

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/183665

発行日 平成31年2月21日 (2019. 2. 21)

(43) 国際公開日 **平成29年10月26日 (2017. 10. 26)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z N A Z	4 B O 6 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C O 8 5
C 1 2 N 15/10 (2006.01)	C 1 2 N 15/10 2 O O Z	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 45 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2018-513201 (P2018-513201)	(71) 出願人	504171134 国立大学法人 筑波大学 茨城県つくば市天王台一丁目1番1
(21) 国際出願番号	PCT/JP2017/015767	(74) 代理人	110001070 特許業務法人 S S I N P A T
(22) 国際出願日	平成29年4月19日 (2017. 4. 19)	(72) 発明者	渋谷 彰 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内
(31) 優先権主張番号	特願2016-84170 (P2016-84170)	(72) 発明者	渋谷 和子 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内
(32) 優先日	平成28年4月20日 (2016. 4. 20)	(72) 発明者	阿部 史枝 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立 大学法人筑波大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 制御性T細胞の活性化剤及びその使用

(57) 【要約】

D N A X A c c e s s o r y M o l e c u l e - 1 (D N A M - 1) 及び C D 1 5
5 の結合を阻害する物質からなる、制御性T細胞の活性化剤。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

D N A X Accessory Molecule - 1 (D N A M - 1) 及び C D 1 5 5 の結合を阻害する物質からなる、制御性 T 細胞の活性化剤。

【請求項 2】

D N A M - 1 及び C D 1 5 5 の結合を阻害する前記物質が、D N A M - 1 に対する特異的結合物質、D N A M - 1 発現阻害剤、C D 1 5 5 に対する特異的結合物質又は C D 1 5 5 発現阻害剤である、請求項 1 に記載の制御性 T 細胞の活性化剤。

【請求項 3】

移植片対宿主病、臓器移植拒絶、自己免疫疾患、線維化疾患、炎症性腸炎若しくはアレルギーの予防又は治療用である、請求項 1 又は 2 に記載の制御性 T 細胞の活性化剤。

10

【請求項 4】

D N A M - 1 及び C D 1 5 5 の結合を阻害する前記物質が、D N A M - 1 に対する特異的結合物質であり、

前記 D N A M - 1 はヒト D N A M - 1 であり、

前記特異的結合物質は抗体又はその断片であり、

前記抗体又はその断片は、ヒト D N A M - 1 を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒト D N A M - 1 分子と反応させた場合に、I g G 型抗体全長に換算して 100 ng 以下で前記ヒト D N A M - 1 分子を飽和することができる、

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の制御性 T 細胞の活性化剤。

20

【請求項 5】

D N A M - 1 及び C D 1 5 5 の結合を阻害する前記物質が、D N A M - 1 に対する特異的結合物質であり、

前記 D N A M - 1 はヒト D N A M - 1 であり、

前記特異的結合物質は抗体又はその断片であり、

前記抗体又はその断片は、ヒト D N A M - 1 を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒト D N A M - 1 分子を、ヒト C D 1 5 5 と I g G 型抗体定常領域との融合タンパク質 1000 ng で飽和させた後に反応させた場合に、I g G 型抗体全長に換算して 500 ng 以下で、前記融合タンパク質と前記ヒト D N A M - 1 分子との結合を完全に阻害することができる、

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の制御性 T 細胞の活性化剤。

30

【請求項 6】

前記抗体はヒト型抗体である、請求項 4 又は 5 に記載の制御性 T 細胞の活性化剤。

【請求項 7】

前記抗体又はその断片は、

相補性決定領域 (C D R) 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列又は配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、C D R 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列又は配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有するか、又は

40

ヒト D N A M - 1 と結合させた場合に、C D R 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、C D R 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する抗体と競合する、

請求項 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の制御性 T 細胞の活性化剤。

【請求項 8】

前記抗体又はその断片は、

C D R 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列又は配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、C D R 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列

50

又は配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、

請求項 4 ~ 7 のいずれか一項に記載の制御性 T 細胞の活性化剤。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の制御性 T 細胞の活性化剤と、薬学的に許容できる担体とを含む、制御性 T 細胞活性化用医薬組成物。

【請求項 10】

ヒト DNAM - 1 を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒト DNAM - 1 分子と反応させた場合に、IgG 型抗体全長に換算して 50 ng 以下で前記ヒト DNAM - 1 分子を飽和することができる、抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

10

【請求項 11】

ヒト DNAM - 1 を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒト DNAM - 1 分子を、ヒト CD155 と IgG 型抗体定常領域との融合タンパク質 1000 ng で飽和させた後に反応させた場合に、IgG 型抗体全長に換算して 300 ng 以下で、前記融合タンパク質と前記ヒト DNAM - 1 分子との結合を完全に阻害することができる、抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 12】

ヒト型抗体又はその断片である、請求項 10 又は 11 に記載の抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

20

【請求項 13】

CDR 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列又は配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列又は配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有するか、又は

ヒト DNAM - 1 と結合させた場合に、CDR 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する抗体と競合する、

請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

30

【請求項 14】

CDR 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列又は配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列又は配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載の抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 15】

CDR 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、請求項 10 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

40

【請求項 16】

配列番号 7 のアミノ酸配列又は配列番号 7 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、

配列番号 8 のアミノ酸配列又は配列番号 8 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、請求項 10 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

50

【請求項 17】

配列番号7のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、配列番号8のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、請求項16に記載の抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 18】

配列番号9のアミノ酸配列又は配列番号9のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、

配列番号10のアミノ酸配列又は配列番号10のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、請求項10～14のいずれか一項に記載の抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片。

10

【請求項 19】

配列番号9のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、配列番号10のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、請求項18に記載の抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 20】

請求項10～19のいずれか一項に記載の抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片をコードする核酸。

【請求項 21】

請求項20に記載の核酸を含有するベクター。

20

【請求項 22】

請求項21に記載のベクターを含有する形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、制御性T細胞の活性化剤及びその使用に関する。より具体的には、制御性T細胞の活性化剤、制御性T細胞活性化用医薬組成物、抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片、核酸、ベクター及び形質転換体に関する。本願は、2016年4月20日に、日本に出願された特願2016-084170号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

30

【背景技術】

【0002】

輸血又は幹細胞移植の後に、移植片対宿主病(graft-versus-host disease、GVHD)が発症する場合がある。移植片対宿主病は、移植細胞中に存在するドナー由来の活性化T細胞がレシピエントの細胞を傷害することにより生じる。また、ドナーの臓器をレシピエントに移植すると拒絶反応が起こる場合がある。例えば、心移植、血管移植、腎臓移植等において、移植された心臓、血管、腎臓は、一時的には生着するものの、次第に剥離等が認められる場合がある。このため、移植片対宿主病や臓器移植拒絶を抑制する技術が求められている。

【0003】

例えば、特許文献1には、マウスDNAM-1タンパク質に対する中和抗体が、マウスにおける移植心臓、移植血管又は移植腎臓の生着を維持する薬剤として使用可能であることが記載されている。

40

【0004】

DNAM-1タンパク質は、CD226とも呼ばれる分子量65kDaの免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子である。DNAM-1タンパク質の発現は、ヒトやマウスのCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、NK細胞、マクロファージ、樹状細胞等の様々な免疫細胞に認められる。ヒトDNAM-1のRefSeq IDはNP_001290547であり、マウスDNAM-1のRefSeq IDはNP_001034238である。発明者らは、以前に、DNAM-1タンパク質が、ポリオウイルスレセプター

50

として知られてきたCD155に結合することを明らかにした。CD155は、イムノグロブリンスーパーファミリーに属するI型膜貫通糖タンパク質である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2013-245162号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

このような背景のもと、本発明は、ヒトの免疫反応を抑制することができる技術を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は以下の態様を含む。

[1] DNAM-1及びCD155の結合を阻害する物質からなる、制御性T細胞の活性化剤。

[2] DNAM-1及びCD155の結合を阻害する前記物質が、DNAM-1に対する特異的結合物質、DNAM-1発現阻害剤、CD155に対する特異的結合物質又はCD155発現阻害剤である、[1]に記載の制御性T細胞の活性化剤。

[3] 移植片対宿主病、臓器移植拒絶、自己免疫疾患、線維化疾患、炎症性腸炎若しくはアレルギーの予防又は治療用である、[1]又は[2]に記載の制御性T細胞の活性化剤。

[4] DNAM-1及びCD155の結合を阻害する前記物質が、DNAM-1に対する特異的結合物質であり、前記DNAM-1はヒトDNAM-1であり、前記特異的結合物質は抗体又はその断片であり、前記抗体又はその断片は、ヒトDNAM-1を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒトDNAM-1分子と反応させた場合に、IgG型抗体全長に換算して100ng以下で前記ヒトDNAM-1分子を飽和することができる、[1]～[3]のいずれかに記載の制御性T細胞の活性化剤。

[5] DNAM-1及びCD155の結合を阻害する前記物質が、DNAM-1に対する特異的結合物質であり、前記DNAM-1はヒトDNAM-1であり、前記特異的結合物質は抗体又はその断片であり、前記抗体又はその断片は、ヒトDNAM-1を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒトDNAM-1分子を、ヒトCD155とIgG型抗体定常領域との融合タンパク質1000ngで飽和させた後に反応させた場合に、IgG型抗体全長に換算して500ng以下で、前記融合タンパク質と前記ヒトDNAM-1分子との結合を完全に阻害することができる、[1]～[4]のいずれかに記載の制御性T細胞の活性化剤。

[6] 前記抗体はヒト型抗体である、[4]又は[5]に記載の制御性T細胞の活性化剤。

[7] 前記抗体又はその断片は、相補性決定領域(CDR)1～3が、それぞれ配列番号1～3のアミノ酸配列又は配列番号1～3のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1～3が、それぞれ配列番号4～6のアミノ酸配列又は配列番号4～6のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有するか、又は、ヒトDNAM-1と結合させた場合に、CDR1～3が、それぞれ配列番号1～3のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1～3が、それぞれ配列番号4～6のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する抗体と競合する、[4]～[6]のいずれかに記載の制御性T細胞の活性化剤。

[8] 前記抗体又はその断片は、CDR1～3が、それぞれ配列番号1～3のアミノ酸配列又は配列番号1～3のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1～3が、それぞれ

10

20

30

40

50

配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列又は配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、[4] ~ [7] のいずれかに記載の制御性 T 細胞の活性化剤。

[9] [1] ~ [8] のいずれかに記載の制御性 T 細胞の活性化剤と、薬学的に許容できる担体とを含む、制御性 T 細胞活性化用医薬組成物。

[10] ヒト DNAM - 1 を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒト DNAM - 1 分子と反応させた場合に、IgG 型抗体全長に換算して 100 ng 以下で前記ヒト DNAM - 1 分子を飽和することができる、抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

[11] ヒト DNAM - 1 を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒト DNAM - 1 分子を、ヒト CD155 と IgG 型抗体定常領域との融合タンパク質 1000 ng で飽和させた後に反応させた場合に、IgG 型抗体全長に換算して 500 ng 以下で、前記融合タンパク質と前記ヒト DNAM - 1 分子との結合を完全に阻害することができる、抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

[12] ヒト型抗体又はその断片である、[10] 又は [11] に記載の抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

[13] CDR1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列又は配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列又は配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有するか、又は、ヒト DNAM - 1 と結合させた場合に、CDR1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する抗体と競合する、[10] ~ [12] のいずれかに記載の抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

[14] CDR1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列又は配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列又は配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、[10] ~ [13] のいずれかに記載の抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

[15] CDR1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、[10] ~ [14] のいずれかに記載の抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

[16] 配列番号 7 のアミノ酸配列又は配列番号 7 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 8 のアミノ酸配列又は配列番号 8 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、[10] ~ [15] のいずれか一項に記載の抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

[17] 配列番号 7 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 8 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、[16] に記載の抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

[18] 配列番号 9 のアミノ酸配列又は配列番号 9 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 10 のアミノ酸配列又は配列番号 10 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、[10] ~ [14] のいずれかに記載の抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

10

20

30

40

50

[1 9] 配列番号 9 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 1 0 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、[1 8] に記載の抗ヒト D N A M - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

[2 0] [1 0] ~ [1 9] のいずれかに記載の抗ヒト D N A M - 1 モノクローナル抗体又はその断片をコードする核酸。

[2 1] [2 0] に記載の核酸を含有するベクター。

[2 2] [2 1] に記載のベクターを含有する形質転換体。

【 0 0 0 8 】

(1) C D R 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列又は配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、C D R 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列又は配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、抗ヒト D N A X A c c e s s o r y M o l e c u l e - 1 (D N A M - 1) モノクローナル抗体又は抗体フラグメント (抗体断片) 。

(2) C D R 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、C D R 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、(1) に記載の抗ヒト D N A M - 1 モノクローナル抗体又は抗体フラグメント。

(3) 配列番号 7 のアミノ酸配列又は配列番号 7 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 8 のアミノ酸配列又は配列番号 8 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、(1) 又は (2) に記載の抗ヒト D N A M - 1 モノクローナル抗体又は抗体フラグメント。

(4) 配列番号 7 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 8 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、(1) ~ (3) のいずれかに記載の抗ヒト D N A M - 1 モノクローナル抗体又は抗体フラグメント。

(5) (1) ~ (4) のいずれかに記載の抗ヒト D N A M - 1 モノクローナル抗体又は抗体フラグメントをコードする核酸。

(6) (5) に記載の核酸を含有する組換えベクター。

(7) (6) に記載の組換えベクターを含有する形質転換体。

(8) (1) ~ (4) のいずれかに記載の抗ヒト D N A M - 1 モノクローナル抗体又は抗体フラグメントを有効成分として含有する免疫抑制剤。

(9) 移植片対宿主病の予防又は治療剤である、(8) に記載の免疫抑制剤。

(1 0) 臓器移植拒絶の予防又は治療剤である、(8) に記載の免疫抑制剤。

【 発明の効果 】

【 0 0 0 9 】

本発明によれば、ヒトの免疫反応を抑制することができる技術を提供することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 0 】

【 図 1 】 抗ヒト D N A M - 1 モノクローナル抗体 N o . 1 ~ 6 の重鎖のアミノ酸配列をアラインメントした結果を示す図である。

【 図 2 】 抗ヒト D N A M - 1 モノクローナル抗体 N o . 1 ~ 6 の軽鎖のアミノ酸配列をアラインメントした結果を示す図である。

【 図 3 】 (a) ~ (d) は、実験例 2 の結果を示すグラフである。

【 図 4 】 (a) ~ (l) は、実験例 3 の結果を示すグラフである。

【 図 5 】 (a) ~ (e) は、実験例 4 において、抗ヒト D N A M - 1 モノクローナル抗体 N o . 1 ~ 6 の反応性を検討した結果を示すグラフである。

【 図 6 】 (a) ~ (e) は、実験例 5 において、抗ヒト D N A M - 1 モノクローナル抗体

10

20

30

40

50

No. 1 ~ 6 の反応性を検討した結果を示すグラフである。

【図 7】(a) ~ (e) は、実験例 6 において、抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体 No. 1 ~ 6 の反応性を検討した結果を示すグラフである。

【図 8】(a) ~ (e) は、実験例 7 において、抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体 No. 1 ~ 6 の反応性を検討した結果を示すグラフである。

【図 9】実験例 8 における混合リンパ球反応アッセイの結果を示すグラフである。

【図 10】実験例 9 の実験プロトコルを示す図である。

【図 11】実験例 9 におけるマウスの生存率を示すグラフである。

【図 12】(a) 及び (b) は、実験例 9 におけるマウスの肝機能を検討した結果を示すグラフである。

10

【図 13】実験例 10 の実験プロトコルを示す図である。

【図 14】実験例 10 におけるマウスの生存率を示すグラフである。

【図 15】実験例 11 において、抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体を反応させた CD8⁺T 細胞の細胞傷害活性を測定した結果を示すグラフである。

