

(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2010-233572

(P2010-233572A)

(43) 公開日 平成22年10月21日(2010.10.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 G	4 H O 4 5
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 U	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	

審査請求 有 請求項の数 14 O L (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-106164 (P2010-106164)	(71) 出願人	506359886 ラボラトワ セローノ エス. エイ. スイス国、1170 オボヌ、ゾン アン ダストリエル ド ロリエタ
(22) 出願日	平成22年5月6日 (2010.5.6)		
(62) 分割の表示	特願2000-603370 (P2000-603370) の分割	(74) 代理人	100066692 弁理士 浅村 皓
原出願日	平成12年3月13日 (2000.3.13)		
(31) 優先権主張番号	99200746.8	(74) 代理人	100072040 弁理士 浅村 肇
(32) 優先日	平成11年3月11日 (1999.3.11)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100088926 弁理士 長沼 暉夫
		(74) 代理人	100102897 弁理士 池田 幸弘
		(72) 発明者	ビート・アルベール・イモフ スイス、ツェーハー-1233コンシュ、 シュマン・デ・ブージュリー-28番 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管接着分子およびその機能の調節

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】腫瘍の影響のもとに内皮で転写段階で制御されている免疫グロブリンスーパーファミリーの新規な接着タンパク質を探索し、たとえば腫瘍や炎症などの種々の適応症の治療に使用するための分子の提供。

【解決手段】コンフルエンシー制御接着分子2 (C R A M - 2) のアミノ酸配列と同一性を示すポリペプチド及び抗体。並びに炎症及び腫瘍の治療におけるその使用。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト免疫グロブリンスーパーファミリーのサブファミリーに属する単離した形態の新規なポリペプチドであって、図 3 の上および下の列にそれぞれ示すマウスコンフルエンシー制御接着分子 1 または 2 (CRAM - 1 または CRAM - 2) のアミノ酸配列と少なくとも 70% の配列ホモロジーを示すポリペプチド。

【請求項 2】

図 6 に示すヒト CRAM - 1 のアミノ酸配列と少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、さらに好ましくは少なくとも 90%、最も好ましくは本質的に 100% 相同なアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドに対する抗体。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドを有する細胞に対するターゲティング分子として使用するための請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

腫瘍における血管形成を抑制するのに使用するための請求項 3 または 4 に記載の抗体。

【請求項 6】

炎症反応の治療に使用するための請求項 3 または 4 に記載の抗体。

【請求項 7】

血管透過性の調節、とりわけ増大に使用するための請求項 3 または 4 に記載の抗体。

20

【請求項 8】

血管透過性の増大が、薬剤を送達するために腫瘍において達成される、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

毒素、放射性標識、蛍光標識、酵素標識、光活性化標識、リボソーム、薬剤および細胞よりなる群から選ばれた他の分子に結合される、請求項 3 ないし 8 のいずれかに記載の抗体。

【請求項 10】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドと本質的に同じアミノ酸配列を有する、炎症反応の治療に使用するための可溶性ポリペプチド。

30

【請求項 11】

請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも一部を有する、炎症反応の治療に使用するためのペプチド。

【請求項 12】

該アミノ酸配列の少なくとも一部が、細胞外ドメイン VC₂、および/または膜近位細胞質配列: A - [Y, Q] - [R, S] - [R, K] - G - [C, Y] - F を含む、請求項 11 に記載のペプチド。

【請求項 13】

血管透過性を調節するのに使用するための可溶性形態にある、請求項 1、2、11 および 12 に記載の (ポリ) ペプチド。

40

【請求項 14】

完全なポリペプチドまたはその一部をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドであって、該ポリペプチドが図 3 の上および下の列に示すアミノ酸配列と少なくとも 70% 相同なアミノ酸配列を有するものである、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド。

【請求項 15】

完全なポリペプチドまたはその一部をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドであって、該ポリペプチドが図 6 に示すヒト CRAM - 1 のアミノ酸配列と少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、さらに好ましくは

50

少なくとも90%、最も好ましくは本質的に100%相同なアミノ酸配列を有する、請求項14に記載のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド。

【請求項16】

図6に示すヒトCRAM-1のヌクレオチド配列と本質的に同一のヌクレオチド配列を有する、請求項15に記載のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド。

【請求項17】

ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドがRNAまたはDNAである、請求項14ないし16のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド。

【請求項18】

ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドがプライマー、プローブ、アンチセンスRNAなどである、請求項14ないし17のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド。

【請求項19】

デファレンシャルディスプレイ逆転写PCRを使用することを含み、その際、標的遺伝子に特異的な部分的にまたは完全に縮重したプライマーを1セット用いることを特徴とする、差別的に発現されたDNA配列の特異的な同定法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血管接着分子の新規なサブクラスの同定および種々の疾患の治療のためのこれら分子の機能の調節に関する。

【背景技術】

【0002】

胚発生および生後の初期の発生期を通じて、内皮細胞は脈管形成および血管形成により増殖、分化して新たな血管を形成する。成体の生物では内皮は血管-組織バリアーを定めており、細胞周期にない静止した細胞からなる。これらの極性化した細胞は互いに密着結合および接着結合により連結して細胞の連続した層を形成している。内皮層の機能は、組織ホメオスタシスの維持、繊維素溶解、血液凝固、血管緊張(vasotonus)および白血球の血管外遊出にある。これらの特性はすべて、接着分子の発現および機能の精妙な調律により制御されている。

【0003】

炎症、腫瘍の増殖、創傷または血管形成といった病的な状況は血管内皮上の接着分子の数および機能に一時的な変化をもたらし、このことが血管のホメオスタシスの変化という結果となる。一例として、腫瘍は血管新生因子の局所濃度を増加させ、このことが細胞周期にない静止した内皮細胞から増殖する内皮へのスイッチを引き起こす。血管形成のスイッチ(angio-genic switch)は、IL-8、上皮増殖因子(EGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、可溶性VCAM-1、塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)および腫瘍壊死因子(TNF)を含む幾つかの因子により引き起こされる。その結果、既存血管の内皮細胞は細胞外マトリックス(ECM)を分解して周囲の組織に侵入し、腫瘍の血管形成へと導く。

【0004】

血管形成のスイッチの間に内皮遺伝子の発現は変化する。たとえば、内皮細胞をbFGFまたはTNFで処理すると内皮細胞遊出に関係する接着分子である v_3 インテグリンの発現が4倍になる。さらに、血管形成のスイッチは内皮の炎症応答も変化させ、腫瘍への白血球の異常な移行に導く。通常は白血球は内皮に接着し内皮中を移行することによって血液から血管外遊出する。これらの機構は、セレクチン、インテグリンおよび免疫グロブリンスーパーファミリー接着分子が関与する多段階のプロセスで生じる。

腫瘍に関連する内皮では、VCAM、ICAMおよびセレクチンはダウンレギュレーションされることが示されている。これら接着分子のダウンレギュレーションは、腫瘍が免疫系の細胞障害性細胞の侵入を回避する機構を表している。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、腫瘍の影響のもとに内皮で転写段階で制御されている、免疫グロブリンスーパーファミリー (Ig S f) の新規な接着タンパク質を探索することにある。

本発明のさらなる目的は、たとえば腫瘍や炎症などの種々の適応症の治療に使用するための、該新規な接着タンパク質に由来する分子を定めることにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明に至る研究に際して、内皮細胞株とメラノーマ細胞との同時培養の間に制御される転写物を同定するため実験マウスモデルを用いた。スクリーニング戦略を Ig S f の接着分子に限定するため、「ターゲットデファレンシャルディスプレイ (Targeted Differential Display)」と称する RNA 提示の新規な方法を開発した。この改変提示法の新規な点は 1 セットのみの縮重 (degenerated) プライマーを用いることにある。実施例でも示すであろうように、驚くべきことに、このことが十分な特異性をもたらすことがわかった。

10

【0007】

さらに詳細には、Ig S f 成員の C₂ ドメインに見出される保存配列をターゲットングすべくデザインした、部分的に縮重したプライマー (本発明の場合、縮重のレベルは 1 セット内で 2048 ~ 4096 の異なる形態のプライマーである) をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) ベースのターゲットデファレンシャルディスプレイ法 (Samaridis & Colonna (1997) Eur. J. Immunol. 27, 660-665) を行うのに用いた。

20

【0008】

この知見に基づき、本発明は、デファレンシャルディスプレイ逆転写 PCR の使用を含む、差別的に発現された DNA 配列の特異的な同定方法を提供するものであり、該方法において 1 セットの部分的または完全に縮重した標的遺伝子に特異的なプライマーを用いる。従来の RNA 提示戦略の 1 つの主たる限界は、特異性が欠けていることである。この特異性を増大させる目的で、本発明者らは他の接着分子を探索するに際して C₂ ドメインを有する分子をコードする配列をターゲットングする縮重したプライマーを用いた。このことは幾つかの Ig S f 接着分子の C₂ ドメインのアラインメント、および C₂ ドメイン構造に参画しているシステイン残基周辺の線状アミノ酸コンセンサス: Y - (R Q Y S) - C - x - A - S - N - x₂ - G の同定によって達成された。さらに一般的な意味において、このアプローチはまた他の配列の探索にも用いることができ、その際、最も頻繁なコンセンサス配列の 1 またはそれ以上の逆翻訳を、デファレンシャルディスプレイに使用する縮重プライマーをデザインするために用いる。

30

【0009】

本発明の方法は、メラノーマ細胞または癌腫細胞の存在下でコンフルエンシー (集密さ; confluency) によって内皮細胞でダウンレギュレーションされる転写物の同定を可能とした。この cDNA は異常な構造特性を有する Ig S f の新規な分子をコードしており、「コンフルエンシー制御接着分子 (Confluency Regulated Adhesion Molecule)」として CRAM - 1 と名づけた。構造的に関連する分子である JAM (白血球の血管外遊出に關係する) の最近の記載は、接着分子の新たなファミリーの存在を示唆していたが、そのうち JAM および CRAM - 1 は基本形であった。EST データベースを用いた配列の比較は、この分子ファミリーの第三の成員である CRAM - 2 のクローニングを可能とした。図 1 は CRAM - 1 タンパク質および CRAM - 2 タンパク質をコードするマウス cDNA 配列を示す。本明細書では JAM と JAM - 1、CRAM - 1 と JAM - 2、および CRAM - 2 と JAM - 3 との名称は相互に同じ意味で用いる。

40

【0010】

JAM、CRAM - 1 および CRAM - 2 をコードする転写物の組織分布の比較は、これら分子が内皮および上皮の区画で優先的に発現されることを示しており、細胞 - 細胞接

50

触部の維持における役割を示唆している。これら静止した内皮細胞の細胞 - 細胞相互作用は、血管の透過性、細胞周期、および内皮壁を横切る白血球の血管外遊出を制御している。

【0011】

これら3つの分子の機能および相互作用をさらに解明するため、分子的なアプローチを用いた。この目的のため、可溶性の形態または膜結合形態のCRAM-1、CRAM-2またはJAMに融合したFlagタグおよびエンハンスドグリーン蛍光タンパク質(Enhanced Green Fluorescent Protein)(EGFP)からなるキメラ分子を構築した(図2に要約してある)。細胞株にトランスフェクションしたとき、CRAM-1およびJAMのEGFP融合産物は細胞 - 細胞接触部に局在し、これら分子の細胞 - 細胞コミュニケーションにおける役割が確認された。対照的に、CRAM-2は細胞表面上でより広範囲にわたって分布した。さらに、CRAM-1の可溶性構築物が白血球の経内皮移行をインビトロで阻止したのに対し、可溶性のJAMは下限に近い作用しか示さなかった。以上を総合すると、これら結果は、血管の完全さの維持および内皮層の機能におけるこの接着分子の新規なサブファミリーの中心的な役割を示唆している。

10

【0012】

これら知見に基づき、本発明は、CRAMポリペプチドに基づく試薬を用いて慢性の炎症や腫瘍の進行などの医学的適応症に対処する新規な手段を提供する。

さらに詳細には、本発明は、ヒト免疫グロブリンスーパーファミリーのサブファミリーに属する単離した形態のポリペプチドに関するものであり、該ポリペプチドは図3の上列および第二の列にそれぞれ示すようにマウスのコンフルエンシー制御接着分子1または2(CRAM-1またはCRAM-2)のアミノ酸配列との少なくとも70%の配列ホモロジーを示す。図4および図5は、それぞれ、アミノ酸レベルでのマウスJAM-2(CRAM-1)およびJAM-3(CRAM-2)間のアラインメントを示す。

20

【0013】

ヒトまたは動物の生体内に見出されるCRAMポリペプチドは、増殖する細胞のマーカである。CRAM発現は増殖している細胞ではアップレギュレーションされている。

本明細書に開示するのは、このファミリーの成員である2つの新規なマウスポリペプチドである。これらポリペプチドの配列情報に基づき、該ファミリーの他の成員をPCR、DNAライブラリー上でのクロスハイブリダイゼーション(crosshybridization)、抗体の交差反応性などのよく知られた手段により同定することができる。

30

【0014】

配列情報は、アミノ酸配列かまたは該アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列のいずれであってもよい。

それゆえ、さらに詳細には本発明は、本質的に図6Bに示すアミノ酸配列または該配列と少なくとも70%相同なアミノ酸配列を含む、ヒトの対応ポリペプチドに関する。

【0015】

ヒトなどの他の種における該ファミリーの他の成員を同定するために本明細書に開示した2つのCRAMタンパク質の配列情報を用いることに加えて、これら2つのタンパク質およびその対応ファミリー成員はまた、誘導分子、たとえば本発明の(ポリ)ペプチドに対する抗体、または任意に可溶性の形態の該タンパク質の組換え等価物、または該ポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも一部を含むペプチドなどの調製に用いることもできる。適当なアミノ酸配列の部分は、とりわけ細胞外ドメイン: VC₂、および膜近位細胞質配列(membrane proximal cytoplasmic sequence): A - [Y, Q] - [R, S] - [R, K] - G - [C, Y] - Fである。

40

【0016】

抗体および(ポリ)ペプチド型の誘導体に加えて、本発明はまた完全なポリペプチドまたはその一部をコードする配列を有するポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドにも関するものであり、該ポリペプチドは本明細書に開示するCRAM-1タンパク質またはCRAM-2タンパク質のアミノ酸配列に少なくとも70%相同なアミノ酸配列を有する

50

。さらに詳細には、本発明は、図6に示すヒトDNA CRAM-1配列に少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは本質的に100%相同なヌクレオチド配列に関する。

【0017】

そのようなポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、たとえば、RNAまたはDNAであってよく、プライマー、プローブ、アンチセンスRNAなどであってよい。

そのような分子はすべて、ヒトまたは動物の生体内に見出される元々のポリペプチドの機能を調節するため、または診断のために用いることができる。

たとえば腫瘍の場合の血管形成は抗体で抑制することができる。該抗体は、CRAMポリペプチドを有する細胞のターゲティング分子として用いることができる。これら抗体はそれ自体として作用させることもできるし、あるいは他の分子、たとえば毒素、放射性標識、蛍光標識、酵素標識、光活性化(photo-activatable)標識など、さらにリボソーム、細胞などに結合させることができる。

【0018】

標識抗体は抗体の診断における使用に特に適しており、増殖している腫瘍での血管形成を位置付けるのに利用できる。さらに、毒素や放射性分子に結合させた抗体は、腫瘍中で増殖している血管をターゲティングすることにより腫瘍を特異的に殺傷するのに用いることができる。

CRAM型の分子は、リンパ管、およびリンパ節やパイエル斑などのリンパ器官中の高内皮細静脈(high endothelial venules)を除いて通常の脈管系では検出されないことがわかった。このことの利点は、たとえば抗CRAM抗体のターゲティングをたとえば腫瘍細胞に対して極めて特異的に行えることであり、それゆえ望ましくない副作用を回避できる。

