明　細　書

発明の名称 ： 抗ＧＰＣ３抗体

技術分野

[0001] 本発明は、ＧＰＣ３（Glypican-3）に特異的に結合する抗体（抗ＧＰＣ３抗体）；抗ＧＰＣ３一本鎖抗体と、かかる抗ＧＰＣ３一本鎖抗体のカルボキシル（Ｃ）末端に融合した細胞膜貫通領域と、かかる細胞膜貫通領域のＣ末端に融合した免疫担当細胞活性化シグナル伝達領域とを含むキメラ抗原受容体（Chimeric Antigen Receptor:以下、「ＣＡＲ」ともいう）；ＣＡＲを発現する免疫担当細胞；抗ＧＰＣ３抗体遺伝子又はＣＡＲ遺伝子；抗ＧＰＣ３抗体遺伝子又はＣＡＲ遺伝子を含むベクター；かかるベクターが導入された宿主細胞；ＧＰＣ３を検出する方法；及びＧＰＣ３を検出するためのキット；に関する。

背景技術

[0002] Glypican-3（ＧＰＣ３）は、胎生期の組織、特に肝臓・腎臓で発現し、器官形成に関わる細胞外マトリックスタンパク質である。ＧＰＣ３は、成人組織においては胎盤以外に発現は認められないものの、肝細胞がん、メラノーマ、卵巣明細胞がん、肺扁平上皮がん等の様々ながん組織において発現が認められる。このようにＧＰＣ３は、α－フェトプロテイン（α－fetoprotein；ＡＦＰ）、癌胎児性抗原（Carcinoembryonic antigen；ＣＥＡ）等のタンパク質と同様に、胎生期の組織に発現するタンパク質であるため、胎児性癌抗原に分類される。すなわち、ＧＰＣ３は、正常組織細胞においては発現しないが、がん細胞に特異的に発現する特徴を示すため、がん治療の標的分子や、腫瘍マーカー及び診断マーカーとして有用である。

[0003] ＧＰＣ３は、器官形成における細胞外マトリクスとして細胞接着や細胞増殖因子の受容体として機能するプロテオグリカンファミリーの１つである。ＧＰＣ３のカルボキシル（Ｃ）末端側に位置する５６０番目のセリンに、ＧＰＩ（Glycosylphosphatidylinositol）アンカーが付加する。ＧＰＩアンカ

ーは、細胞膜脂質と共有結合し、ＧＰＣ３を細胞表面上に局在させる役割を担っている。また、ＧＰＣ３の４９５番目のセリンと、５０９番目のセリンは、ヘパラン硫酸鎖（ＨＳ鎖）が修飾している。ＨＳ鎖は、Ｗｎｔシグナル、ＦＧＦシグナル、ＢＭＰシグナル等の複数の増殖シグナル伝達経路を調節することが知られている。がん種によっては、関わる増殖シグナル伝達経路が異なることが知られており、例えば、肝細胞がん（ＨＣＣ）においては、Ｗｎｔシグナル経路を刺激して細胞増殖する。グリピカンファミリーに共通する特徴として、細胞外領域にシステインが１６個と豊富に含んでおり、複数の分子内ジスルフィド結合を形成して立体構造形成の安定化に寄与していると考えられている。細胞膜表面のＧＰＣ３は、フーリンコンバターゼ（furin convertase）により３５８番目のアルギニン（Ｒ）と、３５９番目のセリン（Ｓ）の間（Ｒ３５８／Ｓ３５９）で切断される可能性があることが報告されている。しかし、ＧＰＣ３のアミノ（Ｎ）末端サブユニットは、分子内ジスルフィド結合により架橋されているため、フーリンコンバターゼによってＮ末端側サブユニット及びＣ末端側サブユニットの２つに切断された場合であっても、両者は解離することなく、全長型の構造を保持する可能性も考えられ、可溶性ＧＰＣ３の構造については議論が分かれている。このように、細胞膜に局在するＧＰＣ３の立体構造は、ＧＰＣ３のアイソフォームの構造も含めて、不明な点が多い。

[0004] 細胞膜におけるＧＰＣ３の構造は複雑であるため、ＧＰＣ３に対する抗体を作製する上で、もっとも単純な構造領域をエピトープにすることが望ましいと考えられていた。既存の抗ＧＰＣ３抗体の代表として、バイオモザイク社から販売されているモノクローナル抗体１Ｇ１２がある。この抗体はＧＰＣ３の複雑な構造や局在を回避してデザインされた抗原（ＧＰＣ３のＣ末側７０残基のポリペプチド）をBalb/cマウスに免疫し、ハイブリドーマを作製し、当該抗原を用いたスクリーニングにより得られた抗体である。また国内製薬メーカーが開発した抗体ＧＣ３３及びＧＣ１９９も、同様のコンセプトを基にして樹立したモノクローナル抗体であり、ＧＰＣ３のＣ末端側部分断

片を抗原として得られた抗体である（特許文献１）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第４０１１１００号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の課題は、既存の抗体（例えば、ＧＣ３３、ＧＣ１９９）とは異なるエピトープを認識し、かつ一本鎖抗体の状態でも細胞膜に局在するＧＰＣ３に特異的に結合できる抗ＧＰＣ３抗体；かかる抗ＧＰＣ３一本鎖抗体を含むＣＡＲ；かかるＣＡＲを発現する免疫担当細胞；上記抗ＧＰＣ３抗体遺伝子又はＣＡＲ遺伝子；かかる抗ＧＰＣ３抗体遺伝子又はＣＡＲ遺伝子を含むベクター；かかるベクターが導入された宿主細胞；ＧＰＣ３を特異的に検出する方法；及びＧＰＣ３を特異的に検出するためのキット；を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を続けている。その過程において、ハイブリドーマを樹立する従来のモノクローナル抗体作製法とは異なる手法であるファージディスプレイ法にて新規抗ＧＰＣ３抗体を作製した。具体的には、ヒトＧＰＣ３の全長を免疫したマウス由来のＢ細胞を用いて、抗体遺伝子の免疫ライブラリーを合成し、一本鎖抗体（single chain Fv；ｓｃＦｖ）ライブラリーに遺伝子を再構成してファージディスプレイに組み込み、ファージ表面に発現させ、組換え全長ヒトＧＰＣ３及び当該ＧＰＣ３発現細胞株と、必要に応じて、さらにコンペティターとして上記既存抗体のエピトープであるＧＰＣ３のＣ末端側ポリペプチドとを用いたバイオパンニングを行い、抗ＧＰＣ３抗体を作製した。また、作製した抗ＧＰＣ３抗体は、キメラ抗原受容体（Chimeric Antigen Receptor:ＣＡＲ）を発現するＴ細胞（以下、「ＣＡＲ－Ｔ細胞」ということがある）を用いたがん免疫療法に

有用であることを確認した。本発明は、これらの知見に基づき、完成するに至ったものである。

[0008] すなわち、本発明は以下のとおりである。

〔１〕配列番号１５５に示されるアミノ酸配列からなるヒトＧＰＣ３（Glypican-3）由来のポリペプチドに特異的に結合する抗体であって、

（１－１）配列番号１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）１、配列番号２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、
配列番号４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（２－１）配列番号１１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号１２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、
配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（３－１）配列番号２１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号２２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、
配列番号２４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号２５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（４－１）配列番号３１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号３２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号３３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、
配列番号３４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号３５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号３６に示され

るアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（５－１）配列番号４１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号４２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号４３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、
配列番号４４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号４５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号４６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（６－１）配列番号５１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号５２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号５３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、
配列番号５４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号５５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号５６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（７－１）配列番号６１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号６２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号６３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、
配列番号６４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号６５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号６６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（８－１）配列番号７１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号７２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、
配列番号７４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号７５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（９－１）配列番号８１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号８２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、

配列番号８４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号８５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（１０－１）配列番号９１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号９２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号９３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、
配列番号９４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号９５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；或いは

（１１－１）配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１０３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、
配列番号１０４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１０５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１０６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含む；
前記抗体（以下、「本件抗体」ということがある）。

〔２〕（１－２）配列番号７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（２－２）配列番号１７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号１８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（３－２）配列番号２７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号２８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（４－２）配列番号３７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号３８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（５－２）配列番号４７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号４８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（６－２）配列番号５７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号５８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（７－２）配列番号６７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号６８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（８－２）配列番号７７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号７８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（９－２）配列番号８７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号８８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（１０－２）配列番号９７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号９８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；或いは

（１１－２）配列番号１０７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号１０８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む；

上記〔１〕に記載の抗体。

〔３〕一本鎖抗体である上記〔１〕又は〔２〕のいずれかに記載の抗体。

〔４〕一本鎖抗体が、

（１－３）配列番号１６５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（２－３）配列番号１６６に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（３－３）配列番号１６７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（４－３）配列番号１６８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（５－３）配列番号１６９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（６－３）配列番号１７０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（７－３）配列番号１７１に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（８－３）配列番号１７２に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（９－３）配列番号１７３に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（１０－３）配列番号１７４に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；或いは

（１１－３）配列番号１７５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０

％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；

上記〔３〕に記載の抗体。

〔５〕一本鎖抗体が、

（１－３’－１）配列番号１７８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（１－３’－２）配列番号１７９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（１－３’－３）配列番号１８０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（２－３’－１）配列番号１８１に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（２－３’－２）配列番号１８２に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（２－３’－３）配列番号１８３に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；或いは

（２－３’－４）配列番号１８４に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；

上記〔３〕に記載の抗体。

〔６〕（１－４）配列番号９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号１０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（２－４）配列番号１９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号２０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（３－４）配列番号２９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号３０に示さ

れるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（４－４）配列番号３９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号４０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（５－４）配列番号４９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号５０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（６－４）配列番号５９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号６０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（７－４）配列番号６９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号７０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（８－４）配列番号７９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号８０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（９－４）配列番号８９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号９０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（１０－４）配列番号９９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号１００に

示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；或いは

（１１－４）配列番号１０９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号１１０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む；

上記〔１〕又は〔２〕に記載の抗体。

〔７〕上記〔３〕～〔５〕のいずれかに記載の抗体（以下、「本件一本鎖抗体」ということがある）と、本件一本鎖抗体のカルボキシル末端に融合した細胞膜貫通領域と、前記細胞膜貫通領域のカルボキシル末端に融合した免疫担当細胞活性化シグナル伝達領域とを含むＣＡＲ（以下、「本件ＣＡＲ」ということがある）。

〔８〕配列番号１８５～１８７のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む上記〔７〕に記載のＣＡＲ。

〔９〕上記〔７〕又は〔８〕に記載のＣＡＲを発現する免疫担当細胞（以下、「本件免疫担当細胞」ということがある）。

〔１０〕さらに、インターロイキン７（ＩＬ－７）、及びケモカインリガンド１９（ＣＣＬ１９）を発現する上記〔９〕に記載の免疫担当細胞。

〔１１〕上記〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の抗体をコードする抗体遺伝子（以下、「本件抗体遺伝子」ということがある）、又は上記〔７〕若しくは〔８〕に記載のＣＡＲをコードするＣＡＲ遺伝子（以下、「本件ＣＡＲ遺伝子」ということがある）。

〔１２〕上記〔１〕～〔４〕及び〔６〕のいずれかに記載の抗体をコードする抗体遺伝子。

〔１３〕プロモーターと、該プロモーターの下流に作動可能に連結されている上記〔１１〕に記載の抗体遺伝子、又は上記〔１１〕に記載のＣＡＲをコードするＣＡＲ遺伝子とを含むベクター（以下、「本件ベクター」ということがある）。

〔１４〕プロモーターと、該プロモーターの下流に作動可能に連結されている上記〔１２〕に記載の抗体遺伝子とを含むベクター。

〔１５〕上記〔１３〕又は〔１４〕に記載のベクターが導入されている宿主細胞（以下、「本件宿主細胞」ということがある）。

〔１６〕上記〔1〕～〔６〕のいずれかに記載の抗体を用いて、ＧＰＣ３（Glypican-3）を検出する工程を備えたＧＰＣ３の検出方法（以下、「本件検出方法」ということがある）。

〔１７〕上記〔1〕～〔６〕のいずれかに記載の抗体、又はその標識物を含む、ＧＰＣ３（Glypican-3）の検出用キット（以下、「本件検出用キット」ということがある）。

[0009] 本発明の実施の他の形態として、ＧＰＣ３の検出に使用するための本件抗体や、配列番号１５７で示されるアミノ酸配列からなる全長ヒトＧＰＣ３を、非ヒト動物（例えば、マウス、ラット）に免疫する工程と、前記免疫非ヒト動物由来Ｂ細胞の全ＲＮＡから逆転写反応によりｃＤＮＡを合成し、抗体遺伝子を増幅して抗体遺伝子ライブラリーを作製する工程と、前記抗体遺伝子ライブラリーからｓｃＦｖファージライブラリーを構築し、大腸菌に感染させてｓｃＦｖを発現させたものに対して、前記全長ヒトＧＰＣ３や当該ＧＰＣ３発現細胞株、必要に応じて、さらにコンペティターとしてＧＰＣ３のＣ末端側ポリペプチド（配列番号１５６に示されるアミノ酸配列からなるヒト由来ＧＰＣ３ポリペプチド）を用いたバイオパンニングを行う工程とを備えた本件抗体の製造方法を挙げることができる。

