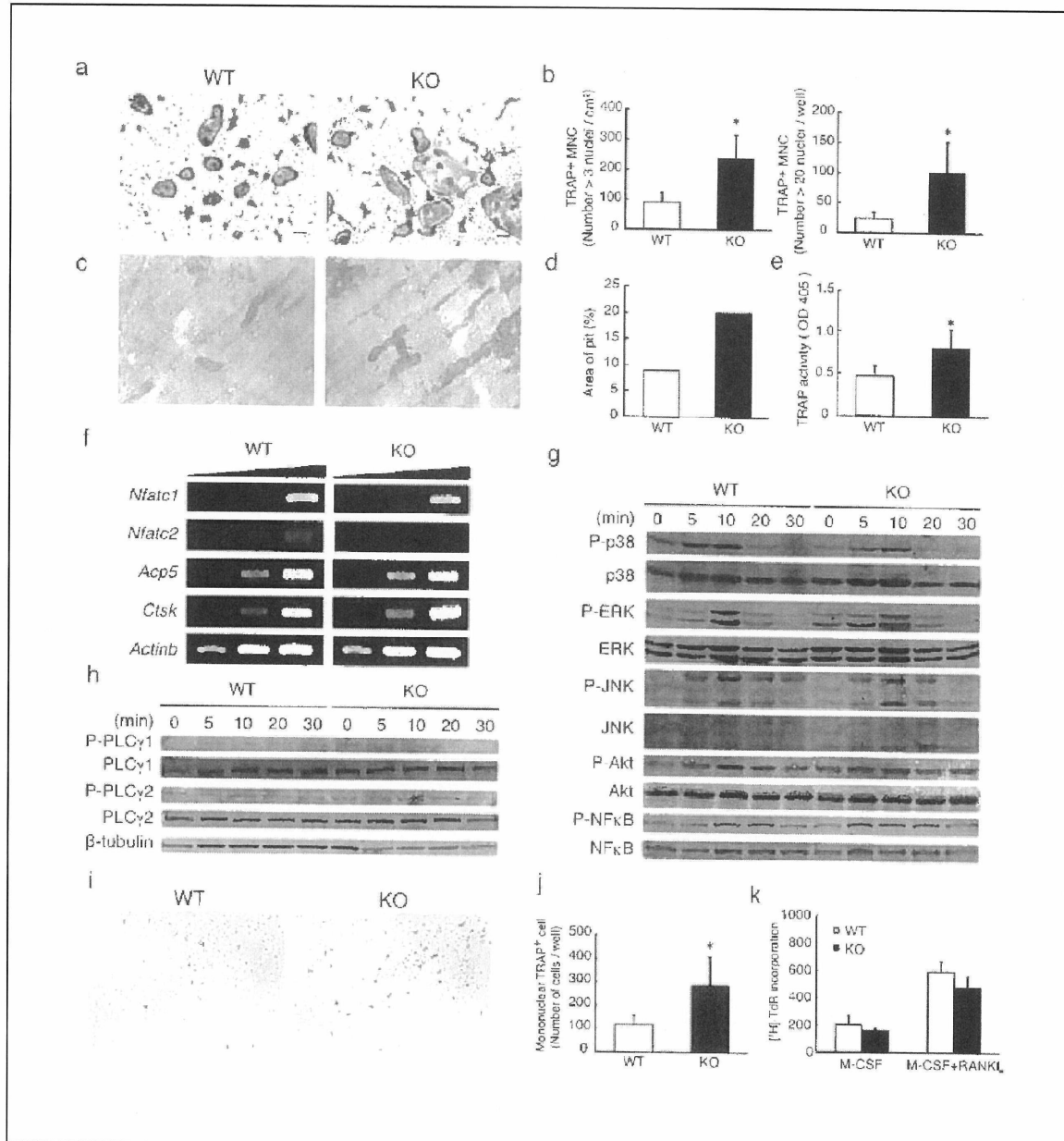
【 4 】



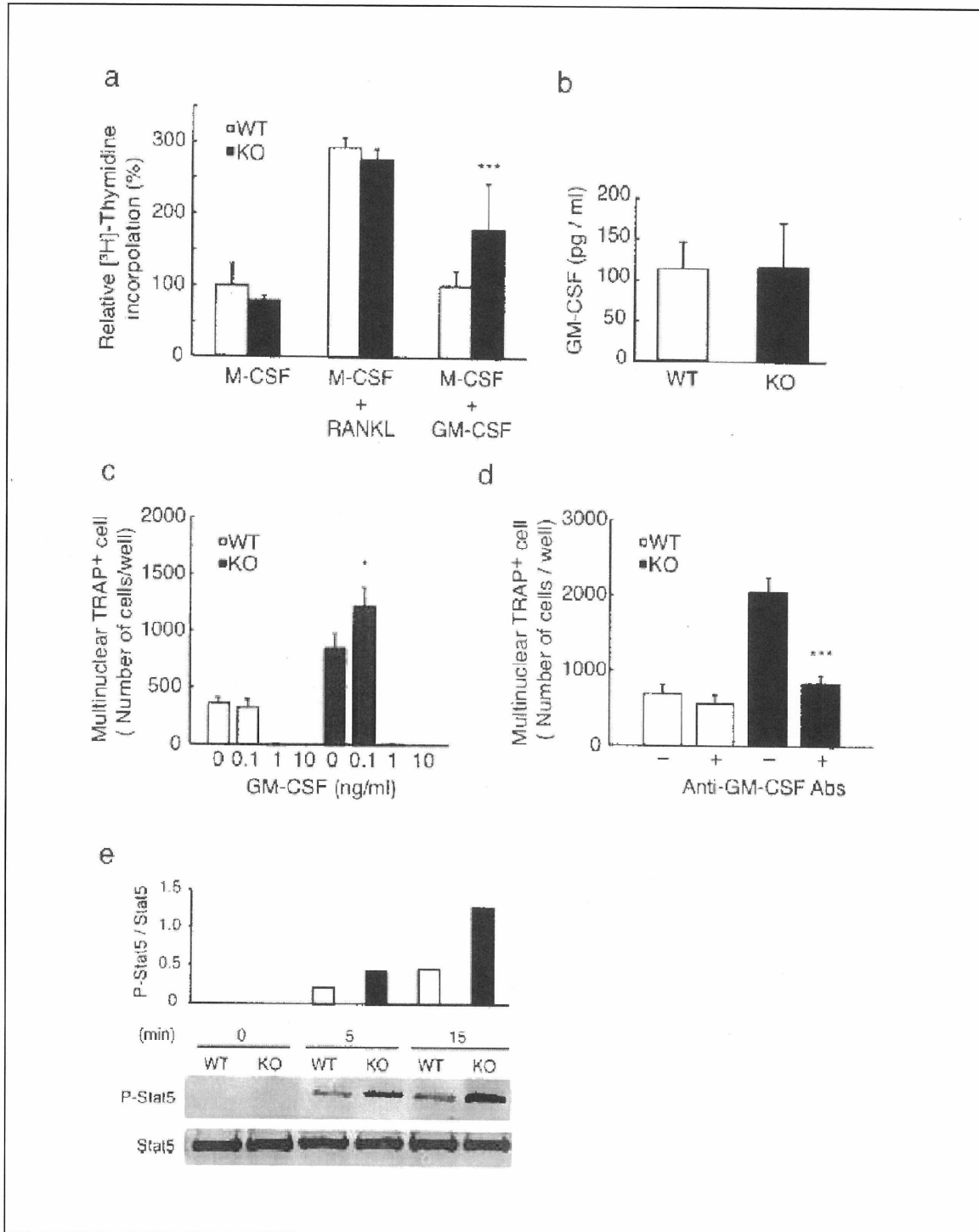