【図 16】(a) は、実験例 12 において、モノクローナル抗体 No. 1 を投与してから 14 日後のマウスの脾臓中の CD4⁺T 細胞における制御性 T 細胞の割合を測定した結果を示すグラフである。(b) は、実験例 12 において、モノクローナル抗体 No. 1 を投与してから 14 日後のマウスの末梢血中の CD4⁺T 細胞における制御性 T 細胞の割合を測定した結果を示すグラフである。

【図 17】(a) は、実験例 13 において、脳脊髄炎の発症率を測定した結果を示すグラフである。また、(b) は、実験例 13 において、臨床スコアの平均値を算出した結果を示すグラフである。

20

【図 18】(a) は、実験例 14 において、血清中のアルカリフォスファターゼを定量した結果を示すグラフである。(b) は、実験例 14 において、血清中の総ビリルビンを定量した結果を示すグラフである。

【図 19】(a) は、実験例 14 における対照マウスの肝臓組織の顕微鏡写真である。(b) は、実験例 14 における DNAM - 1 遺伝子欠損マウスの肝臓組織の顕微鏡写真である。

【図 20】(a) は、実験例 15 においてマッソントリクローム染色した腎臓の切断面の写真である。(b) は、(a) に基づいて腎皮質の面積を測定した結果を示すグラフである。

30

【図 21】(a) は、実験例 15 において、対照マウスの腎臓の組織切片を抗 - SMA 抗体で免疫染色した代表的な結果を示す顕微鏡写真である。(b) は、実験例 15 において、DNAM - 1 遺伝子欠損マウスの腎臓の組織切片を抗 - SMA 抗体で免疫染色した代表的な結果を示す顕微鏡写真である。(c) は、実験例 15 において、各群のマウスの腎臓組織における - SMA 陽性領域の面積を算出した結果を示すグラフである。

【図 22】実験例 16 において、対照マウス及び DNAM - 1 遺伝子欠損マウスの体重を測定した結果を示すグラフである。

【図 23】(a) は、実験例 16 において、実験開始から 9 日目に摘出した、DNAM - 1 遺伝子欠損マウスの大腸の写真である。(b) は、実験例 16 において、実験開始から 9 日目に摘出した、対照マウスの大腸の写真である。(c) は、(a) 及び (b) の結果を数値化したグラフである。

40

【発明を実施するための形態】

【0011】

[制御性 T 細胞の活性化剤]

1 実施形態において、本発明は、DNAM - 1 及び CD155 の結合を阻害する物質からなる、制御性 T 細胞の活性化剤を提供する。

【0012】

実施例において後述するように、発明者らは DNAM - 1 と CD155 との結合を阻害することにより、制御性 T 細胞を活性化することができることを明らかにした。したがっ

50

て、DNAM-1及びCD155の結合を阻害する物質は、制御性T細胞の活性化の用途に使用することができる。

【0013】

DNAM-1及びCD155の結合を阻害する物質としては、例えば、DNAM-1に対する特異的結合物質、DNAM-1発現阻害剤、CD155に対する特異的結合物質、CD155発現阻害剤等が挙げられる。

【0014】

DNAM-1に対する特異的結合物質、CD155に対する特異的結合物質としては、DNAM-1及びCD155の結合を阻害できる物質であれば特に限定されず、例えば、抗体、抗体断片、アプタマー等が挙げられる。抗体は、マウス等の動物を免疫することによって作製したものであってもよく、ファージライブラリ等の抗体ライブラリのスクリーニングにより作製したものであってもよい。また、抗体断片としては、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、scFv等が挙げられる。また、アプタマーとしては、例えば、核酸アプタマー、ペプチドアプタマー等が挙げられる。

【0015】

また、DNAM-1に対する特異的結合物質は、可溶化したCD155であってもよい。可溶化したCD155としては、例えば、CD155と抗体定常領域との融合タンパク質等が挙げられる。また、CD155に対する特異的結合物質は、可溶化したDNAM-1であってもよい。可溶化したDNAM-1としては、例えば、DNAM-1と抗体定常領域との融合タンパク質等が挙げられる。

【0016】

DNAM-1発現阻害剤、CD155発現阻害剤としては、DNAM-1又はCD155の発現を低減させ、結果としてDNAM-1及びCD155の結合を阻害できる物質であれば特に限定されず、例えば、siRNA、shRNA、miRNA、リボザイム、アンチセンス核酸、低分子化合物等が挙げられる。siRNA、shRNA、miRNA、リボザイム及びアンチセンス核酸は、安定性や活性を向上させるために、種々の化学修飾を含んでいてもよい。例えば、ヌクレアーゼ等の加水分解酵素による分解を防ぐために、リン酸残基を、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネート等の化学修飾リン酸残基に置換してもよい。また、少なくとも一部をペプチド核酸(PNA)等の核酸類似体により構成してもよい。

【0017】

制御性T細胞とは、Treg、調節性T細胞とも呼ばれるT細胞の一種である。制御性T細胞は免疫応答の抑制的制御を行うことが明らかにされつつある。制御性T細胞としては、例えばCD4⁺CD25⁺T細胞、Foxp3⁺CD25⁺T細胞、CD4⁺Foxp3⁺細胞等が挙げられる。

【0018】

本明細書において、制御性T細胞の活性化とは、制御性T細胞の細胞数の増加、制御性T細胞が発現するTGF- β 、IL-10等の抑制性サイトカインの発現量の増加、T細胞による免疫応答の抑制、免疫応答全般の抑制等を意味する。

【0019】

本実施形態の制御性T細胞の活性化剤は、制御性T細胞の活性化により症状を軽減することができる疾患の予防又は治療に用いることができる。このような疾患としては、例えば、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、自己免疫疾患、線維化疾患、炎症性腸炎、アレルギー等が挙げられる。

【0020】

ここで、自己免疫疾患としては、例えばリウマチ、I型糖尿病、自己免疫性脳脊髄炎等が挙げられる。また、繊維化疾患とは、肺、心臓、肝臓、腎臓等の様々な臓器において、組織がI型コラーゲン等に置き換わる疾患であり、例えば肝硬変、糖尿病性腎症、肺線維症等が挙げられる。アレルギーとしては、例えばアレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎等が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0021】

本実施形態の制御性T細胞の活性化剤は、例えば、DNAM-1に対する特異的結合物質であってもよく、特異的結合物質は抗体又はその断片であってもよい。ここで、DNAM-1は、制御性T細胞を活性化する対象の種のDNAM-1であればよく、例えばヒトDNAM-1であってもよい。すなわち、本実施形態の制御性T細胞の活性化剤は、抗ヒトDNAM-1抗体又はその断片であってもよい。

【0022】

ここで、抗ヒトDNAM-1抗体又はその断片としては、ヒトDNAM-1を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒトDNAM-1分子と反応させた場合に、IgG型抗体全長に換算して100ng以下、好ましくは80ng以下、より好ましくは50ng以下、更に好ましくは40ng以下、特に好ましくは30ng以下で、上記のリンパ球の細胞表面に存在するヒトDNAM-1分子を飽和することができる反応性を有するものが好ましい。実施例において後述するように、このような反応性を有する抗ヒトDNAM-1抗体は、制御性T細胞の活性化能が高い。

10

【0023】

ここで、例えば、対象の抗体が例えば抗体断片等であった場合には、IgG型抗体全長の質量に換算して反応性を計算すればよい。この場合、例えば抗体断片とIgG型抗体全長の分子量に基づいて質量を換算すればよい。

【0024】

また、本実施形態の制御性T細胞の活性化剤として好適な抗ヒトDNAM-1抗体又はその断片は、ヒトDNAM-1を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒトDNAM-1分子を、ヒトCD155とIgG型抗体定常領域との融合タンパク質1000ngで飽和させた後に、上記のリンパ球と反応させた場合に、IgG型抗体全長に換算して500ng以下、好ましくは400ng以下、より好ましくは300ng以下、更に好ましくは200ng以下、特に好ましくは100ng以下で、上記の融合タンパク質と上記のリンパ球の細胞表面に存在するヒトDNAM-1分子との結合を完全に阻害することができる反応性を有するものであってもよい。

20

【0025】

すなわち、このような反応性を有する抗ヒトDNAM-1抗体は、DNAM-1とCD155とが予め結合していた場合においても、この結合を解除することができる。実施例において後述するように、このような反応性を有する抗ヒトDNAM-1抗体は、制御性T細胞の活性化能が高い。

30

【0026】

ここで、完全に阻害するとは、実質的に完全に阻害できることを意味する。例えば、ヒトDNAM-1を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒトDNAM-1分子を、ヒトCD155とIgG型抗体定常領域との融合タンパク質1000ngで飽和させた後に、上記のリンパ球と反応させた場合に、上記のリンパ球の表面に結合していた融合タンパク質のうち、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは99%以上を解離させ、リンパ球の細胞表面に存在するヒトDNAM-1分子と結合することができることを意味する。

40

【0027】

また、本実施形態の制御性T細胞の活性化剤は、抗ヒトCD155抗体又はその断片であってもよい。

【0028】

本実施形態の制御性T細胞の活性化剤において、抗ヒトDNAM-1抗体若しくはその断片、又は抗ヒトCD155抗体若しくはその断片は、ヒト型抗体若しくはその断片であることが好ましい。

【0029】

制御性T細胞の活性化剤がヒト型抗体又はその断片であれば、ヒトに投与しても免疫原性が低いため、アナフィラキシーショック等の副作用を抑制することができる。ヒト型抗

50

体としては、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体等が挙げられる。

【0030】

本明細書において、キメラ抗体とは、可変領域が非ヒト動物由来の抗体であり、定常領域の少なくとも一部がヒト由来の抗体である抗体を意味する。また、ヒト化抗体とは、重鎖及び軽鎖の相補性決定領域(CDR)のみが非ヒト動物由来の抗体であり、定常領域及びフレームワーク領域がヒト由来の抗体である抗体を意味する。また、完全ヒト抗体とは、相補性決定領域を含めて全体がヒト由来の抗体を意味する。

【0031】

本実施形態の制御性T細胞の活性化剤において、抗ヒトDNAM-1抗体又はその断片は、CDR1~3が、それぞれ配列番号1~3のアミノ酸配列又は配列番号1~3のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1~3が、それぞれ配列番号4~6のアミノ酸配列又は配列番号4~6のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する抗体又はその断片であってもよい。

10

【0032】

ここで、重鎖可変領域のCDR1又はCDR2における数個とは、4個、3個又は2個を意味する。また、重鎖可変領域のCDR3における数個とは2個を意味する。また、軽鎖可変領域のCDR1又はCDR3における数個とは、4個、3個又は2個を意味する。また、軽鎖可変領域のCDR2における数個とは2個を意味する。

20

【0033】

CDR1~3が、それぞれ配列番号1~3のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及びCDR1~3が、それぞれ配列番号4~6のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を有する抗体としては、例えば、実施例において後述するモノクローナル抗体No.1、モノクローナル抗体No.1をヒト型化した抗体等が挙げられる。

【0034】

また、抗ヒトDNAM-1抗体は、モノクローナル抗体No.1に限定されず、モノクローナル抗体No.1と同等以上の反応性を有するものであれば本実施形態の制御性T細胞の活性化剤として使用することができる。したがって、抗ヒトDNAM-1抗体は、CDR1~3が、それぞれ配列番号1~3のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1~3が、それぞれ配列番号4~6のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を有する抗体であってもよい。このような抗体としては、例えば、実施例において後述するモノクローナル抗体No.2~6、モノクローナル抗体No.2~6をヒト型化した抗体等が挙げられる。

30

【0035】

あるいは、抗ヒトDNAM-1抗体又はその断片は、ヒトDNAM-1と結合させた場合に、CDR1~3が、それぞれ配列番号1~3のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1~3が、それぞれ配列番号4~6のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する抗体と競合する抗体又はその断片であってもよい。すなわち、抗ヒトDNAM-1抗体は、ヒトDNAM-1との結合に関して、実施例において後述するモノクローナル抗体No.1と競合する抗体であってもよい。モノクローナル抗体No.1と競合する抗体は、ヒトDNAM-1との結合に関して、モノクローナル抗体No.1と同等以上の反応性を有する。

40

【0036】

ここで、対象の抗体が競合するとは、例えば、ヒトDNAM-1を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒトDNAM-1分子に、実施例において後述するモノクローナル抗体No.1を反応させた後に、対象の抗体を上記のリンパ球と反応させた場合に、モノクローナル抗体No.1とヒトDNAM-1分子との結合を少なくとも1部解離させて、ヒトDNAM-1分子と結合することができることを意味する。

50

【 0 0 3 7 】

ここで、少なくとも1部とは、上記のリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒトDNAM-1分子全体の10%以上であってもよく、30%以上であってもよく、50%以上であってもよく、70%以上であってもよく、90%以上であってもよい。

【 0 0 3 8 】

[制御性T細胞活性化用医薬組成物]

1実施形態において、本発明は、上述した制御性T細胞の活性化剤と、薬学的に許容できる担体とを含む、制御性T細胞活性化用医薬組成物を提供する。

【 0 0 3 9 】

薬学的に許容される担体としては、一般的に製剤に用いられるものを使用することができ、例えば、賦形剤、安定剤、注射剤用溶剤等が挙げられる。注射剤用溶剤としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム等の補助薬を含む等張液が挙げられる。

10

【 0 0 4 0 】

本実施形態の医薬組成物は、上述した制御性T細胞の活性化剤、薬学的に許容できる担体以外に添加物を含んでいてもよい。添加物としては、例えば、pH調節剤、粘度改良剤、着色剤、移植片対宿主病や臓器移植拒絶の治療において従来使用されてきた、ステロイド類、免疫抑制剤等が挙げられる。

【 0 0 4 1 】

本実施形態の医薬組成物の剤型は限定されず、例えば凍結乾燥剤、粉末製剤、pHが調整された緩衝液による溶液製剤、注射用マイクロカプセル剤等が挙げられる。

20

【 0 0 4 2 】

本実施形態の医薬組成物は、例えば、注射剤又は点滴注入剤として、静脈内投与等により患者に投与される。その投与量、投与経路、処方は、患者の症状、体重、年齢、性別等に応じて適宜決定すればよい。

【 0 0 4 3 】

本実施形態の医薬組成物の投与量は、患者の症状、体重、年齢、性別等によって異なり、一概には決定できないが、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において1kg体重あたり、有効成分(DNAM-1及びCD155の結合を阻害する物質)が例えば $1 \mu\text{g} \sim 100 \text{mg}$ 、例えば $50 \mu\text{g} \sim 50 \text{mg}$ 含まれる量を、1日あたり1回～数回投与すればよい。

30

【 0 0 4 4 】

[抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片]

1実施形態において、本発明は、ヒトDNAM-1を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒトDNAM-1分子と反応させた場合に、IgG型抗体全長に換算して100ng以下、好ましくは80ng以下、より好ましくは50ng以下、更に好ましくは40ng以下、特に好ましくは30ng以下で、上記のリンパ球の細胞表面に存在するヒトDNAM-1分子を飽和することができる、抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片を提供する。

【 0 0 4 5 】

実施例において後述するように、このような反応性を有する抗ヒトDNAM-1抗体は、制御性T細胞の活性化や、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、自己免疫疾患、線維化疾患、炎症性腸炎等の症状の軽減等に有用である。

40

【 0 0 4 6 】

ここで、例えば、対象の抗体が例えば抗体断片等であった場合には、IgG型抗体全長の質量に換算して反応性を計算すればよい。この場合、例えば抗体断片とIgG型抗体全長の分子量に基づいて質量を換算すればよい。また、本実施形態の抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片は、任意の既知の抗体及びその断片を除いたものであってもよい。

【 0 0 4 7 】

50

本実施形態の抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片は、ヒトDNAM-1を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒトDNAM-1分子を、ヒトCD155とIgG型抗体定常領域との融合タンパク質1000ngで飽和させた後に、上記のリンパ球と反応させた場合に、IgG型抗体全長に換算して500ng以下、好ましくは400ng以下、より好ましくは300ng以下、更に好ましくは200ng以下、特に好ましくは100ng以下で、上記の融合タンパク質と上記のリンパ球の細胞表面に存在するヒトDNAM-1分子との結合を完全に阻害することができる反応性を有するものであってもよい。

