

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-56037

(P2007-56037A)

(43) 公開日 平成19年3月8日(2007.3.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 ZNAN	4B024
A61P 43/00 (2006.01)	A61P 43/00 IO5	4B064
A61P 35/04 (2006.01)	A61P 35/04	4C085
A61P 9/10 (2006.01)	A61P 9/10 IO1	4H045
C07K 16/18 (2006.01)	A61P 43/00 I11	
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 15 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-287608 (P2006-287608)	(71) 出願人	504145364 国立大学法人群馬大学
(22) 出願日	平成18年10月23日 (2006.10.23)		群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地
(62) 分割の表示	特願2003-157287 (P2003-157287) の分割	(74) 代理人	100093230 弁理士 西澤 利夫
原出願日	平成15年6月2日 (2003.6.2)	(72) 発明者	的崎 尚 群馬県前橋市関根町260-1
		(72) 発明者	岡澤 秀樹 群馬県前橋市下小出町2-39-18 グレイスフルマンション305号
		Fターム(参考)	4B024 AA01 BA53 CA04 EA04 GA11 HA01 HA03 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 4C085 AA14 BB11 CC23 4H045 AA30 DA76 EA20 FA72 FA74

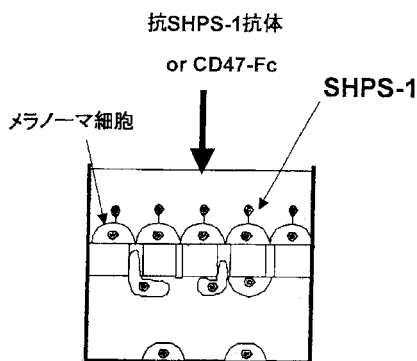
(54) 【発明の名称】 抗SHPS-1モノクローナル抗体

(57) 【要約】

【課題】 SHPS-1を介した細胞応答の機能に作用させることのできる抗SHPS-1モノクローナル抗体を有効成分とする医薬組成物を提供する。

【解決手段】 SH2ドメイン含有タンパク質の脱リン酸化基質タンパク質SHPS-1のN端免疫グロブリン様構造を特異的に認識し、結合する抗SHPS-1モノクローナル抗体を有効成分として、薬理成分とともに含有していることを特徴とする医薬組成物。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

SH2ドメイン含有タンパク質の脱リン酸化基質タンパク質SHPS-1のN端免疫グロブリン様構造を特異的に認識し、結合する抗SHPS-1モノクローナル抗体を有効成分として、薬理成分とともに含有していることを特徴とする医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

この出願の発明は、抗SHPS-1モノクローナル抗体を有効成分として含有する医薬組成物に関するものである。

10

## 【背景技術】

## 【0002】

従来より、細胞の増殖と接着との制御機構には、両者における綿密なクロストークが作用していることが明らかにされてきている。たとえば、外傷等によって皮膚に損傷が生じた場合、皮膚の細胞は傷口を覆うために増殖し始め、細胞同士が接触すると、細胞の増殖は停止する（接触阻止）。また、多くのガン細胞ではこの接触阻止の機構が消失しており、これがガン細胞の無限増殖能や転移能の獲得の原因となっていると考えられている。そのため、細胞の増殖と接着の制御機構の解明は、器官形成等の生命現象を理解する上で重要であり、またガン細胞の転移といった病態を理解する上においても重要である。

## 【0003】

20

また、わが国において、重篤な疾患の原因になることが多い動脈硬化の新たな予防法や治療法の開発は、中・高年者の保健医療において重要な課題となっている。最近、動脈硬化の病巣において、マクロファージを中心とした免疫担当細胞による慢性炎症との関連性が注目されている。したがって、動脈硬化の病態をさらに詳細に理解して、より効果的な治療戦略を研究開発する上で、マクロファージ機能の詳細な制御機構を分子レベルで解明することは大変重要である。

## 【0004】

発明者らは、SH2ドメインを有するチロシンホスファターゼが、増殖因子の刺激によるRas低分子量Gタンパク質の活性化に重要な役割を果たしていることを解明した（非特許文献1）。また、SHP-2の脱リン酸化基質タンパク質としてイムノグロブリンスーパーファミリーに属する受容体型のタンパク質SHPS-1（SH2-containing Protein Tyrosine Phosphatase Substrate-1）（非特許文献2）やドッキングタンパク質Gab-1を見出しており、SHPS-1/SHP-2系やGab-1/SHP-2系が、細胞外マトリックスへ細胞が接着する際に機能する細胞表面上の受容体分子であるインテグリン系や細胞が互いに接着するのに必要な分子群であるカドヘリン系と相互作用して、Rho低分子量Gタンパク質の活性化を介して、細胞運動をも制御することも解明している。

30

## 【0005】

そして、最近、発明者らはSHPS-1がその細胞外領域の生理的なりガンドである受容体型の分子CD47と相互作用することにより細胞間シグナル伝達系（CD47-SHPS-1系）を形成している可能性を示唆する研究結果を得ている（非特許文献3）。また、CD47は、血管内皮細胞においても発現しており、従って血管内皮細胞のCD47がマクロファージ上のSHPS-1と相互作用し、マクロファージ機能を負に制御することが考えられる。このCD47-SHPS-1系の詳細を解明することによって、上記のような「増殖と接着との制御機構」や「マクロファージ機能の制御機構」等の解明に大きく貢献できると考えられ、その結果、たとえばSHPS-1を発現しているガン細胞転移の抑制や動脈硬化の予防や治療に貢献することが期待される。