【 5 】



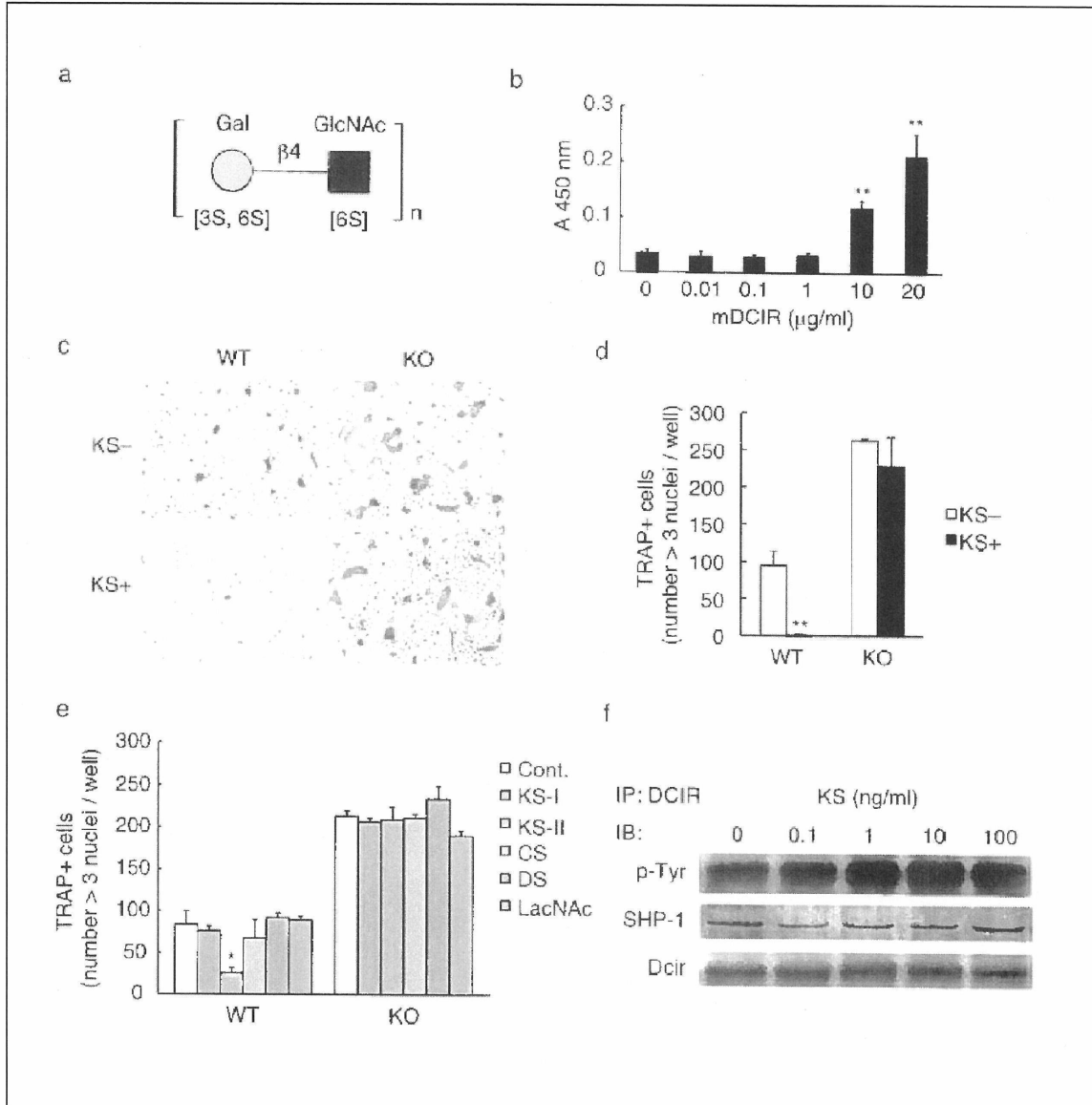
【 図 6 】