【0019】

さらに、本発明の(ポリ)ペプチドはまた血管形成性の血管上の分子に結合させてもよく、それにより血管形成を刺激もしくは抑制させてよい。

CRAMポリペプチドと本質的に同じアミノ酸配列を有する可溶性の(ポリ)ペプチドは、血管内皮の炎症反応の治療に用いることができる。本発明に従い、白血球の経内皮移行がsCRAM-1-IG2DまたはCRAM-1に対する抗体により抑制できることがわかった。それゆえ、この分子や類似の分子を用い、炎症において認められるような免疫反応を停止もしくは刺激することができる。

【0020】

リンパ球の移行に限定されるHEVの血管細胞上の分子のインビボでの特異的な発現は、リンパ球の移行または血管透過性に対するCRAMの刺激作用を支持するものである。それゆえ、この作用は通常、血管床(vascular bed)のシーリング(sealing)に関与する分子(CRAM-1、CRAM-2、JAM、PECAM、VE-カドヘリン)の変調によるものであり得る。この知見は、本発明の組換えCRAM分子(ポリ)ペプチドまたはCRAM-1に対するモノクローナル抗体を送達することによる、内皮間の結合の制御を含む本発明の他の応用の基礎となる。

【0021】

抗CRAM抗体はまた、増殖している細胞における細胞-細胞相互作用を阻止するのに用いることができる。このことは、血管のパリヤー機能に通常必要とされる細胞間接触の解体へと導く。この知見は、増殖している血管の透過性を増加させて、増殖している腫瘍、月経期後の子宮などの部位への薬剤の送達を増大させるのに用いることができる。それゆえ、細胞間接触の解体は、血管腫(血管内皮から生じる腫瘍)またはある種の速やかに増殖する癌腫などの抗原を有する腫瘍細胞の進行を阻止するのに用いることができる。

診断目的の使用のためには、標識抗体のみならずCRAMタンパク質を発現する内皮細胞で見出されるCRAM DNAまたはmRNAに相補的な標識オリゴヌクレオチドを利用できる。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

【図1】CRAM-1タンパク質およびCRAM-2タンパク質をコードするマウスcDNA配列。muCRAM-1をpcDNA3ベクターにサブクローニングし、Sp6プライマーおよびT7プライマーを用いてシーケンシングした。muCRAM-2はESTライブラリーからIMAGEクローンとして得られたものであり(Ac:AA690843およびW80145)、pT7T3-DPacベクター中でT7プライマーおよびT3プライマーを用いてシーケンシングした。

【図2】実施例に使用した分子的手段の模式図。新規なファミリーの構造および重要な残基を上側最上部のパネルに示す。星印は3つの分子の細胞質部分の中の推定リン酸化部位を示す。C2ドメインの第二のカノニカルCys残基はJAM配列では存在しない。下側には異なるキメラ分子が融合の位置および周辺残基とともに示してある。JAM、CRAM-1またはCRAM-2配列に由来する分子の部分は白色の背景に示してある。

【図3】CRAM-1アミノ酸配列およびCRAM-1アミノ酸配列のアラインメント。ギャップはダッシュで示してある。

【図4】マウスおよびヒトのCRAM-1(JAM-2)のアラインメント。

【図5】マウスおよびヒトのCRAM-2(JAM-3)のアラインメント。

【図6】ヒトCRAM-1の核酸配列(上側のパネル)、ヒトCRAM-1の全アミノ酸配列(中央のパネル)およびヒトCRAM-2の部分アミノ酸配列。

【図7】縮重プライマーを用いたターゲットデファレンシャルディスプレイ。(A): C2 Igドメインに存在する配列をコードするPCRプライマーのヌクレオチド配列を示す。2つのプライマーはSer残基をコードするコドンのために同じ配列をコードしている。縮重のレベルは、YRCXASをコードするプライマーについては4096の異なる形態、他のプライマーについては2048の形態である。(B): YYCXAS1プライマーを用いて得られた放射性PCR産物の提示を示す。各レーンは、t-end内皮細胞株(レーンt-end)、B16メラノーマ細胞株(レーンB16)、またはこれら2つの細胞株の同時培養(中央のレーン)から得られたcDNA上で行ったPCR産物の提示に対応する。矢印は、同時培養条件下でダウンレギュレーションされた転写物CRAM-1から得られた目的PCR産物を示す。

【図8】(A)コンフルエンシー制御接着分子1(CRAM-1)cDNAのヌクレオチド配列およびそれから導かれるアミノ酸配列。推定の疎水性シグナルペプチド(第一)および膜貫通領域(第二)には下線を引いてある。予測されるN-グリコシル化部位(やり損ない(strikeout))、ジスルフィド結合を形成しやすいシステイン(括弧)および可能なリン酸化部位のSer/Thr/Tyr残基(太字)を示す。(B)マウスCRAM-1タンパク質の構造モデル。細胞外部分は、2つの推定N-結合グリコシル化部位を有するVHおよびC2様Igドメインを示す。矢印は、ターゲットデファレンシャルディスプレイに用いた部分的に縮重したプライマー(YYCXAS1)によりターゲティングした領域を示す。

【図9】JAM、CRAM-1およびCRAM-2マウスタンパク質のアラインメント。同一の残基は黒く囲んであり、相同な残基は灰色に陰影を付してある。全体の同一性は、CRAM-2とCRAM-1とで36%、JAMとCRAM-1とで31%、JAMとCRAM-2とで33%;各ホモロジーは52%、52%および49%である。ギャップは配列中にダッシュで示してある。VドメインおよびC2ドメインのカノニカル保存残基(CysおよびTrp)は星印でマークしてある。

【図10】RT-PCRにより種々の細胞株で検出した(A)、またはノーザンブロットにより種々の組織で検出した(B)、JAM、CRAM-1およびCRAM-2をコードする転写物の発現。(A): RT-PCRは、TNFで処理した(レーン2および11はTNF処理したt-endに対応する)または処理していない(レーン3、4、6、7、9、12は、それぞれ、b-end、5、e-end、2、t-end V⁺⁺L⁻、t-end V^{1°}wL⁺⁺、TMEおよびt-endに対応する)内皮細胞株由来のcDNAで行う。レーン5および10は腫瘍細胞株B16(メラノーマ)およびKLN205

10

20

30

40

50

(癌腫)に対応する。レーン8は非形質転換胸腺上皮細胞株MTE4-14に対応する。レーン1はクローン化cDNAを含有するプラスミドでのJAM、CRAM-1およびCRAM-2増幅の陽性コントロールである。(B):マウスノーザンプロットへのP³²プローブのハイブリダイゼーションのオートラジオグラフ。各ハイブリダイゼーションに用いたプローブは左に示してある。JAMおよびCRAM-1のハイブリダイゼーションシグナルは2kbのサイズで検出できる。

【図11】確立された細胞-細胞接触部へのJAM-2およびJAM-1の局在。A:パラホルムアルデヒド固定化TME細胞に対して抗JAM-2抗体(a)または抗JAM-1抗体(b)を用いて免疫細胞化学を行った。矢印は細胞-細胞接触部へのタンパク質の特異的な局在を示す。棒は10μm。B:JAM-2-EGFP(a)およびJAM-1-EGFP(b)キメラ分子を、トランスフェクションした細胞間での細胞接触に特異的に局在させた。EGFP組換えタンパク質の富化は、トランスフェクションした細胞とトランスフェクションしていない細胞との間では観察されなかった(矢印の先)。棒は20μm。C:TME内皮細胞の表面ビオチン化後のJAM-2の免疫沈降。抗PECAM抗体(レーン1)および抗JAM-1抗体(レーン2)を、それぞれ、CRAM-XIXH36抗体(レーン3)で免疫沈降するための陰性コントロールおよび陽性コントロールとして用いた。分子量は右に示してある。D:CHOトランスフェクション細胞からのEGFP組換えタンパク質の免疫沈降。抗JAM-2(レーン2、3、6)、抗JAM-1(レーン1、4、5)を、トランスフェクションしていないCHO細胞(レーン1および2)、JAM-1-EGFPでトランスフェクションしたCHO細胞(レーン3および4)、またはJAM-2-EGFPでトランスフェクションしたCHO細胞(レーン5および6)からのビオチン化溶解物を免疫沈降するのに用いた。分子量は右に示してある。

【図12】ケモカインSDF-1の存在下または不在下でのTNF活性化内皮腫の単層を横切る脾細胞の移行。3種の内皮腫を用いた:野生型t.end.1、またはCRAM-1もしくはCRAM-2をコードするcDNAでトランスフェクションしたt.end.1。2つのモノクローナル抗体、F-26またはH-26(ともにマウスCRAM-1に対するラットのIgG1モノクローナル抗体である)について、血管外遊出に及ぼす能力を試験した。

【図13】コンフルエンシーの機能に対するCRAM-1の制御。HPRT cDNAおよびCRAM-1 cDNAに特異的なプライマーの混合物を用い、半定量的なPCRを行う。PCR反応を1.2%アガロースゲル上で行い、臭化エチジウムで染色する。レーン1、2および3は、それぞれ100%、50%および10%のコンフルエンシーに対応する。CRAM-1に対する弱いシグナルが100%コンフルエンシー(レーン1)において観察される。内皮細胞株(t.end.1およびTME)自体または腫瘍細胞株KLN205との混合物の培養条件を示してある。

【図14】マウス組織でのJAM-2(a)、JAM-1(b)または-アクチン(c)転写物のノーザンプロット分析。胚の交尾後の(pc)mRNA調製物および成体のmRNA調製物の結果を示してある。ハイブリダイゼーションシグナルのサイズを右に示す。

【図15】JAM-2、JAM-1、ZO-1およびPECAM発現の免疫組織学的分析。腎臓の連続切片(a~d)または腸間膜リンパ節からの切片(e~l)を、抗JAM-2抗体(a、e、i)、抗JAM-1抗体(b、f、j)、抗ZO-1抗体(c、g、k)または抗PECAM抗体(d、h、l)で染色した。各系列の写真(a~d、e~h、およびi~l)は、CCDの同一のセッティングで得られた。

【図16】内皮細胞上でのJAM-2発現。A:内皮細胞株(tEnd.1、eEnd.2およびTME)または扁平上皮癌細胞株(KLN205)上でのJAM-2、JAM-1、およびPECAM発現のサイトフルオロメトリー分析。点線のプロフィールはCD4に対する抗体を用いて得られた陰性コントロールを表す。B:新たに単離した内皮細胞上でのJAM-2のサイトフルオロメトリー分析。指示した器官をコラゲナーゼ/ディスペーゼ(dispace)消化により解離し、示したようにDiIAC-LDL、CD31および抗

10

20

30

40

50

JAM-2 または抗 JAM-1 抗体で染色した。ヒストグラムプロファイルは、DiIAC-LDL (FL-2) および CD31 (FL-3) に陽性の内皮細胞集団にゲートの開閉する (gating) ことにより得た。陰性のコントロールは、JAM-1 または JAM-2 に対する一次モノクローナル抗体を省くことにより得た。

【図17】(A) : 細胞-細胞接触部の形成の間の JAM-2-EGFP 局在。JAM-2-EGFP でトランスフェクションした CHO 細胞の単層形成の間に単一の蛍光写真を3分毎に1時間得た。最初の18分間に得た写真を示す。時間0において星印は視野に存在する3つの細胞を認めている。時間6、12 および18分では、矢印は新たに形成された細胞-細胞接触部への JAM-2-EGFP の再局在を強調している。(B) : 創傷後の JAM-2-EGFP の局在。矢印は創傷部位を示しており、矢印の先は JAM-2-EGFP に富む膜プロセスを強調している。経過した時間を写真に示してある。棒は10 μm 。

【図18】JAM-2 発現はパラ細胞 (paracellular) 透過性を低下させる。(A) : パラ細胞透過性の評価は、トランスフェクションしていない CHO 細胞単層、Tac(huIL2R) または所定の EGFP 融合タンパク質 (JAM-1 または JAM-2) でトランスフェクションした CHO 細胞での FITC-デキストラン拡散により行った。CHO 細胞の JAM-2-EGFP または JAM-1-EGFP でのトランスフェクションは、パラ細胞透過性の有意な低減に導いた (それぞれ、57.8% + / - 4.9 および 70.8% + / - 3.6) のに対し、Tac でのトランスフェクションはパラ細胞透過性に有意の影響を及ぼさなかった (100.4% + / - 4.4、 $p = 0.9872$)。結果をトランスフェクションしていない CHO 細胞に正規化した。

【図19】既存の密着結合への JAM-2-EGFP (A) および JAM-1-EGFP (B) のターゲティング。JAM-2-EGFP (A) または JAM-1-EGFP (B) で安定にトランスフェクションした集密的な MDCK 細胞を抗オクルディンおよび抗ウサギ Texas Red で染色した。基底レベルから先端レベルまでの各 0.9 μm の一連の写真を EGFP 蛍光 (a) またはオクルディン染色 (b) について示す。左側にある基底レベルは、一連の写真が +3.6 および +4.5 μm の焦点で (右に向かって第四または第五の写真) 密着結合レベルを含むように恣意的に定めた。

【図20】白血球の経内皮移行に対する可溶性の組換えタンパク質の作用。(A) : 細胞外遊出を相対的な率で表し、処理していない t-end 細胞株で得られた値 (破線、率1) に正規化した。1 μg の sJAM-Ig2do (白抜き四角) または 1 μg の sCRAM-1-Ig2do (黒丸) の存在下で得られた結果を示す。率は5回の独立した血管外遊出実験の平均として計算してある。(B) : 血管外遊出した細胞の表現型を、Facs 分析の後に抗 CD3-FITC および抗 B220-PE で染色して得たパーセントから計算した細胞数として表してある。星印はコントロールと比べて有意の差異のある実験点を示す。

【0023】

下記実施例において、JAM と JAM-1、CRAM-1 と JAM-2、CRAM-2 と JAM-3 とは相互に同じ意味で用いてある。

【実施例】

【0024】

材料および方法

細胞株

胸腺 (tEnd.1) および胚 (eEnd.2) 内皮腫細胞株 (Williams 5、1989、Ce ll 57: 1053-1063) は W. Risau 博士および B. Engelhardt 博士 (Max Planck Institute、バード-ノイハイム、ドイツ) により提供された。SV40 形質転換リンパ節内皮細胞株 TME は A. Hamann 博士により提供された (Harder 5、1991、Exp. Cell. Res. 197: 259-267)。扁平上皮癌 KLN205、CHO、MDCK、およびミエローマ細胞株 Sp2/0 はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) から入手した。CHO を除いて細胞はすべて、10% FCS (PAA Laboratories、リンツ、オーストリア)、2

10

20

30

40

50

mMのグルタミン、100U/mlのペニシリンおよび100U/mlのストレプトマイシン(すべてGibco BRL、ペーズリー、スコットランド)を添加したDMEM(Gibco BRL)で増殖させた。CHO細胞は、上記を添加したNut.Mix.F-12(HAM)培地で増殖させた。附着した細胞はPBS/0.15mM EDTAで洗浄し、ついでトリプシン/EDTA中、37℃で5分間インキュベートすることにより剥がした。

【0025】

提示、クローニングおよび配列分析

同時培養実験のため、 5×10^5 のt.End.1細胞を 2.5×10^4 のB16F10ミエローマ細胞とともに10cm組織培養皿で64時間増殖させた。コントロールとして 5×10^5 のt.End.1細胞および 2.5×10^5 のB16F10細胞を同条件で別々に増殖させて64時間後に集密的な単層という結果となった。トリゾール試薬を用い、製造業者(Gibco BRL、ペーズリー、スコットランド)の指示に従って全RNAをペトリ皿中で直接抽出した。オリゴdT(16-mer)プライマーおよびスーパースク립ト逆転写酵素(Gibco BRL、ペーズリー、スコットランド)を用い、cDNAを5 μ gの全RNAから調製した。

10

【0026】

ハウスキーピング(housekeeping)HPRT cDNAに特異的なプライマーを用い、1:5に希釈した1 μ lのcDNAについてPCRを27サイクル行うことによってcDNAの品質および量をチェックした。ついで、C₂ドメインで最も頻繁に認められるアミノ酸配列:YRCXAS、YQCXAS、およびYYCXASをコードする下記の縮重プライマー:

20

【化1】

5'TAYAGNTGYNNNGCYTCYAA3'

【化2】

5'TAYCRGTGYNNNGCYTCYAA3'

30

および

【化3】

5'TAYTAYTGYNNNGCYTCYAA3'

を用いてデファレンシャルPCRを行った。PCRの条件は、2 μ lの希釈cDNA; 2.5 μ lの10XゴールドスターPCR緩衝液; 2 μ lのMgCl₂; 2 μ lの縮重プライマー0.3mM; 0.5 μ lのdNTP 0.1mM; 0.1 μ lのP³³dATP 10mCi/ml(Amersham Pharmacia Biotech、デューベンドルフ、スイス); 15.65 μ lのH₂O; 0.25 μ lのゴールドスターTaqポリメラーゼ(Eurogentech、セラリング、ベルギー)を使用することからなっていた。

40

【0027】

PCRのパラメータは以下の通りであった: 94℃で45秒、50℃で90秒、および72℃で45秒を40回繰り返した。ホルムアミド/EDTA負荷緩衝液を加え、94℃で2分間変性させた。ついで、PCR生成物を6%ポリアクリルアミドゲル上で分離し、コダックOM-Matを用いてオートラジオグラフィーを得た。バンドの強度を比較した。

【0028】

50

差別的に発現されたバンドを乾燥したポリアクリルアミドゲルから切り出し、以前に記載されたようにして (LiangおよびPardee, 1992, *Science*, 257: 967-970) 沸騰およびエタノール沈殿させることにより断片を回収した。ついで、 P^{32} -ATPなしで濃度を高めたdNTP (2 μ Mの代わりに0.2 mM)を用いてPCR生成物を再度増幅させた。再度増幅させた生成物を、以前に記載されたようにして (Sambrook, FritschおよびManiatis; *Molecular cloning*; 第2版; コールド・スプリングス・ハーバー・ラボラトリー・プレス; 1989) pGem-T Easyベクター (Promega Corp、ワリセレン、スイス) にクローニングした。

【0029】

2つの独立したクローンの核酸配列を、サーモシークエンス蛍光標識プライマーサイクルシークエンシングキット (Amersham Pharmacia Biotech、デューベンドルフ、スイス) およびLI-COR DNA分析システム (MWG-Biotech GmbH、エーベルスベルク、ドイツ) を用いて決定した。

10

【0030】

JAM-3の同定

配列分析および比較は、EXPASyモレキュラーバイオロジーサーバーで利用できるアプリケーション、すなわちBLAST、Prosite、Swiss-Protにより行った。CRAM-1に相同な3つの異なるESTが同定された (受け入れ番号AA726206、AA052463およびAA175925)。これらのいずれも完全長の転写物をコードしておらず、開始のATG配列を含んでいた。それゆえ、cDNA末端の迅速な増幅のための5' RACE-PCRシステム、バージョン2.0を用い、製造業者 (Gibco BRL、ペーズリー、スコットランド) の指示に従って5'コード配列を得た。

20

【0031】

使用した3つのプライマーは、EST配列に基づいて以下のようにデザインした：第一の鎖の合成のための

【化4】

5'-GAGGTA CTTGCATGTGCT-3'

30

2つのネステッド (nested) PCRのための

【化5】

5'-CGACAGGTGTCAGATAACA-3'

および

【化6】

5'-CACCTCCTCACTCGT-3'

40

5' RACE-PCR生成物をpGem-Tベクターにクローニングした。CRAM-1の完全長のコード配列を得るため、クローニングした5' RACE-PCR生成物およびEST (受け入れ番号AA726206) をHpaIおよびNotI制限酵素で消化し、pGem-tベクターにライゲートした。完全長のCRAM-2のクローニングも同様の配列比較および5' RACE法に基づいて行った。CRAM-2をコードする完全長のcDNAは、最終的にEST受け入れ番号: AA690843およびW80145から得た。これら2つのクローンは3'の非翻訳領域の長さが異なっている。

【0032】

50

ノーザンブロット

細胞および組織からの全mRNAをトリゾール (Life technologies AG、バーゼル、スイス) を用い、製造業者の指示に従って抽出した。250 μg の全RNAからオリゴテックスマRNA精製キット (Qiagen、チューリッヒ、スイス) を用いてポリA⁺mRNAを抽出した。胚のポリAノーザンブロットはCLONTECH (P. H. Stehelin and Cie AG、バーゼル、スイス) から購入した。リボプローブはpcDNA3ベクター (Invitrogen、リーク、オランダ) から調製し、JAM-1およびJAM-2の免疫グロブリンドメインをコードする配列またはアクチンの完全長コード配列を含んでいた。ハイブリダイゼーションは50%ホルムアミドを含有する緩衝液中で62℃にて行った。ついで、ブロットを2回洗浄し (0.5×SSC、0.1%SDS、67℃)、コダックX-Omat上、-80℃でオートラジオグラフィーを得た。

10

【0033】

コンフルエンシー実験

JAM-2 mRNAレベルに及ぼす内皮細胞のコンフルエンシーの影響を調べた。2×10⁵のTME内皮細胞を6cm、10cmおよび15cmの直径の培養皿で培養して64時間後に10~100%の範囲の異なるレベルのコンフルエンシーに達した。トリパンプルー排除およびカウンティングによりチェックした64時間後の細胞数はすべての場合と同じであり、ペトリ皿の表面積に無関係であった。

【0034】

半定量的PCR反応またはノーザンブロットティングを用いて種々の条件での転写物の相対量を決定した。JAM-2転写物の検出には下記プライマーペア：

20

【化7】

5'-GACTCACAGACAAGTGAC-3'

および

【化8】

5'-CACCCCTCCTCACTCGT-3'

30

を用い、750bpの増幅生成物を得た。内部コントロールとしてHprt cDNAに特異的な下記プライマーを用い、350bpの長さの断片を増幅させた：

【化9】

5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3'

および

【化10】

5'-GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT-3'

40

【0035】

発現ベクターの構築

EGFPをコードする配列をHindIIIおよびNotI部位を用いてpEGFP-1ベクター (CLONTECH、P. H. Stehelin and Cie AG、バーゼル、スイス) からpcDNA3中にサブクローニングし、それゆえpcDNA3/EGFPと名付けた。JAM-2およびJAM-1の細胞質ドメインをそれぞれコードする配列で見出された3'制限部

50

位、HpaIおよびScaIを用い、2つの配列をp c D N A 3ベクター（Invitrogen、リーク、オランダ）中のE G F PのN末端で融合させた。J A M - 2またはJ A M - 1をコードする挿入物を、それぞれScaI / HpaI消化またはHindIII / ScaI消化を用いてp G e m tまたはp R c / C M Vから切り出した。

【0036】

ついで、AgeIで消化し、充填により平滑末端にし、さらにHindIIIまたはSacI酵素で消化したp c D N A 3 / E G F Pベクターにコード配列をクローニングした。このことにより、J A M - 2についてはD G V₂₉₁、J A M - 1についてはQ P S₂₈₅のアミノ酸位置での融合部位という結果となった。C H O細胞のトランスフェクションは以前に記載されたようにして行った（Ballestremら、1998, J. Cell. Sci. 111: 1649-1658）。

10

【0037】

透過性アッセイに用いた安定なトランスフェクタントは、トランスフェクションしたC H O細胞を1 m g / m lのG 4 1 8を含有する培地で2週間増殖させることにより選択した。耐性コロニーは、フローサイトメトリー（F A C S c a l i b u r装置、Becton Dickinson、マウンテンビュー、カリフォルニア）によるE G F P蛍光強度および顕微鏡観察（Axiovert、ツァイス、オーバーコッペン、ドイツ）による蛍光の局在について単離、チェックした。

時間経過ビデオ顕微鏡観察を、Axiovert蛍光顕微鏡および画像形成のためのOpenlabソフトウェアを用いて行った。

20

【0038】

哺乳動物発現ベクターp c D N A 3（Invitrogen、リーク、オランダ）をF l a g - タグ（G. Wiedle、病理学部、C M U、ジュネーブ）コード配列を組込んで改変した。J A M、C R A M - 1およびC R A M - 2タンパク質の可溶性のコード配列を含むF l a g - タグ構築物をP C Rにより調製した。いずれの場合もフォアワードプライマーはA T G開始領域に適合するようにデザインした。リバースプライマーは、1つのI g可溶性のヒンジ領域をコードする配列か、または2つのI gドメイン可溶性分子のC 2ドメインと膜貫通ドメインとの間の領域をコードする配列でデザインした。すべてのリバースプライマーは、F l a g - タグ改変ベクター中に直接インフレームでクローニングするためのX b a I制限部位を含む3'伸長を有していた。P f u D N AポリメラーゼをP C Rで用いて、頻繁に起る突然変異を回避した（Stratagene、ラジヨラ、カリフォルニア、米国）。ついで、P C R断片をX b a Iで消化し、p c D N A - 3 F l a g - タグベクター（E c o R Iで消化し、クレノーで充填し、ついでX b a Iで消化したもの）中にクローニングした。

30

【0039】

試薬および免疫蛍光分析

以下のモノクローナル抗体を用いた：抗P E C A M（G C 5 1、ラットI g G_{2a}；E A - 3、ラットI g G₁）および抗J A M（H 2 0 2 . 1 0 6 . 7 . 4、ラットI g G₁）（Malergueら、1998, Mol. Immunol. 35: 1111-1119; Pialiら、1993, Eur. J. Immunol. 23: 2464-2471）。

40

J A M - 2に対するC R A M抗体のパネルは、標準法および免疫原として組換えの可溶性分子（Aurrand-Lionsら、1996, Immunity 5: 391-405）を用いて実験室で生成させた。選択したハイブリドーマは、組換えの可溶性J A M - 2分子を特異的に認識する抗体の産生についてE L I S Aによりスクリーニングした。陽性のクローンは、J A M - 2 c D N AでトランスフェクションしたC H O細胞でさらに試験した（示していない）。

【0040】

C R A M抗体は、C R A M - 2 5 F 2 4がI g G_{2b}サブクラスであるのを除いて全てI g G₁またはI g G_{2a}イソ型である。抗体の精製は、プロテインGセファロースカラム（Amersham Pharmacia Biotech、デューベンドルフ、スイス）上で製造業者の指示に従って行った。C R A M - 1 9 H 3 6モノクローナル抗体は免疫沈降に用い、一方、C R A

50

M - 1 8 F 2 6 は免疫組織化学の試薬として用いた。同様の結果は C R A M - 4 H 3 1 および C R A M - 1 7 D 3 3 モノクローナル抗体を用いても得られた。

免疫蛍光分析は、F I T C またはテキサスレッド (Jackson Immunoresearch、Milan AG、La Roche、スイス) に結合させた二次試薬をそれぞれサイトフルオロメトリーおよび免疫組織化学に用いて行った。

【 0 0 4 1 】

免疫組織化学の場合、試料を冷 (- 2 0) メタノールで 5 分間固定した。試料を P B S、ゼラチン 0 . 2 %、T w e e n 2 0 0 . 0 5 % 中で再水和し、洗浄前に一次抗体とともに一夜インキュベートし、ついでテキサスレッドに結合した適当な二次試薬で暴露した。新鮮な内皮細胞の分析の場合には、新たに切り出した組織の解離を確立された手順 (Kramerら、1984, *J. Cell. Biol.* 99: 692-698) に従ってコラゲナーゼ / ディスパーゼ消化を用いて行った。解離した細胞を、抗 C R A M - 1 9 およびヤギ抗ラット - F I T C プローブで染色する前に D i I - アセチル化 L D L (Molecular Probe Europe BV、ライデン、オランダ) で 3 7 にて 2 時間染色した。3 回洗浄後、細胞をビオチン化抗 C D 3 1 (Pharmingen) およびストレプトアビジン R e d 6 7 0 (Life technologies AG、バーゼル、スイス) で染色した。

J A M - 1 発現または J A M - 2 発現を、2 つの内皮細胞マーカー : アセチル化 L D L (F L - 2) および C D 3 1 (F L - 3) について陽性の細胞で分析した。陰性のコントロールは一次抗体を省くことにより得た。

【 0 0 4 2 】

免疫沈降

免疫沈降は、1 0 m M トリス - H C l 緩衝液、p H 7 . 4、1 5 0 m M N a C l、0 . 5 % トリトン X 1 0 0、0 . 5 % N P 4 0、溶解のためのプロテアーゼインヒビターカクテル (Roche Diagnostics Ltd.、ロートクロイツ、スイス) を用い、以前に記載されたようにして行った (Aurrand-Lionsら、1997, *Cellular Immunology*, 176: 173-179)。免疫沈降、S D S / P A G E、およびニトロセルロースメンブレンへの移動後、ペルオキシダーゼ (Jackson Immunoresearch) および E C L (Amersham Pharmacia Biotech、英国) に結合したストレプトアビジンを用いてビオチン化タンパク質を暴露した。

【 0 0 4 3 】

透過性アッセイ

透過性はトランスウエルチャンバ (6 . 5 m m の直径、P C フィルター、0 . 4 μ m の孔径、Costar Corp.) を用いて測定した。簡単に説明すると、 1×10^4 のトランスフェクションしたまたはトランスフェクションしていない C H O 細胞を、0 . 2 % ゼラチンで前以て 3 0 分間コーティングしたフィルター上でコンフルエンシーまで培養した。5 日後、培地を F C S 不含の前以て温めた N u t / F 1 2 培地 (下のチャンバは 5 0 0 μ l、上のチャンバは 2 0 0 μ l) に変えた。F I T C - デキストラン (M W 3 8 , 9 0 0、Sigma Chemical Co.) を上のチャンバに 1 m g / m l の最終濃度で加えた。

1 時間後、チャンバを取り出し、Cytofluor II を用いて蛍光を下のチャンバで直接読み取った。5 つの独立したチャンバの平均蛍光強度を計算し、Statview ソフトウェアおよび t - 検定不対 (unpaired) 比較を用いて比較した。実験を正規化するため、野生型の C H O 細胞で得た平均蛍光強度の値を 1 0 0 % とした。

【 0 0 4 4 】

可溶性分子のトランスフェクションおよび精製

可溶性の I g 1 D o および I g 2 D o F l a g t a g / p c D N A - 3 構築物による 2 9 3 T、B o s c 2 3 の一過性のトランスフェクションまたは C H O 細胞の安定なトランスフェクションを、リポフェクタミン試薬を用い、製造業者 (Gibco BRL、ペーザリー、スコットランド) の指示に従って行った。トランスフェクション後、1 0 日の期間の間、2 日毎に上澄み液を回収した。抗 F l a g 抗体に共有結合させた M 2 ビーズ (Kodak、ニューヘブン、米国) を、プロテアーゼインヒビター混合物を含有する P B S (Boehringer Mannheim、ドイツ) で 2 回洗浄した。ついで、ビーズをトランスフェクションした細

10

20

30

40

50

胞からの上澄み液とともに4で3時間インキュベートした。プロテアーゼインヒビターを含有するPBSで5回洗浄した後、カラムにビーズを充填し、組換え分子を10mMグリシン緩衝液pH3.4を用いて製造業者の指示に従って溶出した。ついで、組換えタンパク質を含む溶出フラクションをCentricon-10 (Millipore)で濃縮し、PBSに対して透析した。

最終的なタンパク質濃度はマイクロBCAアッセイ (Biorad) を用いて決定した。ついで、精製した生成物をポリアクリルアミドSDSゲル電気泳動に供し、ついでクーマシーブルー染色を行ってその純度を分析した。

