

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4915919号
(P4915919)

(45) 発行日 平成24年4月11日(2012.4.11)

(24) 登録日 平成24年2月3日(2012.2.3)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/00 C

請求項の数 25 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-528454 (P2006-528454)	(73) 特許権者	507206192
(86) (22) 出願日	平成17年6月9日(2005.6.9)		S B I バイオテック株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2005/010561		東京都港区白金台4-7-4 白金台S T
(87) 国際公開番号	W02006/008886		ビル
(87) 国際公開日	平成18年1月26日(2006.1.26)	(74) 代理人	100102978
審査請求日	平成20年6月6日(2008.6.6)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	特願2004-173767 (P2004-173767)	(74) 代理人	100128048
(32) 優先日	平成16年6月11日(2004.6.11)		弁理士 新見 浩一
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	大川 淳
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-10339		埼玉県草加市新栄町545 メルペーユ3
微生物の受託番号	IPOD FERM BP-10340	(72) 発明者	鴨川 由美子
			東京都渋谷区神泉町25-8-703
		審査官	福岡 信子
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターフェロン産生細胞の活性調節剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記(a)~(f)のいずれかに記載の蛋白質を認識する抗体を有効成分として含有するIPC (interferon producing cell) のインターフェロン産生活性の抑制剤。

(a) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質

(b) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質

(c) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列において10個以内のアミノ酸が、置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列を含み、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

(d) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列からなるDNAと0.2 x S SC、55 で洗浄する条件でハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、IPCで発現し、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

(e) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

(f) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列がコードする蛋白質であって、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質

を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

【請求項 2】

インターフェロン産生活性がタイプ 1 インターフェロン産生活性である請求項 1 に記載の抑制剤。

【請求項 3】

配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5 のいずれかによりコードされるアミノ酸配列からなる蛋白質を認識する抗体を有効成分として含有する、請求項 1 または 2 に記載の抑制剤。

【請求項 4】

該抗体が、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質を認識する抗体である請求項 1 または 2 に記載の抑制剤。

10

【請求項 5】

配列番号：4 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質を認識する抗体を有効成分として含有する、請求項 4 に記載の抑制剤。

【請求項 6】

配列番号：2、および配列番号：4 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質を認識する抗体を有効成分として含有する、請求項 4 に記載抑制剤。

【請求項 7】

配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質の全てを認識する抗体を有効成分として含有する、請求項 4 に記載の抑制剤。

20

【請求項 8】

下記(a)～(f)の記載の蛋白質を認識する抗体を非ヒト動物体内またはインビトロにおいてIPCに接触させる工程を含む、IPCのインターフェロン産生活性の抑制方法。

(a) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質

(b) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質

(c) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列において10個以内のアミノ酸が、置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列を含み、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

30

(d) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列からなるDNAと0.2 x S SC、55 で洗浄する条件でハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、IPCで発現し、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

(e) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

(f) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列がコードする蛋白質であって、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

40

【請求項 9】

次の工程を含む、請求項 1 に記載の抑制剤の製造方法。

(1) 請求項 1 の(a)～(f)の記載の蛋白質、もしくはその断片を免疫原として非ヒト免疫動物に投与する工程

(2)(1)の非ヒト免疫動物の抗体産生細胞から、該蛋白質を認識する抗体を産生する抗体産生細胞を選択する工程、

(3)(2)で選択された抗体産生細胞を培養するか、または当該抗体産生細胞が産生する抗体をコードする遺伝子を単離し、この遺伝子を発現可能に保持する細胞を培養する工程、および

50

(4)(3)の培養物からIPCのインターフェロン産生活性を抑制する抗体を回収する工程。

【請求項10】

免疫原が、ヒトから採取されたIPCである請求項9に記載の方法。

【請求項11】

IPCを含む細胞試料において下記(a)～(f)のいずれかに記載の蛋白質または該蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出する工程を含む、活性化されたIPCの検出方法。

(a) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質

(b) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質

(c) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列において10個以内のアミノ酸が、置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列を含み、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

10

(d) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列からなるDNAと0.2 x S SC、55 で洗浄する条件でハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、IPCで発現し、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

(e) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

20

(f) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列がコードする蛋白質であって、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

【請求項12】

IPCを含む細胞試料において下記(a)～(f)のいずれかに記載の蛋白質または該蛋白質をコードする遺伝子を発現する細胞を単離する工程を含む、活性化されたIPCの分離方法。

(a) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質

(b) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質

(c) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列において10個以内のアミノ酸が、置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列を含み、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

30

(d) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列からなるDNAと0.2 x S SC、55 で洗浄する条件でハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、IPCで発現し、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

(e) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

40

(f) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列がコードする蛋白質であって、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

【請求項13】

配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含む、活性化IPC検出用試薬。

【請求項14】

配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列を有する遺伝子の発現を検出するプローブまたはプライマー

50

を含む、活性化IPC検出用試薬。

【請求項15】

配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含む、活性化IPC分離用試薬。

【請求項16】

次の工程を含む、生体のIPCの活性化のレベルを測定する方法。

(1)生体から採取された試料に含まれるIPCにおける、下記(a)～(f)のいずれかに記載の蛋白質または該蛋白質をコードする遺伝子を発現している細胞、およびその発現レベルのいずれかまたは両方を検出する工程、および

(a) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質

(b) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質

(c) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列において10個以内のアミノ酸が、置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列を含み、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

(d) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列からなるDNAと0.2 x SSC、55 で洗浄する条件でハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、IPCで発現し、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

(e) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

(f) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列がコードする蛋白質であって、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

(2)(1)で測定された細胞の数、およびその発現レベルのいずれかまたは両方を、被検者のIPCの活性化のレベルに関連付ける工程

【請求項17】

生体から採取された試料が、体液、皮膚、滑膜組織、造血組織、膿、肺胞洗浄液、および血液細胞を含む可能性のある生検組織試料からなる群から選択されるいずれかの試料である請求項16に記載の方法。

【請求項18】

次の工程を含む、被験物質のIPCの活性化を調節する作用の検出方法。

(1)IPCを被験物質とともに細胞刺激剤と接触させるか、またはIPCと被験物質の接触の前、若しくは後に細胞刺激剤と接触させる工程

(2)IPCにおける、下記(a)～(f)のいずれかに記載の蛋白質または該蛋白質をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程、および

(a) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質

(b) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質

(c) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列において10個以内のアミノ酸が、置換、欠失、挿入、および/または付加されたアミノ酸配列を含み、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

(d) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列からなるDNAと0.2 x SSC、55 で洗浄する条件でハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質であって、IPCで発現し、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

10

20

30

40

50

(e) 配列番号：2、4、6、8、10、または23に記載のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

(f) 配列番号：1、3、5、7、9、または22に記載の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列がコードする蛋白質であって、IPCで発現する蛋白質であって、該蛋白質を認識する抗体の添加によりIPCのインターフェロン産生活性を抑制させる蛋白質

(3) (2)で測定された指標物質の発現レベルを、対照と比較し、発現レベルが対照よりも有意に高い場合に被験物質のIPCの活性化を増強する作用が、また対照よりも有意に低い場合には被験物質のIPCの活性化を抑制する作用が検出される工程

【請求項19】

細胞刺激剤がウイルス、ウイルスの構成要素、バクテリアのDNA、およびインターフェロンからなる群から選択される少なくとも1つの細胞刺激剤である請求項18に記載の方法。

【請求項20】

次の工程を含む、IPCの活性化を調節する作用を有する被験物質のスクリーニング方法。

(1)請求項18または19に記載の方法によって、被験物質のIPCの活性化を調節する作用を測定する工程、および

(2)対照と比較して前記活性化を調節する作用が大きい被験化合物を選択する工程

【請求項21】

配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含む、IPCの活性化を調節する作用を検出するための試薬。

【請求項22】

配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列を有する遺伝子の発現を検出するプローブまたはプライマーを含む、IPCの活性化を調節する作用を検出するための試薬。

【請求項23】

該プローブまたはプライマーが、配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列から選択された少なくとも30塩基からなる連続した塩基配列を含む、請求項22に記載の試薬。

【請求項24】

該プローブまたはプライマーが、配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列から選択された少なくとも50塩基からなる連続した塩基配列を含む、請求項22に記載の試薬。

【請求項25】

FERM ABP-10339として寄託されたハイブリドーマ3D3#7、またはFERM ABP-10340として寄託されたハイブリドーマ3G7#6が産生するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片を有効成分として含有するIPCのインターフェロン産生活性の抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インターフェロン産生細胞(Interferon producing Cells; IPC)の活性調節剤、ならびに活性調節方法に関する。

【背景技術】

【0002】

インターフェロン(IFN、以下「インターフェロン」をIFNと省略して記載する)、およびインターフェロン(IFN)は、抗ウイルス活性、あるいは抗腫瘍活性を有するtype 1 IFNとして知られている。一方で、IFNは自己免疫疾患に関連していることも明らかにされている。たとえば、以下のような自己免疫疾患患者においてIFNの異常産生が

10

20

30

40

50

報告されている。そしてIFN γ の中和によって自己免疫症状が緩和される可能性も示唆されている。

全身性エリテマトーデス(Shiozawa et al., *Arthr. & Rheum.* 35, 412, 1992)

慢性関節リウマチ(Hopkins et al., *Clin. Exp. Immunol.* 73, 88, 1988)

更に組み換えIFN γ の投与によって自己免疫疾患症状が発現あるいは悪化した症例が報告されている(Wada et al., *Am. J. Gastroenterol.* 90, 136, 1995; Perez et al., *Am. J. Hematol.* 49, 365, 1995)。

【0003】

またIFN γ が、樹状細胞(dendritic cell)の分化を誘導していることも明らかにされている。樹状細胞(dendritic cell)は抗原提示細胞でもある。したがって樹状細胞の分化誘導は、自己免疫疾患における重要なメカニズムを構成していると考えられる。実際、IFN γ の樹状細胞の分化誘導と、全身性エリテマトーデスの発症には、深い関連性があることが示唆されている(Blanco et al., *Science*, 16:294,1540-1543,2001)。このようにIFN γ は、抗腫瘍活性とともに、自己免疫疾患との密接な関連性が指摘されている。

10

【0004】

さて、ウイルス感染に伴って、type 1 IFNを大量に産生する細胞として同定されたのがIPCである。IPCは血中にわずかしが存在していない。末梢血リンパ球に占めるIPCの割合は、1%以下と考えられている。しかしIPCは、きわめて高いIFNの産生能を有する。IPCのIFN産生能は、たとえば3000pg/mL/10⁶cellsに達する。つまり、細胞の数は少ないが、血中IFN γ あるいはIFN α の大部分は、IPCによってもたらされていると言って良い。

20

【0005】

一方IPCは、樹状細胞(dendritic cell)の前駆細胞に位置付けられる未分化のリンパ球系樹状細胞である。IPCは、プラズマ細胞様樹状細胞(Plasmacytoid dendritic cell)と呼ばれることもある。IPCは、ウイルス刺激によって樹状細胞に分化し、T細胞によるIFN γ とIL-10の産生を誘導する。またIPCは、IL-3刺激によっても樹状細胞に分化する。IL-3刺激によって分化した樹状細胞は、T細胞によるTh2サイトカイン(IL-4、IL-5、IL-10)の産生を誘導する。このようにIPCは、刺激の違いによって異なる樹状細胞に分化する性質を有している。

【0006】

したがってIPCは、IFN産生細胞としての側面と、樹状細胞の前駆細胞としての2つの側面を有する細胞である。いずれの細胞も、免疫システムにおいて重要な役割を担っている。つまりIPCは、様々な面で免疫システムを支える重要な細胞の一つである。

30

【非特許文献1】Shiozawa et al., *Arthr. & Rheum.* 35, 412, 1992

【非特許文献2】Hopkins et al., *Clin. Exp. Immunol.* 73, 88, 1988

【非特許文献3】Wada et al., *Am. J. Gastroenterol.* 90, 136, 1995

【非特許文献4】Perez et al., *Am. J. Hematol.* 49, 365, 1995

【非特許文献5】Blanco et al., *Science*, 16:294,1540-1543,2001

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、IPCの活性を調節するための調節剤および調節方法の提供を課題とする。あるいは本発明は、IPCの活性化の指標とすることができるマーカーの提供を課題とする。更に本発明は、IPCの活性化マーカーを用いたスクリーニング方法、並びに活性化IPCの単離あるいは検出のための方法の提供を課題とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

IFNのような液性因子の活性調節には、当該因子を認識する抗体の投与が有効である。たとえばインターロイキン(IL)-1、あるいはIL-4に対する抗体によって自己免疫疾患を治療する試みが実用化された(Guler et al., *Arthritis Rheum.*, 44, S307, 2001)。またインターフェロンにおいても同様に、中和抗体が自己免疫疾患の治療薬となりうるとされ

50

ている(Stewart, TA. Cytokine Growth Factor Rev. 14; 139-154, 2003)。IPCが産生するIFNに対しても同様のアプローチが有効であろうことは予想できる。しかしこのようなアプローチは、産生された後の液性因子の作用の阻害に基づいている。目的とする液性因子の産生を直接的に制御することができれば、より本質的な治療効果を達成することができる。

【 0 0 0 9 】

ヒトIPCを認識する抗体が報告されている。たとえば、抗BDCA-2モノクローナル抗体、あるいは抗BDCA-4モノクローナル抗体(Dzionic A. et al. J. Immunol. 165:6037-6046, 2000)は、ヒトIPC特異モノクローナル抗体である。このうち抗BDCA-2モノクローナル抗体は、ヒトIPCのIFN産生を抑制する作用を有することが明らかにされている。その他にもマウスのインターフェロン産生細胞を認識するモノクローナル抗体が、インターフェロンの産生を抑制することも報告されている(Blood 2004 Jun 1;103/11:4201-4206. Epub 2003 Dec)。マウスのプラズマ細胞様樹状細胞(Plasmacytoid Dendritic Cell)に対するモノクローナル抗体による樹状細胞数の減少が報告された(J. Immunol. 2003, 171:6466-6477)。

BDCA2は、IPC特異抗原として同定された。IPCにおけるBDCA2の発現は恒常的である。つまりBDCA2を認識する抗体は、IPCの活性化のレベルとは無関係に、IPCに結合する。ところがIFNは活性化されたIPCによって産生される。したがって、活性化されたIPCに選択的に作用する抗体を得ることができれば理想的である。またBDCAを認識するモノクローナル抗体以外の報告においては、モノクローナル抗体が認識する抗原分子やその発現パターンは同定されていない。

【 0 0 1 0 】

活性化IPCへの選択的な作用によって、治療効率の向上が期待できる。具体的には、より少量の抗体によって目的とする治療効果を得ることができる。また、目的とする細胞への選択的な作用によって、予期できない副作用の可能性を小さくすることができる。このような考え方に基づいて、活性化IPCに特異的に作用し、その活性を調節することができる方法について本発明者らは研究を重ねた。その結果、BST2およびそのホモログのいずれかあるいは両方に結合する抗体が、活性化IPCに作用してその活性を調節することを明らかにして本発明を完成した。先に述べたようにBDCA-2に対する抗体もIFN産生を抑制する。しかしBDCA-2がIPCの活性化レベルに関わらず、恒常的にIPCにおいて発現している点で、BST2とは相違する。更に、BDCA-2に対する抗体は、IL-12の産生を上昇させることが報告されている(Dzionic, A. et al. Hum Immunol. 63; 1133-1348.2002)。

更に本発明者らは、BST2およびそのホモログがIPCの活性化の指標として利用できることを見出し本発明を完成した。すなわち本発明は、以下のIPC活性の調節剤、調節方法、その製造方法、活性化IPCの検出と分離方法、IPCの活性化レベルの測定方法、あるいはIPCの活性化を調節する作用の検出方法、そして当該作用を有する物質のスクリーニング方法に関する。

〔 1 〕 BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を認識する抗体を有効成分として含有するインターフェロン産生細胞の活性抑制剤。

〔 2 〕 インターフェロン産生細胞の活性が、インターフェロン産生活性およびインターフェロン産生細胞の生存のいずれか、または両方である〔 1 〕に記載のインターフェロン産生細胞の活性抑制剤。

〔 3 〕 インターフェロン産生細胞の活性が、インターフェロン産生活性であり、かつインターフェロンがタイプ1インターフェロンである〔 2 〕に記載のインターフェロン産生細胞の活性抑制剤。

〔 4 〕 BST2およびそのホモログが、配列番号： 2、配列番号： 4、および配列番号： 6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質である〔 1 〕に記載のインターフェロン産生細胞の活性抑制剤。

〔 5 〕 配列番号： 4に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質を認識する抗体を有効成分として含有する、〔 4 〕に記載のインターフェロン産生細胞の活性抑制剤。

〔 6 〕配列番号： 2、配列番号： 4、および配列番号： 6 に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質の全てを認識する抗体を有効成分として含有する、〔 4 〕に記載のインターフェロン産生細胞の活性抑制剤。

〔 7 〕BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を認識する抗体をインターフェロン産生細胞に接触させる工程を含む、インターフェロン産生細胞の活性抑制方法。

〔 8 〕インターフェロン産生細胞の活性が、インターフェロン産生活性およびインターフェロン産生細胞の生存のいずれか、または両方である〔 5 〕に記載のインターフェロン産生細胞の活性抑制方法。

〔 9 〕次の工程を含む、インターフェロン産生細胞の活性を抑制する抗体の製造方法。

(1)BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方、もしくはその断片を免疫原として免疫動物に投与する工程

(2)(1)の免疫動物の抗体産生細胞から、BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を認識する抗体を産生する抗体産生細胞を選択する工程、

(3)(2)で選択された抗体産生細胞を培養するか、または当該抗体産生細胞が産生する抗体をコードする遺伝子を単離し、この遺伝子を発現可能に保持する細胞を培養する工程、および

(4)(3)の培養物からインターフェロン産生細胞の活性を抑制する抗体を回収する工程。

〔 10 〕免疫原が、ヒトから採取されたインターフェロン産生細胞である〔 9 〕に記載の方法。

〔 11 〕次の(a)-(d)のいずれかに記載の指標物質を検出する工程を含む、活性化されたインターフェロン産生細胞の検出方法。

(a)配列番号： 1、配列番号： 3、および配列番号： 5 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド

(b)配列番号： 1、配列番号： 3、および配列番号： 5 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列から選択された連続する塩基配列を有するポリヌクレオチド

(c)配列番号： 2、配列番号： 4、および配列番号： 6 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質

(d)配列番号： 2、配列番号： 4、および配列番号： 6 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する蛋白質

〔 12 〕次の(a)-(d)のいずれかに記載の指標物質を有する細胞を単離する工程を含む、活性化されたインターフェロン産生細胞の分離方法。

(a)配列番号： 1、配列番号： 3、および配列番号： 5 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド

(b)配列番号： 1、配列番号： 3、および配列番号： 5 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列から選択された連続する塩基配列を有するポリヌクレオチド

(c)配列番号： 2、配列番号： 4、および配列番号： 6 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質

(d)配列番号： 2、配列番号： 4、および配列番号： 6 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する蛋白質

〔 13 〕配列番号： 2、配列番号： 4、および配列番号： 6 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含む、活性化されたインターフェロン産生細胞検出用試薬。

〔 14 〕配列番号： 1、配列番号： 3、および配列番号： 5 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列から選択された少なくとも 15 塩基からなる連続した塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む、活性化されたインターフェロン産生細胞検出用試薬。

〔 15 〕配列番号： 2、配列番号： 4、および配列番号： 6 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含む、活性化さ

10

20

30

40

50

れたインターフェロン産生細胞分離用試薬。

〔16〕次の工程を含む、生体のインターフェロン産生細胞の活性化のレベルを測定する方法。

(1)生体から採取された試料に含まれるインターフェロン産生細胞における、(a)-(d)のいずれかに記載の指標物質を発現している細胞、およびその発現レベルのいずれかまたは両方を検出する工程、および

(a)配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド

(b)配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列から選択された連続する塩基配列を有するポリヌクレオチド

(c)配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質

(d)配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する蛋白質
(2)(1)で測定された細胞の数、およびその発現レベルのいずれかまたは両方を、被検者のインターフェロン産生細胞の活性化のレベルに関連付ける工程

〔17〕生体から採取された試料が、体液、皮膚、滑膜組織、造血組織、膿、肺胞洗浄液、および血液細胞を含む可能性のある生検組織試料からなる群から選択されるいずれかの試料である〔16〕に記載の方法。

〔18〕次の工程を含む、被験物質のインターフェロン産生細胞の活性化を調節する作用の検出方法。

(1)インターフェロン産生細胞を被験物質とともに細胞刺激剤と接触させるか、またはインターフェロン産生細胞と被験物質の接触の前、若しくは後に細胞刺激剤と接触させる工程

(2)インターフェロン産生細胞における、(a)-(d)のいずれかに記載の指標物質の発現レベルを測定する工程、および

(a)配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド

(b)配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列から選択された連続する塩基配列を有するポリヌクレオチド

(c)配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質

(d)配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する蛋白質
(3)(2)で測定された指標物質の発現レベルを、対照と比較し、発現レベルが対照よりも有意に高い場合に被験物質のインターフェロン産生細胞の活性化を増強する作用が、また対照よりも有意に低い場合には被験物質のインターフェロン産生細胞の活性化を抑制する作用が検出される工程

〔19〕細胞刺激剤がウイルス、ウイルスの構成要素、バクテリアのDNA、およびインターフェロンからなる群から選択される少なくとも1つの細胞刺激剤である〔18〕に記載の方法。

〔20〕次の工程を含む、インターフェロン産生細胞の活性化を調節する作用を有する被験物質のスクリーニング方法。

(1)〔18〕に記載の方法によって、被験物質のインターフェロン産生細胞の活性化を調節する作用を測定する工程、および

(2)対照と比較して前記活性化を調節する作用が大きい被験化合物を選択する工程

〔21〕〔20〕に記載の方法によって選択された被験物質を有効成分として含有する、インターフェロン産生細胞の活性を調節するための医薬組成物。

10

20

30

40

50

〔 2 2 〕 配列番号： 2、配列番号： 4、および配列番号： 6 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体を含む、インターフェロン産生細胞の活性化を調節する作用を検出するための試薬。

〔 2 3 〕 配列番号： 1、配列番号： 3、および配列番号： 5 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列から選択された少なくとも 15 塩基からなる連続した塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを含む、インターフェロン産生細胞の活性化を調節する作用を検出するための試薬。

〔 2 4 〕 次の i) -vi) のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

i) 配列番号： 4、または配列番号： 6 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

ii) 配列番号： 3、または配列番号： 5 に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド；

iii) 配列番号： 4、または配列番号： 6 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号： 2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等なタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

iv) 配列番号： 3、または配列番号： 5 に記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド；および

v) 配列番号： 4 に記載のアミノ酸配列において、N 末端から 139 ~ 158 位のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド

vi) 配列番号： 6 に記載のアミノ酸配列において、N 末端から 96 ~ 100 位のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド

〔 2 5 〕 〔 2 4 〕 に記載のポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を含む蛋白質。

