

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6218088号
(P6218088)

(45) 発行日 平成29年11月1日 (2017. 11. 1)

(24) 登録日 平成29年10月6日 (2017. 10. 6)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 16/18 (2006. 01)	C O 7 K 16/18 Z N A
C O 7 K 16/46 (2006. 01)	C O 7 K 16/46
C 1 2 P 21/08 (2006. 01)	C 1 2 P 21/08
C 1 2 N 5/12 (2006. 01)	C 1 2 N 5/12
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 D
請求項の数 19 (全 40 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2015-504400 (P2015-504400)	(73) 特許権者	504176911
(86) (22) 出願日	平成26年3月6日 (2014. 3. 6)		国立大学法人大阪大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/055861		大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号
(87) 国際公開番号	W02014/136910	(74) 代理人	100077012
(87) 国際公開日	平成26年9月12日 (2014. 9. 12)		弁理士 岩谷 龍
審査請求日	平成27年8月19日 (2015. 8. 19)	(72) 発明者	谷山 義明
(31) 優先権主張番号	特願2013-47097 (P2013-47097)		大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法
(32) 優先日	平成25年3月8日 (2013. 3. 8)		人大阪大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	森下 竜一
(出願人による申告) 平成20年度、文部科学省、関西 広域バイオメディカルクラスター構想 (大阪北部 (彩部)) 地域「接着阻害因子ペリオスチンに着目した新規心不 全治療薬の開発」) に伴う委託研究、産業技術力強化法 第 19 条の適用を受ける特許出願			大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法
		(72) 発明者	東 純哉
			大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法
			人大阪大学内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ペリオスチンの E x o n - 2 1 部位によりコードされるペプチドに対する抗体及び該抗体を含む炎症関連疾患の予防又は治療用医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 6 で表されるアミノ酸配列、配列番号 17 で表されるアミノ酸配列及び配列番号 18 で表されるアミノ酸配列からなる群から選ばれる 1 種以上のアミノ酸配列からなるペプチドと特異的に結合する抗体。

【請求項 2】

配列番号 19 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 20 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド及び配列番号 21 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドからなる群から選ばれる 1 種以上のペプチドと特異的に結合する抗体。

【請求項 3】

抗体が、細胞接着活性を有するペリオスチンの細胞接着活性に関与する領域を特異的に認識し、かつ当該ペリオスチンの細胞接着活性を中和する能力を有する抗体である、請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

抗体が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 5】

抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 4 記載の抗体。

【請求項 6】

ハイブリドーマ細胞株 N I T E B P - 0 1 5 4 6 により産生される、請求項 5 記載の

抗体。

【請求項 7】

請求項 5 又は 6 記載のモノクローナル抗体の F a b、F (a b ')₂、F v、s c F v または d s F v を含有するペプチドである抗体断片。

【請求項 8】

請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の抗体又は請求項 7 記載の抗体断片と、タンパク質又は低分子の薬剤とを結合させた抗体の誘導体。

【請求項 9】

請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 10】

ハイブリドーマ細胞株 N I T E B P - 0 1 5 4 6。

【請求項 11】

配列番号 6 で表されるアミノ酸配列、配列番号 17 で表されるアミノ酸配列及び配列番号 18 で表されるアミノ酸配列からなる群から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチド又は当該ペプチドの N 末端に C y s 基を付加したペプチドでヒトを除く哺乳動物を免疫した後、当該動物の抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合させ、得られたハイブリドーマを培養する工程を有する請求項 4 に記載の抗体を製造する方法。

【請求項 12】

ハイブリドーマが、ハイブリドーマ細胞株 N I T E B P - 0 1 5 4 6 である、請求項 11 記載の製造方法。

【請求項 13】

請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の抗体、請求項 7 記載の抗体断片又は請求項 8 記載の抗体の誘導体を含む、細胞接着活性を有するペリオスチンに対する阻害用医薬組成物。

【請求項 14】

請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の抗体、請求項 7 記載の抗体断片又は請求項 8 記載の抗体の誘導体を含む、細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する炎症関連疾患の予防又は治療用医薬組成物。

【請求項 15】

請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の抗体、請求項 7 記載の抗体断片又は請求項 8 記載の抗体の誘導体を含む、細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する血管内膜肥厚抑制用、癌治療用、血管新生抑制用又は動脈瘤の予防若しくは治療用医薬組成物。

【請求項 16】

請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の抗体、請求項 7 記載の抗体断片又は請求項 8 記載の抗体の誘導体を用いて、生体試料中の細胞接着活性を有するペリオスチンを検出又は定量する方法。

【請求項 17】

ペリオスチンの E x o n - 2 1 のみを抗原として得られる抗体。

【請求項 18】

配列番号 6 で表されるアミノ酸配列、配列番号 17 で表されるアミノ酸配列及び配列番号 18 で表されるアミノ酸配列からなる群から選ばれる 1 種以上のアミノ酸配列からなるペプチドと結合する請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 19】

配列番号 19 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号 20 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド及び配列番号 21 で表されるアミノ酸配列からなるペプチドからなる群から選ばれる 1 種以上のペプチドと特異的に結合する請求項 17 に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ペリオスチンの E x o n - 2 1 部位によりコードされるペプチドに対する抗体及び該抗体を含む炎症関連疾患の予防又は治療用医薬組成物に関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

ペリオスチンは、細胞外マトリックスタンパク質の一種であり、分子量約9万のポリペプチドからなる。各ポリペプチド鎖には、シグナル配列、システインリッチドメイン、4回繰り返しドメイン、C末端ドメインが含まれている。

【0003】

ペリオスチンは、当初、骨芽細胞特異的因子-2（OSF-2）と呼ばれ、マウス骨芽細胞株MC3T3-E1細胞に特異的に発現している遺伝子として分離同定されたが（特許文献1、非特許文献1）、後に現在の名称であるペリオスチンと呼ばれるようになり、骨芽細胞における接着促進活性が報告された（非特許文献2）。 10

【0004】

初期の研究では、ペリオスチンは骨組織に特異的に発現する細胞外マトリックスであると考えられていた。しかしながら、現在では骨組織のみならず心不全（非特許文献3、非特許文献4）、動脈瘤（非特許文献5）、癌（非特許文献6～8）、子癇前症（非特許文献9）、血管再狭窄（非特許文献10～15）、炎症性疾患（(i)食道炎（非特許文献16）、(ii)副鼻腔炎・喘息（非特許文献17）、(iii)喘息（非特許文献18）、(iv)血管新生（非特許文献6、非特許文献19～22））等の発症において極めて高く発現しており、また正常組織においては極僅かしか発現していないことが明らかになっている。また、幾つかのペリオスチンスプライシングバリエントが骨芽細胞で発現していることも明らかになっている（非特許文献1～2、非特許文献23、特許文献2）。 20

【0005】

ペリオスチンの作用について、細胞接着作用に関しては、811アミノ酸から成るペリオスチンスプライシングバリエント（図1におけるPN-2に相当）（非特許文献2）及び783アミノ酸からなるペリオスチンスプライシングバリエント（図1におけるPN-4に相当）（非特許文献24）が細胞接着作用を有すると報告されていた。その他に細胞接着作用を有していない838アミノ酸から成るペリオスチンスプライシングバリエント（図1におけるPN-1に相当）（特許文献2）や810アミノ酸から成るペリオスチンスプライシングバリエント（図1におけるPN-3に相当）（特許文献4）が存在する。

【0006】

癌に関しては、癌の転移は、原発巣から血管やリンパ管内への癌細胞の浸潤、転移臓器への癌細胞の選択的な移動、血管から転移臓器への癌細胞の浸潤、転移先の微小環境に支えられた癌細胞の増殖、血管新生を伴った直径数ミリメートル以上となる腫瘍の増殖等の過程より成る（非特許文献25～26）。これらの複雑な転移成立過程の中で、癌細胞の運動能の亢進による浸潤・転移は極めて重要な段階である（非特許文献27）。これまでに、高転移性癌細胞は、それ自身が自己分泌型運動因子を産生し、固有運動を亢進させることが報告されている（非特許文献28）。この悪性因子に対する阻害物質は転移抑制剤として期待できるが、現在までにその特異的阻害剤は見出されていない。 30

【0007】

一方で、高転移性癌でのペリオスチンの高発現が各種論文で報告されている（（膵臓癌；非特許文献29）、（口腔癌；非特許文献21）、（膵臓癌；非特許文献30）、（乳癌；非特許文献31）、（頭頸部癌；非特許文献32）、（結腸癌；非特許文献19）、（乳癌；非特許文献6、8、33）、（胸腺癌；非特許文献34～35）、（非小細胞性肺癌；非特許文献36～37）、（卵巣癌；非特許文献38）、（前立腺癌；非特許文献39）、（肝臓癌、胆管癌；非特許文献40）、（食道扁平上皮癌；非特許文献41）、（前立腺癌；非特許文献42）、（甲状腺癌；非特許文献43））。また、高転移性癌においては転写因子Twistが高発現していることが報告され（非特許文献44～45）注目されており、ペリオスチンのプロモーター領域にもTwistが有ることが報告されている（非特許文献46）。加えて、ヒト胎児腎上皮細胞株である293T細胞にペリオスチン遺伝子を導入すると、浸潤能が亢進することが報告されている（非特許文献47）。また、種々の細胞癌で、811アミノ酸から成るペリオスチンスプライシングバリエン 40 50

ト（図1におけるPN-2に相当）の発現が低下しており悪性黒色腫への遺伝子導入により肺転移抑制が報告されている（非特許文献48）。

【0008】

血管再狭窄に関しては、従来から広く使用されてきたベアメタルステント（bare metal stent：BMS）では、留置後3～8カ月の期間に10～40%の確率でステント内再狭窄（in-stent restenosis：ISR）が起り、ISRの主たる機序は冠動脈の中膜平滑筋細胞のステント内への遊走・増殖に起因する新生内膜の増殖と考えられ（非特許文献49）、この欠点を克服すべく、ステント表面に薬剤を塗布した薬剤溶出冠動脈ステント（Drug Eluting Stent：DES）が1999年にSousaらによりシロリムス溶出性ステント（Sirolimus-Eluting Stent：SES）として開発された。しかしながら、DESにより引き起こされる遅発性ステント血栓症も報告されていることから、依然として再狭窄を安全に抑制する薬剤が望まれている。一方、バルーン傷害モデル動物を用いた再狭窄モデルにおいて、血管平滑筋でのペリオスチンの高発現が各種論文で報告されている（非特許文献10～15）。

【0009】

炎症に関しては、抗炎症剤としてこれまで臨床で用いられてきた薬物として、急性及び慢性の炎症疾患に対してはステロイド及び非ステロイド系抗炎症剤、慢性の進行性炎症疾患（例えば、リウマチ、変形性関節炎等）に対しては免疫抑制剤及び金製剤が挙げられる。非ステロイド系抗炎症剤の作用機序は主に炎症メディエーターの抑制である。即ち、対症的な作用であり、急性疾患に対する効果は高いものの慢性の炎症疾患に対しての効果はあまり高くない。ステロイド系抗炎症剤は急性、慢性炎症疾患に対する作用は非常に強いが、同時に重篤な副作用を引き起こすことが報告されており、使用には十分な注意が必要である。金製剤は、急性炎症疾患に対する適用はなく、慢性リウマチに用いられており、免疫調節作用を持つことから、その作用は遅効性である。しかしながら、金製剤も粘膜皮膚症状、骨髄抑制、腎障害、呼吸器障害等の副作用が報告されており、ステロイド系抗炎症剤同様、使用には十分な注意が必要である。一部の免疫抑制剤も、慢性リウマチに対する臨床応用が注目されているが、免疫抑制剤特有の副作用が心配される。

【0010】

一方で、炎症性疾患でのペリオスチンの発現が亢進していることが報告されている（非特許文献16～18、50～51）。

【0011】

血管新生に関しては、血管新生は癌以外にも糖尿病性網膜症、アテローム性動脈硬化症、歯周病、強皮症、緑内障、加齢黄斑変性症、II型糖尿病等の病態悪化と深く関わっており、その他、リウマチ様関節炎、カポジ肉腫、乾癬、バセドウ病においても、血管新生がこれらの疾患の発症あるいは病態悪化に重要な役割を担っているとされている（非特許文献52）。また、脂肪組織の成長が血管新生に依存することが示されており、血管新生を抑制することによって肥満等の防止に効果があることが報告されている（非特許文献53）。アルツハイマー病においても、血管新生によって脳内皮細胞が活性化され、 β -アミロイドの前駆物質及び神経毒ペプチドを分泌して選択的に皮質ニューロンの細胞死を招くとされており、血管新生の抑制がアルツハイマー病の予防及び治療に有効であると報告されている（非特許文献54）。この様な背景から、優れた血管新生抑制作用を有する物質が求められており、近年、血管新生抑制物質によるこれらの疾患の治療や予防が進められてきた。

【0012】

血管新生抑制剤としては、現在までに、アンギオスタチン（非特許文献55及び56）、エンドスタチン（非特許文献57）、アスペルギルス・フミガトゥス（*Aspergillus fumigatus*）に由来するフマガリリン（fumagillin）及びその合成誘導体であるTNP-470（非特許文献58）、サイトジェニン（非特許文献59）、メタロプロテアーゼ阻害薬であるバチマスタット（BB-94）及びマリマスタット

ト (BB-2516) (非特許文献60~61) 等の合成化学物質、並びに血管新生因子 (EGF、TGF- α 、VEGF等) とそれらに対応するレセプターの結合を阻害するモノクローナル抗体 (非特許文献62) が知られている。しかしながら、これらの物質においては副作用を考慮する必要がある、人体に対する安全性が必ずしも保証されていないという欠点が存在している。

【0013】

一方で、癌発症における血管新生とペリオスチンの発現とが深く関わっていることが報告されている (非特許文献6、非特許文献19、非特許文献21~22)。また、ペリオスチンが血管新生を誘導するには血管内皮細胞でのVEGFレセプター2 (Flk-1/KDR) の発現を引き起こして成されることが報告されている (非特許文献20)。

10

【0014】

このように、ペリオスチン遺伝子の発現が血管再狭窄病態、癌、炎症、血管新生の病態にも関連することが示唆されており、またペリオスチンの細胞遊走阻害に関する抗体 (非特許文献12) 及びペリオスチンによる細胞の増殖抑制活性を有する抗体 (非特許文献13) が報告されているが、依然としてペリオスチンスプライシングバリエーションの構造と血管再狭窄や癌、炎症、血管新生との関連については明らかではない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】特開平5-268982号公報

20

【特許文献2】WO2005/019471号パンフレット

【特許文献3】WO2007/077934号パンフレット

【特許文献4】再公表特許WO02/020055号公報

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】Takeshita S. et al., Biochem J (1993) 294, 271-278

【非特許文献2】Horiuchi K. et al., J. Bone Miner. Res. (1999) 14, 1239-1249

【非特許文献3】Katsuragi N. et al., Circulation (2004) 110, 1806-1813

【非特許文献4】Wang D. et al., Hypertension (2003) 42, 88-95

【非特許文献5】Peters DG. et al., Stroke (2001) 32, 1036-1042

30

【非特許文献6】Shao R. et al., Mol Cell Biol. (2004) 24(9), 3992-4003

【非特許文献7】Gonzalez HE. et al., Arch Otolaryngol Head Neck Surg. (2003) 129, 754-759

【非特許文献8】Sasaki H. et al., Breast Cancer Res Treat. (2003) 77(3), 245-252

【非特許文献9】Sasaki H. et al., Am J Obstet Gynecol. (2002) 186, 103-108

【非特許文献10】Lindner V. et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol. (2005) 25, 77-83

【非特許文献11】Litvin J. et al., Am J Physiol Cell Physiol (2007) 292, C1672-C1680

【非特許文献12】Butcher JT. et al., Dev Biol. (2007) 302(1), 256-266

40

【非特許文献13】Li G. et al. Atherosclerosis (2006) 188(2), 292-300

【非特許文献14】Roy S. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. (2007) 104(36), 14472-14477

【非特許文献15】Goetsch SC. et al., Physiol Genomics (2003) 14(3), 261-271

【非特許文献16】Blanchard C, et al. Mucosal Immunol. (2008) 1(4), 289-296

【非特許文献17】Stankovic KM, et al. Laryngoscope (2008) 118(5), 881-889

【非特許文献18】Woodruff PG, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. (2007) 104(40), 15858-15863