発明の効果

[0010] 本件抗体は、ＩｇＧ型のみならず、ｓｃＦｖ型の状態であっても、細胞膜に局在するＧＰＣ３に特異的に結合する抗体である。また、ＣＡＲにおけるｓｃＦｖとして本件抗体を用いたＣＡＲ－Ｔ細胞は、優れた細胞傷害活性及びＩＦＮ－γ産生能を有する。このため、本件抗体は、がん免疫療法に有用である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]５種類のシリーズ（Ａ～Ｅシリーズ）からなるバイオパンニングの各ラウンド（工程）を示す図である。Ａシリーズは、磁性ビーズに固定化した組換えＧＰＣ３をベイトにして３ラウンドバイオパンニングを行い、４～５ラウンドにＧＰＣ３発現細胞株をベイトとしてバイオパンニングを行うものである（５ラウンド目は1413#3のみ実施）。なお、１～４ラウンドでは既存の抗ＧＰＣ３抗体（ＧＣ３３及びＧＣ１９９）を競合抗体として添加した。Ｂシリーズは、Ａシリーズのラウンド２の後、競合抗体存在下でＧＰＣ３発現細胞をベイトにしてバイオパンニングを行うものである。Ｅシリーズは、Ａシリーズのラウンド３の後、競合抗体なしの条件で、磁性ビーズに固定化した組換えＧＰＣ３をベイトにしてバイオパンニングを行うものである。Ｃシリーズは、ＧＰＣ３発現細胞株をベイトとして２ラウンド、及び磁性ビーズに固定化した組換えＧＰＣ３をベイトとして２ラウンドの計４ラウンドを競合抗体非存在下で行った。Ｄシリーズは、競合抗体非存在下でＡシリーズと同じバイオパンニングを行うものである。

[図2]１８種類の抗ＧＰＣ３ ｓｃＦｖクローン（TF1413-02d023、02d028、02d030、02d039、02e003、02e004、02e014、02e030、02e040、03e001、03e004、03e005、03e015、03e016、03e019、03e027、03e034、及び03e045）及び既存の抗ＧＰＣ３抗体（ＧＣ３３及びＧＣ１９９）と、３種類の細胞株（ＧＰＣ３Ｎ末断片発現細胞株、ＧＰＣ３Ｃ末断片発現細胞株、及びＧＰＣ３［全長］発現細胞株）とを用いて、フローサイトメトリー（ＦＣＭ）を行った結果を示す図である。図中の数値は、ＦＣＭにより、ＧＰＣ３を発現しない細胞株（ＳＫ－Ｈｅｐ－１細胞株）の蛍光強度を１としたときの相対値として示す。

[図3]１１種類のｓｃＦｖクローン（TF1413-02d028、02d039、02e004、02e014、02e030、02e040、03e001、03e004、03e005、03e015、及び03e034）から作製したＩｇＧ抗体及び既存の抗ＧＰＣ３抗体（ＧＣ３３及びＧＣ１９９）と、３種類の細胞株（ＧＰＣ３Ｎ末断片発現細胞株、ＧＰＣ３Ｃ末断片発現細胞株、及びＧＰＣ３［全長］発現細胞株）とを用いて、ＦＣＭを行った結果

を示す図である。

[図4]３種類の方法（ＥＤＴＡ、トリプシン、及び「ＥＤＴＡ＋コラゲナーゼ」）で処理したＧＰＣ３発現細胞株と、３種類の抗体の組合せ（ＡＰＣで標識した抗マウスＩｇＧ抗体［以下、「ＡＰＣ抗マウスＩｇＧ抗体」ということがある］、及びＡＰＣ抗マウスＩｇＧ抗体とｓｃＦｖクローン［TF1413-02d028］抗体との組合せ）を用いてＦＡＣＳ（fluorescence activated cell sorting）した結果を示す図である。

[図5]５種類のｓｃＦｖクローン（TF1413-02d028、TF1413-02d039、TF1413-02e014、TF1413-02e030、及びTF1413-03e005）に由来するＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞（ＧＰＣ３を認識するｓｃＦｖのＣＡＲを発現するＴ細胞）について、Ｓｋ－ＨＥＰ－１ ＧＰＣ３細胞株に対する細胞傷害活性を解析した結果を示す図である。各グラフにおける右側のピークが、ＣＤ４５陽性細胞（ＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞）を示し、左側のピークが、ＣＤ４５陰性細胞（残存がん細胞［Ｓｋ－ＨＥＰ－１ ＧＰＣ３細胞］）を示す。各グラフの縦軸は細胞数を示す。各グラフにおける数値は、全細胞数（ＣＤ４５陽性細胞及びＣＤ４５陰性細胞）に対するＣＤ４５陽性細胞の割合（％）を示す。コントロールとして、ＧＰＣ３ ＣＡＲを発現しないＴ細胞（図中の「Non infection」）を用いた。

[図6]図５におけるＣＤ４５陰性細胞の割合（図６Ａ）及びＣＤ４５陰性細胞数（図６Ｂ）を示すグラフである。ペアーの棒グラフのうち、左側の棒グラフが「ｍｏｃｋ」（Ｓｋ－ＨＥＰ－１ ｍｏｃｋ細胞株）を示し、右側の棒グラフが「ＧＰＣ３」（Ｓｋ－ＨＥＰ－１ ＧＰＣ３細胞株）を示す。

[図7]５種類のｓｃＦｖクローン（TF1413-02d028、TF1413-02d039、TF1413-02e014、TF1413-02e030、及びTF1413-03e005）に由来するＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞について、Ｓｋ－ＨＥＰ－１ ＧＰＣ３細胞株に対するＩＦＮ－γ産生能を解析した結果を示す図である。コントロールとして、ＧＰＣ３ ＣＡＲを発現しないＴ細胞（図中の「Non infection」）を用いた。

発明を実施するための形態

[0012] 本件抗体は、上記（１－１）～（１１－１）のいずれかの重（Ｈ）鎖及び軽（Ｌ）鎖のＣＤＲ１～３を含み、かつ、配列番号１５５に示されるアミノ酸配列からなるヒト由来ＧＰＣ３ポリペプチド（配列番号１５７に示されるアミノ酸配列からなるヒト由来全長ＧＰＣ３の３２～４７１番目のアミノ酸残基［エクソン１～７］からなるアミノ［Ｎ］末端側ポリペプチド）の少なくとも一部（通常３～３０アミノ酸残基の範囲内、好ましくは４～２０アミノ酸残基、より好ましくは５～１５アミノ酸残基）をエピトープとして特異的に結合する抗体であり、ＩｇＧ型のみならず、ｓｃＦｖ型の状態で、細胞膜に局在するＧＰＣ３に特異的に結合する抗体であり、通常、上記（１－１）～（１１－１）のいずれかのＨ鎖ＣＤＲ１～３を含むＨ鎖可変領域と、上記（１－１）～（１１－１）のいずれかのＬ鎖ＣＤＲ１～３を含むＬ鎖可変領域とが含まれる。ここで「特異的に結合する」とは、抗原－抗体間の特異性の高い認識機構によって、配列番号１５５に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを認識し結合する抗体を意味する。したがって、本件抗体は、配列番号１５６に示されるアミノ酸配列からなるヒト由来ＧＰＣ３ポリペプチド（配列番号１５７に示されるアミノ酸配列からなるヒト由来全長ＧＰＣ３の４７２～５８０番目のアミノ酸残基［エクソン８～９］からなるカルボキシル［Ｃ］末端側ポリペプチド）に対して特異的に結合するものではない。

[0013] 本件抗体の由来、種類、クラス、形態等は特に制限されず、例えば本件抗体には、ヒト由来の抗体；マウス、ラット等の非ヒト動物由来の抗体；ポリクローナル抗体、オリゴクローナル抗体（数種～数十種の抗体の混合物）、モノクローナル抗体；抗体の一部領域（例えば、定常領域）を異なる生物種由来の領域に置換したキメラ抗体又はヒト化抗体、モノクローナル抗体をペプシンで消化して得られるＦ（ａｂ′）$_2$抗体フラグメント、Ｆ（ａｂ′）$_2$抗体フラグメントを還元して得られるＦａｂ′抗体フラグメント、モノクローナル抗体をパパインで消化して得られるＦａｂ等の抗体フラグメント、抗体重（Ｈ）鎖可変領域と抗体軽（Ｈ）鎖可変領域とを、アミノ酸架橋によっ

て連結させたｓｃＦｖ等の組換え抗体；などが含まれる。本件抗体をＣＡＲとして用いる場合、ｓｃＦｖが好ましい。

[0014] 本件抗体は、分離されているものが好ましい。ここで「分離されている」とは、人為的操作によって、抗体を、本来存在する環境から取り出したり、抗体が本来存在する環境とは別の環境下で発現させる等して、抗体が本来存在している状態とは異なった状態で存在していることを意味する。すなわち、「分離されている抗体」には、ある個体由来の抗体であって、かつ外的操作（人為的操作）が施されずに、当該個体の体内中又は体内由来の組織若しくは体液（血液、血漿、血清等）中に含まれる状態の抗体は含まれない。また、本件抗体は、人為的操作によって作製した抗体（例えば、上記組換え抗体）が好ましい。かかる「人為的操作によって作製した細胞由来の抗体や当該細胞から産生される抗体」には、人為的操作の施されていない抗体、例えば、天然に存在するＢ細胞から産生される抗体は含まれない。

[0015] 本件抗体は、通常、Ｈ鎖及びＬ鎖のＣＤＲ１～３の各領域のＮ末端及びＣ末端には、フレームワーク領域（ＦＲ）が連結されている。かかるＦＲのうちＨ鎖ＦＲとしては、Ｈ鎖ＣＤＲ１のＮ末端に連結されているＨ鎖ＦＲ１や、Ｈ鎖ＣＤＲ１のＣ末端（Ｈ鎖ＣＤＲ２のＮ末端）に連結されているＨ鎖ＦＲ２や、Ｈ鎖ＣＤＲ２のＣ末端（Ｈ鎖ＣＤＲ３のＮ末端）に連結されているＨ鎖ＦＲ３や、Ｈ鎖ＣＤＲ３のＣ末端に連結されているＨ鎖ＦＲ４を挙げることができる。また、上記ＦＲのうちＬ鎖ＦＲとしては、Ｌ鎖ＣＤＲ１のＮ末端に連結されているＬ鎖ＦＲ１や、Ｌ鎖ＣＤＲ１のＣ末端（Ｌ鎖ＣＤＲ２のＮ末端）に連結されているＬ鎖ＦＲ２や、Ｌ鎖ＣＤＲ２のＣ末端（Ｌ鎖ＣＤＲ３のＮ末端）に連結されているＬ鎖ＦＲ３や、Ｌ鎖ＣＤＲ３のＣ末端に連結されているＬ鎖ＦＲ４を挙げることができる。

[0016] 上記Ｈ鎖ＦＲ１としては、具体的には、（１－ＨＦＲ１）配列番号７で示されるアミノ酸配列の１～３０番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（２－ＨＦＲ１）配列番号１

７で示されるアミノ酸配列の１～３０番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（３－ＨＦＲ１）配列番号２７で示されるアミノ酸配列の１～３０番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（４－ＨＦＲ１）配列番号３７で示されるアミノ酸配列の１～３０番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（５－ＨＦＲ１）配列番号４７で示されるアミノ酸配列の１～３０番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（６－ＨＦＲ１）配列番号５７で示されるアミノ酸配列の１～３０番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（７－ＨＦＲ１）配列番号６７で示されるアミノ酸配列の１～３０番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（８－ＨＦＲ１）配列番号７７で示されるアミノ酸配列の１～３０番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（９－ＨＦＲ１）配列番号８７で示されるアミノ酸配列の１～３０番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（１０－ＨＦＲ１）配列番号９７で示されるアミノ酸配列の１～３０番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；或いは（１１－ＨＦＲ１）配列番号１０７

で示されるアミノ酸配列の１～３０番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；を挙げることができる。

[0017] 上記Ｈ鎖ＦＲ２としては、具体的には、（１－ＨＦＲ２）配列番号７で示されるアミノ酸配列の３６～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（２－ＨＦＲ２）配列番号１７で示されるアミノ酸配列の３６～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（３－ＨＦＲ２）配列番号２７で示されるアミノ酸配列の３６～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（４－ＨＦＲ２）配列番号３７で示されるアミノ酸配列の３６～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（５－ＨＦＲ２）配列番号４７で示されるアミノ酸配列の３６～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（６－ＨＦＲ２）配列番号５７で示されるアミノ酸配列の３６～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（７－ＨＦＲ２）配列番号６７で示されるアミノ酸配列の３６～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（８－ＨＦＲ２）配列番号７７で示されるアミノ酸配列の３６～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するア

ミノ酸配列からなるポリペプチド；（９－ＨＦＲ２）配列番号８７で示されるアミノ酸配列の３６～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（１０－ＨＦＲ２）配列番号９７で示されるアミノ酸配列の３６～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；或いは（１１－ＨＦＲ２）配列番号１０７で示されるアミノ酸配列の３６～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；を挙げることができる。