〔 2 6 〕 〔 2 5 〕 に記載の蛋白質に対する抗体であって、配列番号： 4 に記載のアミノ酸配列の N 末端から 139 ~ 158 位のアミノ酸配列を含む領域を認識する抗体。

〔 2 7 〕 〔 2 5 〕 に記載の蛋白質に対する抗体であって、配列番号： 6 に記載のアミノ酸配列の N 末端から 96 ~ 100 位のアミノ酸配列を含む領域を認識する抗体。

〔 2 8 〕 モノクローナル抗体である〔 2 6 〕 または〔 2 7 〕 に記載の抗体。

〔 2 9 〕 〔 2 4 〕 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

〔 3 0 〕 〔 2 4 〕 に記載のポリヌクレオチド、またはそのポリヌクレオチドを含むベクターを保持する形質転換細胞。

〔 3 1 〕 〔 3 0 〕 に記載の形質転換細胞を培養し、培養物から〔 2 5 〕 に記載の蛋白質を採取する工程を含む、〔 2 5 〕 に記載の蛋白質の製造方法。

〔 3 2 〕 FERM ABP-10339 として寄託されたハイブリドーマ 3D3#7、または FERM ABP-10340 として寄託されたハイブリドーマ 3G7#6。

〔 3 3 〕 FERM ABP-10339 として寄託されたハイブリドーマ 3D3#7、または FERM ABP-10340 として寄託されたハイブリドーマ 3G7#6 が産生するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片。

〔 3 4 〕 FERM ABP-10339 として寄託されたハイブリドーマ 3D3#7、または FERM ABP-10340 として寄託されたハイブリドーマ 3G7#6 を培養し、培養物に含まれるイムノグロブリンを回収する工程を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合領域を含む断片の製造方法。

〔 3 5 〕 FERM ABP-10339 として寄託されたハイブリドーマ 3D3#7、または FERM ABP-10340 として寄託されたハイブリドーマ 3G7#6 が産生するモノクローナル抗体、またはその抗原結合領域を含む断片を有効成分として含有するインターフェロン産生細胞の活性抑制剤。

【 発明の 効果 】

【 0 0 1 1 】

本発明により、活性化 IPC に作用しその活性を抑制する技術が提供された。すなわち BST 2 およびそのホモログのいずれかまたは両方を認識する抗体は、活性化 IPC に結合してその

10

20

30

40

50

活性を抑制する。BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を認識する抗体は、IPCの活性の抑制剤、あるいは抑制方法に利用することができる。BST2およびそのホモログは、活性化されたIPCにおいて発現が上昇しているため、本発明に基づくIPCの活性の抑制剤、あるいは抑制方法は、活性化IPCに特異的に作用する。

【0012】

IPCは、わずかな細胞が多量のIFNを産生する。IFNの中和には、IFNの分子数に応じた抗体が必要である。しかし本発明においては、産生細胞の活性が直接抑制される。その結果、抗IFN抗体による中和と比較して、より少量の抗体で強力なIFNの抑制効果を期待できる。更に、持続的にIFNが産生されている場合には、IFNの抗体による中和は、一過的な抑制に留まると予想される。本発明においては、IPCの活性を抑制することから、長期間にわたるIFN産生抑制効果が期待できる。特に、本発明の望ましい態様によれば、BST2あるいはそのホモログを認識する抗体は、IPCのIFN産生のみならず、細胞数をも抑制する。これらの効果が相乗的に作用し、IFNの産生は効果的に抑制される。

10

【0013】

更に本発明は、ヒト由来のBST2の新規なスプライシングバリエーションBST2HおよびBST2HSを単離した。本発明において特定された抗原分子は、ヒトIPCに特異的に発現しており、ヒトIPCのマーカースとして有用である。すなわち本発明において見出された配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドは、IPCのマーカースとして有用である。あるいはこれらの塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質も、IPCのマーカースとして有用である。

20

また本発明において、マウスにおけるホモログである、マウスBST2HおよびマウスBST2HSも、新規分子として同定された。ヒトと同様に、これらの分子は既知分子であるマウスBST2Dと、スプライシングバリエーションの関係にあると考えられた。これらの分子は、マウスIPCのマーカースとして有用である。

【0014】

また本発明は、BST2およびそのホモログが、IPCの活性化に伴って発現レベルが上昇することを明らかにした。したがってこれらのマーカースを指標として、IPCの活性化のレベルを評価することができる。更に、これらのマーカースを指標として、IPCの活性化を調節する作用を評価することができる。様々な物質のIPCの活性化を調節する作用を評価し、当該作用を有する物質をスクリーニングすることもできる。このようなスクリーニングによって、IPCの活性化を調節する薬剤を見出すことができる。本発明に基づいて見出されたIPCの活性化を調節する作用を有する薬剤は、自己免疫疾患やアレルギー疾患の治療剤として有用である。

30

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】FLT-3リガンド添加後、10日間培養したマウスの骨髄細胞（IPCが濃縮されている）の細胞表面を、作製した抗体及び他のマーカースで染色したFACS解析像である。培養上清陽性分画、陰性分画をそれぞれR2、R3とした。グラフ内の、R1&R2は抗体陽性の細胞集団、R1&R3は抗体陰性の細胞集団を表わす。

40

【図2】各モノクローナル抗体で抽出した細胞の形態を表わす顕微鏡写真（x400）である。（a）はインフルエンザウイルスPR8に感染させる前の形態、（b）はインフルエンザウイルスPR8と24時間培養した後の形態を示す。感染後の細胞は樹状突起を持ち、樹状細胞に典型的な形態を示した。

【図3】モノクローナル抗体SNK01を用いて分離した細胞のインターフェロン産生能を示すグラフである。図中、横軸は細胞の処理の種類を、縦軸は培養上清中のIFN濃度（pg/mL）を示す。横軸のP（+）はモノクローナル抗体に結合した細胞にウイルスを感染させた場合、N（+）はモノクローナル抗体に結合しなかった細胞にウイルスを感染させた場合、そしてN（-）はモノクローナル抗体に結合しなかった細胞にウイルスを感染させなかった場合の結果を示す。

50

【図4】モノクローナル抗体SNK01のインターフェロン産生能への影響を示すグラフである。図中、横軸は処理に用いた抗体の濃度(μg/mL)を、縦軸は培養上清中のIFN濃度(pg/mL)を示す。横軸の(-)はウイルス処理していない場合の結果を示す。SNK01は濃度依存的にインターフェロン産生抑制活性を示した。

【図5】モノクローナル抗体SNK01によるウェスタンブロッティングアッセイの結果を示す写真である。写真上は抗Hisタグ抗体、下は本発明のモノクローナル抗体SNK01による結果を示す。写真左側がpcDNA3.1-mBST2DHis、右側がpcDNA3.1-mBST2H-Hisで形質転換したCOS7細胞の結果である。培養した細胞を溶解処理した際の沈殿物(P)と上清(S)についての結果を示した。

【図6】マウスBST2のmRNA発現レベルを組織、細胞間で比較した結果を示す写真である。レーンはそれぞれ解析した組織、細胞を示す。

【図7】マウスBST2及びそのホモログのアミノ酸配列とゲノム構造を示す図である。(a)は各アイソフォームのアミノ酸配列のアライメントを、(b)はエキソンマッピングを示す。

【図8】ヒトBST2及びそのホモログのアミノ酸配列とゲノム構造を示す図である。(a)は各アイソフォームのアミノ酸配列のアライメントを、(b)はエキソンマッピングを示す。

【図9】ヒトBST2のmRNA発現レベルを組織、細胞間で比較した結果を示す写真である。

【図10】作製したマウスBST2に対するモノクローナル抗体のインターフェロン産生能への影響を示すグラフである。図中、横軸は処理に用いたハイブリドーマ培養上清の種類を、縦軸は培養上清中のIFN濃度(pg/mL)を示す。CpGはCpGで処理した際、PR8はインフルエンザウイルスPR8を感染させた際の結果を示す。

【図11】作製したヒトBST2に対するモノクローナル抗体のインターフェロン産生能への影響を示すグラフである。(a)はインターフェロン産生能への影響を示したグラフであり、図中、横軸は処理に用いた抗体の種類と濃度、縦軸はヒトIPCをHSVで刺激した際の培養上清中のIFN濃度(pg/mL)を示す。(b)はクローン3D3#7と3G7#6のBST2サブタイプへの反応性を解析した結果である。

【図12-1】野生型マウス(WT)あるいはIFNレセプターノックアウトマウス(IFNR-KO)の各種細胞をCpGあるいはインフルエンザウイルスPR8で刺激した後、蛍光色素Alexa488で標識したSNK01抗体で染色した図である。横軸はSNK01の蛍光強度、すなわちBST2の発現強度を、縦軸は細胞数を示す。(a)は全脾臓細胞を解析した図、(b)は各細胞を分画して解析した図、(c)はIPCを分画して解析した図である。

【図12-2】図12-1の続きを示す図である。

【図13】ヒトIPCのマーカースとして抗BDCA-4、BDCA-2抗体を用いて、ヒトIPCをIFNにて刺激した際のBST2の発現を検討した図である。横軸は5C11#7抗体の蛍光強度、すなわちBST2の発現強度を、縦軸は細胞数を示す。

【図14】ヒトIPCをCpGにて刺激した際のBST2の発現を検討した図である。横軸は、抗ヒトBST2抗体3E2#8、5C11#7の蛍光強度、すなわちBST2の発現強度を、縦軸は細胞数を示す。それぞれ太線はCpGで刺激した場合、点線は未刺激の場合のパターンを示す。

【図15】抗マウスBST2抗体SNK01を投与したマウスから採取した細胞を用いて解析した図である。(a)は投与のスケジュールを示す。(b)は各臓器中のIPC割合を示し、横軸が投与した抗体を、縦軸がIPCの割合を示す。(-)は抗体のかわりにPBSのみを投与した群を示す。(c)は骨髄細胞をCpGあるいはインフルエンザウイルスPR8で刺激した際に産生したIFNの濃度を示す。横軸が投与した抗体を示す。

【図16】抗マウスBST2抗体SNK01を投与し、ウイルス感染させたマウスを用いて解析した図である。(a)は投与のスケジュールを示す。(b)は血清中のIFNの濃度を示し、横軸が投与した抗体を示す。(c)は脾臓中のIPC割合を示し、横軸が投与した抗体を、縦軸がIPCの割合を示す。(-)は抗体のかわりにPBSのみを投与した群を示す。

【図17】抗マウスBST2抗体SNK01およびクローン12、コントロール抗体であるラットIgG(IgGと表記)を投与したマウスから細胞を採取して解析した図である。(a)は各抗体を投与したマウスのリンパ節細胞をFACSにて解析した結果の一例を示す。四角で示した細胞

10

20

30

40

50

画分がIPCである。(b)は(a)の結果を元に、リンパ節中のIPCの割合をグラフに示したものである。同様に、(c)、(d)はそれぞれ脾臓、末梢血中のIPC割合を示し、横軸が投与した抗体を、縦軸がIPCの割合を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明は、BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を認識する抗体を有効成分として含有するIPCの活性抑制剤に関する。また本発明は、BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を認識する抗体をIPCに接触させる工程を含む、IPCの活性抑制方法に関する。更に本発明は、BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を認識する抗体を投与する工程を含む、生体内においてIPCの活性を抑制する方法に関する。あるいは本発明は、BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を認識する抗体の、IPC活性抑制剤の製造における使用に関する。

10

【0017】

本発明において、IPCはヒトBST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を発現し、かつIFNを産生する細胞であれば特に限定されない。たとえば、ヒト、およびマウスにおいては、IPCがBST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を発現していることが確認された。したがって、ヒト、およびマウスのIPCは、本発明におけるIPCとして好ましい。特にヒトIPCにおいては、その活性化に伴ってBST2およびそのホモログの発現レベルが顕著に上昇する。そのため、BST2およびそのホモログを認識する抗体は、ヒトにおいては、活性化されたIPCに対して特異的に作用する。したがって、ヒトIPCは本発明のIPCとして特に好ましい。

20

【0018】

本発明において、BST2遺伝子は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列によって定義されるヒト由来の蛋白質である。配列番号：2に記載のアミノ酸配列は配列番号：1に記載の塩基配列からなるcDNAによってコードされている。ヒトBST2のcDNAのクローニングと、モノクローナル抗体についての報告がある(Ishikawa J. et al. Genomics 26:527, 1995; GenBank Acc#.D28137)。BST2は、プレB細胞増殖支持能を有する膜蛋白質であるとされた(特開平7-196694)。BST2のゲノム遺伝子とプロモーターについての知見も得られている(WO 99/43803)。また、ヒトBST2は、ミエローマに対するモノクローナル抗体である抗HM1.24抗体が認識している抗原であることが明らかにされている(Ohmoto T. et al. B.B.R.C 25 8: 583, 1999)。抗HM1.24抗体は、ヒトプラズマセルラインを免疫原として樹立されたモノクローナル抗体である(Goto T. et al. Blood 84:1992, 1994)。

30

その後、抗HM1.24抗体がミエローマを特異的に認識することが明らかにされ、ミエローマの治療を目的としてヒト化抗体が作成された(Ozaki S. et al. Blood 93: 3922, 1999; WO98/14580)。ヒト化抗HM1.24抗体は、造血組織の癌に対する治療効果を有している(WO02/064159)。現在はその実用化を目指して臨床試験が進められている。以上のようにヒトBST2は、造血器系の腫瘍におけるマーカーとして利用されている。しかし現在のところBST2を認識する抗体とIPCの関連を示唆する報告は無い。

【0019】

本発明において、BST2はそのホモログを含む。BST2のホモログとは、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質と定義することができる。このような蛋白質は、天然に存在する蛋白質を含む。一般に真核生物の遺伝子は、IFN遺伝子等で知られているように、多型現象(polymorphism)を有する。この多型現象によって生じた塩基配列の変化によって、1または複数個のアミノ酸が、置換、欠失、挿入、および/または付加される場合がある。このようにヒトに由来する蛋白質であって、かつ配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が、置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質は、本発明のBST2ホモログに含まれる。

40

【0020】

具体的には、たとえばBST2のスプライシングバリエント、あるいは遺伝子多型によって

50

生じる変異体は、BST2ホモログに含まれる。たとえば本発明者らは、配列番号：1の塩基配列からなるcDNAに対するスプライシングバリエーションの存在を明らかにした。このスプライシングバリエーションは、配列番号：3または配列番号：5に示す塩基配列からなり、配列番号：4または配列番号：6に記載のアミノ酸配列をコードしていた。

本発明において、BST2とはそのスプライシングバリエーションを含む。したがって、これらのスプライシングバリエーションは、いずれもヒトBST2あるいはマウスBST2に含まれる。以下スプライシングバリエーションをサブタイプと記載することもある。

【0021】

あるいは多型現象によって塩基配列に変化はあっても、アミノ酸配列が変わらない場合もある。このような塩基配列の変異は、サイレント変異と呼ばれる。サイレント変異を有する塩基配列からなる遺伝子も、本発明に含まれる。なおここで言う多型現象とは、集団内において、ある遺伝子が個体間で異なる塩基配列を有することを言う。一般に、遺伝学的には多型と変異は遺伝子型の分布率によって定義されている。しかし本発明においては、多型および変異は、特に断りが無ければ、いずれも、分布率にかかわらず、異なる塩基配列が存在していることを示す用語として用いられる。

【0022】

BST2のホモログは、ヒト以外の種における機能的に同等な蛋白質を含む。BST2と機能的に同等な蛋白質は、たとえばハイブリダイゼーションを利用して同定することができる。すなわち、配列番号：1に示すようなBST2をコードするポリヌクレオチド、あるいはその断片をプローブとし、これとハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドを単離するのである。ハイブリダイゼーションをストリンジェントな条件下で実施すれば、塩基配列としては相同性の高いポリヌクレオチドが選択され、その結果として単離される蛋白質にはBST2と機能的に同等なタンパク質が含まれる可能性が高まる。

【0023】

本発明者らは、BST2のマウスにおけるホモログに対する抗体が、ヒトにおける抗体と同様にマウスIPCの活性を抑制することを確認した。マウスBST2は、配列番号：9に記載の塩基配列を有し配列番号：10に記載のアミノ酸配列をコードしていた。更に本発明者らは、BST2のスプライシングバリエーションであるBST2Hについても同様に、マウスにおけるホモログの存在を確認した。マウスBST2Hの塩基配列は配列番号：7に、この塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を配列番号：8に示した。マウスのBST2Hに対する抗体も、IPCの活性を抑制することが確認された。

本発明において明らかにされたヒトとマウスのBST2とそのホモログの塩基配列情報、およびアミノ酸配列情報を以下にまとめた。

	塩基配列	アミノ酸配列	アミノ酸配列の長さ
ヒトBST2D	配列番号：1	配列番号：2	(180)
ヒトBST2H	配列番号：3	配列番号：4	(158)
ヒトBST2HS	配列番号：5	配列番号：6	(100)
マウスBST2H	配列番号：7	配列番号：8	(178)
マウスBST2D	配列番号：9	配列番号：10	(172)
マウスBST2HS	配列番号：22	配列番号：23	(105)

【0024】

なおストリンジェントな条件とは、具体的には例えば6×SSC、40%ホルムアミド、25でのハイブリダイゼーションと、1×SSC、55での洗浄といった条件を含む。ストリンジェンシーは、塩濃度、ホルムアミドの濃度、あるいは温度といった条件に左右される。当業者は、これらの条件を必要なストリンジェンシーを得られるように適宜調節することができる。

【0025】

ハイブリダイゼーションを利用することによって、たとえばヒト以外の動物種におけるBST2のホモログをコードするポリヌクレオチドを単離することができる。ヒト以外の動物種、すなわちマウス、ラット、ウサギ、ブタ、あるいはヤギ等の動物種から得ることがで

10

20

30

40

50

きるポリヌクレオチドがコードするBST2のホモログは、本発明における機能的に同等な蛋白質を構成する。

【0026】

ハイブリダイゼーション技術等を利用して単離されるポリヌクレオチドがコードする蛋白質は、通常、ヒトBST2D(配列番号:2)とアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも30%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは80%以上(例えば、95%以上、あるいは98%、更には99%以上)の配列の同一性を指す。塩基配列やアミノ酸配列の同一性は、インターネットを利用したホモロジー検索サイトを利用して調べることができる[例えば日本DNAデータバンク(DDBJ)において、FASTA、BLAST、PSI-BLAST、およびSSEARCH等の相同性検索が利用できる[例えば日本DNAデータバンク(DDBJ)のウェブサイトの相同性検索(Search and Analysis)のページ; <http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/homology-j.html>]。また、National Center for Biotechnology Information(NCBI)において、BLASTを用いた検索を行うことができる(例えばNCBIのホームページのウェブサイトのBLASTのページ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; Altschul, S.F. et al., J. Mol. Biol., 1990, 215(3):403-10; Altschul, S.F. & Gish, W., Meth. Enzymol., 1996, 266:460-480; Altschul, S.F. et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25:3389-3402)。

10

【0027】

例えばAdvanced BLAST 2.1におけるアミノ酸配列の同一性の算出は、プログラムにblastpを用い、Expect値を10、Filterは全てOFFにして、MatrixにBLOSUM62を用い、Gap existence cost、Per residue gap cost、およびLambda ratioをそれぞれ11、1、0.85(デフォルト値)に設定して検索を行い、同一性(identity)の値(%)を得ることができる(Karlin, S. and S. F. Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68; Karlin, S. and S. F. Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7)。

20

【0028】

更に既に構造が明らかにされているcDNA、あるいはゲノムDNAの塩基配列情報の検索によって、他の種におけるBST2ホモログを見出すこともできる。すなわち、公知の塩基配列情報あるいはアミノ酸配列情報を蓄積したデータベースを対象として、ヒトBST2の塩基配列情報および/またはアミノ酸配列情報をクエリーとする相同性検索によって、類似の配列情報が検索される。もしも他の種に由来する相同性の高い既知の遺伝子並びに蛋白質がデータベース中に存在すれば、相同性検索によってそれを見出すことができる。遺伝子の全長が同定されていなくても、ESTなどの断片配列情報が得られれば、インシリコクロニングによって、遺伝子の全長配列を構成できる場合もある。こうして明らかにされた他の種に由来するホモログについて、実際に当該動物種のIPCにおける発現が確認できれば、本発明におけるBST2のホモログとして利用することができる。

30

【0029】

本発明においてインターフェロン産生細胞(IPC)は、IFN産生能を有し、かつ細胞表面にBST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を発現する細胞を言う。BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方は、細胞の活性化に伴って発現する場合が含まれる。たとえばヒト並びにマウスにおいて、樹状細胞の前駆細胞であって、刺激によりIFNを産生する細胞は、IPCとして好ましい。以下、特に断りの無い場合には、IPCは、樹状細胞の前駆細胞である細胞のみならず、IFN産生能を有し、かつ細胞表面にBST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を発現する細胞を含む。このようなIPCの同定方法は公知である。たとえばいくつかの細胞表面マーカーを指標としてIPCを他の血液細胞と識別することができる。具体的には、ヒトIPCの細胞表面マーカーのプロファイルは次のとおりである(Shortman, K. and Liu, YJ. Nature Reviews 2: 151-161, 2002)。近年になって、BDCA-2陽性細胞をIPCと位置づける報告もある(Dzionek, A. et al. J. Immunol. 165: 6037-6046, 2000.)。

40

[ヒトIPCの細胞表面抗原のプロファイル]

CD4陽性、CD123陽性、

50

Lineage(CD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56)陰性、CD11c陰性

したがって、これらの公知のマーカーの発現プロファイルを持ち、IFN産生能を持つ細胞をIPCとすることもできる。更に、これらのマーカーの発現プロファイルの発現パターンとは異なるプロファイルを持つ細胞群であっても、IFN産生能を有する生体中の細胞はIPCに含まれる。

【0030】

あるいはマウスIPCは、以下のプロファイルによって定義されている。

[マウスIPCの細胞表面抗原のプロファイル]

- CD11c、B220、Ly6C、およびCD45RBが陽性
- CD11b、CD3、CD19が陰性

10

更に、ヒトあるいはマウスのIPCに共通して見られる特徴として、以下のような特徴を示すことができる。

[細胞の形態上の特徴]

- プラズマ細胞に似ている
- 細胞表面が平滑な丸い細胞
- 核が比較的大きい

[細胞の機能的な特徴]

- ウイルス感染時に、短期間に大量のType-1 interferonを産生する
- ウイルス感染後、樹状細胞に分化する

【0031】

20

本発明において、IPCの活性抑制とは、IPCが有する機能の少なくとも一つを抑制することを言う。IPCの機能として、IFNの産生と細胞生存を示すことができる。細胞の生存は、細胞数と言い換えることもできる。したがって、これらの機能の両方あるいはいずれかを抑制する場合に、IPCの活性を抑制すると言う。IPCによって産生されるタイプ1 IFNが種々の疾患の原因となっていることが明らかにされている。したがってその産生を抑制することは、それらの疾患の治療戦略として有用である。