【非特許文献19】Bao S. et al., Cancer Cell (2004) 5(4), 329-339

【非特許文献20】Shao R. et al., Biochem Biophys Res Commun. (2004) 321(4), 788-

50

794

- 【非特許文献 2 1】Siriwardena BS. et al., Br J Cancer.(2006)95(10),1396-1403
- 【非特許文献 2 2】Takanami I. et al., Int J Biol Markers (2008)23(3),182-186
- 【非特許文献 2 3】Litvin J. et al., J Cell Biochem. (2004) 92, 1044-1061
- 【非特許文献 2 4】Gillan L. et al., Cancer Res. (2002) 62, 5358-5364
- 【非特許文献 2 5】Folkman J. Semin. Cancer Biol (1992)3, 65-71
- 【非特許文献 2 6】Hanahan D. et al.,Cell (1996)86, 353-364
- 【非特許文献 2 7】Liotta LA.et al.,Cell(1991) 64, 327-336
- 【非特許文献 2 8】Liotta LA.et al.,Proc. Natl. Acad. Sci. (1986) 83, 3302-3306
- 【非特許文献 2 9】Erkan M. et al., Gastroenterology (2007) 132(4),1447-1464 10
- 【非特許文献 3 0】Baril P. et al., Oncogene (2007)26(14),2082-2094
- 【非特許文献 3 1】Grigoriadis A. et al., Breast Cancer Res. (2006)8(5), R56
- 【非特許文献 3 2】Kudo Y. et al., Cancer Res. (2006)66(14), 6928-6935
- 【非特許文献 3 3】Tie S, et al., Int J Cancer. (2010) 16.
- 【非特許文献 3 4】Sasaki H. et al. Cancer Lett. (2001)72(1), 37-42.
- 【非特許文献 3 5】Erratum in: Cancer Lett. (2003)202(1), 117
- 【非特許文献 3 6】Sasaki H. et al., Cancer (2001)92(4), 843-848
- 【非特許文献 3 7】Erratum in: Cancer (2002)95(12), 2580
- 【非特許文献 3 8】Zhu M et al., Gynecol Oncol. (2010) 119(2):337-344.
- 【非特許文献 3 9】Tischler V et al., BMC Cancer. (2010) 9;10:273. 20
- 【非特許文献 4 0】Riener MO et al., Histopathology. (2010) 56(5):600-6
- 【非特許文献 4 1】Kwon YJ et al., Oncol Res. (2009) 18(4):141-151.
- 【非特許文献 4 2】Tsunoda T et al., Prostate. (2009) 15;69(13):1398-1403.
- 【非特許文献 4 3】Puppin C et al., Endocrinol. (2008) 197(2):401-408.
- 【非特許文献 4 4】Thiery JP. et al., Nat Med. (2004)10(8), 777-778
- 【非特許文献 4 5】Yang J, et al., Cell (2004)117(7), 927-939
- 【非特許文献 4 6】Oshima A. et al., J Cell Biochem. (2002)86(4), 792-804
- 【非特許文献 4 7】Yan W. et al., J Biol Chem. (2006)281(28),19700-19708
- 【非特許文献 4 8】Kim CJ. et al., Int J Cancer (2005)117(1), 51-58
- 【非特許文献 4 9】Kornowski R.et al.,J Am Coll Cardiol (1998)31,224-230 30
- 【非特許文献 5 0】Hakuno D et al., J Clin Invest. 2010;120(7):2292-306.
- 【非特許文献 5 1】Zhou HM. et al., J Cell Commun Signal. 2010 4(2):99-107.
- 【非特許文献 5 2】細胞工学 Vol.19,No.8,2000、蛋白質 核酸 酵素 Vol.45,No.6,p.1182-1187
- 【非特許文献 5 3】Brakenhielm E. et al., Circ Res. (2004) 94(12),1579-1588
- 【非特許文献 5 4】Vagnucci AH Jr. et al., Lancet(2003) 361(9357),605-608
- 【非特許文献 5 5】M.S. O'Neil, et al., Nature Medicine, 1996, 2,p689-692
- 【非特許文献 5 6】B.K. Sim, et al., Cancer Reseach., 1997, 57,p1329-1334
- 【非特許文献 5 7】M.S. O'Neil, et al., Cell,1997, 88,p277-285
- 【非特許文献 5 8】D.Ingber, et al., Nature,1990,348,p555-557 40
- 【非特許文献 5 9】T.Oikawa, et al., Anticancer Reseach,1997,17,p1881-1886
- 【非特許文献 6 0】G.Taraboletti, et al., Journal of National Cancer Institute.,1995,87,p293-298
- 【非特許文献 6 1】Marimastat: BB 2516, TA 2516., Drugs in R&D,2003,4(3),p198-203.
- 【非特許文献 6 2】S.Iqbal and H.J.Lenz, HYPERLINK "<http://www.ingentaconnect.com/content/klu/280>" \o "Cancer Chemotherapy and Pharmacology" Cancer Chemotherapy and Pharmacology,2004, 54 Suppl.1,pS32-39
- 【発明の概要】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0017】

50

本発明の目的は、細胞接着活性を有するペリオスチンに対する阻害剤を提供することである。また、本発明の目的は、生活の質の改善及び長期生命予後の改善が可能であり、かつ既存のメカニズムとは異なる新たな血管再狭窄や癌、炎症、血管新生、動脈硬化の予防剤又は治療剤を提供することである。さらに、本発明の目的は、血管再狭窄や癌、炎症、血管新生の治療方法、診断方法及び診断薬を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明者らは、ペリオスチンスプライシングバリエーションのPN-2とPN-4のタンパク質を発現・精製し、それらをコートしたプレート上での線維芽細胞の接着活性を調べた結果、線維芽細胞の接着能はスプライシングバリエーションにより異なり、ペリオスチンスプライシングバリエーション(PN-2)は陰性コントロールのアルブミン(BSA)及びコーティングなしの群に対して有意に強い細胞接着性を示す一方、ペリオスチンスプライシングバリエーション(PN-4)はコーティングなしの群よりも弱く、陰性コントロールのアルブミン(BSA)と比べて非常に弱い細胞接着性しか持たないことを見いだした(図2)。この接着能の相違から、Exon-21領域は細胞接着に関与していることが予測され、それを抗原とした抗ペリオスチン Exon-21ポリクローナル抗体はPN-2の細胞接着性を阻害するであろうと考えた。

【0019】

次に血管再狭窄や癌、炎症性大腸炎、血管新生病態時に発現が亢進するペリオスチンスプライシングバリエーションを調べた結果、スプライシングバリエーションが形成されるC-末端ドメインは、Exon(エクソン)15から23で構成されており、ラットでは、下記(1)から(4)が存在することが明らかとなった(図1参照)。

(1) 全てを保持しているもの(PN-1と呼ぶ; 配列番号1として示す838アミノ酸からなる; cDNA配列を配列番号2として示す)、

(2) Exon-17が欠失しているもの(PN-2と呼ぶ; 配列番号3として示す811アミノ酸からなる; PN-1から配列番号4で示される27アミノ酸(Exon-17)が欠失しているもの; cDNA配列を配列番号5として示す)、

(3) Exon-21が欠失しているもの(PN-3と呼ぶ; 810アミノ酸からなる; PN-1から、N末端から785番目のアミノ酸から812番目のアミノ酸(配列番号6で示される28アミノ酸(Exon-21))が欠失しているもの)、

(4) Exon-17とExon-21が欠失しているもの(PN-4と呼ぶ; 配列番号7として示す783アミノ酸からなる; PN-2から配列番号6で示される28アミノ酸(Exon-21)が欠失しているもの; cDNA配列を配列番号8として示す)。

【0020】

また、ラット以外でも、マウス及びヒトについてPN-2及びPN-4が見出されている(マウスPN-2: 配列番号9(アミノ酸配列)、配列番号10(cDNA配列); マウスPN-4: 配列番号11(アミノ酸配列)、配列番号12(cDNA配列); ヒトPN-2: 配列番号13(アミノ酸配列)、配列番号14(cDNA配列); ヒトPN-4: 配列番号15(アミノ酸配列)、配列番号16(cDNA配列))。

【0021】

そこで、本発明者らは、PN-2とPN-4の構造上異なる部位であり、PN-2のみに存在するExon-21部位の阻害物質として、該部位がコードするアミノ酸配列部分を特異的に認識する抗体の作製を検討した。

【0022】

抗体を作製するためには、免疫原として用いる物質が親水性であることが必要であり、また、タンパク質のような大きなポリペプチドの一部分を用いて抗体を作製する際には、免疫原として使用する部分が、該タンパク質の表面に出ており、エピトープ部分を構成していることが必要である。そこで、Exon-21ペプチド鎖を抗原として用いることの可能性を検討するために、最初に、バイオインフォマティクス分野で汎用されているaccelrys社のソフト、Mac Vector 7.2を使用してエピトープ検索を行

なった。その結果、“親水性 (Hydrophilicity)” は若干見受けられたが、“表面への露出のしやすさ (Surface Probability)” 及び“抗原性 (Antigenicity)” から見て、Exon-21 領域の配列番号 6 で示されるアミノ酸配列 (EVSKVTKFIEGGDGHLEDEAIKRLQLQG) はタンパク質分子の表面に出ている可能性が非常に低いことが示唆され、抗原性を有しておらず抗体が作製できないと考えられ、実際に抗体を作製することは困難であることが予想された。

【0023】

しかしながら、本発明者らは、PN-2 タンパク質の機能を特異的に阻害するためには、PN-2 に存在する Exon-21 がコードするペプチド領域に対する抗体の使用が最適であるとの考えのもと、Exon-21 がコードするアミノ酸配列に対する抗体の作製を目ざし、Exon-21 領域がコードするペプチドを構成する 28 アミノ酸からなるペプチドを合成し、ウサギに免疫させ、得られた血清から IgG 画分を精製し、抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体を作製することができた。

【0024】

抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体にペリオスチンが持つ接着活性を阻害する活性が有るかを、サブコンフルエントに培養したラット血管平滑筋細胞にマウス PN-2 タンパク質をコートし、そこに単球由来の THP-1 細胞を播くと接着することを確認した上で、次に、PN-2 タンパク質と抗体を混ぜてから THP-1 細胞を播くと接着が阻害されることを確認した。このことから、抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体はペリオスチンが持つ接着活性を阻害する活性が有ることを確認した。抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体は、THP-1 細胞の接着を抑制することによりマクロファージへの分化を抑制することから、結果的にマクロファージの臓器への浸潤を抑制する機能を有すると考えられる。様々な炎症疾患には少なからずマクロファージが関連することから、抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体の抗炎症作用が示された (図 3)。

【0025】

次に、動物モデルを用いて血管内膜肥厚抑制効果を確認した。SD ラットの左頸動脈にバルーンカテーテルにて傷害を与え、同時に抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体を血管内投与した。一定期間をおいた後、血管を摘出して組織を固定し HE 染色を行ない、内膜と中膜の面積比を求め内膜肥厚の程度を調べた。その結果、中膜の面積は有意な差は無かったが、内膜／中膜比においては抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体投与群と擦過のみの群とで有意な差が得られ、内膜の肥厚が抑制されていることが示された (図 4 (A))。

【0026】

次に、PN-2 タンパクが炎症に関連しているとの報告がなされていることから、動脈硬化に対する抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体 (ex21PoAb) (ラットペリオスチンの Exon-21 がコードするペプチドに対するポリクローナル抗体) の効果を検討した。一般に、動脈硬化誘発モデルと考えられている ApoE ノックアウト (KO) マウスに高脂肪食を 3 か月負荷するモデルで検討した。抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体 (ex21PoAb) はラビット・コントロール IgG 抗体 (rIgG) を投与したマウスと比して、胸部大動脈 (上部) の Oil red O 染色で評価した動脈硬化が著明に抑制されていた。これによって抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体の動脈硬化抑制作用が示された (図 5)。

【0027】

次に、代表的な炎症性疾患である炎症性大腸炎のクローン病モデルにおいて、抗ヒト Exon-21 モノクローナル抗体 (ex21MoAb) の抗炎症効果を検討した。C57B6 の雄 8 週齢に、抗ヒト Exon-21 モノクローナル抗体 (ex21MoAb) 又はマウス・コントロール IgG 抗体 (mIgG) を投与し、1.75% デキストラン硫酸 (Dextran Sulfate Sodium; DDS) を飲水投与した。2 週間後の大腸の長さは、抗ヒト Exon-21 モノクローナル抗体 (ex21MoAb) 投与群の

方がマウス・コントロール I g G 抗体 (m I g G) と比して有意に長く保たれていた (図 6)。このことから、抗ヒト E x o n - 2 1 モノクローナル抗体 (e x 2 1 M o A b) は、マウス大腸炎モデルにおいて抗炎症作用が示された。

【0028】

また、PN-2 タンパクはこれまで血管新生との関連が報告されていることから、動物モデルを用いて抗ラット E x o n - 2 1 ポリクローナル抗体 (e x 2 1 P o A b)、抗ヒト E x o n - 2 1 モノクローナル抗体 (e x 2 1 M o A b) の血管新生抑制作用を検討した。マウス下肢虚血モデルにおいて PN-2 遺伝子が発現されていることを確認した上で、抗ラット E x o n - 2 1 ポリクローナル抗体 (e x 2 1 P o A b) を投与したところ著明な血管新生抑制効果を確認した (図 7 (B))。さらに組織を、C D 3 1 抗体を用いて血管の免疫染色したところ抗ラット E x o n - 2 1 ポリクローナル抗体 (e x 2 1 P o A b) 投与群で血管新生が有意に抑制されていた (図 8)。また抗ヒト E x o n - 2 1 モノクローナル抗体 (e x 2 1 M o A b) でも下肢血流抑制作用が確認できた (図 9)。抗 E x o n - 2 1 抗体の血管新生抑制作用を確認したので、病的血管新生を抗 E x o n - 2 1 抗体が抑制する可能性が示唆された。

【0029】

さらに、培養細胞を用いてマトリゲル・アッセイ (M a t r i g e l A s s a y) を行ったところ、M D A - M B 2 3 1 ヒト乳癌細胞の上清はヒト内皮細胞での血管新生を有意に増加させ、抗ラット E x o n - 2 1 ポリクローナル抗体 (e x 2 1 P o A b)、抗ヒト E x o n - 2 1 モノクローナル抗体 (e x 2 1 M o A b) の添加は血管新生を有意に抑制した (図 10 (A)、(B))。また、PN-2 は濃度依存的に血管新生を誘導することが示された (図 11 (A)、(B))。これにより癌が誘導する血管新生を抗 E x o n - 2 1 抗体が抑制することが示された。

【0030】

次に、培養マウス 4 T 1 乳癌細胞の増殖能への抗ラット E x o n - 2 1 ポリクローナル抗体 (e x 2 1 P o A b) の効果を見たところ、ラビット・コントロール I g G 抗体 (r I g G) 投与と比して、M T S アッセイによる評価で有意な細胞増殖抑制作用を確認した (図 12 (A))。また、マウス 4 T 1 乳癌細胞の壊死への抗ヒト E x o n - 2 1 モノクローナル抗体 (e x 2 1 M o A b) の効果を見たところ、マウス・コントロール I g G 抗体 (m I g G) 投与と比して、上清の L D H の評価で有意な壊死誘導作用を確認した。このことから抗 E x o n - 2 1 抗体のマウス 4 T 1 乳癌細胞への直接的な増殖抑制・壊死誘導作用を確認した (図 12 (B))。

【0031】

一方、マウス 4 T 1 乳癌細胞を足踵に注射し肺転移を起こすモデルマウスに抗ラット E x o n - 2 1 ポリクローナル抗体 (e x 2 1 P o A b) を週に一度投与し続けたところ、ラビット・コントロール I g G 抗体 (r I g G) 投与と比してモデル作製後 3 ~ 5 週間で原発巣の増殖のみならず原発巣から肺への転移コロニー数を有意に抑制した (図 13 (A)、(B))。また、抗ヒト E x o n - 2 1 モノクローナル抗体 (e x 2 1 M o A b) を同様に投与したところ、マウス・コントロール I g G 抗体 (m I g G) 投与と比して、肺転移を有意に抑制していた (図 14)。

【0032】

さらに、B 1 6 F 1 0 マウス悪性黒色腫細胞を足踵に注射し肺転移を起こすモデルマウスに、抗ラット E x o n - 2 1 ポリクローナル抗体 (e x 2 1 P o A b) を週に一度投与し続けたところ、ラビット・コントロール I g G 抗体 (r I g G) 投与と比して、モデル作製後 3 週間で原発巣の増殖のみならず原発巣から肺への転移コロニー数を有意に抑制した (図 15 (A)、(B))。PN-2 に対する中和抗体 (抗 E x o n - 2 1 抗体) は、PN-2 が有するマクロファージの接着促進作用、血管新生作用等を抑制することによって、乳癌細胞や悪性黒色腫細胞の増殖及び肺転移を抑制することが考えられ、新規治療薬としての可能性が示唆された。これにより、抗 E x o n - 2 1 抗体が、癌病態の進行とともに起こる原発巣の増殖を抑制する活性、及び原発巣から肺への転移を抑制する活性を持

つ抗体であることが明らかとなった。

【0033】

さらに、動脈硬化に対する抗ヒトExon-21モノクローナル抗体(ex21MoAb)の効果を検討した。動脈瘤モデルマウスに抗ヒトExon-21モノクローナル抗体(ex21MoAb)を週に一度投与したところ、マウス・コントロールIgG抗体(mIgG)投与と比して、超音波装置で評価した大動脈径の拡大が著明に抑制されていた。これによって抗ヒトExon-21モノクローナル抗体(ex21MoAb)の動脈瘤抑制作用が示され(図16)、本発明を完成するに至った。

【0034】

本発明は、前記の課題を解決するものとして、癌をはじめとする様々な炎症関連性病態時に特異的に発現する細胞接着活性を有するペリオスチンに対する抗体、特に該ペリオスチンスプライシング部位を抗原とする抗体を含有する、癌を含む様々な炎症関連疾患への治療用組成物を提供するものである。

【0035】

すなわち、本発明としては、以下を挙げることができる。

[1] 配列番号6で表されるアミノ酸配列、配列番号17で表されるアミノ酸配列及び配列番号18で表されるアミノ酸配列からなる群から選ばれる1種以上のアミノ酸配列からなるペプチドと結合する抗体。

[2] 配列番号19で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号20で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、配列番号21で表されるアミノ酸配列からなるペプチド及び配列番号22で表されるアミノ酸配列からなるペプチドからなる群から選ばれる1種以上のペプチドと特異的に結合する抗体。

[3] 抗体が、細胞接着活性を有するペリオスチンの細胞接着活性に関与する領域を特異的に認識し、かつ当該ペリオスチンの細胞接着活性を中和する能力を有する抗体である、前記[1]又は[2]記載の抗体。

[4] 抗体が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、前記[1]～[3]のいずれか1項に記載の抗体。

[5] 抗体が、モノクローナル抗体である、前記[4]記載の抗体。

[6] ハイブリドーマ細胞株NITE BP-01546により産生される、前記[5]記載の抗体。

[7] 前記[5]又は[6]記載のモノクローナル抗体の部分断片からなる抗体断片。

[8] 前記[1]～[6]のいずれか1項に記載の抗体又は前記[7]記載の抗体断片と、タンパク質又は低分子の薬剤とを結合させた抗体の誘導体。

[9] 前記[1]～[5]のいずれか1項に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

[10] ハイブリドーマ細胞株NITE BP-01546。

[11] 配列番号6で表されるアミノ酸配列、配列番号17で表されるアミノ酸配列及び配列番号18で表されるアミノ酸配列からなる群から選ばれるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチド又は当該ペプチドのN末端にCys基を付加したペプチドでヒトを除く哺乳動物を免疫した後、当該動物の抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合させ、得られたハイブリドーマを培養する工程を有する前記[4]に記載の抗体を製造する方法。

[12] ハイブリドーマが、ハイブリドーマ細胞株NITE BP-01546である、前記[11]記載の製造方法。

[13] 前記[1]～[6]のいずれか1項に記載の抗体、前記[7]記載の抗体断片又は前記[8]記載の抗体の誘導体を含む、細胞接着活性を有するペリオスチンに対する阻害用医薬組成物。