40

【非特許文献1】Noguchi, T., Matozaki, T., et al.: Mol. Cell. Biol., 14: 6674-6682, 1994

【非特許文献2】Fujioka, Y., Matozaki, T., et al.: Mol. Cell. Biol., 16: 6887-6899, 1996

50

【非特許文献3】Yamao, T., Noguchi, T., et al.: J. Biol. Chem., 277: 39833-39839, 2002

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、CD47-SHPS-1系が細胞の「増殖と接着との制御機構」や「マクロファージ機能の制御機構」に関与している可能性が示唆され、これらに基づく各疾患の予防や治療に応用することが考えられているとはいえ、CD47は、膜貫通型タンパク質であるため、時間的、定量的にリガンドとして作用させるということは困難であり、SHPS-1の機能を制御する有効な方法はなかった。

10

【0007】

また、抗SHPS-1抗体の作製においては、その際に免疫源となるSHPS-1をコードする塩基配列は本発明者らによってはじめて同定されたもの（GenBank Accession No.: JC5287（タンパク質）、GenBank Accession No.: E15703A（核酸）Yamamoto, T., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 231: 61-67, 1997）であるが、抗体作製までは到らなかった。

【0008】

そこでこの出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、従来の問題点を解消し、SHPS-1を介した細胞応答の機能に作用させることのできる抗SHPS-1モノクローナル抗体を有効成分とする医薬組成物を提供することを課題としている。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

この出願の発明は、上記の課題を解決する手段として、SH2ドメイン含有タンパク質の脱リン酸化基質タンパク質SHPS-1のN端免疫グロブリン様構造を特異的に認識し、結合する抗SHPS-1モノクローナル抗体を有効成分として、薬理成分とともに含有していることを特徴とする医薬組成物を提供する。

【発明の効果】

【0010】

以上詳しく説明したとおり、SHPS-1を介した細胞応答の機能に作用させることによって、ガン細胞の転移抑制や動脈硬化の改善等に貢献することのできるCD47部分ペプチドと抗SHPS-1モノクローナルが提供される。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

この出願の発明におけるCD47タンパク質（たとえば、GenBank Accession No.: BT00697）とは、細胞接着分子であるインテグリンに関連する分子として同定されたため、IAP（Integrin-Associated Protein）とも呼ばれ、組織普遍的に発現している5回細胞膜貫通型タンパク質である。図1および図2に例示したとおり、その細胞外領域には1個の免疫グロブリン様構造を保有しており、これがSHPS-1のN末端側にある免疫グロブリン様構造と結合する。

【0012】

40

そして、CD47部分ペプチドは、CD47タンパク質の免疫グロブリン様構造を有する細胞外領域を構成するアミノ酸配列を有し、SH2ドメイン含有タンパク質の脱リン酸化基質タンパク質SHPS-1のN端免疫グロブリン様構造と特異的に結合するポリペプチドである。配列番号2のアミノ酸配列は、上記のCD47タンパク質の免疫グロブリン様構造を有する細胞外領域を構成するアミノ酸配列である。このCD47部分ペプチドは、公知であるCD47タンパク質（たとえば、GenBank Accession No.: BT00697）の部分配列（第1位-第142位アミノ酸）であり、また、ヒト細胞由来のcDNAライブラリーからクローン化することができる。cDNAライブラリーは、ヒト細胞等から抽出したポリ(A)+RNAを鋳型として公知の方法（たとえば、Okayama, H., et al., Mol. Cell. Biol. 2; 161-170, 1982等）により合成することができ、市販のcDNAライブラリーを用いることもできる。

50

## 【0013】

このcDNAライブラリーから、CD47部分ペプチドをクローン化するには、前記のとおりCD47タンパク質の任意の部分の塩基配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとして用い、公知の方法によってコロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行うことによって取得することができる。また、目的とするポリヌクレオチドの両末端にハイブリダイズをするオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして、細胞から単離したmRNAからRT-PCR法を行うことによって、CD47部分ペプチドcDNAを取得することができる。このcDNAを適当な制限酵素によってダイジェストすることによって、配列番号2のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド(すなわち、配列番号1の塩基配列を有するポリヌクレオチド)を調整することができる。

10

## 【0014】

CD47部分ペプチドは、抗体をパパイン等のタンパク質分解酵素で消化させることによって得られる免疫グロブリンFcフラグメント(以下、Ig-Fcとすることがある)とを結合させた融合タンパク質(以下、CD47-Fcとすることがある)とすることもできる。このCD47-Fcは、配列番号4のアミノ酸配列を有するものであり、配列番号3の塩基配列を有するポリヌクレオチドの発現産物である。なお、この配列番号4のアミノ酸を有するCD47-Fcを構成しているCD47部分ペプチドは第1位-第142位のアミノ酸部分であり、Ig-Fcは第143位-第371位のアミノ酸部分である。

## 【0015】

上記のようにして得られたCD47-Fcは、可溶性であり、また抗体様で2価の状態であるため、SHPS-1架橋作用が得られ、細胞運動の抑制等の効果を実現するにおいてより好ましい。

20

## 【0016】

さらにまた、二次抗体を添加することによって、CD47-Fcあるいは抗SHPS-1モノクローナル抗体によるSHPS-1の集積、架橋効果が増強することによって、SHPS-1の作用を介した抑制効果が増強される。この二次抗体は、一次抗体の抗体種に対するIgG抗体であり、特に限定されるものではない。たとえば、マウスを免疫して得られた抗体であるならば、抗体がマウスIgGであるため、二次抗体として抗マウスIgG抗体を使用する。また、ヒトFcフラグメントタンパク質の場合、抗ヒトIgGFc抗体を用いる。