[0018] 上記Ｈ鎖ＦＲ３としては、具体的には、（１－ＨＦＲ３）配列番号７で示されるアミノ酸配列の６７～９８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（２－ＨＦＲ３）配列番号１７で示されるアミノ酸配列の６７～９８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（３－ＨＦＲ３）配列番号２７で示されるアミノ酸配列の６７～９８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（４－ＨＦＲ３）配列番号３７で示されるアミノ酸配列の６７～９９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（５－ＨＦＲ３）配列番号４７で示されるアミノ酸配列の６７～９９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（６－ＨＦＲ３）配列番号５７で示されるアミノ酸配列の６７～９

８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（７－ＨＦＲ３）配列番号６７で示されるアミノ酸配列の６７～９８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（８－ＨＦＲ３）配列番号７７で示されるアミノ酸配列の６７～９８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（９－ＨＦＲ３）配列番号８７で示されるアミノ酸配列の６７～９９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（１０－ＨＦＲ３）配列番号９７で示されるアミノ酸配列の６７～９８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；或いは（１１－ＨＦＲ３）配列番号１０７で示されるアミノ酸配列の６７～９８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；を挙げることができる。

[0019] 上記Ｈ鎖ＦＲ４としては、具体的には、（１－ＨＦＲ４）配列番号７で示されるアミノ酸配列の１０９～１１８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（２－ＨＦＲ４）配列番号１７で示されるアミノ酸配列の１０８～１１７番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（３－ＨＦＲ４）配列番号２７で示されるアミノ酸配列の１０６～１１５番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少

なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（４－ＨＦＲ４）配列番号３７で示されるアミノ酸配列の１１１～１２０番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（５－ＨＦＲ４）配列番号４７で示されるアミノ酸配列の１０８～１１７番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（６－ＨＦＲ４）配列番号５７で示されるアミノ酸配列の１０７～１１６番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（７－ＨＦＲ４）配列番号６７で示されるアミノ酸配列の１０６～１１５番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（８－ＨＦＲ４）配列番号７７で示されるアミノ酸配列の１０６～１１５番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（９－ＨＦＲ４）配列番号８７で示されるアミノ酸配列の１１１～１２０番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（１０－ＨＦＲ４）配列番号９７で示されるアミノ酸配列の１１０～１１９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；或いは（１１－ＨＦＲ４）配列番号１０７で示されるアミノ酸配列の１０９～１１８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；を挙げることができる。

[0020] 上記Ｌ鎖ＦＲ１としては、具体的には、（１－ＬＦＲ１）配列番号８で示

されるアミノ酸配列の１～２３番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（２－ＬＦＲ１）配列番号１８で示されるアミノ酸配列の１～２３番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（３－ＬＦＲ１）配列番号２８で示されるアミノ酸配列の１～２３番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（４－ＬＦＲ１）配列番号３８で示されるアミノ酸配列の１～２３番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（５－ＬＦＲ１）配列番号４８で示されるアミノ酸配列の１～２３番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（６－ＬＦＲ１）配列番号５８で示されるアミノ酸配列の１～２３番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（７－ＬＦＲ１）配列番号６８で示されるアミノ酸配列の１～２３番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（８－ＬＦＲ１）配列番号７８で示されるアミノ酸配列の１～２３番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（９－ＬＦＲ１）配列番号８８で示されるアミノ酸配列の１～２３番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（１０－ＬＦＲ１）配列番号９８で示されるアミノ

酸配列の１～２３番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；或いは（１１－ＬＦＲ１）配列番号１０８で示されるアミノ酸配列の１～２３番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；を挙げることができる。

[0021] 上記Ｌ鎖ＦＲ２としては、具体的には、（１－ＬＦＲ２）配列番号８で示されるアミノ酸配列の３５～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（２－ＬＦＲ２）配列番号１８で示されるアミノ酸配列の４０～５４番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（３－ＬＦＲ２）配列番号２８で示されるアミノ酸配列の３５～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（４－ＬＦＲ２）配列番号３８で示されるアミノ酸配列の３５～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（５－ＬＦＲ２）配列番号４８で示されるアミノ酸配列の４１～５５番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（６－ＬＦＲ２）配列番号５８で示されるアミノ酸配列の３５～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（７－ＬＦＲ２）配列番号６８で示されるアミノ酸配列の３５～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配

列からなるポリペプチド；（８－ＬＦＲ２）配列番号７８で示されるアミノ酸配列の３５～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（９－ＬＦＲ２）配列番号８８で示されるアミノ酸配列の３５～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（１０－ＬＦＲ２）配列番号９８で示されるアミノ酸配列の３５～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；或いは（１１－ＬＦＲ２）配列番号１０８で示されるアミノ酸配列の３５～４９番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；を挙げることができる。

[0022] 上記Ｌ鎖ＦＲ３としては、具体的には、（１－ＬＦＲ３）配列番号８で示されるアミノ酸配列の５７～８８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（２－ＬＦＲ３）配列番号１８で示されるアミノ酸配列の６２～９３番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（３－ＬＦＲ３）配列番号２８で示されるアミノ酸配列の５７～８８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（４－ＬＦＲ３）配列番号３８で示されるアミノ酸配列の５７～８８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（５－ＬＦＲ３）配列番号４８で示されるアミノ酸配列の６３～９４番目の

アミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（６－ＬＦＲ３）配列番号５８で示されるアミノ酸配列の５７～８８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（７－ＬＦＲ３）配列番号６８で示されるアミノ酸配列の５７～８８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（８－ＬＦＲ３）配列番号７８で示されるアミノ酸配列の５７～８８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（９－ＬＦＲ３）配列番号８８で示されるアミノ酸配列の５７～８８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（１０－ＬＦＲ３）配列番号９８で示されるアミノ酸配列の５７～８８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；或いは（１１－ＬＦＲ３）配列番号１０８で示されるアミノ酸配列の５７～８８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；を挙げることができる。

[0023] 上記Ｌ鎖ＦＲ４としては、具体的には、（１－ＬＦＲ４）配列番号８で示されるアミノ酸配列の９８～１０８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（２－ＬＦＲ４）配列番号１８で示されるアミノ酸配列の１０３～１１３番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％

以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（３－ＬＦＲ４）配列番号２８で示されるアミノ酸配列の９７～１０７番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（４－ＬＦＲ４）配列番号３８で示されるアミノ酸配列の９８～１０８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（５－ＬＦＲ４）配列番号４８で示されるアミノ酸配列の１０４～１１４番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（６－ＬＦＲ４）配列番号５８で示されるアミノ酸配列の９８～１０８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（７－ＬＦＲ４）配列番号６８で示されるアミノ酸配列の９８～１０８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（８－ＬＦＲ４）配列番号７８で示されるアミノ酸配列の９８～１０８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（９－ＬＦＲ４）配列番号８８で示されるアミノ酸配列の９８～１０８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；（１０－ＬＦＲ４）配列番号９８で示されるアミノ酸配列の９８～１０８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；或いは（１１－ＬＦＲ４）配列番号１０８で示されるアミノ酸配列の９８～１０８番目のアミノ酸残基からなるポリペプチド、又は当該ポリペプ

チドのアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド；を挙げることができる。

[0024] 本件抗体のＦＲとしては、既知のヒト抗体のＦＲが好ましい。かかる「既知のヒト抗体のＦＲ」としては、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ等の公知の配列データベースに登録されているヒト抗体のＦＲ、ヒト抗体の各サブグループに由来する共通配列(Human Most Homologous Consensus Sequence；Kabat, E. A.らのSequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991）から選択されたＦＲ等を挙げることができる。

[0025] 本件抗体におけるＨ鎖ＣＤＲ１は、通常、kabatによる番号付け（文献「kabat, E.A. et al., (1991) NIH Publication No. 91-3242, sequences of proteins of immunological interest」参照）でＨ３１～３５の位置に存在する。また、本件抗体におけるＨ鎖ＣＤＲ２は、通常、kabatによる番号付けでＨ５０～５２、Ｈ５２Ａ、及びＨ５３～６５の位置に存在する。また、本件抗体におけるＨ鎖ＣＤＲ３は、通常、kabatによる番号付けでＨ９５～１００、Ｈ１００Ａ、Ｈ１００Ｂ、Ｈ１０１、及びＨ１０２の位置に存在する。また、本件抗体におけるＬ鎖ＣＤＲ１は、通常、kabatによる番号付けでＬ２４～３４の位置に存在する。また、本件抗体におけるＬ鎖ＣＤＲ２は、通常、kabatによる番号付けでＬ５０～５６の位置に存在する。また、本件抗体におけるＬ鎖ＣＤＲ３は、通常、kabatによる番号付けでＬ８９～９７の位置に存在する。

[0026] 本件抗体のうち、上記（１－１）のＨ鎖及びＬ鎖のＣＤＲ１～３を含む抗体としては、上記（１－２）のＨ鎖及びＬ鎖の可変（Ｖ）領域を含むものを挙げることができ、具体的には、上記（１－３）の一本鎖抗体；や、上記（１－３’－１）の一本鎖抗体、上記（１－３’－２）の一本鎖抗体、及び上記（１－３’－３）の一本鎖抗体；や、上記（１－４）のＨ鎖及びＬ鎖を含む抗体；を挙げることができる。また、上記（２－１）のＨ鎖及びＬ鎖のＣＤＲ１～３を含む抗体としては、上記（２－２）のＨ鎖及びＬ鎖のＶ領域を

含むものを挙げることができ、具体的には、上記（２－３）の一本鎖抗体；や、上記（２－３’－１）の一本鎖抗体、上記（２－３’－２）の一本鎖抗体、上記（２－３’－３）の一本鎖抗体、及び上記（２－３’－４）の一本鎖抗体；や、上記（２－４）のＨ鎖及びＬ鎖を含む抗体；を挙げることができる。また、上記（３－１）のＨ鎖及びＬ鎖のＣＤＲ１～３を含む抗体としては、上記（３－２）のＨ鎖及びＬ鎖のＶ領域を含むものを挙げることができ、具体的には、上記（３－３）の一本鎖抗体；や、上記（３－４）のＨ鎖及びＬ鎖を含む抗体；を挙げることができる。また、上記（４－１）のＨ鎖及びＬ鎖のＣＤＲ１～３を含む抗体としては、上記（４－２）のＨ鎖及びＬ鎖のＶ領域を含むものを挙げることができ、具体的には、上記（４－３）の一本鎖抗体；や、上記（４－４）のＨ鎖及びＬ鎖を含む抗体；を挙げることができる。また、上記（５－１）のＨ鎖及びＬ鎖のＣＤＲ１～３を含む抗体としては、上記（５－２）のＨ鎖及びＬ鎖のＶ領域を含むものを挙げることができ、具体的には、上記（５－３）の一本鎖抗体；や、上記（５－４）のＨ鎖及びＬ鎖を含む抗体；を挙げることができる。また、上記（６－１）のＨ鎖及びＬ鎖のＣＤＲ１～３を含む抗体としては、上記（６－２）のＨ鎖及びＬ鎖のＶ領域を含むものを挙げることができ、具体的には、上記（６－３）の一本鎖抗体；や、上記（６－４）のＨ鎖及びＬ鎖を含む抗体；を挙げることができる。また、上記（７－１）のＨ鎖及びＬ鎖のＣＤＲ１～３を含む抗体としては、上記（７－２）のＨ鎖及びＬ鎖のＶ領域を含むものを挙げることができ、具体的には、上記（７－３）の一本鎖抗体；や、上記（７－４）のＨ鎖及びＬ鎖を含む抗体；を挙げることができる。また、上記（８－１）のＨ鎖及びＬ鎖のＣＤＲ１～３を含む抗体としては、上記（８－２）のＨ鎖及びＬ鎖のＶ領域を含むものを挙げることができ、具体的には、上記（８－３）の一本鎖抗体；や、上記（８－４）のＨ鎖及びＬ鎖を含む抗体；を挙げることができる。また、上記（９－１）のＨ鎖及びＬ鎖のＣＤＲ１～３を含む抗体としては、上記（９－２）のＨ鎖及びＬ鎖のＶ領域を含むものを挙げることができ、具体的には、上記（９－３）の一本鎖抗体；や、上記（９

－４）のＨ鎖及びＬ鎖を含む抗体；を挙げることができる。また、上記（１０－１）のＨ鎖及びＬ鎖のＣＤＲ１～３を含む抗体としては、上記（１０－２）のＨ鎖及びＬ鎖のＶ領域を含むものを挙げることができ、具体的には、上記（１０－３）の一本鎖抗体；や、上記（１０－４）のＨ鎖及びＬ鎖を含む抗体；を挙げることができる。また、上記（１１－１）のＨ鎖及びＬ鎖のＣＤＲ１～３を含む抗体としては、上記（１１－２）のＨ鎖及びＬ鎖のＶ領域を含むものを挙げることができ、具体的には、上記（１１－３）の一本鎖抗体；や、上記（１１－４）のＨ鎖及びＬ鎖を含む抗体；を挙げることができる。なお、一本鎖抗体における重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、通常ペプチドリンカーを介して結合している。