[14] 前記[1]～[6]のいずれか1項に記載の抗体、前記[7]記載の抗体断片又は前記[8]記載の抗体の誘導体を含む、細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する炎症関連疾患の予防又は治療用医薬組成物。

[15] 前記[1]～[6]のいずれか1項に記載の抗体、前記[7]記載の抗体断片又は前記[8]記載の抗体の誘導体を含む、細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する

10

20

30

40

50

血管内膜肥厚抑制用、癌治療用、血管新生抑制用又は動脈瘤の予防若しくは治療用医薬組成物。

〔16〕前記〔1〕～〔6〕のいずれか1項に記載の抗体、前記〔7〕記載の抗体断片又は前記〔8〕記載の抗体の誘導体を用いて、生体試料中の細胞接着活性を有するペリオスチンを検出又は定量する方法。

【0036】

また、本願発明において「配列番号○で示されるアミノ酸配列」という場合、そのアミノ酸配列のうち、1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されている場合も包含する。前記した「数個」とは、通常2～8個、好ましくは2～5個、より好ましくは2～3個を意味する。

10

【発明の効果】

【0037】

本発明の抗体を含む、細胞接着活性を有するペリオスチンに対する阻害剤を用いることにより、血管内膜肥厚や癌、炎症性大腸炎を含む炎症、血管新生を伴う疾患等で発現が増大する特定のペリオスチンバリエントの作用を抑制し、病状の増悪化抑制を行うことにより、疾患の治療を行うことができる。また、患者サンプル中の該ペリオスチンバリエント量を測定することにより、疾患の有無及び病状の進行程度を知ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】図1は、マウスのペリオスチンのスプライシングバリエントを示す模式図である。

20

【図2】図2は、実施例1において、ラットPN-2及びPN-4タンパク質の細胞接着作用を測定した結果を示す図である。

【図3】図3(A)及び(B)は、実施例4においてマウスPN-2タンパクがTHP-1細胞の接着を促進しマクロファージへの分化を誘導すること、また抗ラットExon-21ポリクローナル抗体がTHP-1細胞の接着を抑制し、マクロファージへの分化を抑制することを示す図である。

【図4】図4(A)及び(B)は、実施例7において、抗ラットExon-21ポリクローナル抗体のラット頸動脈バルーン障害モデルでの新生内膜抑制結果を示す図である。

【図5】図5は、実施例8において、抗ラットExon-21ポリクローナル抗体のApoeKOマウス動脈硬化モデルでの動脈硬化抑制結果を示す図である。

30

【図6】図6は、実施例9において、抗ヒトExon-21モノクローナル抗体のマウス大腸炎モデルでの炎症抑制結果を示す図である。

【図7】図7(A)は、実施例10において、抗体を投与した時期を表す。図7(B)は、実施例10において、閉塞性動脈硬化症モデルで抗ラットExon-21ポリクローナル抗体の血管新生抑制作用を示す図である。

【図8】図8は、実施例10において、閉塞性動脈硬化症モデルで抗ラットExon-21ポリクローナル抗体の血管新生抑制作用を示す図である。

【図9】図9は、実施例10において、閉塞性動脈硬化症モデルで抗ヒトExon-21モノクローナル抗体の血管新生抑制作用を示す図である。

40

【図10】図10(A)及び(B)は、実施例11において、ヒト内皮細胞を用いたマトリゲル血管新生モデルで抗ラットExon-21ポリクローナル抗体及び、抗ヒトExon-21モノクローナル抗体の血管新生抑制効果を示す図である。図中、Shamは偽処置群を表す。

【図11】図11(A)及び(B)は、実施例11において、ヒト内皮細胞を用いたマトリゲル血管新生モデルで抗ラットExon-21ポリクローナル抗体及び、抗ヒトExon-21モノクローナル抗体の血管新生抑制効果を示す図である。図中、Shamは偽処置群を表す。

【図12】図12(A)は、実施例12において、マウス4T1乳癌細胞への抗ラットExon-21ポリクローナル抗体の癌細胞増殖抑制効果を示す図である。図12(B)は

50

、実施例 11 においてマウス 4 T 1 乳癌細胞への抗ヒト E x o n - 2 1 モノクローナル抗体の壊死誘導効果を示す図である。

【図 1 3】図 1 3 (A) は、実施例 1 3 (マウス 4 T 1 乳癌細胞接種後、3 週間での下肢の原発巣の体積) において、マウス 4 T 1 乳癌細胞肺転移モデルマウスを用いた抗ラット E x o n - 2 1 ポリクローナル抗体の効果を測定した結果を示す図である。図 1 3 (B) は、実施例 1 3 (マウス 4 T 1 乳癌細胞接種後、5 週間での転移コロニー数) において、マウス 4 T 1 乳癌細胞肺転移モデルマウスを用いた抗ラット E x o n - 2 1 ポリクローナル抗体の効果を測定した結果を示す図である。

【図 1 4】図 1 4 は、実施例 1 3 (マウス 4 T 1 乳癌細胞接種後、5 週間での転移コロニー数) において、マウス 4 T 1 乳癌細胞肺転移モデルマウスを用いた抗ヒト E x o n - 2 1 モノクローナル抗体の効果を測定した結果を示す図である。

【図 1 5】図 1 5 (A) は、実施例 1 4 (マウス悪性黒色腫細胞接種後、3 週間での原発巣の体積) において、マウス悪性黒色腫 B 1 6 - F 1 0 細胞肺転移モデルマウスを用いた抗ラット E x o n - 2 1 ポリクローナル抗体の効果を測定した結果を示す図である。図 1 5 (B) は、実施例 1 4 (マウス悪性黒色腫細胞接種後、5 週間での転移コロニー数) において、マウス悪性黒色腫 B 1 6 - F 1 0 細胞肺転移モデルマウスを用いた抗ラット E x o n - 2 1 ポリクローナル抗体の効果を測定した結果を示す図である。

【図 1 6】図 1 6 は、実施例 1 5 において、動脈瘤モデルで抗ヒト E x o n - 2 1 モノクローナル抗体の大動脈径拡大抑制作用を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0039】

本発明の 1 つの態様において、細胞接着活性を有するペリオスチンに対する抗体を提供する。ここで、ペリオスチンは、細胞外マトリックスの一種であり、いくつかのスプライシングバリエーションの存在が知られている。そのいくつかは、癌病態時に特異的に発現する。癌病態時に特異的に発現するペリオスチンスプライシングバリエーションの機能を阻害する物質、すなわち阻害用薬剤として、本発明においては、特異性が高い、ヒトへの安全性が高い等の理由から、抗体を使用できる。本発明では、癌病態時に特異的なスプライシングバリエーションが形成される C - 末端ドメインの E x o n - 2 1 領域がコードするアミノ酸配列からなるペプチドを化学合成したものを抗原として、抗体を作製できるが、係るペプチドは、ペリオスチンタンパク質の酵素消化や遺伝子工学的手法等によっても得られ、その由来は問わない。

【0040】

本発明において、「細胞接着活性を有する」とは、細胞を接着させる作用を有することである。細胞接着活性の有無は、まず検体試料を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ でシャーレに入れ、オーバーナイトでタンパク質を表面に吸着させる。後に心線維芽細胞等の培養細胞を添加する。3~6 時間後に洗浄して剥離した細胞を除去した後に、残存している細胞を染色し、接着していた細胞の残存状態を確認することにより、判断することができる。

【0041】

また、本発明において、細胞接着活性を有するペリオスチンとしては、特に限定されないが、好ましくは、配列番号 3 (ラットペリオスチン P N - 2、811 アミノ酸) のアミノ酸配列からなるペリオスチン、配列番号 9 (マウスペリオスチン P N - 2、811 アミノ酸) のアミノ酸配列からなるペリオスチン、また、ヒトのアミノ酸配列はマウス・ラットのそれとほぼ同じなので接着活性を持つことが容易に推察される配列番号 13 (ヒトペリオスチン P N - 2、809 アミノ酸) のアミノ酸配列からなるペリオスチン、E x o n - 2 1 部位をコードするペプチドを構成するアミノ酸を有し、E x o n - 17 部位をコードするペプチドを構成するアミノ酸を有しないペリオスチンスプライシングバリエーション等を挙げることができる。

【0042】

また、細胞接着活性を有するペリオスチンとして、配列番号 6 (ラットペリオスチンの E x o n - 2 1 がコードする 28 アミノ酸)、配列番号 17 (マウスペリオスチンの E x

on-21がコードする28アミノ酸)又は配列番号18(ヒトペリオスチンのExon-21がコードする28アミノ酸)で示されるアミノ酸配列を有するペリオスチンを挙げることができる。

【0043】

さらに、抗体に対するエピトープは、配列番号19(ヒトペリオスチンのExon-21がコードするアミノ酸配列(配列番号18)のN末端から2番目から7番目、6アミノ酸)で示されるアミノ酸配列を有するペリオスチン、配列番号20(ヒトペリオスチンのExon-21がコードするアミノ酸配列(配列番号18)のN末端から17番目から23番目、7アミノ酸)で示されるアミノ酸配列を有するペリオスチン、配列番号21で示されるアミノ酸配列(ヒトペリオスチンのExon-21がコードするアミノ酸配列(配列番号18)のN末端から3番目から7番目、5アミノ酸)を有するペリオスチン、配列番号22で示されるアミノ酸配列(ヒトペリオスチンのExon-21がコードするアミノ酸配列(配列番号18)のN末端から27番目から28番目、2アミノ酸)と連続する6アミノ酸からなる8アミノ酸配列を有するペリオスチンを挙げることができる。

【0044】

ペリオスチンの細胞接着活性に関与する領域としては、例えば、Exon-21部位を挙げることができる。具体的には、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するペリオスチンの配列番号6で示されるアミノ酸配列部分(配列番号3の758~785アミノ酸)、配列番号9で示されるアミノ酸配列を有するペリオスチンの配列番号17で示されるアミノ酸配列部分(配列番号9の758~785アミノ酸)、配列番号13で示されるアミノ酸配列を有するペリオスチンの配列番号18で示されるアミノ酸配列部分(配列番号13の756~783アミノ酸)等が挙げられる。

【0045】

本発明の好ましい態様において、「細胞接着に関与する部位を特異的に認識できる」とは、好適には、上記のExon-21部位を含むペリオスチンの細胞接着に関与する領域を特異的に認識できることを意味する。例えば、ペリオスチンの細胞接着に関与する部位を特異的に認識できる抗体としては、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するペリオスチンの配列番号6で示されるアミノ酸残基部分(配列番号3の758~785アミノ酸)、配列番号9で示されるアミノ酸配列を有するペリオスチンの配列番号17で示されるアミノ酸残基部分(配列番号9の758~785アミノ酸)、配列番号13で示されるアミノ酸配列を有するペリオスチンの配列番号18で示されるアミノ酸残基部分(配列番号13の756~783アミノ酸)、又はその一部に対する抗体を好適に挙げることができる。さらに、配列番号19又は配列番号20で示されるアミノ酸配列、配列番号21又は配列番号22で示されるアミノ酸配列或いはその一部を有するポリペプチドに対する抗体を挙げることができる。

【0046】

「ペリオスチンの細胞接着活性に関与する領域を阻害する」とは、上述の「ペリオスチンの細胞接着活性に関与する領域」が有する作用ないし活性を阻害することであり、具体的には、例えば、上述の細胞接着活性に関与する部位を特異的に認識できる抗体を用いて、ペリオスチンの有する作用ないし活性を阻害することである。

【0047】

1つの態様において、本発明の抗体は、上記のような抗原を用いて得られるモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体である。ここで、「モノクローナル抗体」とは、前述の抗原に反応性を有する任意のモノクローナル抗体であって、「モノクローナル抗体」には、前記の抗原を、マウス、ラット、ハムスター、モルモット又はウサギ等の哺乳動物に免疫して得られる天然型抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造され得るキメラモノクローナル抗体(キメラ抗体)及びヒト化モノクローナル抗体(ヒト化抗体;CDR-grafted抗体)、並びにヒト抗体産生トランスジェニック動物等を用いて製造され得るヒトモノクローナル抗体(ヒト抗体)も包含される。また、本発明の抗体は、IgG(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれの

アイソタイプを有するモノクローナル抗体をも包含する。好ましくは、IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) 又はIgMである。

【0048】

抗原に上記ペプチドを用いる場合には、それ自身抗原として用いることも可能であるが、抗原性を高めるために、上記ペプチドをポリビニルピロリドン、ラテックス、ポリメチルメタクリレート等の巨大分子の物質に吸着させて免疫する方法、KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin: スカシ貝ヘモシアニン) やBSA (牛血清アルブミン) 等のキャリアタンパクに結合して用いる方法等があり、いずれの方法をも使用することができる。一般的にはペプチドをキャリアタンパクに結合して用いる方法が好ましく、結合方法は公知の方法を用いることができる (例えば、「続医薬品の開発、14巻、廣川書店、1991」)。

【0049】

ペプチドはキャリアタンパクと結合させて方向性を持たせるために、ペプチドのC末端又はN末端にシステイン基を導入し、システイン基を介してキャリアタンパクと結合させる方法が用いられる。この目的に合った結合方法であれば当技術分野において一般に用いられている架橋剤を用いることができる。架橋剤としては、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート (以下「SMCC」と略す) や3-マレイミドベンゾイックアシッド-N-ヒドロキシサクシンイミドエステル (MBS) 等が適している。モノクローナル抗体は、ケーラーとミルシュタインによる細胞融合法 (G.Kohler et al Nature (1975)256,495-7) により作製されたハイブリドーマを培養して分泌させ、その培養液から分離することにより調製される。すなわち、Exon-21がコードするアミノ酸配列を有するペプチド等で哺乳動物を免疫した後、この動物の抗体産生細胞をミエローマ細胞と融合させハイブリドーマを得る。Exon-21に結合する抗体を産生するハイブリドーマの検索は、例えばハイブリドーマ上清について抗原を固定したマイクロプレートを用いる酵素免疫測定法 (以下「ELISA」と略す) によって行われる。

【0050】

免疫に使用する動物としては特に制限はなく、各種の哺乳動物、例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ等を使用することができる。モノクローナル抗体の作製には、上記の免疫動物のうち、取扱い易さ等の理由により一般にはBALB/cマウスが用いられるが、他の系統のマウスを使用することもできる。その際、免疫に用いる抗原の濃度は、十分な量の抗原刺激を受けたリンパ球が形成されるよう選択し、好ましくは1~100μgの抗原を適当な濃度に生理食塩水等で希釈し、フロイント完全アジュバントあるいはフロイント不完全アジュバント等の懸濁液とし、動物に腹腔内注射又は皮下注射等によって投与する。投与は2~4週毎に1~数回行う。最終免疫は通常1~100μgの抗原を添加した生理食塩溶液を静脈注射又は皮下注射等により投与して行われる。最終免疫の数日後に細胞融合のため免疫した動物から抗原産生細胞、例えばリンパ球、好ましくは脾臓細胞又はリンパ節細胞を取り出す。

【0051】

次に、抗体産生細胞として脾臓細胞を用いた場合について説明するが、脾臓細胞以外の抗体産生細胞も同様に細胞融合に供し得る。細胞融合は、最終免疫3~4日後に無菌的に取り出した脾臓から調製した脾臓細胞と適当なミエローマ細胞を融合促進剤の存在下で細胞融合させる。融合に用いるミエローマ細胞は、哺乳動物からのものでよいが、一般には、免疫に用いた動物と同じ種の動物に由来するものが好適であり、既に公知の種々の細胞株、例えば、マウスではSP2/O-Ag14 (SP2) [Nature, 276, 269(1978)]、NS-1-Ag4/1 (NS-1)、P3-X63Ag8U.1 (P3U1) [Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 1-7(1978): ATCCから入手可、ATCC No. CRL-1597]、P3-NS1-1-Ag4-1、P3-X63Ag8 (P3)、FO、X63Ag8.653 (X63.653)、210. RCY3. Ag1. 2. 3、S194/5XO. BU1、SKO-007、GM15006TG-A12等が好適に使用され

10

20

30

40

50

、ラットではY3、Ag1、2、3等が好適に使用される。好ましい融合促進剤として例えば、平均分子量が1000～6000のポリエチレングリコール（PEG）のほかセンダイウィルスも使用できる。融合時の脾臓細胞とミエローマ細胞の混合比率は、一般に10：1～2：1の範囲が好ましい。

【0052】

融合した細胞よりハイブリドーマの分離は、未融合の脾臓細胞、未融合のミエローマ細胞及び融合した細胞の混合物を未融合のミエローマ細胞が生存できない選択培地で、未融合の細胞が死滅するまでの適当な時間（約1週間）培養することにより行える。選択培地は、例えば、HAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地）が使用される。この選択培地中では、未融合のミエローマ細胞は死滅し、また未融合の脾臓細胞は、非腫瘍性細胞であるので、一定期間後（約1週間後）死滅するので、生育できる細胞を選択することによりハイブリドーマを得ることができる。目的の抗体を産生するハイブリドーマは、通常の限界希釈法によって、目的とする抗体の産生株の検索及び単クローン化が行える。このようにして得られた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は、生育に適した培地中で生育でき、また超低温冷凍庫や液体窒素中で容易に長期に保存が可能である。

10

【0053】

このようにして得られたハイブリドーマは、栄養培地中又は哺乳動物の腹腔内で増殖させることにより抗体を産生させることができる。産生した抗体は、培養上清又はその哺乳動物の腹水若しくは血清から精製することができる。

20

【0054】

本発明のハイブリドーマとしては、例えば、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター（NPMID）に国際寄託されているハイブリドーマ（受託日：2013年2月26日、受託番号：NITE BP-01546、識別の表示：KS-0259#8, 080611 Kohjin Bio）を使用することができる。

【0055】

抗体の精製は、遠心分離、透析、硫酸アンモニウム等による塩析、DEAEカラム等によるイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィー等の一般的な単離、精製方法を用いて行うことができる。

【0056】

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの決定は、以下のように行うことができる。まず、同定法としては、オクテルロニー（Ouchterlony）法、ELISA法、又はRIA法が挙げられる。オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。一方、ELISA法又はRIA法を用いる場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに第二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることにより、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。また、さらに簡便な方法として、市販の同定用のキット（例えば、マウスタイパーキット；バイオラッド社製）等を利用することもできる。さらに、タンパク質の定量は、フォーリンロウリー法、及び280nmにおける吸光度 $[1.4(OD_{280}) = \text{イムノグロブリン} 1 \text{ mg/ml}]$ より算出する方法により行うことができる。