【0048】

すなわち、このような反応性を有する抗ヒトDNAM-1抗体は、DNAM-1とCD155とが予め結合していた場合においても、この結合を解除することができる。ここで、「完全に阻害する」については上述したものと同様である。

【0049】

本実施形態の抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片は、ヒト型抗体又はその断片であってもよい。ヒト型抗体については上述したものと同様である。

【0050】

本実施形態の抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片は、CDR1~3が、それぞれ配列番号1~3のアミノ酸配列又は配列番号1~3のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1~3が、それぞれ配列番号4~6のアミノ酸配列又は配列番号4~6のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有するものであってもよい。

【0051】

ここで、重鎖可変領域のCDR1又はCDR2における数個とは、4個、3個又は2個を意味する。また、重鎖可変領域のCDR3における数個とは2個を意味する。また、軽鎖可変領域のCDR1又はCDR3における数個とは、4個、3個又は2個を意味する。また、軽鎖可変領域のCDR2における数個とは2個を意味する。

【0052】

本明細書において、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを適切なリンカーで連結したsingle-chain Fv(scFv)等が挙げられる。scFvのリンカーとしては、例えば、(GGGS)₃(配列番号21)等のペプチドが挙げられる。

【0053】

実施例において後述するように、本実施形態の抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片は、ヒトDNAM-1タンパク質に良好に結合し、インビボ及びインビトロにおいてヒトの免疫反応を抑制することができる。このため、免疫抑制剤として利用することができる。

【0054】

あるいは、本実施形態の抗ヒトDNAM-1抗体又はその断片は、ヒトDNAM-1と結合させた場合に、CDR1~3が、それぞれ配列番号1~3のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1~3が、それぞれ配列番号4~6のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する抗体と競合する抗体又はその断片であってもよい。すなわち、抗ヒトDNAM-1抗体は、ヒトDNAM-1との結合に関して、実施例において後述するモノクローナル抗体No.1と競合する抗体であってもよい。モノクローナル抗体No.1と競合する抗体は、ヒトDNAM-1との結合に関して、モノクローナル抗体No.1と同等以上の反応性を有する。ここで、抗体の競合については上述したものと同様である。

【0055】

抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片は、CDR1~3が、それぞれ配列番号1~3のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1~3が、それぞれ配列番号4~6のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有するものであってもよい。この

10

20

30

40

50

ような抗体としては、例えば、実施例において後述するモノクローナル抗体 No. 1、モノクローナル抗体 No. 1 をヒト型化した抗体等が挙げられる。

【0056】

また、抗ヒト DNAM-1 モノクローナル抗体又はその断片は、配列番号7のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、配列番号8のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有するものであってもよい。このような抗体としては、例えば、実施例において後述するモノクローナル抗体 No. 1、モノクローナル抗体 No. 1 をヒト型化した抗体等が挙げられる。

【0057】

あるいは、抗ヒト DNAM-1 モノクローナル抗体又はその断片は、配列番号9のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、配列番号10のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有するものであってもよい。このような抗体としては、例えば、実施例において後述するモノクローナル抗体 No. 2、モノクローナル抗体 No. 2 をヒト型化した抗体等が挙げられる。

10

【0058】

また、抗ヒト DNAM-1 モノクローナル抗体又はその断片は、ヒト DNAM-1 に対する反応性を有している限り、配列番号7のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、配列番号8のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有するものであってもよい。

20

【0059】

あるいは、抗ヒト DNAM-1 モノクローナル抗体又はその断片は、ヒト DNAM-1 に対する反応性を有している限り、配列番号9のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、配列番号10のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有するものであってもよい。

【0060】

ここで、重鎖可変領域又は軽可変領域における数個とは、15個、14個、13個、12個、11個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個又は2個を意味する。このような抗体としては、例えば、実施例において後述するモノクローナル抗体 No. 3~6、モノクローナル抗体 No. 3~6 をヒト型化した抗体等が挙げられる。

30

【0061】

[抗ヒト DNAM-1 モノクローナル抗体又はその断片をコードする核酸]

1実施形態において、本発明は、上述した抗ヒト DNAM-1 モノクローナル抗体又はその断片をコードする核酸を提供する。

【0062】

このような核酸としては、例えば、上述した抗ヒト DNAM-1 モノクローナル抗体の重鎖可変領域遺伝子、上述した抗ヒト DNAM-1 モノクローナル抗体の軽鎖可変領域遺伝子、上述した抗ヒト DNAM-1 モノクローナル抗体の重鎖可変領域及び定常領域の一部をコードする遺伝子、上述した抗ヒト DNAM-1 モノクローナル抗体の軽鎖可変領域及び定常領域の一部をコードする遺伝子、上述した抗ヒト DNAM-1 モノクローナル抗体の重鎖全長をコードする遺伝子、上述した抗ヒト DNAM-1 モノクローナル抗体の軽鎖全長をコードする遺伝子、上述した抗ヒト DNAM-1 モノクローナル抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを適切なリンカーで連結した scFv をコードする遺伝子等が挙げられる。

40

【0063】

上記の重鎖可変領域遺伝子は、配列番号19に記載の塩基配列からなる遺伝子であってもよい。また、上記の軽鎖可変領域遺伝子は、配列番号20に記載の塩基配列からなる遺伝子であってもよい。

【0064】

50

また、上記の重鎖可変領域遺伝子は、CDR 1～3が、それぞれ配列番号1～3に記載のアミノ酸配列からなり、CDR以外のフレームワーク領域が非マウス抗体由来である重鎖可変領域をコードする遺伝子であってもよい。また、上記の軽鎖可変領域遺伝子は、CDR 1～3が、それぞれ配列番号4～6に記載のアミノ酸配列からなり、CDR以外のフレームワーク領域が、非マウス抗体由来である軽鎖可変領域をコードする遺伝子であってもよい。ここで、非マウス抗体としては、例えばヒト抗体が挙げられる。

【0065】

本実施形態の核酸は、上述した抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体の重鎖可変領域遺伝子又はこれに由来する遺伝子と、抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体の軽鎖可変領域遺伝子又はこれに由来する遺伝子との組み合わせであることが好ましい。

10

【0066】

ここで、重鎖可変領域遺伝子に由来する遺伝子としては、例えば、CDR 1～3が、それぞれ配列番号1～3に記載のアミノ酸配列からなり、CDR以外のフレームワーク領域が非マウス抗体由来である重鎖可変領域をコードする遺伝子が挙げられる。また、同様に、軽鎖可変領域遺伝子に由来する遺伝子としては、例えば、CDR 1～3が、それぞれ配列番号4～6に記載のアミノ酸配列からなり、CDR以外のフレームワーク領域が非マウス抗体由来である軽鎖可変領域をコードする遺伝子が挙げられる。

【0067】

[ベクター]

1実施形態において、本発明は、上述した核酸を含有する組換えベクターを提供する。本実施形態の組換えベクターは、発現ベクターであってもよい。本実施形態のベクターが発現ベクターである場合、宿主に導入して発現させることにより、抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片を製造することができる。

20

【0068】

本実施形態の組換えベクターにおいて、上述した核酸の5'末端又は3'末端に、ヒスチジンタグ、FLAGタグ、GSTタグ等のタグ配列をコードするDNAが付加されていてもよい。上記の発現ベクターとしては、宿主細胞に抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片を発現させる細胞系ベクターと、適当な細胞から抽出されたタンパク質合成能を有する成分からなるタンパク質翻訳系において抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片を発現させる無細胞系ベクターが挙げられる。

30

【0069】

細胞系ベクターとしては、宿主細胞に適した公知の発現ベクターが用いられる。例えば、大腸菌においてはpBR322誘導体に代表されるColE系プラスミド、p15Aオリジンを持つpACYC系プラスミド、pSC系プラスミド、Bac系等のF因子由来ミニFプラスミドが挙げられる。その他にも、trcやtac等のトリプトファンプロモーター、lacプロモーター、T7プロモーター、T5プロモーター、T3プロモーター、SP6プロモーター、アラビノース誘導プロモーター、コールドショックプロモーター、テトラサイクリン誘導性プロモーター等を有する発現ベクターが挙げられる。また、宿主が大腸菌以外のベクターとしては、例えば、酵母発現用のpAUR系プラスミド、昆虫細胞発現用のpIEx系プラスミド、動物細胞発現用のpBApo-CMV系プラスミド等

40

【0070】

無細胞系ベクターとしては、細胞系ベクターにおいて挙げられたT7プロモーターを有する発現ベクターやT3プロモーターを有する発現ベクター；SP6プロモーター又はT7プロモーターを有するpEU系プラスミド等の小麦無細胞タンパク質合成用ベクター等が挙げられる。

【0071】

無細胞系ベクターを用いたタンパク質合成においては、まず、転写系を用いて、SeaA遺伝子を転写して、mRNAを合成する。転写系としては、RNAポリメラーゼにより転写させる従来公知のものが挙げられる。RNAポリメラーゼとしては、例えばT7RN

50

Aポリメラーゼ、SP6ポリメラーゼ等が挙げられる。

【0072】

続いて、翻訳系である無細胞タンパク質合成系を用いて、mRNAを翻訳し、タンパク質を合成する。この系にはリボソーム、翻訳開始因子、翻訳伸長因子、解離因子、アミノアシルtRNA合成酵素等、翻訳に必要な要素が含まれている。このようなタンパク質翻訳系としては、大腸菌抽出液、ウサギ網状赤血球抽出液、小麦胚芽抽出液等が挙げられる。更に、上記翻訳に必要な要素が独立に精製された因子のみからなる再構成型無細胞タンパク質合成系が挙げられる。

【0073】

細胞系ベクター又は無細胞系ベクターを用いて合成されたタンパク質から抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片を精製して用いることができる。精製方法としては、プロテインA、プロテインG等を用いた方法等が挙げられる。発現ベクターが目的タンパク質のN末端又はC末端にヒスチジントグ等のタグ配列を発現するように設計されている場合には、ニッケルやコバルト等、このタグに親和性を有する物質を用いたアフィニティーカラムによる精製方法が挙げられる。その他、イオン交換クロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィー等を適宜組み合わせることで精製することにより、抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片の純度を高めることができる。

10

【0074】

[形質転換体]

1実施形態において、本発明は、上述した組換えベクターを含有する形質転換体を提供する。本実施形態の形質転換体又はその培地等より、抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片を製造することができる。

20

【0075】

本実施形態の形質転換体は、上述した組換えベクターを宿主に導入することにより得ることができる。形質転換体としては、例えば、上述した組換えベクターが導入された、大腸菌、酵母、植物細胞、昆虫細胞、動物細胞等の培養細胞；上述したベクターが導入された、カイコ等の昆虫生体；上述したベクターが導入された、タバコ等の植物体等が挙げられる。

【0076】

組換えベクターの宿主への導入（形質転換）は従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、カルシウム処理された菌体を用いるコンピテント細胞法や、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、プラスミドベクター以外にも、ファージベクター、ウイルスベクター等を宿主に感染させて形質転換する方法を利用してもよい。

30

【0077】

[免疫抑制剤]

1実施形態において、本発明は、上述した抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片を有効成分として含有する免疫抑制剤を提供する。

【0078】

実施例において後述するように、本実施形態の免疫抑制剤は、混合リンパ球反応（mixed lymphocyte reaction、MLR）アッセイにおけるCD8⁺T細胞の増殖を抑制することができる。

40

【0079】

また、実施例において後述するように、本実施形態の免疫抑制剤は、移植片対宿主病マウスモデルにおいて、移植片対宿主病の予防及び治療のいずれにも効果を示すことが確認されている。

【0080】

したがって、本実施形態の免疫抑制剤は、移植片対宿主病の予防又は治療剤であるといえることができる。また、本実施形態の免疫抑制剤は、臓器移植拒絶の予防又は治療剤であるということもできる。

【0081】

50

本実施形態の免疫抑制剤は、薬学的に許容される担体、その他の添加物を含有する医薬組成物であってもよい。薬学的に許容される担体としては、賦形剤、安定剤、注射剤用溶剤等が挙げられる。注射剤用溶剤としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム等の補助薬を含む等張液が挙げられる。その他の添加物としては、例えば、pH調節剤、粘度改良剤、着色剤、移植片対宿主病や臓器移植拒絶の治療において従来使用されてきた、ステロイド類、免疫抑制剤等が挙げられる。

【0082】

本実施形態の免疫抑制剤又は上記の医薬組成物の剤型は限定されず、例えば凍結乾燥剤、粉末製剤、pHが調整された緩衝液による溶液製剤、注射用マイクロカプセル剤等が挙げられる。

10

【0083】

本実施形態の免疫抑制剤又は上記の医薬組成物は、注射剤又は点滴注入剤として、静脈内投与等により患者に投与される。その投与量、投与経路、処方は、患者の症状、体重、年齢、性別等に応じて適宜決定すればよい。

【0084】

本実施形態の免疫抑制剤又は上記の医薬組成物の投与量は、患者の症状、体重、年齢、性別等によって異なり、一概には決定できないが、処置を必要とするヒト患者に対し、1回の投与において1kg体重あたり、有効成分(抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片)が例えば1 μ g~100mg、例えば50 μ g~50mg含まれる量を、1日あたり1回~数回投与すればよい。

20

【0085】

[その他の実施形態]

1実施形態において、本発明は、DNAM-1及びCD155の結合阻害物質の有効量を、治療を必要とする患者に投与する工程を備える、制御性T細胞の活性化方法を提供する。DNAM-1及びCD155の結合阻害物質としては、上述したものが挙げられる。

【0086】

1実施形態において、本発明は、制御性T細胞の活性化のための、DNAM-1及びCD155の結合阻害物質を提供する。DNAM-1及びCD155の結合阻害物質としては、上述したものが挙げられる。

30

【0087】

1実施形態において、本発明は、制御性T細胞の活性化剤を製造するための、DNAM-1及びCD155の結合阻害物質の使用を提供する。DNAM-1及びCD155の結合阻害物質としては、上述したものが挙げられる。

【0088】

1実施形態において、本発明は、DNAM-1及びCD155の結合阻害物質の有効量を、治療を必要とする患者に投与する工程を備える、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、自己免疫疾患、線維化疾患、炎症性腸炎若しくはアレルギーの予防又は治療方法を提供する。DNAM-1及びCD155の結合阻害物質としては、上述したものが挙げられる。

【0089】

1実施形態において、本発明は、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、自己免疫疾患、線維化疾患、炎症性腸炎若しくはアレルギーの予防又は治療のための、DNAM-1及びCD155の結合阻害物質を提供する。DNAM-1及びCD155の結合阻害物質としては、上述したものが挙げられる。

40

【0090】

1実施形態において、本発明は、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、自己免疫疾患、線維化疾患、炎症性腸炎若しくはアレルギーの予防剤又は治療剤を製造するための、DNAM-1及びCD155の結合阻害物質の使用を提供する。DNAM-1及びCD155の結合阻害物質としては、上述したものが挙げられる。

【0091】

50

1実施形態において、本発明は、上述した抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片の有効量を、治療を必要とする患者に投与する工程を備える、移植片対宿主病又は臓器移植拒絶の治療又は予防方法を提供する。

【0092】

1実施形態において、本発明は、移植片対宿主病又は臓器移植拒絶の治療又は予防のための、上述した抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片を提供する。

【0093】

1実施形態において、本発明は、移植片対宿主病又は臓器移植拒絶の治療剤又は予防剤を製造するための上述した抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片の使用を提供する。

【実施例】

【0094】

次に実験例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実験例に限定されるものではない。

【0095】

[実験例1]

(抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体の作製)