[0027] 本件ＣＡＲとしては、本件一本鎖抗体と、本件一本鎖抗体のＣ末端に融合した細胞膜貫通領域と、かかる細胞膜貫通領域のＣ末端に融合した免疫担当細胞活性化シグナル伝達領域とを含むものであればよく、ここで、本件一本鎖抗体と細胞膜貫通領域との間や、細胞膜貫通領域と免疫担当細胞活性化シグナル伝達領域との間は、ペプチドリンカー又はＩｇＧ４ヒンジ領域を介して融合してもよい。

[0028] 本件抗体におけるペプチドリンカーの長さとしては、例えば、１～１００アミノ酸残基、好ましくは１０～５０アミノ酸残基を挙げることができる。また、本件抗体におけるペプチドリンカーとしては、具体的には、１～４つのグリシンと、１つのセリンとからなるアミノ酸配列が３つ連続に連なったものを挙げることができる。

[0029] 上記細胞膜貫通領域としては、細胞膜を貫通することができるペプチドであればよく、例えば、ＣＤ８、Ｔ細胞受容体のα、β鎖、ＣＤ３ζ、ＣＤ２８、ＣＤ３ε、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＩＣＯＳ、ＣＤ１５４、ＥＧＦＲ（ｅｐｉｄｅｒｍａｌ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ ｒｅｃｅｐｔｏｒ）、又はＧＩＴＲ由来の細胞膜貫通領域を挙げることができ、具体的には、配列番号１８５に示されるア

ミノ酸配列の１～８３番目のアミノ酸残基からなるヒトＣＤ８細胞膜貫通領域を挙げることができる。また、上記細胞膜貫通領域としては、細胞膜を貫通することができるペプチドのＣ末端側の１～１０アミノ酸残基、好ましくは６～７アミノ酸残基が削除されたものであってもよく、例えば、配列番号１８６に示されるアミノ酸配列の１～７７番目のアミノ酸残基からなる、前記ヒトＣＤ８細胞膜貫通領域の改変体１や、配列番号１８７に示されるアミノ酸配列の１～７６番目のアミノ酸残基からなる、前記ヒトＣＤ８細胞膜貫通領域の改変体２を挙げることができる。

[0030] 上記免疫担当細胞活性化シグナル伝達領域としては、本件一本鎖抗体がヒトＧＰＣ３に結合した際に、免疫担当細胞内にシグナル伝達することが可能な領域であればよく、ＣＤ２８、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＧＩＴＲ、ＣＤ２７，ＯＸ４０、ＨＶＥＭ、ＣＤ３ζ、Ｆｃ　Ｒｅｃｅｐｔｏｒ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　γｃｈａｉｎの細胞内領域のポリペプチドから選択される少なくとも１種又は２種以上を含むものが好ましく、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、及びＣＤ３ζの細胞内領域のポリペプチド３種を含むものがより好ましい。かかるＣＤ２８の細胞内領域のポリペプチドとしては、具体的には、配列番号１８５に示されるアミノ酸配列の８５～１２４番目のアミノ酸残基からなるヒトＣＤ２８の細胞内領域のポリペプチドを挙げることができる。また、上記「４－１ＢＢの細胞内領域のポリペプチド」としては、具体的には、配列番号１８５に示されるアミノ酸配列の１２５～１７０番目のアミノ酸残基からなるヒト４－１ＢＢの細胞内領域のポリペプチドを挙げることができる。また、上記ＣＤ３ζの細胞内領域のポリペプチドとしては、具体的には、配列番号１８５に示されるアミノ酸配列の１７２～２８３番目のアミノ酸残基からなるヒトＣＤ３ζの細胞内領域のポリペプチドを挙げることができる。

[0031] なお、配列番号１８５に示されるアミノ酸配列の８４番目のアルギニン（Ａｒｇ）、配列番号１８６に示されるアミノ酸配列の７８番目のアルギニン、配列番号１８７に示されるアミノ酸配列の７７番目のアルギニンは、上記

ヒトＣＤ８由来の細胞膜貫通領域のポリペプチドと上記ヒトＣＤ２８の細胞内領域のポリペプチドの共通配列である。また、配列番号１８５に示されるアミノ酸配列の１７１番目のロイシン（Ｌｅｕ）、配列番号１８６に示されるアミノ酸配列の１６５番目のロイシン、配列番号１８７に示されるアミノ酸配列の１６４番目のロイシンは、上記ヒト４－１ＢＢの細胞内領域のポリペプチドと上記ヒトＣＤ３ζの細胞内領域のポリペプチドの共通配列である。

[0032] 本明細書において、「免疫担当細胞」とは、生体において免疫機能を担う細胞を意味する。免疫担当細胞としては、例えば、Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ細胞）、Ｂ細胞等のリンパ球系細胞や、単球、マクロファージ、樹状細胞等の抗原提示細胞や、好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞等の顆粒球を挙げることができる。具体的には、ヒト、イヌ、ネコ、ブタ、マウス等の哺乳動物由来のＴ細胞、好ましくはヒト由来のＴ細胞を好適に挙げることができる。また、Ｔ細胞は、血液、骨髄液等の体液や、脾臓、胸腺、リンパ節等の組織、若しくは原発腫瘍、転移性腫瘍、がん性腹水等のがん組織に浸潤する免疫担当細胞から単離、精製して得ることができ、さらに、ＥＳ細胞やｉＰＳ細胞から作製されたものを利用してもよい。かかるＴ細胞としては、アルファ・ベータＴ細胞、ガンマ・デルタＴ細胞、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、腫瘍浸潤Ｔ細胞、メモリーＴ細胞、ナイーブＴ細胞、ＮＫＴ細胞を挙げることができる。なお、免疫担当細胞の由来と投与対象とは同じであっても異なってもよい。さらに、投与対処がヒトの場合において、免疫担当細胞としては、投与対象としての患者本人から採取した自家細胞を用いても、他人から採取した他家細胞を用いてもよい。すなわち、ドナーとレシピエントは一致しても不一致でもよいが、一致することが好ましい。

[0033] 上記投与対象としては、哺乳動物又は哺乳動物細胞を好適に挙げることができ、かかる哺乳動物の中でも、ヒト、マウス、イヌ、ラット、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、サル、チンパンジーをより好適に挙げることができ、ヒトを特に好適に挙げることができる。

[0034] 本件ＣＡＲは、好ましくは、がん治療において、がん患者から採取された免疫担当細胞の細胞表面上にエクスビボで発現させるために用いられる。免疫担当細胞としてＴ細胞を用いる場合、本件ＣＡＲにおける細胞膜貫通領域と、かかる細胞膜貫通領域のＣ末端に融合した免疫担当細胞活性化シグナル伝達領域とからなるペプチドとしては、具体的には、配列番号１８５～１８７のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドを挙げることができる。また、本件ＣＡＲとしては、具体的に、上記（１－３）の一本鎖抗体、上記（２－３）の一本鎖抗体、上記（１－３’－１）の一本鎖抗体、上記（１－３’－２）の一本鎖抗体、上記（１－３’－３）の一本鎖抗体、上記（２－３’－１）の一本鎖抗体、上記（２－３’－２）の一本鎖抗体、上記（２－３’－３）の一本鎖抗体、及び上記（２－３’－４）の一本鎖抗体からなる群から選択される一本鎖抗体と、かかる一本鎖抗体のＣ末端に融合した、配列番号１８５～１８７のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものを挙げることができる。

[0035] すなわち、上記本件ＣＡＲとしては、

上記（１－３）の一本鎖抗体と、配列番号１８５に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、

上記（１－３）の一本鎖抗体と、配列番号１８６に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、

上記（１－３）の一本鎖抗体と、配列番号１８７に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、

上記（１－３’－１）の一本鎖抗体と、配列番号１８５に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、

上記（１－３’－１）の一本鎖抗体と、配列番号１８６に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、

上記（１－３’－１）の一本鎖抗体と、配列番号１８７に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、

上記（１－３’－２）の一本鎖抗体と、配列番号１８５に示されるアミノ酸

配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（１－３’－２）の一本鎖抗体と、配列番号１８６に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（１－３’－２）の一本鎖抗体と、配列番号１８７に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（１－３’－３）の一本鎖抗体と、配列番号１８５に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（１－３’－３）の一本鎖抗体と、配列番号１８６に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（１－３’－３）の一本鎖抗体と、配列番号１８７に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（２－３）の一本鎖抗体と、配列番号１８５に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（２－３）の一本鎖抗体と、配列番号１８６に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（２－３）の一本鎖抗体と、配列番号１８７に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（２－３’－１）の一本鎖抗体と、配列番号１８５に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（２－３’－１）の一本鎖抗体と、配列番号１８６に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（２－３’－１）の一本鎖抗体と、配列番号１８７に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（２－３’－２）の一本鎖抗体と、配列番号１８５に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（２－３’－２）の一本鎖抗体と、配列番号１８６に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（２－３’－２）の一本鎖抗体と、配列番号１８７に示されるアミノ酸

配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（２－３’－３）の一本鎖抗体と、配列番号１８５に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（２－３’－３）の一本鎖抗体と、配列番号１８６に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（２－３’－３）の一本鎖抗体と、配列番号１８７に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（２－３’－４）の一本鎖抗体と、配列番号１８５に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（２－３’－４）の一本鎖抗体と、配列番号１８６に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むものや、
上記（２－３’－４）の一本鎖抗体と、配列番号１８７に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとを含むもの、を挙げることができる。

[0036] 本件免疫担当細胞としては、ＣＡＲを発現する免疫担当細胞であればよく、ＣＡＲは通常天然には存在しないため、内在性ではなく、外来性のＣＡＲを発現する免疫担当細胞である。本件免疫担当細胞としては、さらに、ＩＬ－７及び／又はＣＣＬ１９を発現するものが好ましい。免疫担当細胞がＩＬ－７及び／又はＣＣＬ１９の発現が認められない細胞、例えば、Ｔ細胞である場合や、免疫担当細胞がＴ細胞以外であってＩＬ－７及び／又はＣＣＬ１９の発現が低い細胞の場合には、本件免疫担当細胞としては、外来性のＩＬ－７及び／又はＣＣＬ１９を発現するものが好ましい。

[0037] 本件免疫担当細胞は、本件ＣＡＲ遺伝子を含む本件ベクターや、ＩＬ－７及び／又はＣＣＬ１９遺伝子を含むベクターを、免疫担当細胞へ導入することにより作製することができる。導入する方法としては、哺乳動物細胞にＤＮＡを導入する方法であればよく、例えば、エレクトロポレーション法（Cytotechnology,3,133(1990)）、リン酸カルシウム法（特開平２－２２７０７５号公報）、リポフェクション法（Proc.Natl.Acad.Sci.U. S.A.,84,7413(1987)）、ウイルス感染法等の方法を挙げることができる。かかるウイルス感染法

としては、ＣＡＲ発現ベクター（国際公開２０１６／０５６２２８号パンフレット）と、パッケージングプラスミドとをＧＰ２－２９３細胞（タカラバイオ社製）、Ｐｌａｔ－ＧＰ細胞（コスモ・バイオ社製）、ＰＧ１３細胞（ATCC CRL-10686）、ＰＡ３１７細胞（ATCC CRL-9078）などのパッケージング細胞にトランスフェクションして組換えウイルスを作製し、かかる組換えウイルスをＴ細胞に感染させる方法を挙げることができる。

[0038] また、本件免疫担当細胞は、本件ＣＡＲをコードするヌクレオチドや、ＩＬ－７及び／又はＣＣＬ１９をコードするヌクレオチドを、公知の遺伝子編集技術を用いて、適切なプロポーターの制御下で発現可能なように、細胞のゲノムに組み込むことによって製造してもよい。公知の遺伝子編集術としては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮ（転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ）、ＣＲＩＳＰＲ（Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ Ｒｅｐｅａｔ）－Ｃａｓシステム等のエンドヌクレアーゼを用いる技術が挙げられる。

[0039] 本件免疫担当細胞は、他の抗がん剤と併用して用いることができる。他の抗がん剤としては、シクロホスファミド、ベンダムスチン、イオスファミド、ダカルバジン等のアルキル化薬、ペントスタチン、フルダラビン、クラドリビン、メソトレキセート、５－フルオロウラシル、６－メルカプトプリン、エノシタビン等の代謝拮抗薬、リツキシマブ、セツキシマブ、トラスツズマブ等の分子標的薬、イマチニブ、ゲフェチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、ダサチニブ、スニチニブ、トラメチニブ等のキナーゼ阻害剤、ボルテゾミブ等のプロテアソーム阻害剤、シクロスポリン、タクロリムス等のカルシニューリン阻害薬、イダルビジン、ドキソルビシンマイトマイシンＣ等の抗がん性抗生物質、イリノテカン、エトポシド等の植物アルカロイド、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン等のプラチナ製剤、タモキシフェン、ビカルダミド等のホルモン療法薬、インターフェロン、ニボルマブ、ペンブロリズマブ等の免疫制御薬を挙げることができる。

[0040] 上記「本件免疫担当細胞と他の抗がん剤と併用して用いる」方法としては、他の抗がん剤を用いて処理し、その後本件免疫担当細胞を用いる方法や、本件免疫担当細胞と他の抗がん剤を同時に用いる方法や、本件免疫担当細胞を用いて処理し、その後他の抗がん剤を用いる方法を挙げることができる。また、本件免疫担当細胞と他の抗がん剤と併用した場合には、がんの治療効果がより向上するとともに、それぞれの投与回数又は投与量を減らすことで、それぞれによる副作用を低減させることが可能となる。