たとえば、自己免疫性の疾患の病態とIFN の関連性が指摘されている。IFN の大部分がIPCによって産生されている。したがってその産生を抑制すれば、IFN によってもたらされる病態を緩和することができる。なお本発明において、IPCによるIFN産生抑制とは、IPCが産生するIFNの少なくとも1種類のIFN産生を抑制することを言う。本発明における好ましいIFNは、タイプ1 IFNである。中でもIFN は重要である。

30

【0032】

すなわち本発明は、BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を認識する抗体を有効成分として含有する、IFN産生抑制剤に関する。あるいは本発明は、BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を認識する抗体を投与する工程を含む、IFNの産生抑制方法を提供する。更に本発明は、BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を認識する抗体の、IFNの産生を抑制するための医薬組成物の製造における使用に関する。

【0033】

IPCには、少数の細胞で大量のIFNを産生する細胞が含まれる。たとえば、ウイルスなどで刺激を受けた樹状細胞の前駆細胞は、生体が産生するIFNの大部分を産生する。大量のIFNを産生するIPCの細胞数を抑制することは、結果としてIFNの産生量を抑制することになる。したがって、IPCの細胞数の抑制によっても、IFN によってもたらされる病態を緩和することができる。

40

【0034】

本発明に用いるBST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を認識する抗体は、BST2およびそのホモログ、あるいはそれらの断片を免疫原として調製することができる。本発明における抗体は、任意のクラスであってよい。また抗体が由来する生物種も限定されない。更に、抗体の抗原結合領域を含む断片を抗体として用いることができる。たとえばIgGの酵素的な消化によって生成される、抗原結合部位を含む抗体断片も、本発明における抗体として利用することができる。具体的には、パepsinあるいはトリプシンによる消化

50

によって、FabあるいはF(ab')₂などの抗体断片を得ることができる。これらの抗体断片は、抗原との結合親和性を有する抗体分子として利用しうることが周知である。あるいは、必要な抗原結合活性を維持している限り、遺伝子組み換えによって構築された抗体を用いることもできる。遺伝子組み換えによって構築された抗体とは、たとえばキメラ抗体、CD R移植抗体、シングルチェーンFv、diabody (diabodies)、線状抗体、及び抗体断片より形成された多特異性抗体等を示すことができる。任意の免疫原を利用してこれらの抗体を得る方法は公知である。

【0035】

本発明において、抗体は、必要に応じて修飾することができる。本発明によれば、BST2 またはそのホモログのいずれかまたは両方を認識する抗体は、IPCの細胞数を抑制する作用を有する。すなわち、抗体そのものがIPCに対する細胞障害作用を有していると考えられた。強いエフェクター作用を示す抗体のサブクラスは公知である。あるいは、抗体を細胞障害物質(cytotoxic agent)によって修飾することによって、IPCの活性抑制効果を更に増強することができる。細胞障害物質としては、以下のような物質を示すことができる。

トキシン類：緑膿菌毒素(Pseudomonas Endotoxin; PE)、ジフテリアトキシン、リシン
放射性同位元素：Tc^{99m}、Sr⁸⁹、I¹³¹、Y⁹⁰

抗癌剤：カリキアマイシン、マイトマイシン、パクリタキセル

蛋白質からなるトキシン類は、2官能性試薬によって抗体あるいはその断片などに結合することができる。あるいは、抗体をコードする遺伝子にトキシン類をコードする遺伝子を接合し、両者の融合蛋白質を得ることもできる。放射性同位元素を抗体に結合する方法も公知である。たとえば、キレート剤を利用して、抗体を放射性同位元素で標識する方法が公知である。更に抗癌剤は、糖鎖あるいは2官能性試薬などの利用により、抗体に結合することができる。

【0036】

本発明において用いられる抗体は、人為的に構造を改変された抗体であっても良い。たとえば、抗体の細胞障害作用や安定性を改善するための様々な修飾方法が公知である。具体的には、重鎖の糖鎖が改変されたイムノグロブリンが知られている(Shinkawa, T. et al. J. Biol. Chem. 278:3466-3473. 2003.)。糖鎖の改変によって、イムノグロブリンのADCC(抗体依存性の細胞障害;Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)活性が増強された。あるいは、Fc領域のアミノ酸配列を改変されたイムノグロブリンも公知である。すなわち、イムノグロブリンのFc受容体との結合活性を人為的に高めることによって、ADCC活性が増強された(Shield, RL. et al. J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001.)。

また、Fc受容体に結合したIgGは、細胞内にいったん取り込まれる。その後、エンドソームに発現したFc受容体と結合して、再び血中に放出される現象が明らかにされている。Fc受容体との結合活性が高いIgGは、細胞に取り込まれた後に再び血中に放出される可能性が高まる。その結果、IgGの血中における滞留期間が延長される(Hinton, PR. et al. J Biol Chem. 279:6213-6216. 2004)。その他、Fc領域のアミノ酸配列の改変は、CDC(補体依存性の細胞障害作用;Complement Dependent Cytotoxicity)活性の変化をもたらすとも言われている。これらの改変を施した抗体を本発明における抗体として用いることができる。

【0037】

たとえばモノクローナル抗体は、当該モノクローナル抗体を産生する抗体産生細胞から採取することができる。本発明に用いることができるモノクローナル抗体の産生細胞は、たとえばBST2またはそのホモログ、その断片、あるいはそれらを産生する細胞またはその細胞膜分画を免疫原として免疫動物に投与し、その抗体産生細胞をクローニングすることによって取得することができる。すなわち本発明は、次の工程を含む、IPCの活性を抑制する抗体の製造方法を提供する。

(1)BST2またはそのホモログを免疫原として免疫動物に投与する工程

(2)(1)の免疫動物の抗体産生細胞から、BST2を認識する抗体を産生する抗体産生細胞を選択する工程、

10

20

30

40

50

(3)(2)で選択された抗体産生細胞を培養するか、または当該抗体産生細胞が産生する抗体をコードする遺伝子を単離し、この遺伝子を発現可能に保持する細胞を培養する工程、および

(4)(3)の培養物からインターフェロン産生細胞の活性を抑制する抗体を回収する工程。

【0038】

一般的なモノクローナル抗体の製造方法においては、免疫細胞と腫瘍細胞との細胞融合によって得られるハイブリドーマが抗体産生細胞として利用される。本発明における免疫原には、BST2またはそのホモログ、あるいはその断片を用いることができる。免疫原は、それをコードする遺伝子で形質転換した細胞から精製することができる。更に、BST2またはそのホモログを発現している細胞を免疫原として利用することができる。このような細胞としては、具体的には以下のような細胞を示すことができる。これらの細胞の細胞膜分画を免疫原とすることもできる。

- 生体から採取されたIPC
- 造血幹細胞などから分化誘導されたIPC
- 外来性のBST2またはそのホモログ遺伝子を発現可能に保持する細胞

生体からIPCを採取するためには、たとえば先に述べたような細胞表面マーカーの発現プロファイルに基づいて、目的とする細胞を採取すればよい。複数の細胞表面マーカーを指標として特定の細胞を集めるための方法は公知である。たとえば免疫染色とセルソーターを利用することによって、目的とする発現プロファイルに適合する細胞を容易に分取することができる。たとえばヒトのIPCは、BDCA-2陽性細胞を選択することにより、IPCが濃縮される。ヒトから採取されたIPCは、必要に応じて活性化された後に免疫原として利用される。

IPCは、生体の末梢血あるいは造血組織以外に、培養細胞として得ることもできる。たとえばヒトおよびマウスの造血幹細胞を培養し、IPCに分化させることによって大量に得ることができる。ヒトおよびマウス造血幹細胞をin vitroでIPCに分化させるための条件は公知である。

【0039】

たとえば、in vitroにおける造血幹細胞からのヒト(Blom, B. et al. J. Exp. Med. 192: 1785-1796, 2000.; Chen, W. et al. Blood 103: 2547-2553, 2004.)、およびマウス(Gil liert et al 2002, J. Exp. Med. 958-953)のIPCの誘導が報告されている。あるいはin vivoでのマウスIPCの誘導も公知である(Bjorck らのBlood 2001, 3520-3526)。in vitroで分化させたIPCは、IPCを認識するモノクローナル抗体を得るための免疫原として有利である。

【0040】

具体的には、造血幹細胞を含む細胞集団をIPC誘導剤の存在下で培養することにより、IPCへの分化が誘導される。造血幹細胞を含む細胞集団としては、たとえば骨髓細胞を用いることができる。またIPC誘導剤には、FLT-3リガンド、あるいはFLT-3リガンドとトロンプオエチン(thrombopoietin; TPO)の組み合わせを用いることができる。培地中のFLT-3リガンドの濃度は、通常1 ~ 100 ng/mLとすることができる。その他の培養条件は、一般的な血液細胞の培養条件を応用すればよい。すなわち基礎培地としては、RPMI1640等を用い、更に10%程度の牛胎児血清を加えることができる。あるいはヒトIPCの誘導においては、Yssel's Mediumが用いられた。in vitroにおけるIPCへの分化は、ヒトでは、たとえば25日前後にピークを迎える。

【0041】

培養された造血幹細胞から、IPCに分化した細胞を取得すれば、免疫原のためのIPCを得ることができる。実際には、いくつかの細胞表面マーカーを利用して、IPCに特徴的な細胞表面抗原を有する細胞を分取する。すなわち、たとえばBDCA-2陽性細胞をヒトIPCとして取得することができる。あるいは、CD11c陽性、CD11b陰性、およびB220陽性の細胞分画をセルソーターで分取しマウスIPCを得ることができる。

あるいは、既にIPC特異的であることが明らかな抗体を利用して、当該抗体陽性の細胞

10

20

30

40

50

をIPCとして分取することもできる。本発明者らが樹立した、マウスIPC特異抗原を認識するモノクローナル抗体産生細胞2E6(WO 2004/013325, FERM-BP-8445)が産生するモノクローナル抗体を、マウスIPCの分取に利用することができる。

【0042】

IPCは、末梢血から分取することもできる。しかし先に述べたようにIPCの末梢血におけるポピュレーションは極めて低いので、末梢血からIPCを採集するには多量の血液が必要となる。したがって、免疫原とするIPCには、造血幹細胞から分化させた細胞を利用するのが有利である。

【0043】

本発明に用いるモノクローナル抗体の調製においては、IPCのみならず、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、またはその断片を免疫原として利用することもできる。本発明のモノクローナル抗体は、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質を抗原として認識していることが明らかにされた。したがって、これらの蛋白質を免疫原として用いることによって、本発明のモノクローナル抗体を得ることができる。

【0044】

配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質は、組み換え体として得ることができる。たとえば配列番号：1に記載の塩基配列は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードしている。また配列番号：3に記載の塩基配列は配列番号：4に記載のアミノ酸配列をコードしている。したがって、これらの塩基配列からなるDNAを適当な宿主-ベクターを使って発現させれば、目的とする蛋白質を得ることができる。

【0045】

あるいは、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列からなるオリゴペプチドを免疫原とすることもできる。免疫原として選択すべきアミノ酸配列は、たとえば5-50、好ましくは7-20程度のアミノ酸からなる。任意のアミノ酸配列を有するオリゴペプチドを得る方法は公知である。たとえば、化学的にアミノ酸を結合させて、目的とするアミノ酸配列を有するオリゴペプチドを得ることができる。あるいは、上記組み換え体として得られた全長アミノ酸配列を有する蛋白質を切断することによって、所定のアミノ酸配列を有する断片を得ることもできる。得られたオリゴペプチドは、適当なキャリアー蛋白質と結合することによって、より免疫原性を高めることができる。キャリアー蛋白質には、キーホールリンペットヘモシアニンやウシ血清アルブミンなどが用いられる。

【0046】

配列番号：2と、配列番号：4および配列番号：6のアミノ酸配列の大部分は一致している。したがって、共通のアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を利用することによって、これらの蛋白質の全てを認識するモノクローナル抗体を得ることができる。このような抗体は、いずれかのサブタイプを発現する細胞に作用してその活性を調節することができる。実際に、全てのサブタイプに結合する抗体3G7#6が、IPCの活性を調節することが実施例において確認されている。

【0047】

また3種類の蛋白質のそれぞれについて、2種類が共有するアミノ酸配列を利用することによって、特定の2つの蛋白質を、他の1つと識別することができる。あるいは各アミノ酸配列に固有のアミノ酸配列を利用することによって、各蛋白質を特異的に識別するモノクローナル抗体を取得することもできる。たとえば、配列番号：4に記載のアミノ酸配列において、N末端から139~158のアミノ酸配列は、配列番号：4に固有のアミノ酸配列である。同様に、配列番号：6に記載のアミノ酸配列においては、N末端から96~100のアミノ酸配列が、配列番号：6に固有のアミノ酸配列である。このようなアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列によって構成されるエピトープを認識する抗体は、当該抗体が認識するサブタイプを発現する細胞に作用してその活性を調節することができる。実際、実施例に示したように、配列番号：4 (hBST2H) 特異的な抗体3D3#7は、IPCの活性を調節した。

【0048】

モノクローナル抗体を得るためには、続いて免疫原を、適当な免疫動物に免疫する。IPCは適当なアジュバントとともに免疫動物へ投与することができる。あるいは、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の蛋白質、若しくはその部分アミノ酸配列からなるペプチドを、アジュバントとともに免疫動物に投与することができる。

【0049】

更に、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列をコードするDNAを発現可能に保持した形質転換細胞を免疫原として利用することができる。たとえば配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列のコード領域を構成する塩基配列を含むDNAは、上記DNAとして好ましい。これらのDNAを適当な発現ベクターに組み込み、宿主細胞を形質転換すれば免疫原として有用な形質転換細胞を得ることができる。

【0050】

免疫原とするための宿主細胞は、免疫動物と同じ種に由来する細胞とすることができる。同種の細胞を用いることにより、外来性の蛋白質に対する特異的な免疫応答を誘導することができる。たとえば、免疫動物にラットを用いるのであれば、ラットに由来する宿主細胞を用いるのが有利である。上記蛋白質を含む形質転換細胞の分画を免疫原として用いることもできる。実施例に示したように、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列には、膜貫通ドメインが見られた(図8の膜貫通領域; transmembrane region)。したがって、これらのアミノ酸配列を有する蛋白質は、細胞膜に発現する可能性がある。実際にCOS細胞に発現させた場合には、配列番号：8および配列番号：10に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質は、形質転換細胞培養物の沈殿分画においてより多くの蛋白質が検出された。したがって、上記蛋白質を発現する細胞の、細胞膜分画を免疫原として利用できる。

【0051】

本発明における免疫動物は、IPCを異物と認識するあらゆる非ヒト脊椎動物を利用することができる。モノクローナル抗体を得るためには、ハイブリドーマとするための融合パートナーの入手が容易な動物が有利である。たとえば、マウス、ラット、ラビット、ウシ、ヤギなどの細胞に由来するハイブリドーマの樹立が確立されている。これらの免疫動物を、本発明に用いることができる。一方アジュバントには、フロイントの完全アジュバントやフロイントの不完全アジュバント等が用いられる。

【0052】

免疫動物は、3~10日間隔で複数回免疫される。1回の免疫に用いられるIPCの数は、任意である。通常、 $10^3 \sim 10^8$ 、たとえば 10^6 のIPCが免疫される。また蛋白質やペプチドによる免疫においては、一般に1~100 μg が免疫される。複数回の免疫を経た免疫動物から免疫担当細胞を回収し、目的とする抗体を産生する細胞をクローニングすることにより、本発明のモノクローナル抗体を得ることができる。免疫担当細胞とは、免疫動物において抗体産生能を有する細胞を言う。

【0053】

免疫担当細胞は、たとえばハイブリドーマ法によってクローニングすることができる。免疫担当細胞は、1つの細胞が1種類の抗体を産生している。したがって、1つの細胞に由来する細胞集団を確立すること(すなわちクローニング)ができれば、モノクローナル抗体を得ることができる。ハイブリドーマ法とは、免疫担当細胞を適当な細胞株と融合させ、不死化する(imortalize)した後にクローニングする方法を言う。ハイブリドーマ法に有用な多くの細胞株が知られている。これらの細胞株は、リンパ球系細胞の不死化効率

10

20

30

40

50

に優れ、かつ細胞融合に成功した細胞の選択に必要な各種の遺伝マーカーを有している。更に抗体産生細胞の取得を目的とする場合には、抗体産生能を欠落した細胞株を用いることもできる。

【0054】

たとえばマウスミエローマP3x63Ag8.653(ATCC CRL-1580)は、マウスやラットの細胞融合に有用な細胞株として広く用いられている。本発明においては、マウスのIPCを免疫原としているので、免疫動物はマウス以外の動物となる。一般にハイブリドーマは、同種の細胞の融合によって作成されるが、近縁の異種間でのヘテロハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得することもできる。

【0055】

細胞融合の具体的なプロトコルは公知である。すなわち、免疫動物の免疫担当細胞を適当な融合パートナーと混合し、細胞融合させる。免疫担当細胞には、脾細胞や末梢血B細胞などが用いられる。融合パートナーとしては、先に述べた各種の細胞株を利用することができる。細胞融合には、ポリエチレングリコール法や、電気融合法が用いられる。

次に、融合細胞が有する選択マーカーに基づいて、細胞融合に成功した細胞が選択される。たとえばHAT感受性の細胞株を細胞融合に用いた場合には、HAT培地において成育する細胞を選択することによって、細胞融合に成功した細胞が選択される。更に選択された細胞が産生する抗体が、目的とする反応性を有していることを確認する。

【0056】

各ハイブリドーマは、抗体の反応性に基づいて、スクリーニングされる。すなわち、BS T2およびそのホモログのいずれかまたは両方に結合する抗体を産生するハイブリドーマが選択される。好ましくは、選択されたハイブリドーマをサブクロニングし、最終的に目的とする抗体の産生が確認された場合に、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとして選択する。

【0057】

具体的には、たとえば配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質や、その部分アミノ酸配列からなるペプチドを抗原としてスクリーニングすることができる。抗原を適当な固相に結合し、抗原に結合するモノクローナル抗体を、免疫動物のイムノグロブリンを認識する標識抗体によって検出することができる。マイクロプレートの内壁に抗原を結合させ、酵素標識抗体を使ったELISA法を利用すれば、モノクローナル抗体を迅速にスクリーニングすることができる。抗原に対する結合活性が確認されたモノクローナル抗体は、必要に応じて実際にIPCの活性に与える影響が確認される。IPCに対する影響は、たとえば後に述べるような方法によって確認することができる。

【0058】

このようなモノクローナル抗体は、当該ハイブリドーマから抗体の抗原結合領域をコードするcDNAを取得し、これを適当な発現ベクターに挿入することによって発現させることができる。抗体の可変領域をコードするcDNAを取得し、適当な宿主細胞に発現させる技術は公知である。また抗原結合領域を含む可変領域を、定常領域と結合させることによってキメラ抗体とする手法も公知である。

【0059】

更に、モノクローナル抗体の抗原結合活性を他のイムノグロブリンに移植することもできる。イムノグロブリンの抗原結合領域は、相補性決定領域(CDR)と、フレーム領域で構成されている。各イムノグロブリンの抗原結合特性はCDRによって決定されており、フレームは抗原結合領域の構造を維持している。CDRのアミノ酸配列がきわめて多様性に富むのに対して、フレーム部分のアミノ酸配列は高度に保存されている。CDRの抗原を他のイムノグロブリン分子のフレーム領域に組み込むことによって、抗原結合活性も移植できることが知られている。この方法を利用して、異種のイムノグロブリンが有する抗原結合特性をヒト・イムノグロブリンに移植する方法が確立されている。

【0060】

10

20

30

40

50

このようにして作成されたモノクローナル抗体はいずれも本発明に利用することができる。すなわち、当該モノクローナル抗体の抗原結合領域をコードするcDNAに由来するポリヌクレオチドによってコードされた抗原結合領域を含むイムノグロブリンからなるモノクローナル抗体を本発明に利用することができる。

本発明に利用することができるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとして、たとえば、ハイブリドーマ3D3#7あるいは3G7#6を示すことができる。ハイブリドーマ3D3#7およびハイブリドーマ3G7#6は、2005年5月27日付けで独立行政法人産業技術総合研究所内特許生物寄託センターに対して、受領番号FERM ABP-10339および受領番号FERM ABP-10340として寄託されている。以下に、寄託を特定する内容を記載する。

(a)寄託機関の名称・あて名

名称：独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号中央第6（郵便番号305-8566）

(b)寄託日：2005年5月27日

(c)受領番号：ABP-10339（ハイブリドーマ3D3#7）

(c)受領番号：ABP-10340（ハイブリドーマ3G7#6）

【0061】

本発明に利用するためのモノクローナル抗体は、それを産生するハイブリドーマを培養しその培養物から回収することができる。ハイブリドーマは、*in vitro*または*in vivo*で培養することができる。*in vitro*においては、RPMI1640などの公知の培地を用いて、ハイブリドーマを培養することができる。培養上清には当該ハイブリドーマが分泌したイムノグロブリンが蓄積される。したがって、培養上清を採取し、必要に応じて精製することにより、本発明のモノクローナル抗体を得ることができる。培地には、血清を添加しない方が、イムノグロブリンの精製が容易である。しかし、ハイブリドーマのより迅速な増殖と、抗体産生の促進を目的として、10%程度のウシ胎児血清を培地に加えることもできる。

【0062】

ハイブリドーマは、*in vivo*において培養することもできる。具体的には、ヌードマウスの腹腔にハイブリドーマを接種することにより、腹腔内でハイブリドーマを培養することができる。モノクローナル抗体は、腹水中に蓄積する。したがって、腹水を採取し、必要に応じて精製すれば、必要なモノクローナル抗体を得ることができる。得られたモノクローナル抗体は、目的に応じて適宜、修飾、あるいは加工することができる。

【0063】

BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方に結合する抗体は、IPCに接触させるとその活性を抑制する。したがってこれらの抗体を、IPCの活性抑制剤、あるいは抑制方法に利用することができる。すなわち本発明は、下記(a)-(c)からなる群から選択される少なくとも1種類の成分を有効成分として含む、IPCの活性抑制剤を提供する。あるいは本発明は、下記(a)-(c)からなる群から選択される少なくとも1種類の成分を投与する工程を含むIPCの活性抑制方法に関する。更に本発明は、下記(a)-(c)からなる群から選択される少なくとも1種類の成分のIPC活性調節剤の製造における使用に関する。

(a)BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方に結合する抗体、またはその抗原結合領域を含む断片

(b)(a)の抗体の相補性決定領域を移植したイムノグロブリン、またはその抗原結合領域を含む断片、および

(c)(a)または(b)に記載の成分をコードするポリヌクレオチド

本発明において、IPCの活性を抑制するモノクローナル抗体としては、配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識するモノクローナル抗体を利用することができる。本発明においては、1種類あるいは複数種類のモノクローナル抗体を利用することができる。たとえば、ある特定のBST2またはそのサブタイプを認識する複数種のモノクローナル抗体を配合して、本発明に利用することができる。あるいは、異なるBST2またはそのサブ