30

## 【0017】

そして、CD47部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドとIg-Fcをコードするポリヌクレオチドそれぞれを適当な制限酵素で処理およびライゲーションによって連結をし、得られたフラグメント(すなわち、配列番号3の塩基配列からなるポリヌクレオチド)を導入して発現ベクターを構築することができる。この発現ベクターを利用して、CD47-Fcを発現させてもよい。なお、使用できる発現ベクターとしては、pTracerCMV、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pcDNA3、pMSG、pYES2等が例示できる。

## 【0018】

もちろん、この出願の発明は、CD47部分ペプチドのみの構成(1価)として利用することもでき、また上記Ig-Fcフラグメントを、他のペプチド(たとえば、His-tag(ヒスチジン-tag)やGST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)等)を任意に採択して融合タンパク質としてもよい。

40

## 【0019】

上記のとおり配列番号3の塩基配列からなるポリヌクレオチドを保有する発現ベクターを任意の培養細胞に形質転換して形質転換細胞を樹立することもできる。この培養細胞は、CD47-Fcを安定発現する形質転換細胞であって、発現ベクターが保有している薬剤耐性遺伝子に合わせた各種薬剤(たとえば、G418等)を含有する細胞培養培地で、選択培養をすることによって樹立されたものである。この形質転換細胞株の細胞上清を回収・精製することによってCD47-Fcを得ることができる。なお、培養細胞は、HeLa細胞、COS7細胞

50

、CHO細胞等をはじめとする種々のものが使用でき、特に限定されるものではない。

【0020】

細胞の回収方法としては、一般的には細胞を培養容器から培地とともに回収し、この細胞を含有した培地を低速遠心で処理をして、沈殿した細胞を適当な緩衝液で懸濁する。緩衝液は、トリス緩衝液、HEPES緩衝液、リン酸緩衝液等が例示でき、細胞の種類や実験目的に応じて適宜に採択することができる。この細胞懸濁液は、必要に応じてDMSOや市販の保存液キット（たとえば、Cellvation<sup>TM</sup>; Celox Laboratories社製）等のような細胞保存液と混合することによって、液体窒素や-80 以下のフリーザーにて長期保存することができる。

【0021】

また、CD47-Fc等の目的とする発現されたタンパク質の精製方法としては、細胞上清をたとえば、アフィニティーカラム、ゲルろ過法等が採択して精製することができる。特に、この出願の発明のCD47-Fcの場合、Fcフラグメントとの融合タンパク質としているため、Fcフラグメントと高い結合能を有するProtein-Aアガロースを使用したアフィニティーカラムを利用することが好ましい。

【0022】

なお、CD47-Fcを構成するCD47部分ペプチドやIg-Fcの由来は、哺乳類であることが好ましい。たとえば、ヒツジ、ヤギ、ラットやマウス、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒト等が挙げることができ、特にヒトのガン細胞転移の抑制や動脈硬化の予防・治療等という目的から、ヒトであることがより好ましい。

【0023】

CD47-Fcは、SHPS-1のリガンドの一種としてSHPS-1と結合させることができ、この際のCD47-Fcの使用量や使用時期等を調節することによって、SHPS-1の機能を制御することが実現することができる。このSHPS-1は、SH2ドメインを有しているチロシンホスファターゼSHPS-1の脱リン酸化基質タンパク質として、受容体型のタンパク質であり、細胞外領域に3個の免疫グロブリン様構造を有し、さらにリン酸化を受ける複数のチロシン残基を細胞内領域に保有するタンパク質である。

【0024】

そして、前記のとおりCD47-Fcは、SHPS-1のN末端側の免疫グロブリン様構造とCD47細胞外領域の1個の免疫グロブリン様構造とが結合することによって、SHPS-1と相互作用を形成（すなわち、CD47-SHPS-1系）していると考えられている。このCD47-SHPS-1系が、普遍的な細胞運動の負の制御に関与しており、図3に例示したようにCD47-SHPS-1系はCD47分子やSHPS-1分子をそれぞれ発現する細胞同士の接触により双方向に細胞運動を抑制することが考えられ、CD47-SHPS-1系が接触阻止の分子機構に大きく関与していると考えられる。

【0025】

この発明の抗SHPS-1モノクローナル抗体とは、SH2ドメイン含有タンパク質の脱リン酸化基質タンパク質SHPS-1を特異的に認識し、結合する抗SHPS-1モノクローナル抗体である。そのため、CD47-Fcと同様に、抗SHPS-1モノクローナル抗体の使用量や使用時期等を調節することによって、SHPS-1の機能を制御することができる。

【0026】

なお、抗SHPS-1モノクローナル抗体において、その標的対象となるSHPS-1は哺乳類であることが好ましい。たとえば、ヒツジ、ヤギ、ラットやマウス、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒト等が挙げることができ、特にヒトのガン細胞転移の抑制や動脈硬化の予防・治療等という目的から、CD47部分ペプチドと同様にヒトであることがより好ましい。

【0027】

この発明の抗SHPS-1モノクローナル抗体は、定法に従いハイブリドーマ細胞株から作製することができる。まず、ペプチドであるSHPS-1（GenBank Accession No.: JC5287（タンパク質）、GenBank Accession No.: E15703A（核酸）、Yamamoto, T., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 231: 61-67, 1997等）をFc特異的抗体を用いて免疫沈降法で