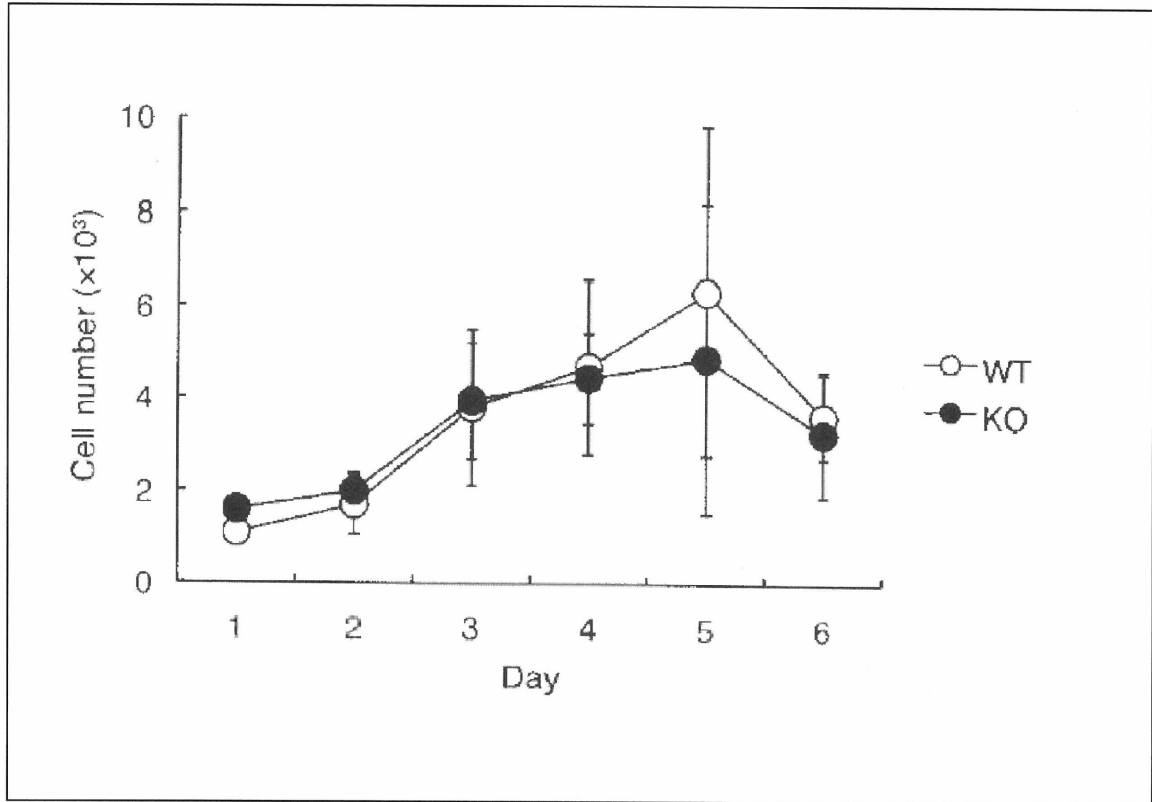
【 7 】



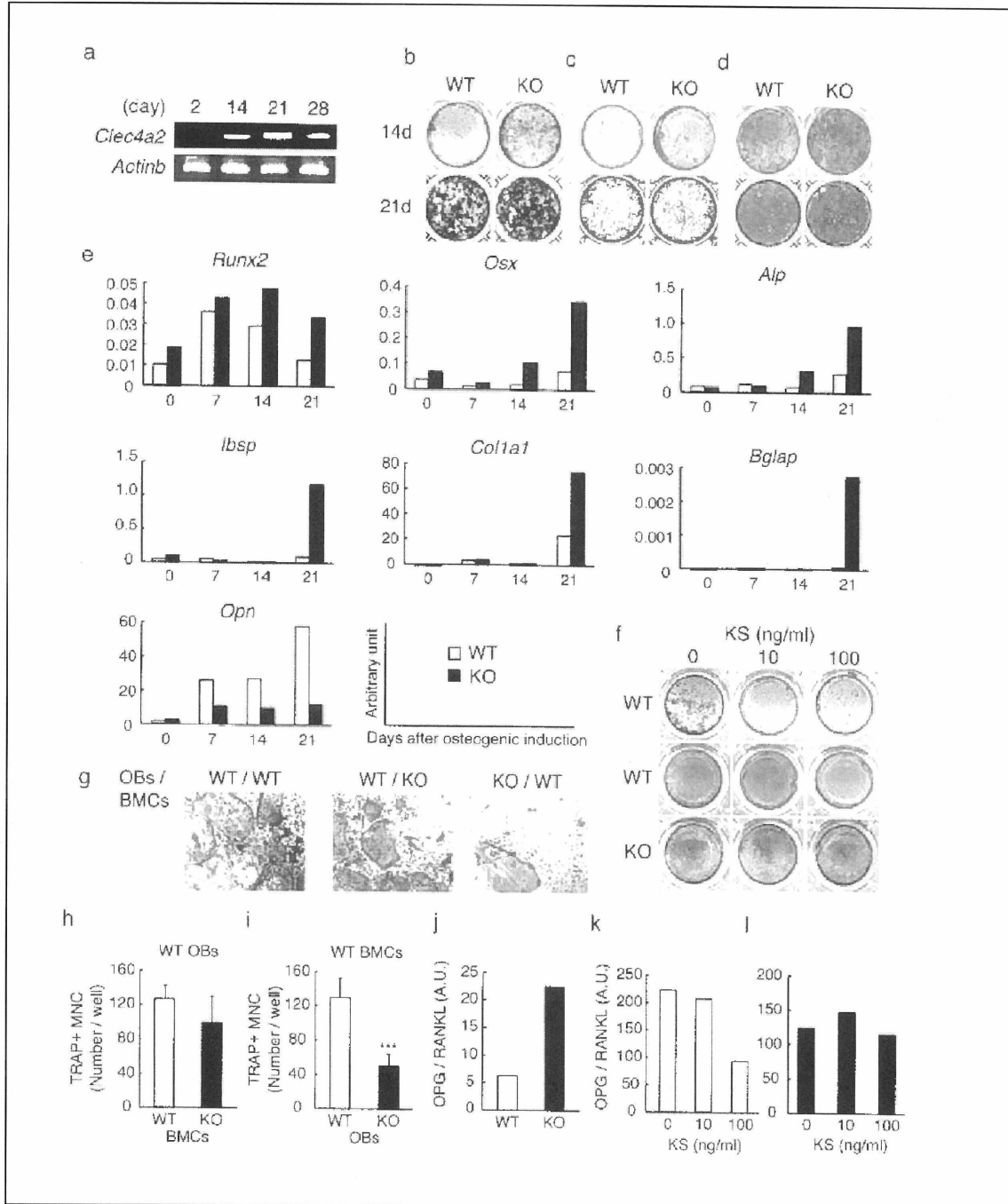
【 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【 配列表 】