10

20

30

40

50

タイプを認識する複数種のモノクローナル抗体を組み合わせて用いることもできる

【0064】

抗体がIPCのIFN産生活性の抑制作用を有することは次のようにして確認することができる。IPCはウイルスの刺激によってIFNを大量に産生する。IPCに対するウイルス刺激の前、後、あるいはウイルス刺激と同時に抗体を与え、抗体を与えないIPCを対照として、IFNの産生能を比較する。IFN産生能は、IPCの培養上清中に含まれるIFN- γ やIFN- β を測定することによって評価することができる。比較の結果、抗体の添加によって、上清中のIFNの量が有意に低下すれば、試験された抗体は、IFN産生能を抑制する作用を有することが確認できる。これらIFNの測定方法は公知である。IPCは、生体におけるIFNの大部分を産生する細胞である。したがって、IPCのIFN産生能の抑制によって、生体のIFNの産生状態を調節することができる。

10

【0065】

本発明において、IPC活性にはIPCの細胞数の維持が含まれる。したがって本発明におけるIPCの活性の抑制は、IPCの細胞数の抑制を含む。IFN産生と同様に、感染性のウイルスなどの刺激によってIPCの活性化が誘導される。活性化されたIPCの細胞数が、抗体の存在下で抑制されることを確認すれば、当該抗体がIPCの活性を抑制していることがわかる。比較対照としては、IFN産生と同様に、活性を確認すべき抗体と同じ動物種に由来する不活性なイムノグロブリンを用いることができる。IPCの細胞数は、細胞の計数によって定量的に比較することができる。細胞数は、FACSや顕微鏡によって計数することができる。

【0066】

また、IPCはウイルスなどの感染の結果DC 2(Dendritic Cell 2)というTh2を誘導する細胞へ分化するとも言われている。ウイルス刺激によるIPCのIFN産生を抑制できれば、Th2への分化も抑制できる可能性がある。したがって、IFN産生を抑制する本発明のモノクローナル抗体は、各種アレルギー疾患の治療効果も期待できる。

20

【0067】

BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を認識する抗体を、その抗体が由来する生物種とは異なる宿主に投与する場合には、当該宿主にとって異物と認識されにくい形に加工するのが望ましい。たとえば、次のような分子に加工することにより、イムノグロブリンを異物として認識されにくくすることができる。イムノグロブリン分子を以下のように加工する手法は公知である。

30

- 定常領域を欠失した抗原結合領域を含む断片(Monoclonal Antibodies : Principles and Practice, third edition, Academic Press Limited, 1995; Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)

- モノクローナル抗体の抗原結合領域と宿主のイムノグロブリンの定常領域とで構成されるキメラ抗体(遺伝子発現実験マニュアル 講談社 1994年 (石田 功、安東 民衛 編))

- 宿主のイムノグロブリンにおける相補性決定領域(CDR)をモノクローナル抗体のCDRに置換したCDR置換抗体(遺伝子発現実験マニュアル 講談社 1994年 (石田 功、安東 民衛 編))

【0068】

40

あるいはヒト抗体遺伝子を組み込まれた非ヒト動物を免疫動物として用いることにより、非ヒト動物を用いながら、ヒト抗体を得ることができる。たとえば、ヒト抗体遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスが、ヒト抗体を製造するための免疫動物として実用化されている(Ishida et al., Cloning and Stem Cells, 4:85-95,2002)。このような動物を用いることにより、ヒトのBST2を抗原として、BST2を認識するヒト抗体を得ることができる。ヒト抗体は、ヒトに投与する抗体として好ましい抗体である。

【0069】

あるいは、ファージディスプレイ法(McCafferty J. et al., Nature 348:552-554,1990; Kretzschmar T et.al., Curr Opin Biotechnol. 2002 Dec;13(6):598-602.)によって、ヒトのイムノグロブリン可変領域遺伝子を取得することもできる。ファージディスプレイ

50

法においては、ヒトイムノグロブリン可変領域をコードする遺伝子がファージ遺伝子に組み込まれる。多様なイムノグロブリン遺伝子をソースとして、ファージライブラリーを作成することもできる。ファージは自身を構成する蛋白質の融合蛋白質として、当該可変領域を発現する。ファージによって発現されたファージ表面の可変領域は、抗原との結合活性を維持している。したがって、抗原あるいは抗原を発現した細胞などに結合するファージを選択することによって、ファージライブラリーから、目的とする結合活性を有する可変領域を発現したファージをスクリーニングすることができる。更に、こうして選択されたファージ粒子の中には、目的とする結合活性を有する可変領域をコードする遺伝子が保持されている。すなわち、ファージディスプレイ法においては、可変領域の結合活性を指標として、目的とする結合活性を有する可変領域をコードしている遺伝子を取得することができる。

10

【0070】

本発明によるIPCの活性抑制剤、または抑制方法において、BST2およびそのホモログのいずれかまたは両方を認識する抗体またはその断片は、蛋白質として、あるいはそれをコードするポリヌクレオチドとして、投与することができる。ポリヌクレオチドを投与するには、目的とする蛋白質を発現できるように、適当なプロモーターの制御下に目的とする蛋白質をコードするポリヌクレオチドを配置したベクターを利用するのが望ましい。ベクターには、エンハンサーやターミネーターを配置することもできる。イムノグロブリンを構成する重鎖と軽鎖の遺伝子を保持し、イムノグロブリン分子を発現することができるベクターが公知である。

20

イムノグロブリンを発現することができるベクターは、細胞に導入することにより投与することができる。生体への投与にあたっては、生体への投与によって細胞に感染させることができるものはそのまま投与することができる。あるいは、いったん生体から分離したリンパ球にベクターを導入して再び生体に戻すこともできる(ex vivo)。

【0071】

本発明に基づくIPCの活性抑制剤、または抑制方法において、生体に投与されるモノクローナル抗体の量は、イムノグロブリンとして体重1kgあたり、通常0.5mg~100mg、たとえば1mg~50mg、好ましくは2mg~10mgである。生体への抗体の投与間隔は、治療期間中の生体内におけるイムノグロブリンの有効濃度が維持できるように適宜調節することができる。具体的には、たとえば、1~2週間間隔で投与することができる。投与経路は、任意である。当業者は、治療に際して効果的な投与経路を適宜選択することができる。具体的には、経口的に、あるいは非経口的な投与を示すことができる。たとえば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、あるいは皮下注射等により、全身あるいは局所に抗体を投与することができる。本発明における非経口投与に適当な製剤として、注射剤、座剤、噴霧剤などがあげられる。また細胞に与える場合には、培養液中に通常1µg/mL、好ましくは10µg/mL以上、より好ましくは50µg/mL以上、更に好ましくは0.5mg/mL以上のイムノグロブリンを与える。

30

【0072】

本発明のIPCの活性抑制剤または抑制方法において、モノクローナル抗体は、任意の方法により生体に投与することができる。通常モノクローナル抗体は、薬学的に許容される担体と配合される。モノクローナル抗体には、必要に応じて増粘剤、安定剤、防腐剤および可溶化剤などの添加剤を配合することができる。このような担体または添加剤としては、ラクトース、クエン酸、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、スクロース、デンプン、タルク、ジェラチン、寒天、植物油、エチレングリコールなどが挙げられる。「薬学的に許容される」という用語は、各国政府の監督当局により承認されているか、または各国の薬局方もしくは一般的に認知されている薬局方に動物、哺乳動物、および特にヒトへの使用に関して列記されていることを言う。本発明のIPCの活性抑制剤は、1回または複数回の用量の凍結乾燥粉末または錠剤の形態で供給することもできる。凍結乾燥粉末または錠剤には、更に、投与の前に該組成物を所望の濃度となるように溶解するための注射用の滅菌済みの水、生理的食塩水または緩衝液を組み合わせることもできる。

40

50

【 0 0 7 3 】

更に、イムノグロブリンを発現するベクターとして投与する場合には、重鎖と軽鎖を別のプラスミドとしてコトランスフェクトするとして、体重 1 kgあたり各プラスミドを 0 . 1 ~ 1 0 mg、たとえば 1 ~ 5 mgを投与することができる。また *in vitro*において細胞に導入するためには、1 ~ 5 $\mu\text{g}/10^6\text{cell}$ のベクターが用いられる。

【 0 0 7 4 】

IPCにおいては、BST2あるいはそのスプライシングバリエーションは、IPCの活性化に伴って発現が増強されることが明らかにされた。活性化されていないヒトIPCにおいてはBST2あるいはそのスプライシングバリエーションの発現はほとんど見られない。またマウスBST2は、活性化される前のIPCでも発現が見られるとともに、IPCの活性化に伴ってその発現レベルが

10

上昇する。したがってBST2あるいはそのスプライシングバリエーションは、IPCの活性化のマーカーとして有用である。すなわち本発明は、次の(a)-(d)のいずれかに記載の指標物質を検出する工程を含む、活性化されたIPCの検出方法に関する。

- (a) 配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド
- (b) 配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列から選択された連続する塩基配列を含むポリヌクレオチド
- (c) 配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質
- (d) 配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する蛋白質

20

【 0 0 7 5 】

活性化のマーカーは、蛋白質あるいは当該蛋白質をコードするmRNAの存在によって検出することができる。蛋白質やmRNAは、全長のみならずその部分配列であってもよい。部分配列を検出の対象とする場合には、特異性を期待できる程度の長さの配列を検出対象として選択することが好ましい。たとえばmRNAにおいては、一般に10b以上、好ましくは15b以上、たとえば15 - 500b程度の連続した塩基配列が検出対象となる。

上記指標物質の検出方法は、公知である。たとえば指標物質(a)または(b)のようなポリヌクレオチドは、各塩基配列に相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのハイブリダイズによって検出することができる。一方(c)または(d)のような蛋白質は、当該蛋白質を認識する抗体を用いて免疫学的に検出することができる。

30

【 0 0 7 6 】

本発明において、活性化されたIPCの検出とは、試料を構成する細胞に何らかの刺激によって活性化されたIPCが含まれることを確認することを言う。本発明による活性化されたIPCの検出により、試料が由来する生体あるいは組織において、IPCが活性化された状態にあることを明らかにできる。更に本発明の方法を利用して生体のIPCの活性化レベルを検査することもできる。すなわち本発明は、次の工程を含む、生体のIPCの活性化のレベルを測定する方法に関する。

(1) 生体から採取された試料に含まれるインターフェロン産生細胞における、(a)-(d)のいずれかに記載の指標物質を発現している細胞、およびその発現レベルのいずれかまたは両方を検出する工程、および

40

- (a) 配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド
 - (b) 配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列から選択された連続する塩基配列を含むポリヌクレオチド
 - (c) 配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質
 - (d) 配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6 からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する蛋白質
- (2) (1)で測定された細胞の数、およびその発現レベルのいずれかまたは両方を、被検者の

50

インターフェロン産生細胞の活性化のレベルに関連付ける工程

【0077】

本発明において、生体から採取される試料としては、IPCを含む可能性のある任意の試料を用いることができる。代表的な試料は、体液、皮膚、滑膜組織、造血組織、膿、肺胞洗浄液、および血液細胞を含む可能性のあるその他の生検組織試料である。体液には、血液、髄液、関節液、尿、涙液、唾液、および鼻汁等が含まれる。造血組織には、骨髄、および脾臓が含まれる。あるいは末梢血を試料とすることもできる。これらの組織に含まれる上記マーカーのいずれかを発現している細胞を検出することによって、活性化されたIPCの数を知ることができる。得られた活性化IPCの数のIPC全体に占める割合を明らかにすることによって、生体のIPCの活性化のレベルと前記マーカーが検出された細胞の数とを

10

【0078】

あるいは生体試料中に検出される前記指標物質の発現レベルを、被検者のインターフェロン産生細胞の活性化のレベルに関連付けることもできる。たとえばヒトにおいては、前記指標物質は、活性化されていないIPCにおいてはほとんど発現を検出することができな

い。したがって、前記指標物質の発現レベルは、IPCの活性化レベルと直接的に相関していると言ってよい。そのため、生体試料における前記指標物質の発現レベルが高いとき、被検者の当該生体試料においては、IPCの活性化のレベルが亢進している。言い換えれば、指標物質の発現レベルの上昇によって、生体試料におけるIPCの活性化レベルの上昇が検出される。指標物質の発現レベルは、IPCの各細胞の活性化のレベルと、活性化された細胞の数によって決定される。しかし、必ずしも両者を独立して評価しなくても、指標物質の発現レベルの総和に基づいて、IPCの活性化のレベルを評価することができる。特にヒトにおいては、不活性化IPCにおける前記指標物質の発現が検出できないことから、指標物質陽性（あるいは陰性）細胞の数を求めることなく、指標物質の発現レベルのみに基づいて、IPCの活性化のレベルを評価することができる。

20

30

【0079】

IPCは、生体において、IFNなどの産生を介して免疫システムを支える重要な細胞である。したがって、その活性化を知ることには、臨床的な意義がある。たとえば、本発明によって活性化IPC、あるいは被検者のIPCの活性化のレベルの上昇が確認されれば、被検者の免疫システムが活性化された状態にあることを知ることができる。具体的には、自己免疫疾患、およびウイルスなどの感染が疑われる。

たとえば、全身性エリテマトーデス患者の皮膚病変部におけるIPCの蓄積が報告されている(Farkas, L. et al. Am. J. Pathol. 159:237-243.2001)。あるいは、脊椎関節症患者の関節液中におけるIPCの増加が観察されている(Van Krinks. C.H. et al. Rheumatology, 43:453-460. 2004)。これらの生体試料中における前記指標物質の発現レベルを明らかにすることによって、自己免疫症状の程度を評価するための情報を得ることができる。

40

またウイルス感染においては、感染によって産生が誘導されるサイトカインの種類が、ウイルスの種類によって異なる場合のあることが知られている(Dalod, M. et al. J. Exp. Med. 195: 517-528.2002)。したがって、本発明の方法によって特にIPCの活性化を刺激するウイルスの種類を予め明らかにしておけば、逆にIPCの活性化を感染源であるウイルスの種類を特定するための診断材料の一つにすることができる。

【0080】

すなわち本発明は、次の工程を含む自己免疫疾患あるいはウイルス感染の検出方法に関する。

(1)生体試料中の、下記(a)-(d)のいずれかに記載の指標物質を発現している細胞および

50

、前記(a)-(d)のいずれかに記載の指標物質の発現レベルのいずれか、または両方を測定する工程、および

(2)(1)で測定された細胞の数、およびその発現レベルのいずれかまたは両方を、自己免疫疾患あるいはウイルス感染に関連付ける工程

(a)配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド

(b)配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列から選択された連続する塩基配列からなるポリヌクレオチド

(c)配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質

(d)配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列からなる蛋白質

本発明においては、対照と比較して、(1)で測定された細胞の数あるいは発現レベルが高い場合には、自己免疫疾患あるいはウイルス感染が検出される。本発明において、対照としては、健常者の測定結果を利用することができる。あるいは、同一の被検者について本発明の検出方法を繰り返すことによって、当該被検者の自己免疫疾患あるいはウイルス感染の症状の変化を追跡することもできる。

【0081】

本発明の検出方法、あるいは活性化レベルの測定方法は、たとえば次のようにして実施することができる。

細胞を含む試料をモノクローナル抗体と接触させ、試料中のIPCに前記マーカに結合する抗体を結合させる。細胞試料と抗体は、抗体の免疫学的結合活性が維持できる条件下で接触させられる。具体的には、弱酸性～弱アルカリ性のpHで、かつ生理食塩水に近い塩濃度のもとで接触させるのが望ましい。試料には、IPCを含む可能性があるあらゆる試料を用いることができる。たとえば、末梢血のリンパ球集団、あるいはリンパ節や脾臓等のリンパ系組織を試料とすることができる。これらの細胞試料の調製方法は公知である。あるいは、造血幹細胞を、IPCに分化させて細胞試料とすることもできる。造血幹細胞を含む細胞集団を、*in vitro*で、あるいは*in vivo*においてIPCに分化させる方法は公知である。人為的に分化させたIPCの検出あるいは同定は、IPCへの分化に必要な条件の探索において有用である。

【0082】

次いで、細胞に結合した抗体が検出される。例えば抗BST2抗体を標識し、当該標識を追跡することにより活性化IPCを検出することができる。抗体を標識する方法は公知である。抗体は、たとえば酵素、蛍光物質、発光物質、結合親和性物質、マイクロビーズ、あるいはラジオアイソトープ等の成分によって標識することができる。これらの成分を抗体に結合する方法も公知である。たとえば、マレイミド誘導体等の2官能性試薬を用いて、酵素、蛍光物質、あるいはマイクロビーズ等を抗体に直接結合することができる。あるいは、マイクロビーズの表面に抗体を物理吸着させることもできる。

その他、抗体を、適当な固相に結合しておくこともできる。プレートやチューブの内壁、カラムやキャピラリーの内壁、あるいはビーズ状の固相の表面などが固相として利用される。

本発明の抗体は、間接的に標識することもできる。たとえば、ラット由来の抗体は、ラットイムノグロブリンを認識する標識抗体によって、間接的に標識することができる。抗体を間接的に標識するための標識抗体は、一般に二次抗体と呼ばれる。

【0083】

本発明による活性化IPCの検出方法あるいは活性化レベルの測定方法において、抗体の標識は、各標識成分に応じた手法を利用することにより、追跡することができる。たとえば、蛍光物質であれば、励起光の照射により、蛍光を検知することができる。酵素標識の場合には、酵素反応の生成物を指標として、標識を追跡することができる。

【 0 0 8 4 】

標識の検知に先立ち、抗体と反応した細胞を分離することもできる。細胞の分離には、異なる細胞表面抗原を認識する抗体を利用することもできる。すなわち、前記マーカーに対する抗体と、IPCを認識する任意の抗体の組み合わせが利用される。たとえば、ある細胞集団をビーズに固定化したIPCに特異的な抗体と接触させて、IPCを特異的に捕捉する。次に、捕捉されたIPCに対して、IPCを認識する任意の抗体を結合させる。IPCを認識する任意の抗体を標識抗体としておけば、活性化IPCを検出することができる。

【 0 0 8 5 】

BST2およびそのスプライシングバリエーションのいずれかまたは両方に結合する抗体は、活性化IPCの検出用試薬とすることができる。本発明による活性化IPCの検出用試薬に、更にIPCの検出用試薬を組み合わせることによって、被検者のIPCの活性化のレベルを測定するためのキットを提供することができる。本発明においてIPCの検出用試薬とは、活性化の程度にかかわらずIPCを検出することができる試薬を言う。IPC検出用試薬としては、たとえばBDCA2あるいはBDCA4を認識する抗体を示すことができる。本発明の活性化IPCの検出用試薬およびIPCの検出用試薬における抗体は、上記のような標識成分で標識しておくことができる。あるいは、二次抗体と組み合わせて供給することもできる。これらの試薬に用いる抗体は、その抗原結合領域を含む任意の断片とすることができる。したがって、完全なイムノグロブリン分子のみならず、イムノグロブリンの抗原結合活性を保持した断片を用いることができる。このような断片としては、たとえばF(ab)2や、Fab等を示すことができる。

【 0 0 8 6 】

本発明の検出方法は、たとえば次のようにして実施することもできる。すなわち、細胞試料が有するmRNAを対象として、前記指標(a)または(b)を検出する。好ましい指標として、特にmRNAまたはmRNAから誘導されたcDNAを挙げることができる。指標(a)または(b)の検出には、配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列から選択された連続する塩基配列に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いることができる。オリゴヌクレオチドには、たとえば10 - 50b、好ましくは15 - 30bの長さを有するDNA、RNAあるいはその誘導体を用いることができる。このようなDNAは、化学的に合成することができる。合成にあたり、蛍光活性を有する誘導体などを用いることによって、DNAの誘導体とすることもできる。

【 0 0 8 7 】

オリゴヌクレオチドは、相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドにハイブリダイズする。このハイブリダイズを検出することにより、検出対象とした塩基配列を有するmRNAの存在を知ることができる。たとえばノーザンブロット法により、mRNA中に対象となるmRNAが含まれていることを直接知ることができる。あるいはRT-PCR法を利用して、対象となるmRNAの存在を検出することもできる。更に、細胞中に含まれるmRNAをin situハイブリダイゼーションやin situ PCR法によって直接解析することもできる。これらの解析方法はいずれも公知である。

【 0 0 8 8 】

本発明の検出方法に利用することができるオリゴヌクレオチドは、活性化IPCの検出用試薬とすることができる。本発明の活性化IPCの検出用試薬におけるオリゴヌクレオチドは、標識しておくことができる。標識には、蛍光物質、発光物質、放射活性物質、あるいは結合親和性物質などを用いることができる。蛍光物質としては、FITCやローダミンなどが知られている。結合親和性物質としては、ビオチンやジゴキシゲニンなどが利用される。

【 0 0 8 9 】

本発明の活性化IPCの検出に用いるオリゴヌクレオチドの塩基配列は、配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列に相補的な塩基配列からなる。特異的なハイブリダイズを達成する塩基配列は、目的とする標的塩基配列に対して必ずしも完全に相補的である必要は無い。ストリンジェ

ントな条件の元で、必要な特異性を達成できれば、配列の変異は許容される。設定された塩基配列を持ったオリゴヌクレオチドは化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、さまざまなフォーマットのハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。

【0090】

プライマーとして利用する場合には、相補鎖の合成原理に応じて複数の領域を設定することができる。たとえばPCRのためのプライマーであれば、合成の対象となるセグメントの5'側と3'側の両端を規定する領域がプライマーとして選択される。本発明によるオリゴヌクレオチドは、基本的なPCRのみならず、RNAを鋳型とするRT-PCR、増幅領域をネストさせて高感度な検出を可能とするネステッドPCR、あるいはcDNAの合成等、様々な相補鎖合成反応に応用することができる。

10

【0091】

更に抗体を用いた方法と同様に、ハイブリダイゼーションアッセイあるいは核酸増幅を利用する方法に基づいて、生体のIPCの活性化のレベルを測定することができる。すなわち、本発明によって検出される活性化IPCの、IPC全体に対する割合を明らかにすることによって、生体のIPCの活性化のレベルを知ることができる。IPC全体を反映することができるマーカーとしては、先に述べたBDCA2およびBDCA4などを用いることができる。ハイブリダイゼーションアッセイあるいは核酸増幅によるマーカーの測定では、細胞の数を直接的に決定することはできない。しかし、試料から抽出された全RNA、または全mRNAを対象として得られる結果は、各マーカーを発現している細胞の数を反映する。したがって各マーカーの発現レベルを比較することによって、活性化のレベルを明らかにすることもできる。なお試料間で発現レベルを正確に比較するためには、比較対照試料の間の細胞数の補正が必要な場合がある。細胞の種類および状態にかかわらず、発現レベルが一定に保たれている遺伝子は、細胞数の補正に利用することができる。このような遺伝子マーカーとして、アクチンあるいはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)などが用いられる。

20

【0092】

更に本発明は、BST2あるいはそのホモログを指標とする、活性化IPCの分離方法を提供する。すなわち本発明は、次の(a)-(d)のいずれかに記載の指標物質を有する細胞を単離する工程を含む、活性化されたIPCの分離方法に関する。