マウスリンパ球細胞であるBW5147細胞株にヒトDNAM-1遺伝子を導入し、ヒトDNAM-1タンパク質を発現させた。この細胞を抗原としてマウスを免疫し、常法によりハイブリドーマを作製した。得られたハイブリドーマ株の中からヒトDNAM-1タンパク質に対する反応性を指標として抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体No.1~6を産生するクローンをそれぞれ取得した。

【0096】

続いて、常法により樹立したハイブリドーマ株から抗体重鎖遺伝子及び抗体軽鎖遺伝子をクローニングし、抗体重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を同定した。図1は、抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体No.1~6の重鎖のアミノ酸配列をアラインメントした結果を示す図である。図1中、下線はCDR1~3を示す。図2は、抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体No.1~6の軽鎖のアミノ酸配列をアラインメントした結果を示す図である。図2中、下線はCDR1~3を示す。また、下記表1に、各モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列と配列表の配列番号との対応を示す。

【0097】

【表1】

抗体	重鎖可変領域全長	軽鎖可変領域全長
No. 1	配列番号7	配列番号8
No. 2	配列番号9	配列番号10
No. 3	配列番号11	配列番号12
No. 4	配列番号13	配列番号14
No. 5	配列番号15	配列番号16
No. 6	配列番号17	配列番号18

【0098】

[実験例2]

(抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体の反応性の検討1)

実験例1で作製したモノクローナル抗体No.1及びNo.2の反応性を検討した。具体的には、マウスリンパ球細胞であるBW5147細胞株(以下、「BW」という場合がある。)、及びヒトDNAM-1タンパク質を発現させたBW5147細胞株(以下、「DNAM-1/BW」という場合がある。)に、モノクローナル抗体No.1及びNo.2を反応させ、フローサイトメトリー解析を行った。対照にはコントロールIgG1抗体を使用した。1×10⁵個の各細胞に対し、30ngの各抗体を反応させた。抗体は氷上

10

20

30

40

50

で30分間反応させた。

【0099】

図3(a)は、BW細胞にモノクローナル抗体No.1を反応させた結果を示すグラフである。図3(b)は、DNAM-1/BW細胞にモノクローナル抗体No.1を反応させた結果を示すグラフである。図3(c)は、BW細胞にモノクローナル抗体No.2を反応させた結果を示すグラフである。図3(d)は、DNAM-1/BW細胞にモノクローナル抗体No.2を反応させた結果を示すグラフである。

【0100】

その結果、モノクローナル抗体No.1及びNo.2のいずれもBW細胞に発現させたDNAM-1タンパク質を特異的に認識することが確認された。

10

【0101】

[実験例3]

(抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体の反応性の検討2)

実験例1で作製したモノクローナル抗体No.1及びNo.2のヒト末梢血リンパ球表面に存在するDNAM-1タンパク質に対する反応性を検討した。

【0102】

ヒト末梢血リンパ球中に存在するCD3⁺CD4⁺細胞(CD4⁺T細胞)、CD3⁺CD8⁺細胞(CD8⁺T細胞)、CD3⁻CD19⁺細胞(B細胞)、CD3⁻CD56⁺細胞(NK細胞)、CD3⁺CD56⁺細胞(NKT細胞)、CD14⁺細胞(単球)に対するモノクローナル抗体No.1及びNo.2の反応性を検討した。対照にはコントロールIgG1抗体を使用した。1×10⁵個の末梢血リンパ球に対し、モノクローナル抗体No.1及びNo.2をそれぞれ100ng反応させた。抗体は氷上で30分間反応させた。

20

【0103】

図4(a)は、CD4⁺T細胞に対するモノクローナル抗体No.1の反応性を示す結果である。図4(b)は、CD8⁺T細胞に対するモノクローナル抗体No.1の反応性を示す結果である。図4(c)は、B細胞に対するモノクローナル抗体No.1の反応性を示す結果である。図4(d)は、CD4⁺T細胞に対するモノクローナル抗体No.2の反応性を示す結果である。図4(e)は、CD8⁺T細胞に対するモノクローナル抗体No.2の反応性を示す結果である。図4(f)は、B細胞に対するモノクローナル抗体No.2の反応性を示す結果である。図4(g)は、NK細胞に対するモノクローナル抗体No.1の反応性を示す結果である。図4(h)は、NKT細胞に対するモノクローナル抗体No.1の反応性を示す結果である。図4(i)は、単球に対するモノクローナル抗体No.1の反応性を示す結果である。図4(j)は、NK細胞に対するモノクローナル抗体No.2の反応性を示す結果である。図4(k)は、NKT細胞に対するモノクローナル抗体No.2の反応性を示す結果である。図4(l)は、単球に対するモノクローナル抗体No.2の反応性を示す結果である。

30

【0104】

その結果、モノクローナル抗体No.1及びNo.2のいずれも、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、B細胞、NK細胞、NKT細胞、単球の細胞表面に存在するDNAM-1タンパク質に対する反応性を有することが確認された。

40

【0105】

[実験例4]

(抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体の反応性の検討3)

実験例1で作製したモノクローナル抗体No.1~No.6を用いた競合アッセイを行った。より具体的には、まず、上述したDNAM-1/BW細胞1×10⁵個に対し、100ngのモノクローナル抗体No.2を反応させた(前処理)。続いて、段階希釈したモノクローナル抗体No.1、3~6をそれぞれ反応させた。抗体は氷上で30分間反応させた。前処理なしのDNAM-1/BW細胞に対する各抗体の反応性も検討した。

【0106】

50

図5(a)は、モノクローナル抗体No. 1の結果を示すグラフである。図5(b)は、モノクローナル抗体No. 3の結果を示すグラフである。図5(c)は、モノクローナル抗体No. 4の結果を示すグラフである。図5(d)は、モノクローナル抗体No. 5の結果を示すグラフである。図5(e)は、モノクローナル抗体No. 6の結果を示すグラフである。

【0107】

図5(a)の結果から、モノクローナル抗体No. 1は、予めモノクローナル抗体No. 2を反応させたDNAM-1/BW細胞とも良好な反応性を示すことが明らかとなった。この結果は、モノクローナル抗体No. 1が、モノクローナル抗体No. 2よりもDNAM-1タンパク質に対する反応性が高いことを示す。

10

【0108】

また、図5(b)の結果から、モノクローナル抗体No. 3は、予めモノクローナル抗体No. 2を反応させたDNAM-1/BW細胞にはあまり反応しないことが明らかとなった。この結果は、モノクローナル抗体No. 2が、モノクローナル抗体No. 3よりもDNAM-1タンパク質に対する反応性が高いことを示す。

【0109】

また、図5(c)の結果から、モノクローナル抗体No. 4は、予めモノクローナル抗体No. 2を反応させたDNAM-1/BW細胞にはあまり反応しないことが明らかとなった。この結果は、モノクローナル抗体No. 2が、モノクローナル抗体No. 4よりもDNAM-1タンパク質に対する反応性が高いことを示す。

20

【0110】

また、図5(d)の結果から、モノクローナル抗体No. 5は、予めモノクローナル抗体No. 2を反応させたDNAM-1/BW細胞に対する反応性を有することが示された。後述する実験例5の結果と総合すると、モノクローナル抗体No. 5とモノクローナル抗体No. 2とはエピトープが競合していない可能性が考えられた。

【0111】

また、図5(e)の結果も図5(d)の結果と同様であり、後述する実験例5の結果と総合すると、モノクローナル抗体No. 6とモノクローナル抗体No. 2とはエピトープが競合していない可能性が考えられた。

30

【0112】

[実験例5]

(抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体の反応性の検討4)

DNAM-1/BW細胞に予め反応させる抗体を入れ替えて、実験例4と同様の実験を行った。より具体的には、まず、上述したDNAM-1/BW細胞 1×10^5 個に対し、飽和量のモノクローナル抗体No. 1、3~6をそれぞれ反応させた(前処理)。具体的には、モノクローナル抗体No. 1を30ng、No. 3を300ng、No. 4を300ng、No. 5を500ng、No. 6を1000ng使用した。

【0113】

なお、上述したDNAM-1/BW細胞 1×10^5 個の細胞表面に発現したヒトDNAM-1抗体を飽和することができる抗体の最低量は、モノクローナル抗体No. 1では30ngであり、モノクローナル抗体No. 2では50ngであり、モノクローナル抗体No. 3では100ngであり、モノクローナル抗体No. 4では100ngであり、モノクローナル抗体No. 5では300ngであり、モノクローナル抗体No. 6では300ngであった。続いて、段階希釈したモノクローナル抗体No. 2をそれぞれ反応させた。抗体は氷上で30分間反応させた。前処理なしのDNAM-1/BW細胞に対する各抗体の反応性も検討した。

40

【0114】

図6(a)は、モノクローナル抗体No. 1の結果を示すグラフである。図6(b)は、モノクローナル抗体No. 3の結果を示すグラフである。図6(c)は、モノクローナル抗体No. 4の結果を示すグラフである。図6(d)は、モノクローナル抗体No. 5

50

の結果を示すグラフである。図 6 (e) は、モノクローナル抗体 No . 6 の結果を示すグラフである。

【 0 1 1 5 】

図 6 (a) の結果から、モノクローナル抗体 No . 2 は、予めモノクローナル抗体 No . 1 を反応させた DNAM - 1 / BW 細胞にはあまり反応しないことが明らかとなった。この結果は、上述した実験例 4 の結果と総合すると、モノクローナル抗体 No . 1 が、モノクローナル抗体 No . 2 よりも DNAM - 1 タンパク質に対する反応性が高いことを更に支持するものである。

【 0 1 1 6 】

また、図 6 (b) の結果から、モノクローナル抗体 No . 2 は、予めモノクローナル抗体 No . 3 を反応させた DNAM - 1 / BW 細胞とも比較的良好に反応することが明らかとなった。この結果は、上述した実験例 4 の結果と総合すると、モノクローナル抗体 No . 2 が、モノクローナル抗体 No . 3 よりも DNAM - 1 タンパク質に対する反応性が高いことを更に支持するものである。

10

【 0 1 1 7 】

また、図 6 (c) の結果から、モノクローナル抗体 No . 2 は、予めモノクローナル抗体 No . 4 を反応させた DNAM - 1 / BW 細胞とも比較的良好に反応することが明らかとなった。この結果は、上述した実験例 4 の結果と総合すると、モノクローナル抗体 No . 2 が、モノクローナル抗体 No . 4 よりも DNAM - 1 タンパク質に対する反応性が高いことを更に支持するものである。

20

【 0 1 1 8 】

また、図 6 (d) の結果から、モノクローナル抗体 No . 2 は、予めモノクローナル抗体 No . 5 を反応させた DNAM - 1 / BW 細胞に対する反応性を有することが示された。この結果と上述した実験例 4 の結果を総合すると、モノクローナル抗体 No . 2 とモノクローナル抗体 No . 5 とはエピトープが競合していない可能性が考えられた。

【 0 1 1 9 】

また、図 6 (e) の結果も図 6 (d) の結果と同様であり、上述した実験例 4 の結果と総合すると、モノクローナル抗体 No . 2 とモノクローナル抗体 No . 6 とはエピトープが競合していない可能性が考えられた。

30

【 0 1 2 0 】

[実験例 6]

(抗ヒト DNAM - 1 モノクローナル抗体の反応性の検討 5)

DNAM - 1 タンパク質は CD 1 5 5 タンパク質と相互作用することが知られている。そこで、実験例 1 で作製したモノクローナル抗体 No . 1 ~ No . 6 が、DNAM - 1 タンパク質と CD 1 5 5 タンパク質との相互作用を阻害することができるか否かを検討した。

【 0 1 2 1 】

まず、可溶化ヒト CD 1 5 5 タンパク質を準備した。具体的には、ヒト CD 1 5 5 タンパク質とヒト Ig G 抗体定常領域との融合タンパク質 (以下、「hCD 1 5 5 - Fc」という場合がある。) を定法により作製した。なお、ヒト CD 1 5 5 タンパク質の RefSeq ID は NP_001129240 である。

40

【 0 1 2 2 】

続いて、上述した DNAM - 1 / BW 細胞 1×10^5 個に hCD 1 5 5 - Fc タンパク質の飽和量 (1 0 0 0 n g) を予め反応させた。続いて、上記の DNAM - 1 / BW 細胞に、段階希釈したモノクローナル抗体 No . 1 ~ No . 6 をそれぞれ反応させた。反応は氷上で 3 0 分間行った。

【 0 1 2 3 】

図 7 (a) ~ (e) は、それぞれモノクローナル抗体 No . 1、3 ~ 6 の結果を示すグラフである。比較のために、図 7 (a) ~ (e) のいずれにもモノクローナル抗体 No . 2 の結果を示す。

50

【 0 1 2 4 】

図 7 (a) の結果から、モノクローナル抗体 No . 1 は、h C D 1 5 5 - F c タンパク質を予め反応させた D N A M - 1 / B W 細胞に良好に反応することができ、その反応性は、モノクローナル抗体 No . 2 よりも高いことが明らかとなった。

【 0 1 2 5 】

また、図 7 (b) の結果から、モノクローナル抗体 No . 3 は、h C D 1 5 5 - F c タンパク質を予め反応させた D N A M - 1 / B W 細胞に良好に反応することができ、その反応性は、モノクローナル抗体 No . 2 と同程度であることが明らかとなった。

【 0 1 2 6 】

また、図 7 (c) の結果から、モノクローナル抗体 No . 4 は、h C D 1 5 5 - F c タンパク質を予め反応させた D N A M - 1 / B W 細胞に良好に反応することができ、その反応性は、モノクローナル抗体 No . 2 と同程度であることが明らかとなった。

10

【 0 1 2 7 】

また、図 7 (d) の結果から、モノクローナル抗体 No . 5 は、h C D 1 5 5 - F c タンパク質を予め反応させた D N A M - 1 / B W 細胞と反応するものの、その反応性は、モノクローナル抗体 No . 2 よりも低いことが明らかとなった。

【 0 1 2 8 】

また、図 7 (e) の結果から、モノクローナル抗体 No . 6 は、h C D 1 5 5 - F c タンパク質を予め反応させた D N A M - 1 / B W 細胞と反応するものの、その反応性は、モノクローナル抗体 No . 2 よりも低いことが明らかとなった。

20

【 0 1 2 9 】

[実験例 7]

(抗ヒト D N A M - 1 モノクローナル抗体の反応性の検討 6)

実験例 6 において、h C D 1 5 5 - F c タンパク質を予め反応させた D N A M - 1 / B W 細胞に、段階希釈したモノクローナル抗体 No . 1 ~ No . 6 をそれぞれ反応させた後、D N A M - 1 / B W 細胞表面の D N A M - 1 タンパク質に結合した h C D 1 5 5 - F c タンパク質を検出した。h C D 1 5 5 - F c タンパク質の検出は、抗ヒト I g G 抗体を用いて行った。反応は氷上で 3 0 分間行った。

【 0 1 3 0 】

図 8 (a) ~ (e) は、それぞれモノクローナル抗体 No . 1、3 ~ 6 の結果を示すグラフである。比較のために、図 8 (a) ~ (e) のいずれにもモノクローナル抗体 No . 2 の結果を示す。

30

【 0 1 3 1 】

図 8 (a) の結果から、モノクローナル抗体 No . 1 を反応させた後に残存する h C D 1 5 5 - F c タンパク質の量は、モノクローナル抗体 No . 1 の濃度依存的に減少することが明らかとなった。

【 0 1 3 2 】

また、反応させたモノクローナル抗体の濃度が高い領域では、h C D 1 5 5 - F c タンパク質が全くなることが明らかとなった。この結果は、モノクローナル抗体 No . 1 及び No . 2 のいずれも、D N A M - 1 タンパク質と C D 1 5 5 タンパク質との相互作用を完全に阻害することができることを示す。また、D N A M - 1 タンパク質と C D 1 5 5 タンパク質との相互作用を完全に阻害するために必要な抗体量は、モノクローナル抗体 No . 1の方がモノクローナル抗体 No . 2 よりも少なかった。より具体的には、D N A M - 1 タンパク質と C D 1 5 5 タンパク質との相互作用を完全に阻害するために必要な抗体量は、モノクローナル抗体 No . 1 では 1 0 0 n g であり、モノクローナル抗体 No . 2 では 3 0 0 n g であった。