10

20

30

40

50

精製することによってこのSHPS-1を取得することができる。また、GST(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)との融合タンパク質として大腸菌や酵母等で産生させることや免疫グロブリンFcとの融合タンパク質として産生させてもよい。得られたこのSHPS-1を免疫源として被免疫動物(たとえば、マウス、ラット、ウサギ等)に任意の担体(たとえば、ウシ血清アルブミン(FCS))とともに投与して、免疫させ、必要に応じて一定期間の後に適宜に追加免疫して、この被免疫動物を十分に感化させる。次に、公知の方法(たとえばポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で細胞融合する方法、電氣的刺激による細胞融合する方法等)に従い、被免疫動物から、脾臓やリンパ節から調整したリンパ球等の抗体産生細胞をミエローマ細胞と細胞融合させ、抗SHPS-1モノクローナル抗体産生のハイブリドーマ細胞株を作製し、その細胞上清を精製することによって取得することができる。(「単クローン抗体」、岩崎辰夫、安東民衛、他著、講談社、1987年; Seiffert, M., et al, Blood 94; 3633-3643, 1999、Seiffert, M., et al, Blood 97; 2741-2749, 2001等)。上記のミエローマ細胞は、特に制限されるものではなく、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を考慮すると、その選択方法が確立しているHGPRT(Hpxanthine-guanine Phosphoribosyl Transferase)欠損株を用いるのが好ましく、マウス由来のX63-AG8(X63)、NS-1Ag4/1(NS-1)、P3X63-AG8.U1(P3UI)、X63-Ag8.653(X63.653)、SP2/0-AG14(SP2/0)、Fo等が例示できる。

10

## 【0028】

融合細胞と非融合細胞の選択は、たとえば公知のHAT(ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン)選択法によってできる。この方法は、上記のアミノプテリン存在下で生存することができないHGPRT欠損株のミエローマ細胞を用いて融合細胞を作製する場合に有効な方法である。これは、融合細胞および非融合細胞をHAT培地で培養することによって、アミノプテリンに対する耐性を有する融合細胞のみを選択培養することができる。

20

## 【0029】

目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞のスクリーニングは、たとえばEIA(酵素免疫検定法)、RIA(放射線免疫測定法)、蛍光抗体法等公知の方法によって行うことができる。

## 【0030】

以上のようにして得られたハイブリドーマ細胞株は、CD47-Fc産生細胞株と同様に必要に応じて、DMSOや市販の保存液キット(たとえば、Cellvation<sup>TM</sup>; Celox Laboratories社製)等のような細胞保存液と混合することによって、液体窒素や-80以下のフリーザーにて長期保存することができる。

30

## 【0031】

さらにまたこの出願の発明は、CD47部分ペプチドと抗SHPS-1モノクローナル抗体の少なくともどちらか一方を有効成分として薬理成分とともに含有している組成物として提供されるものである。この組成物は、ガン細胞の転移抑制や動脈硬化の予防・治療等に応用することができる。もちろん、CD47部分ペプチドと抗SHPS-1モノクローナル抗体の2種類を混合させて、薬理成分とともに含有させた組成物としてもよい。

## 【0032】

「薬理成分」とは、第1に通常の薬剤製造に用いられる各種の担体を意味する。「担体」は、対象疾患の種類や薬剤の投与形態に応じて広い範囲から適宜選択することができるが、この発明の組成物は、経口的にまたは注射により投与しうる単位服用形態にあることが望ましい。特に、注射による投与の場合には、局所注入、腹腔内投与、選択的静脈内注入、静脈注射、皮下注射、臓器灌流液注入等を採用することができる。

40

## 【0033】

懸濁剤およびシロップ剤等のような経口液体調整物は、水、シュクロース、ソルビトール、フラクトース等の糖類、ポリエチレングリコール等のグリコール類、ごま油、大豆油等の油類、アルキルパラヒドロキシベンゾエート等の防腐剤、ストロベリー・フレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を使用して製造することができる。

## 【0034】

50

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクト - ス、グルコース、シュークロース、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギニン酸ソーダ等の崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の表面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を用いて製剤化することができる。錠剤およびカプセル剤は、投与が容易であるという点において、この発明の組成物における好ましい単位投与形態である。錠剤やカプセル剤を製造する際には、固体の製造担体を用いられる。

【0035】

また、注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物、各種の緩衝液等からなる担体を用いて製剤化することができる。また粉末状態で製剤化し、使用時に前記液体担体と混合して注射液を調整するようにしてもよい。

10

【0036】

薬学的成分の第2は、CD47タンパク質および/または抗SHPS-1モノクローナル抗体を細胞内に導入可能な形態とするための成分である。たとえば、このポリペプチドの構造や機能を変更することなく、かつ薬理的に許容される溶液にこのポリペプチドを混合して組成物とすることができる。このような組成物は、たとえばマイクロインジェクション法によって細胞内に導入する方法や、脂質を用いた細胞内導入法等によって標的細胞に導入することができる。

【0037】

以下に実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細、かつ、具体的に説明する。

20

もちろん、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0038】

(実施例1) 細胞運動の抑制効果における検証

1. 各抗体の作製

(i) 抗CD47モノクローナル抗体

本実施例で用いる抗CD47モノクローナル抗体は、抗ヒトCD47モノクローナル抗体 (CC2C6) として作製し、これを利用した。

【0039】

作製方法は、公知の方法 (「単クローン抗体」、岩崎辰夫、安東民衛、他著、講談社、1987年; Seiffert, M., et al, Blood 94; 3633-3643, 1999、Seiffert, M., et al, Blood 97; 2741-2749, 2001等) で作製・精製した。