30

40

【0057】

このようにして得られた本発明のモノクローナル抗体は、配列番号3、配列番号9若しくは配列番号13で表されるアミノ酸配列を有するペリオスチン（PN-2）；配列番号6、配列番号17若しくは配列番号18で表されるアミノ酸配列を有するペリオスチン；又は配列番号19若しくは20で表されるアミノ酸配列を有するペリオスチン；配列番号6、配列番号17若しくは配列番号18で表されるアミノ酸配列からなるペプチド；又は、配列番号19若しくは20で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを特異的に認識する。好ましくは、本発明のモノクローナル抗体は、ヒトペリオスチンExon-21ペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号18）におけるN末端から2番目のバリン（V）から7

50

番目のリシン（K）までのアミノ酸配列からなるペプチド（配列番号19）、及びヒトペリオスチンExon-21ペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号18）におけるN末端から17番目のフェニルアラニン（F）から23番目のリシン（K）までのアミノ酸配列からなるペプチド（配列番号20）を特異的に認識して結合することができる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体は、ヒトペリオスチンExon-21ペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号18）のN末端から2番目のバリンから7番目のリシンまでのアミノ酸配列部位（VTKVTK；配列番号19）、ヒトペリオスチンExon-21ペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号18）におけるN末端から17番目のフェニルアラニン（F）から23番目のリシン（K）までのアミノ酸配列部位（FEDEEK；配列番号20）又はそれらの一部を特異的に認識することができる。

10

【0058】

本発明のモノクローナル抗体は、ヒトペリオスチン-1タンパク質の細胞接着作用を抑制又は阻害する、すなわちヒトペリオスチン-1タンパク質の細胞接着作用を中和する活性を有する。さらに、本発明のモノクローナル抗体は、癌病態時等に引き起こされる湿潤、炎症及び血管新生を抑制し、炎症関連疾患の予防又は治療することができる。

【0059】

本発明の抗体としてポリクローナル抗体を使用する場合、ポリクローナル抗体は通常行われている方法、例えば「日本生化学会編、新生化学実験講座12、東京化学同人、1992」記載の方法によって得ることができる。

【0060】

20

免疫動物としては、特に限定されるものではないが、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、モルモット、マウス、ニワトリ等が挙げられる。免疫動物としてウサギを用いる場合には、抗原を適当な濃度に生理食塩水等で希釈し、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント又は水酸化アルミニウムアジュバント等の懸濁液とし、10～1000 µg/回/匹を注射し、さらに2～4週間後に追加免疫注射を1～3回行い、抗血清を得る。注射は多数箇所の皮下に行うのが好ましい。抗血清からポリクローナル抗体の調製は、上記モノクローナル抗体の精製と同様の方法で行うことができる。

【0061】

このようにして得られた本発明のポリクローナル抗体は、配列番号3、配列番号9若しくは配列番号13で表されるアミノ酸配列を有するペリオスチン（PN-2）；配列番号6、配列番号17若しくは配列番号18で表されるアミノ酸配列を有するペリオスチン；配列番号19又は20で表されるアミノ酸配列を有するペリオスチン；配列番号6、配列番号17若しくは配列番号18で表されるアミノ酸配列からなるペプチド；又は、配列番号19若しくは20で示されるアミノ酸配列を有するペプチドを特異的に認識する。好ましくは、本発明のポリクローナル抗体は、ヒトペリオスチンExon-21ペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号18）におけるN末端から7番目のリシン（K）から11番目のグリシン（G）までのアミノ酸配列からなるペプチド（配列番号19）、及びヒトペリオスチンExon-21ペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号18）におけるN末端から23番目のリシン（K）から26番目のロイシン（L）までのアミノ酸配列からなるペプチド（配列番号20）を特異的に認識して結合することができる。すなわち、本発明のポリクローナル抗体は、ヒトペリオスチンExon-21ペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号18）のN末端から3番目から7番目までのアミノ酸配列部位（TKVTK；配列番号21）、ヒトペリオスチンExon-21ペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号18）におけるN末端から27番目から28番目までのアミノ酸配列に連続する6アミノ酸から構成される配列部位（QGDTVRK；配列番号22）或いはそれらの一部を特異的に認識することができる。

30

40

【0062】

本発明のポリクローナル抗体は、ヒトペリオスチン-1タンパク質の細胞接着作用を抑制又は阻害する、すなわちヒトペリオスチン-1タンパク質の細胞接着作用を中和する活性を有する。さらに、本発明のポリクローナル抗体は、癌病態時等に引き起こされる湿潤

50

、炎症及び血管新生を抑制し、炎症関連疾患の予防又は治療することができる。

【0063】

本発明は、細胞接着作用を有するペリオスチンのスプライシングバリエーションを認識する抗ペリオスチン抗体を含む、血管内膜肥厚抑制用又は癌治療用、血管新生抑制用組成物である。

【0064】

ヒト型抗体の作製

免疫グロブリンG（以下、単に「IgG」という。）は、分子量約23000の軽ポリペプチド鎖（以下「軽鎖」という）、分子量約50000の重ポリペプチド鎖（以下「重鎖」という）の各2本ずつから構成される。重鎖、軽鎖とも約110残基からなる、アミノ酸配列が保存されている領域の繰り返し構造を持ち、これらはIgGの3次元構造の基本単位（以下、「ドメイン」という。）を構成する。重鎖及び軽鎖は、それぞれ連続した4個、及び2個のドメインから構成されている。重鎖、軽鎖いずれにおいても、アミノ末端のドメインは他のドメインに比べ各抗体分子間でのアミノ酸配列の変異が大きく、このドメインは可変ドメイン（variable domain：以下、「Vドメイン」という。）と呼ばれる。IgGのアミノ末端においては、重鎖、軽鎖のVドメインが相補的に会合し可変領域を形成している。これに対し、残余のドメインは、全体として定常領域を形成する。定常領域は、各動物種に特徴的な配列を有し、例えば、マウスIgGの定常領域はヒトIgGの定常領域とは異なっているため、マウスIgGはヒトの免疫系によって異物として認識され、その結果、ヒト抗マウス抗体（Human Anti Mouse Antibody：以下「HAMA」という。）応答が起こる（Schroff RW, et al Cancer Res. (1985)45,879-85）。従って、マウス抗体はヒトに繰り返し投与することはできない。このような抗体をヒトに投与するためには、抗体の特異性を保持したままHAMA応答を起こさないように抗体分子を修飾する必要がある。

【0065】

X線結晶構造解析の結果によれば、一般に、このようなドメインは3本から5本のβ鎖からなる逆平行βシートが二層重なり合った長円筒状の構造をとる。可変領域では、重鎖、軽鎖のVドメインそれぞれにつき各3個のループが集合し、抗原結合部位を形成する。この各ループは相補性決定領域（complementarity determining region：以下、「CDR」という。）と呼ばれ、アミノ酸配列の変異が最も著しい。可変領域のCDR以外の部分は、一般に、CDRの構造を保持する役割を有し、「フレームワーク」と呼ばれる。カバトラは、重鎖、軽鎖の可変領域の一次配列を多数収集し、配列の保存性に基づき、それぞれの一次配列をCDR及びフレームワークに分類した表を作成した（Kabatt et al. SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No.91-3242, E.A.）。

【0066】

また、各フレームワークは、アミノ酸配列が共通の特徴を有する複数のサブグループに分類された。さらに、ヒトとマウスの間で対応するフレームワークが存在することも見いだされた。このようなIgGの構造的特徴に関する研究から以下のヒト化抗体の作製法が考案された。研究初期の段階では、マウス由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体が提案された（Morrison SL, et al Proc Natl Acad Sci U S A. (1984)81,6851-5）。しかしながら、そのようなキメラ抗体は、依然として、多くの非ヒトアミノ酸残基を含むので、特に長期間投与した場合にはHAMA応答を誘導しうる（Begent et al., Br. J. Cancer, (1990)62, 487）。

【0067】

ヒトに対しHAMA応答を発現する可能性のある、非ヒト哺乳動物由来のアミノ酸残基を更に少なくする方法として、CDR部分のみをヒト由来の抗体に組み込む方法が提案された（Peter T et al. Nature, (1986) 321, 522-5）が、一般に、抗原に対する免疫グロブリン活性を保持するにはCDRのみの移植では不十分であった。一方、チョッチアらは、1987年、X線結晶構造解析データを用い、（a）CDRのアミノ酸配列中には、抗

原に直接結合する部位とCDR自体の構造を維持する部位とが存在し、CDRの取り得る三次元構造は、複数の典型的なパターン（カノニカル構造）に分類されること、（b）カノニカル構造のクラスは、CDRのみならずフレームワーク部分の特定の位置のアミノ酸の種類によって決定されること、を見いだした（Chothia C. et al. J. Mol. Biol. (1987)196, 901-17）。この知見に基づき、CDR移植法を用いる場合、CDRの配列に加え一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植する必要性が示唆された（特表平4-502408号）。

【0068】

一般に、移植すべきCDRを有する非ヒト哺乳動物由来の抗体は「ドナー」、CDRが移植される側のヒト抗体は「アクセプター」と定義され、CDR移植法を実施する際に考慮すべき点は、可能な限りCDRの構造を保存し、免疫グロブリン分子の活性を保持することにある。この目的を達成するためには、（a）アクセプターは、いずれのサブグループに属するものを選択すべきか、及び、（b）ドナーのフレームワークからいずれのアミノ酸残基を選択すべきか、の2点に留意する必要がある。

【0069】

クィーンらは、ドナーのフレームワークのアミノ酸残基が、以下の基準の少なくともひとつに該当する場合、CDR配列とともにアクセプターに移植するデザインの方法を提唱した（特表平4-502408号）：

（a）アクセプターのフレームワーク領域中のアミノ酸がその位置において稀であり、ドナーの対応するアミノ酸がアクセプターの前記位置において普通であること

（b）該アミノ酸がCDRのひとつのすぐ近くであること

（c）該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3 Å（オングストローム）以内に側鎖原子を有し、そして抗原と又はヒト化抗体のCDRと相互作用することができると思われすること。

【0070】

本発明の抗Exon-21モノクローナル抗体の重鎖又は軽鎖をコードするDNAは、上記抗Exon-21モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを調製し、該mRNAを逆転写酵素でcDNAに変換してから、該抗体の重鎖又は軽鎖をコードするDNAをそれぞれ単離することにより得ることができる。

【0071】

ヒト抗体の作製

本発明における「ヒト抗体」又は「ヒト免疫グロブリン」とは、免疫グロブリンを構成するH鎖の可変領域（VH）及びH鎖の定常領域（CH）並びにL鎖の可変領域（VL）及びL鎖の定常領域（CL）を含む全ての領域がヒトイムノグロブリンをコードする遺伝子に由来するイムノグロブリンである。換言すれば、H鎖がヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子に由来し、軽鎖がヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子に由来するものである抗体を意味する。

ヒト抗体は、常法に従って、例えば、少なくともヒトイムノグロブリン遺伝子をマウス等のヒト以外の哺乳動物の遺伝子座中に組込むことにより作製されたトランスジェニック動物を、抗原で免疫感作することにより、前述したモノクローナル抗体の作製法と同様にして製造することができる。例えば、ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスは、既報(Mendez MJ et al.Nature Genetics(1997)15,146-56,Green LL et al.Nature Genetics(1994)7,13-21, 表平4-504365号公報；国際出願公開WO94/25585号公報；日経サイエンス、6月号、第40～第50頁、1995年;Nils Lonberg et al.Nature(1994)368,856-9,及び特表平6-500233号公報）に記載の方法に従って作製することができる。

【0072】

本発明で使用される抗体は、抗体の分子全体に限らず、細胞接着活性を有するペリオスチンの該活性を中和するものであれば、抗体の断片又は抗体の誘導体であってもよい。

【0073】

抗体断片としては、例えば、F a b、F (a b ')₂、F v、一本鎖抗体 (s c F v)、ジスルフィド安定化抗体 (d s F v)、C D Rを含有するペプチド等を挙げることができる。

【 0 0 7 4 】

本発明の抗体断片のうち F a b、F (a b ')₂等は、ペリオスチンの細胞接着活性を阻害する抗体をパパイイン、ペプシン等のタンパク質分解酵素で処理して得ることができ、また、得られた抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させて作製することができる。

【 0 0 7 5 】

本発明の抗体断片のうち s c F vは、ペリオスチンの細胞接着活性を阻害する抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を、適当なペプチドリンカー等を用いて連結し、作製することができる。また、上記抗体のH鎖又はH鎖V領域をコードする遺伝子、及びL鎖又はL鎖V領域をコードする遺伝子の全配列又は所望のアミノ酸配列をコードするD N A部分を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させて作製することができる。

10

【 0 0 7 6 】

本発明の抗体断片のうち d s F vは、ペリオスチンの細胞接着活性を阻害する抗体のH鎖V領域とL鎖V領域のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間でジスルフィド結合を介して結合させた抗体断片であり、システイン残基に置換するアミノ酸残基は、抗体の立体構造予測により選択することができる。該抗体断片をコードする遺伝子の全配列又は所望のアミノ酸配列をコードするD N A部分を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させて作製することができる。

20

【 0 0 7 7 】

本発明の抗体断片のうちC D Rを含有するペプチドは、ペリオスチンの細胞接着活性を阻害する抗体のH鎖又はL鎖のC D R領域のうち、少なくとも1つのC D R領域以上を含んで構成される。また複数のC D R領域を適当なペプチドリンカーを介する等の方法により結合させてもよい。該C D Rを含有するペプチドは、これをコードする遺伝子の全配列又は所望のアミノ酸配列をコードするD N A部分を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させて作製することができる。また、F m o c法又はt B o c法等の化学合成によっても作製できる。

30

【 0 0 7 8 】

また、本発明では、上述の抗体又は抗体断片に、タンパク質又は低分子化合物を結合させた誘導体を使用することができ、これら修飾は、公知の方法で行うことができる。

【 0 0 7 9 】

本発明の抗体、抗体断片及び該抗体又は該抗体断片がタンパク質と結合している誘導体をコードするD N Aは、常法により決定することができる。また、常法により、該D N Aを含有する組換えベクターを作製し、該組換えベクターを常法により宿主細胞に導入することにより形質転換体を作製することができる。さらに、常法により、該形質転換体を培養し、培養物中に抗体、抗体断片、及び抗体又は抗体断片とタンパク質が結合している誘導体を生成させ、該培養物から抗体、抗体断片、及び抗体又は抗体断片とタンパク質が結合している誘導体を採取することにより、抗体、抗体断片、及び抗体又は抗体断片とタンパク質が結合している誘導体を製造することができる。

40

【 0 0 8 0 】

また、本発明の1つの態様において、本発明の抗体、抗体断片及び／又は抗体の誘導体は、細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する炎症関連疾患を予防又は治療するために使用することができる。

【 0 0 8 1 】

細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する炎症関連疾患とは、疾患の病態時に細胞接着活性を有するペリオスチンの遺伝子の発現が高く、該遺伝子によりコードされるタン

50

パク質の産生が増加している疾患である。また、該遺伝子又はタンパク質の増加により、病態が悪化する疾患のことである。

【0082】

このような細胞接着活性を有する炎症関連疾患としては、特に限定されるものではないが、血管内膜肥厚を主因とする疾患、癌及びその他の炎症関連疾患が挙げられる。血管内膜肥厚を主因とする疾患としては、動脈硬化、冠動脈形成術後に認められる血管内膜肥厚を主因とした再狭窄等が挙げられる。また、本発明の抗体、抗体断片及び／又は抗体の誘導体を適用できる癌としては、これに限定されるものではないが、例えば、脳腫瘍、白血病、骨肉腫、乳癌、大腸癌、悪性黒色腫、骨癌、胃癌、肺癌、肝癌、腎癌、膀胱癌、胆のう癌、皮膚癌、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、結腸癌、卵管癌、食道癌、小腸癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、前立腺癌、膀胱癌、悪性リンパ腫等を挙げることができ、特に好適には、乳癌、大腸癌、肺癌、及び悪性黒色腫を挙げることができる。その他の炎症関連疾患としては、自己免疫性関節炎、アトピー性皮膚炎、喘息、肺気腫、ベーチェット病、多発性硬化症、脊髄小脳変性症、ブドウ膜炎、ギランバレー症候群、フィッシャー症候群、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、多発性筋炎、強皮症、自己免疫性肝炎、サルコイドーシス、慢性膀胱炎、炎症性腸炎、クローン病、固形癌、多発性骨髄腫、血管線維腫、粥状動脈硬化、動静脈奇形、肉芽、血管腫、肥大性癍痕、ケロイド、早老、乾癬、発熱性肉芽腫、疣、出血性関節、非結合骨折、リウマチ様関節炎（例えば、悪性関節リウマチ等）、変形性関節症、卵胞嚢胞、卵巣肥大症候群、多嚢胞卵巣、加齢性黄斑変性症、糖尿病性網膜症、新生血管緑内障、トラコーマ、肺気腫、慢性気管支炎、肥満症、歯周病、角膜移植片の血管新生、動脈瘤等が挙げられる。上記例示した炎症関連疾患の多くに血管新生が関与する。

【0083】

本発明の他の態様としては、上記の抗体をマーカー標識することにより作製した、前記細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する炎症関連疾患の診断薬が挙げられる。ここでマーカーとしては、特に限定されず、酵素、放射性同位元素、蛍光色素等を用いることができる。ここで用いる酵素としては、ターンオーバー数（turn over number）が大きく、かつ酵素と結合しても安定であること、基質と特異的に反応して発色させることができる等の条件を満たす物であれば特に制限されるものではなく、通常酵素免疫アッセイ（EIA）に用いられる酵素を使用することができる。好ましい酵素の例としては、ペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素等が挙げられる。また、酵素阻害物質や補酵素等を用いることもできる。

【0084】

これら酵素と抗体との結合は、マレイミド化合物等の公知の架橋剤を用いる公知の方法により行うことができる。基質としては、使用する酵素に応じて公知の物質を使用することができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンを用いることができる。また酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。マーカーとして用いる放射性同位元素としては、¹²⁵Iや³H等の通常のラジオイムノアッセイ（RIA）で用いられているものを使用することができる。蛍光色素としては、フルオレッセンスイソチオシアネート（FITC）やテトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）等の通常の蛍光抗体法に用いられるものを使用することができる。また、本診断薬は、癌細胞と周辺の線維芽細胞を特異的に染色することが可能な、免疫組織学的染色として使用することができる。また、放射性同位体を標識した場合には、体内に投与することによって、癌病態時等の病変部を画像化するために使用することもできる。