[0041] 本件抗体遺伝子としては、本件抗体をコードする抗体遺伝子（ヌクレオチド）であれば特に制限されず、例えば、

（１－１Ｄ）配列番号１１１に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の９１～１０５番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（１－１）のＨ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１１１に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の１４８～１９８番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（１－１）のＨ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１１１に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の２９５～３２４番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（１－１）のＨ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；と、

配列番号１１２に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の７０～１０２番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（１－１）のＬ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１１２に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の１４８～１６８番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（１－１）のＬ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１１２に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の２６５～２９１番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（１－１）のＬ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子

）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；とを含むものや、

（２－１Ｄ）配列番号１１５に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の９１～１０５番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（２－１）のＨ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１１５に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の１４８～１９８番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（２－１）のＨ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１１５に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の２９５～３２１番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（２－１）のＨ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；と、

配列番号１１６に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の７０～１１７番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（２－１）のＬ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１１６に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の１６３～１８３番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（２－１）のＬ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１１６に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の２８０～３０６番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（２－１）のＬ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；とを含むものや、

（３－１Ｄ）配列番号１１９に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の９１～１０５番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（３－１）のＨ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１１９に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の１４８～１９８番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（３－１）のＨ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１１９に示され

るヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の２９５～３１５番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（３－１）のＨ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；と、配列番号１２０に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の７０～１０２番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（３－１）のＬ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１２０に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の１４８～１６８番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（３－１）のＬ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１２０に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の２６５～２８８番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（３－１）のＬ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；とを含むものや、

（４－１Ｄ）配列番号１２３に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の９１～１０５番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（４－１）のＨ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１２３に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の１４８～１９８番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（４－１）のＨ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１２３に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の２９８～３３０番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（４－１）のＨ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；と、配列番号１２４に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の７０～１０２番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（４－１）のＬ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１２４に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の１４８～１６８番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ２遺伝子

（上記（４－１）のＬ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１２４に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の２６５～２９１番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（４－１）のＬ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；とを含むものや、

（５－１Ｄ）配列番号１２７に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の９１～１０５番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（５－１）のＨ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１２７に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の１４８～１９８番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（５－１）のＨ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１２７に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の２９８～３２１番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（５－１）のＨ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；と、

配列番号１２８に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の７０～１２０番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（５－１）のＬ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１２８に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の１６６～１８６番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（５－１）のＬ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１２８に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の２８３～３０９番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（５－１）のＬ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；とを含むものや、

（６－１Ｄ）配列番号１３１に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の９１～１０５番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（６－１）のＨ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１

遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１３１に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の１４８～１９８番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（６－１）のＨ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１３１に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の２９５～３１８番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（６－１）のＨ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；と、

配列番号１３２に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の７０～１０２番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（６－１）のＬ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１３２に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の１４８～１６８番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（６－１）のＬ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１３２に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の２６５～２９１番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（６－１）のＬ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；とを含むものや、

（７－１Ｄ）配列番号１３５に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の９１～１０５番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（７－１）のＨ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１３５に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の１４８～１９８番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（７－１）のＨ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１３５に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の２９５～３１５番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（７－１）のＨ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；と、

配列番号１３６に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の７０～１

０２番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（７－１）のＬ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１３６に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の１４８～１６８番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（７－１）のＬ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１３６に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の２６５～２９１番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（７－１）のＬ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；とを含むものや、

（８－１Ｄ）配列番号１３９に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の９１～１０５番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（８－１）のＨ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１３９に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の１４８～１９８番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（８－１）のＨ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１３９に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の２９５～３１５番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（８－１）のＨ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；と、

配列番号１４０に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の７０～１０２番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（８－１）のＬ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１４０に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の１４８～１６８番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（８－１）のＬ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１４０に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の２６５～２９１番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（８－１）のＬ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子

）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；とを含むものや、

（９－１Ｄ）配列番号１４３に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の９１～１０５番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（９－１）のＨ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１４３に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の１４８～１９８番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（９－１）のＨ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１４３に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の２９８～３３０番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（９－１）のＨ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；と、

配列番号１４４に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の７０～１０２番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（９－１）のＬ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１４４に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の１４８～１６８番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（９－１）のＬ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１４４に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の２６５～２９１番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（９－１）のＬ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；とを含むものや、

（１０－１Ｄ）配列番号１４７に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の９１～１０５番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（１０－１）のＨ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１４７に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の１４８～１９８番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（１０－１）のＨ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１４７に

示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の２９５～３２７番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（１０－１）のＨ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；と、

配列番号１４８に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の７０～１０２番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（１０－１）のＬ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１４８に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の１４８～１６８番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（１０－１）のＬ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１４８に示されるヌクレオチド配列からなるＬ鎖Ｖ領域の２６５～２９１番目のヌクレオチド残基からなるＬ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（１０－１）のＬ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｌ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；とを含むものや、

（１１－１Ｄ）配列番号１５１に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の９１～１０５番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ１遺伝子（上記（１１－１）のＨ鎖ＣＤＲ１をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ１遺伝子の縮重コドン改変体；配列番号１５１に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の１４８～１９８番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ２遺伝子（上記（１１－１）のＨ鎖ＣＤＲ２をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ２遺伝子の縮重コドン改変体；及び配列番号１５１に示されるヌクレオチド配列からなるＨ鎖Ｖ領域の２９５～３２４番目のヌクレオチド残基からなるＨ鎖ＣＤＲ３遺伝子（上記（１１－１）のＨ鎖ＣＤＲ３をコードする遺伝子）、又は当該Ｈ鎖ＣＤＲ３遺伝子の縮重コドン改変体；とを含むものを挙げることができる。

[0042] さらに本件抗体遺伝子としては、

（１－２Ｄ）配列番号１１１に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０

％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖可変領域遺伝子（配列番号７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖可変領域をコードする遺伝子）と、配列番号１１２に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖可変領域遺伝子（配列番号８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖可変領域をコードする遺伝子）とを含むものや、

（２－２Ｄ）配列番号１１５に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖可変領域遺伝子（配列番号１７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖可変領域をコードする遺伝子）と、配列番号１１６に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖可変領域遺伝子（配列番号１８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖可変領域をコードする遺伝子）とを含むものや、

（３－２Ｄ）配列番号１１９に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖可変領域遺伝子（配列番号２７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖可変領域をコードする遺伝子）と、配列番号１２０に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖可変領域遺伝子（配列番号２８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖可変領域をコードする遺伝子）とを含むものや、

（４－２Ｄ）配列番号１２３に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖可変領域遺伝子（配列番号３７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖可変領域をコードする遺伝子）と、配列番号１２４に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列

同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖可変領域遺伝子（配列番号３８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖可変領域をコードする遺伝子）とを含むものや、

（５－２Ｄ）配列番号１２７に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖可変領域遺伝子（配列番号４７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖可変領域をコードする遺伝子）と、配列番号１２８に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖可変領域遺伝子（配列番号４８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖可変領域をコードする遺伝子）とを含むものや、

（６－２Ｄ）配列番号１３１に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖可変領域遺伝子（配列番号５７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖可変領域をコードする遺伝子）と、配列番号１３２に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖可変領域遺伝子（配列番号５８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖可変領域をコードする遺伝子）とを含むものや、

（７－２Ｄ）配列番号１３５に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖可変領域遺伝子（配列番号６７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖可変領域をコードする遺伝子）と、配列番号１３６に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖可変領域遺伝子（配列番号６８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖可変領域をコードする遺伝子）とを含むものや、

（８－２Ｄ）配列番号１３９に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０

％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖可変領域遺伝子（配列番号７７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖可変領域をコードする遺伝子）と、配列番号１４０に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖可変領域遺伝子（配列番号７８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖可変領域をコードする遺伝子）とを含むものや、

（９－２Ｄ）配列番号１４３に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖可変領域遺伝子（配列番号８７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖可変領域をコードする遺伝子）と、配列番号１４４に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖可変領域遺伝子（配列番号８８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖可変領域をコードする遺伝子）とを含むものや、

（１０－２Ｄ）配列番号１４７に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖可変領域遺伝子（配列番号９７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖可変領域をコードする遺伝子）と、配列番号１４８に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖可変領域遺伝子（配列番号９８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖可変領域をコードする遺伝子）とを含むものや、

（１１－２Ｄ）配列番号１５１に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖可変領域遺伝子（配列番号１０７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖可変領域をコードする遺伝子）

と、配列番号１５２に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖可変領域遺伝子（配列番号１０８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖可変領域をコードする遺伝子）とを含むものを挙げることができる。

[0043] 特に本件抗体遺伝子としては、

（１－４Ｄ）配列番号１１３に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖遺伝子（配列番号９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖をコードする遺伝子）と、配列番号１１４に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖遺伝子（配列番号１０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖をコードする遺伝子）とを含むものや、

（２－４Ｄ）配列番号１１７に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖遺伝子（配列番号１９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖をコードする遺伝子）と、配列番号１１８に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖遺伝子（配列番号２０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖をコードする遺伝子）とを含むものや、

（３－４Ｄ）配列番号１２１に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖遺伝子（配列番号２９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖をコードする遺伝子）と、配列番号１２２に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖遺伝子（配列番号３０に示されるアミノ酸配

列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖をコードする遺伝子）とを含むものや、

（４－４Ｄ）配列番号１２５に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖遺伝子（配列番号３９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖をコードする遺伝子）と、配列番号１２６に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖遺伝子（配列番号４０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖をコードする遺伝子）とを含むものや、

（５－４Ｄ）配列番号１２９に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖遺伝子（配列番号４９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖をコードする遺伝子）と、配列番号１３０に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖遺伝子（配列番号５０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖をコードする遺伝子）とを含むものや、

（６－４Ｄ）配列番号１３３に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖遺伝子（配列番号５９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖をコードする遺伝子）と、配列番号１３４に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖遺伝子（配列番号６０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖をコードする遺伝子）とを含むものや、

（７－４Ｄ）配列番号１３７に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖遺伝子（配列

番号６９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖をコードする遺伝子）と、配列番号１３８に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖遺伝子（配列番号７０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖をコードする遺伝子）とを含むものや、

（８－４Ｄ）配列番号１４１に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖遺伝子（配列番号７９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖をコードする遺伝子）と、配列番号１４２に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖遺伝子（配列番号８０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖をコードする遺伝子）とを含むものや、

（９－４Ｄ）配列番号１４５に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖遺伝子（配列番号８９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖をコードする遺伝子）と、配列番号１４６に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖遺伝子（配列番号９０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖をコードする遺伝子）とを含むものや、

（１０－４Ｄ）配列番号１４９に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖遺伝子（配列番号９９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖をコードする遺伝子）と、配列番号１５０に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖遺伝子（配列番号１００に示されるアミノ

酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖をコードする遺伝子）とを含むものや、

（１１－４Ｄ）配列番号１５３に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＨ鎖遺伝子（配列番号１０９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＨ鎖をコードする遺伝子）と、配列番号１５４に示されるヌクレオチド配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するヌクレオチド酸配列からなるＬ鎖遺伝子（配列番号１１０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるＬ鎖をコードする遺伝子）とを含むものを具体的に挙げることができる。

[0044] 本件ＣＡＲ遺伝子としては、本件ＣＡＲをコードする遺伝子（ヌクレオチド）であれば特に制限されず、例えば、

（１－３Ｄ）上記（１－３）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（２－３Ｄ）上記（２－３）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（３－３Ｄ）上記（３－３）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（４－３Ｄ）上記（４－３）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（５－３Ｄ）上記（５－３）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（６－３Ｄ）上記（６－３）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（７－３Ｄ）上記（７－３）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（８－３Ｄ）上記（８－３）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（９－３Ｄ）上記（９－３）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（１０－３Ｄ）上記（１０－３）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（１１－３Ｄ）上記（１１－３）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（１－３’－１Ｄ）上記（１－３’－１）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（１－３’－２Ｄ）上記（１－３’－２）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（１－３’－３Ｄ）上記（１－３’－３）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（２－３’－１Ｄ）上記（２－３’－１）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（２－３’－２Ｄ）上記（２－３’－２）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（２－３’－３Ｄ）上記（２－３’－３）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものや、

（２－３’－４Ｄ）上記（２－３’－４）の一本鎖抗体をコードする遺伝子、又は当該遺伝子の縮重コドン改変体を含むものを具体的に挙げることができる。

[0045] 本明細書において、「少なくとも８０％以上の同一性」とは、同一性が８０％以上であることを意味し、好ましくは８５％以上、より好ましくは８８％以上、さらに好ましくは９０％以上、さらにより好ましくは９３％以上、特に好ましくは９５％以上、特により好ましくは９８％以上、最も好ましくは１００％の同一性を意味する。