【0045】

血管外遊出アッセイ

内皮細胞を横切る白血球の血管外遊出を以前に記載されたようにして行った (Wheerasingheら、1998, *J. Cell. Biology*, 142: 595-607)。簡単に説明すると、 1×10^5 のt-end細胞を1 μ gの可溶性組換え分子: sJAM2doまたはsCRAM-12doの存在下、トランスウエルユニット (ポリカーボネートフィルター、5 μ m孔径、costar) 中で2日間培養した。2日後、リンパ節またはパイエル斑から得た 1×10^6 の白血球を上側の区画に加え、血管外遊出した細胞の数を実験の間、1時間毎にモニターした。4時間後、5つの独立したウエルから得た血管外遊出細胞をプールし、B細胞およびT細胞マーカーB220およびCD3についてサイトフルオロメトリー分析に供した。Facsclibur器械およびCell-Quest分析プログラム (Becton-Dickinson) を用いて結果を得た。

【0046】

脾細胞を用いた血管外遊出アッセイでは、 3×10^5 の内皮細胞をトランスウエルユニット (ポリカーボネートフィルター、8 μ m孔径、costar) に植えて細胞を18時間かけて単層を形成させた。上側の区画の培地を除き、脾臓からフィコール遠心分離により新たに調製した 1×10^6 の白血球 (100 μ l) を上側の区画に加えた。下側の区画の培地にSDF-1を加え (最終濃度: 40nM)、下側の区画と上側の区画の間でケモカイン勾配を確立した。抗体を用いた実験では、精製抗体18-F26または19-H36を10 μ g/mlの濃度で脾細胞とともに上側の区画に加えた。4時間後、血管外遊出した白血球 (下側の区画中) を回収し、カウントした。結果を添加量の%として表した。

【0047】

結果

ターゲットドデファレンシャルディスプレイ

内皮細胞中の遺伝子の制御はその環境に依存する。本発明は、内皮が腫瘍細胞と接触したときに制御を司る遺伝子の同定に向けられていた。この目的のため、メラノーマ腫瘍細胞 (B16) と内皮腫細胞株 (t-end) との同時培養を用いたインビトロアッセイを開発した。混合物から抽出した全RNAを鋳型として用いてデファレンシャルPCRスクリーニングに供するcDNAを調製した。内皮またはメラノーマ細胞単独で培養して得られたcDNAはコントロールとして用いた。3つの異なるパターンを比較して同時培養条件により制御される転写物を同定した。Igスーパーファミリーの細胞表面分子をコードする配列に分析を限定するため、Igスーパーファミリー分子中のC2ドメインのC末端システインの周辺の配列をターゲティングする部分的に縮重したプライマーを用いた。最も再現性のあるパターンのPCR生成物が配列YYCxAS1をコードするプライマーを用いて得られた (図7A)。この改良されたRNA提示法は、「ターゲットドデファレンシャルディスプレイ (Targeted Differential Display)」としてTDDと名付けた。

【0048】

TDDの繰返し行った実験で16の差別的に発現された遺伝子が同定された。クローニング、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列分析の後、16のPCR生成物のうちの3つがIgスーパーファミリーの未知の成員をコードしている可能性のある候補であった。これら3つの候補のうちの一つ (CRAM-1) を選んでさらに調べた。別々に増殖させたときには、t-end、1内皮細胞およびB16メラノーマ細胞は高レベルのCRAM-1転写物を発現した。しかしながら、同時培養条件下ではCRAM-1発現のレベルはダウン

10

20

30

40

50

レギュレーションされた(図7B)。CRAM-1に対応する350bp長の断片の翻訳は、アミノ酸配列YYCxA Sを示し、IgC2ドメインの終了に続いて膜貫通領域に対応する(signed)18アミノ酸の疎水性ストレッチを含むオープンリーディングフレーム(ORF)を示していた。

【0049】

CRAM-1、免疫グロブリンスーパーファミリーの成員

PCR生成物の配列とヌクレオチドデータベースとの配列比較は、マウスのESTデータベースで相同な配列および同一の配列を明らかにした。ESTの存在は、PCR生成物がインビボで発現される配列に対応することを示していた。3つのESTがその5'末端に300bp長の配列を含んでおり、それがTDD生成物中の300bpと同一であることがわかった。各ESTの3'末端はポリAテールを含んでいた。ESTは全部で長さが1270bpで、CRAM転写物の3'末端に対応していた。転写物の5'末端はEST cDNAクローンにはなかったため、5'RACE-PCRにより得た。その結果得られた仮定されたCRAM-1 cDNAの1980ヌクレオチドの完全長コード配列を図8Aに示す。5'末端から16bp下流に翻訳開始の強いコンセンサス部位(GACATGG)が存在し、それに続いて310アミノ酸のタンパク質が予測される単一のORFが存在していた。仮定の開始メチオニンに続く31アミノ酸領域はシグナルペプチドの特徴を有していた。開裂部位はAla31-Va132であると予測された。

【0050】

マウスCRAM-1タンパク質の推定構造を図8Bに示してあり、可変重鎖および定常2型様免疫グロブリンドメイン(Pfam、The Sanger Centre and Blast)を有する細胞外領域からなっており、2つの可能なN-結合グリコシル化部位(アミノ酸104および192)を有している。疎水性分析(Tmpred、ISREC)は、位置242-260の間の膜貫通領域を予測した。仮定された細胞質ドメインは49アミノ酸からなり、多数の高度に保存されたSer/ThrおよびTyrリン酸化部位を含んでいた(図8A、イタリック体の残基)。Prositeプログラムを用いた既知のパターンのサーチは、プロテインキナーゼCとしてSSK/SYKを、CK2としてSKQD/TSEEを、チロシンキナーゼリン酸化の特性としてKQDGE S Y/KHDGV N Yを同定した。

【0051】

JAM、CRAM-1およびCRAM-2は新規なスーパーファミリーを定める

幾つかのタンパク質がCRAM-1と高いホモロジーを示した。Igスーパーファミリーの2つの成員:ヒトA33抗原およびマウス神経細胞接着分子N-CAMの一部が、それぞれCRAM-1と41%および46%のホモロジーを有することがわかった。IgSfの他の成員であるJAMは、CRAM-1と類似の構造を有し、34%のアミノ酸配列同一性および54%のホモロジーを有していた。JAMとCRAM-1との間の有意の同一性を利用して第三の密接に関連する配列、すなわちCRAM-2をESTデータベースで見出した。これら3つの分子の間の同一性は、Igスーパーファミリーに分子の新たなサブファミリーが存在することを示唆していた(図9)。このホモロジーはVドメインおよびC2ドメインの全体の構造のみならず(図9のC54~C118およびC147~C235)細胞質ドメイン内部の配列にも関わっていた。興味深いことに、これら3つの分子間で最も変化している領域は、Vドメインの開始部(位置40~60)および近位の細胞質部分(位置280~300)に認められた。これら2つの領域の機能は、Igスーパーファミリーの他の成員におけるリガンド結合およびシグナル伝達に関連する配列に対応しており、細胞-細胞コミュニケーションにおけるJAM、CRAM-1およびCRAM-2の役割を示唆していた。

【0052】

JAM、CRAM-1およびCRAM-2 mRNAの組織分布

由来の異なる細胞での3つの転写物の発現をRT-PCRにより検出した。試験した内皮細胞株、上皮細胞株および殆どの腫瘍細胞株はすべて陽性であったが、発現の程度は転写物により異なっていた(図10A)。CRAM-1の最も高い発現レベルはSV40で

10

20

30

40

50

形質転換した H E V 細胞株 T M E (レーン 9) および胚の内皮細胞株 e - e n d 2 (レーン 4) で見出された。 C R A M - 2 および J A M 転写物は一層制限された分布を示し、 C R A M - 1 転写物といっしょに成体の内皮細胞株で見出された (レーン 3、 7、 9 および 1 2)。特に、 J A M および C R A M - 2 転写物は内皮細胞の T N F 処理により強くダウンレギュレーションされたが、 C R A M - 1 転写物のレベルは変化しなかった (レーン 2 および 1 1)。興味深いことに、胚内皮細胞株 (レーン 4) または t - e n d の血管形成変異を表す成体内皮細胞株 (レーン 6) は J A M または C R A M - 2 を発現しなかった。

【 0 0 5 3 】

J A M - 2 転写物の組織分布をノーザンブロットイングにより調べ、 J A M - 1 と比較した (図 1 4)。 J A M - 2 転写物は 2 k b の長さで、胚組織、並びに成体動物のパイエル斑、リンパ節、腎臓および精巣で大いに発現された。 1 . 8 k b の推定スプライス変異体が精巣で検出された。 J A M - 2 転写物の発現は、肺、脾臓および胸腺では低かった。 J A M - 1 および J A M - 2 の相対的な豊富さを胚発生の間に比較した : J A M - 2 をコードする m R N A は早くも交尾後 7 . 5 日で検出されたのに対し、 J A M - 1 m R N A は胚発生の期間を通じて検出されなかった。

これらの結果は、 C R A M - 1 が胚発生の間に広く発現され、成体の組織では上皮または内皮区画に限定された発現を示すことを示唆している。このことは、 C R A M - 1 が細胞の極性化された組織化の確立および維持において役割を果たしているという考えと一致するものである。

【 0 0 5 4 】

4 5 k D のタンパク質である J A M - 2 はその細胞 - 細胞接触部への局在のためにホモフィリックな相互作用に依存する

H E V 由来細胞株 T M E は最も高いレベルの J A M - 2 を発現したので、この内皮細胞株を用いて J A M - 2 の細胞内局在をさらに調べ、 J A M - 1 の局在と比較した。内皮細胞の表面上の J A M - 2 タンパク質の局在は細胞 - 細胞接触部に限られていた (図 1 1 A、 a)。 J A M - 2 の染色は J A M - 1 で観察されるものよりも弱く、細胞間の膜伸長ではより顕著ではなかった。

【 0 0 5 5 】

つぎに、細胞 - 細胞接触部に存在する J A M - 2 が J A M - 2 とホモフィリックに相互作用するのがあるいは隣接する細胞上の他の分子とヘテロフィリックに相互作用するのかを調べた。この目的のため、 J A M - 2 タンパク質をグリーン蛍光タンパク質に融合し (J A M - 2 - E G F P)、構築物を C H O 細胞にトランスフェクションした。 J A M - 2 - E G F P c D N A でトランスフェクションした C H O 細胞がコンフルエンシーに達したとき、両細胞が該タンパク質を発現している細胞 - 細胞接触部では J A M - 2 のみが観察された (図 1 1 B) のに対し、該タンパク質を発現する細胞と発現しない細胞との接触では J A M - 2 が欠けていた (図 1 1 B、 a、矢印の先で示す)。同じ結果はキメラ分子 J A M - 1 - E G F P で細胞をトランスフェクションしたときにも得られた (図 1 1 B、 b)。このことは、 J A M - 2 または J A M - 1 のいずれも、細胞 - 細胞接触部に局在するにはホモフィリックな相互作用が必要であることを示していた。

【 0 0 5 6 】

J A M - 2 を生化学的に特徴付けるため、それぞれ T M E 細胞株によってまたはトランスフェクションした C H O 細胞によって発現された (図 1 1 C および D)、 J A M - 2 または E G F P キメラタンパク質の免疫沈降を行った。抗 J A M - 2 抗体、 C R A M - 1 9 H 3 6 は、 T M E 細胞溶解液からの 4 5 k D の単一のバンドを免疫沈降させた。

【 0 0 5 7 】

みかけの分子量は還元条件下および非還元条件下で同じであり (示していない)、 J A M - 2 のアミノ酸配列から導かれる予測された分子量に対応しており、各 N - グリコシル化部位は 5 k D に相当した。 H 2 0 2 - 1 0 6 抗 J A M 特異的抗体を用いた J A M - 1 の免疫沈降は、より低分子量 (~ 4 2 k D、 レーン 2) の単一バンドという結果となり、抗 J A M - 2 抗体と抗 J A M - 1 抗体との間の可能な交差反応性が排除された。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 8 】

表面ビオチン化後の J A M - 1 - E G F P タンパク質または J A M - 2 - E G F P タンパク質の免疫沈降は、それぞれ 7 0 k D および 7 3 k D の単一の広いバンドという結果となり、これら分子が C H O トランスフェクション細胞の表面で発現されていることを示していた (図 1 1 D、レーン 4 および 6)。E G F P は分子量が 2 8 k D なので、これら分子量は予測されたものであった。

【 0 0 5 9 】

密着性および白血球の移行

分子が内皮細胞単層の完全さにどのような影響を及ぼすかおよび分子が血管内皮の機能をどのように制御しているかを理解するため、白血球の経内皮移行アッセイを組換え可溶性 J A M または C R A M - 1 の存在下で行った。内皮細胞を s J A M - I g 2 D o または s C R A M - I g 2 D o の存在下で 2 日間培養した。おそらく細胞 - 細胞接触部形成の機構での分子過剰 (molecular redundancy) のため、単層の完全さはこの期間の間に影響を受けなかった。血管外遊出アッセイを 1 μ g の組換え可溶性分子の存在下で行った。図 2 0 A に示すように、血管外遊出細胞の数は s J A M - I g 2 D o の存在によって (白抜き の四角) 最初の 3 時間の間に殆ど影響を受けなかった。4 時間後、血管外遊出細胞の数はコントロール (破線) と比べて増大した。対照的に、s C R A M - I g 2 D o の存在 (黒丸) は血管外遊出細胞の数を大きく低下させた。

10

【 0 0 6 0 】

白血球の集団は不均質であるので、s C R A M - I g 2 D o は特定の白血球垂集団に作用するのか、あるいは特異性なしに血管外遊出が阻止するのかを評価した。この目的のため血管外遊出細胞をリンパ球マーカー C D 3 および B 2 2 0 で標識した (図 2 0 B)。

20

顕著にも、s C R A M - I g 2 D o は非リンパ性白血球、すなわち骨髄系細胞の血管外遊出を特異的に阻害した (中央のパネル、斜線のカラム)。対照的に、s J A M - I g 2 D o は他の細胞垂集団に影響を及ぼすことなく血管外遊出した T 細胞の数をわずかに増大させた (左のパネル、白いカラム)。

【 0 0 6 1 】

さらに、C R A M - 1 でトランスフェクションした内皮腫細胞を血管外遊出アッセイに用いたとき、血管外遊出の増大が観察された (図 1 2) のに対し、C R A M - 2 のトランスフェクションは血管外遊出に影響を及ぼさなかった。S D F - 1 をアッセイに加えたとき、白血球の経内皮移行は 2 0 % に達した。これは C R A M - 1 に対するモノクローナル抗体により部分的に阻止された。

30

これらの結果は、内皮細胞間での C R A M - 1 の連動 (engagement) が内皮層の機能を制御していることを示している。このファミリーの分子は内皮細胞がコンフルエンシーに達したときにバリアーになるであろうことが予想された。この目的のため、C R A M - 1 転写物の制御を異なる培養条件下での内皮細胞で調べた。

【 0 0 6 2 】

C R A M は高コンフルエンシーによってダウンレギュレーションされる

C R A M - 1 をコードする転写物は T N F によっては制御されないが内皮を腫瘍細胞とともに同時培養したときにはダウンレギュレーションされるので、コンフルエンシーアッセイを用いてこの制御をさらに調べた。低コンフルエンシーでは細胞は活発に細胞周期を繰返し C R A M - 1 相互作用は起らなかったが、高コンフルエンシーでは細胞は分裂しなくなり C R A M - 1 は連動した (engaged)。C R A M - 1 m R N A 発現のレベルを半定量 R T - P C R により種々の細胞密度で決定した。図 1 3 に示すように、C R A M - 1 転写物の発現レベルはコンフルエンシーが達成されるときに低減した (図 1 3 のレーン 1、2、3 はそれぞれ 1 0 0 %、5 0 % および 1 0 % のコンフルエンシーに対応する)。この効果は t - e n d 細胞では殆ど検出できなかったが、C R A M - 1 を高度に発現する T M E 細胞では一層顕著であった。

40

【 0 0 6 3 】

内皮での C R A M - 1 のダウンレギュレーションはまた、内皮細胞を K L N 2 0 5 癌腫

50

細胞（それ自体はC R A M - 1を発現しない）とともに同時培養したときにも促進された。このことはC R A M - 1発現と細胞周期との関連性を確認するものであった。なぜなら腫瘍細胞は接触によって内皮細胞の増殖速度を増大させると記載されていたからである。K L N 2 0 5 癌腫細胞で得られた結果がB 1 6メラノーマ腫瘍を用いた本発明者らの最初のスクリーニング戦略に使用したものと同一であったことは注目される。このことは、腫瘍が内皮の挙動に影響を及ぼす一般的な機構を示している。