【0085】

本発明の1つの態様は、本発明の抗体、抗体断片及び／又は抗体の誘導体を用いることによる、ヒト又は動物の血液から血清を調製した生体試料のサンプル中、すなわち血清中における細胞接着活性を有するペリオスチンを検出又は定量する方法であり、さらに検出

又は定量することによる心不全等の細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する炎症関連疾患の診断方法を提供する。本方法において、いわゆるサンドイッチELISA法（Enzyme-linked immunosorbent assay：酵素免疫測定法）によって細胞接着活性を有するペリオスチンを検出することができる。本発明の診断キットを用いる場合には、まず抗ペリオスチン一次抗体を固相化したプレートに試料を接触させて両者を結合させ、この結合体にマーカー標識した抗ペリオスチン二次抗体を結合させ、この三者の結合体におけるマーカーのシグナル強度を測定することにより、細胞接着活性を有するペリオスチンを検出又は定量することができる。特に細胞接着活性を有するペリオスチンは、癌等の病態時に特異的に発現するスプライシングバリエーションであるため、ペリオスチンの産生をモニターすることにより癌等における病態の診断をすることができる。

10

【0086】

このように、本発明の抗体を標識化して、二次抗体として使用することが可能である。

【0087】

また、本発明の1つの態様としては、本発明の抗体、抗体断片及び／又は抗体の誘導体を有効成分として含有する、細胞接着活性を有するペリオスチンに対する阻害用医薬組成物が挙げられる。前記抗体、抗体断片及び／又は誘導体が、細胞接着活性を有するペリオスチンに対する阻害活性を有することにより、前記医薬組成物は、血管新生を抑制し、血管内膜肥厚を抑制し、癌を治療し、又、動脈瘤を予防若しくは治療することができる。すなわち、本発明は、細胞接着作用を有するペリオスチンのスプライシングバリエーションを認識する抗ペリオスチン抗体を含む、血管内膜肥厚抑制用、癌治療用、血管新生抑制用、動脈瘤を予防若しくは治療用組成物である。本発明の組成物は、冠動脈形成術後に認められる血管内膜肥厚を主因とした再狭窄の治療及び予防、癌の予防又は治療、血管新生を伴う疾患の治療又は予防、動脈瘤を予防又は治療するために使用することができる。

20

【0088】

さらに、本発明の1つの態様として、本発明の抗体、抗体断片及び／又は誘導体を有効成分として含有する、細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する炎症関連疾患の予防又は治療用医薬組成物が挙げられる。例えば、本発明の1つの態様として、前記抗体、抗体断片及び／又は抗体の誘導体を有効成分として含有する血管内膜肥厚抑制用医薬組成物、前記抗体、抗体断片及び／又は抗体の誘導体を有効成分として含有する癌治療用医薬組成物、前記抗体、抗体断片及び／又は抗体の誘導体を有効成分として含有する血管新生抑制用医薬組成物、前記抗体、抗体断片及び／又は抗体の誘導体を有効成分として含有する動脈瘤の予防又は治療用医薬組成物等が挙げられる。

30

【0089】

本発明の癌治療用組成物は、癌の病原巣の増殖を抑制する効果、及び癌の転移を抑制する効果を有する。従って、癌の病原巣の増殖を抑制する効果を期待して、又は癌の転移を抑制する効果を期待して、さらにはその両者を期待して使用することができる。

【0090】

本発明の抗体、抗体断片及び／又は抗体の誘導体を有効成分として含有する医薬組成物は、通常の製剤化の際に用いられ、薬理学的に許容し得る公知の担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製される。

40

【0091】

本発明に係る医薬組成物の有効成分は、薬理学的に許容し得る公知の担体、賦形剤、希釈剤等と混合して医薬に一般に使用されている投与方法（例えば、経口投与方法、又は、静脈内投与、筋肉内投与もしくは皮下投与等の非経口投与方法）によって投与するのが好ましい。本発明の医薬組成物は、例えば、有効成分を、薬理学的に許容される担体、香味剤、賦形剤、安定剤、希釈剤、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤等と、適宜混和することにより製造することができる。本発明の医薬組成物の剤形としては、特に限定されず、例えば、錠剤、散剤、顆粒剤、溶液剤等が挙げられる。錠剤等に混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン等の結合剤、コーンスターチ等の潤沢剤等を用いるこ

50

とができる。また、医薬組成物を、糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質のフィルムにより被膜してもよい。カプセルの剤型である場合には、前記の組成物に更に液状担体を含有させることができる。注射のための無菌組成物も、通常の医薬の処方を用いて製造することができる。注射用の水性液としては、ブドウ糖等を含む等張液等が挙げられ、ポリエチレングリコール等の適当な溶解補助剤等と併用してもよい。また、医薬組成物を、緩衝剤、安定剤、保存剤、酸化防止剤、無痛化剤等と配合してもよい。経口投与において、消化管内で有効成分が分解を受けやすい場合、消化管内で分解を受けにくい製剤（例えば、活性成分をリポソーム中に包容したマイクロカプセル剤）として経口投与することも可能である。また、直腸、鼻腔内、舌下、肺等の消化管以外の粘膜から吸収せしめる投与方法も可能である。この場合は、座剤、点鼻剤、舌下剤、経肺剤といった形態で投与することができる。

10

【0092】

本発明の医薬組成物の投与量は、治療に用いられる場合、治療に有効な投与量が決められるが、当該投与量は投与対象者の年齢、体重、症状の程度及び投与経路等によって異なり、個々の場合に依拠して決められる。通常、経口投与による場合、成人一日当たりの投与量は0.1～1000mg程度であり、これを1～数回（2、3回等）に分けて投与すればよい。持続静脈内投与においては、 $0.01\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ～ $1.0\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ の範囲で投与することができ、 $0.025\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ～ $0.1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ で投与するのが望ましい。

【0093】

20

本発明の1つの態様として、「ペリオスチン抗体を用いることを特徴とする、細胞接着活性を有するペリオスチンに対する阻害方法」、「治療の有効量の細胞接着作用を有するペリオスチンのスプライシングバリエーションを認識する抗ペリオスチン抗体を癌患者に投与することを含む、細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する炎症関連疾患の予防又は治療方法」が挙げられる。本発明の1つの態様として、「細胞接着活性を有するペリオスチンに対する阻害用医薬組成物製造のためのペリオスチン抗体の使用」、「細胞接着活性を有するペリオスチンが関与する炎症関連疾患の予防又は治療用医薬組成物製造のためのペリオスチン抗体の使用」が挙げられる。前記抗ペリオスチン抗体としては、上述の抗体、抗体断片及び／又は抗体の誘導体が挙げられる。炎症関連疾患としては、上述の炎症関連疾患が挙げられる。

30

【実施例】

【0094】

次に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではなく、本発明の技術的思想内で当分野において通常の知識を有する者により、多くの変形が可能である。

【0095】

〔製造例1〕 サブトラクション法によるペリオスチンの検索

1-1 心不全病態モデルラットの作製及び左心室サンプルの採取

雄性ダール食塩感受性ラット（Dahl-S）（清水実験材料）を6週齢より8%高食塩含有食で飼育し、心肥大期（11週齢）及び心不全期（14週齢）に各3匹の左心室を採取した。

40

【0096】

1-2 mRNAの調製

総RNAは上記左心室約500mgからISOGEN（ニッポンジーン社）を用いて説明書に記載の方法にしたがって調整した。次に、心肥大期、心不全期それぞれ3匹分を合わせた総RNA約400μgよりFast Track 2.0 Kit（インビトロジェン社）を用いて説明書に記載の方法にしたがってmRNAを精製し、それぞれ約3μgのmRNAを回収した。

【0097】

1-3 cDNAサブトラクション

50

cDNAサブトラクションは、PCR-Select cDNA subtraction kit (クローンテック社) により、説明書に記載の方法にしたがって行った。すなわち、上記1-2で得られたmRNAそれぞれ2 µgよりcDNAを合成し、制限酵素RsaIで消化した。次に、14週齢から合成されたcDNAをテスターcDNA、11週齢から合成されたcDNAをドライバーcDNAとし、テスターcDNAにkit添付の2種類のアダプターを別々に連結させた後、サブトラクトハイブリダイゼーションを行った。次に、アダプターに相補的なプライマーを用いてPCRを行い、発現量に違いのあるcDNA断片を特異的に増幅させ、増幅産物1を得た。

【0098】

また、同様のサブトラクションを11週齢から合成されたcDNAをテスターcDNA、14週齢から合成されたcDNAをドライバーcDNAとして行い、得られた増幅産物を増幅産物2とした。

【0099】

1-4 ドットプロットスクリーニング

A. ドットプロットの作製

増幅産物1をPCR IIベクター (インビトロジェン社) にTAクローニングし、挿入断片の入ったクローンを選択した。各クローンの挿入断片を増幅したPCR反応後、それぞれ1 µLを熱処理後、2枚のナイロンメンブレンフィルター (ベーリンガー社) にドットプロットし、UVクロスリンカー (ストラタジーン社) により固定した。

【0100】

B. cDNAプローブの作製

増幅産物1を制限酵素RsaI及びEaeI、SmaIで消化し、アダプターを除去し、DIGハイプライムDNAラベリング/検出キットII (ベーリンガー社) を用いて説明書に記載の方法に従ってDIG-dUTPでランダムプライム標識を行い、cDNAプローブ1を作製した。同様に、増幅産物2を用いてcDNAプローブ2を作製した。

【0101】

C. スクリーニング

上記Aで作製したドットプロットメンブレンの1枚をcDNAプローブ1、他の1枚をcDNAプローブ2とハイブリダイゼーションを行った。具体的には、ベーリンガー社のDIGハイプライムDNAラベリング/検出キットIIを用いて、説明書に記載の方法にしたがい、ハイブリダイゼーション液 (DIGイージーハイブ (DIG Easy Hyb) 液) 中42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。2×SSC、0.1% SDSで室温にて5分間2回、0.1×SSC、0.1% SDSで68℃にて15分間2回洗浄した後、キットに添付のブロッキングバッファー中でアルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体と反応後、化学発光基質 (CSPD ready-to-use) を加えて化学発光を進行させ、X線フィルムを露光させた。cDNAプローブ1でのシグナルがcDNAプローブ2でのシグナルより強いクローンをポジティブクローンとして選択し、塩基配列の決定を行った。

【0102】

1-5 塩基配列の決定

塩基配列は、ダイターミネーターシーケンシングキット (商品名: THERMO SequenaseTM II dye terminator cycle sequencing kit、アマシャムファルマシア社) を用いて自動DNA配列読み取り装置モデル373A (PE Applied Biosystems社) で解析することにより決定した。得られた遺伝子配列をGenBankのデータベースに照会した結果、クローンの1つ (SF014) がマウスペリオスチン (GenBank Accession No. D13664) と86%ホモロジーのある遺伝子であることが判明した。

【0103】

[製造例2] ラットペリオスチン-1のcDNAのクローニング

ラットペリオスチンcDNAの単離はλgt IIベクターに挿入されたrat ao

10

20

30

40

50

rat a cDNA library (クローンテック社) より作製した約4000クロンのファージサブプール10個 (計約4万クロン) をSF014の塩基配列を基に設計したプライマー (1) 5'-GTTCAATTGAAGGTGGCGATGGTC-3' (配列番号23)、(2) 5'-GAGATAAAATCCCTGCATGGTCCCT-3' (配列番号24) を用いてPCRスクリーニングを行い、3個のポジティブなサブプールを得た。そのうち1個のサブプールを上記PCRによって増幅された断片をAlkPhos DirectTM (アマシャムファルマシア社) を用いてアルカリフォスファターゼ標識したプローブを用いてハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行い、1個のポジティブクローンラットペリオスチン#1を得た。その挿入断片をpBluescript II (ストラタジーン社) のEcoRI部位に組み込み、製造例1の1-5の方法に従って全塩基配列を決定した。

10

【0104】

得られたクロンの長さは約3kbであり、マウスペリオスチン (GenBank Accession No. D13664) の292番から3'-末端までに相当するものであり、5'-末端が欠けたクローンであることが示唆された。

【0105】

ここで、SMART RACE cDNA増幅キット (商品名: SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit、クローンテック社) を用いて説明書に記載の方法にしたがって、rat aorta cDNAを鋳型として、上記プライマー (2) 5'-GAGATAAAATCCCTGCATGGTCCCT-3' (配列番号24) とラットペリオスチン#1の塩基配列を基に設計したプライマー (3) 5'-CACGGGTCGATGACATGGACAACACC-3' (配列番号25) を用いて5'-RACE反応を行った。得られたPCR産物をインビトロジェン社のPCR IIベクターにTAクローニングし、ラットペリオスチン5'-RACE #1と命名した。塩基配列を製造例1の1-5の方法にしたがって決定した。

20

【0106】

その結果、ラットペリオスチン5'-RACE #1は最初に得られたラットペリオスチン#1より5'方向に約300bp長いクローンであり、5'-末端はマウスペリオスチン (GenBank Accession No. D13664) の5'-末端より15bp長いクローンであった。さらにラットペリオスチン5'-RACE #1の塩基配列を基に設計したプライマー (4) 5'-ACGGAGCTCAGGGCTGAAGATG-3' (配列番号26) と上記プライマー (3) 5'-CACGGGTCGATGACATGGACAACACC-3' (配列番号25) を用いて上記rat aorta cDNA libraryより作製した約4万クロンのファージサブプール10個 (計約40万クロン) をPCRスクリーニングすることにより2個のポジティブなサブプールを得た。そのうち1個のサブプールを上記PCRによって増幅される断片をプローブとしてハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行い1個のポジティブクローンを得、ラットペリオスチン#2と命名した。挿入断片をpBluescript II (ストラタジーン社) のEcoRI部位に組み込み、塩基配列を製造例1の1-5の方法にしたがって決定した。

30

40

【0107】

得られたクロンの長さは約2.6kbであり、5'-末端は5'-RACEで得られたクローンと同一であったが、3'-末端はマウスペリオスチン (GenBank Accession No. D13664) の2410番までに相当するクローンであった。また、先に得られたラットペリオスチン5'-RACE #1の塩基配列とラットペリオスチン#2の相当する領域の塩基配列は全く同一であった。ラットペリオスチン#1とラットペリオスチン#2よりラットペリオスチンcDNAの完全長を完成させた。この完全長cDNAの塩基配列を配列番号2に示し、この塩基配列より翻訳されるアミノ酸配列を配列番号1に示す。

【0108】

50

〔製造例 3〕 ラットペリオスチン-2 及び 4 の cDNA のクローニング

製造例 1 で使用したダールラットの心肥大期の cDNA と、製造例 2 でクローニングした遺伝子配列を元にプライマー 5' -AAGCTAGCGAAGATGGTTCTCTCTCCTGCCCT-3' (配列番号 27)、プライマー 5' -CTTTGGGTTTTTCAGCCTC-3' (配列番号 28) を用いて PCR を行い、得られた PCR 産物をインビトロジェン社の PCR4 Blunt TOPO ベクターに TA クローニングした。得られたコロニーを 96 穴プレートに 1 コロニー/穴ずつ 96 コロニーを選び、プライマー 5' -CCCCATGACTGTCTATAGACCT-3' (配列番号 29)、プライマー 5' -ATTTCCCTTAAAAATCAGATTG-3' (配列番号 30) を用いてラットペリオスチン-2 及び 4 遺伝子の候補を選別した後に、遺伝子配列を決定し PCR エラーの無いクローンを選別した。

10

【0109】

〔製造例 4〕 バキュロウイルス用発現ベクターの構築

製造例 3 で得られたプラスミド pCR4 Blunt TOPO/ラットペリオスチン-2、-4 を、制限酵素 Spe I 及び Not I で消化し、ラットペリオスチン-2、-4 断片を切り出した。これを、pFastBacHTc (インビトロジェン社) を制限酵素 pe I 及び Not I で消化して得られたベクター断片に、ライゲーションキット (宝酒造 (株)) を用いて連結し、得られた発現ベクターを pFastBac/ラットペリオスチン-2、-4 と命名した。挿入部分の塩基配列は製造例 1 の 1-5 に記載の方法により確認した。

20

【0110】

〔製造例 5〕 組換えバキュロウイルスの調製及び培養

エシエリキア コリ (*Escherichia coli*) の DH10BAC 細胞を、製造例 4 で得られた pFastBac/ラットペリオスチン-2、-4 で形質転換し、組換えバキュロウイルスを調製した。得られたバキュロウイルスは、電気泳動及び PCR により、目的のものが挿入されていることを確認した。

【0111】

この組換えバキュロウイルスを MOI = 0.1 にて感染させた昆虫 Sf9 細胞 (2×10^6 cells/mL) を、無血清培地 (Sf-900 II SFM (インビトロジェン社製) 2000 mL 中にゲンタマイシンを $50 \mu\text{g/mL}$ の濃度になるように添加) 中、 28°C で 4~5 日培養した後、培養上清を回収した。

30

【0112】

〔製造例 6〕 ラットペリオスチンタンパク質の精製

製造例 5 で得られた培養上清 2000 mL を平衡化バッファー (50 mM 酢酸ナトリウムバッファー pH 6.0、 0.1 M 塩化ナトリウム) で平衡化した SP Sepharose Fast Flow 10 mL bed に供し、得られた Flow Through (通過分画) を SP セファロース通過分画とした。

【0113】

平衡化バッファーで 280 nm の吸光度が 0 付近になるまで (100 mL) 洗浄し、SP セファロース洗浄分画とした。

40

【0114】

溶出バッファー (50 mM リン酸 2 水素ナトリウム (pH 8.0)、 0.5 M 塩化ナトリウム、 5 mM イミダゾール) 100 mL で溶出し、SP セファロース溶出分画とした。次に、 100 mL の SP セファロース溶出分画を、 50 mM リン酸ナトリウムバッファー pH 8.0、 0.5 M 塩化ナトリウム及び 5 mM イミダゾールで平衡化した Ni-NTA agarose 5 mL bed に供し、得られた通過分画を Ni-NTA アガロース通過分画とした。