30

【0040】

具体的には、CD47タンパク質を免疫原としてマウスに担体としてウシ血清アルブミン (FCS) ) とともに投与して、免疫させ、必要に応じて一定期間の後に適宜に追加免疫して、マウスを十分に感化させる。このマウスから、脾臓、リンパ節から調整したリンパ球等の抗体産生細胞を公知の方法に従いマウスミエローマ細胞であるP3Uと細胞融合させ、CD47抗体産生ハイブリドーマ細胞株を作製し、その細胞上清を精製することによって得た。

(ii) 抗SHPS-1モノクローナル抗体

抗ヒトSHPS-1モノクローナル抗体 (SE12C3) は、免疫原としてペプチドであるSHPS-1を用いた点以外は、上記(i)と同様の方法で、作製・精製した。

40

【0041】

このSHPS-1は、Fc特異的抗体を用いて免疫沈降法で精製することによって取得した。

2. メラノーマ細胞におけるSHPS-1およびCD47の発現確認

メラノーマ細胞としてヒト悪性黒色腫瘍細胞WM239a (M. Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia, PA) より提供を受けた) を用いて、CD47およびSHPS-1の発現を免疫蛍光標識分析法にて確認した。

【0042】

結果は、図4に示したとおり、SHPS-1およびCD47いずれにおいても発現していることが確認された。(A)は抗SHPS-1モノクローナル抗体 (SE12C3) を、(B)は抗CD47モノクロー

50

ル抗体 (CC2C6) をそれぞれWM239aとインキュベートした。そして、インキュベート後にFITC標識抗マウスIgGポリクロナール抗体の利用とフローサイトメトリーによって検出した (太線)。また、抗SHPS-1モノクロナール抗体、または抗CD47モノクロナール抗体それぞれをノーマルなマウスIgGと置き換えることによって、ネガティブコントロールとした (細線)。

### 3. CD47-Fcの作製

ヒトCD47のcDNAは、F.P. Lindberg氏 (Washington University, St Louis, MO)からの提供で取得した。

#### 【0043】

まず、ヒトIgG1のFcタンパク質をコードするcDNAを、PCR法を用いて公知の方法 (Liu, Y.C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90; 8957-8961, 1993) に従い取得した。このPCR産物をSpeIおよびNotIとでダイジェストし、このSpeIおよびNotIと相同する部位にpEFneoベクター (Invitrogen社製) ライゲーションし、pEFneoFc76として作製した。

#### 【0044】

次にヒトCD47部分ペプチド (1-142アミノ酸) をコードするcDNAは、全長ヒトCD47タンパク質のcDNAを鋳型としてPCR法で取得した。その際のセンスプライマーとして、5'-TAATACTAGTCTGCTGCTCCAGACACCTGCG-3'を、アンチセンスプライマーとしては5'-TAGCTCTAGAATTTCATTTGGAGAAAACCATGAAAC-3'を用いた。そして、得られたPCR産物をXbaIおよびSpeIでダイジェストし、pEFneoFc76のSpeIサイトに導入した。得られたこのベクターをPstIおよびNotIでダイジェストし、これによって得られる断片をpTracerCMVのPstIおよびNotIサイトと相同する箇所に導入し、プラスミドpTracerCMV-hCD47-Fcとした。CHO-Ras細胞にpTracerCMV-hCD47-Fcをトランスフェクトし、Zeocinを用いて定法に従い選択培養を行った。CD47-Fc融合タンパク質を発現・分泌する細胞株の判別には、細胞の上清に抗ヒトIgGポリクロナール抗体を用いてイムノプロットング法によって行った。CD47-Fcの精製には、その上清をrProtein A-Sepharose 4FF (Amersham Pharmacia Biotech社製) を備えたカラムクロマトグラフィーによって精製した。

### 4. 抗SHPS-1モノクロナール抗体とCD47-FcのWM239aに対する作用

細胞運動の測定によって、悪性黒色腫細胞WM239aに対する作用を検討した。細胞運動の測定には、Transwell apparatus (Corning社製) を用いて、公知の方法で測定した (Longo, N., et al., Blood 98;3717-3726, 2001)。

#### 【0045】

図5に示したとおり、抗SHPS-1モノクロナール抗体とCD47-Fcいずれにおいても悪性黒色腫細胞WM239aに対して、細胞運動の抑制効果が確認された。すなわち、CD47と結合するSHPS-1リガンド (すなわち、抗SHPS-1モノクロナール抗体とCD47-Fc) は、細胞運動を抑制することができ、ガン細胞の転移を抑制することが期待できる。

### 5. 二次抗体の添加による効果

上記4の細胞運動の抑制効果は、二次抗体を添加することによって、図6に示したとおり、細胞運動の抑制が増強されることが確認された。

#### 【0046】

このことは、融合タンパク質であるCD47-Fc、あるいは抗SHPS-1モノクロナール抗体によるSHPS-1の集積、架橋効果が増強し、その結果SHPS-1の作用を介した抑制効果が増強するものと考えられる。

#### 【0047】

なお、本実施例において二次抗体として、抗マウスIgGを用いた。

### 6. 抗SHPS-1モノクロナール抗体のCHO-Ras細胞に対する作用

細胞運動の測定によって、H-Rasを安定発現しているCHO-Ras細胞 (S. Shirahata (Kyushu University, Fukuoka, Japan)より提供を受けた) に対する作用を検討した。細胞運動の測定には、上記4と同様にTranswell apparatus (Corning社製) を用いて、公知の方法で測定した (Longo, N., et al., Blood 98;3717-3726, 2001)。