0005641508000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 19/08	(2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 19/10	(2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
C 1 2 N 5/0784	(2010.01)	C 1 2 N 5/00	2 0 2 M
C 1 2 N 15/02	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	C

(72)発明者 岩倉 洋一郎
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 藤門 範行
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 馬 光宇
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

審査官 常見 優

(56)参考文献 特開2009-019044(JP,A)
国際公開第2008/097866(WO,A1)
特表2004-511254(JP,A)
特開2008-029319(JP,A)
Fujikado N, Saijo S, Yonezawa T, Shimamori K, Ishii A, Sugai S, Kotaki H, Sudo K, Nose M, Iwakura Y, Dcir deficiency causes development of autoimmune diseases in mice due to excess expansion of dendritic cells, Nature Medicine, 2008年 2月, vol. 14, no. 2, pp. 176-180

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
3 3 / 1 5
A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 3 / 4 4
A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4
4 9 / 0 0 - 4 9 / 0 4
5 1 / 0 0
A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

专利名称(译)	树突状细胞免疫受体兴奋剂		
公开(公告)号	JP5641508B2	公开(公告)日	2014-12-17
申请号	JP2012501817	申请日	2011-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人 东京大学		
申请(专利权)人(译)	东京大学		
当前申请(专利权)人(译)	东京大学		
[标]发明人	岩倉洋一郎 藤門範行 馬光宇		
发明人	岩倉 洋一郎 藤門 範行 馬 光宇		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/566 G01N33/50 G01N33/15 A61K39/395 A61P43/00 A61P19/08 A61P37/04 A61P29/00 A61P19/10 A61P19/02 C12N5/0784 C12N15/02		
CPC分类号	A61K31/737 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/04 A61P39/04 A61P43/00 C07K16/2851 C07K2317/76 G01N33/5047 G01N2400/40		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/566 G01N33/50.Z G01N33/15.Z A61K39/395.ZNAN A61P43/00.111 A61P19/08 A61P37/04 A61P29/00 A61P19/10 A61P19/02 C12N5/00.202.M C12N15/00.C		
代理人(译)	村田正树		
优先权	2010037204 2010-02-23 JP		
其他公开文献	JPWO2011105424A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

寻找DCIR的配体并探索其兴奋剂和拮抗剂。一种含有硫酸角质素-II (KS-II) 作为有效成分的树突细胞免疫受体刺激剂, 具有硫酸角质素-II 样树突状细胞免疫受体刺激作用的树突细胞免疫受体抗体, 硫酸角质素-II 抗树突细胞免疫受体的抗体, 具有抑制性树突细胞免疫受体拮抗作用。