30

(a)配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド

(b)配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列から選択された連続する塩基配列を含むポリヌクレオチド

(c)配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質

(d)配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する蛋白質

【0093】

本発明の分離方法において、指標物質に結合する抗体は、前記検出方法における抗体と同様に、標識成分や固相に結合することができる。活性化IPCを含む細胞集団と上記マーカー(c)または(d)に対する抗体を結合させた後に、抗体と結合した細胞を分取することによって、活性化IPCを分離することができる。たとえば、標識成分と結合させた抗体を用いる場合には、標識成分を追跡し、標識成分が結合している細胞を分取することによって、活性化IPCを分離することができる。固相と結合させた抗体を利用する場合には、固相を回収すれば、活性化IPCが分離される。

40

【0094】

続いて抗体を利用した活性化IPCの分離手法を、具体的に述べる。たとえば、水不溶性担体に抗体を固定化し、これに細胞を直接的または間接的に結合させる方法を利用することができる。水不溶性担体には、セルロース誘導体やアガロース等からなるビーズやマト

50

リックス等が利用される。抗体を固定化した水不溶性担体は、カラムに充填して免疫吸着カラムとすることもできる。不溶性担体上の抗体に捕捉された活性化IPCは、免疫学的な結合を解離させる緩衝液によって溶出することができる。

【0095】

あるいは蛍光抗体標識細胞分離法や、免疫磁気ビーズによる分離法を利用することもできる。すなわち抗体が結合した細胞を蛍光標識や磁気標識を目印に、目的とする細胞を一つ一つ分離する方法である。これらの分離法には、FACSやMACSなどのセルソーターを用いるのが有利である。セルソーターを用いた細胞の分離方法は公知である。

【0096】

例えばAutoMACSによる細胞の分離においては、活性化IPCを含む細胞集団に、マーカーを認識する抗体を接触させる。細胞をPBSで洗浄後、次いで二次抗体を反応させる。マーカーに対する抗体がマウスIgGであれば、二次抗体にはビオチン化抗マウスIgG抗体などを利用することができる。あるいは、マーカーに対する抗体を予めビオチン化しておけば、二次抗体は不要である。さらに、細胞をPBSで洗浄後、ストレプトアビジンマグネティックビーズを反応させる。こうして活性化IPCには、マグネティックビーズが結合される。得られた細胞を磁気カラムに通すことにより、活性化IPCをカラムに捕捉することができる。このカラムを洗浄した後、カラムに残った細胞を溶出させれば、活性化IPCを回収することができる。MACSを利用した場合には、操作は30分間程度で完了する。つまり本発明の分離方法は、生体中にはわずしか見出すことのできない活性化IPCを大量に調製するための方法として有用である。

【0097】

あるいは本発明は、前記指標物質(a)-(d)のいずれかに記載の指標物質を有する細胞を単離する工程を含む、活性化IPCの分離方法に関する。本発明によって、前記指標物質(a)-(d)が活性化IPCの特異的なマーカーとして利用できることが明らかにされた。したがって、これらの指標物質が検出された細胞を単離することにより、活性化IPCを分離することができる。これらの指標物質の検出方法は、先に述べたとおりである。

【0098】

更に本発明者は、前記指標物質(a)-(d)がIPCのウイルス刺激によって発現が増強することを確認した。この知見に基づいて、前記指標物質(a)-(d)の測定によって、IPCの活性化のレベルを知ることができる。すなわち本発明は、次の工程を含む、IPCの活性化のレベルを測定する方法を提供する。

(1) IPCにおける、前記(a)-(d)のいずれかに記載の指標物質の発現レベルを測定する工程、および

(2) (1)で測定された指標物質の発現レベルが、刺激を与えないIPCと比較して上昇していた場合に、被検細胞が活性化されていると判定する工程

あるいは、(1)で測定された指標物質の発現レベルが、刺激を与えないIPCと比較して上昇していた場合に、活性化されたIPCが検出される。

【0099】

前記(a)-(d)の指標物質の発現レベルを測定するための方法は既に述べた。in vivoまたはin vitroにおいて、IPCにおいて前記(a)-(d)の指標物質の発現レベルが、無刺激のIPCと比較して上昇しているとき、そのIPCは活性化していることが確認できる。IPCは、ウイルスの刺激により活性化されることが明らかにされている。したがって、IPCにおける前記指標物質(a)-(d)の発現レベルの上昇は、IPCに対するウイルスの刺激の指標として有用である。つまり前記指標物質(a)-(d)の発現レベルの上昇を検出することによって、IPCのウイルスとの接触を検出することができる。IPCのウイルスとの接触は、そのIPCが由来する個体のウイルス感染経験を意味する。すなわち、本発明によって、個体のウイルス感染を検出することができる。

【0100】

更に本発明は、IPCにおける前記(a)-(d)の指標物質を指標として、IPCの活性化を調節する作用を測定する方法を提供する。すなわち本発明は、次の工程を含む、被験物質のIF

10

20

30

40

50

N産生細胞の活性化を調節する作用の検出方法を提供する。

(1) IFN産生細胞を被験物質とともに細胞刺激剤と接触させるか、またはIFN産生細胞と被験物質の接触の前、若しくは後に細胞刺激剤と接触させる工程

(2) IFN産生細胞における、(a)-(d)のいずれかに記載の指標物質の発現レベルを測定する工程、および

(a) 配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド

(b) 配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列から選択された連続する塩基配列を含むポリヌクレオチド

(c) 配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質

(d) 配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する蛋白質

(3) (2)で測定された指標物質の発現レベルを、対照と比較し、発現レベルが対照よりも有意に高い場合に被験物質のIPCの活性化を増強する作用が、また対照よりも有意に低い場合には被験物質のIPCの活性化を抑制する作用が検出される工程

【0101】

本発明の方法において、細胞刺激剤とはIPCの活性化を誘導しうる物質を言う。たとえば、ウイルスやウイルスの構成成分を、細胞刺激剤として示すことができる。具体的には、単純ヘルペスウイルス(Herpes simplex virus;HSV)、あるいはインフルエンザウイルス(10
Influenza virus)などのウイルスの投与によりIPCが活性化することが知られている。その他、バクテリア中のDNAであるCpGのIPC活性化作用も公知である。その他、インターフェロンとの接触によるIPCの活性化も公知である。具体的には、図13にも示すように、IFN-
によってIPC自身が活性化される。これらの細胞刺激剤は、単独で用いても良いし、異なる細胞刺激剤を組み合わせることもできる。細胞刺激剤と被験物質とは、同時にIPCに接触させても良いし、細胞刺激剤との接触の前あるいは後にIPCと被験物質を接触させることもできる。

【0102】

本発明において、細胞刺激剤、IPC、および被験物質は、生体外(in vitro)、生体内(in vivo)、あるいはex vivoにおいて接触させることができる。生体外(in vitro)においては、IPCを培養可能な条件下で、先に述べたような任意の順番で細胞刺激剤および被験物質をIPCと接触させることができる。また生体内(in vivo)においては、生体内のIPCに対して、被験物質あるいは細胞刺激物質を投与した後に、IPCを採取する。採取されたIPCを生体外において細胞刺激物質あるいは被験物質に接触させた後、細胞の活性化のレベルを評価することができる。細胞の活性化のレベルは、細胞が産生するIFNの濃度の変化などによって評価することができる。

更にex vivoでの評価においては、生体外で調製されたIPCに対して、細胞刺激剤または被験物質を接触させる。接触後のIPCを生体に投与し、更に被験物質または細胞刺激剤を投与する。生体内におけるIPCの活性化のレベルを評価し、被験物質の作用が評価される。IPCの活性化のレベルは、たとえば血中のIFNのレベルを指標として評価することができる。なお生体外におけるIPCの調製とは、生体からIPCを採取すること、あるいはIPCの前駆細胞の分化誘導によって人工的にIPCを調製することを言う。

【0103】

IPCに対する刺激はIFNの産生を誘導することから、その活性化の調節によってIFN産生を調節することができる。本発明において、IPCの活性化の調節とは、活性化を抑制または増強することを含む。具体的には、IPCの活性化を増強することができる物質は、IFN産生の増強剤として有用である。本発明によって、様々な物質について、ウイルスなどの刺激によるIPCの活性化を増強あるいは抑制する作用を評価することができる。逆に、IPCの活性化を抑制することができる物質はIFN産生の抑制剤として用いることができる。

【0104】

10

20

30

40

50

なお本発明の方法における対照としては、被験物質に代えてIPCの活性化に対する影響が予め知られている物質を用いることができる。たとえば、生理食塩水はIPCの活性化に影響を与えない物質である。あるいはIPCの活性化を増強、あるいは抑制することが確認されている物質を対象として用い、その物質との相対的な比較によって被験化合物の作用を評価することもできる。

【0105】

前記(a)-(d)の指標を測定するための試薬は、本発明に基づくIPCの活性化を調節する作用を測定するための試薬として利用することができる。たとえば配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列から選択された少なくとも15塩基からなる連続した塩基配列を含むオリゴヌクレオチドは、IPCの活性を調節する作用を検出するための試薬として有用である。

10

【0106】

あるいは配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識する抗体は、IPCの活性を調節する作用を検出するための試薬として有用である。このような抗体としては、BST2およびそのスプライシングパリアントのいずれか、または両方を認識する抗体を用いることができる。

【0107】

本発明によるIPCの活性化を調節する作用を測定するための試薬には、更にIPCを活性化するための細胞刺激剤、IPCの培養のための培地や培養容器などを組み合わせることもできる。また、IPCの活性化作用に与える影響が明らかな物質を対照として組み合わせることもできる。

20

【0108】

更に本発明のIPCの活性化を調節する作用を測定する方法を利用して、IPCの活性化を調節する作用を有する物質のスクリーニング方法が提供される。すなわち本発明は、次の工程を含む、IPCの活性を調節する作用を有する被験物質のスクリーニング方法を提供する。

(1) IFN産生細胞を被験物質とともに細胞刺激剤と接触させるか、またはIFN産生細胞と被験物質の接触の前、若しくは後に細胞刺激剤と接触させる工程

(2) IFN産生細胞における、(a)-(d)のいずれかに記載の指標物質の発現レベルを測定する工程、

30

(a) 配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド

(b) 配列番号：1、配列番号：3、および配列番号：5からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載の塩基配列から選択された連続する塩基配列からなるポリヌクレオチド

(c) 配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質

(d) 配列番号：2、配列番号：4、および配列番号：6からなる群から選択されるいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列からなる蛋白質

40

(3) (2)で測定された指標物質の発現レベルを、対照と比較し、発現レベルが対照よりも有意に高い場合に被験物質のIPCの活性化を増強する作用が、また対照よりも有意に低い場合には被験物質のIPCの活性化を抑制する作用が検出される工程、および

(4) 対照と比較して前記活性化を調節する作用が大きい被験化合物を選択する工程

【0109】

本発明のスクリーニング方法によって選択することができる化合物は、IPCの活性化の調節剤として有用である。本発明のスクリーニング方法において、IPCに対する活性化を増強する作用が明らかな物質を接触させたIPCを対照として用いれば、この物質よりも活性化増強作用の大きい物質を見出すことができる。逆に、IPCの活性化を抑制する作用を有する物質を接触させたIPCを対照とすることで、当該物質よりも更に抑制作用の大きい

50

単離されたポリヌクレオチドとは、そのポリヌクレオチドが由来する天然起源に存在する他の核酸分子から分離されたポリヌクレオチドのことである。単離されたポリヌクレオチドは、たとえば、ベクターに含有されている組換えDNA分子、異種宿主細胞内に維持されている組換えDNA分子、部分的または実質的に精製された核酸分子、および合成のDNA分子またはRNA分子が含まれる。cDNA分子のような「単離された」ポリヌクレオチドは、組換え技術により作製された場合には、他の細胞材料もしくは培養培地を実質的に含まない。または化学合成されたポリヌクレオチドは、化学前駆物質もしくはその他の化学物質を実質的に含まない可能性がある。

【0114】

また本発明のタンパク質は、単離されたあるいは精製されたタンパク質を含む。「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的活性部分は、たとえば前記アミノ酸配列：4あるいは配列番号：6からなるタンパク質が由来する細胞もしくは組織の起源からの細胞材料もしくはその他の混入タンパク質を実質的に含まない。あるいは本発明のタンパク質が化学合成された場合には、化学前駆物質もしくはその他の化学物質を実質的に含まない。「細胞材料を実質的に含まない」という用語は、単離されたまたは組換え作製された細胞の細胞要素からタンパク質が分離されていることを意味する。1つの態様において、「細胞材料を実質的に含まない」という用語は、本発明のタンパク質に混入したそれ以外のタンパク質が、乾重量で約30%未満、より好ましくは約20%未満、さらに好ましくは約10%未満、最も好ましくは約5%未満であることを言う。本発明のタンパク質またはその生物学的活性部分が組換え作製される場合には、好ましくは培養培地も実質的に含まない。本発明において培養培地を実質的に含まないとは、培養培地がタンパク質調製物の容量の約20%未満、より好ましくは約10%未満、最も好ましくは約5%未満であることを言う。

【0115】

配列番号：4に記載のアミノ酸配列のうち、N末端から138位までのアミノ酸配列は、配列番号：2に記載されたアミノ酸配列と一致している。同様に、配列番号：6に記載のアミノ酸配列のうち、N末端から95位までのアミノ酸配列は、配列番号：2に記載されたアミノ酸配列と一致している。配列番号：2に記載されたアミノ酸配列は、BST2(bone marrow stromal cell antigen 2)として公知である(GenBank Acc#.BC027328)。本発明者が見出した新規なアミノ酸配列からなる蛋白質は、BST2のスプライシングバリエーションであると考えられた。

【0116】

本発明のポリヌクレオチド、ならびに当該ポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質、更にそれらの機能的同等物は、いずれも活性化IPCの指標として有用である。また本発明において明らかにされた以下に記載の本発明の蛋白質に固有のアミノ酸配列は、本発明の蛋白質に特異的に結合する抗体を得るための免疫原として有用である。このような抗体によって、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と、配列番号：4および配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の分別測定が可能となる。すなわち本発明は、次のアミノ酸配列を含む領域を認識する抗体に関する。

配列番号：4における139 - 158位のアミノ酸配列

配列番号：6における96 - 100位のアミノ酸配列

【0117】

本発明の抗体は、前記アミノ酸配列を含むポリペプチドを免疫原として作成することができる。具体的には、たとえば5～50アミノ酸残基、たとえば5～30アミノ酸残基のポリペプチドを免疫原として用いることができる。免疫原とするポリペプチドは、化学合成や、配列番号：4および配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の消化によって得ることができる。免疫原ポリペプチドは、担体蛋白質と結合することができる。担体蛋白質としては、キーホールリンペットのヘモシアニン等を用いることができる。あるいは、配列番号：4および配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をそのまま免疫原として利用することもできる。

【0118】

得られた抗体は、エピトープマッピングによって、その抗原決定基を同定することができる。エピトープマッピングとは、抗体が認識するアミノ酸配列（抗原決定基）を同定することを言う。実際には、上記アミノ酸配列またはその部分配列からなるペプチド、もしくは上記アミノ酸配列を含む各種のアミノ酸配列からなる複数種のオリゴペプチドを使った吸収試験、あるいは結合試験によって、抗原決定基を同定することができる。

【0119】

更に、これらの一次構造(primary structure)上の相違に加えて、各サブタイプに固有の高次構造(conformation)を識別する抗体も、サブタイプの分別測定に利用することができる。高次構造を識別する抗体は、各サブタイプを免疫原として作成された抗体の、他のサブタイプに対する交差性を明らかにすることによって選択することができる。選択された各サブタイプに特異的に結合する抗体の結合活性が、たとえば、上記の固有アミノ酸配列からなるオリゴペプチドによって吸収されない場合、当該抗体は、サブタイプに固有な高次構造を認識している可能性がある。

同様に、配列番号：3あるいは配列番号：5の塩基配列中、これらのアミノ酸配列をコードする塩基配列は、それぞれの遺伝子の特異的に検出するための標的配列として有用である。すなわち、次の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドを検出するためのプローブあるいはプライマーとして有用である。

配列番号：3における418 - 477位の塩基配列

配列番号：5における289 - 303位の塩基配列

【0120】

本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：1に記載の塩基配列に基づいてデザインされたプローブを利用して、IPCのcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって得ることができる。あるいは、配列番号：1に記載の塩基配列に基づいてデザインされたプライマーを利用して、IPCのcDNAライブラリーやmRNAを鋳型とするPCR法(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4)によって、本発明のポリヌクレオチドを合成することができる。当業者は、与えられた塩基配列に基づいてプローブやプライマーをデザインすることができる。

【0121】

本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：4、または配列番号：6に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：4、または配列番号：6に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等なタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。本発明において機能的に同等な蛋白質とは、活性化IPCにおいて発現が見られ、かつIPCの活性化に伴って発現が上昇する蛋白質を含む。本発明の好ましい態様において、機能的に同等な蛋白質は、当該蛋白質に結合する抗体を、当該蛋白質を発現する細胞に接触させたときに、当該細胞の活性が抑制されることによって特徴付けることができる。ここで細胞の活性には、IFNの産生能、および細胞数のいずれか、または両方が含まれる。本発明における細胞のIFN産生能とは、好ましくはタイプ1 IFNである。より具体的には、IFN およびIFN のいずれか、または両方の産生能を言う。

【0122】

アミノ酸配列の変異は、人為的なものであっても、自然において生じる変異であってもよい。本発明の蛋白質は、好ましくは天然由来である。本発明において許容されるアミノ酸の変異の数は、通常50アミノ酸以内であり、好ましくは30アミノ酸以内であり、さらに好ましくは10アミノ酸以内である。例えば、5アミノ酸以内、あるいは3アミノ酸以内の置換は許容される。アミノ酸を置換する場合には、保存的置換であることが望ましい。一般に蛋白質の機能の維持のためには、置換するアミノ酸は、置換前のアミノ酸と類似の性質を有するアミノ酸であることが好ましい。このようなアミノ酸残基の置換は、保存的置換と呼ばれている。

【 0 1 2 3 】

例えば、以下に示す各分類に含まれるアミノ酸間の置換によって、アミノ酸の保存的置換を行うことができる。

非極性アミノ酸：Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trp

非荷電性アミノ酸：Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Gln

酸性アミノ酸：AspおよびGlu

塩基性アミノ酸：Lys、Arg、His

【 0 1 2 4 】

また本発明のポリヌクレオチドは、他のタンパク質またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと接合することができる。このようなポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質と、それ以外のタンパク質あるいはポリペプチドとの接合体（融合タンパク質）を与える。たとえば、ヒスチジンタグ、flag-tagなどを、任意のタンパク質に付加する方法が公知である。これらのタンパク質を付加することによって、本発明のタンパク質の検出や精製に利用することができる。本発明のタンパク質の機能が維持される限り、本発明のタンパク質は、それを含む融合タンパク質であっても良い。

10

【 0 1 2 5 】

また本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。本発明におけるハイブリダイゼーションの条件は、洗浄条件として通常「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度であり、さらに厳しい条件としては「0.1xSSC、0.1% SDS、65℃」程度を示すことができる。ストリンジエンシーは、厳しい条件とするほど、相同性の高いポリヌクレオチドを得ることができる。本明細書においてストリンジентな条件としては、ハイブリダイゼーションを「6 x SSC、40%ホルムアミド、37℃」、洗浄を「0.2 x SSC、55℃」で行う条件をストリンジентな条件として示すこともできる。

20

【 0 1 2 6 】

上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示である。当業者は、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する種々の条件を調節することにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することができる。たとえば、上記条件の他にもプローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間などは、ストリンジエンシーを左右する条件として挙げられる。

30

【 0 1 2 7 】

このようなハイブリダイゼーション技術を利用してポリヌクレオチドは、配列番号：1に記載の塩基配列と高い相同性を有する。また塩基配列の相同性が高いポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列も、高い相同性が期待される。本発明において高い相同性とは、90%以上、または93%以上、あるいは95%以上、更には97%以上、そして99%以上の同一性を言う。同一性は、BLAST検索アルゴリズムを用いて決定することができる。

【 0 1 2 8 】

本発明におけるアミノ酸配列や塩基配列の相同性は、Karlin and Altschul によるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、blastnやblastxと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol.215:403-410, 1990)。BLASTに基づいてblastnによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえばscore = 100、wordlength = 12とする。また、BLASTに基づいてblastxによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

40

【 0 1 2 9 】

加えて本発明は、本発明のポリヌクレオチドが挿入されたベクターに関する。本発明の

50

ベクターは、挿入したDNAを安定に保持するものであれば特に制限されない。例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBluescriptベクター(St ratagene社製)などが好ましい。本発明の蛋白質を生産するためにベクターを用いる場合には、発現ベクターを用いることができる。任意の遺伝子を発現させるための様々なベクターが市販されている。これらのベクターのクローニングサイトに本発明のDNAを挿入することにより、目的とするベクターを得ることができる。

【0130】

更に本発明は、本発明のベクターを保持する形質転換体に関する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。蛋白質を高発現させるための真核細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞などを例示することができる。

10

【0131】

ベクターを宿主細胞に導入するための方法も公知である。たとえば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法(GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法などの方法で宿主細胞にベクターを導入することができる。ベクターを導入した細胞を、当該遺伝子の発現が誘導される条件下で培養することによって、目的とするアミノ酸配列を有する蛋白質の発現が誘導される。更に形質転換体の培養物から蛋白質を精製することによって、本発明の蛋白質を単離することができる。組み換え蛋白質の精製方法も公知である。このようにして得ることができる本発明の蛋白質は、たとえば本発明の蛋白質を認識する抗体を調製するための免疫原として有用である。

20

なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

以下、実施例に基づいて本発明を更に詳細に説明する。

【実施例1】

【0132】

モノクローナル抗体作成プロトコール

免疫原とする細胞は以下のようにして調製した。Balb/cマウス雌(4~6週令)の骨髓細胞を、10ng/mlのFLT-3リガンド(R&D Systems社製)を添加した10%FCS-RPMI1640培地〔10%牛胎児血清(FCS)、およびペニシリン、ストレプトマイシンを含むRPMI1640培地〕にて10日間培養した。10日後、IPC(Interferon producing cell)を、CD11c陽性、CD11b陰性、B220陽性分画としてセルソーター(FACSVantage, Becton Dickinson社製)で分離した。抗体はBecton Dickinson社製のものを用いた。

30

上記の分離した細胞を、0、4、11日目に、片足あたり 1×10^6 個ずつ、完全フロインドアジュバント(CFA:ヤトロン社製)と共にラットのフットパッド(foot pad)へ注入した。12日目に免疫ラットのリンパ節を分離し、リンパ球を採取した。マウスのミエローマ細胞P3x63Ag8.653とラットのリンパ球を4:5の割合で混合し、ポリエチレングリコール(PEG)を加えて細胞を融合した。融合後の細胞を十分に洗浄してHAT培地に分散させ、1ウェルあたり 5×10^4 個の細胞を含むように96 well plateにまいた。