[0046] 本明細書において、用語「同一性」は、ポリペプチド又はポリヌクレオチド配列近似性の程度（これは、クエリー配列と他の好ましくは同一の型の配

列（核酸若しくはタンパク質配列）とのマッチングにより決定される）を意味する。「同一性」を計算及び決定する好ましいコンピュータープログラム法としては、ＧＣＧ ＢＬＡＳＴ（Ｂａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ）（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９０，２１５：４０３－４１０；Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９９７，２５：３３８９－３４０２；Ｄｅｖｅｒｅｕｘ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１９８４，１２：３８７）、並びにＢＬＡＳＴＮ ２．０（Ｇｉｓｈ Ｗ．，ｈｔｔｐ：／／ｂｌａｓｔ．ｗｕｓｔｌ．ｅｄｕ，１９９６－２００２）、並びにＦＡＳＴＡ（Ｐｅａｒｓｏｎ及びＬｉｐｍａｎ，Ｐｒｏｃ． Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １９８８，８５：２４４４－２４４８）、並びに最も長く重複した一対のコンティグを決定及びアライメントするＧＣＧ ＧｅｌＭｅｒｇｅ（Ｗｉｂｕｒ及びＬｉｐｍａｎ，ＳＩＡＭ Ｊ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．１９８４，４４：５５７－５６７；Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ及びＷｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９７０，４８：４４３－４５３）が挙げられるが、これらに限定されない。

[0047] 本明細書において、「配列番号Ｘに示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列」とは、換言すると、「配列番号Ｘに示されるアミノ酸配列において、０、１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列」であり、かつ、配列番号Ｘに示されるアミノ酸と同等の機能を有する。ここで、「１若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列」とは、例えば１～３０個の範囲内、好ましくは１～２０個の範囲内、より好ましくは１～１５個の範囲内、さらに好ましくは１～１０個の範囲内、さらに好ましくは１～５個の範囲内、さらに好ましくは１～３個の範囲内、さらに好ましくは１～２個の範囲内の数のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列を意味する。これらアミノ酸残基の変異処理は、化学合成、遺伝子工学的手法、突然変異誘発等の当業者に既知

の任意の方法により行うことができる。

[0048] 本件ベクターにおけるプロモーターとしては、プロモーターの下流に位置する本件抗体遺伝子がコードするｍＲＮＡの転写を開始させる領域であればよく、プロモーターには、通常転写開始点（ＴＳＳ）が含まれる。

[0049] 本件ベクターにおけるプロモーターやベクターの種類は、導入する宿主細胞（又は宿主生物）の種類に応じて適宜選択することができる。

[0050] 宿主細胞としては、本件抗体遺伝子が転写されて本件抗体が発現するもの、又は本件ＣＡＲ遺伝子のｍＲＮＡが転写されて本件ＣＡＲが発現するものであればよく、本件ベクターとして「本件抗体遺伝子を含むベクター」を導入する場合には、宿主細胞として以下の酵母、哺乳動物細胞、昆虫細胞、又は植物細胞を用いることができ、本件ベクターとして「本件ＣＡＲ遺伝子を含むベクター」を導入する場合には、宿主細胞として上記免疫担当細胞を用いることができる。

[0051] 宿主細胞として酵母（例えば、Saccharomyces Cerevisiae、Schizosaccharomyces Pombe等）を用いる場合、本件ベクターとしては、例えば、ＹＥＰ１３（ＡＴＣＣ３７１１５）、ＹＥｐ２４（ＡＴＣＣ３７０５１）、ＹＣｐ５０（ＡＴＣＣ３７４１９）等のベクター又はかかるベクター由来のものを挙げることができ、プロモーターとしては、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、ＰＨＯ５プロモーター、ＰＧＫプロモーター、ＧＡＰプロモーター、ＡＤＨプロモーター、ｇａｌ１プロモーター、ｇａｌ１０プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、ＭＦα１プロモーター、ＣＵＰ１プロモーターなどを挙げることができる。

[0052] また、宿主細胞として哺乳動物細胞（例えば、ヒト由来のナマルバ［Namalwa］細胞、サル由来のＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣由来のＣＨＯ細胞、ヒト、マウス等由来のＴ細胞など）を用いる場合であって、本件ベクターが抗体遺伝子を含むベクターのとき、本件ベクターとしては、例えば、ｐcDNAｌ、ｐｃＤＭ８（フナコシ社製）、ｐＡＧＥ１０７（特開平３－２２９７９号公報；Cytotechnology,3,133,(1990)）、ｐＡＳ３－３（特開平２

－２２７０７５号公報）、ｐＣＤＭ８（Nature,329,840,(1987)）、ｐcDNAＩ／Ａｍｐ（Invitrogen社製）、ｐＲＥＰ４（Invitrogen社製）、ｐＡＧＥ１０３（J.Biochemistry,101,1307（1987））、ｐＡＧＥ２１０等のベクター又はかかるベクター由来のものを挙げることができる。一方、宿主細胞として哺乳動物細胞（例えば、ヒト由来の上記免疫担当細胞など）を用いる場合であって、本件ベクターがＣＡＲ遺伝子を含むベクターのとき、本件ベクターとしては、例えば、ｐＭＳＧＶベクター（Tamada k et al., Clin Cancer Res 18:6436-6445(2002)）やｐＭＳＣＶベクター（タカラバイオ社製）などのレトロウイルスベクター又はかかるベクター由来のものを挙げることができる。

[0053] 本件ベクターにおけるプロモーターとしては、例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）のＩＥ（immediate early）遺伝子のプロモーター、ＳＶ４０の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、ＳＲαプロモーター、ＮＦＡＴプロモーター、ＨＩＦプロモーター等を挙げることができる。

[0054] また、宿主細胞として昆虫細胞（例えば、Spodopterafrugiperdaの卵巣細胞であるＳｆ９細胞、Ｓｆ２１細胞、Trichoplusianiの卵巣細胞であるＨｉｇｈ５細胞等）を用いる場合、本件ベクターとしては、例えば、組換えバキュロウイルス作製法において用いられるトランスファーベクター、具体的には、ｐＶＬ１３９２、ｐＶＬ１３９３、ｐＢｌｕｅＢａｃＩＩＩ（ともにInvitorogen社製）等のベクター又はかかるベクター由来のものを挙げることができ、プロモーターとしては、例えば、ポリヘドリンプロモーター、ｐ１０プロモーター等を挙げることができる。

[0055] また、宿主細胞として植物細胞（例えば、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等）を用いる場合、発現ベクターとしては、例えば、Ｔｉプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等のベクター又はかかるベクター由来のものを挙げることができ、プロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウ

イルス（ＣａＭＶ）の３５Ｓプロモーター、イネアクチン１プロモーター等を挙げることができる。

[0056] 本件ベクターとしては、遺伝子発現効率をさらに高めるために、エンハンサー領域やリボソーム結合領域（ＲＢＳ；ribosome binding site）の塩基配列をさらに含むものや、本件宿主細胞のスクリーニングのために、宿主細胞の種類に応じた薬剤耐性遺伝子（例えば、スペクチノマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、ジェネティシン耐性遺伝子等）をさらに含むものが好ましい。エンハンサー領域は、通常プロモーターの上流に配置され、ＲＢＳは、通常プロモーターと本件遺伝子の間に配置される。本件ベクターに組み込む本件抗体遺伝子のヌクレオチド配列は、発現させる宿主細胞に合わせてコドン配列の最適化がされていてもよい。本件ベクターは、遺伝子組み換え技術を用いて公知の方法により作製することができる。

[0057] 本件宿主細胞は、本件ベクターを、宿主細胞の種類に応じた方法により、宿主細胞へ導入（トランスフェクション）することにより得ることができる。

[0058] 宿主細胞として上記酵母を用いる場合、本件ベクターの酵母への導入方法としては、酵母にＤＮＡを導入する方法であればよく、例えば、エレクトロポレーション法（Methods.Enzymol.,194,182(1990)）、スフェロプラスト法（Proc.Natl.Acad.Sci.U. S. A,84,1929(1978)）、酢酸リチウム法（J.Bacteriology,153,163(1983)）等の方法を挙げることができる。

[0059] また、宿主細胞として上記哺乳動物細胞を用いる場合、本件ベクターの哺乳動物細胞への導入方法としては、哺乳動物細胞にＤＮＡを導入する方法であればよく、例えば、上述のとおり、エレクトロポレーション法（Cytotechnology,3,133(1990)）、リン酸カルシウム法（特開平２－２２７０７５号公報）、リポフェクション法（Proc.Natl.Acad.Sci.U. S.A.,84,7413(1987)）、

ウイルス感染法等の方法を挙げることができる。かかるウイルス感染法としては、上述のとおり、ＣＡＲ発現ベクター（国際公開２０１６／０５６２２８号パンフレット）と、パッケージングプラスミドとをＧＰ２－２９３細胞（タカラバイオ社製）、Ｐｌａｔ－ＧＰ細胞（コスモ・バイオ社製）、ＰＧ１３細胞（ATCC CRL-10686）、ＰＡ３１７細胞（ATCC CRL-9078）などのパッケージング細胞にトランスフェクションして組換えウイルスを作製し、かかる組換えウイルスをＴ細胞に感染させる方法を挙げることができる。

[0060] また、宿主細胞として上記昆虫細胞を用いる場合、本件ベクターの昆虫細胞への導入方法としては、例えば「Current Protocols in Molecular Biology」、「Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H.Freeman and Company, New York（１９９２）」、「Bio/Technology,6,47(1988)」等に記載の方法にしたがって、本件ベクター（トランスファーベクター）と、バキュロウイルス由来のゲノムＤＮＡとを上記昆虫細胞にコトランスフェクションし、組換えバキュロウイルスを作製する方法を挙げることができる。かかるコトランスフェクションの方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平２－２２７０７５号公報）、リポフェクション法（Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,84,7413(1987)等の方法を挙げることができる。

[0061] また、宿主細胞として上記植物細胞を用いる場合、本件ベクターの植物細胞への導入方法としては、例えば、アグロバクテリウム（Agrobacterium）を用いる方法（特開昭５９－１４０８８５号公報、特開昭６０－７００８０号公報）、エレクトロポレーション法（特開昭６０－２５１８８７号公報）、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法（日本特許第２６０６８５６号公報、日本特許第２５１７８１３号公報）等の方法を挙げることができる。

[0062] 本件抗体は、上述の方法で得られた本件宿主細胞を、宿主細胞に応じた培養液中で培養することにより得ることができる。

[0063] また、トランスジェニック動物作製技術を用いて本件抗体遺伝子（本件ベクター）が組み込まれたマウス、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリ、ブタ等のトランスジェニック動物を作製し、かかるトランスジェニック動物の血液、

ミルク中などから本件抗体遺伝子に由来する抗体を大量に産生することもできる。

[0064] さらに、配列番号１５５に示されるアミノ酸配列からなるヒト由来ＧＰＣ３ポリペプチドを含む物質（ＧＰＣ３ポリペプチド抗原）を、非ヒト動物（例えば、マウス、ラット）に免疫し、ファージディスプレイ法によりscFv遺伝子のファージライブラリーを作製し、かかるＧＰＣ３ポリペプチド抗原、及び／又はかかるＧＰＣ３ポリペプチド抗原を発現する細胞株（好ましくは、内在性ＧＰＣ３を発現しない細胞株）と、好ましくは、さらにコンペティターとして配列番号１５９に示されるアミノ酸配列からなるＧＰＣ３のＣ末端側ポリペプチドとを用いたバイオパニング（Biopanning）法により、本件ｓｃＦｖを得ることができる。また、上記抗原を免疫した非ヒト動物から、細胞融合技術を用いて、抗体を産生するハイブリドーマを調製し、上記抗原を固相化したプレートを用いたＥＬＩＳＡ法によるスクリーニングにより、本件抗体を含む培養上清を得ることもできる。本件抗体は、かかる培養上清から公知の抗体精製技術を用いて分離し、精製することができる。

[0065] 本件検出方法としては、本件抗体を用いて、試料（例えば、血液、組織、尿等）中の細胞膜に局在する（細胞膜にアンカーされた）ＧＰＣ３を検出する工程を備えた方法であればよく、具体的な検出方法としては、本件抗体を用いた免疫蛍光染色法、ウェスタンブロッティング法、ＥＬＩＳＡ等を挙げることができる。

[0066] 本件検出用キットとしては、「ＧＰＣ３を検出するため」という用途に限定された、本件抗体又はその標識物を含むキットであり、かかるキットには、一般にこの種のキットに用いられる成分、例えば担体、ｐＨ緩衝剤、安定剤の他、取扱説明書、ＧＰＣ３を検出するための説明書等の添付文書が通常含まれる。

[0067] 本件検出方法や本件検出用キットにおいて、検出対象のＧＰＣ３の生物種は、マウス、ラット等の非ヒト動物であってもよいが、通常ヒトである。

[0068] 上記本件抗体の標識物における標識物質としては、例えば、ペルオキシダ

ーゼ（例えば、horseradish peroxidase［ＨＲＰ］）、アルカリフォスファターゼ、β－Ｄ－ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコ－ス－６－ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質、緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescence Protein；ＧＦＰ）、シアン蛍光タンパク質（Cyan Fluorescence Protein；ＣＦＰ）、青色蛍光タンパク質（Blue Fluorescence Protein；ＢＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（Yellow Fluorescence Protein；ＹＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（Red Fluorescence Protein；ＲＦＰ）、ルシフェラーゼ（luciferase）等の蛍光タンパク質、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ若しくは^{131}Ｉ等の放射性同位体、ビオチン、アビジン、又は化学発光物質を挙げることができる。