40

【 0 1 3 3 】

図 8 (b) の結果から、モノクローナル抗体 No . 3 を反応させた後に残存する h C D 1 5 5 - F c タンパク質の量は、モノクローナル抗体 No . 3 の濃度依存的に減少することが明らかとなった。

50

【0134】

また、反応させたモノクローナル抗体の濃度が低い領域では、モノクローナル抗体 No. 3 を反応させた後に残存する hCD155-Fc タンパク質の量は、モノクローナル抗体 No. 2 を反応させた後に残存する hCD155-Fc タンパク質の量よりも少なかった。この結果は、反応させたモノクローナル抗体の濃度が低い領域では、モノクローナル抗体 No. 3 が、モノクローナル抗体 No. 2 よりも、DNAM-1 タンパク質と CD155 タンパク質との相互作用を阻害する活性が高いことを示す。また、反応させたモノクローナル抗体の濃度が高い領域では、モノクローナル抗体 No. 2 と、モノクローナル抗体 No. 3 との反応性の差が小さかった。DNAM-1 タンパク質と CD155 タンパク質との相互作用を完全に阻害するために必要なモノクローナル抗体 No. 3 の量は、300 ng であった。

10

【0135】

図8(c)の結果から、モノクローナル抗体 No. 4 を反応させた後に残存する hCD155-Fc タンパク質の量は、モノクローナル抗体 No. 4 の濃度依存的に減少することが明らかとなった。

【0136】

また、モノクローナル抗体 No. 4 を反応させた後に残存する hCD155-Fc タンパク質の量は、モノクローナル抗体 No. 2 を反応させた後に残存する hCD155-Fc タンパク質の量よりも多かった。この結果は、モノクローナル抗体 No. 2 が、モノクローナル抗体 No. 4 よりも、DNAM-1 タンパク質と CD155 タンパク質との相互作用を阻害する活性が高いことを示す。DNAM-1 タンパク質と CD155 タンパク質との相互作用を完全に阻害するために必要なモノクローナル抗体 No. 4 の量は、1000 ng であった。

20

【0137】

図8(d)の結果から、モノクローナル抗体 No. 5 を反応させても、hCD155-Fc タンパク質の量はあまり減少しないことが明らかとなった。この結果は、モノクローナル抗体 No. 5 は、DNAM-1 タンパク質と CD155 タンパク質との相互作用を阻害する活性が低いことを示す。モノクローナル抗体 No. 5 を 3000 ng 使用しても、DNAM-1 タンパク質と CD155 タンパク質との相互作用を完全に阻害することはできなかった。

30

【0138】

また、図8(e)の結果から、モノクローナル抗体 No. 6 を反応させても、hCD155-Fc タンパク質の量はあまり減少しないことが明らかとなった。この結果は、モノクローナル抗体 No. 6 は、DNAM-1 タンパク質と CD155 タンパク質との相互作用を阻害する活性が低いことを示す。モノクローナル抗体 No. 6 を 3000 ng 使用しても、DNAM-1 タンパク質と CD155 タンパク質との相互作用を完全に阻害することはできなかった。

【0139】

[実験例8]

(抗ヒト DNAM-1 モノクローナル抗体の機能解析1)

40

実験例1で作製したモノクローナル抗体 No. 1 又は No. 2 の存在下で混合リンパ球反応 (mixed lymphocyte reaction, MLR) アッセイを行い、T細胞の増殖に対するモノクローナル抗体の影響を検討した。

【0140】

MLR アッセイとは、同種異系刺激細胞と T細胞を混合した場合に観察される T細胞の増殖を測定するものである。具体的には、まず、ヒト末梢血リンパ球から CD14⁺ 細胞 (5×10^5 個) を分取し、インターロイキン (IL) - 4 (40 ng/ウェル) 及び GM-CSF (50 ng/ウェル) の存在下で1週間培養し、樹状細胞を誘導した。CD14⁺ 細胞の培養は24ウェルプレートで行った。一方で、別のドナー由来のヒト末梢血リンパ球から CD8⁺ T細胞を分取した。

50

【0141】

続いて、CD8⁺T細胞を、飽和量以上(1 μ g/mL)の、F(ab')₂型モノクローナル抗体No.1、F(ab')₂型モノクローナル抗体No.2、又はF(ab')₂型コントロールIgG(対照)と反応させた後、上記の樹状細胞と共培養した。CD8⁺T細胞は5 \times 10⁴個であり、樹状細胞は5 \times 10³個であった。

【0142】

共培養の開始から48時間後に上記の抗体を1 μ g/mLずつ再び添加した。また、共培養の開始から72時間後にプロモデオキシウリジン(BrdU)を添加した。また、共培養の開始から96時間後に抗BrdU抗体で染色することによりCD8⁺T細胞の増殖を測定した。

10

【0143】

図9は、MLRアッセイの結果を示すグラフである。図9中、「*」は危険率5%未満で有意差があることを示す。その結果、モノクローナル抗体No.1及びNo.2のいずれを添加した場合においても、CD8⁺T細胞の増殖が有意に抑制されたことが明らかとなった。この結果は、モノクローナル抗体No.1及びNo.2が、ヒトT細胞の機能に作用できることを示す。

【0144】

[実験例9]

(抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体の機能解析2)

移植片対宿主病マウスモデルを用いて、実験例1で作製したモノクローナル抗体No.1の機能を解析した。

20

【0145】

本実験例で使用した移植片対宿主病マウスモデルは、免疫不全マウスであるNOGマウス(NOD/Shi-scid, IL-2R nullマウス)とヒトCD155トランスジェニックマウスを交配して得られたhCD155Tg/NOGマウスに放射線照射した後、ヒト末梢血リンパ球を移植し、体重の変化又は生存率により移植片対宿主病の症状を測定するモデルである。

【0146】

図10は、本実験の実験プロトコルを示す図である。実験開始の前日に、hCD155Tg/NOGマウス(メス、8週齢)に1.2Gyの放射線照射を行った。続いて、実験開始の日に2.5 \times 10⁶個/匹のヒト末梢血リンパ球を尾静脈注射により移植し、更に300 μ g/0.2mLのF(ab')₂型モノクローナル抗体No.1を腹腔内投与した(n=6)。対照として、抗体の代わりにリン酸緩衝液(PBS)を投与したマウスを使用した(n=6)。続いて、マウスの体重の変化及び生存率を測定し、移植片対宿主病の症状を測定した。実験開始から3、7、11、14、18及び21日目にも上記と同量の抗体を腹腔内投与した。

30

【0147】

図11は、マウスの生存率を示すグラフである。その結果、モノクローナル抗体No.1を投与したマウスでは有意に生存率が上昇した。この結果は、モノクローナル抗体No.1を投与することにより、移植片対宿主病を予防することができることを示す。

40

【0148】

また、上記のマウスについて、血液中のグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(ALT)活性及びグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(AST)活性を測定し、肝機能の低下を検討した。血液中のALT及びASTの活性が上昇することは、肝臓が障害を受けていることを示す。

【0149】

図12(a)は、ALT活性を測定した結果を示すグラフである。また、図12(b)は、AST活性を測定した結果を示すグラフである。その結果、モノクローナル抗体No.1を投与したマウスでは、肝機能の低下が抑制されることが明らかとなった。

【0150】

50

[実験例 10]

(抗ヒト DNA M - 1 モノクローナル抗体の機能解析 3)

実験例 9 と同様の移植片対宿主病マウスモデルを用いて、実験例 1 で作製したモノクローナル抗体 No. 1 の機能を解析した。実験例 9 とは実験プロトコルを変更し、モノクローナル抗体 No. 1 による移植片対宿主病の治療効果を検討した。

【 0 1 5 1 】

図 1 3 は、本実験の実験プロトコルを示す図である。実験開始の前日に、hCD155 Tg / NOG マウス (メス、8 週齢) に 1.2 Gy の放射線照射を行った。続いて、実験開始の日に 2.5×10^6 個 / 匹のヒト末梢血リンパ球を尾静脈注射により移植した。続いて、マウスの体重の変化及び生存率を測定し、移植片対宿主病の症状を測定した。実験開始から 10、13、17、20 日目に $300 \mu\text{g} / 0.2 \text{ mL}$ の F (a b ')₂ 型モノクローナル抗体 No. 1 を腹腔内投与した。モノクローナル抗体 No. 1 の投与はマウスが死亡するまで週 2 回の割合で継続した。対照として、抗体の代わりに PBS を投与したマウスを使用した。

10

【 0 1 5 2 】

図 1 4 は、マウスの生存率を示すグラフである。その結果、モノクローナル抗体 No. 1 を投与したマウスでは有意に生存率が上昇した。この結果は、モノクローナル抗体 No. 1 を投与することにより、移植片対宿主病を治療することができることを示す。

【 0 1 5 3 】

[実験例 11]

(抗ヒト DNA M - 1 モノクローナル抗体の機能解析 4)

実験例 1 で作製したモノクローナル抗体 No. 1 とモノクローナル抗体 No. 2 の機能を比較した。より具体的には、まず、ヒト末梢血単核細胞から CD8⁺T 細胞を分離し、抗 CD3 抗体 (型式「555336」、BD Bioscience 社、 $0.25 \mu\text{g} / \text{mL}$)、抗 CD28 抗体 (型式「555725」、BD Bioscience 社、 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$) 及び IL - 2 (型式「554603」、BD Bioscience 社、 $0.02 \mu\text{g} / \text{mL}$) の存在下で 7 日間培養し、活性化した。

20

【 0 1 5 4 】

続いて、活性化した CD8⁺T 細胞に、コントロール IgG1 抗体 (対照)、モノクローナル抗体 No. 1 又はモノクローナル抗体 No. 2 を $10 \text{ mg} / 10^6$ 細胞の割合で添加し、4、30 分間インキュベートして結合させた。

30

【 0 1 5 5 】

続いて、抗体処理後の CD8⁺T 細胞に、標的細胞となる hCD155 発現細胞を、CD8⁺T 細胞 : hCD155 発現細胞 = 1 : 5 の割合で混合して 37 で 4 時間共培養した。hCD155 発現細胞としては、BW5147 細胞に hCD155 を強制発現させた細胞を使用した。

【 0 1 5 6 】

その後、各 CD8⁺T 細胞の細胞傷害活性を評価した。CD8⁺T 細胞の細胞傷害活性は、CD8⁺T 細胞における CD107a の発現により評価した。なお、CD107a は CD8⁺T 細胞の脱顆粒マーカーである。

40

【 0 1 5 7 】

図 1 5 は、検討結果を示すグラフである。コントロール IgG1 抗体 (対照) で処理した CD8⁺T 細胞における CD107a 発現細胞の割合を 100% とし、モノクローナル抗体 No. 1 又はモノクローナル抗体 No. 2 で処理した CD8⁺T 細胞における CD107a 発現細胞の割合を示した。

【 0 1 5 8 】

図 1 5 中、 $p = 0.002$ は危険率 0.2% 未満で有意差が存在することを示し、 $p = 0.004$ は危険率 0.4% 未満で有意差が存在することを示し、 $p = 0.02$ は危険率 2% 未満で有意差が存在することを示す。

【 0 1 5 9 】

50

その結果、CD8⁺T細胞上のDNAM-1と標的細胞上のhCD155の結合を抗DNAM-1抗体で阻害すると、CD8⁺T細胞の細胞傷害活性が阻害されることが明らかとなった。また、その阻害の程度は、モノクローナル抗体No.1の方がモノクローナル抗体No.2よりも有意に高いことが明らかとなった。

【0160】

[実験例12]

(制御性T細胞に関する検討)

実験例9と同様の移植片対宿主病マウスモデルを用いて、実験例1で作製したモノクローナル抗体No.1の機能を解析した。

【0161】

具体的には、まず、実験開始の前日に、免疫不全マウスであるNOGマウス(NOD/Shi-scid, IL-2R nullマウス)とヒトCD155トランスジェニックマウスを交配して得られたhCD155Tg/NOGマウス(メス、8週齢)に1.2Gyの放射線照射を行った。続いて、実験開始の日に 2.5×10^6 個/匹のヒト末梢血リンパ球を尾静脈注射により移植し、更に300 μ g/0.2mLのF(ab')₂型モノクローナル抗体No.1を腹腔内投与した(n=6)。対照として、抗体の代わりにリン酸緩衝液(PBS)を投与したマウスを使用した(n=6)。実験開始から3、7、11日目にも上記と同量の抗体を腹腔内投与した。

10

【0162】

続いて、実験開始から14日目にマウスから脾臓及び末梢血を採取してフローサイトメトリーにより解析し、これらに含まれる制御性T細胞の割合を測定した。CD4⁺Foxp3⁺細胞を制御性T細胞として検出した。

20

【0163】

図16(a)は、モノクローナル抗体No.1を投与してから14日後のマウスの脾臓中のCD4⁺T細胞における制御性T細胞の割合を測定した結果を示すグラフである。また、図16(b)はモノクローナル抗体No.1を投与してから14日後のマウスの末梢血中のCD4⁺T細胞における制御性T細胞の割合を測定した結果を示すグラフである。

【0164】

その結果、モノクローナル抗体No.1を投与することにより、制御性T細胞の割合が顕著に増加したことが明らかとなった。

30

【0165】

[実験例13]

(自己免疫疾患に関する検討)

実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルを用いて抗DNAM-1抗体の機能を評価した。具体的には、まず、実験開始の前日に、C57BL/6Jマウスに100 μ g/0.2mLの抗マウスDNAM-1抗体を腹腔内投与した(n=8)。また、対照として、C57BL/6Jマウスに100 μ g/0.2mLのコントロールIgG抗体を腹腔内投与した(n=9)。

【0166】

続いて、実験開始時に、各群のマウスに50 μ g/0.2mLのMyelin oligodendrocyte glycoprotein(MOG)タンパク質の第33~55番目のアミノ酸配列に相当するペプチドを背部皮下投与した。また、200ng/0.2mLの百日咳毒素を腹腔内投与した。更に、実験開始から2日目にも各群のマウスに200ng/0.2mLの百日咳毒素を腹腔内投与した。

40

【0167】

続いて、実験開始から1、3、7、11、13日目に各群のマウスに100 μ g/0.2mLの抗マウスDNAM-1抗体又は100 μ g/0.2mLのコントロールIgG抗体をそれぞれ投与した。

【0168】

50

実験開始後のマウスを観察し、脳脊髄炎の発症率及び臨床スコアを測定した。臨床スコアは次の評価基準にしたがって評価したスコアの平均値とした。

(臨床スコア)

- 0 : 正常
- 1 : 尾のトーンス低下
- 2 : 尾の完全下垂
- 3 : 歩行異常
- 4 : 後肢の完全脱力
- 5 : 前肢麻痺を含む後肢の完全脱力
- 6 : 死亡

10

【0169】

図17(a)は脳脊髄炎の発症率を測定した結果を示すグラフである。また、図17(b)は臨床スコアの平均値を算出した結果を示すグラフである。図17(a)及び(b)中、横軸は実験開始後の時間(日)を示す。その結果、抗DNAM-1抗体を投与することにより、自己免疫性脳脊髄炎の臨床スコアが改善されることが明らかとなった。

【0170】

[実験例14]

(肝臓の線維化に関する検討)

抗DNAM-1抗体の投与の代わりにDNAM-1遺伝子欠損(以下、「DNAM-1 KO」という場合がある。)マウスを用いて肝臓の線維化に関する検討を行った。対照には野生型マウスを使用した。実験にはbile duct ligation(BDL)モデルを使用した。

20

【0171】

具体的には、まず、実験開始時に各群のマウスを開腹して総胆管を結索し、BDLモデルを作製した。続いて、実験開始から3、7、14、21日目に各群のマウスから眼窩採血を行った。続いて、採取した血液から血清を分離し、臨床化学分析装置(型式「ドライケム」、富士フイルム社)を用いてアルカリフォスファターゼ及び総ビリルビンを定量した。なお、アルカリフォスファターゼ及び総ビリルビンは肝臓及び胆道の障害の指標である。