【0064】

J A M - 2は胚発生の間に高度に発現され、成体の組織ではH E Vおよび内皮細胞の亜集団に限定される

J A M - 2の組織分布を一層明確に定めるため、最も高いレベルのJ A M - 2転写物が発現された腎臓および腸間膜リンパ節切片で免疫組織学的分析を行った（図15）。腎臓の皮質領域では管間構造の特異的な染色が抗P E C A M（G C 5 1）モノクローナル抗体または抗J A M - 2（C R A M - X V I I I F 2 6）モノクローナル抗体で検出されたのに対し、抗Z O - 1または抗J A M - 1は管状上皮細胞を優先的に染色した（示していない）。

【0065】

それゆえ、本発明者らは骨髄中に沈み込み（dip down into）橈骨静脈または直脈管内皮構造に対応する血管構造に着目した。この目的のため、連続切片を行い、該血管構造を抗P E C A M染色で同定した（図15d）。隣接する切片の等価な領域で線状の内皮間染色が抗J A M - 2、抗J A M - 1または抗Z O - 1で検出された（それぞれ、図15a、bおよびc）。腸間膜リンパ節の切片では、高内皮細静脈（H E V）の典型的な染色が抗J A M - 2モノクローナル抗体で得られた（図15e）。H E Vはまた、J A M - 1、Z O - 1またはP E C A Mを発現することがわかったが（図15f、gおよびh）、染色の細胞内局在は微妙に異なっていた（図15e～h、挿入写真）。腸間膜リンパ節の皮質領域では、被膜下静脈洞（subcapsular sinuses）の典型的な染色がすべての抗体で観察され（図15i～l）、求心性のリンパ管の染色に対応していた。それゆえ、C R A M - 1 8 F 2 6抗J A M - 2モノクローナル抗体による染色は、ある種の内皮細胞または血管形成に密接に関連する構造に限られている。

【0066】

内皮細胞の染色が図15に示す写真を説明するかどうかを明らかにするため、J A M - 2発現のサイトフルオロメトリー分析を種々の細胞株または解離した組織から新たに単離した内皮細胞で行った。内皮細胞株（t E n d . 1、e E n d . 2およびT M E）は細胞表面で低レベルのJ A M - 2を発現し、種々のレベルのJ A M - 1を発現した（図16A）。

【0067】

新たに単離した内皮細胞のサイトフルオロメトリー分析は、コラゲナーゼ/ディスパーゼで器官を解離した後に得た細胞懸濁液を3つずつ染色することにより行った。内皮細胞は、P E C A M / C D 3 1およびアセチル化L D Lの両方で染色した細胞のゲートを開閉することにより同定した（Voytaら、1984、*J. Cell. Biol.* 99: 2034）。この二重陽性細胞集団でのJ A M - 2またはJ A M - 1染色は、図16Bに示してある。腎臓およびパイエル斑ではC D 3 1およびアセチル化L D Lについて陽性の単離細胞はすべてJ A M - 2についても染色され、少なくともこれら器官では内皮細胞がJ A M - 2をインビボで発現したことを意味していた。リンパ節から得た細胞で染色を行った場合には、J A M - 2発現は細胞の亜集団でのみ見出され、この組織内での内皮細胞表現型の不均質性の可能性を反映していた。

以上を総合すると、サイトフルオロメトリー分析および免疫組織化学的分析の結果は、J A M - 2がJ A M - 1とともに腎臓、パイエル斑およびリンパ節の内皮細胞により同時に発現されることを示している。

【0068】

細胞 - 細胞接触部へのJ A M - 2の動的局在

JAM-2が細胞-細胞接触部に特異的に局在する機構を詳細に吟味するため、時間経過ビデオ顕微鏡観察を用いた。蛍光キメラ分子で安定にトランスフェクションしたCHO細胞をトリプシン処理し、画像化のためにチャンバスライドにプレーティングした。細胞拡張後、JAM-2-EGFPの表面発現は均一ではなく、むしろ細胞-細胞接触部に群集していた(図17A、星印で示す細胞)。新たな細胞-細胞接触部の形成の間に細胞結合へのJAM-2-EGFPの再局在が観察され、この新たな細胞-細胞接触部を形成している細胞間の新たな接触点で強い蛍光シグナルが検出された(矢印)。キメラタンパク質は接触している細胞間の膜突起で豊富にみられ、12分または18分後に認められる「ジッパー様」写真へと導いた。興味深いことに、一次細胞-細胞接触部でのJAM-2の局在は新たな膜接触の形成の間にも失われなかった(右上のコーナーの細胞接触を参照)。この知見は、JAM-2-EGFPが新たな細胞接触に特異的に再局在されること、および連動(engagement)によりその局在は安定であることを示していた。

10

【0069】

JAM-2の局在の要件にさらに取り組みため、細胞単層を創傷した後に時間経過ビデオ顕微鏡観察を行った(図17B)。端を傷つけた細胞はその完全な接触部位ではJAM-2を染色したが(矢印の先)、傷ついた部位ではJAM-2局在を喪失し(矢印)、JAM-2の膜局在を維持するには反対側細胞上のリガンドによるJAM-2の連動が必要であることを示していた。創傷から90分経過すると、創傷と接している細胞は創傷領域内に移動し始めた。興味深いことに、これら細胞は、鮮やかに蛍光を発する、すなわちJAM-2陽性の膜突起を介して隣接細胞との接触を維持していた(矢印の先)。これら結果は、JAM-2のホモフィリックな相互作用が細胞-細胞接触部の確立または維持に役割を果たしているという仮説を支持していた。

20

【0070】

JAM-2は単層の密着性を増大させ、密着結合複合体に関与している

細胞-細胞連結に関与している多数の分子が細胞単層のパラ細胞(paracellular)透過性を制御していることが示されているので、JAM-2もまたこの機能に影響を及ぼし得るか否かを試験した。JAM-2-EGFPのトランスフェクションはFITCデキストランへのパラ細胞透過性を低下させ、CHO細胞単層のシーリングを42.5%改善した；一方、関係のない分子Tacのトランスフェクション(IL2R)はCHOトランスフェクション細胞のパラ細胞透過性を有意に低下させなかった(図18)。JAM-1

30

-EGFPのトランスフェクションもまたCHOトランスフェクション細胞単層のパラ細胞透過性を低下させた。

これら結果は、これらキメラ分子が、極性化上皮細胞における密着結合などの細胞内の特別の区画に関与し得るかという問題を提起した。

【0071】

この問題に答えるため、EGFPキメラタンパク質をMDCK細胞にトランスフェクションし、その細胞内局在を密着結合マーカー：オクルディンと比較した。図19Aに示すように、0.9μm毎の連続写真をEGFP蛍光について分析し、オクルディン染色と比較したところ、JAM-2-EGFPは密着結合レベルでの細胞-細胞接触部で特に豊富にみられた。基底部レベルでは(左)、EGFP蛍光の細胞内の点が観察された。JAM-1-EGFPでトランスフェクションしたMDCK細胞の同様の分析(図19B)は、オクルディンとの同様の同時局在を示した。それにも拘らず、密着結合のレベルではJAM-1-EGFP蛍光の分布はJAM-2-EGFPで観察されるものに比べて連続性が低かった。

40

【0072】

検討

この実施例は、接着分子のIgスーパーファミリーの成員をコードする制御された転写物を同定するための新規なスクリーニング戦略の使用を報告するものである。ここには、この方法を用いて新規な分子CRAM-1を制御された転写物としてクローニングすることを記載してある。腫瘍の存在下で増殖させた内皮細胞で観察される制御は、半定量的な

50

R T - P C Rによって確認され、細胞の増殖期に依存することが示されている。変化する細胞のコンフルエンス条件下での差別的な発現のため、「コンフルエンス制御接着分子 - 1」としてC R A M - 1の名称が採用された。

【 0 0 7 3 】

ここではまた、C R A M - 2と称するC R A M - 1と密接に関連する配列をも記載してある。C R A M - 1およびC R A M - 2は接着分子の新規なサブファミリーの基本形を表しており、これはまた最近記載された分子J A Mをも含む (Chretienら、1988, Eur. J. Immunol. 28, 4049-4104; Malergueら、1998, Mol. Immunol. 35, 1111-1119)。

C R A M - 1およびJ A Mは細胞 - 細胞接触部で内皮組織および上皮組織によって優先的に発現され、極性化層に特別の性質を付与する。経内皮移行アッセイにおける組換え可溶性分子の作用およびJ A M、C R A M - 1およびC R A M - 2の制御は、これら3つの分子が血管生理学の維持において重要な役割を果たしていることを示している。

【 0 0 7 4 】

ターゲットデファレンシャルディスプレイ (T D D) と名付けた新規なスクリーニング戦略は、目的のc D N Aを選択的に増幅するうえで有効な技術であることがわかった。T D Dは、C 2様I gドメインの保存された領域Y (Y / Q / R) C X A Sに選択的なターゲティングを付与するための部分的に縮重したプライマーの使用を開発することに成功した。繰返し行った実験は、再現性のある提示パターンに導いた。16の差別的に発現された転写物のうち、3つが保存されたI g配列に対して有意のホモロジーを有する遺伝子に対応している。この特異性の増大によって、古典的なR N Aのフィンガープリンティングおよびデファレンシャルディスプレイのすでに知られている技術の主たる困難性をどうにか克服できる。

【 0 0 7 5 】

R N Aフィンガープリンティングは長い間、差別的に発現された遺伝子の同定に用いられてきた。しかしながら、配列に特異的なプライマーを用いるため、この方法は選択され既に知られているタンパク質の転写物しか検出することがない。他方、R N A提示はランダムプライマーを用い、転写物の非特異的な増幅を含んでいる。この場合の目的は、比較のために供出された2つの生物系の間でのm R N Aレベルの差異を正確に指摘することである。T D DはR N Aフィンガープリンティングの特異性をデファレンシャルR N Aディスプレイの縮重と組み合わせて選択性という結果となる改良されたスクリーニング法である。関連する転写物をターゲティングするため、この技術はスクリーニングに要する時間を有意に短くするものである。それゆえ、特定のタンパク質ファミリーの新規の成員の同定が可能となる。このことは、報告された非特異的なスクリーニング戦略実質的な改良点である。

【 0 0 7 6 】

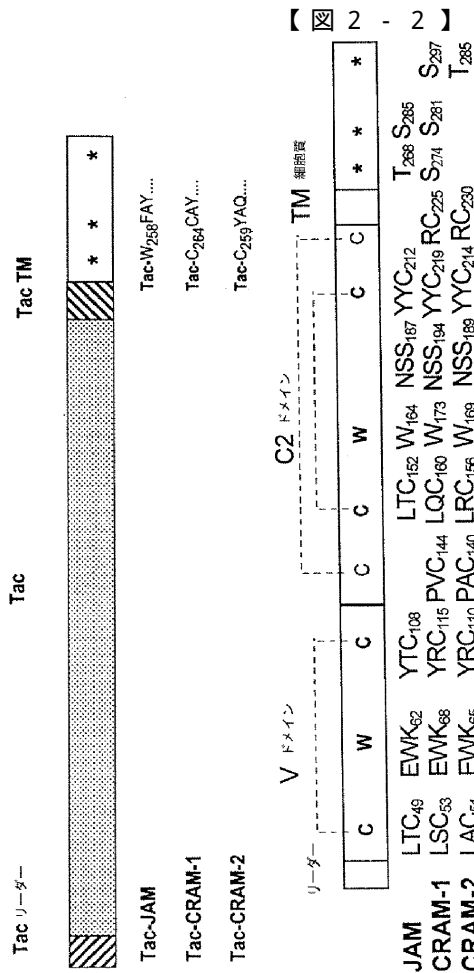
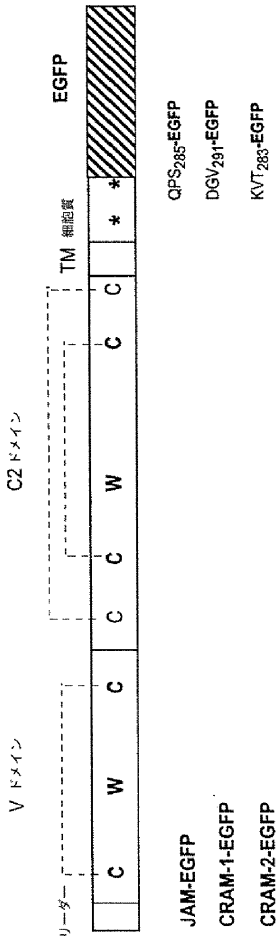
これらの共通する特性を用い、J A M、C R A M - 1およびC R A M - 2の機能を調べるために組換えタンパク質を構築した。本実施例ではs J A M - I g 2 D oおよびs C R A M - 1 - I g 2 D oの作用をインビトロ血管外遊出アッセイで記載してある。骨髄細胞の移行に対する特異的な阻止作用はs C R A M - 1 - I g 2 D oでは観察することができたが、s J A M - I g 2 D oはリンパ球に対してわずかな作用しか示さなかった。

【 0 0 7 7 】

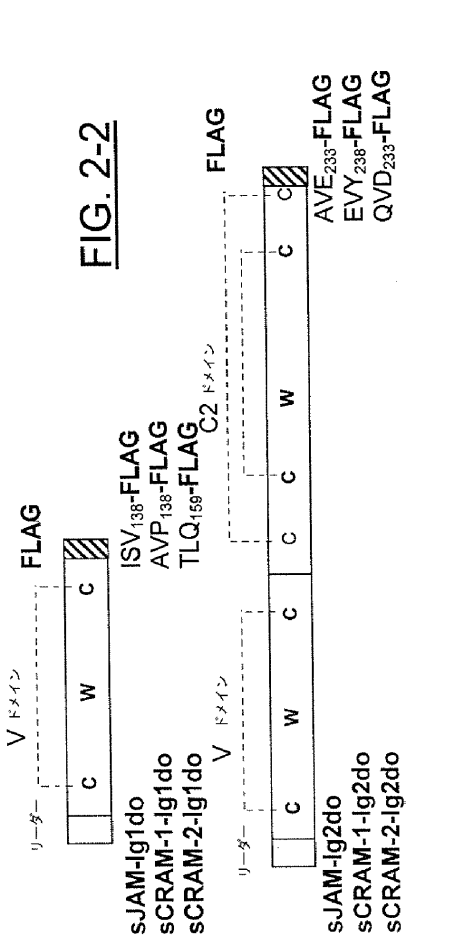
J A M転写物およびC R A M - 2転写物は同様の組織分布およびT N Fの影響下で同様の発現の制御を示し、これらが同様の生理機構により作用することを示していた。対照的に、C R A M - 1転写物はT N Fによって制御されず、むしろ内皮細胞の増殖速度または密度によって制御される。実際、細胞周期にある細胞でのC R A M - 1転写物の過剰発現および静止細胞でのダウンレギュレーションは、この分子が連続単層の確立に関与していることを示している。細胞の集密な単層でのその機能は、内皮細胞層および関連する特性の維持である。異なる白血球集団が免疫応答部位に移行しなければならないので、非リンパ球はC R A M - 1に依存した機構で移行し、一方、リンパ球はJ A MまたはC R A M - 2により移行すると考えられる。この場合、免疫応答は異なる可溶性組換え分子の組み合