[0069] 本明細書において引用された、学術文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。また、本出願は、日本特許出願２０１７－００１７３２号（２０１７年１月１０日出願）に基づく優先権を主張しており、この内容はその全体が本明細書に参照として取り込まれる。

[0070] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例 1

[0071] １．ヒトＧＰＣ３のＮ末端側ポリペプチドを認識する新規抗ＧＰＣ３抗体の調製

［概要］

抗ヒトＧＰＣ３抗体を調製するための免疫動物としてSKG/Jclマウスを使用し、免疫する抗原として全長ヒトＧＰＣ３タンパク質を使用した。SKG/Jclマウスは、関節リウマチを自然発症する自己免疫疾患モデルマウスであり、加

齢や飼育環境によって、自己成分に対しても抗体産生応答することが知られている。一方、ＧＰＣ３は、ヒト及びマウスの間で相同性が高く、通常は正常マウスに免疫しても抗体産生産生が起こりにくいため、SKG/Jclマウスを免疫動物として使用した。ＧＰＣ３を免疫したマウスのＢ細胞由来ｃＤＮＡからｓｃＦｖファージライブラリーを作製し、ファージディスプレイ法を応用して、抗ヒトＧＰＣ３抗体を単離した。

[0072] 免疫したマウスの抗血清には、多種類の抗体が含まれるが、ＧＰＣ３に対して特異性の低い抗体や、ＧＰＣ３のＣ末端側ポリペプチドを認識する抗体を産生するマウスを除き、ＧＰＣ３のＮ末端側ポリペプチドに対して特異性を有する抗体を産生するマウスを選択する必要がある。そこでＥＬＩＳＡとＦＣＭを用いて、ＧＰＣ３のＮ末端側ポリペプチドに特異的に結合する抗体産生を示すマウス個体を選択した。具体的には、免疫マウス由来Ｂ細胞の全ＲＮＡから逆転写反応によりｃＤＮＡを合成し、抗体遺伝子を増幅して抗体遺伝子ライブラリーを作製した。抗体遺伝子ライブラリーからｓｃＦｖファージライブラリーを構築し、大腸菌に感染させてｓｃＦｖを発現させたものに対して、組換えＧＰＣ３、ＧＰＣ３発現細胞株、及びＧＰＣ３のＣ末端側ポリペプチドを用いたバイオパンニングを行うことにより、目的のｓｃＦｖ、すなわち、ＧＰＣ３のＮ末端側ポリペプチドに対する抗体を発現するファージを濃縮した。さらに、得られたｓｃＦｖについて、細胞中のＧＰＣ３、すなわち、ＧＰＩ（Glycosylphosphatidylinositol）アンカーを介して細胞膜に局在（結合）するＧＰＣ３（膜型ＧＰＣ３）に対する結合特異性を解析するために、cell based-ELISA、ＦＣＭを用いて検証した。また、結合特異性を有するクローンのＨ鎖可変領域及びＬ鎖可変領域のヌクレオチド配列をシーケンスし、かかる配列を基に、免疫マウス由来Ｂ細胞が産生する抗ＧＰＣ３抗体のヌクレオチド配列を決定した。最後にＧＰＣ３のＮ末端側ポリペプチド断片及びＣ末端側ポリペプチド断片を細胞表面に発現させたマンマリアン・ディスプレイ法を用いて、ｓｃＦｖのエピトープがＧＰＣ３のＮ末端側ポリペプチド断片であることを確認した。以下に詳細な方法及び結果を示

す。

[0073] １－１　材料と方法

［細胞培養］

ヒトＧＰＣ３発現細胞として、ＪＨＨ７細胞株、ＨｅｐＧ２細胞株、及びヒトＧＰＣ３全長を強制発現させたＳＫ－Ｈｅｐ－１細胞株（以下、「ＧＰＣ３発現細胞株」ということがある）を用いて、抗ＧＰＣ３抗体のバイオパンニング及びスクリーニングを行った。ＪＨＨ７細胞株は、肝細胞がん由来のＧＰＣ３発現細胞株であり、当該細胞中には、ＧＰＩ（Glycosylphosphatidylinositol）アンカーを介して細胞膜に結合するＧＰＣ３（膜型ＧＰＣ３）が恒常的に発現している。一方、ＨｅｐＧ２細胞株は、ＪＨＨ７細胞株と同様に、肝細胞がん由来のＧＰＣ３発現細胞株であるが、膜型ＧＰＣ３よりも、細胞膜に結合していない分泌型ＧＰＣ３の発現が優勢な細胞株である。また、Ｓｋ－Ｈｅｐ－１細胞株は、ＧＰＣ３未発現の肝細胞がん由来の細胞株である。このため、強制発現により膜型の全長ＧＰＣ３のみや、一部のエクソンが欠損した部分長の膜型ＧＰＣ３を発現する細胞株を作製することができる。

[0074] ４種類の細胞株（ＪＨＨ７細胞株、ＨｅｐＧ２細胞株、ＧＰＣ３発現細胞株、及びヒト胎児腎臓上皮由来２９３Ｔ細胞株）の培養は、１０％ ＦＢＳ（Gibco社製）及び１％ ペニシリン－ストレプトマイシン(Gibco社製)を含むＤＭＥＭ培養液(Sigma-Aldrich社製)（以下、単に「ＤＭＥＭ培養液」という）中で３７℃、５％CO_2条件下で行った。また、ＣＨＯ－Ｋ１細胞株の培養は、１０％ ＦＢＳ（Gibco社製）を含むＨａｍ’ｓ Ｆ１２培養液(Sigma-Aldrich社製)中で３７℃、５％CO_2条件下で行った。

[0075] ［免疫抗原］

６×Ｈｉｓタグが Ｃ末端に付加した組換えＧＰＣ３（R & D systems社製）をＰＢＳにて０．１ｍｇ／ｍＬに調整し、人工アジュバントTiterMax Gold（TiterMax社製）又はＣＦＡ（Freund’s Adjuvant Complete）（F5881、Sigma-Aldrich社製）と等量混合してエマルジョンを作製したものを初回の免疫抗原

として用いた。２回目以降の免疫抗原は、組換えＧＰＣ３をＰＢＳにて１０～１００μｇ／ｍＬで濃度調整したものを用いた。

[0076] ［ＧＰＣ３発現細胞株の作製］

配列番号１５７で示されるアミノ酸配列からなる全長ヒトＧＰＣ３をコードする遺伝子（配列番号１６０で示されるヌクレオチド配列からなる全長ヒトＧＰＣ３遺伝子）を、ｐｃＤＮＡ３．１ベクター（ThermoFisher Scientific社製）に挿入してＧＰＣ３発現ベクターを作製した。ＧＰＣ３発現ベクターを、ＳＫ－Ｈｅｐ－１細胞株に定法にしたがってトランスフェクションした後、Ｇ４１８（Roche diagnostics社製）を含むＤＭＥＭ培養液中で培養することにより、ＧＰＣ３全長が安定に発現するＳＫ－Ｈｅｐ－１細胞株（ＧＰＣ３発現細胞株）の樹立を行った。

[0077] ［マウスの免疫］

SKG/jclマウス（日本クレア、８週齢雌、ＳＰＦ）を免疫動物として、組換えＧＰＣ３を、フットパットに１週間毎に合計４回免疫した。免疫開始から５週目に採血し、定法にしたがって血清を調製し、抗体価の確認用検体とした。

[0078] ［ＥＬＩＳＡを用いた抗血清の血清抗体価］

免疫したマウスにおける抗ＧＰＣ３抗体産生応答を確認するため、抗原固定化ＥＬＩＳＡを用いて血清抗体価を測定した。０．５又は２μｇ／ｍＬの組換えＧＰＣ３を、９６ウェルマイクロプレート（Nunc社製）に５０μＬ／ウェルずつ添加して室温で１時間、又は４℃で１２時間インキュベートした。その後に、２％ ブロックエース（DSファーマ社製）を、２００μＬ／ウェルずつ添加してブロッキング処理を行った。ＧＰＣ３免疫マウス由来の血清を、１００倍～１６５００倍まで０．１％ ブロックエース／ＰＢＳ溶液にて段階希釈し、各希釈血清サンプルを５０μＬ／ウェルずつ添加して、２時間、室温にてインキュベートし、抗原抗体反応処理を行った。Tween20含有ＰＢＳ（ＰＢＳＴ）溶液でウェルを洗浄した後、２μｇ／ｍＬ ペルオキシダーゼがコンジュゲートしたヤギ抗マウスＩｇＧ（Jackson ImmunoResearch labora

tories社製）を添加して２時間、室温にてインキュベートし、２次抗体反応処理を行った。ＰＢＳＴ溶液で５回ウェルを洗浄後、水分を除去した後にＴＭＢ基質（Thermo Fisher Scientific社製）を５０μＬ／ウェルずつ添加し、発色反応を行った。１５分後に０．１８Ｍ 硫酸を５０μＬ／ウェルずつ添加して、発色反応を停止させた後、４５０ｎｍと５４０ｎｍの吸光度をプレートリーダー（Bio-Rad社製）で測定した。４５０ｎｍの測定値から、５４０ｎｍの測定値を差し引いた補正値を用いて定量を行った。

[0079] ［ＦＣＭを用いた抗血清中の抗体の特異性］

免疫したマウスについて、さらに、膜型ＧＰＣ３に対する抗血清の特異的結合性を確認するため、１００倍希釈したマウス血清と、ＧＰＣ３発現細胞株５×１０^{5}個の細胞とを混合し、氷上で３０分インキュベートした。FACS buffer（１％ＢＳＡ／ＰＢＳ溶液）を加えて遠心処理し、上清を除いた後、２次抗体であるヤギ抗マウスＩｇＧ（H+L）Alexa Fluor488（ThermoFisher Scientific社製）１μｇ／ｍＬを１００μＬ添加し、氷上で３０分インキュベートして２次抗体反応処理を行った。Alexa Fluor488の検出及び蛍光レベルの測定は、フローサイトメーター（FACSCanto）（BD Biosciences社製）を用いて行った。

[0080] ［ｓｃＦｖファージライブラリーの作製］

上記［フローサイトメーター］の項目に記載の方法により、膜型ＧＰＣ３に結合する抗体が産生されたことが示されたマウスについて、Ｂ細胞由来の全ＲＮＡを定法に従って抽出し、全ＲＮＡをテンプレートとしたＲＴ－ＰＣＲを定法に従って行い、ｃＤＮＡを調製した。抗体Ｈ鎖及びＬ鎖の可変領域遺伝子をＰＣＲにより増幅し、それらをフレキシブルリンカーで連結したｓｃＦｖと、繊維状バクテリオファージＭ１３のコートタンパク質ｇ３ｐ（ｃｐ３）との融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を、pTZ19Rファージミドベクターのマルチクローニングサイトに挿入し、ｓｃＦｖ発現ベクターを作製した。ｓｃＦｖライブラリーサイズは、大腸菌ＤＨ１２Ｓ株（Invitrogen社製）の形質転換効率により算出した。形質転換したＤＨ１２Ｓ株にヘ

ルパーファージであるＭ１３ＫＯ７（Invitrogen社製）を感染させて、ｓｃＦｖを発現するファージライブラリーを作製した。

[0081] ［ファージｓｃＦｖのバイオパンニングとクローン化］

Dynabeads His-Tag Isolation & Pulldown磁性ビーズ（VERITAS社製）に、６×Ｈｉｓタグを介して固定化した組換えＧＰＣ３と、ＧＰＣ３発現細胞株とを組み合わせたものをベイトして用いたファージｓｃＦｖのバイオパンニングは、文献「J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97.」、「J Med Virol. 2007 Jun;79(6):852-62.」、「Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 May 20;105(20):7287-92.」、「JOURNAL OF VIROLOGY, Apr. 2004, p. 3325-3332 Vol. 78, No. 7」等に記載の方法にしたがって行った。５種類のシリーズ（Ａ～Ｅシリーズ）からなるバイオパンニング（図１参照）の各ラウンド（工程）において、ポリクローナルなファージ抗体の一部をサンプリングし、ｓｃＦｖの結合特異性を確認するために、抗原固定化ＥＬＩＳＡを、上記［ＥＬＩＳＡを用いた抗血清の血清抗体価］の項目に記載の方法（血清に代えてファージを含む大腸菌の培養上清を用いた方法）にしたがって行うとともに、Cell based-ELISAを、下記［Cell-based ELISAによるｓｃＦｖのスクリーニング］の項目に記載の方法にしたがって行った。なお、かかるバイオパンニングの各工程において、既存の抗ＧＰＣ３抗体であるＧＣ３３（中外製薬社製）とＧＣ１９９（中外製薬社製）を、ベイトにあらかじめ結合させておくことにより、既存抗体が認識するＧＰＣ３のＣ末端エピトープと同じ部分に結合するｓｃＦｖファージが選択されないように工夫した。すなわち、この競合法により、既存の抗ＧＰＣ３抗体と異なるＧＰＣ３エピトープを認識する新規抗体を選択的にパンニングすることが可能となる。バイオパンニングにより濃縮したファージを大腸菌ＤＨ１２Ｓにトランスフォームし、ＬＢアガロース寒天培地に播種し、シングルコロニーを分離した。さらに小スケールＬＢ液体培地中で大腸菌を培養した後、プラスミドを抽出及び精製した。精製したプラスミドのＤＮＡシーケンスを行い、ｓｃＦｖのＨ鎖及びＬ鎖の可変領域のヌクレオチド配列を決定した。