【0172】

30

また、実験開始から21日目に各群のマウスを全身灌流して肝臓を摘出した。摘出した肝臓を固定し、パラフィン包埋して組織切片を作製し、シリウスレッド染色を行い顕微鏡観察した。シリウスレッドは、コラーゲン三本鎖らせんに結合する色素である。

【0173】

図18(a)は、血清中のアルカリフォスファターゼを定量した結果を示すグラフである。図18(a)中、「WT」は野生型マウスの結果であることを示し、「DNAM-1 KO」はDNAM-1遺伝子欠損マウスの結果であることを示し、「naive」は胆管結索処置を行っていないマウスの結果であることを示す。また、横軸は実験開始後の時間(日)を示す。その結果、DNAM-1遺伝子欠損マウスでは、対照の野生型マウスと比較して、血清中のアルカリフォスファターゼ量が有意に少ないことが明らかとなった。

40

【0174】

また、図18(b)は、血清中の総ビリルビンを定量した結果を示すグラフである。図18(b)中、「WT」は野生型マウスの結果であることを示し、「DNAM-1 KO」はDNAM-1遺伝子欠損マウスの結果であることを示し、「naive」は胆管結索処置を行っていないマウスの結果であることを示す。また、横軸は実験開始後の時間(日)を示す。その結果、DNAM-1遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、血清中の総ビリルビン量が有意に少ないことが明らかとなった。

【0175】

また、図19(a)及び(b)は肝臓組織の顕微鏡写真である。図19(a)は対照の野生型マウス(WT)の写真であり、図19(b)はDNAM-1遺伝子欠損マウス(D

50

NAM - 1 KO) の写真である。倍率はいずれも 20 倍である。その結果、DNAM - 1 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、肝臓の線維化が顕著に軽減していることが明らかとなった。

【0176】

以上の結果は、抗DNAM - 1抗体を生体に投与することにより、肝臓の線維化を軽減できることを示す。

【0177】

[実験例15]

(腎臓の線維化に関する検討)

抗DNAM - 1抗体の投与の代わりにDNAM - 1遺伝子欠損マウスを用いて腎臓の線維化に関する検討を行った。対照には野生型マウスを使用した。実験にはUnilateral ureteral obstruction (UUO) モデルを使用した。

【0178】

具体的には、まず、実験開始時に各群のマウスを開腹して右腎尿管を結索し、UUOモデルを作製した。一方、左腎は無処置とした。続いて、実験開始から7日目に各群のマウスを全身灌流して両腎を摘出した。続いて、摘出した腎臓をホルマリン固定し、パラフィン包埋して組織切片を作製した。続いて、組織切片をマッソントリクローム染色し、観察した。また、パラホルムアルデヒド固定した腎臓をOCTコンパウンドで包埋し、組織切片を作製した。続いて、組織切片を免疫染色し、線維化の指標の一つである α -smooth muscle actin (α -SMA) 陽性領域の面積を算出した。

【0179】

図20(a)はマッソントリクローム染色した腎臓の切断面の写真である。図20(b)は、図20(a)に基づいて腎皮質の面積を測定した結果を示すグラフである。図20(a)及び(b)中、「UUO」は尿管を結索した右腎の結果であることを示し、「CON」は無処置である左腎の結果であることを示し、「WT」は野生型マウスの結果であることを示し、「DNAM - 1 KO」はDNAM - 1遺伝子欠損マウスの結果であることを示す。また、図20(b)中、「*」は危険率5%未満で有意差があることを示し、「**」は危険率1%未満で有意差があることを示し、「N.S.」は有意差がないことを示す。その結果、DNAM - 1遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、尿管の結索による腎組織の破壊が有意に軽減したことが明らかとなった。

【0180】

また、図21(a)及び(b)は腎臓の組織切片を抗 α -SMA抗体で免疫染色した結果を示す顕微鏡写真である。図21(a)は対照である野生型マウスにおける、尿管を結索した右腎の組織切片の代表的な結果を示し、図21(b)はDNAM - 1遺伝子欠損マウスにおける、尿管を結索した右腎の組織切片の代表的な結果を示す。また、図21(c)は各群のマウスの腎臓組織における α -SMA陽性領域の面積を算出した結果を示すグラフである。

【0181】

図21(a)~(c)中、「WT」は野生型マウスの結果であることを示し、「DNAM - 1 KO」はDNAM - 1遺伝子欠損マウスの結果であることを示す。また、図21(c)中「CON」は無処置である左腎の結果であることを示す。その結果、DNAM - 1遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、尿管の結索による腎組織の線維化が顕著に軽減したことが明らかとなった。

【0182】

以上の結果は、抗DNAM - 1抗体を生体に投与することにより、腎臓の線維化を軽減できることを示す。

【0183】

[実験例16]

(炎症性腸炎に関する検討)

抗DNAM - 1抗体の投与の代わりにDNAM - 1遺伝子欠損マウスを用いて炎症性腸

10

20

30

40

50

炎に関する検討を行った。対照には野生型マウスを使用した。実験にはデキストラン硫酸（DSS）誘導マウス腸炎モデルを使用した。

【0184】

まず、実験開始の3日前からDNAM-1遺伝子欠損マウス（n=5）及び野生型マウス（n=5）を飼育して馴化させた。この間は通常の水を与えた。続いて、実験を開始し、水の代わりに2% DSS水溶液を与えて各群のマウスを飼育し、体重の変化を測定した。実験開始から9日目に各群のマウスをと殺し、大腸を摘出して腸管の長さを測定した。

【0185】

図22は、対照の野生型マウス（WT）及びDNAM-1遺伝子欠損マウス（KO）の体重を測定した結果を示すグラフである。図22中、「*」は危険率5%未満で有意差があることを示す。また、横軸は実験開始後の時間（日）を示す。その結果、DNAM-1遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、炎症性腸炎による体重の減少が有意に軽減したことが明らかとなった。

10

【0186】

また、図23（a）は、実験開始から9日目に摘出した、DNAM-1遺伝子欠損マウスの大腸の写真である。また、図23（b）は、実験開始から9日目に摘出した、対照の野生型マウスの大腸の写真である。また、図23（c）は図23（a）及び（b）の結果を数値化したグラフである。図23（a）～（c）中、「WT」は野生型マウスの結果であることを示し、「DNAM-1 KO」はDNAM-1遺伝子欠損マウスの結果であることを示し、「naive」は2% DSS水溶液の代わりに水を与えたマウスの結果であることを示す。また、図23（c）中、「N.S.」は有意差がなかったことを示す。その結果、DNAM-1遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、炎症性腸炎による腸管の短縮が有意に軽減したことが明らかとなった。

20

【0187】

以上の結果は、抗DNAM-1抗体を生体に投与することにより、炎症性腸炎の病態を軽減できることを示す。

【産業上の利用可能性】

【0188】

本発明によれば、ヒトの免疫反応を抑制することができる技術を提供することができる。

30

【 図 1 】

```

No. 1 1  --SQSLSLTCSVTGYSITSGYWNWIRQFPGNKLEWMGYISYDGSNNYNPS 50
No. 2 1  --SQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGTITTYNPS 50
No. 3 1  -----EISCKASGYTFITNYWLGWVKQRPGHLEWIGDIYPGGYIYNNE 50
No. 4 1  --KWLSEISCKASGYTFITNYWLGWVKQSHGKLEWIGDIYPYNGSITGVNQ 50
No. 5 1  -----SVTGYSTISG--YYWNIWIRQFPGNKLEWMGYISYDGSNNYNPS 50
No. 6 1  SQSLSLTCSVTGYSITSG--YYWNIWIRQFPGNKLEWMGYISYDGSNNYNPS 50
                                CDR1                                CDR2

No. 1 51  LKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCARAYYGNVYGVFDVWGA 100
No. 2 51  LKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCAELSMDYWGQGTSVTVS 100
No. 3 51  KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCANAYYRYKGFAYWQGC 100
No. 4 51  KFKSKATLTVDNSSSTAYMELRSLTSEDSAVYCAGYWYFDVWAGATVTV 100
No. 5 51  LKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCARERVMITASFVYWGQC 100
No. 6 51  LKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCARERVMITASFDVWQGC 100

No. 1 101  GTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGK----- 122
No. 2 101  SAKTTPPSVYPLAPGNLNSSTSFSLG----- 126
No. 3 101  TLVTVSAAKTTPPSVYPLAPL----- 114
No. 4 101  VSSAKTTPPSVYPLAPWK----- 116
No. 5 101  TTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGK----- 113
No. 6 101  TTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGK----- 121

```

【 図 2 】

```

No. 1 1  -----RVITTCASQSVSNDVAHYQQKPGQSPKLLIYY 50
No. 2 1  DIVLSQSPAILSVSPGERVFSFCRASQSIGTISIHVYQRTNGSPRLIKY 50
No. 3 1  -----VTMSCKSQSLLYSSNQKNYLAHYQQKPGQAPKLLIYY 50
No. 4 1  -----EKVSTTCASQDGTAVAHYQQKPGQSPKLLIYY 50
No. 5 1  -----SALWERVSLTCRASQETISGLSWLQQKPGDTIKRLIYA 50
No. 6 1  -----

                                CDR1

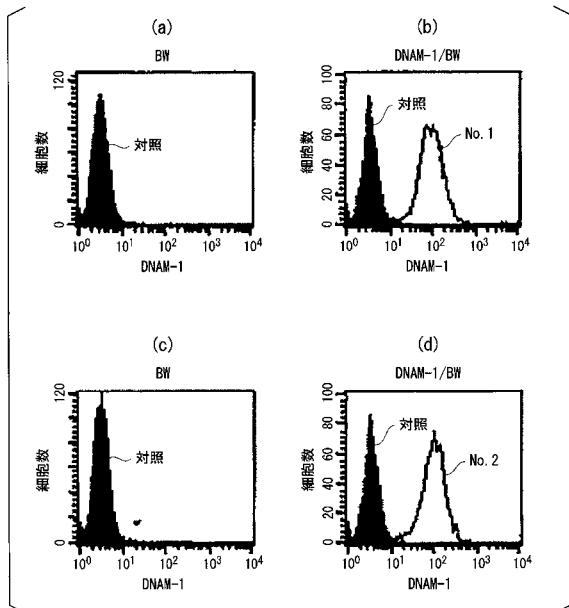
No. 1 51  ASNRYTGVPRDFTGSGYGTDFITVQAEFLAVYFCQDYSSPLTFGA 100
No. 2 51  ASESISGIPSRFSGSGSGDFTLINSVSEEDIAVYFCQSRSWPLTFGA 100
No. 3 51  ASTRSGVPRDFTGSGSGDFTLTISSVKAEDLAVYFCQYSSYPWTFGG 100
No. 4 51  ASTRHTGVPRDFTGSGSGDFTLTISSVQSEDLAVYFCQYSSYPWTFGG 100
No. 5 51  ASTLDSGVKPRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFADYFCQYASYPWTFGG 100
No. 6 51  -----

                                CDR2

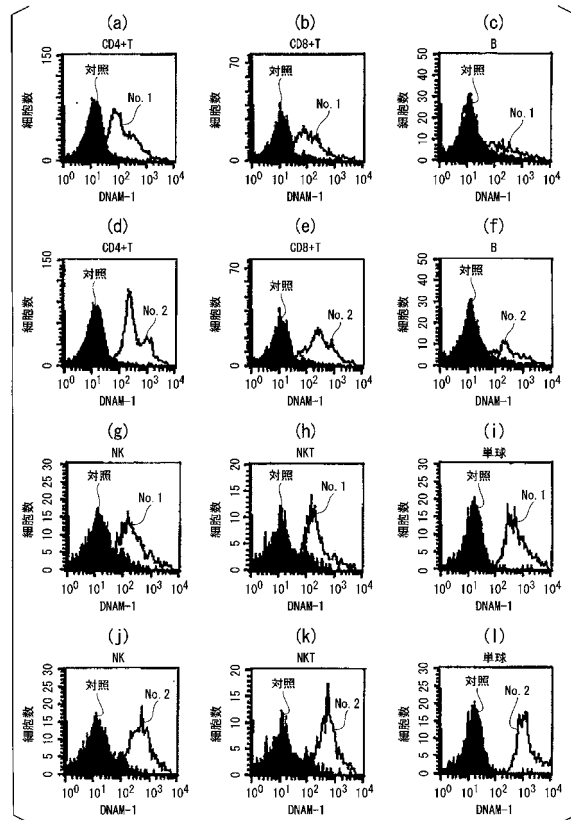
No. 1 101  GTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQT----- 115
No. 2 101  GTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQNHEFWIRYVTRLQHWYRAFPVIGDE 150
No. 3 101  GTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQ----- 120
No. 4 101  GTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQR----- 113
No. 5 101  GTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQ----- 113