せを用いることにより調節できる。

【 図 2 - 1 】



【 図 2 - 2 】



【 5 A 】

マウスおよびヒト CRAM-2 (JAM-3)

huJAM-3(CRAM-2) 10 20
 moJAM-3(CRAM-2) M A R S P Q G L L M L L L L L H Y L I V A L D Y H K

 huJAM-3(CRAM-2) 30 40 50
 moJAM-3(CRAM-2) A N G F S A S K D H R Q E V T V I E F Q E A I L A

 huJAM-3(CRAM-2) 60 70
 moJAM-3(CRAM-2) C K T P K K T T S S R L L E W K K V G Q G V S L V Y

 huJAM-3(CRAM-2) 80 90 100
 moJAM-3(CRAM-2) Y Q Q A L Q G D F K D R A E M I D F N I R I K N V

【 5 B 】

マウスおよびヒト CRAM-2 (JAM-3)

huJAM-3(CRAM-2) 110 120
 moJAM-3(CRAM-2) T R S D A G K E Y R C E V S A P . E Q G Q N L . E D

 huJAM-3(CRAM-2) 130 140 150
 moJAM-3(CRAM-2) T V T L T V I V A P A V P S C E V P S A L S G T
 K V M L E V L V A P A V P . C E V P . S . . . G .

 huJAM-3(CRAM-2) 160 170
 moJAM-3(CRAM-2) V V F I R C O D K E G N P A P E Y T W F K D G I R
 V V E L R C O D K E G N P A P E Y W F K D G

 huJAM-3(CRAM-2) 180 190 200
 moJAM-3(CRAM-2) L L E N P R L G S Q S T N S V M N T K T T
 L L N P G K G T H N . N S S Y T . G L

【 5 C 】

マウスおよびヒト CRAM-2 (JAM-3)

huJAM-3(CRAM-2) 210 220
 moJAM-3(CRAM-2) Q F N . S K . D . G E Y C E A R N S V G R R R

 huJAM-3(CRAM-2) 230 240 250
 moJAM-3(CRAM-2) C P G K R M Q V D L N I S G I I A . V V V V A

 huJAM-3(CRAM-2) 260 270
 moJAM-3(CRAM-2) V I S V C G I G V I C Y A Q R K G Y F S K E I S F Q
 V I S V C G L G C Y A Q R K G Y F S K E T S F Q

 huJAM-3(CRAM-2) 280 290 300
 moJAM-3(CRAM-2) K S N S S S K A T T M S F N D F K H T K S F I I
 G S P A V V G E N D F . H T K S F I I

【 6 A 】

> 核酸配列 huCRAM-1/huJAM-2
 ATGGCGCTGAGGGCGCCACCGGACTCCGGCTCTGCGCTCGGC
 TGCCCTGACTTCTTCTCTGCTGCTGCTTTTCAGGGGCTGCGCTGAT
 AGGGGCTGTAAATCTCAAATCCAGCAATCGAACCCAGTGGTA
 CAGGAATTTGAAAGTGTGGAAGTGTCTTGATCATTTACGGATT
 CGCAGACAAGTGAACCCAGGATCGAGTGGAGAAAATTCAGA
 TGAACAAACCACATATGTGTTTTTGGACAACAAAATTCAGGGA
 GACTTGGCGGGTCTGTCAGAAATACTGGGGGAAGACATCCCTGA
 AGATCTGGAATGTGACACGGAGAGACTCAGCCCTTTATCGCTG
 TGAGGTGCTTGTGCGAAATGACCGCAAGGAATTTGATGAGATT
 GTGATCGAGTTAACTGTGCAAGTGAAGCCAGTACCCCTGTCT
 GTAGAGTGGCGAAGGCTGTACCACTAGGCAAGATGGCAACT
 GCACTGCCAGGAGAGTGTAGGGCCACCCCGGCTCACTACAGC
 TGATCTCGCAATGATGTACCCTGCCACGGATTCCAGAGCCA
 ATCCAGATTTTCGCAATTTCTTCTTCCACTTAAACTCTGAAAC
 AGGCATTTGGTGTTCCTGCTGTTTCAAGGACACTCTGGG
 CAGTACTACTGCAATGCTTCCAATGACGCAGGCTCAGCCAGGT
 GTGAGGAGCAGGAGATGGAAGTCTATGACCTGAACATTTGGCGG
 AATTTATGGGGGGGTCTGGTTGCTCTGTGCTACTGGCCCTG
 ATCAGTGTGGGCACTGTGCTGTGATACAGACGTTGGCTACTTCA
 TCAACAATAAACAGGATGGAGAAAGTTACAAGAACCAGGGAA
 ACCAGATGGAGTTAACTACATCCGCACTGACGAGGAGGGCGAC
 TTCAGACACAAGTCACTGTTTGTGATCTGAGACCCGGGTGTGG
 CTGAGAGCGCACAGAGCCGACCTGCACATACCTCTGCTAGAA
 ACTCTGTCAAGGACGAGAGCTGATGACCTCGACAGAGCTA
 GACACTCTTCAAAGCTTTTTCGTTTGGCAAGGTGACCACTACTC
 TTTTACTCTACAAGCCATGAAAAGAGAATTTTCTCAAGAGG
 ACCCGGAAATATAACCCCAAGGAACCAACTGGGTGCGTTTAC
 TGAGGTGGGGTCTTAAATTTGTTTGGCCTGATTTCCATGAA
 AATAAGGGGTCTTTAAGAGTTTGTGACGTAAACCCCGGCTT
 GGGCTTGGAAACCACATGTTTACCACCTGCGTTAAAAAATAA
 AAAAA

【 図 6 B 】

全配列 >huCRAM-1/huJAM-2

MALRRPRLRLCARLPDFLLLLFRGCLIGAVNLKSSNRTPVV
QEFESVELSCIITDSQSDPRIEWKKIQDEQTTYVFFDNKIQQ
DLAGRAEILGKTSLKIWNVTRRDSALYRCEVVARNDRKETDEI
VIELTVQVKPVPVPCRVKAVPVGKMATLHCQSESEGHPRPHYS
WYRNDVPLPTDSRANPRFRNSSFHLNSETGLVFTAVHKDDSG
QYYCIASNDAGSARCEEQEMEVYDLNIGGIIGVVLVVLAVLAL
ITLGLCCAYRRGYFINNKQDGESYKNPGKPDGVNVIIRTDDEEGD
FRHKSSEFVI

部分配列 >huCRAM-2/huJAM-3

RAEMIDFNIRIKNVTRSDAGKYRCEVSAPAEQONLEEDTVTL
EVLVAPAVPSCVEPSSALSGTVVELRCQDKEGNPAPEYTWFKD
GIRLLENPRLGSSQSTNSSYTMNTKTGLQFNNTVSKLDTGEYSC
EARNVSVGYRRPCPKRMQVDDLNIISGIIAAVVVVVALVISVCLG
VCYAQRKGYFSKETSFQKSNSSSKATMSENDFKHKTSFII

【 図 9 A 】

20

40

60

80

100

MALSRRLRLRYARLPHFELLLFR
MARSPQGLMLLLIHYLVLDY
MGTEGKAGRKLFLFTSMILG
GCMIEAVNLKSSNRNPVHEFEVSVE
HKANGFSASKDHRQEVTVIEFOEAI
SLVQGGKGSVYTAQSDVQVPEMESIK
LSCIIITHSQTSDEPEREMKKIODGQ
LACK-TPKKTSSRLEWKKVIGQAV
LTC--TYSGFSSPRVEWKEVQST
LCLLSUSSDR EMKK G C E
TYVYFDNKKIQDLAGRTDVEGKTS
SIVAYQQALOGDFKDRADMID-FNI
ALVCMNSQITAPYADRVTFSSEGI
LVV IGGG adr f

CRAM-1
CRAM-2
JAM
コンセンサス
CRAM-1
CRAM-2
JAM
コンセンサス
CRAM-1
CRAM-2
JAM
コンセンサス
CRAM-1
CRAM-2
JAM
コンセンサス

【 図 9 B 】

120

140

160

180

200

RIMNVTRSDSAIYRCEVVALNDR-K
RIKNVTRSDAGEYRCEVSAFTEQGO
TFSSVTRKDNGEYTCMVS -EEGGO
Ri hVTRsd geYrceVsa aa
EVDEITTEIIVOMKPVTPVCRIPAA
NLQEDKVMLEVLVAPAVPACAEVPTS
NYGEVSIHLTLVLPFSKFTLSVPSS
L VLV P P C P S
VPVGTKTALCOESEGYPREPHYSWY
VMTGSVVELRCQDKEGNPAPEYIWF
VTIGNRAVLTCEHDSGSPSEYSWE
V C a L C a P P eYSW
RNDVPLPTDSRANPRFRNSSFHVN
KDGTSILHG-NPRGGTH-NNSSVANE
KDGISMLTADAKKTRAFHNSSTIID
k c l s l t k f nSS f

CRAM-1
CRAM-2
JAM
コンセンサス
CRAM-1
CRAM-2
JAM
コンセンサス
CRAM-1
CRAM-2
JAM
コンセンサス
CRAM-1
CRAM-2
JAM
コンセンサス

【 図 9 C 】

220

240

260

280

300

SETGTLVFNVAHKDDSGOYCIASN
HESGILQFNMIKMDSGEYICEARN
PKSGDLYFDFVTAFDSEYICQAOON
esg L F k DSG YYC A N
DAGAA-RCEGQDMBYDNLNACIIG
SVCHR-RCPGKRMOVDVNLNISGIIA
GYCTAMRSEAAHMDAVELNNGCIVA
C a Rced M V LN C I a
GVLVFLVAVITMIGICAVRRCGF
TVVVAFVIVSVCCLGTCYAKRGVF
AVLVTIILGLLIFGVWFAYSRGVF
VIVVAVI V G C AVYFVGF
ISSKODGESYKSPGKHGDNVYIRIS
--SKETSFOKGSFASK----VTM
---ETTKGTAPGKKVIYSQPSR
sk t sPpkk t

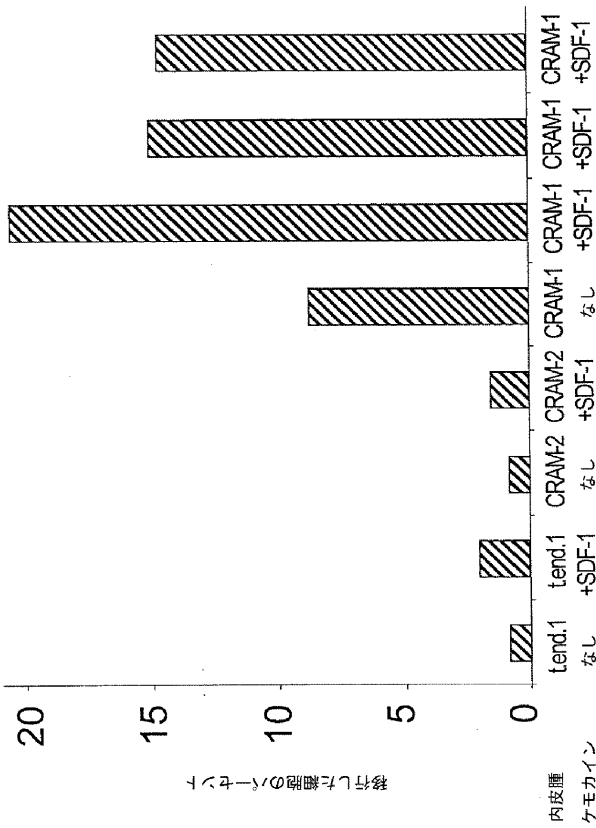
CRAM-1
CRAM-2
JAM
コンセンサス
CRAM-1
CRAM-2
JAM
コンセンサス
CRAM-1
CRAM-2
JAM
コンセンサス

【図9D】

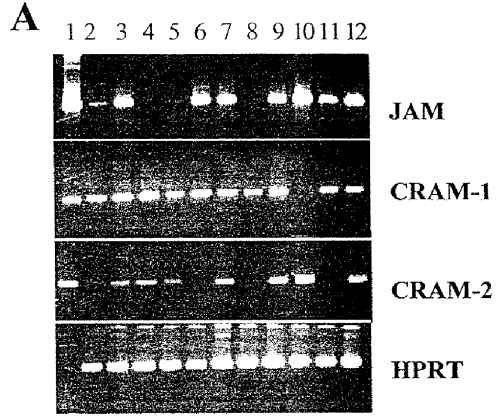
CRAM-1	:	310
CRAM-2	:	298
JAM	:	300
コンセンサス	:	