【0115】

洗浄バッファー (50 mL リン酸 2 水素ナトリウム pH 8.0、 0.5 M 塩化ナトリウム、 5 mM イミダゾール) 約 50 mL で洗浄し、Ni-NTA アガロース洗浄分画と

50

した。

【0116】

溶出バッファーは以下の通り（（1）50mMリン酸2水素ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム、20mMイミダゾール、以降イミダゾール量が（2）30mM、（3）40mM、（4）50mM、（5）60mM）とし、それぞれ約25mLで溶出し、Ni-NTAアガロース溶出分画（1）～（5）とした。

【0117】

ウエスタンブロット法により目的タンパクが含まれることが確認された分画を、1mL以下に濃縮した。

【0118】

次に、脱気したPBS（-）（137mM NaCl、8.1mM Na₂HPO₄、2.68mM KCl、1.47mM KH₂PO₄）で平衡化したゲルろ過カラム（Sephacryl S-200HR Φ11mm×95cm；容量：90bed）に上記濃縮試料を供し、PBS（-）で溶出し、凍結乾燥することにより、ラットペリオスチン精製タンパク質を得た。

【0119】

〔実施例1〕 in vitroにおけるラットPN-2及びPN-4タンパク質の細胞接着活性の有無の検討

細胞培養用96穴マルチウェルプレートに10μg/ml フィブロネクチン、100μg/ml BSA、10μg/ml PN-2タンパク質、10μg/ml PN-4タンパク質をそれぞれ添加し4℃にて一晚コーティングした。タンパク質液を除去したウェルに、DMEM（10% BSA、PC/SM）に懸濁したラット胎仔心臓由来線維芽細胞10⁴ cells/ウェルを加え、37℃インキュベーターにて3時間培養した。細胞の接着量測定は、培養上清を除去した後、2.5%グルタルアルデヒドにて30分間固定し、0.02%クリスタルバイオレットにて染色した後プレートリーダー（BIO-RAD、Model 680 マイクロプレートリーダー）にてOD 550nmの吸光度を測定した。バックグラウンドとして、無処理のウェルを染色したものを扱い、その吸光度値にて補正した値を比較した。データの解析はFisherのPLSD検定により行った（図2）。その結果、陽性コントロールであるフィブロネクチン（図中、FNで表示）では細胞が接着し、陰性コントロールであるBSAでは細胞が接着しなかった。また、各タンパク質をコートしなかったウェルでも細胞接着が観察されたが、陽性コントロールであるフィブロネクチンほどの接着量は観察されなかった。一方、ラットPN-2タンパク質を添加した群では細胞の接着がフィブロネクチンと同程度以上に認められたのに対し、ラットPN-4タンパク質を添加した群では、コートしなかったウェルと同程度の接着活性しかないことが明らかとなった。

【0120】

〔実施例2〕 ラットExon-21ペプチド鎖の合成及びポリクローナル抗体の作製

実施例1に示したように、ラットPN-2タンパク質に比べラットPN-4タンパク質には細胞接着作用が弱いことが明らかとなったことを受け、ラットPN-2タンパク質に特異的な構造は、それぞれの配列比較からExon-21配列であると同定した。このExon-21を構成するアミノ酸配列のN末端にCys残基を付加したペプチドを、純度80%以上にて10mg、化学合成した。キャリアタンパク質としてKLH6mgを結合させたものをウサギ（Kb1：JW）に免疫させた。免疫（投与）には、初回免疫にはFCA（フロイント完全アジュバント）を使用し、2次免疫以降はFIA（フロイント不完全アジュバント）を使用した。また、投与部位は背部皮下20ヶ所、投与した週は、初回投与後、2、4、6週後、投与量は初回免疫では800μgペプチド/匹、2次免疫以降では400μgペプチド/匹にて免疫した。抗体力価はELISA法にて測定し、投与開始から7週目に全血清を集めた。その後、合成ペプチドを用いたアフィニティークラムを作製し、Exon-21ペプチドに特異的に反応する抗体のみを回収した。上記の、ラットペリオスチンのExon-21がコードするペプチドに対するポリクローナル抗体を

10

20

30

40

50

、抗ラットExon-21ポリクローナル抗体と称する。

【0121】

【実施例3】ラットペリオスチンタンパク質(PN-2)との結合性の確認

実施例2で得られたポリクローナル抗体2種(No. 1及びNo. 3)について、ラットペリオスチンタンパク質(PN-2)との結合性について、ドットブロット法にて確認した。すなわち、製造例6で得られた精製タンパク質(30 µg/ml)を5 µlずつHybond-ECLニトロセルロースメンブレン(GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)にスポットし、TBS溶液(10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl)で1回洗浄した。ブロッキングバッファー(ブロックエース、雪印乳業株式会社製)を加えて、室温で1時間振盪した。メンブレンにモノクローナル抗体(一次抗体)の1 µg/ml濃度溶液を加えて3時間振盪した後、TBS溶液で10分間振盪洗浄を4回行った。メンブレンにHRP標識抗ラビットIgG抗体(プロメガ社製)(二次抗体)の0.4 µg/ml濃度溶液を加えて室温にて1時間振盪した後、メンブレンをTBS溶液で10分間振盪洗浄を4回行った。検出用試薬(ECL plus western blotting detection system、GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製)を加えて1分間反応させ、化学発光法により検出した。その結果、得られたポリクローナル抗体2種はラットペリオスチンPN-2とも結合することが確認された。

【0122】

【実施例4】in vitroにおける抗ラットExon-21ポリクローナル抗体の中和活性の検討

細胞培養用96穴マルチウェルプレートにDB1Xラット由来血管平滑筋細胞A7r5細胞(Cat. No. 09-1444、大日本住友製薬)を0.5~1×10⁴ cells/ウェル播き、サブコンフルエントまで培養し、その後Serum(-)にした培地に交換した。次に、THP-1細胞(Human acute monocytic leukemia Cat. No. 06-202、大日本住友製薬)を蛍光標識するために、THP-1細胞を2 nMのBCECF-AM((株)同仁科学研究所BCECF-AM special packaging cat. No. B221)を添加し、30分間インキュベート後、遠心してPBS(-)で2回洗浄した。次に、蛍光標識したTHP-1細胞の接着量を測定するために1×10⁴ cells/ウェルと予め抗ラットExon-21ポリクローナル抗体(ex21PoAb)または、ラビット・コントロールIgG抗体(rIgG)とPN-2タンパク質を混合し、室温で1時間反応させた溶液を加えた。コントロールとして、(1)ファイブロネクチンのみ、(2)PN-2のみ、(3)PN-2+ラビット・コントロールIgG抗体(rIgG)、(5)THP-1のみを用い、各々6時間インキュベートした。その後、各ウェルにRPMI 1640培地をゆっくりと添加して完全に満たした後、空気が入らないようにパラフィルムで覆い、裏返して更に30分間インキュベートした。その後、ゆっくりと取り外し、培地を吸引した後PBS(-)で3回洗浄し、プレートリーダー(Wallac 1420 ARVOMx/light (Perkin-Elmer))で細胞接着量を励起波長485 nm/蛍光波長535 nmにて蛍光強度測定にて計測した。その結果、図3(A)及び(B)に示されるように、(1)ファイブロネクチンのみ、(2)PN-2のみ、(3)PN-2+ラビット・コントロールIgG抗体(rIgG)の群では細胞の接着が認められたのに対し、(4)抗ラットExon-21ポリクローナル抗体(ex21PoAb)を処理した群では、(5)THP-1のみのように、接着が認められなかったことから、抗ラットExon-21ポリクローナル抗体にはPN-2が持つ細胞接着作用を抑制する、即ち中和活性を有していることが判明した。

【0123】

【実施例5】ヒトペリオスチンのExon-21ペプチド鎖に対するモノクローナル抗体の作製

(1) 抗原の作製

ヒトペリオスチン Exon-21 を構成するアミノ酸配列（配列番号 18）の N 末端に Cys 残基を付加したペプチド（抗原ペプチド；CEVTKVTKFIEGGDGHLEFEDEEIKRLQLQG（配列番号 31））を、Fmoc 法にて化学合成し、純度 90% 以上の抗原ペプチド 10 mg を得た。この抗原ペプチド 5 mg にキャリアタンパク質として KLH（CALBIOCHEM 社製）5 mg を結合させ、抗原溶液を得た。すなわち、KLH を PBS（0.01 M）に溶解して 3.3 mg/mL に調整し、0.2524 mg/mL の MBS 溶液（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）を滴下して室温で 60 分間攪拌し反応させた。ジクロロメタンを用いてフリーの MBS を除き、KLH-MB を得た。この KLH-MB 5 mg と、0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.2）に溶解した抗原ペプチド 5 mg とを混合し、4℃で 12 時間攪拌して反応させ、抗原溶液を得た。

10

【0124】

（2）免疫

6 週齢の BALB/c 雌性マウス 3 匹の両足に、（1）で得られた KLH 結合抗原ペプチド 100 µg を含む抗原溶液 50 µl と、FCA（フロイント完全アジュバント）50 µl との混合乳濁液全量を皮下注射した。その後 2 週間間隔で 2 回、用時調製した上記抗原溶液と FIA（フロイント不完全アジュバント）との混合乳濁液を両足に投与した。その後、そのマウスを頸椎脱臼により致死させ、無菌的に足部リンパ節を採取した。

【0125】

RPMI 培地（コージンバイオ株式会社製）を供給しながら上記リンパ節を破碎し、孔径約 10 µm のメッシュを通過させて RPMI 培地に懸濁状態のリンパ節細胞を得た。これを 1000 rpm、10 分間の遠心分離にかけて、リンパ節細胞を沈殿画分として得た。この沈殿画分に、0.84% の塩化アンモニウム溶液に 20 mM の HEPES 緩衝液（pH 7.4）を加えた溶液 1 ml を入れて溶血させ、赤血球を除いた後、1,000 rpm、5 分間の遠心分離にかけた。得られた沈殿画分（細胞画分）を RPMI 培地で数回洗浄し、細胞融合に用いた。

20

【0126】

（3）ミエローマ細胞の調製

8-アザグアニン耐性でかつイムノグロブリン非分泌型のマウスミエローマ細胞株 P3X63Ag8U.1（P3U1 株）を、20% のウシ胎児血清（FCS）を含む RPMI 培地で、10% CO₂・37℃インキュベーター内で培養し、対数増殖期にある細胞を集め、1,000 rpm、5 分間の遠心分離にかけて沈殿画分として細胞のみを取得し、RPMI 培地に懸濁させた。

30

【0127】

（4）細胞の融合

（2）で得た免疫化リンパ節細胞 $1 \times 10^8 \sim 3 \times 10^8$ 個を含む RPMI 培地と、（3）で得たミエローマ細胞 10^8 個を含む RPMI 培地とを混合した後、1,000 rpm、10 分間の遠心分離にかけた。上清を静かに除いて沈殿画分として細胞を取得し、これに 25%（w/v）のポリエチレングリコール 1500（PEG 1500、ベリンガー社製）1 ml を加えた後、更に RPMI 培地をゆっくりと加えて総量を 10 ml とした。これに 20% FCS を含む RPMI 培地 10 ml を加えて、少し静置させた後、1,000 rpm、5 分間の遠心分離にかけ、得られた沈殿画分（細胞画分）に 20% FCS を含む RPMI 培地を加えて細胞濃度が 10^6 個/mL になるように調整した細胞懸濁液を、コーニング社製の 96 穴培養プレートに 200 µL/ウェルずつ分注した。5% CO₂・37℃インキュベーター中で 24 時間培養後、HAT 溶液（インビトロジェン社製）を添加した後、更に 2 週間培養した。

40

【0128】

（5）ELISA 法によるスクリーニング

培養上清が抗原ペプチドと反応する陽性ウェルのスクリーニングを行った。アッセイ用の抗原溶液には、（1）で得られた抗原ペプチド 2 mg に、キャリアタンパク質として

50

卵白アルブミン (O V A) を結合させたコンジュゲートを用いた。

96穴マイクロタイタープレート (ファルコン353912) の各ウェルを、上記コンジュゲート $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で 4°C 下一夜静置してコーティングした。このプレートを洗浄後、(4) の培養上清 (モノクローナル抗体を含む) $50 \mu\text{l}$ を各ウェルに滴下し、 37°C のインキュベーター内で2時間放置した後、PBS (ー) (リン酸緩衝液) で洗浄した。これにアルカリフォスターゼ結合ヒツジ抗マウス Ig G 抗体 (Z y m e d 社製) を加え、 37°C インキュベーターで1時間放置し、PBS (ー) で洗浄後、発色基質剤 (A L P) を加えて20分間発色させ、プレートリーダー (B I O - R A D、 M o d e l 680 M I C R O P L A T E R E A D E R) で各ウェルのOD490nmの吸光度 (抗体価) を測定し、抗原ペプチドとの反応性を確認し、培養上清が抗原ペプチドと反応する陽性ウェルを決定した。

【0129】

(6) 抗体産生細胞のクローニング

(5) のE L I S A法で抗原ペプチドとの反応性が確認された陽性ウェル内の細胞から、限界希釈法により、抗体産生細胞株のクローニングを行った。すなわち、陽性ウェル内の細胞を96穴培養プレートの各ウェルに撒き込み、 $5\% \text{CO}_2 \cdot 37^\circ\text{C}$ インキュベーター内で2週間培養した。各ウェルの培養上清について、(5) の方法と同様に、E L I S A法にて、抗原ペプチドとの反応性を確認し、陽性ウェルについて、再度、限界希釈法によるクローニングを行い、抗原ペプチドとの反応性が高く、細胞コロニーの発育が良好な30個の細胞を得た。これら細胞を24穴培養プレートに移し、 $5\% \text{CO}_2 \cdot 37^\circ\text{C}$ インキュベーター内で2週間培養した。培養上清について、再び、(5) の方法と同様に、E L I S A法にて、抗原ペプチドとの反応性 (抗体価) を確認した。OD490nmの吸光度が高かった2ウェル内の細胞、すなわち2個のハイブリドーマ細胞株 (N o . 8 及び N o . 10) を、抗体産生細胞として有用であると判断し、選別した。

【0130】

このようにして得た抗体産生細胞は、本発明抗体である抗ヒトE x o n - 21モノクローナル抗体を常時産生するので、この抗体産生細胞を培養した培養液の上清液は、直接、本発明抗体溶液として使用することができる。

【0131】

なお、上記の抗ヒトE x o n - 21モノクローナル抗体を産生する抗体産生細胞株 (ハイブリドーマ) N o . 8 は、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター (N P M D) に国際寄託されている (受託日: 2013年2月26日、受託番号: N I T E B P - 01546、識別の表示: K S - 0259 # 8, 080611 K o h j i n B i o) 。

【0132】

(7) ペリオスチンタンパク質 (P N - 2) との結合性の確認

(6) で得られた抗体産生細胞2個が産生する抗体と、ヒトとマウスのアミノ酸配列はほぼ同じであることから、マウスペリオスチンタンパク質 (P N - 2) との結合性について、ドットブロット法にて確認した。すなわち、マウスP N - 2タンパク質 (R e c o m b i n a n t M o u s e P e r i o s t i n / O S F - 2, R & D S Y S T E M S) ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) を $5 \mu\text{l}$ ずつH y b o n d - E C L ニトロセルロースメンブレン (G E ヘルスケアバイオサイエンス株式会社製) にスポットし、T B S 溶液 (10mM T r i s - H C l (pH8.0)、 150mM N a C l) で1回洗浄した。ブロッキングバッファー (ブロックエース、雪印乳業株式会社製) を加えて、室温で1時間振盪した。メンブレンに(6) で得られたモノクローナル抗体 (一次抗体) の $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度溶液を加えて3時間振盪した後、T B S 溶液で10分間振盪洗浄を4回行った。メンブレンにH R P 標識抗マウス Ig G 抗体 (プロメガ社製) (二次抗体) の $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度溶液を加えて室温にて1時間振盪した後、メンブレンをT B S 溶液で10分間振盪洗浄を4回行った。検出用試薬 (E C L p l u s w e s t e r n b l o t t i n g d e t e c t i o n s y s t e m、G E ヘルスケアバイオサイエンス株式会社製) を加

えて1分間反応させ、化学発光法により検出した。その結果、(6)でクローニングした抗体産生細胞2個全てが、ヒトペリオスチンPN-2と結合することが確認された。

【0133】

(8)モノクローナル抗体の大量調製と精製

BALB/cマウスの腹腔内にプリスタン[2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン(和光純薬製)]0.5mlを投与し、2~3週間飼育した。予め、対数増殖期に維持しておいたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマNo. 8及びNo. 10を回収し、培養上清を除いた沈殿画分の細胞にFCS不含のRPMI培地を加え、細胞数が 1×10^7 個/mlになるように細胞液を調製した。この細胞液を、プリスタン前投与したBALB/cマウスの腹腔中に注入し、3週間後頃から漏出した腹水を腹部より注射器で回収した。採取した腹水を、孔径0.22 μ mφのフィルターを用いて濾過した後、濾液を

10

【0134】

[実施例6] 抗ヒトExon-21モノクローナル抗体のエピトープ解析

Repertoire (ガラススライド上に37種類のペプチドが固定化されたアレイ)を作製し、ヒトペリオスチンExon-21ペプチドに対するモノクローナル抗体(2種)及びラットペリオスチンExon-21ペプチドに対するポリクローナル抗体(2種)のエピトープを同定した。