40

【0133】

細胞が増殖したウェルの細胞を回収して希釈して、その培養上清をマウス脾臓細胞、及び培養骨髓細胞に対する反応性を指標としてスクリーニングした。スクリーニング方法の詳細は実施例2のとおりである。陽性反応を示したウェルの細胞を限外希釈によりクローニングし、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを確立した。更に、ハイブリドーマの培養上清、あるいはハイブリドーマをマウスの腹腔内に移植して得られた腹水より精製された抗体の反応性を解析した。

【実施例2】

【0134】

培養上清のスクリーニング

50

Balb/cマウス雌(4~6週令)の骨髄細胞を、10ng/mlのFLT-3リガンドを添加した10%FCS-RPMI1640培地にて10日間培養した。10日目には約40%の細胞がIPCになった。この細胞を用い、ハイブリドーマ培養上清を1次抗体とし、2次抗体にFITC標識抗ラットIg抗体(BD Pharmingen社製)を用いて染色した。その後、各種抗体(CD11b、CD11c、CD3、CD19、CD45RB、B220、Ly6C;いずれもBecton Dickinson社製)により二重染色し、フローサイトメトリー法により解析(FACS解析)した。

【0135】

培養上清陽性分画、陰性分画をそれぞれR2、R3とし各々のGate内での各種抗原の発現をヒストグラムで示した(図1)。作成した数種類の抗体によって染色される細胞群は、文献上で定義されているマウスIPC(Nature Immunol., 2001; 2, 1144-1150.)の細胞表面抗原プロファイルが一致した。したがって、これらの抗体はマウスIPCに特異的に結合する抗体であると考えられた。

【実施例3】

【0136】

抗体で分離した細胞の形態

実施例2と同様に培養した骨髄細胞を、培養上清を1次抗体とし、2次抗体にFITC標識抗ラットIg抗体を用いて染色した。その後、セルソーター(FACSVantage, Becton Dickinson社製)を用いて陽性細胞を分離した。サイトスピン後、ギムザ染色し、顕微鏡下にて観察したところ、IPCに特異的な形態を示した(図2a)。すなわち、この細胞の形は丸く、大きな核を有していた。

【0137】

1×10^5 個の細胞を96 well 丸底プレートにてインフルエンザウイルスPR8と共に24時間37にて培養し、同様にギムザ染色した後、顕微鏡下にて観察したところ、形態的に典型的な樹状細胞に分化した(図2b)。この結果から、上記抗体によって分離された細胞は、ウイルス感染によって樹状細胞に分化するというマウスIPCの特徴を有していることが確認された。このようなマウスIPC特異的なモノクローナル抗体およびその抗体を産生するハイブリドーマのうち、SNK01を選択して以降の実験に用いた。

【実施例4】

【0138】

抗体で分離した細胞のインターフェロン産生能

実施例2と同様に培養した骨髄細胞をSNK01培養上清および2次抗体で染色後、セルソーターにて陽性、陰性細胞を分離した。各々の分画の細胞、 1×10^5 個ずつを96 well 丸底プレートに分注し(100 μ l/well)、インフルエンザウイルスPR8を感染させ、24時間後の培養上清中のIFN の濃度を以下のようなELISA法にて測定した。

【0139】

まずラット抗マウスIFN 抗体(PBL Biomedical Laboratory社製)を96 wellプレートに4 で一晚反応させ、プレートコートした。プレートを洗浄後、培養上清100 μ lを添加し、4 で一晚反応させた。プレートを洗浄後、IFN とIFN を認識する標識化抗インターフェロン抗体を添加し、1時間反応させて、検出を行った。それぞれの反応は3連で行い、平均値を求めた。検量線を作成することにより、培養上清中のIFN 濃度を算出した。

SNK01陽性細胞では、陰性細胞に比べて、高いインターフェロンの産生が認められた。すなわち、モノクローナル抗体SNK01が認識する抗原はIPCに特異的な表面抗原であることが確認できた(図3)。

【実施例5】

【0140】

抗体のマウスインターフェロン産生能への影響

実施例2と同様に培養したマウス骨髄細胞を 1×10^5 個ずつ、96 well丸底プレートに分注した。これにSNK01抗体、またはコントロール抗体であるラットIgGを添加し、37にて30分間培養後、インフルエンザウイルスPR8を添加し、37にて24時間培養し、培養上清中のIFN を上記実施例4に示したELISAにより測定した(図4)。その結果、SNK01は濃度

依存的にIFN の産生を抑制した。すなわち、この抗体のマウスIPCに与える作用は、特異的な作用であると考えられた。

【実施例6】

【0141】

抗体が認識する分子のクローニング

1) IPC-cDNAライブラリーの作製

実施例2と同様にFLT-3リガンドで骨髄細胞から誘導したIPCより全RNAをフェノール-グアニジン法により抽出し、oligo-dTカラムによりmRNAを精製した。精製したmRNAからGubler-Hofman法によりcDNAを合成し、両端にEcoRI-NotIアダプター(インビトロジェン社製)を結合後、スパンカラム(クロマスピン400、クロンテック社製)により未反応のEcoRIアダプターおよび500塩基以下の短いcDNAを除去した。得られた両端にEcoRIサイトを有するcDNAを動物細胞用発現用ベクターpME18s(XhoI断片を除いたもの)のEcoRIサイトにT4リガーゼにより結合し、大腸菌DH10(インビトロジェン社製)にエレクトロポレーション法により形質転換した。これを100µg/mlのカルベニシリンを含むLB培地(LB・カルベニシリン)500mlで30℃で一晩培養し、QIA filter plasmid maxi kit(Qiagen社製)により同キットのプロトコールに従ってplasmidを抽出、精製し、IPC-cDNAライブラリーを得た。

10

【0142】

2) COS7細胞による発現クローニング

COS7細胞を6cmディッシュに 5×10^5 個ずつ10枚まき、37℃、5%CO₂存在下で20時間培養後、Effectene transfection Reagent(Qiagen社製)により同製品のプロトコールに従い、上記1)で取得したIPC cDNAライブラリーをtransfectionした。48時間、37℃、5%CO₂下で培養後、PBS(Phosphate Buffered Saline)で洗浄、PBS/5mM EDTAで細胞をディッシュから剥離し、さらにPBSで洗浄後、セルストレーナー(70µm、ファルコン社製)を通した。遠心後(1300rpm、5分)上清を除去し、PBS/0.5%BSA/2mM EDTAを1ml添加して懸濁し、Fc block(ファージン社製)40µlを加え4℃で20分間置いた。これにビオチン化したSNK01抗体30~50µgを加え、氷上で30分間保持した。PBSで洗浄後、100µlのPBSに懸濁し、ストレプトアビジンマイクロビーズ(Miltenyi Biotec社製)10-20µlを加え10℃で15分静置した。PBS/0.5%BSA/2mM EDTAで洗浄することにより過剰なストレプトアビジンマイクロビーズを除去し、1mlのPBS/0.5%BSA/2mM EDTAに懸濁した。AutoMACS(Miltenyi Biotec社製)でposseldsの条件で細胞を分取した。改良Hirt法(BioTechniques Vol.24,760-762,1998)によりplasmidを抽出、精製した。得られたplasmidを大腸菌DH10にエレクトロポレーション法により形質転換し、LB・カルベニシリン100mlで30℃で一晩培養し、QIA filter plasmid midi kit(Qiagen社製)により同キットのプロトコールに従ってplasmidを抽出、精製した。

20

30

【0143】

以上の操作を1クールとして、この後同じ操作を4回繰り返し、SNK01抗体に反応する抗原をコードするplasmidを濃縮した。最後に、AutoMACSのかわりにセルソーター(FACSantage, Becton Dickinson社製)により陽性細胞を分取し、これらより抽出したplasmidを形質転換した大腸菌DH10を適量LB・カルベニシリンプレートに塗布した。30℃で一晩培養し、現れたコロニーを30個ピックアップし、それぞれよりplasmidを抽出、COS7細胞にtransfectionし、SNK01抗体を用いてFACS解析することにより陽性plasmidを選抜した。

40

【0144】

得られたplasmid上にクローン化されているcDNAの塩基配列を決定し、マウス遺伝子データベースに登録されている塩基配列情報とblastサーチすることにより、その遺伝子を決定した。また、同時にヒト遺伝子データベースをサーチすることによりそのカウンターパートを同定した。

その結果モノクローナル抗体SNK01が結合したクローンは、配列番号:7および、配列番号:9に記載の塩基配列を有していた。これらの塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を、配列番号:8および配列番号:10に示した。

配列番号:9に記載の塩基配列は、マウスBST2として既知の塩基配列であった(GenBank

50

Acc#.BC027328)。一方、配列番号：7に記載の塩基配列は、配列番号：9の塩基配列と部分的に同一の塩基配列を有していたが、3'末端側に異なる塩基配列が見られ、異なるアミノ酸配列をコードしていた。すなわち、配列番号：8に記載のアミノ酸配列のうち、N末端から139位までのアミノ酸配列は、配列番号：10に記載されたアミノ酸配列と一致した。そして配列番号：8に記載のアミノ酸配列において、N末端から140～178番目のアミノ酸は、配列番号：8に記載のアミノ酸配列に固有の配列であった。両者はオータナティブスプライシングによって生じたバリエーションであると考えられた。これらの知見に基づいて、配列番号：7に記載の塩基配列によってコードされるアミノ酸配列（配列番号：8）からなるタンパク質は、マウスBST2の新規なスプライシングバリエーションであると考えられた。以下、配列番号：7に記載の塩基配列からなる遺伝子をmBST2H、配列番号：9に記載の塩基配列からなる遺伝子をmBST2Dとも称する。（図7(a)）

10

【0145】

3) FACSによる確認

上記発現クローニング法により得られたプラスミドをQIA filter plasmid midi kit (Qiagen社製)により再度大腸菌より高度に精製し、もう一度COS7細胞にtransfectionした。48時間後、定法に従って、SNK01抗体およびFITC標識抗ラットIg抗体で反応させ、FACS解析を行うことで、plasmid上にクローン化されているcDNAが、抗原をコードしているかどうかを確認した。

その結果、上記モノクローナル抗体SNK01は、プラスミドを導入したCOS7細胞に対する結合が観察された。したがって、プラスミド上にクローン化されているcDNAは、いずれもこのモノクローナル抗体によって認識された抗原をコードしていることが確認された。

20

【実施例7】

【0146】

ウエスタンブロッティング法による抗体の反応性の確認

前記モノクローナル抗体が、配列番号：8または配列番号：10に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を認識し結合することを、ウエスタンブロッティング法によって確認した。配列番号：8または配列番号：10に記載のアミノ酸配列を遺伝子組み換え体として発現させ、本発明のモノクローナル抗体との反応性を確認した。具体的な操作は次のとおりである。

【0147】

30

1) pcDNA3.1-mBST2DおよびpcDNA3.1-mBST2Hの構築

クローニングしたmBST2DおよびmBST2Hをコードするplasmid(1 μ g)を鋳型として、PCRにより配列番号：7または配列番号：9に記載の塩基配列を有するDNAを増幅した。PCRに用いたプライマーの塩基配列は次のとおりである。

forward primer (配列番号：11)：

5'-tttttgctagcgacggatcacaatggcgcctcttctatcactatctgcccgtgccatggatgagatgggggggaa
gcaagga-3'

reverse primer (配列番号：12)

5'-tttttttctcgagtcctcaaaagagcaggaacagtgac-3'

また反応液の組成は以下のとおりである。

40

1X GC buffer I,

dNTP mix (0.25 mM),

LA Taq DNA polymerase 5U(以上タカラバイオ製)/100 μ L

forward primer (1 pmol):

reverse primer (1 pmol)

【0148】

95 $^{\circ}$ Cで1分インキュベート後、[95 $^{\circ}$ C 30秒/55 $^{\circ}$ C 30秒/72 $^{\circ}$ C 1分30秒]を1サイクルとして、25回の条件でPCRを行った。アガロースゲル電気泳動にて目的の大きさのDNA断片が増幅されていることを確認後、フェノールクロロフォルム抽出、エタノール沈殿後、回収した増幅産物をTE buffer 10 μ Lに溶解した。これを制限酵素Nhe I

50

およびXho I (タカラバイオ製)で切断後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いてアガロースゲル電気泳動により精製し、エタノール沈殿後、TE buffer 4 μ Lに溶解した。

一方、哺乳動物細胞発現plasmid pcDNA3.1 (インビトロジェン社製) 5 μ gを制限酵素Nhe IおよびXho Iで消化、CIAP (タカラバイオ製)処理後、アガロースゲル電気泳動により精製し、エタノール沈殿後、TE buffer 4 μ Lに溶解した。前述のDNA断片それぞれ2 μ Lと、このplasmid 0.5 μ Lをligation kit ver. II (タカラバイオ製)を用いて連結し、大腸菌DH5に形質転換した。

LB培地 (100 μ g/mlアンピシリン)にて37^oで一晩培養後、出現したコロニー数個を選び、QIAprep Spin miniprep kit(QIAGEN社製)を用いてplasmidを抽出した。抽出されたプラスミドに挿入されているDNA断片の塩基配列を定法に従って決定した。配列番号：8または配列番号：10に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA断片が挿入されているプラスミドであることを確認し、目的の構築物pcDNA3.1-mBST2DおよびpcDNA3.1-mBST2Hを得た。

【0149】

2) pcDNA3.1-mBST2D-HisおよびpcDNA3.1-mBST2H-Hisの構築

pcDNA3.1-mBST2D (pcDNA3.1-mBST2D-His構築の場合)あるいはpcDNA3.1-mBST2H (pcDNA3.1-mBST2H-His構築の場合) 1 μ gを鋳型として、PCRによりHisタグをコードする塩基配列を付加した。PCRに用いたプライマーの塩基配列は次のとおりである。なおforward primer (配列番号：13)は、pcDNA3.1-mBST2D-HisとpcDNA3.1-mBST2H-Hisに同じものを用いた。反応液の組成と温度サイクルの条件は1)と同様とした。

forward primer (配列番号：13)：

5'-ccagctcaccgcacccaggacagtc-3'

reverse primer (pcDNA3.1-mBST2D-His用、配列番号：14)：

5'-tttttttctcgagtcgatgatgatgatgatgaaagagcagaaacagtgacactttga-3'

reverse primer (pcDNA3.1-mBST2H-His用、配列番号：15)：

5'-tttttttctcgagtcgatgatgatgatgatggaagtctccttttgatcctgagctg-3'

【0150】

アガロースゲル電気泳動にて目的の大きさのDNA断片が増幅されていることを確認後、フェノールクロロフォルム抽出、エタノール沈殿後、TE buffer 10 μ Lに溶解した。これを制限酵素BamH IおよびXho I (タカラバイオ製)で切断後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いてアガロースゲル電気泳動により精製し、エタノール沈殿後、TE buffer 4 μ Lに溶解した。

一方、pcDNA3.1-mBST2D およびpcDNA3.1-mBST2H 5 μ gを制限酵素BamH IおよびXho Iで消化、CIAP (タカラバイオ製)処理後、アガロースゲル電気泳動により精製し、エタノール沈殿後、TE buffer 4 μ Lに溶解した。PCRで増幅されたDNA断片それぞれ2 μ Lとこれらのplasmid 0.5 μ Lをligation kit ver. II (タカラバイオ製)を用いて連結し、大腸菌DH5に形質転換した。

LB培地 (100 μ g/mlアンピシリン)にて37^oで一晩培養後、出現したコロニー数個を選び、QIAprep Spin miniprep kit(QIAGEN社製)を用いてこれらよりplasmidを抽出した。抽出されたプラスミドに挿入されているDNA断片の塩基配列を定法に従って決定した。Hisタグをコードする塩基配列が付加されたDNA断片が挿入されていることを確認し、目的の構築物pcDNA3.1-mBST2D-HisおよびpcDNA3.1-mBST2H-Hisを得た。

【0151】

3) Western-blotting

6 cmディッシュにCOS7細胞を5 \times 10⁵で10枚まき、37^o、5%CO₂下で20時間培養した。培養後のCOS7細胞に、Effectene transfection Reagent(Qiagen社製)により、pcDNA3.1-mBST2D-HisあるいはpcDNA3.1-mBST2H-Hisを形質転換した。操作は、同製品のプロトコールに従った。37^o・5%CO₂下で48時間の培養後、PBSで洗浄、PBS/5mM EDTAで細胞をディッシュから剥離し回収した。回収した細胞は、さらにPBSで洗浄後、1xHaIt Prot

ease Inhibitor Coctail (PIERCE 社製)を含む2mlのRIPA bufferを加えて氷上で1時間溶解した。RIPA bufferの組成を以下に示す。

50 mM Tris-HCl (pH7.4),
150 mM NaCl,
1% Triton x-100,
0.5% sodium deoxycholate,
0.1% SDS

【 0 1 5 2 】

溶解後の細胞は、4、15000 rpm、5分間の遠心分離した。上清はMicrocon YM-10(MILLIPORE社製)にて50 μL以下まで濃縮し、ウエスタンブロッティングの試料とした。一方、沈殿物は、1xHalt Protease Inhibitor Coctail (PIERCE 社製)を含む1 mLのRIPA bufferでもう一度洗浄後に、ウエスタンブロッティングの試料とした。

沈殿には200 μLの1x変性bufferを、濃縮した上清には等量の2x変性bufferを加えて100にて10分間煮沸した後、それぞれ5 μLをNuPAGE4-12% Bis-Tris Gel (インビトロジェン社製)にて電気泳動した。泳動後のゲルから試料をセミドライ方式のブロッティング装置 (BIO CRAFT社製、MODEL BE-330) にて、PVDF膜 (MILLIPORE社製) にトランスファーした。

抗体による検出はイムノスターキット (和光純薬社製) を用いた。まず、1次抗体として、HRP標識抗His tag 抗体 (インビトロジェン社製) を5000倍希釈の濃度で用いて、イムノスターキットのプロトコールに従ってシグナルを検出した。シグナルの検出後、PVDF膜を変性溶液 (7M 塩酸グアニジン、50 mM グリシン、0.05mM EDTA、0.1 M 塩化カリウム、20 mM 2-メルカプトエタノール) で室温で1時間振とう処理することにより、標識抗His tag 抗体を除去した。次に、ビオチン標識したSNK01抗体を用いて、同様に、シグナルを検出した。結果を図5に示す。

【 0 1 5 3 】

モノクローナル抗体SNK01において、アミノ酸配列から予想される分子量 (約20 kD) の位置に明瞭なバンドが見られた。SNK01は、BST2D (配列番号: 10) とBST2H (配列番号: 8) の両方に対して強く反応した。20 kD以上の位置にも強い反応が検出された。これらの分子量の大きい蛋白質は、糖鎖の修飾を有していると予想された。BST2D (配列番号: 10) は、上清よりも沈殿で強いシグナルが見られた。BST2H (配列番号: 8) も沈殿でより強いシグナルが見られたが、上清に対しても抗体の強い反応が検出された。BST2D (配列番号: 10) に対するHisタグ抗体のシグナルが検出されていないのは、C末端に付加したHisタグがプロセッシングによって除去されてしまったためと考えられた。

【 実施例 8 】

【 0 1 5 4 】

RT-PCR法によるマウスBST2の発現確認

各細胞より抽出したRNAより合成したcDNAを鋳型として、定法に従ってPCRを行い、抗原遺伝子がIPCに特異的に発現していることを確認した。PCRに用いたプライマーの塩基配列は次の通りである。

配列番号: 7用 forward (配列番号: 16) :

5'-acatggcgccctctttctatcac-3'

reverse (配列番号: 17) :

5'-gagcccagggttttgaaggaagtg-3'

配列番号: 9用 forward (配列番号: 18) :

5'-agctcaccgcacccaggacagt-3'

reverse (配列番号: 19) :

5'-cactccccagtcctaaagtct-3'

アクチン用センスプライマー (配列番号: 20) :

5'-gtgggcccgtcttaggcaccaa-3'

アンチセンスプライマー (配列番号: 21) :

10

20

30

40

50

5'-ctctttgatgtcacgcacgat-ttc-3'

【 0 1 5 5 】

発現レベルを比較したcDNAまたは細胞は次の通りである。DNAパネルは市販品（Clonete ch社製）を利用した。細胞は、セルソーター（FACSVantage, Becton Dickinson社製）により高度に分離したものをを用いた。結果は図6に示した。BST2D（配列番号：9）は、複数の細胞で発現が見られた。強い発現が見られたのはIPCであった。BST2H（配列番号：7）はマウスIPCで強い発現が観察された。

CD3陽性細胞（T細胞）、

CD8陽性細胞、

マウスIPC、

myeloid DC、および

マウス各臓器より抽出したRNAより合成したcDNAパネル、

【実施例9】

【 0 1 5 6 】

マウスBST2の新規スプライシングバリエーションのクローニング

実施例8において、配列番号：7用プライマーの組み合わせにより、配列番号：7のcDNAに該当する増幅断片の他に、短い増幅断片が観察された。本増幅断片を定法によりクローニングして塩基配列を確認したところ、配列番号：7に示したmBST2Hの第2エクソン部分が欠失した塩基配列を有していた。すなわち、配列番号：22に示した塩基配列を有する、マウスBST2の新規のスプライシングバリエーションであると考えられた。この遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号：23に示した。実施例8に示したように、本遺伝子もマウスIPCに発現していることを確認した。この配列番号：22記載の遺伝子を、以下mBST2HSとも称する。

mBST2D、mBST2H、mBST2HSのアミノ酸配列のアライメントを図7(a)に、それぞれのゲノム構造を図7(b)に示す。

【実施例10】

【 0 1 5 7 】

マウスBST2発現ベクターの作成

実施例6により得られたmBST2DおよびmBST2HのcDNAを鋳型とし、以下の塩基配列からなるプライマーを使って以下の条件でPCRを行った。

pmBST2-F ; tttttgctagcgcggatcacatggcgcctctttctatcactatctgcccggtgcccatggatgagatg ggggggaagcaagga (配列番号：24) および

pmBST2-R ; ttttttctcgagtcctcaaaagagcaggaacagtgac (配列番号：25)

DNAポリメラーゼ：LA Taq (タカラバイオ社)

[95 を30秒、55 を30秒、72 を2分] を25サイクル

増幅されたそれぞれの断片を制限酵素NheI及びXhoI (いずれもタカラバイオ社製) で処理して切断した後、同様にNheIとXhoIで処理した動物細胞発現用ベクター-pcDNA3.1-Zeo(+)(インビトロジェン社)とligation kit ver. II (タカラバイオ社製)を用いて連結し、それぞれの発現ベクターとした。mBST2HSの発現ベクターについてはmBST2Hの第2エクソン部分をPCR法を用いて定法に従って除去することによって作成した。

【実施例11】

【 0 1 5 8 】

ヒトオーソログcDNAのクローニングと発現ベクターの作成

本発明において同定されたマウスIPC特異抗原BST2のヒトオーソログを検索したところ、ヒトBST2として報告された既知の遺伝子であった (Ishikawa, J. et al. Genomics, 1995; 26, 527-; GenBank Acc#. D28137)。更にマウスで見出された新規スプライシングバリエーションのヒトオーソログも含めて以下のようにしてPCR法によりクローニングし、3種類の発現ベクターを作成した。