EEGD	FRHKSSFVI	
GENDFRHTKSFII		
SEGEFKQTSFLV		
Eg	FhttsSF	

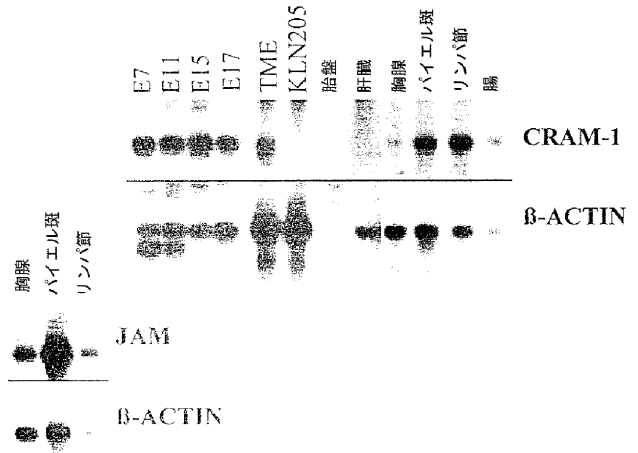
【図12】



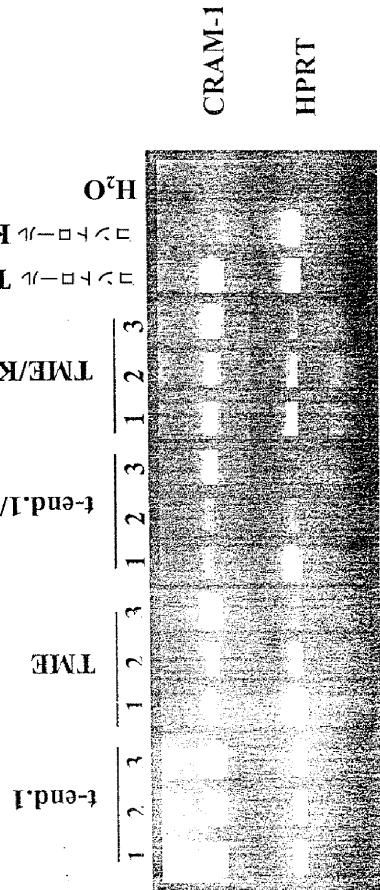
【図10】



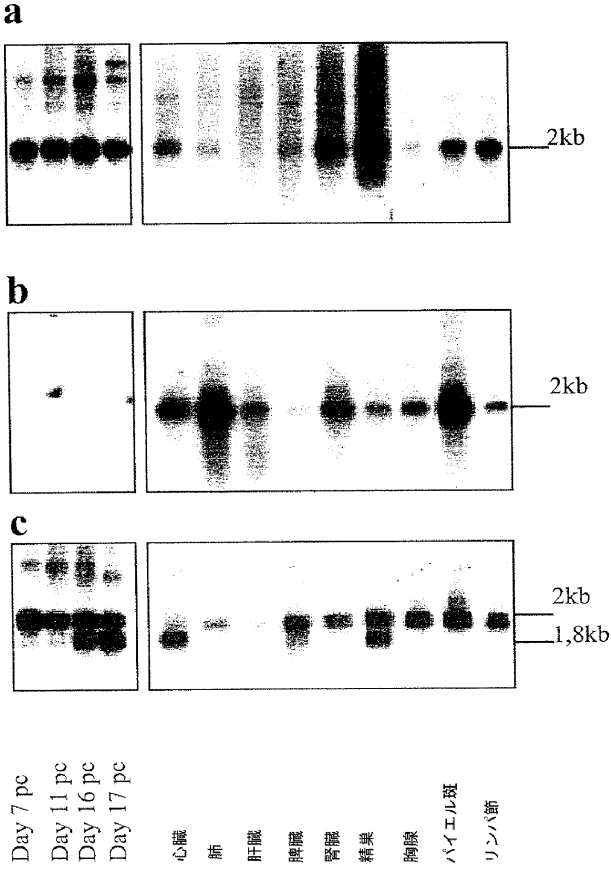
B



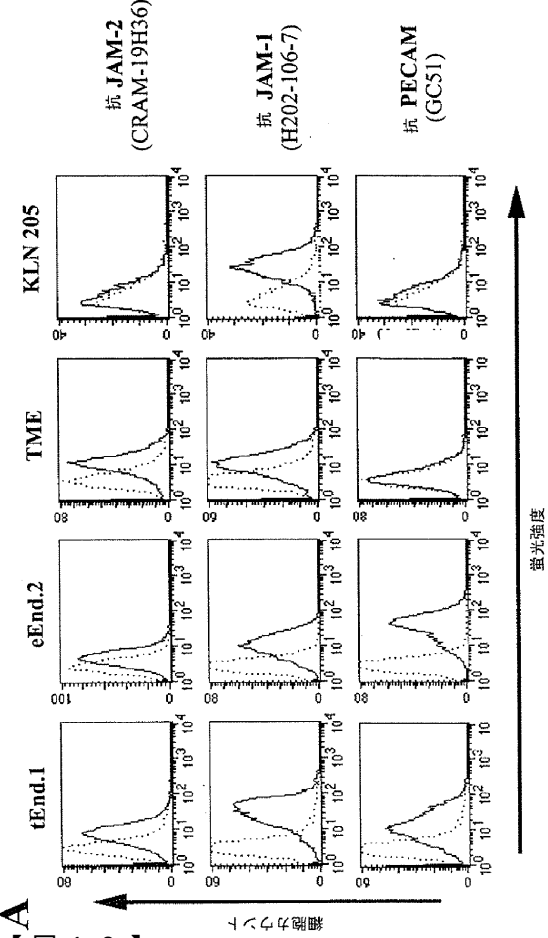
【図13】



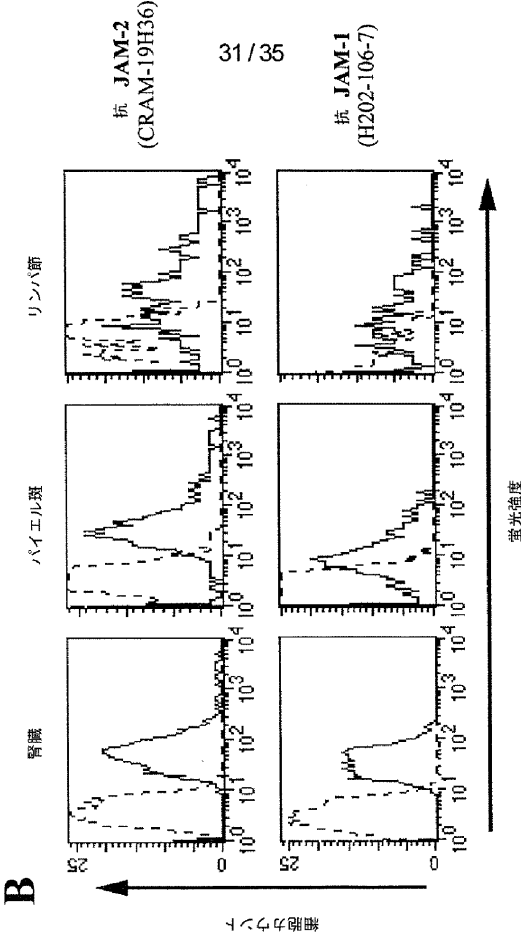
【 図 1 4 】



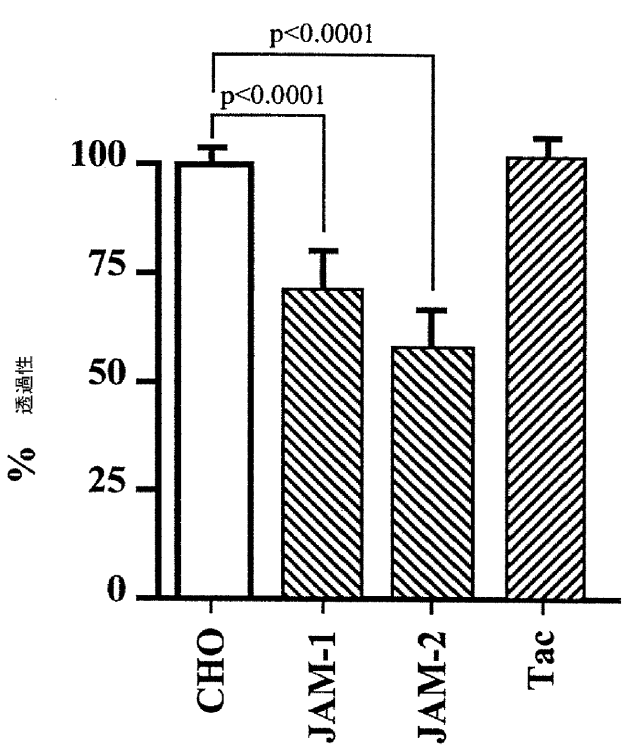
【 図 1 6 A 】



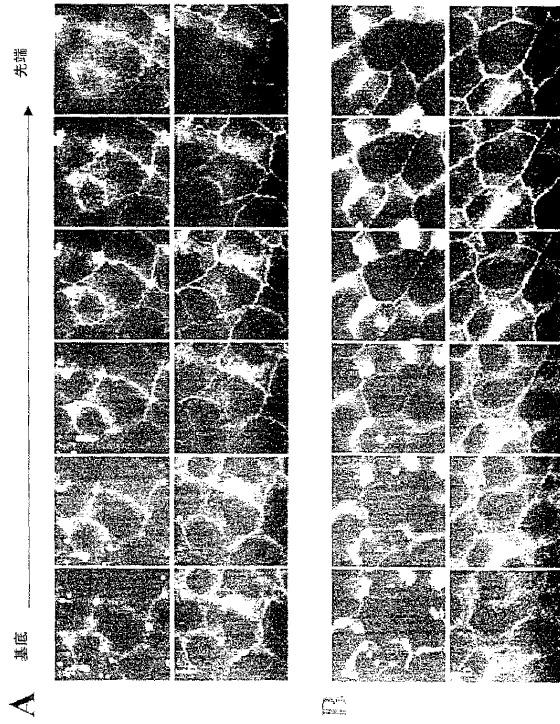
【 図 1 6 B 】



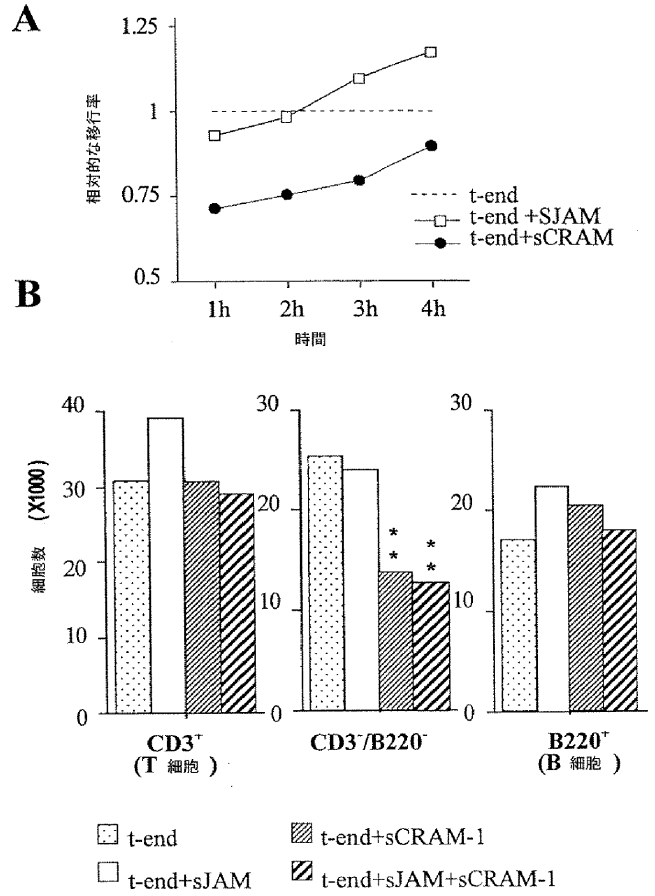
【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【 図 2 0 】



【 3 】

MALSRLRLR	LYARLPFFL	LLFRGCMIE	AVNLKSSNRN	PVVHEFESVE
MARSPQGL	LMLLLLHYLI	VALDYHKANG	FSASKDHRQE	VTVIEFQEAI
LSCIITHSQT	SDPRIEWKKI	ODGQTTYVYF	DNKIQQDLAG	RTDVFGKTSL
LACK-TPKKT	TSSRLEWKKV	GQG-VSLVYY	QQALQGDFKD	RAEMID-FNI
RIWNVTRSDS	AIYRCEVVAL	NDR-KEVDEI	TIELIVQVKP	VTPVCRI PAA
RIKNVTRSDA	GEYRCEVSAP	TEQGQNLQED	KVMLEVLVAP	AVPACEVPTS
VPVGKTATLQ	CQESEGYPRP	HYSWYRNDVP	LPT-DSRANP	RFQNSSFHVN
VMTGSVVELR	CQDKEGNPAP	EYIWFKDGT S	LLG-NPKG GT	H-NNSSYTNE
SETGTLVFNA	VHKDDSGQYY	CIASNDAGAA	RCEGQDMEVY	DLNIAGIIGG
HESGILQFNM	ISKMDSGEYY	CEARNSVGH R	RCPGKRMQVD	VLNISGIIAT
VLVVLIVLAV	ITMGICCA YR	RGCFISSKQD	GESYKSPGKH	DGVNYIRTSE
VVVVAFVISV	CGLGTCYAQR	KGYF--SKET	SFQKGSPASK	-----VTTMG
EGDFRHKSSF	VI			
ENDFRHTKSF	II			

Fig 3

【 7 】

A

Y	R	C	X	A	S1
TAY	AGN	TGY	NNN	GCY	TCY AA

Y	R	C	X	A	S2
TAY	AGN	TGY	NNN	GCY	AGY AA

Y	Q	C	X	A	S1
TAY	CRG	TGY	NNN	GCY	TCY AA

Y	Q	C	X	A	S2
TAY	CRG	TGY	NNN	GCY	AGY AA

Y	Y	C	X	A	S1
TAY	TAY	TGY	NNN	GCY	TCY AA

Y	Y	C	X	A	S2
TAY	TAY	TGY	NNN	GCY	AGY AA

B

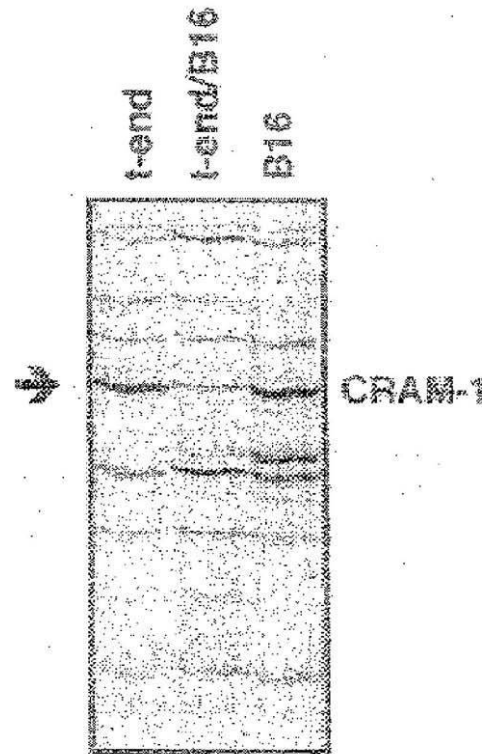


Fig 7

[8]

A

```

gacattccoctogacatgagcgtgagccggcggtgagacttcgactgtacggcgggctg 60
      M A L S R R L R E R L Y A R L 15
oottcaettctctctgctgctgctctctcaggggctgcctgatagaggcagtgaaatccaaa 120
E F F F L L L L L F R G C M I E A V N L K 35
tccagcaaccggaaccagtgctacatgaatttgaagtggtggaattgctcttgcacatcatt 180
S S N R R P V V H E E F E S V E L S (C) I I
acgcactccacagcaagtgaccctaggttgaatggaagaaaatccaagatggccaaaoc 240
T R S Q T S D P R I E W K K I Q D G Q T
acatagtgtattttgacaacaagattccaaggagacctggcaggtcgcacagatgtgttt 300
T Y V Y F D N K I Q G D L A G R T D V F
ggcaaaacttccctgagggatctgggaatgtgacacgatcggattcagccatctatcgtgt 360
G R T S L R I W W V T R S D S A I Y R (C)
gagtgctgtcttaaatgacgaaagaaagttgatgagattaocattgagtttaattgtg 420
E V V A L N D R X E V D E I T I E L I V
caagtgaagccagtgaccctgtctgcagaaattccagccgctgtacctgtaggcaagacg 480
Q V K P V T P V C R I P A A V P V G K T
gcaacactgaggtgcaaaagagagcgagggtatccccggcctcactacagctggtacogc 540
A T L Q (C) Q E S E G Y P R P H Y S W Y R
aatgatgtgocactgocctacagattccagaccatccaggttccagaaatcctctttc 600
N D V F L P T D S R A R P R F Q M S S F
catgtgaactcgggagacagggcactctgggttttcaatgctgtcccaagggagcactctggg 660
H V N S E T G T L V F N A V H K D D S G
cagtaactgctcattgcttccaatgacggcaggtgcagccaggtgtgaggggcaaggagctg 720
Q Y Y (C) I A S N D A G A A R C E G Q D M
gaagtcctatgatttgaacattgctgggattattggggagtccttvtgtccttattgtt 780
E V Y D L N T A G I I G G V L V L I V
cttgcctgtgattacagatgggcatctgtgtgctgtaoagagaggtgtgcttcaagcagt 840
L A V I T M G I C C A Y R R G C F I S S
aaacaagatggagaaagctataagagccaggggaagcagcaggtgtaactacatccgg 900
K Q D G E S F K S P G K H D G V H Y I R
acgagtgagggggtgacttcagacacaaatcgtcctttgttatctgacacactgtcggct 960
F S E E G D F R H K S S F V I *
gggagagcactgcaagtaacctctgttgggaagctggtcacagggctgctgtgagccaga 1020
gctcctgacaaaagocaccgggcaagaagcttttgttttggccaaagtgtgatgactcctt
ccttcttctctctctctttaaaccagccacaaagaaaggaagcctcctgaagatggat 1080
gtagacacagattgttgcctgacctgaactatbatggggattaggggtgacttcaagggc
ttctgtgtctcgttctccatgcagggcaatttggactgttttggccagggctgttta
gotgocaggacaacactggcagagagaggtgagggcgtgggctgagtagcagcagga 1140
acagoutgatgocctgtgacagtgcccaggaaggttttcagggcagtgocctgtoccttg
accctgacccacogtgttgcctctgttgattggccagtactgtcatttccatcctggaga
atgtgtttggantcagcattttatamaaacccaaatcagaaaggtgaaattgcttgctg 1200
ggaagagggtctgacccaggaactctccttcccaagagatgocaggagataggagAAC
ctgtctgtcttaagttaaatggtaactgaagctcctcttctattgggtcttgcctattt 1260
tataaaaatttaacattctaattttgcctagagatgtattttgattactgaaaatttcta
tataaactgtaaatatttgcctacagtgcttcaaaaogtattttttataatgagttc 1320
eaottaaaggtagaaggcttggcctgctagtgtttaattggaaaataccagtagtaagtc
ttttaaggagttttcttaaggaggtggctgaatattccttcttcaaaaaggttttag 1380
cattttcaataagaaaacttactctgtctgaccactgttgcttaggaaaccattaagaa
ttccaatctaaaaaa 1980