#### 【0048】

10

20

30

40

50



本実施例では、抗SHPS-1モノクローナル抗体として抗ヒトSHPS-1モノクローナル抗体 (SE12C3) と抗ラットSHPS-1モノクローナル抗体 (2F34) の2種類を用いて検討した。

【0049】

図7に示したとおり抗ヒトSHPS-1モノクローナル抗体 (SE12C3) と抗ラットSHPS-1モノクローナル抗体 (2F34) のずれにおいても、CHO-Ras細胞に対して、細胞運動の抑制効果が確認された。特に、ヒトSHPS-1発現細胞に対しては抗ヒトSHPS-1モノクローナル抗体がより効果的に作用し、一方ラットSHPS-1発現細胞に対しては、抗ラットSHPS-1モノクローナル抗体が効果的に作用していることが確認された。なお、ノーマルなマウスIgGをコントロールとして用いた。

#### 7. CHO-IR細胞を用いたSHP-2結合モチーフの必要性の検討

10

ヒトインシュリン受容体を安定発現しているCHO-IR細胞は、ラットSHPS-1正常型を保有するCHO-IR-SHPS-1-WT細胞と4つすべてのチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換したラットSHPS-1変異型を保有するCHO-IR-rSHPS-1-4F細胞を用いた。また、抗体は、抗ラットSHPS-1モノクローナル抗体 (2F34)、抗ラットSHPS-1モノクローナル抗体 (9F10) の2種類を用いた。

結果は、図8に示したとおり、CHO-IR-rSHPS-1-4F細胞においてコントロール、抗ラットSHPS-1モノクローナル抗体 (2F34)、抗ラットSHPS-1モノクローナル抗体 (9F10) いずれにおいても差異は認められなかった。一方、CHO-IR-SHPS-1-WT細胞においては、コントロールには効果が認められなかったが、抗ラットSHPS-1モノクローナル抗体 (2F34)、抗ラットSHPS-1モノクローナル抗体 (9F10) においては抑制効果が確認された。すなわち、抗SHPS-1モノクローナル抗体による細胞運動の抑制には、SHPS-1のSHP-2結合モチーフが必要であることが理解することができる。

20

(実施例2) マクロファージ機能における検証

#### 1. SHPS-1遺伝子欠失マウスの末梢血血小板数の変化

SHPS-1の細胞内領域を欠失する遺伝子欠失マウス (以下、SHPS-1 KOマウスとすることがある) を公知の方法 (たとえば、野村達次 監修、勝木元也 編、発生工学実験マニュアル、講談社サイエンティフィック、1987年、Capecchi, MR., Science 244: 1288-1292, 1989等) に従い作製した。

【0050】

30

このSHPS-1 KOマウスの末梢血を各血球成分特異的抗体を用いたフローサイトメトリー解析したところ、血小板数が野生型と比べ、~70%程度減少していた (表1)。

【0051】

【表 1】

	+/- オス	-/- オス	+/- メス	-/- メス
RBC ( $\times 10^4/\text{ml}$ )	925+/-25	924+/-20	973+/-27	932+/-8
WBC ( $\times 10^2/\text{ml}$ )	14.6+/-1.4	25.0+/-1.6	23.2+/-1.8	17.2+/-0.7
Hb (g/dL)	15.7+/-0.33	14.8+/-0.44	16.6+/-0.54	15.7+/-0.26
MCV (fL)	57.6+/-0.67	54.6+/-0.68	57.2+/-0.53	55.6+/-0.57
PLT ( $\times 10^4/\text{ml}$ )	98.2+/-4.1*	75.6+/-3.5*	64.3+/-4.3*	64.9+/-2.3*
MPV (fL)	5.56+/-0.07	5.76+/-0.05	5.70+/-0.12	5.52+/-0.13

\*スチューデントt検定、 $P < .005$ 

10

20

30

## 【0052】

この血小板数の変化は、生後4週から確認され、少なくとも13週まで継続したことを確認した。

## 2. 血小板数の減少の原因検証

血小板数の減少の原因検証は、SHPS-1 KOマウスより取得した巨核球の増殖能、分化能を *in vitro* での培養検討および抗ガン剤5FUの投与後の血小板数の回復をフローサイトメーターによって行った。

40

## 【0053】

具体的には、大腿骨における巨核球コロニー形成能は、その増殖刺激因子であるMGDFを投与し反応を検討したが、野生型とSHPS-1 KOマウスの間には差異は認められなかった。

## 【0054】

一方、血小板の寿命において、抗ガン剤である5-FU投与による骨髓抑制後の血小板数の回復過程を解析した。その結果、図9(A)に示したとおり、投与15日後における血小板数は、野生型では  $182 \pm 13.7 \times 10^4 / \mu\text{l}$  に対して、SHPS-1 KOマウスでは  $117 \pm 41.2 \times 10^4 / \mu\text{l}$  であり、差が認められた。また図9(B)では、ビオチン標識した血小板の生体内での半減

50

期を測定したところ、野生型に対してSHPS-1 KOマウスが有意に半減期の短縮が確認された。このことは、5FUによる回復障害は認められたが、ビオチン化した血小板の消失速度が亢進した結果が確認されたため、産生過程における障害ではなく、消耗過程における亢進によるものであることを意味することが確認された。