20

一次抗体として、ポリクローナル抗体はラビットIgG No. 1 (0.51mg/ml), No. 3 (0.62mg/ml)を用い、モノクローナル抗体としてNo. 8 Mouse IgG2b (2.21mg/ml), No. 10 Mouse IgG1 (1.35mg/ml)を用いた。二次抗体はCy5でラベルされたAnti-rabbit-IgG (H+L) (JIR 111-175-144)、Dylight 649でラベルされたAnti-mouse-IgG (Pierce, シャープ35515)を用いた。ペプチドはセルロース膜によって合成した。その後、マイクロリッター・プレートに移し、ペプチド・アレイ用(JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Germany)のナノパイペティング・システムによってガラス表面に撒いた。ペプチドマイクロ・アレイは、ブロッキングバッファー(Pierce International, Superblock TBS, order シャープ37536)にて2時間インキュベートさせた。その後、マイクロアレイハイブリダイゼーションステーション(TECAN HS400 microarray hybridization station)を用いて一次抗体(10 μ g/ml in blocking buffer, total assay volume 200 μ l)またはブロッキングバッファーのみとインキュベートさせた。さらに、TBS-バッファー(50mM TBS-buffer + 0.1% Tween20 (JPT), pH 7.2)にて洗浄した後、蛍光色素をラベルした二次抗体(anti rabbit IgG or anti-mouse-IgG)を、ブロッキングバッファー中の最終濃度1 μ g/mlでインキュベートさせた。3度TBS-バッファーで洗浄させた後にSSC-バッファー(3mM SSC-buffer (JPT), pH 7.0)で洗浄し、nitrogen streamで乾燥させた。最後に、高解度蛍光スキャナー(商品名: GenePix 4200AL, Axon社)を用いて解析を行った。ソフトはGenePix 6.0を用いてスポットを解析した。

30

40

結果として、抗ラットExon-21ポリクローナル抗体からは、配列TKVTK(配列番号21)と配列QGDTPV RK(配列番号22)が確認され、抗ヒトExon-21モノクローナル抗体からは配列VTKVTK(配列番号19)と配列FEDEEIK(配列番号20)を確認した。

【0135】

[実施例7] ラット頸動脈バルーン傷害モデルを用いた抗ラットExon-21ポリクロー

50

ーナル抗体による血管内膜肥厚抑制効果の検討

S Dラットの左総頸動脈に2 F（フレンチ）のF o g a r t yバルーンカテーテルにて搾過して傷害を与え、同時に抗ラットE x o n - 2 1ポリクローナル抗体（e x 2 1 P o A b）又はラビット・コントロールI g G抗体（r I g G）を血管内投与した。内膜傷害モデルを作製後、1日、3日、1週間、2週間、3週間後において5匹ずつ灌流固定後、血管を摘出し、バルーン傷害を与えた頸動脈をサンプル、与えていない側をコントロールとして約1 c m程各々摘出した。摘出した血管のうち約2 ~ 3 m m程度は4 %パラホルムアルデヒドにて固定し、残りから各々 t o t a l R N A を抽出しc D N Aを合成した。固定した組織から切片を作製し、H E（ヘマトキシリン・エオシン）染色を行なった（図4（B））。H E染色された切片全てに対し内膜と中膜の面積をグラフィック解析ソフト（商品名：G r a p h i c c o n v e r t e r v e r . 4 . 0 2）を用いて求めた。また、その面積より内膜／中膜比を算出し内膜肥厚の程度を調べた。図4（A）に示されるように、内膜／中膜比において抗ラットE x o n - 2 1ポリクローナル抗体（e x 2 1 P o A b）投与群とラビット・コントロールI g G抗体（r I g G）群とでは $p = 0 . 0 3 6 2$ の有意差が得られ（ $N = 8$ ）、内膜の肥厚が抑制されていることが示された（図4）。

10

【0136】

〔実施例8〕A p o Eノックアウトマウスを用いた抗ラットE x o n - 2 1ポリクローナル抗体による血管内膜肥厚抑制効果の検討

A p o Eノックアウトマウスの高脂肪食刺激を行い、動脈硬化を誘導するモデルで抗ラットE x o n - 2 1ポリクローナル抗体（e x 2 1 P o A b）又はラビット・コントロールI g G抗体（r I g G）を高脂肪食開始と同時に $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ で1回／週で腹腔内投与した。3か月後に、大動脈を展開後、動脈硬化を血管全体に対するO i l r e d O染色で陽性となった面積比率を動脈硬化度とし、I g Gを投与した場合の動脈硬化度の平均値で割った値を動脈硬化の%変化度と考えて比較した。その結果、抗ラットE x o n - 2 1ポリクローナル抗体（e x 2 1 P o A b）を投与した群はラビット・コントロールI g G抗体（r I g G）を投与した群と比して大動脈の動脈硬化が有意に抑制されていた（ $N = 3$ ）（ $P < 0 . 0 5$ ）（図5）。

20

【0137】

〔実施例9〕マウス大腸炎モデルを用いた抗ヒトE x o n - 2 1モノクローナル抗体による抗炎症効果の検討

マウス大腸炎モデルのクローン病モデルである1 . 7 5 %デキストラン硫酸（D e x t r a n S u l f a t e S o d i u m ; D D S）投与下での抗ヒトE x o n - 2 1モノクローナル抗体（e x 2 1 M o A b）又はマウス・コントロールI g G抗体（m I g G）の効果を検討した。D D S投与と同時に $100 \mu\text{g}/\text{匹}$ で1回／週で各抗体を腹腔内投与した。2週間後に、大腸を摘出し、大腸の長さを測定し比較した。その結果、D D S投与によって大腸の長さはS h a m群と比して有意に縮小したが（ $N = 6$ ）（ $P < 0 . 0 1$ ）、抗ヒトE x o n - 2 1モノクローナル抗体（e x 2 1 M o A b）を投与した群はマウス・コントロールI g G抗体（m I g G）を投与した群やD D Sだけを投与した群と比して有意に大腸長の縮小作用が抑制されていた（ $N = 6$ ）（ $P < 0 . 0 5$ ）（図6）。

30

40

【0138】

〔実施例10〕下肢虚血モデルを用いた抗ラットE x o n - 2 1ポリクローナル抗体による血管新生抑制効果の検討

C 5 7 B L 6 Nの下肢大腿動脈を結紮し、下肢虚血モデルを作製した。抗ラットE x o n - 2 1ポリクローナル抗体（e x 2 1 P o A b）又はラビット・コントロールI g G抗体（r I g G）を結紮3日前より $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ で腹腔内投与（2回／1週）し、0（投与直前）、1、7、14、21、28日後にL a s e r D o p p l e r I m a g e（L D I； M o o r社）を用いて健側、患側の下肢血流を測定し、R e l a t i v e p e r f u s i o n r a t e = 患側／健側を下肢血流の評価として計算し両群を比較検討した。28日後のR e l a t i v e p e r f u s i o n r a t eは、抗ラットE

50

Exon-21 ポリクローナル抗体 (ex21PoAb) がラビット・コントロール IgG 抗体 (rIgG) を投与した群と比して有意に下肢血流が低下していた ($P < 0.05$) (図7)。さらに、マウスの内転筋を摘出し、凍結切片を作製して CD31 抗体で免疫染色し、血管を評価したところ抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体 (ex21PoAb) がラビット・コントロール IgG 抗体 (rIgG) を投与した群と比して有意に単位面積当たりの血管数少なく、有意に血管新生が抑制されていた ($P < 0.01$) ($N = 6$) (図8)。さらに、同様の実験を、抗ヒト Exon-21 モノクローナル抗体 (ex21MoAb) を用いて検討したところ、ポリクローナル抗体と同様に、LDI にて計算した Relative perfusion rate はマウス・コントロール IgG 抗体 (mIgG) を投与した群と比して、有意に血流が低下しており血管新生が抑制されていることが示された (図9)。

10

【0139】

〔実施例11〕 in vitroにおける抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体の管腔形成抑制効果

マトリゲル (Matrigel、BD Bioscience、No. 356231) 中に 4T1 乳癌細胞の上清を加えてさらに、マウス・コントロール IgG 抗体 (mIgG)、抗ヒト Exon-21 モノクローナル抗体 (ex21MoAb)、ラビット・コントロール IgG 抗体 (rIgG)、抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体 (ex21PoAb) をそれぞれ 1/100 の濃度で投与したものを 96 ウェルプレートに 70 μ l /ウェルずつ入れ、30 分インキュベートしゲル化させ、 1.5×10^4 個/ウェルの HUVEC (正常ヒト臍帯静脈内皮細胞) を播種した。5 時間インキュベート後、クリスタルバイオレット溶液で染色、顕微鏡で写真撮影し、管腔の数をカウントした。4T1 乳癌細胞の上清は血管新生作用を有しており、抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体及び抗ヒト Exon-21 モノクローナル抗体はその血管新生作用を有意に抑制した ($P < 0.05$) (図10 (A)、(B))。次に、PN-2 タンパク質を各種濃度で加えたものを同様に処置し評価したところ 5 μ g/ml 以上の濃度では濃度依存的に PN-2 タンパク質が有意に管腔形成を誘導し、血管新生作用があることが示された ($P < 0.05$) (図11 (A)、(B))。このことから、抗 Exon-21 抗体は、血管新生抑制作用を有していることが示された。また、PN-2 タンパク質の血管新生作用も示された。

20

【0140】

〔実施例12〕 in vitroにおける抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体の細胞増殖に与える影響の検討

細胞培養用 96 穴マルチウェルプレートにマウス 4T1 乳癌細胞 10^5 個/ウェル in DMEM (serum free, PC/SM) を添加し、37℃インキュベーターにて一晚培養した。培養上清を除去した後、抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体 (ex21PoAb) 及びラビット・コントロール IgG 抗体 (rIgG) 各々 200 μ g/ml を 1 μ g/ml の終濃度になるように添加した DMEM (serum free, PC/SM) 培地を加えて、再度一晚培養した。翌日、全てのウェルの培地を DMEM (10% BSA, PC/SM) に交換し、細胞増殖試験キット (商品名: Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit、プロメガ) を用いて、Cell Titer 液を 100 μ l の培地に対し 20 μ l ずつ加え、37℃で 1 時間培養した。その後、490nm のプレートリーダー (BIO-RAD、Model 680 MICRO PLATE READER) を用いて細胞の染色度を測定した (図12 (A))。その結果、抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体 (ex21PoAb) は、高濃度にてラビット・コントロール IgG 抗体 (rIgG) と比して細胞増殖を抑制する活性を有した抗体であることが判明した ($P < 0.05$)。

40

【0141】

さらに、抗ヒト Exon-21 モノクローナル抗体によるマウス 4T1 乳癌細胞への細胞障害性の有無を検討した。細胞培養用 96 穴マルチウェルプレートにマウス F4T1 乳

50

癌細胞 1×10^4 個/ウェル in DMEM (serum free, PC/SM) を添加し、 37°C インキュベーターにて一晩培養した。培養上清を除去した後、抗ヒト Exon-21 モノクローナル抗体 (ex21MoAb) 及びマウス・コントロール IgG 抗体 (mIgG) 各々 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の終濃度になるように添加した DMEM (serum free, PC/SM) 培地を加えて、6 時間培養した。培養液の上清をとり乳酸脱水素酵素 (LDH) を ELISA 法で測定した。測定には、細胞障害測定キット (商品名: LDH Cytotoxicity Detection Kit、タカラバイオ株式会社) を使用した。LDH は細胞質に存在する酵素であり、通常は細胞膜を透過しないが細胞膜が障害を受けると細胞外、すなわち、培地中に放出され細胞障害性の指標となり得る。上清を 490 nm のプレートリーダー (BIO-RAD、Model 680 MICRO PLATE READER) を用いて測定した。その結果、抗ヒト Exon-21 モノクローナル抗体 (ex21MoAb) は、高濃度にてマウス・コントロール IgG 抗体 (mIgG) と比して有意に細胞増殖を抑制する活性を有した抗体であることが判明した ($P < 0.01$) (図 12 (B))。

10

【0142】

[実施例 13] マウス 4T1 乳癌細胞肺転移モデルマウスを用いた抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体の効果

マウス 4T1 細胞 (ATCC) を 10% 牛血清アルブミン (FBS) (Biowest)、Penicillin-streptomycin Mixed solution (ナカライテスク)、含有 RPMI 1640 (Gibco) を用いて 10 cm^2 Tissue Culture Dishes (Greiner) に播種し、 37°C インキュベーターにて 24 時間培養した。その後、培養上清を除去し、PBS にて洗浄した後にトリプシン/EDTA により浮遊させた。細胞を回収し 1500 rpm 、3 分間遠心した後、 1.5×10^5 個の細胞を継代し 37°C インキュベーターにて 72 時間培養後、対数増殖期にある細胞を 1×10^6 個/匹になるようにカウントし $100 \mu\text{l}$ の PBS に懸濁した。調製した細胞は、29G マイジェクター注射針付インスリン用シリンジ (TERMO) を用いマウス BALB/c メス 8 週齢の足底部に注入し、肺転移モデルマウスを作製した。また、29G マイジェクター注射針付インスリン用シリンジにて、抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体 (ex21PoAb) とラビット・コントロール IgG 抗体 (rIgG) の各抗体 $100 \mu\text{g}/\text{匹}/\text{週}$ を腹腔内投与した。抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体 (ex21PoAb) ($1 \text{ mg}/\text{ml}$) を用いた実験では、細胞注射と同時に抗体を投与し、さらに細胞注射を行なった 1 週間後と 2 週間後に抗体を投与した。ラビット・コントロール IgG 抗体 (rIgG) として Normal Rabbit IgG (R&D Systems) を用いた。細胞注射を行なった後、下肢腫大部の径をノギスにて計測し、原発巣の体積を評価した。評価方法は Dethlefsen LA. et al. J. Natl. Cancer Inst., 40, 389 (1968) に記載方法に従い、(足裏の長さ) $\times$ (足裏の幅) $\div 2$ にて求めた。細胞注射後 3 週目に剖検を行い、体重測定、原発巣から肺への転移の有無と肺への転移コロニー数のカウントを行なった。それぞれ、Student の t 検定によりデータ解析を行なった。3 週間後の下肢の原発巣の体積は抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体 (ex21PoAb) 投与によって有意に縮小されていた ($P < 0.05$) (図 13 (A))。また、細胞注射から 5 週間後の肺への転移コロニー数を比較したところ、抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体 (ex21PoAb) 投与によって有意にコロニー数が減少していた ($P < 0.05$) (図 13 (B))。同様の実験を抗ヒト Exon-21 モノクローナル抗体 (ex21MoAb) でも検討し、同様にマウス・コントロール IgG 抗体 (mIgG) 又は PBS (-) 投与群と比して有意に、肺転移コロニー数の減少を示した (図 14)。これにより、抗 Exon-21 抗体による、4T1 乳癌細胞への原発巣及び、転移巣の抑制作用が示された。

20

30

40

【0143】

[実施例 14] マウス B16F10 メラノーマ細胞肺転移モデルマウスを用いた抗ラット Exon-21 ポリクローナル抗体の効果

50

マウスB16F10メラノーマ細胞（マウス悪性黒色腫細胞株B16F10細胞）を37℃インキュベーターにて培養し、PBSで洗浄した後、トリプシン／EDTAにて細胞を浮遊させ回収した。その後1500rpm、3分間遠心を行い回収した細胞を 5×10^5 個／匹になるようにカウントし100μlのPBSに懸濁した。調製した細胞は、29GマイJECTA注射針付インスリン用シリンジ（TERMO）を用いマウスC57BL／6Nオス8週齢の足底部に注入し、肺転移モデルマウスを作製した。29GマイJECTA注射針付インスリン用シリンジにて、抗ラットExon-21ポリクローナル抗体（ex21PoAb）とラビット・コントロールのIgG抗体（rIgG）の各抗体100μg／匹／週を投与した。コントロールはNormal Rabbit IgG（R&D Systems）を用いた。

10

次に、臨床に近い形を再現するためマウスB16F10メラノーマ細胞を接種後1週間してから抗ラットExon-21ポリクローナル抗体（ex21PoAb）（1mg／ml）または、コントロールとしてラビット・コントロールのIgG抗体（rIgG）（1mg／ml）100μg／匹／週を投与した。原発巣に関してはノギスを用いて計測し原発巣の体積を評価した。評価方法は、Dethlefsen LA. et al. J. Natl. Cancer Inst., 40, 389 (1968)に記載方法に従い、（足裏の長さ）×（足裏の幅） $\div 2$ にて求めた。細胞注射後、3週間で抗ラットExon-21ポリクローナル抗体投与によってラビット・コントロールIgG抗体（rIgG）を投与したものと比して有意に原発巣の増殖を抑制した（ $P < 0.05$ ）（図15（A））。肺転移コロニー数に関しては、目視にて計測し比較検討した。その結果、細胞注射から5週間後、抗ラットExon-21ポリクローナル抗体（ex21PoAb）投与によってラビット・コントロールIgG抗体（rIgG）を投与したものと比して有意に肺転移を抑制した（ $P < 0.05$ ）（図15（B））。また、肺への転移コロニー数はMann-Whitney検定によりデータ解析を行なった。

20

【0144】

〔実施例15〕動脈瘤モデルマウスを用いた抗ヒトExon-21モノクローナル抗体の効果

老齢（生後6ヶ月以上）のApoEノックアウトマウスを用いた。Angiotensin IIを生理食塩水に溶解した。Angiotensin II（シグマアルドリッチ・A9525）を浸透圧による持続投与ポンプ（Alzet・室町機械・Model 2004）に充填した。投与量は1,000ng／kg／dayに設定した。調製した浸透圧ポンプは一昼夜生理食塩水中にてプライミング処置を行った。イソフルラン気化液を濃度2％・流量1L／minでマウスに吸入させ十分な鎮静を得たことを確認し、マウスを伏臥位で保持した。頸部皮膚を70％エタノール溶液で消毒し、小切開を加えた。切開部位より剪刀をマウス皮下に挿入して皮膚を剥離し、ポンプ留置スペースを確保したうえで、浸透圧ポンプをマウス皮下に留置した。留置後は小動物手術用ステープル（Fine Science Tools・室町機械・Model 12040-01）で閉創した。

30

0週よりマウス・コントロールIgG抗体（mIgG、100μg／匹）または抗ヒトExon-21モノクローナル抗体（ex21MoAb；100μg／匹）を1回／週で腹腔内投与した。4週間後に超音波装置（東芝ネディカルシステムズ Aplio XV）で大動脈の直径を計測した。その結果、抗ヒトExon-21モノクローナル抗体（ex21MoAb）は有意に大動脈径の拡大を抑制することを確認した（図16）。

40

【産業上の利用可能性】

【0145】

細胞接着活性を有するペリオスチンに対する抗体を用いることにより、癌を含む炎症関連疾患の予防及び治療を行うことができる。また、前記抗体を用いて患者サンプル中の該ペリオスチン量を測定することにより、癌の有無及び病状の進行程度を知ることができる。