【 0 1 5 9 】

下記の実施例に示した方法に従って、Herpes Simplex virus 刺激を行ったヒトIPCを調

10

20

30

40

50

製し、RNAを抽出後、スーパースクリプトファーストストランドシステムキット（インビトロジェン社）を用いて、ファーストストランドcDNAを合成した。これを鋳型に、hBST2 primer F; aaaaaagctagctggatggcatctacttcgtatg（配列番号：26）およびhBST2 primer R; aaaaaactcgagaccataacaacaggcagcacat（配列番号：27）で、LA Taq(タカラバイオ)を酵素にもちいてPCR(95を30秒、55を30秒、72を2分、25 cycle)を行った。増幅された断片を、制限酵素NheIおよびXhoIで切断後、pcDNA3.1-Zeo(+)(インビトロジェン社)のNheI-XhoIサイトに挿入し、ヒトBST2の発現プラスミドとした。

【0160】

マウスプライシングバリエーションのオーソログである遺伝子に関しては、IPCのcDNAライブラリーを鋳型として以下の塩基配列からなるプライマーで、LA Taq(タカラバイオ)を酵素にもちいてPCR(95を30秒、55を30秒、72を2分、25 cycle)を行った。cDNAは、GeneRacer kit(インビトロジェン社)によって合成した。増幅された断片を、制限酵素NheIおよびXhoIで切断後、pcDNA3.1-Zeo(+)(インビトロジェン社)のNheI-XhoIサイトに挿入し、発現プラスミドとした。

mBST2Hオーソログ用のプライマー

hBST2 primer F(配列番号：26)および

primerhBHR; ttttttctcgagctagggatgtgggggtgagaggaatgtggcaggtggagggtagcgggggaaggc
tatctctgacctcagctcgtccacctctgcagac(配列番号：28)

mBST2HSオーソログ用のプライマー

hBST2 primer F(配列番号：26)および

primerhBST2HSR1; aaaaaactcgagcttatggtttaatgtagtgatctctccacagtgtggtgcaggtggc
ggcct(配列番号：29)

【0161】

既知遺伝子であるヒトBST2の塩基配列を配列番号：1に、アミノ酸配列を配列番号：2に示した。以下、この配列を有する遺伝子をhBST2Dとも称する。また、上記により得られたmBST2Hのヒトオーソログ(以下、hBST2Hとも称する)の塩基配列を配列番号：3に、アミノ酸配列を配列番号：4に、また、mBST2HSのヒトオーソログ(以下、hBST2HSとも称する)の塩基配列を配列番号：5に、アミノ酸配列を配列番号：6に示した。

hBST2D、hBST2H、hBST2HSのアミノ酸配列のアライメントを図8(a)に、それぞれのゲノム構造を図8(b)に示した。hBST2HおよびhBST2HSは新規プライシングバリエーションであることが示唆された。

【実施例12】

【0162】

RT-PCR法によるヒトBST2遺伝子の発現の確認

各細胞より抽出したRNAより合成したcDNAを鋳型として、定法に従ってPCRを行い、ヒトBST2の各バリエーションの発現を検討した。PCR条件としては、95、1分間反応させた後、95を30秒、60を30秒、73を45秒を、1サイクルとして、Dタイプは30サイクル、Hタイプ及びHSタイプは35サイクル反応させた(図9)。プライマーの配列は次の通りである。

Forward primer; gccttcgggcagtgatggagtgtc(配列番号：30)

D用Reverse primer; tcaagcgaaaagccgagcaggac(配列番号：31)

H、HS用Reverse primer; aatgtggcaggtggagggtag(配列番号：32)

結果、ヒトBST2mRNAは複数の組織、細胞で発現していることがわかった。また、IPCにおいてはHSV刺激により、発現が増強されることがわかった。

【実施例13】

【0163】

マウスBST2を認識する抗体の作製と評価

1) 抗マウスBST2抗体の作製

マウスBST2の3種類のサブタイプD、H、HSのいずれか、あるいは複数を経験する抗体を以下のように作製した。

6cmディッシュ5枚に、1枚あたり 4×10^5 個のCOS7細胞を播種し、20時間培養後にEffectene transfection Reagent(Qiagen社製)を用いて同製品のプロトコルに従い、上記実施例10で作製したそれぞれのタイプのcDNAがクローニングされた3種類の発現ベクターを同量(ディッシュ1枚あたり1 μ g)ずつ混合してトランスフェクションした。24時間後、新鮮な培地に交換し、更に24時間後、PBS/5mM EDTAで細胞を回収し、PBSで洗浄した後に、Wister rat(5~6週令)の両足のfoot padにアジュバンドCFAとともに注入した。このような操作を0、4、11日目に行って免疫したラットから、12日目にリンパ節を採取して、実施例1に示したのと同様の方法で、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの培養上清をCell ELISAによってスクリーニングし、3種類の発現ベクターをトランスフェクションしたCOS7細胞には反応し、宿主のCOS7細胞には反応しないクローンを選択した。更にFACS解析でも結合活性を確認して細胞のクローニングを行い、最終的には5つの陽性クローンを得た。

【0164】

2) マウスIFN産生能への影響

得られたクローンの培養上清を用いて、実施例5に示した方法に従って、IFN産生に与える影響を検討したところ、いずれもコントロール抗体と比較してIPCのIFN産生を抑制する活性があった。更に、0.1 μ MのCpG ODN 1668(MWG Biotech社)を用いて刺激した際にも、IFN産生抑制活性を示した(図10)。このことから、SNK01以外のmBST2に対する抗体もIPCからのIFN産生を抑制する活性を示すことが確認された。

【実施例14】

【0165】

ヒトBST2(hBST2)を認識する抗体の作製と評価

1) ヒトBST2抗体の作製

ヒトBST2の3種類のサブタイプD、H、HSのいずれか、あるいは複数を認識する抗体を実施例13と同様の方法に従って作製した。実施例11で作製したそれぞれのタイプのヒトcDNAがクローニングされた3種類の発現ベクターを用い、ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清をFACS解析することによって行った。hBST2Hにのみ反応するクローン(3D3#7)、hBST2H及びhBST2Dに反応するクローン(3E2#8、5C11#7)、hBST2H、hBST2D、hBST2HSいずれにも反応するクローン(3G7#6)など、複数のクローンが得られた。得られた複数のクローンの精製抗体を取得し、更に解析を行った。

【0166】

2) ヒトIFN産生能への影響

健常人より末梢血を採取し、PBL(末梢血リンパ球)を分離した。Lineage抗体(CD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56抗体)にてMACSで種々の細胞を除去した後、CD4陽性、CD123陽性、Lineage陰性細胞群をIPCとしてセルソーターで分離した。このように取得したヒトIPCを 2×10^4 cells/wellで96 wellプレートに播種し、それぞれ3、10、30 μ g/mLの濃度で抗BST2抗体を添加して37 $^{\circ}$ Cで1時間培養した。1時間培養後にHerpes Simplex virus(20 pfu/cell)を添加し、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養し、培養上清中のIFN γ をELISA kit(Bender Med System社)により、測定した。その結果、抗ヒトBST2抗体は、既に報告のあるBDCA2抗体(Miltenyi社)と同様に、ヒトIFN産生抑制活性を示すことが明らかとなった。(図11a)クローン3D3#7はhBST2Hに、クローン3G7#6はhBST2H、hBST2D、およびhBST2HSのいずれにも反応した。(図11b)すなわち、ヒトBST2を認識する抗体は、IPCのIFN産生活性に影響を与えることが明らかとなった。

【実施例15】

【0167】

BST2タンパク質の発現パターン

1) マウスBST2の発現パターン

モノクローナル抗体SNK01を用いて、マウスBST2タンパク質の発現をFACSにより解析した。Balb/cマウス、あるいはTypeI IFN receptorノックアウトマウスの脾臓細胞を、CpG(0.5 μ M)あるいはインフルエンザウイルスPR8で24時間刺激した後、各種抗体を用いて

10

20

30

40

50

細胞染色を行った。刺激をしていない通常の状態では、図1に示したようにBST2はIPCに特異的に発現していたが、Balb/cマウスにおいては刺激によって、多くの細胞においてBST2の発現が誘導されることが明らかになった(図12)。CD3陽性であるT細胞、CD19陽性であるB細胞、DX5陽性であるNK細胞、Gr-1陽性である顆粒球、いずれにおいても同様の傾向が検出された。更に、それらのCpG、ウイルスによるBST2の発現増強は、IFN γ ノックアウトマウスでは検出されなかったことから、IFNのシグナルを介してBST2の発現が誘導されることが推定された。

【0168】

2) ヒトBST2の発現パターン

実施例14の1)で作製した抗体5C11を用いて、ヒトBST2タンパク質の発現をFACSにより解析した。健康人の末梢血よりPBLを採取し、IFN γ を1ng/mlの濃度で添加して37 $^{\circ}$ C、24時間培養し、抗BDCA-2抗体、抗BDCA-4抗体と5C11との二重染色を行った(図13)。この結果、ヒトIPCにおいて、通常はBST2の発現が検出されないが、IFN γ 刺激によりBST2の発現が誘導されることが明らかになった。すなわち、BST2分子はマウスと同様ヒトにおいても、IFN γ により発現が誘導され、更にIFN γ の産生自体に影響を与えることが明らかになった。また、CpGにより刺激した場合にも、IPC上で発現が誘導されることが明らかになった(図14)。

【実施例16】

【0169】

抗体のin vivoにおける評価

1) 抗体投与マウスより採取した細胞の解析

Balb/cマウスの腹腔内にSNK01、およびコントロールのラットIgGを1匹あたり300 μ gずつ、一日おきに3回投与し(0.9mg/マウス)、6日目に脾臓、骨髄をそれぞれ採取し、IPCの存在率をB220、CD11c、CD11bの染色によって解析した。更に、骨髄細胞を 1×10^6 /wellにて96wellプレートに播種し、CpG(0.5 μ M)あるいはインフルエンザウイルスPR8によって刺激し、24時間後の培養上清のサイトカイン値をELISAにより測定した(図15)。その結果、SNK01投与群において、各種刺激に対するIFN γ の産生能が低いことが明らかになった。なお、IL-12の産生への影響は認められなかった。このことより、本抗体投与により、分子が発現している細胞の機能に変化を生じ、in vitroでの刺激によるIFN γ 産生能が抑制されたことが示された。

【0170】

2) ウイルス感染マウスを用いた解析

抗体を前投与(1.5日前と0.5日前にそれぞれ一匹あたり500 μ g)したマウス(n=3)に 5×10^4 pfu/mouseのMCMV(マウスサイトメガロウイルス)を腹腔内に投与し、感染を起した。この感染後、1.5日後のマウスの血清中のIFN γ をELISAにより測定した。また、脾臓でのIPCの存在率をB220、CD11c、CD11bの染色によって解析した(図16)。

その結果、SNK01投与群において、血清中のIFN γ 産生量は抑制されていた。なお、TNF α の産生への影響は認められなかった。すなわち、本抗体投与により、in vivoにおけるIFN γ 産生能が抑制されたことが示された。抗体の細胞への結合が、細胞機能を調節したものと考えられた

【0171】

3) 抗体を投与したマウスの細胞の解析

Balb/cマウス(n=3)の腹腔内にSNK01、および実施例13で作製した抗マウスBST2抗体クローン#12、ラットIgG(コントロール)を1匹あたり500 μ gずつ投与し、24時間後に、各臓器でのIPCの存在率をFACS解析によって測定した。その際には、実施例1に示した方法により作製されたIPC特異的抗体であるSNK02抗体、及びCD11c抗体(Beckton Dickinson社製)を用いて染色を行なった。

その結果、抗マウスBST2抗体投与群において、末梢血、脾臓、リンパ節、骨髄の各臓器でのIPCの減少が確認された(図17)。なお、リンパ節において、T細胞B細胞には大きな変化は認められなかった。すなわち本抗体が、IPCの活性を調節することが示された。

【産業上の利用可能性】

【0172】

本発明によってIPC活性の調節剤、あるいは調節方法が提供された。IPCには他の細胞の数千倍ものIFNを産生する細胞が含まれる。したがって、そのIFN産生能、および細胞生存（あるいは細胞数）のいずれかあるいは両方を抑制すれば、IFNの産生を効果的に抑制することができる。IPCによって産生されるタイプ1 IFNの過剰産生は自己免疫疾患の発症メカニズムと密接に関連していることが明らかにされている。したがって、本発明によって提供されたIPC活性の調節剤、あるいは調節方法は、自己免疫疾患の治療に利用することができる。

【0173】

また、BDCA-2およびBDCA-4陽性細胞による白血病が報告されている(Jacob, MC. et al. Haematologica 88; 941-955.2003; Chaperot L. et al. Eur. J. Immunol. 34; 418-426. 2004)。このような白血病に対しては、本発明に基づいて癌性の細胞を直接抑制することができる可能性がある。すなわち、本発明によるIPCの活性化の抑制剤は、BST2またはそのホモログを発現する細胞からなる癌細胞の抑制剤として有用である。

【0174】

また本発明は、BST2およびそのホモログの、IPCの活性化マーカーとしての用途を提供した。生体内におけるIPCの活性化は、タイプ1 IFNの産生増加スイッチがオンされたことを示している。したがって、たとえばIFNによってもたらされる自己免疫疾患の検出マーカー、あるいは診断指標としてBST2およびそのホモログは有用である。あるいはIPCの活性化は、ウイルス感染の初期の段階で起きる。そのため、IPCの活性化を、ウイルス抗体が血中に見出せない時期に、ウイルス感染の可能性を知るためのマーカーとすることもできる。いずれにせよ、生体内におけるIPCの活性化のレベルは、臨床的に重要な情報である。

【0175】

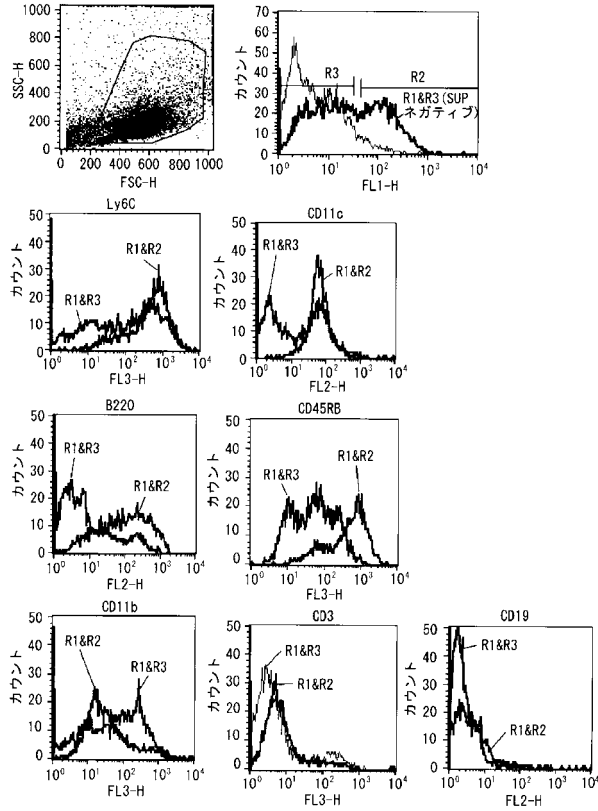
更に、培養細胞におけるBST2およびそのホモログの発現レベルを指標として、被験化合物のIPCの活性化状態を調節する活性を評価することができる。すなわち、BST2およびそのホモログの発現レベルを指標として、IPCの活性化を調節する化合物をスクリーニングすることができる。本発明に基づくスクリーニング方法で見出すことができる化合物も、IPC活性の調節剤、あるいは調節方法に有用である。このような化合物は、自己免疫疾患の治療剤として利用することができる。

10

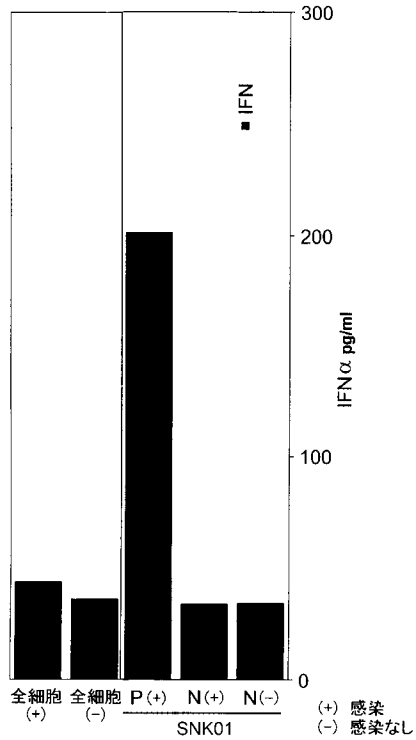
20

30

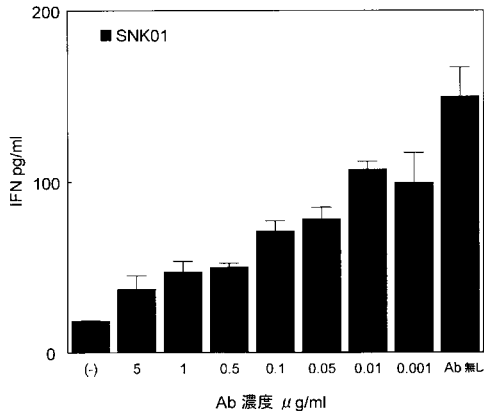
【 図 1 】



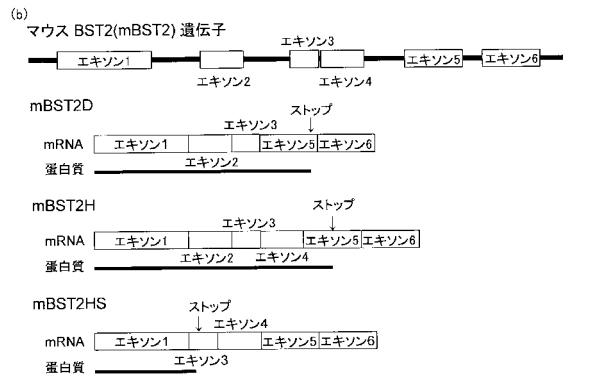
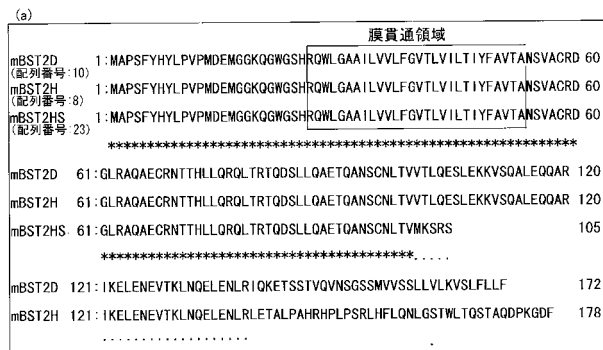
【 図 3 】