```

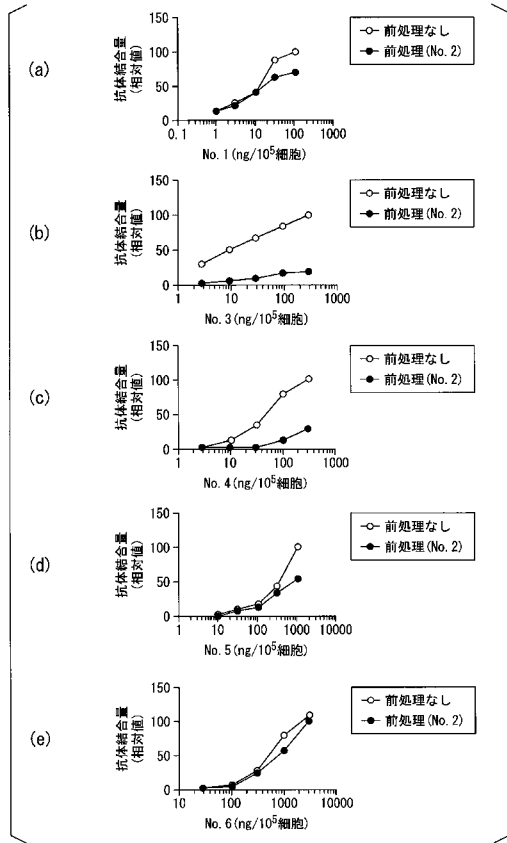
【 図 3 】



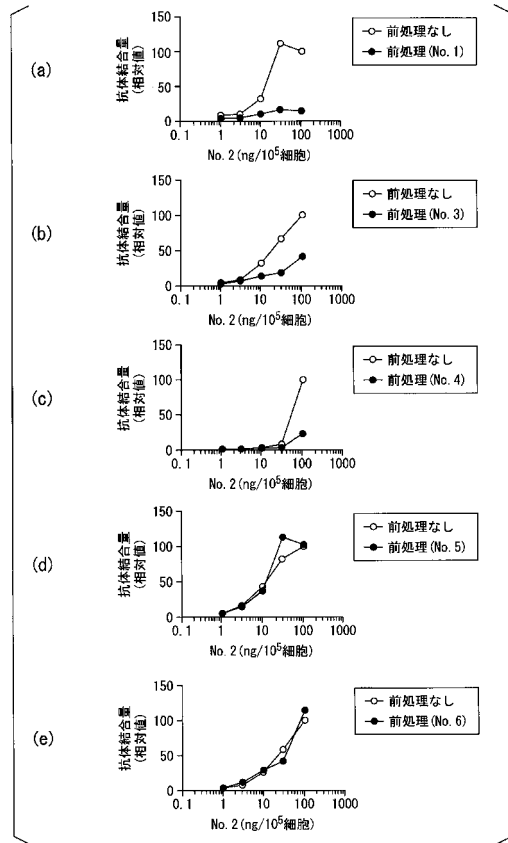
【 図 4 】



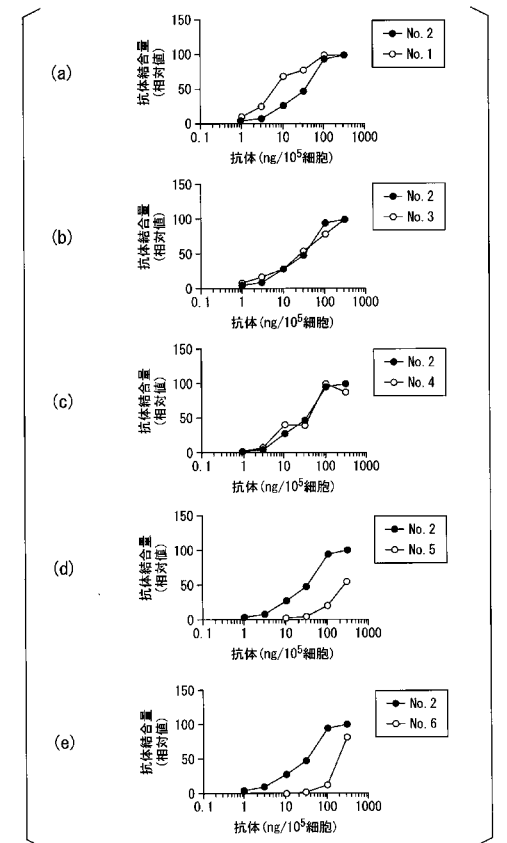
【 図 5 】



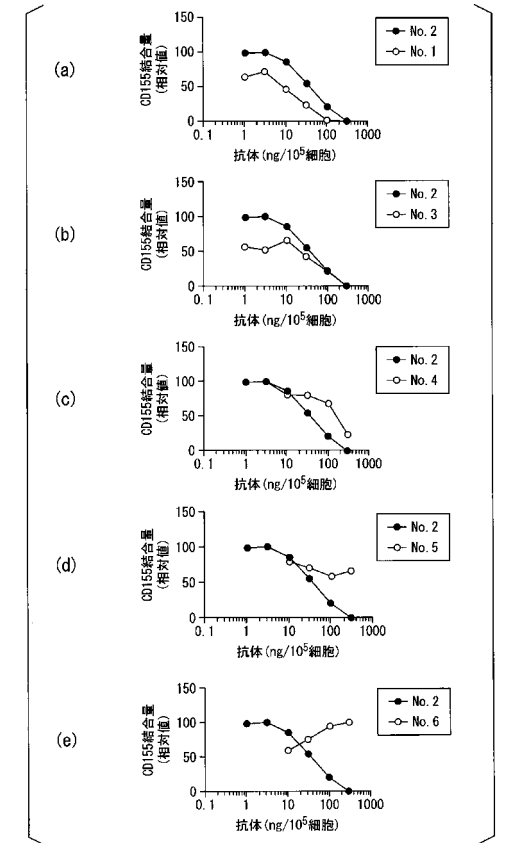
【 図 6 】



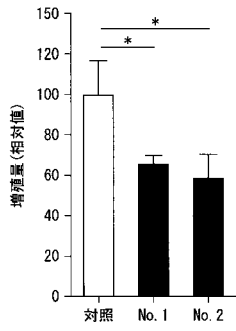
【 図 7 】



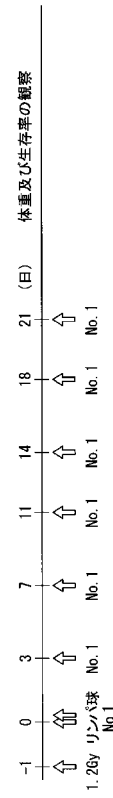
【 図 8 】



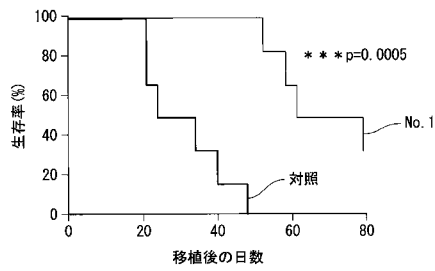
【 図 9 】



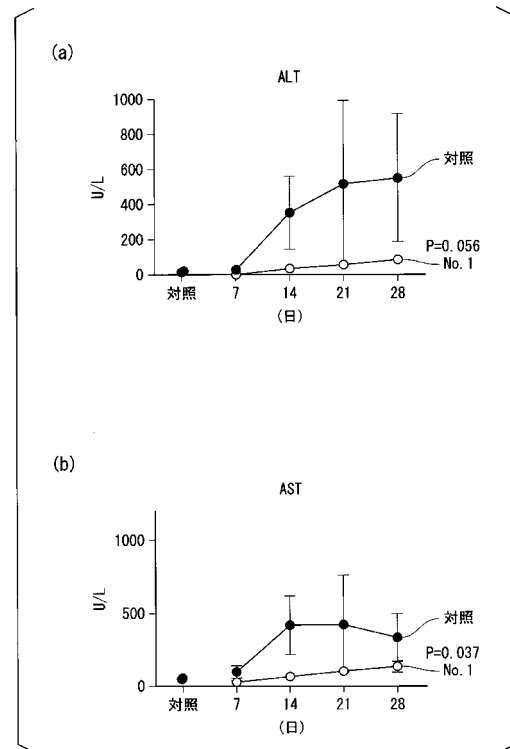
【 図 1 0 】



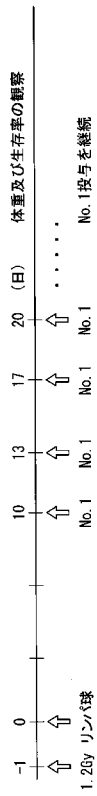
【 図 1 1 】



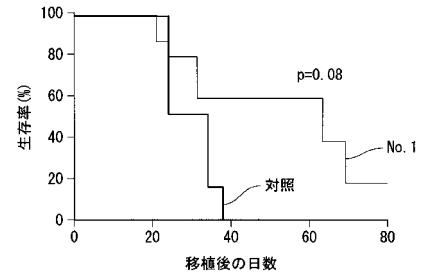
【 図 1 2 】



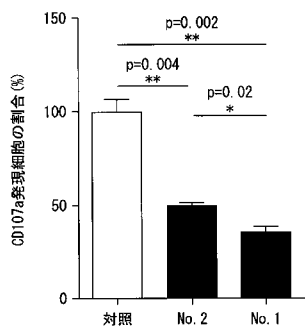
【 図 1 3 】



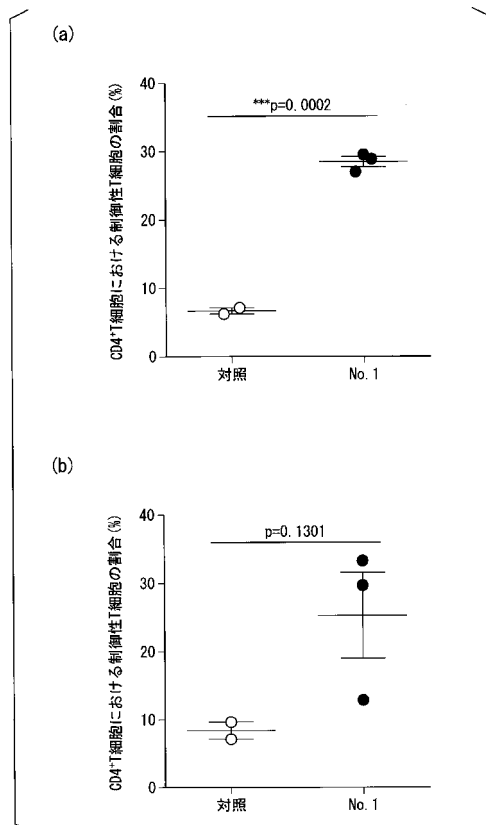
【 図 1 4 】



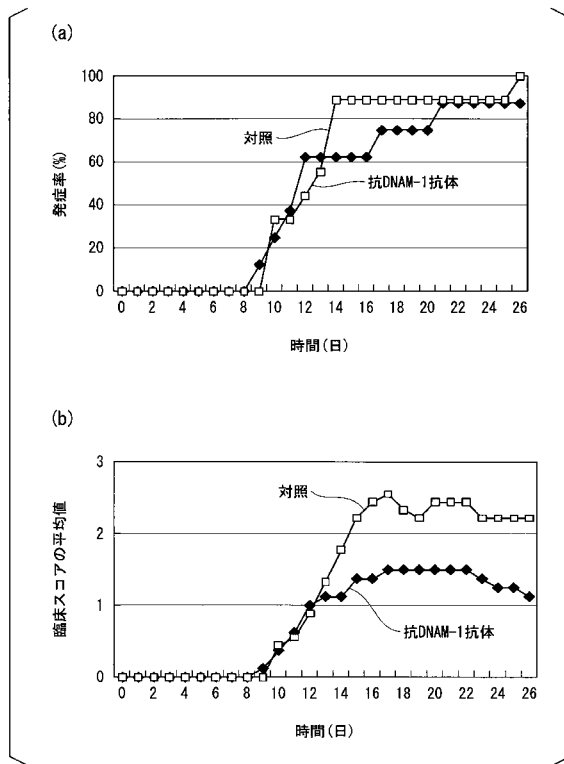
【 図 1 5 】



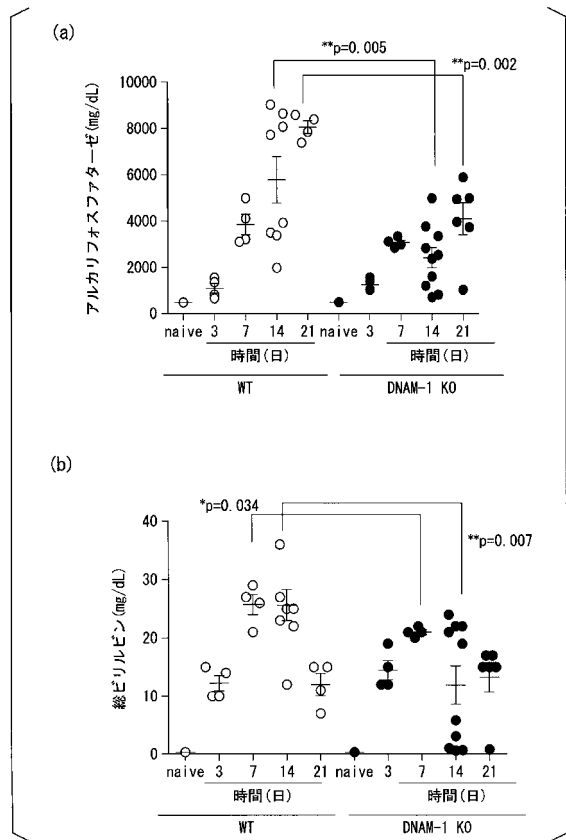
【 図 1 6 】



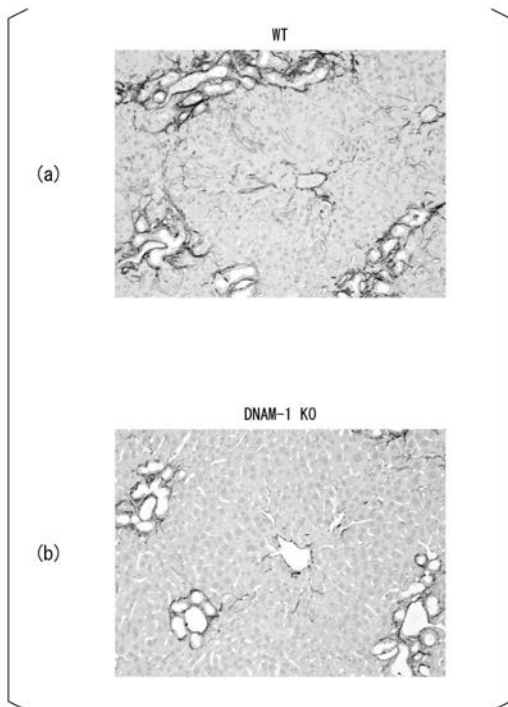
【 図 1 7 】



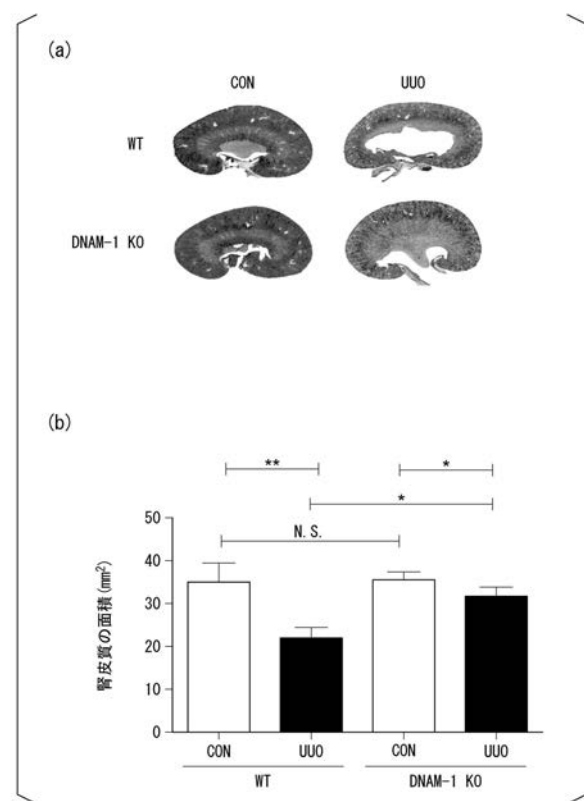
【 図 1 8 】



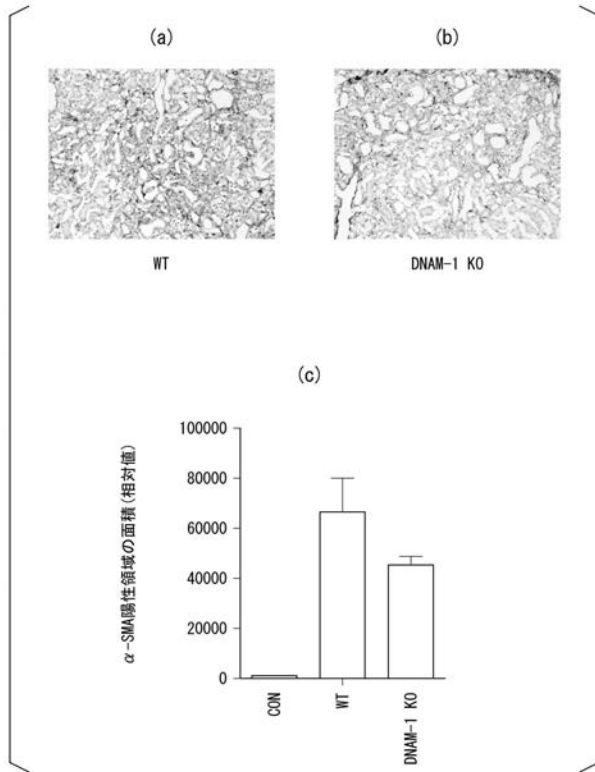
【 図 1 9 】



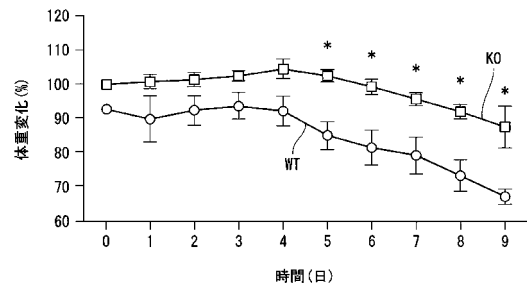
【 図 2 0 】



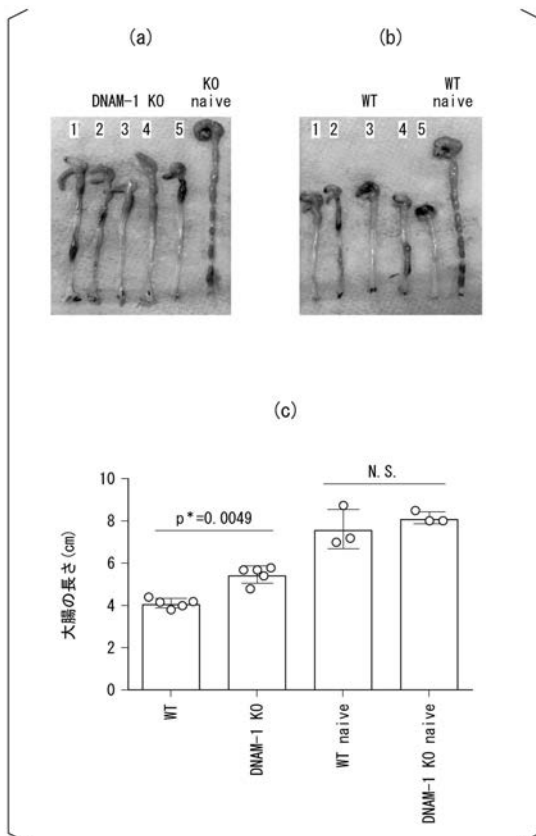
【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