### 3. SHPS-1 KOマウスにおける血小板数の減少に関与する機序の検証

SHPS-1 KOマウスより腹腔内のマクロファージをチオグリコート腹腔内注入により単離し、*in vitro*における貪食能を解析した。そして、このマクロファージを用いてマウス赤血球の貪食能を検討したところ、図10(A)(B)(C)にそれぞれ示したとおり、SHPS-1 KOマウス由来のマクロファージの方が野生型マウス由来のマクロファージと比べて、有意に血小板に対する貪食能の増強が見られた。このことから、血小板数の低下、また血小板の寿命の短縮は、マクロファージの貪食能に起因することが理解できる。すなわち、血小板上のCD47がマクロファージ上のSHPS-1と結合することによって、マクロファージによる血小板の貪食過程を負に制御する。すなわち、SHPS-1のリガンドとなる抗SHPS-1モノクローナル抗体やCD47-Fcを作用させることによって、マクロファージの血液凝固等に関与する血小板に対する貪食能が向上し、動脈硬化の治療等にも応用することが可能となる。

10

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1】メラノーマ細胞に発現しているSHPS-1にCD47タンパク質および/または抗SHPS-1モノクローナル抗体を添加する様子を例示した模式図である。

【図2】細胞膜上に存在する5回膜貫通型CD47の細胞外領域をIg-Fcと融合させ、作製したCD47-Fcを例示した模式図である。

20

【図3】CD47-Fcを添加し、CD47-SHPS-1系における細胞運動抑制機構を例示した模式図である。

【図4】メラノーマ細胞(WM239a)におけるSHPS-1およびCD47の発現の確認を示した図である。(A)がSHPS-1の発現の確認結果を、(B)がCD47の発現の確認結果を示している。

【図5】CD47-Fc、抗SHPS-1モノクローナル抗体による細胞運動に対する抑制効果を示した図である。

【図6】抗SHPS-1モノクローナル抗体に二次抗体をさらに添加した場合における細胞運動に対する抑制効果を示した図である。

【図7】SHPS-1発現するCHO-Ras細胞における細胞運動の抗SHPS-1モノクローナル抗体による抑制効果を示した図である。

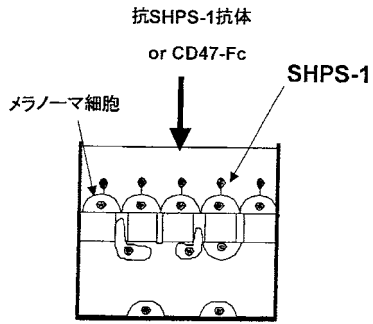
30

【図8】SHPS-1発現するCHO-IR細胞およびSHPS-1発現しない変異型CHO-Ras細胞それぞれに対する抗SHPS-1モノクローナル抗体の抑制効果を示した図である。

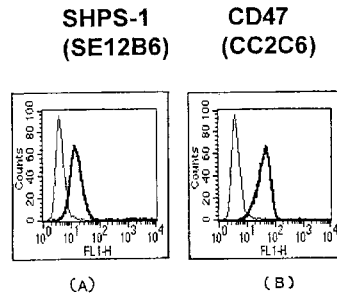
【図9】野生型マウスおよびSHPS-1欠失型マウスにおける血小板寿命を示した図である。(A)は抗ガン剤投与後の日数を、(B)はビオチン標識してその半減期をそれぞれ示している。

【図10】マクロファージの貪食能の亢進を示した図であり、(A)は野生型由来のマクロファージを、(B)はSHPS-1欠失型由来のマクロファージを、(C)は野生型とSHPS-1欠失型とを比較したグラフ図をそれぞれ示している。