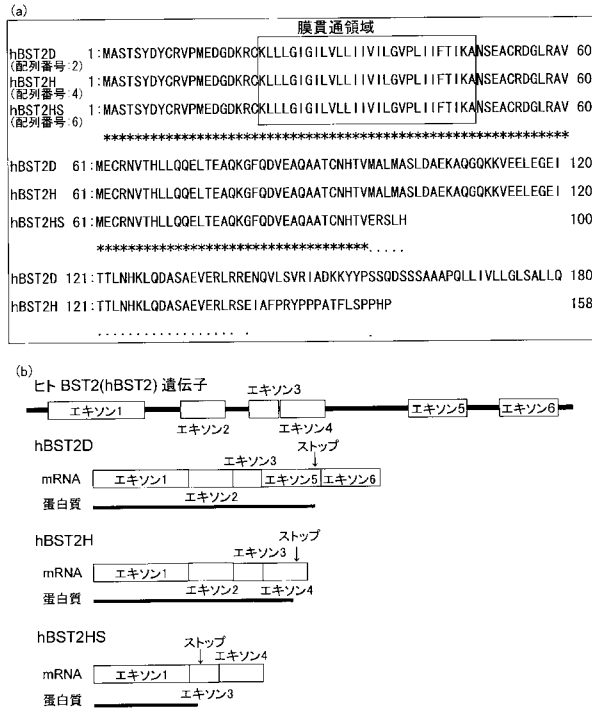
【 図 4 】



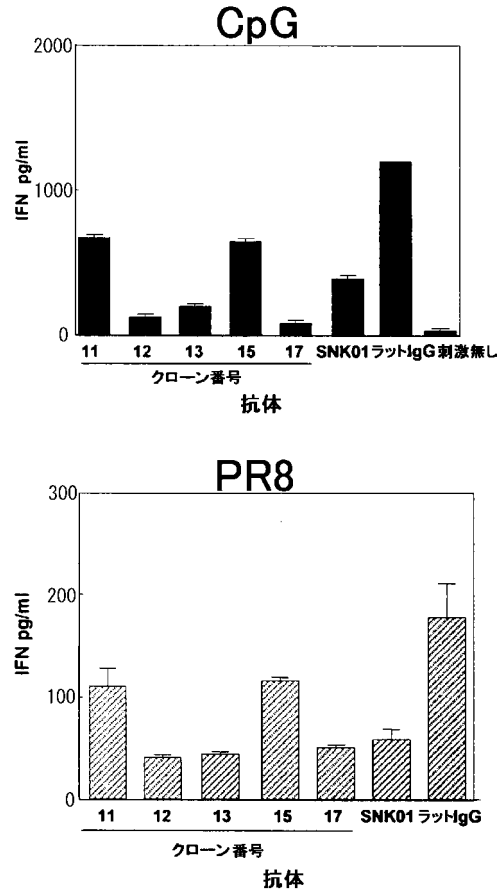
【 図 7 】



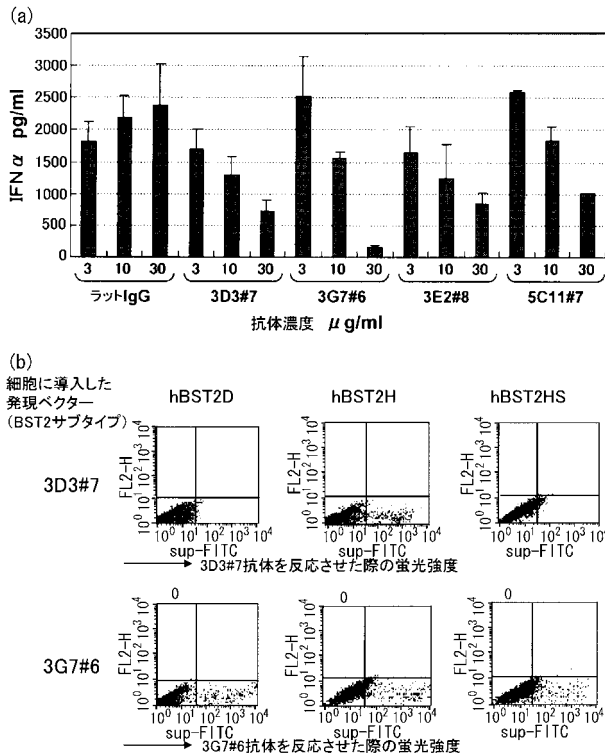
【 図 8 】



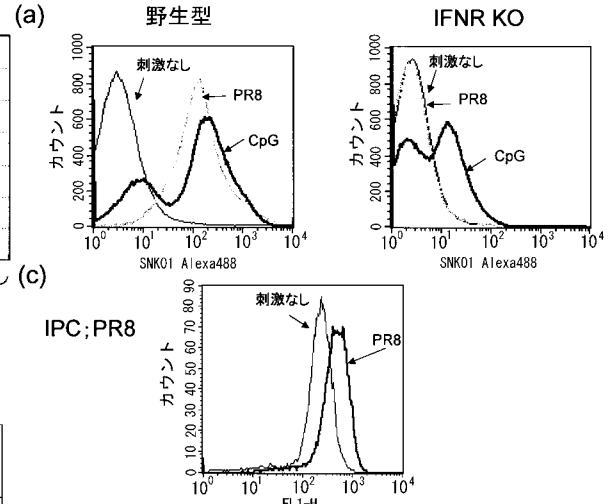
【 図 10 】



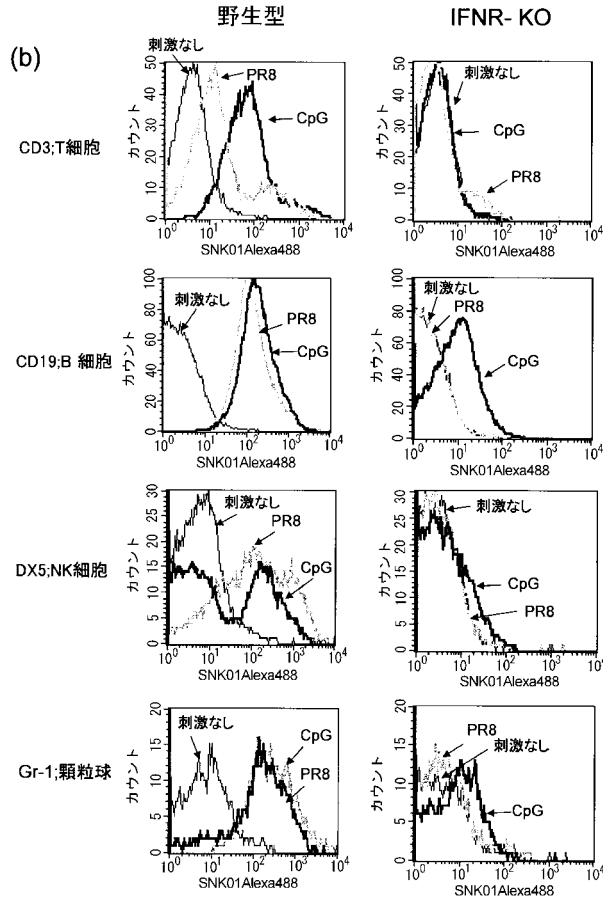
【 図 11 】



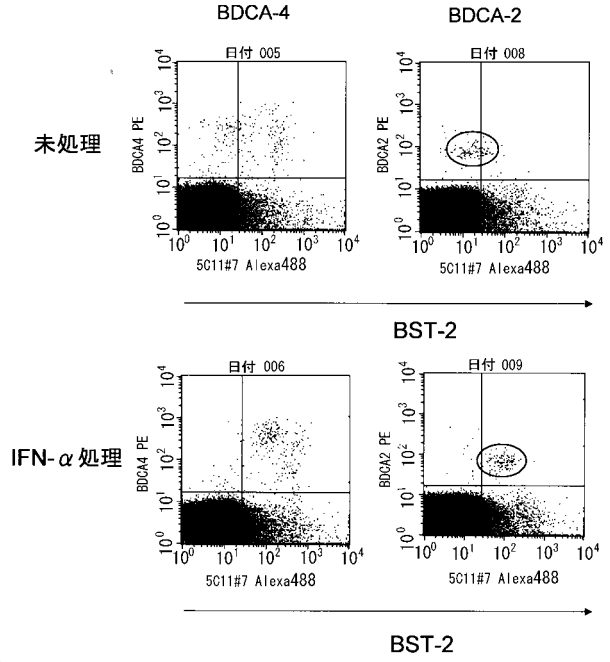
【 図 12 - 1 】



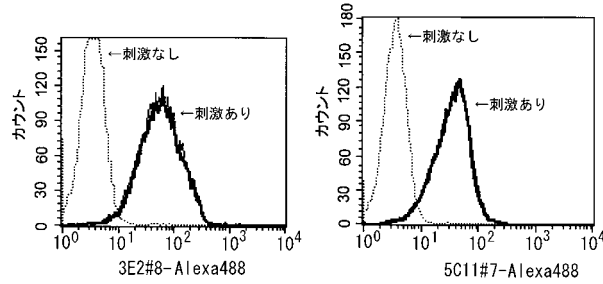
【 図 1 2 - 2 】



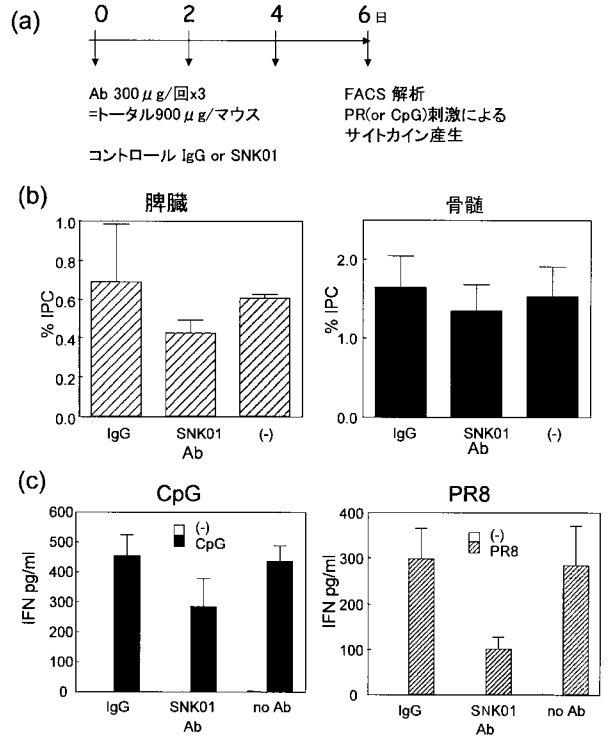
【 図 1 3 】



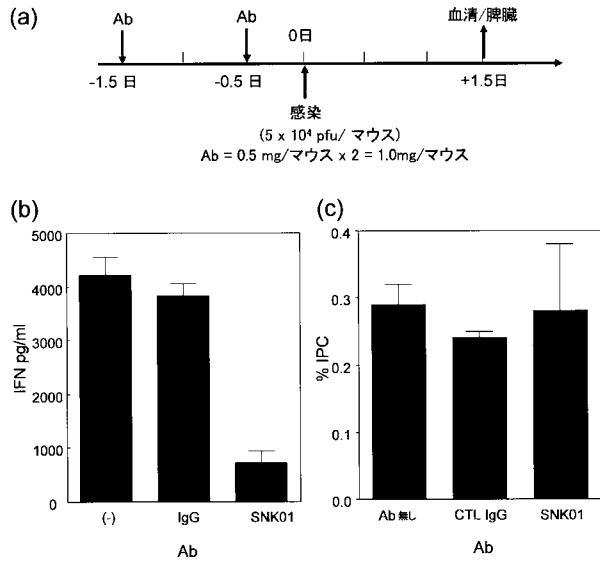
【 図 1 4 】



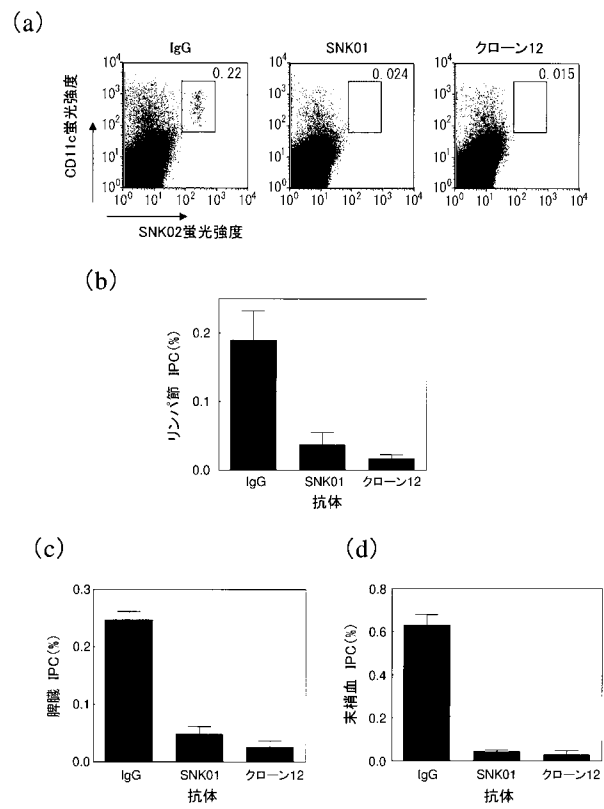
【 図 1 5 】



【図16】

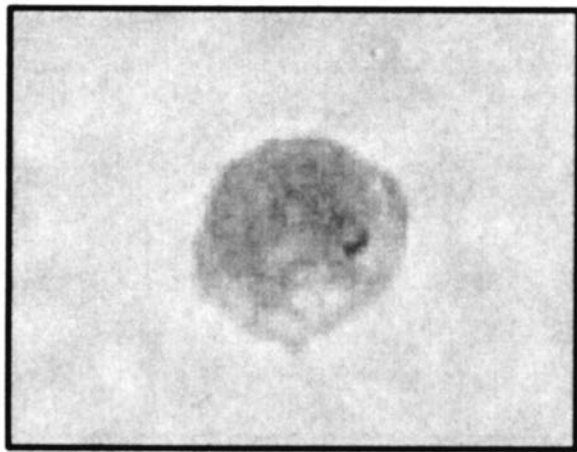


【図17】

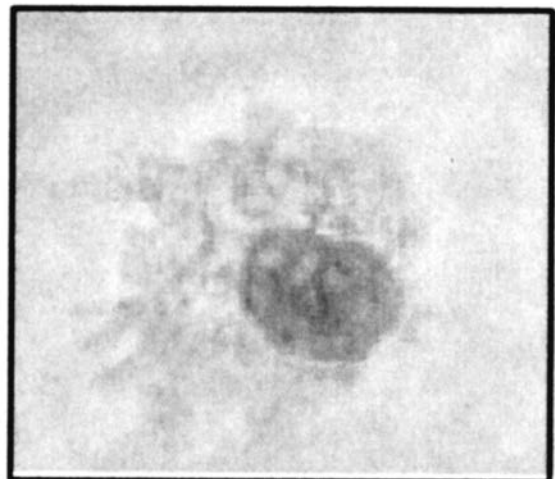


【図2】

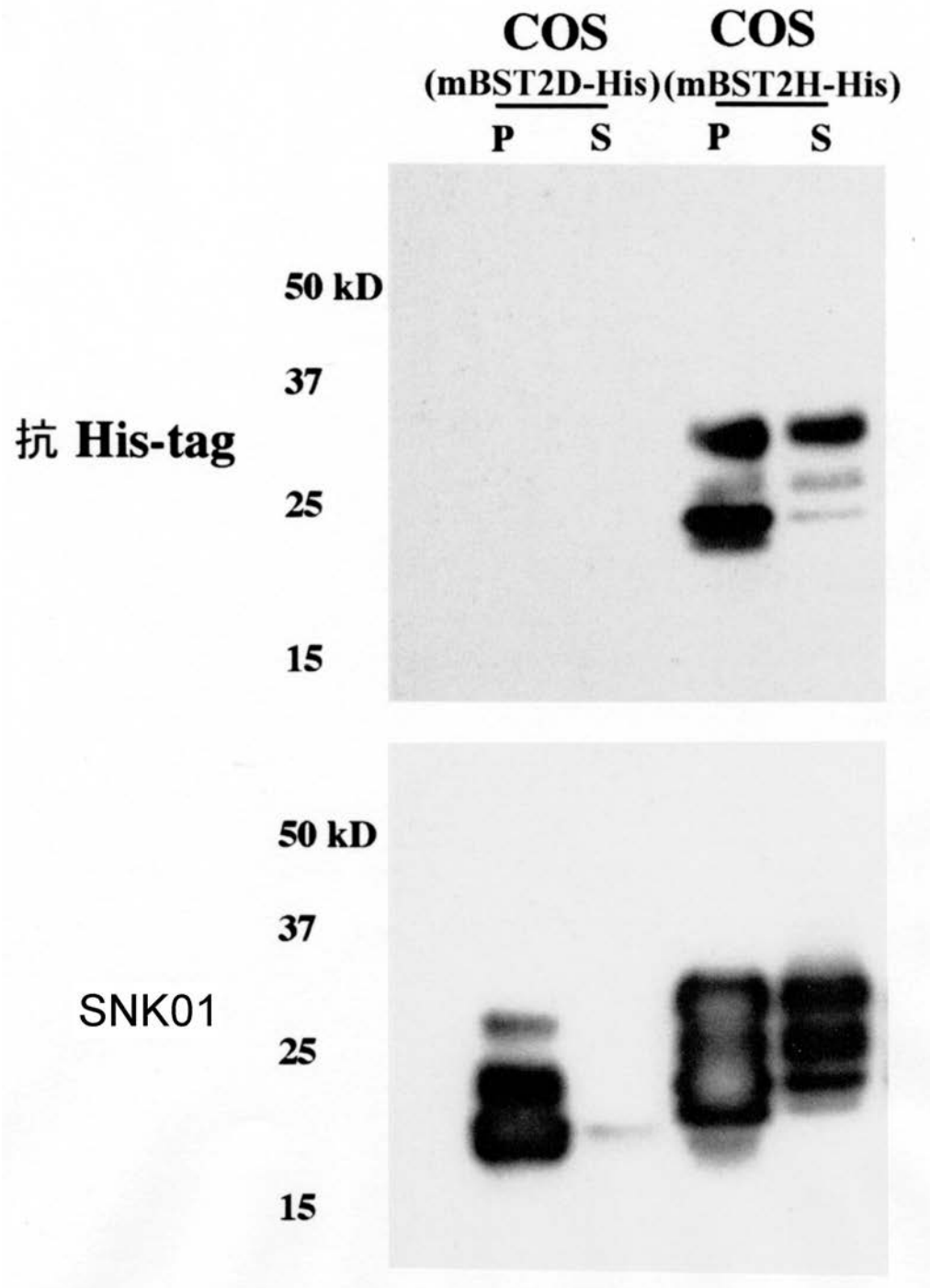
(a) 感染前細胞



(b) PR8感染後細胞

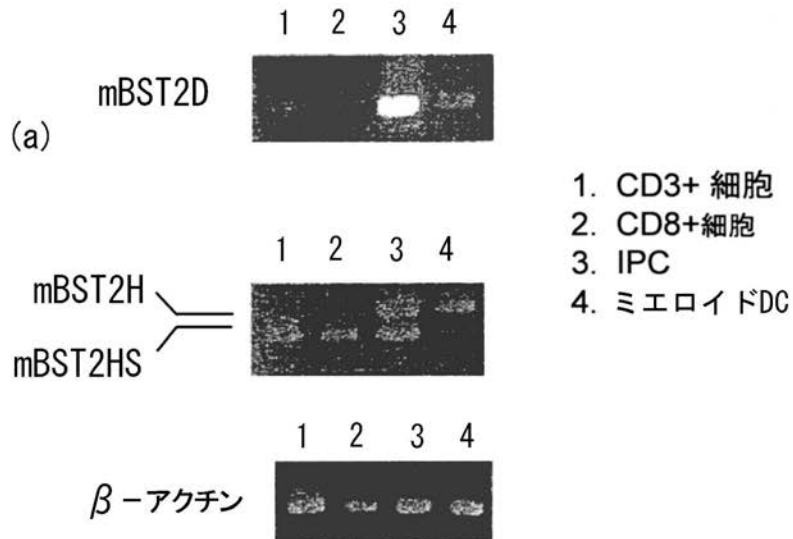


【 5 】

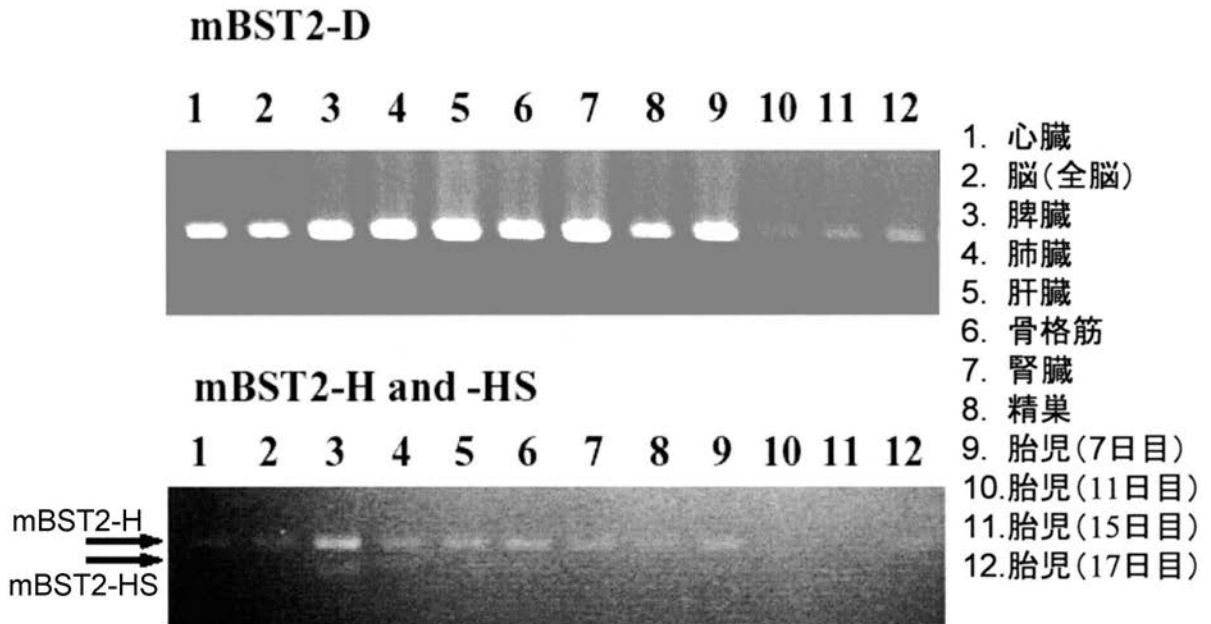


【 図 6 】

(a)

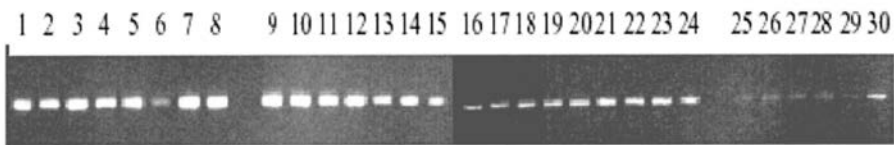


(b)

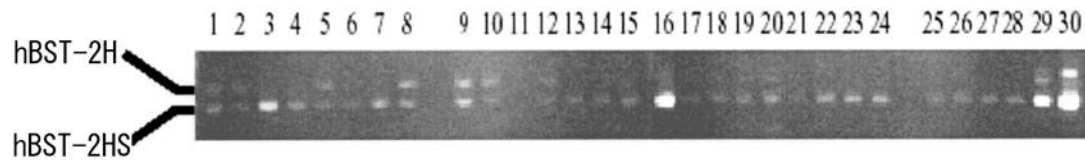


【 図 9 】

hBST-2D



hBST-2H and HS



1: 心臓	9: 脾臓	16: 休止期CD14細胞	25: CD14細胞
2: 脳	10: 胸腺	17: 単核球	26: CD19細胞
3: 胎盤	11: 末梢血白血球	18: 休止期CD8細胞	27: CD3細胞
4: 肺臓	12: リンパ節	19: 休止期CD4細胞	28: CD56細胞
5: 肝臓	13: 扁桃腺	20: 休止期CD19細胞	29: IPC
6: 骨格筋	14: 胎児肝細胞	21: 活性化CD19細胞	30: IPC (HSV感染)
7: 腎臓	15: 骨髄	22: 活性化単核球	
8: 膵臓		23: 活性化CD4細胞	
		24: 活性化CD8細胞	

【 配列表 】

[0004915919000001.app](#)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
<i>C 0 7 K 14/47 (2006.01)</i>		<i>C 1 2 P 21/08</i>	
<i>C 0 7 K 16/18 (2006.01)</i>		<i>C 0 7 K 14/47</i>	
<i>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</i>		<i>C 0 7 K 16/18</i>	
<i>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</i>		<i>C 1 2 Q 1/02</i>	
<i>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</i>		<i>C 1 2 Q 1/68</i>	A
<i>A 6 1 P 37/02 (2006.01)</i>		<i>A 6 1 K 39/395</i>	U
<i>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</i>		<i>A 6 1 K 39/395</i>	F
<i>A 6 1 P 37/08 (2006.01)</i>		<i>A 6 1 K 39/395</i>	H
<i>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</i>		<i>A 6 1 P 37/02</i>	
		<i>A 6 1 K 45/00</i>	
		<i>A 6 1 P 37/08</i>	
		<i>G 0 1 N 33/53</i>	D

(56) 参考文献 国際公開第 0 2 / 0 5 7 3 1 6 (WO , A 1)

(58) 調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-90
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq
 SwissProt/PIR/GeneSeq
 JSTPlus(JDreamII)
 PubMed

专利名称(译)	产生干扰素的细胞的活性调节剂		
公开(公告)号	JP4915919B2	公开(公告)日	2012-04-11
申请号	JP2006528454	申请日	2005-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	SBI生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	SBI生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	SBI生物科技有限公司		
[标]发明人	大川淳 鴨川由美子		
发明人	大川 淳 鴨川 由美子		
IPC分类号	C12N15/09 C12N5/10 C12N5/071 C12P21/00 C12P21/08 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/02 C12Q1/68 A61K39/395 A61P37/02 A61K45/00 A61P37/08 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5047 C07K16/2896 C07K2317/34		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.101 C12N5/00.102 C12N5/00.202.A C12P21/00.C C12P21/08 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/02 C12Q1/68.A A61K39/395.U A61K39/395.F A61K39/395.H A61P37/02 A61K45/00 A61P37/08 G01N33/53.D		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2004173767 2004-06-11 JP		
其他公开文献	JPWO2006008886A5 JPWO2006008886A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了产生干扰素的细胞 (IPC) 的活性调节剂, 其包含与BST2和/或其同源物结合作为活性成分的抗体, 或使用该抗体调节IPC活性的方法。根据本发明, 可以直接控制IPC产生干扰素 (IFN) 的能力以及细胞数量。本发明还提供BST2和/或其同源物作为IPC活化标记物的用途。可以通过IPC活化标记筛选调节IPC活化的化合物。

【 図 4 】