```

B

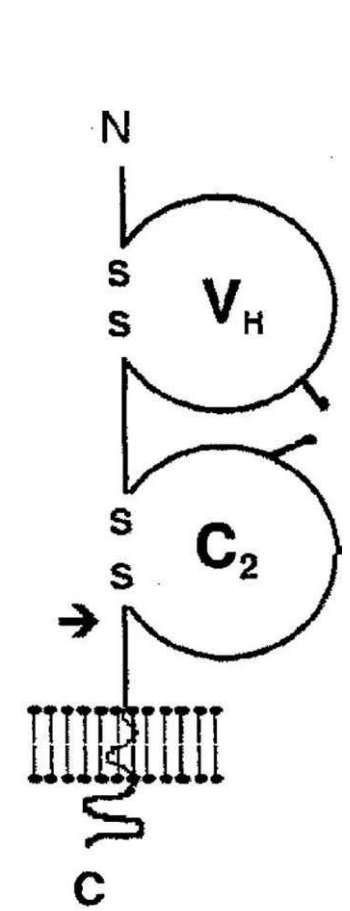
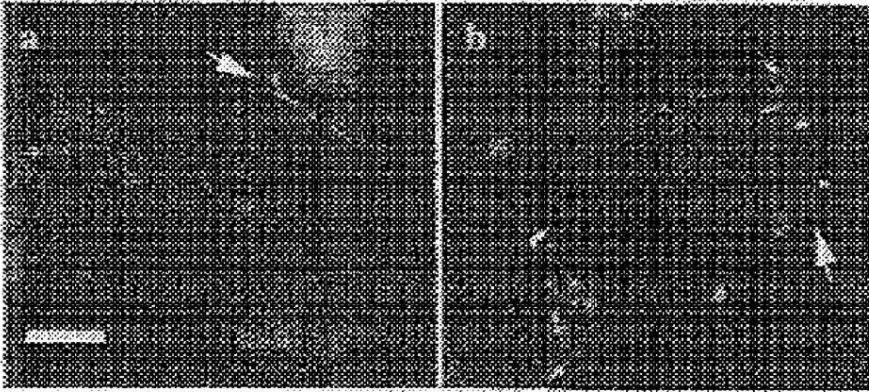


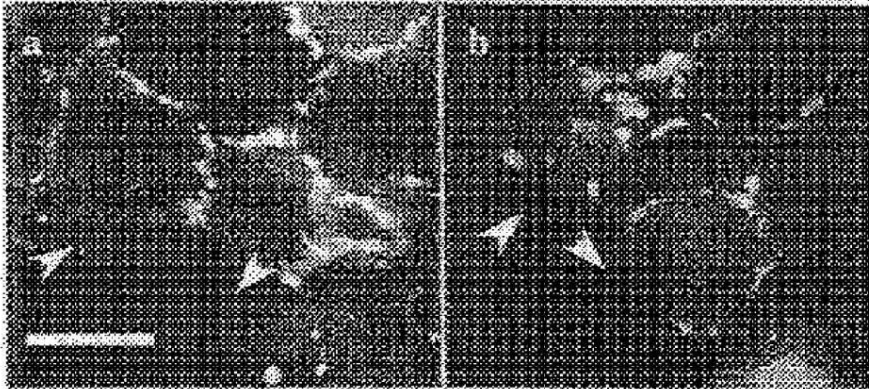
Fig 8

【図 11】

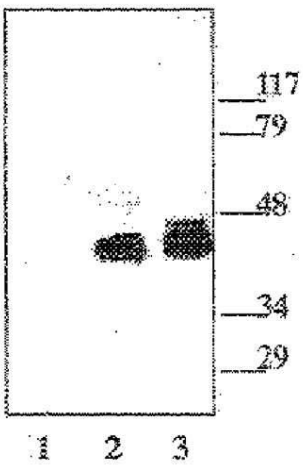
A



B



C



D

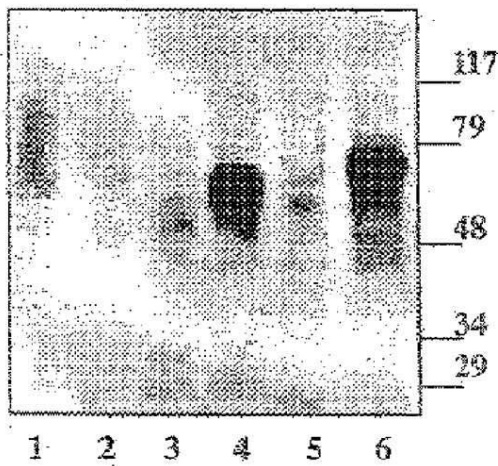


Fig 11

【 図 15 】

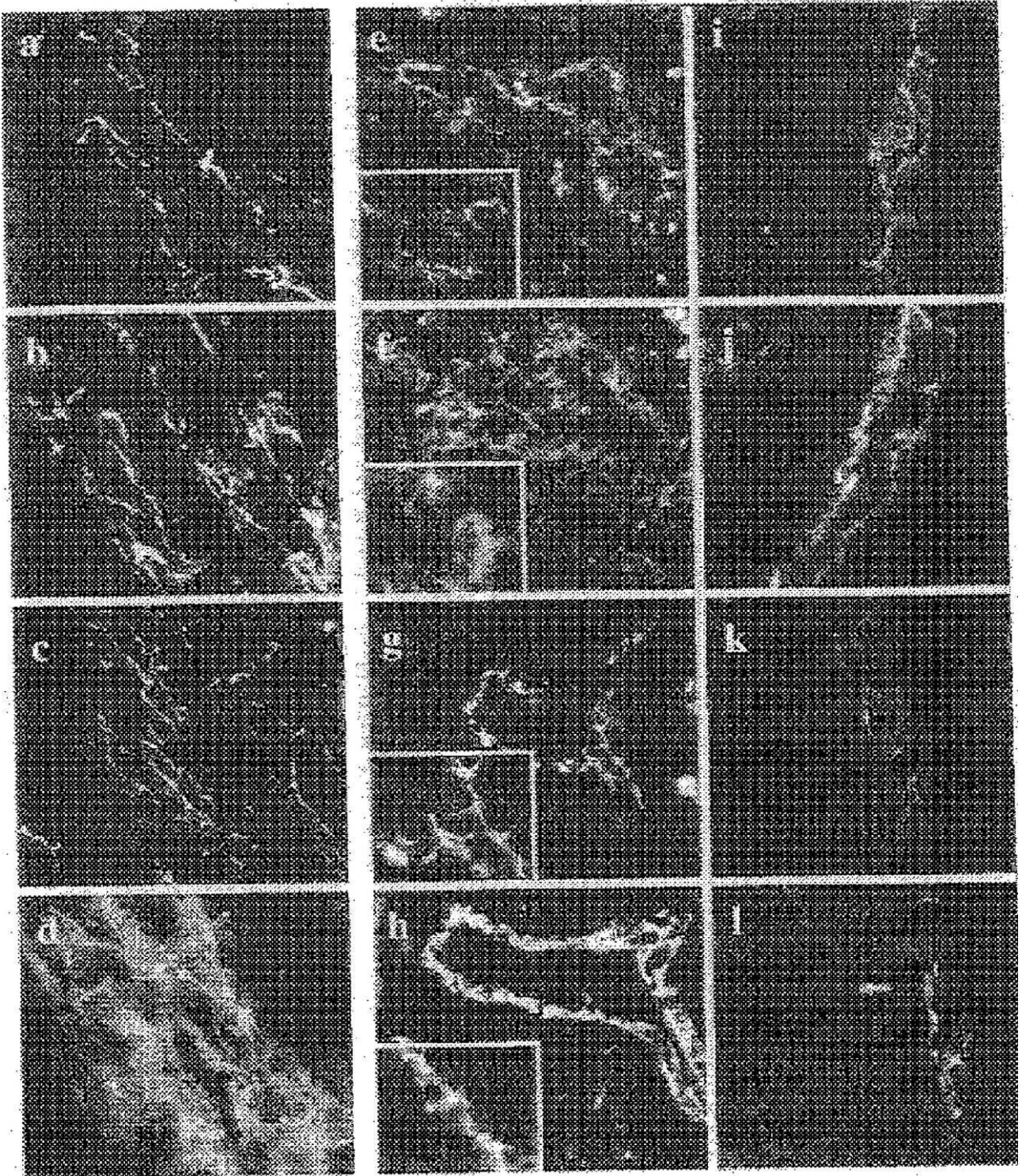
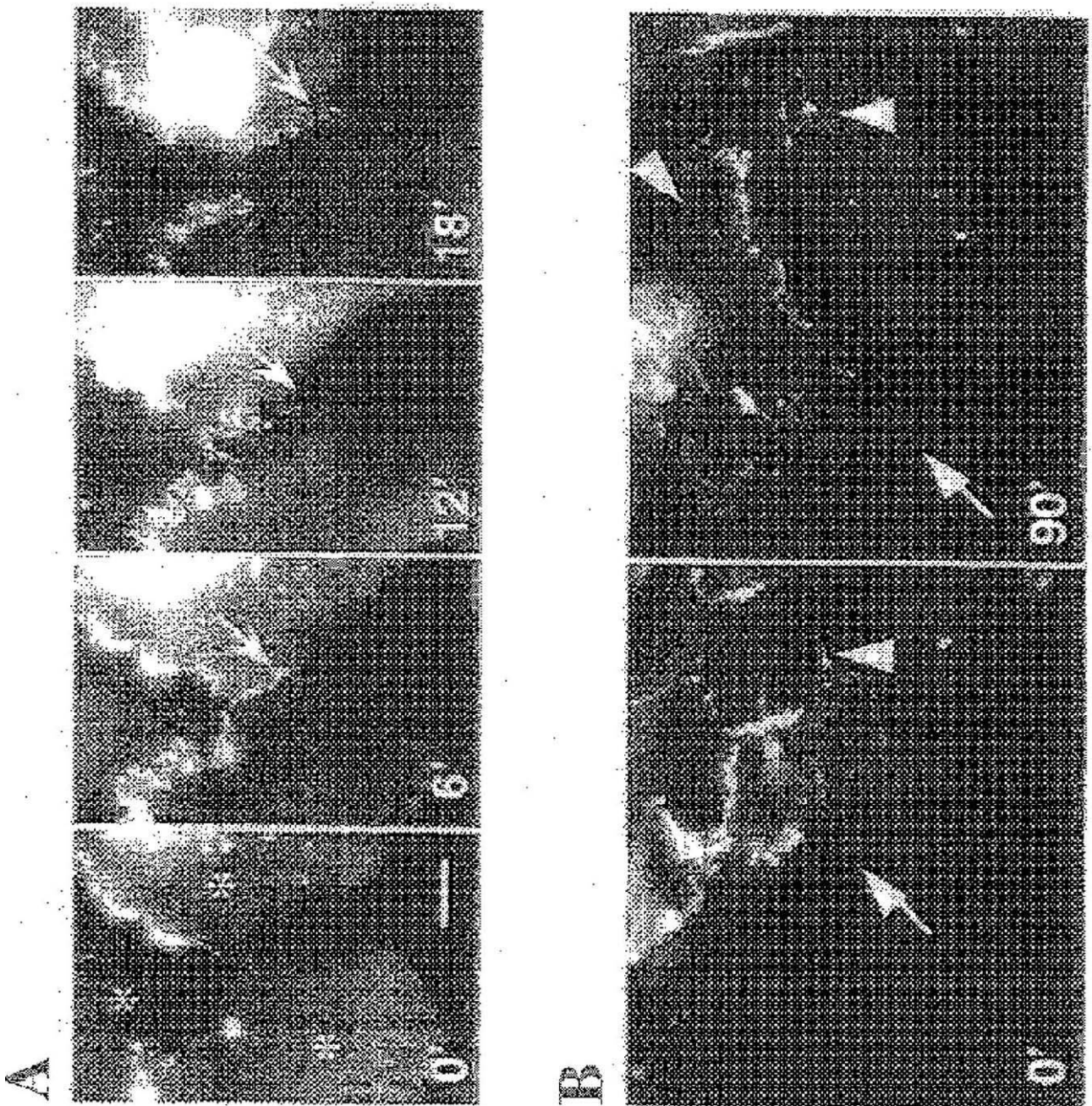


Fig 15

【図 17】

Fig 17



【配列表】

【手続補正書】

【提出日】平成22年5月6日(2010.5.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト免疫グロブリンスーパーファミリーのサブファミリーに属するポリペプチドであって、

- a) 配列番号21に示すマウスコンフルエンシー制御接着分子2(マウスCRAM-2)のアミノ酸配列を含むポリペプチド;
- b) 配列番号21に示すアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を示すアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、リンパ球の移行を刺激するか、又は細胞単層のパラ細胞(paracellular)透過性を低下させる、上記ポリペプチド;
- c) 配列番号23に示すヒトコンフルエンシー制御接着分子2(ヒトCRAM-2)のアミノ酸配列を含むポリペプチド;及び
- d) 配列番号23に示すアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を示すアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、リンパ球の移行を刺激するか、又は細胞単層のパラ細胞透過性を低下させる、上記ポリペプチド、
からなる群から選ばれた、上記ポリペプチド。

【請求項2】

医薬として使用するための、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】

白血球の経内皮移行を抑制する能力がある可溶性ポリペプチドであって、

- a) 配列番号21に示すマウスコンフルエンシー制御接着分子2(マウスCRAM-2)のV及びC₂ドメインと少なくとも80%の同一性を示すアミノ酸配列、又は
- b) 配列番号21に示すマウスCRAM-2のアミノ酸1~233、
を含む、上記可溶性ポリペプチド。

【請求項4】

医薬として使用するための、請求項3に記載の可溶性ポリペプチド。

【請求項5】

炎症反応の治療において使用するための、請求項4に記載の可溶性ポリペプチド。

【請求項6】

ポリヌクレオチドであって、

- a) 配列番号19で示されるマウスコンフルエンシー制御接着分子2(マウスCRAM-2)のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド;
- b) 完全なポリペプチド又はその一部をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、該ポリペプチドは、配列番号21に示すアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を示すアミノ酸配列を含み、かつ、リンパ球の移行を刺激するか、又は細胞単層のパラ細胞(paracellular)透過性を低下させるポリペプチドである、上記ポリヌクレオチド;
- c) 配列番号23に示すアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド;
- d) 完全なポリペプチド又はその一部をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドであって、該ポリペプチドは、配列番号23に示すアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を示すアミノ酸配列を含み、かつ、リンパ球の移行を刺激するか、又は細胞単層のパラ細胞透過性を低下させるポリペプチドである、上記ポリヌクレオチド、
からなる群から選ばれた、上記ポリヌクレオチド。

【請求項 7】

医薬として使用するための、請求項 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】

請求項 1 に記載のポリペプチドに対する抗体であって、白血球の経内皮移行を抑制する能力がある、上記抗体。

【請求項 9】

毒素、放射性標識又は薬剤に結合される、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

医薬として使用するための、請求項 8 又は 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

活性成分として請求項 8 又は 9 に記載の抗体を含む、腫瘍における血管形成の抑制のための、炎症反応の治療のための、白血球の経内皮移行を抑制するための、血管透過性の調節のための、薬剤の送達のために腫瘍における血管透過性を増大するための、又は腫瘍細胞の進行を阻止するための、医薬組成物。

【請求項 12】

活性成分として請求項 3 に記載の可溶性ポリペプチドを含む、炎症反応の治療のための、白血球の経内皮移行を抑制するための、又は血管透過性を調節するための、医薬組成物。

【請求項 13】

請求項 8 に記載の抗体又は請求項 6 に記載のポリヌクレオチドの診断のためのインビトロの使用であって、該抗体又は該ポリヌクレオチドが標識された、上記インビトロの使用。

【請求項 14】

請求項 1 に記載のポリペプチドを有する細胞のターゲティング分子としての、請求項 8 又は 9 に記載の抗体の使用。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 C	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 9/00	
	A 6 1 P 29/00	
	G 0 1 N 33/53 D	

(72)発明者 ミシェル・オラン・リオン

スイス、ツェーハー - 1 2 0 4 ジェニーヴァ、リュ・ピエール・ファティオ 8 番

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA01 CA09 CA11 CA20 HA11 HA17
 4C085 AA13 AA14 AA26 AA27 CC21 DD62 EE01 EE05
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20