【受託番号】

50

【0146】

微生物の表示

識別の表示：KS-0259#8, 080611 Kohjin Bio

受託番号：NITE BP-01546

受託日

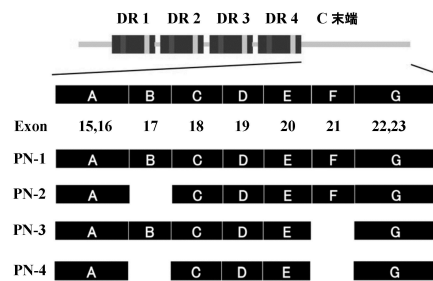
2013年2月26日

国際寄託当局

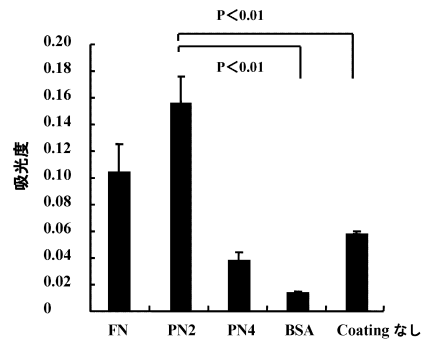
名称：独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター

住所：〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室

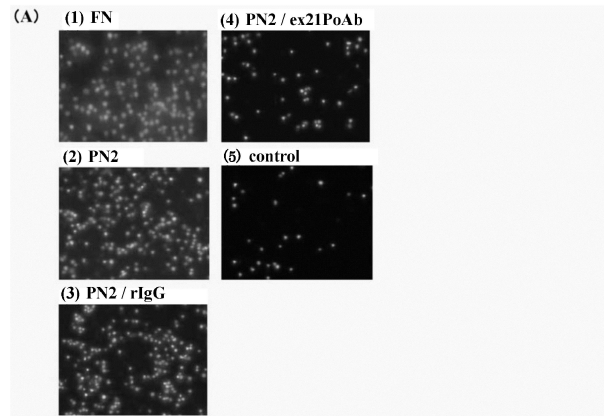
【図1】



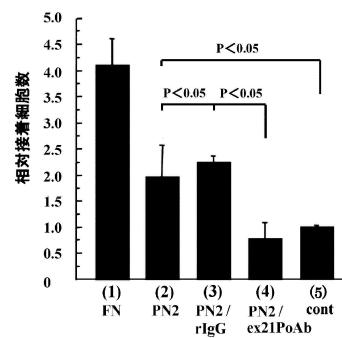
【図2】



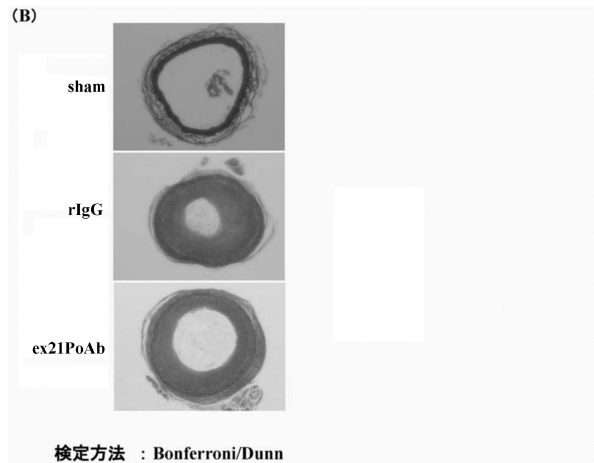
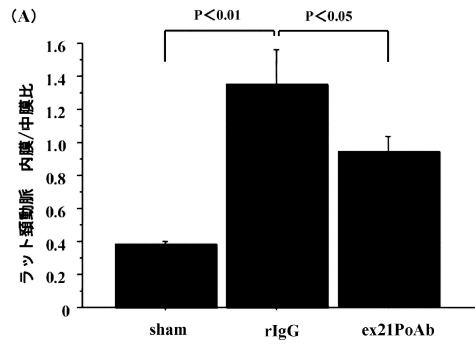
【図3】



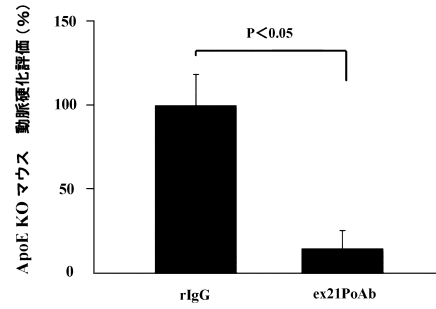
(B)



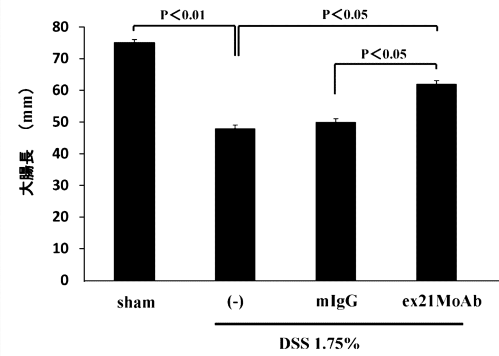
【図 4】



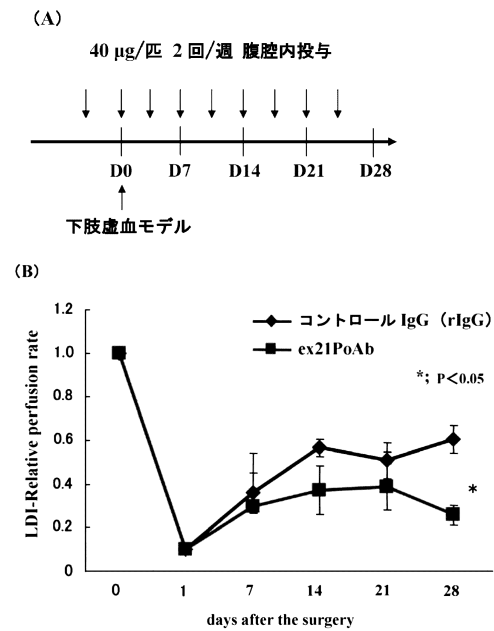
【図 5】



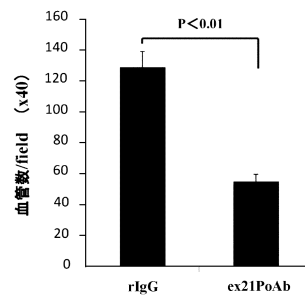
【図 6】



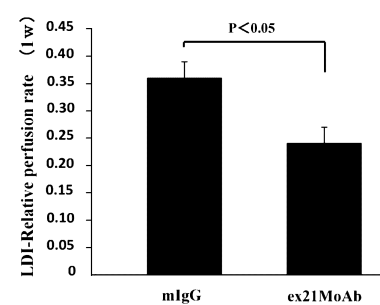
【図 7】



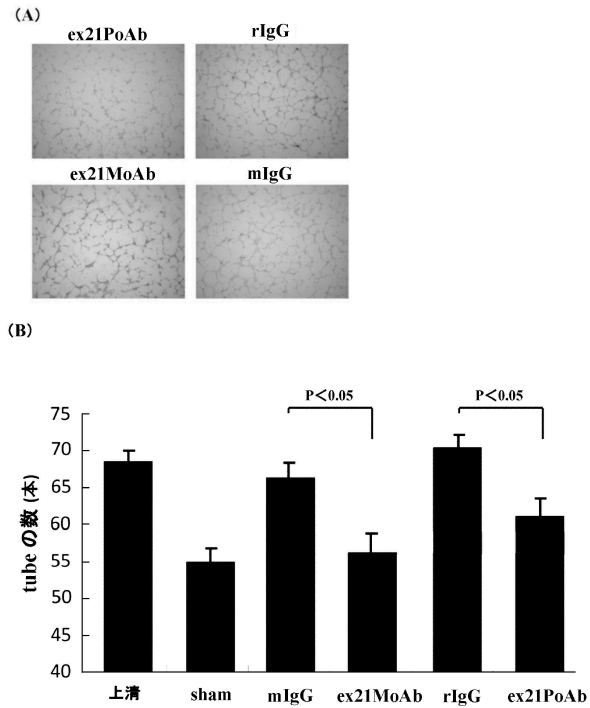
【図 8】



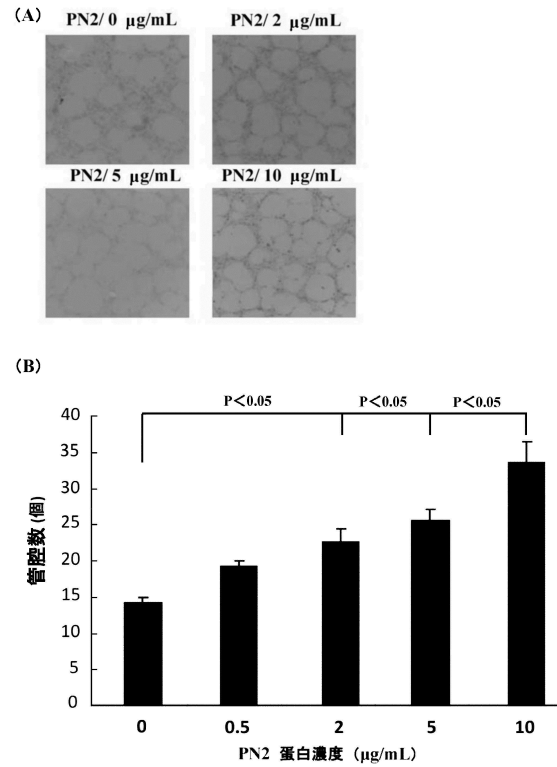
【図 9】



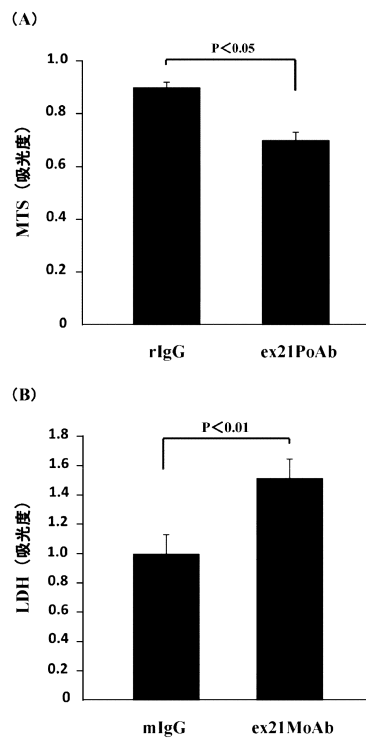
【図 10】



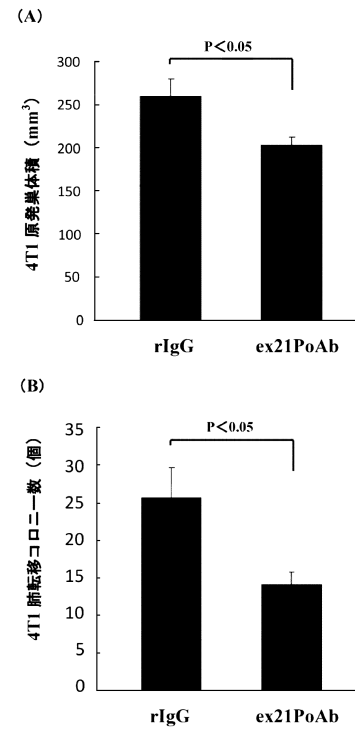
【図 11】



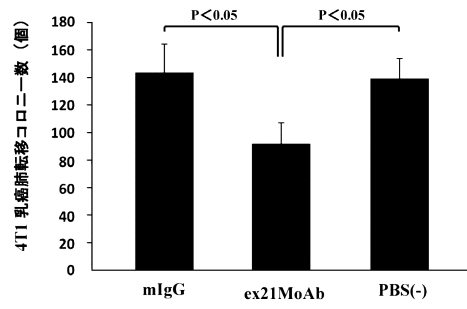
【図 12】



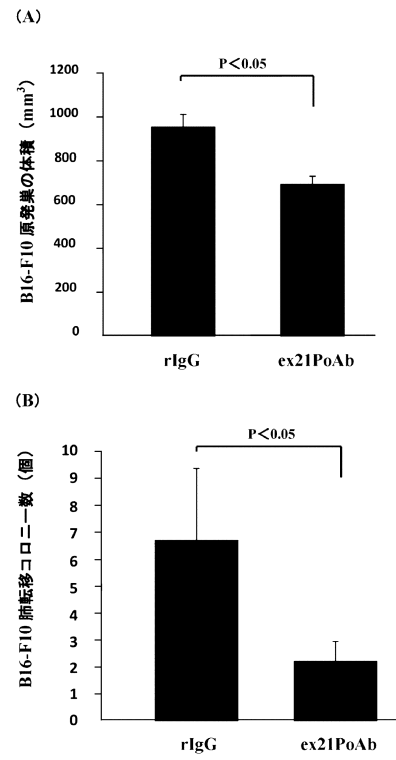
【図 13】



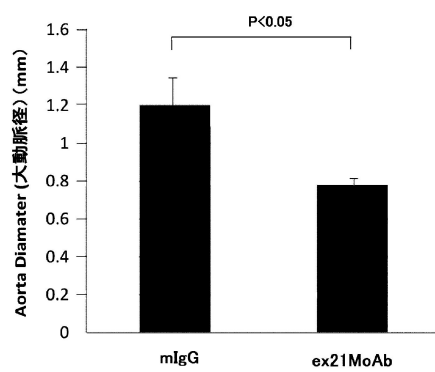
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



【配列表】

0006218088000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P 29/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/395		N
A 6 1 P 9/08 (2006.01)		A 6 1 P 29/00		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 9/08		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
C 1 2 N 15/02 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		D
		C 1 2 N 15/00		C

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-01546

- (72)発明者 眞田 文博
大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内
- (72)発明者 葛城 鳴門
兵庫県加古川市平岡町新在家2丁目280-8-307

審査官 池上 文緒

- (56)参考文献 特表2009-528820 (JP, A)
特表2007-504842 (JP, A)
国際公開第2011/024114 (WO, A1)
国際公開第2007/077934 (WO, A1)
国際公開第2005/019471 (WO, A1)
PLoS ONE, (2012) vol.7, issue 7, e41994
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (2012) vol.109, no.27, p.10978-10983
Human Periostin/OSF-2 Antibody, R&D Systems, [online], <URL:https://www.rndsystems.com/products/human-periostin-osf-2-antibody_af3548>, <URL:https://www.rndsystems.com/products/human-periostin-osf-2-antibody_af3548#citations>
Periostin/OSF-2 Antibody, Novus Biologicals, [online], <URL:https://www.novusbio.com/products/periostin-osf-2-antibody_nbp1-30042>, <URL:https://www.novusbio.com/products/periostin-osf-2-antibody_nbp1-30042#reviews-publications>
Mol. Microbiol. (1993) vol.10, no.1, p.203-213

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 15/00-15/90
C 0 7 K 16/18
PubMed
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
WPIDS/WPIX (STN)
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq

专利名称(译)	抗由periostinのExon-21位点编码の肽の抗体和用于预防或治疗包含所述抗体的炎症相关疾病的药物组合 物		
公开(公告)号	JP6218088B2	公开(公告)日	2017-11-01
申请号	JP2015504400	申请日	2014-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学		
当前申请(专利权)人(译)	国立大学法人大阪大学		
[标]发明人	谷山義明 森下 竜一 東 純哉 眞田 文博 葛城 鳴門		
发明人	谷山 義明 森下 竜一 東 純哉 眞田 文博 葛城 鳴門		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/46 C12P21/08 C12N5/12 A61K39/395 A61P29/00 A61P9/08 A61P35/00 G01N33/53 C12N15/02		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P9/08 A61P29/00 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K2317/34 C07K2317/73 C12N5/12 C07K2317/14 C07K2317/76 G01N33/68 G01N2333/47		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C07K16/46 C12P21/08 C12N5/12 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P29/00 A61P9/08 A61P35/00 G01N33/53.D C12N15/00.C		
优先权	2013047097 2013-03-08 JP		
其他公开文献	JPWO2014136910A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供炎症相关疾病的预防或治疗剂，其中涉及具有细胞粘附活性的骨膜素，并且还提供针对具有细胞粘附活性的骨膜素的抑制剂。

(19) 日本国特許庁 (JP)		(12) 特 許 公 報 (B2)		(11) 特許番号 特許第6218088号 (P6218088)	
(45) 発行日 平成29年11月1日 (2017.11.1)				(24) 登録日 平成29年10月6日 (2017.10.6)	
(51) Int. Cl.		F I			
C 0 7 K 1 6 / 1 8 (2006.01)		C 0 7 K 1 6 / 1 8		Z N A	
C 0 7 K 1 6 / 4 6 (2006.01)		C 0 7 K 1 6 / 4 6			
C 1 2 P 2 1 / 0 8 (2006.01)		C 1 2 P 2 1 / 0 8			
C 1 2 N 5 / 1 2 (2006.01)		C 1 2 N 5 / 1 2			
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5 (2006.01)		A 6 1 K 3 9 / 3 9 5		D	
				請求項の数 19 (全 40 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2015-504400 (P2015-504400)		(73) 特許権者 504176911			
(86) (22) 出願日 平成26年3月6日 (2014.3.6)		国立大学法人大阪大学			
(86) 国際出願番号 PCT/JP2014/055861		大阪府吹田市山田丘1番1号			
(87) 国際公開番号 W02014/136910		(74) 代理人 100077012			
(87) 国際公開日 平成26年9月12日 (2014.9.12)		弁理士 岩谷 龍			
審査請求日 平成27年8月19日 (2015.8.19)		(72) 発明者 谷山 義明			
(31) 優先権主張番号 特願2013-47097 (P2013-47097)		大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法			
(32) 優先日 平成25年3月8日 (2013.3.8)		人大阪大学内			
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		(72) 発明者 森下 竜一			
(出願人による申告) 平成20年度、文部科学省、関西		大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法			
広域バイオメディカルクラスター構想 (大阪北部 (彩都		人大阪大学内			
) 地域「接着阻害因子ペリオスチンに着目した新規心不		(72) 発明者 東 純哉			
全治療薬の開発」) に伴う委託研究、産業技術力強化法		大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法			
第19条の適用を受ける特許出願		人大阪大学内			
		最終頁に続く			
(54) 【発明の名称】 ペリオスチンの E x o n - 2 1 部位によりコードされるペプチドに対する抗体及び該抗体を含む 炎症関連疾患の予防又は治療用医薬組成物					