【配列表】

2017183665000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成30年12月21日(2018.12.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

D N A X Accessory M o l e c u l e - 1 (D N A M - 1) 及び C D 1 5 5 の結合を阻害する物質からなる、制御性T細胞の活性化剤。

【請求項2】

D N A M - 1 及び C D 1 5 5 の結合を阻害する前記物質が、D N A M - 1 に対する特異的結合物質、D N A M - 1 発現阻害剤、C D 1 5 5 に対する特異的結合物質又はC D 1 5 5 発現阻害剤である、請求項1に記載の制御性T細胞の活性化剤。

【請求項3】

移植片対宿主病、臓器移植拒絶、自己免疫疾患、線維化疾患、炎症性腸炎若しくはアレルギーの予防又は治療用である、請求項1又は2に記載の制御性T細胞の活性化剤。

【請求項4】

D N A M - 1 及び C D 1 5 5 の結合を阻害する前記物質が、D N A M - 1 に対する特異的結合物質であり、

前記D N A M - 1 はヒトD N A M - 1 であり、

前記特異的結合物質は抗体又はその断片であり、

前記抗体又はその断片は、ヒトD N A M - 1 を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒトD N A M - 1 分子と反応させた場合に、I g G 型抗体全長に換算して 100 ng 以下で前記ヒトD N A M - 1 分子を飽和することができる、

請求項1～3のいずれか一項に記載の制御性T細胞の活性化剤。

【請求項5】

D N A M - 1 及び C D 1 5 5 の結合を阻害する前記物質が、D N A M - 1 に対する特異的結合物質であり、

前記D N A M - 1 はヒトD N A M - 1 であり、

前記特異的結合物質は抗体又はその断片であり、

前記抗体又はその断片は、ヒトD N A M - 1 を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒトD N A M - 1 分子を、ヒトC D 1 5 5 とI g G 型抗体定常領域との融合タンパク質 1000 ng で飽和させた後に反応させた場合に、I g G 型抗体全長に換算して 500 ng 以下で、前記融合タンパク質と前記ヒトD N A M - 1 分子との結合を完全に阻害することができる、

請求項1～4のいずれか一項に記載の制御性T細胞の活性化剤。

【請求項6】

前記抗体はヒト型抗体である、請求項4又は5に記載の制御性T細胞の活性化剤。

【請求項7】

前記抗体又はその断片は、

相補性決定領域(C D R) 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号1 ~ 3 のアミノ酸配列又は配列番号1 ~ 3 のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、C D R 1 ~ 3 が、それぞれ配列番号4 ~ 6 のアミノ酸配列又は配列番号4 ~ 6 のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有するか、又は

ヒトDNAM-1と結合させた場合に、CDR1～3が、それぞれ配列番号1～3のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1～3が、それぞれ配列番号4～6のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する抗体と競合する、

請求項4～6のいずれか一項に記載の制御性T細胞の活性化剤。

【請求項8】

前記抗体又はその断片は、

CDR1～3が、それぞれ配列番号1～3のアミノ酸配列又は配列番号1～3のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1～3が、それぞれ配列番号4～6のアミノ酸配列又は配列番号4～6のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、

請求項4～7のいずれか一項に記載の制御性T細胞の活性化剤。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか一項に記載の制御性T細胞の活性化剤と、薬学的に許容できる担体とを含む、制御性T細胞活性化用医薬組成物。

【請求項10】

ヒトDNAM-1を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒトDNAM-1分子と反応させた場合に、IgG型抗体全長に換算して100 ng以下で前記ヒトDNAM-1分子を飽和することができる、抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項11】

ヒトDNAM-1を強制発現させたリンパ球細胞 1×10^5 個の細胞表面に存在するヒトDNAM-1分子を、ヒトCD155とIgG型抗体定常領域との融合タンパク質1000 ngで飽和させた後に反応させた場合に、IgG型抗体全長に換算して500 ng以下で、前記融合タンパク質と前記ヒトDNAM-1分子との結合を完全に阻害することができる、抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項12】

ヒト型抗体又はその断片である、請求項10又は11に記載の抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項13】

CDR1～3が、それぞれ配列番号1～3のアミノ酸配列又は配列番号1～3のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1～3が、それぞれ配列番号4～6のアミノ酸配列又は配列番号4～6のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有するか、又は

ヒトDNAM-1と結合させた場合に、CDR1～3が、それぞれ配列番号1～3のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1～3が、それぞれ配列番号4～6のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する抗体と競合する、

請求項10～12のいずれか一項に記載の抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項14】

CDR1～3が、それぞれ配列番号1～3のアミノ酸配列又は配列番号1～3のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1～3が、それぞれ配列番号4～6のアミノ酸配列又は配列番号4～6のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、請求項10～13のいずれか一項に記載の抗ヒトDNAM-1モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項15】

CDR1～3が、それぞれ配列番号1～3のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、CDR1～3が、それぞれ配列番号4～6のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有

する、請求項 10～14 のいずれか一項に記載の抗ヒト DNA M - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 16】

配列番号 7 のアミノ酸配列又は配列番号 7 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、

配列番号 8 のアミノ酸配列又は配列番号 8 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、請求項 10～15 のいずれか一項に記載の抗ヒト DNA M - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 17】

配列番号 7 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 8 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、請求項 16 に記載の抗ヒト DNA M - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 18】

配列番号 9 のアミノ酸配列又は配列番号 9 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、

配列番号 10 のアミノ酸配列又は配列番号 10 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、請求項 10～14 のいずれか一項に記載の抗ヒト DNA M - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 19】

配列番号 9 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び、配列番号 10 のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、を有する、請求項 18 に記載の抗ヒト DNA M - 1 モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項 20】

請求項 10～19 のいずれか一項に記載の抗ヒト DNA M - 1 モノクローナル抗体又はその断片をコードする核酸。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の核酸を含有するベクター。

【請求項 22】

請求項 21 に記載のベクターを含有する形質転換体。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 図 1 】

```

No.1 1 -SQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNIWIRQFPGNKLEWVGYISYDGSNHYNPS 50
No.2 1 -SQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNIWIRQFPGNKLEWVGYISYSGTITYNPS 50
No.3 1 -----FISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYTNYE 50
No.4 1 -KWGLSEISCKASGYTFTDYNMHWYKQSHGKSLEWIGYIYPYNGGTGYNQ 50
No.5 1 -----SVTGYSITSG-YYWNIWIRQFPGNKLEWVGYISYDGSNHYNPS 50
No.6 1 SQSLSLTCSVTGYSITSG-YYWNIWIRQFPGNKLEWVGYISYDGSNHYNPS 50
                                CDR1                                CDR2

No.1 51 LKNRISITROTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCAELSYDYWGQGTSVTVS 100
No.2 51 LKSRSITROTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCAELSYDYWGQGTSVTVS 100
No.3 51 KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCANAYYRYKGFAYWGQG 100
No.4 51 KFKSKATLTVNDSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCAGYWFYFDVWGAGTIVT 100
No.5 51 LKNRISITROTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCAERERVMITASFDYWGQG 100
No.6 51 LKNRISITROTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCAERERVMITASFDYWGQG 100
                                CDR3

No.1 101 GTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGK----- 122
No.2 101 SAKTTPPSVYPLAPGNLNSSTSFSSLG----- 126
No.3 101 TLVTVSAAKTTAPSVYPLAPL----- 115
No.4 101 VSSAKTTPPSVYPLAPWK----- 117
No.5 101 TTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGK----- 113
No.6 101 TTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGK----- 121

```

【 手続補正 3 】

【 補正対象書類名 】 図面

【 補正対象項目名 】 図 2

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 図 2 】

```

No.1 1 -----RVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIYY 50
No.2 1 DIVLSQSPAILSVSPGERVFSRCRASQSIGTSIHWYQQRINGSPRLLIKY 50
No.3 1 -----VTMSCKSSQSLLYSSNOKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYW 50
No.4 1 -----EKVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYW 50
No.5 1 -----SALWERVSLTCRASQEISGYLSWLQQKPDGTIKRLIYA 50
No.6 1 -----RASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYN 50
                                CDR1

No.1 51 ASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPLTFGA 100
No.2 51 ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLISNSVESEDIADYYCQQRSRWPLTFGA 100
No.3 51 ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLISSVKAEDLAVYFCQQYSSYPWTFGG 100
No.4 51 ASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLISNVQSEDLADYFCQQYSSYPWTFGG 100
No.5 51 ASTLDGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSESEDFADYYCQYASYPWTFGG 100
No.6 51 AKTLADGVPDRFSGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYCCQHFWSTPYTFGG 100
                                CDR2                                CDR3

No.1 101 GTKLELKRAAAPTVSIFPPSSEQT----- 108
No.2 101 GTKLELKRAAAPTVSIFPPSSEQNHEFWIRYVTRLQHAWYRAFPVIGVE 150
No.3 101 GTKLEIKRAAAPTVSIFPPSSEQ----- 112
No.4 101 GTKLEIKRAAAPTVSIFPPSSEQR----- 109
No.5 101 GTKLEIKRAAAPTVSIFPPSSEQ----- 112
No.6 101 GTKLEIKRAAAPTVSIFPP----- 97

```

【 手続補正 4 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【配列表】

2017183665000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/015767
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, A61K39/395, A61P37/06, C07K16/28, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	SHIBUYA, A. et al., DNAM-1, A Novel Adhesion Molecule involved in the Cytolytic Function of T Lymphocytes, Immunity, 1996, Vol.4, p.573-581, abstract, page 573, right column, 2nd paragraph, page 577, right column, the last paragraph to page 578, left column, 1st paragraph, fig. 1, 5	10-11, 20-22 4-22
X Y	Akira SHIBUYA, "DNAM-1(CD226) ni yoru Killer Rinpakyu Kasseika to Hyoteki Saibo Shogai", Infection, Inflammation & Immunity, 2013, vol. 43, pages 24 to 34, page 25, 1st paragraph to page 26, 1st paragraph, page 9, the last paragraph to page 31, 1st paragraph	1-3, 9-11, 20-22 4-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 July 2017 (12.07.17)		Date of mailing of the international search report 25 July 2017 (25.07.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/015767

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YAMASHITA, Y. et al., Establishment and Characterization of a novel Anti-DNAM-1 Monoclonal Antibody, MONOCLONAL ANTIBODIES IN IMMUNODIAGNOSIS AND IMMUNOTHERAPY, 2013, Vol.32, p.60-64, page 60, right column, the last paragraph to page 61, left column, 1st paragraph	4-22
X Y	KOYAMA, M. et al., Promoting regulation via the inhibition of DNAM-1 after transplantation, BLOOD, 2013, Vol.121, p.3511-3520, abstract, page 3512, right column, the last paragraph, page 3514, left column, the last paragraph to right column, 1st paragraph, page 3517, right column, the last paragraph to page 3519, right column, 1st paragraph, fig. 1, 3	1-3, 9 4-9
A	TAHARA-HANAOKA, S. et al., Identification and characterization of murine DNAM-1 (CD226) and its poliovirus receptor family ligands, Biochemical and Biophysical Research communications, 2005, Vol.329, p.996-1000, entire text	1-22
A	JP 2013-193995 A (Tokyo Medical and Dental University), 30 September 2013 (30.09.2013), entire text & WO 2013/140787 A1	1-22
A	JP 2013-245162 A (University of Tsukuba), 09 December 2013 (09.12.2013), entire text (Family: none)	1-22
A	JP 5296530 B2 (University of Tsukuba), 25 September 2013 (25.09.2013), entire text & US 2009/0186017 A1 entire text & US 2011/0318762 A1 & WO 2007/116945 A1 & EP 2012123 A1 & CA 2648629 A	1-22

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 5 7 6 7	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, A61K39/395, A61P37/06, C07K16/28, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2017年 日本国実用新案登録公報 1996-2017年 日本国登録実用新案公報 1994-2017年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X Y	SHIBUYA, A. et al., DNAM-1, A Novel Adhesion Molecule involved in the Cytolytic Function of T Lymphocytes, Immunity, 1996, Vol.4, p.573-581, 要約、573 ページ右欄第2 パラグラフ、577 ページ右欄最終パラグラフ-578 ページ左欄第1 パラグラフ、図1、図5	10-11, 20-22 4-22	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 12.07.2017		国際調査報告の発送日 25.07.2017	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 飯室 里美	4 N 2 9 3 6
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2017/015767
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	渋谷彰, DNAM-1 (CD226) によるキラーリンパ球活性化と標的細胞傷害, 感染・炎症・免疫, 2013, Vol. 43, p. 24-34, 25 ページ第 1 パラグラフ-26 ページ第 1 パラグラフ, 9 ページ最終パラグラフ-31 ページ第 1 パラグラフ	1-3, 9-11, 20-22
Y		4-22
Y	YAMASHITA, Y. et al., Establishment and Characterization of a novel Anti-DNAM-1 Monoclonal Antibody, MONOCLONAL ANTIBODIES IN IMMUNODIAGNOSIS AND IMMUNOTHERAPY, 2013, Vol. 32, p. 60-64, 60 ページ右欄最終パラグラフ-61 ページ左欄第 1 パラグラフ	4-22
X	KOYAMA, M. et al., Promoting regulation via the inhibition of DNAM-1 after transplantation, BLOOD, 2013, Vol. 121, p. 3511-3520, 要約, 3512 ページ右欄最終パラグラフ, 3514 ページ左欄最終パラグラフ-右欄第 1 パラグラフ, 3517 ページ右欄最終パラグラフ-3519 ページ右欄第 1 パラグラフ, 図 1, 図 3	1-3, 9
Y		4-9
A	TAHARA-HANAOKA, S. et al., Identification and characterization of murine DNAM-1 (CD226) and its poliovirus receptor family ligands, Biochemical and Biophysical Research communications, 2005, Vol. 329, p. 996-1000, 全文	1-22
A	JP 2013-193995 A (国立大学法人東京医科歯科大学) 2013. 09. 30, 全文 & WO 2013/140787 A1	1-22
A	JP 2013-245162 A (国立大学法人 筑波大学) 2013. 12. 09, 全文 (ファミリーなし)	1-22
A	JP 5296530 B2 (国立大学法人 筑波大学) 2013. 09. 25, 全文 & US 2009/0186017 A1, 全文 & US 2011/0318762 A1 & WO 2007/116945 A1 & EP 2012123 A1 & CA 2648629 A	1-22

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 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	1 4 0 Z
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 7
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(72) 発明者 広近 玲

茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内

(72) 発明者 奥村 元紀

茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA20 CC24 CE12 DA01

4B065 AA92X AA92Y AA94X AB05 AC14 BA02 BA08 CA25 CA44

4C084 AA17 MA52 MA66 NA14 ZA681 ZB081 ZB131 ZB211 ZB222

4C085 AA13 AA14 BB11 BB36 CC23 EE01 GG01 GG08

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA22 FA74 GA26

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。