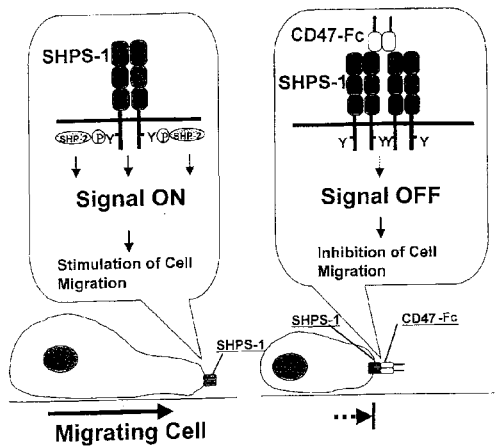
【 図 1 】



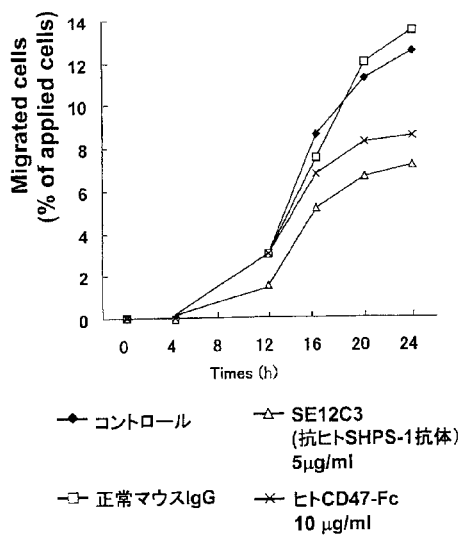
【 図 4 】



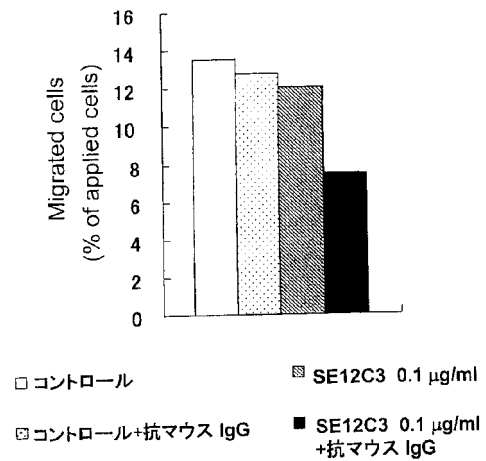
【 図 3 】



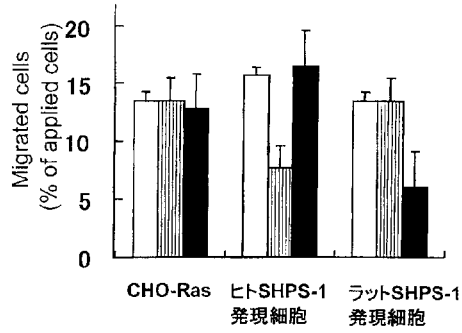
【 図 5 】



【 図 6 】

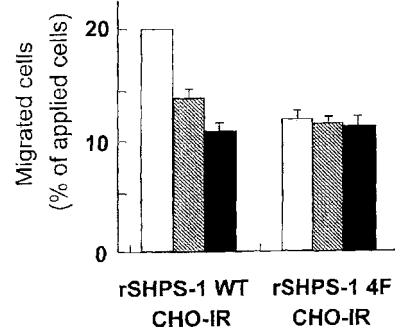


【 図 7 】



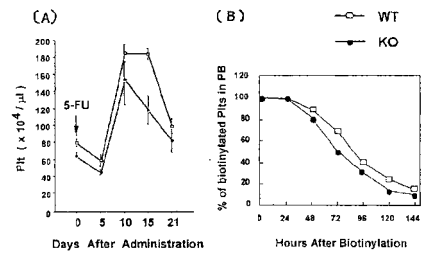
□ コントロール  
 ■ 2F34 5µg/ml (抗ラットSHPS-1抗体)  
 ▨ SE12C3 5µg/ml (抗ヒトSHPS-1抗体)

【 図 8 】

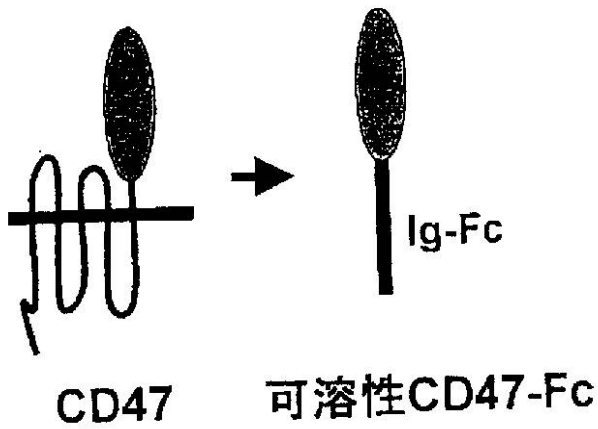


□ コントロール  
 ▨ 抗ラットSHPS-1抗体 2F34 5µg/ml  
 ■ 抗ラットSHPS-1抗体 9F10 5µg/ml

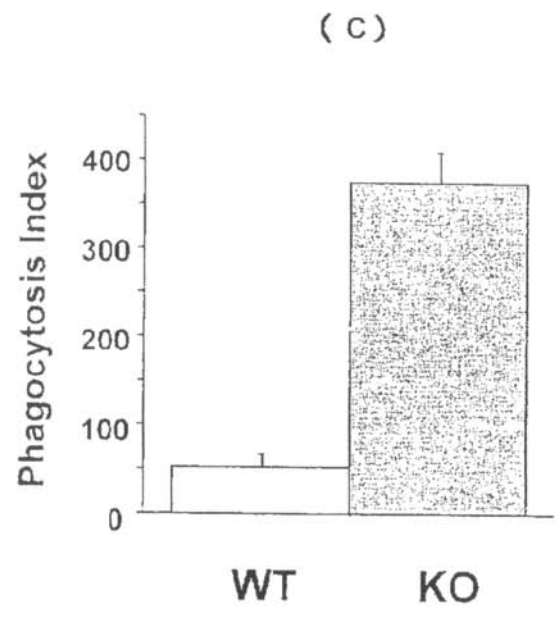
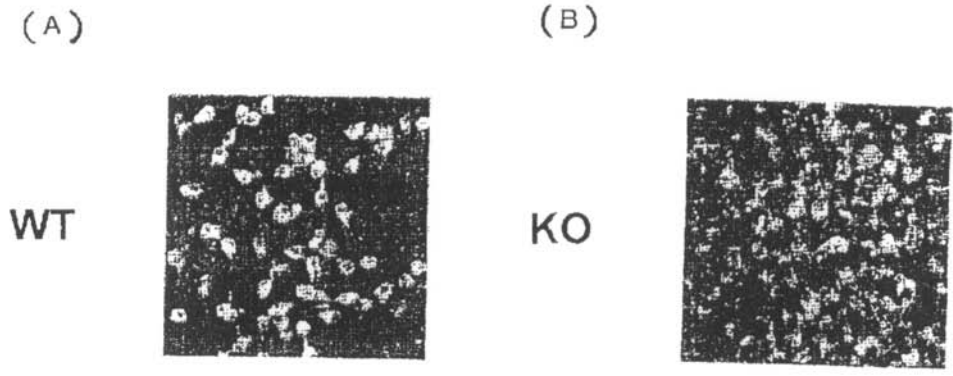
【 図 9 】



【 図 2 】



【 図 1 0 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 0 7 K	16/18
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 P	21/08
			C 1 2 N	15/00
				A