[0082] ［ＦＣＭによるｓｃＦｖのスクリーニング］

ＧＰＣ３発現細胞株（１サンプルあたり５×１０^{5}個）に、ｓｃＦｖファージが分泌されている培養上清１００μＬを加え、混合した後、氷上で３０分インキュベートした。FACS buffer（１％ＢＳＡ／ＰＢＳ溶液）を加えて遠心洗浄した後、２次抗体である抗マウス抗体-alexa488（Thermo Fisher Scientific社製）を１μｇ／ｍＬ加え、氷上で３０分インキュベートした。その後、フローサイトメーター（FACSCanto、BD社製）にて細胞の蛍光染色を測定した。

[0083] ［Cell-based ELISAによるｓｃＦｖのスクリーニング］

１ウェルあたり２×１０^{5}個のＧＰＣ３発現細胞が接着した９６ウェルマイクロプレートのＤＭＥＭ培養液を除いた後、ｓｃＦｖの、細胞やプレートへの非特異的な結合を防ぐ目的で、２％ＢＳＡ－ＰＢＳ溶液を加え、氷上で３０分間インキュベートした。次に、ｓｃＦｖファージが分泌されている大腸菌の培養上清１００μＬを添加し、氷上で４５分間インキュベートした後、ｓｃＦｖのＣ末端側に融合したｃｐ３に対するウサギ抗ｃｐ３抗体（MBL社製）を５μｇ／ｍＬにて１ウェルあたり１００μＬ添加し、さらに氷上で４５分間インキュベートした。抗ｃｐ３抗体検出用の３次抗体として５０００倍希釈したＨＲＰ標識抗ウサギＩｇＧ抗体（MBL社製）を１ウェルあたり１００μＬ添加し、氷上で４５分間インキュベートした後、ＨＲＰの基質としてｏ－フェニレンジアミン（ＯＰＤ）及び過酸化水素を添加して発色させた。４９２ｎｍの吸光度からバックグラウンドとして６２０ｎｍでの吸光度を差し引いた数値にて定量を行った。なお、ｓｃＦｖではなく、ＩｇＧ型抗体に変換済みの抗体を用いてcell-based ELISAを実施したときは、上記条件のうち、抗ｃｐ３抗体及びＨＲＰ標識抗ウサギＩｇＧ抗体に代えて、当該ＩｇＧ型抗体の検出用の２次抗体として２０００倍希釈したＨＲＰ標識抗マウスＩｇＧ抗体（MBL社製）を用いた。

[0084] ［ｓｃＦｖの可変領域遺伝子配列の決定］

膜型ＧＰＣ３に結合するファージｓｃＦｖの可変領域遺伝子配列は、ユニ

バーサルプライマーであるＴ７プライマー（配列番号１７６に示されるヌクレオチド配列からなるプライマー）及びｃｐ３Ｒプライマー（配列番号１７７に示されるヌクレオチド配列からなるプライマー）を、それぞれＨ鎖Ｖ領域（V_H）解読用フォワードプライマー及びＬ鎖Ｖ領域（V_L）解読用リバースプライマーとして用い、シーケンサー（CEQ2000XL、ベックマンコールター社製）にて解読した。

[0085] ［抗体エピトープマッピングに用いる細胞株の作製］

クローングしたｓｃＦｖのエピトープを同定するために哺乳動物ディスプレイ法を応用した。ヒトＧＰＣ３のエクソン１～７からなるＧＰＣ３Ｎ末断片（配列番号１５５に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド）をコードする遺伝子と、ヒトＧＰＣ３のエクソン８～９からなるＧＰＣ３Ｃ末断片（配列番号１５６に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド）をコードする遺伝子とを、ＰＣＲにて増幅し、pDisplay発現ベクター（Thermo Fisher Scientific社製）のマルチクローニングサイト（ＭＳＣ）に挿入した。なお、pDisplay発現ベクターは、目的タンパク質のＣ末端に、platelet-derived growth factor receptor（ＰＤＧＦＲ）の膜貫通領域と融合させて任意の哺乳動物細胞の細胞表面にディスプレイ可能な発現ベクターである。また、pDisplay発現ベクターは、目的タンパク質のＮ末端に、ＨＡタグが付加され、上記ＰＤＧＦＲのＣ末端には、ｍｙｃタグが付加されるように構成されている。上記ＧＰＣ３Ｎ末断片及びＧＰＣ３Ｃ末断片を発現するpDisplay発現ベクターを、ＳＫ－Ｈｅｐ－１細胞株や２９３Ｔ細胞株に遺伝子導入し、ＧＰＣ３Ｎ末断片やＧＰＣ３Ｃ末断片が細胞表面に発現する細胞株（ＧＰＣ３Ｎ末断片発現細胞株、及びＧＰＣ３Ｃ末断片発現細胞株）を単離し、ｓｃＦｖのエピトープマッピングに使用した。

[0086] ［ＦＣＭによる抗体エピトープマッピング］

ＧＰＣ３Ｎ末断片発現細胞株、ＧＰＣ３Ｃ末断片発現細胞株、及びＧＰＣ３発現細胞株（それぞれ、１サンプルあたり５×10^5個）と、ｓｃＦｖファージが分泌されている培養上清１００μＬとを混合し、氷上で３０分インキ

ュベートした。FACS buffer（１％ＢＳＡ／ＰＢＳ溶液）を加えて遠心洗浄した後、２次抗体である抗マウス抗体-alexa488（Thermo Fisher Scientific社製）を１μｇ／ｍＬ加え、氷上で３０分インキュベートした。その後、フローサイトメーター（FACSCanto、BD社製）にて細胞の蛍光染色を測定した。

[0087] ［組換えＩｇＧ発現ベクターの構築］

ｓｃＦｖからＩｇＧへの変換を行うために、Mammalian PowerExpress system（Toyobo社製）の発現ベクターを用いた。ｐＥＨ１．１ベクターのＭＳＣに、ｓｃＦｖのＨ鎖可変領域と、マウスＩｇＧ２ａＨ鎖由来の定常領域との融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を挿入した（ｐＥＨ１．１－Ｈ）。また、ｐＥＬＸ２．２ベクターのＭＳＣに、ｓｃＦｖのＬ鎖可変領域と、マウスＩｇＧ２ａＬ鎖由来の定常領域との融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を挿入した（ｐＥＨ２．２－Ｌ）。次に、ｐＥＨ２．２－ＬからＥＦ１αプロモーターからＬ鎖遺伝子までのポリヌクレオチド断片を、制限酵素（BglII及びSalI）で切り出し、制限酵素（BglII及びSalI）で処理したｐＥＨ１．１－Ｈにライゲーションし、抗体Ｈ鎖及びＬ鎖が共発現するベクターを構築した。

[0088] ［組換えＩｇＧの発現］

上記［組換えＩｇＧ発現ベクターの構築］に記載の方法にて作製した抗体Ｈ鎖及びＬ鎖の共発現ベクター３２．６μｇを、１．６ｍＬのｏｐｔｉ－ＭＥＭ（Gibco社製）に希釈し、Transficient Transfection Reagent（MBL社製）６５μＬを、１．６ｍＬのｏｐｔｉ－ＭＥＭに希釈したものと混合し、室温で１０分間インキュベートした。その後、１０ｍＬのＤＭＥＭ培養液に懸濁したＣＨＯ－Ｋ１細胞（１×１０^{7}個）と混合し、培養した。４時間後に無血清培地（Free Style expression CHO media［Gibco社製］）を添加し、さらに４～６日培養して組換え抗体を含む培養上清を回収した。

[0089] ［抗体のアフィニティー精製］

Protein G Sepharose 4 Fast Flow（GE healthcare社製）又はBipo Resin Protein L（Protein Express社製）カラムを、エンプティーカラム（Bio-Rad

社製）に１ｍＬ bed volumeに充填した後、１０倍bed volume量のＰＢＳでカラム樹脂を洗浄した。0.22ミクロンフィルターろ過した培養上清をカラムに添加して、抗体をカラム内のProtein G又はProtein Lにトラップした後、カラムを１０倍bed volume量のＰＢＳで洗浄して非特異的に吸着した夾雑物を洗浄した。１００ｍＭ グリシン－ＨＣｌ（ｐＨ２．７）溶液を用いて抗体を溶出し、溶出液は１Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）にてｐＨを中和した。吸光度計nanoDrop（Thermo fisher scientific社製）により２８０ｎｍの吸光度を測定し、抗体濃度を算出した。競合抗体として用いたＧＣ３３抗体及びＧＣ１９９抗体についても、同様の方法により発現ベクターをデザインし、作製した。

[0090] １－２　結果

［免疫したマウスの抗血清評価］

組換えＧＰＣ３を４回免疫したSKG/jclマウスから採血し、血清中にＧＰＣ３に対する抗体が産生されているか確認したところ、組換えＧＰＣ３に対するＥＬＩＳと、ＧＰＣ３発現細胞に対するＦＣＭとの実験により、ＧＰＣ３に対して結合性を有する抗体が検出された。このうち、抗体価の特に高かったマウス２匹（個体番号1413#2、1413#3）を抗体ライブラリー作製のソースとして用いた。

[0091] ［ファージライブラリーの構築］

形質転換効率から計算して見積もられたｓｃＦｖライブラリー数は、マウス1413#2で５．８×１０^{7}、マウス1413#3で４．３×１０^{8}であった。本実施例で作製した免疫グロブリンライブラリーは、抗原であるＧＰＣ３を免疫して目的抗原に対する抗体応答が認められたマウスから作製したライブラリーであるため、ライブラリーサイズが小さい場合でも目的の抗体遺伝子が含まれる可能性が高いことが特徴である。また、ランダムな合成抗体ライブラリーに比べ、生体内で正しい立体構造を形成する抗体が含まれていることも有利な特徴である。

[0092] ［モノクローナルｓｃＦｖの配列解析によるクローンの分類］

ピックアップしたモノクローナルｓｃＦｖのＤＮＡ配列解析を行い、重複を除いてクローン分類を行った。その結果、マウス1413#2ライブラリーのＤシリーズから７種類、Ｅシリーズから５種類、マウス1413#3ライブラリーのＤシリーズから３種類、及びＥシリーズから９種類の候補クローンが同定された。それら候補クローンの重鎖及び軽鎖可変領域のヌクレオチド配列を解析し、重複する同一クローンを除いた結果、マウス1413#2ライブラリー由来の９種類のｓｃＦｖ、及びマウス1413#3ライブラリー由来の９種類のｓｃＦｖの合計１８種類のｓｃＦｖが同定された。

[0093] ［抗ＧＰＣ３ ｓｃＦｖクローンのエピトープマッピング解析］

上記［モノクローナルｓｃＦｖの配列解析によるクローンの分類］の項目に記載の方法にしたがって同定された１８種類のｓｃＦｖを用いて、３種類の細胞株（ＧＰＣ３Ｎ末断片発現細胞株、ＧＰＣ３Ｃ末断片発現細胞株、及びＧＰＣ３発現細胞株）の各種ＧＰＣ３との結合を、ＦＣＭにて解析した。その結果、１８種類のscFvクローンのうち、１４種類（TF1413-02d028、02d030、02d039、02e004、02e014、02e030、02e040、03e001、03e004、03e005、03e015、03e019、03e027、及び03e034）については、全長のＧＰＣ３及びＧＰＣ３Ｎ末断片（配列番号１５５に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド）に結合するのに対して、ＧＰＣ３Ｃ末断片（配列番号１５６に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド）には結合しなかった（図２参照）。一方、既存の抗ＧＰＣ３抗体であるＧＣ３３（中外製薬社製）やＧＣ１９９（中外製薬社製）は、全長のＧＰＣ３及びＧＰＣ３Ｃ末断片に結合するのに対して、ＧＰＣ３Ｎ末断片には結合しなかった。

以上の結果から、既存の抗ＧＰＣ３抗体（ＧＣ３３及びＧＣ１９９）のＧＰＣ３Ｃ末端側のエピトープとは異なり、ＧＰＣ３Ｎ末側のエピトープを認識する上記１４種類の新規ｓｃＦｖが同定された。

[0094] 同定した１４種類のｓｃＦｖクローンのうち、結合力の特に高い上位１１種類のｓｃＦｖクローン（TF1413-02d028、02d039、02e004、02e014、02e030、02e040、03e001、03e004、03e005、03e015、及び03e034）を選択した。表

１には、かかる１１種類のｓｃＦｖクローンのＨ鎖及びＬ鎖Ｖ領域と、配列番号との対応を示し、表２には、かかる１１種類のｓｃＦｖクローンのＨ鎖ＣＤＲ１～３と、配列番号との対応を示し、表３には、かかる１１種類のｓｃＦｖクローンのＬ鎖ＣＤＲ１～３と、配列番号との対応を示す。

[0095] [表1]

ｓｃＦｖクローン名及びＶ領域		配列番号
TF1413-02d028	Ｈ鎖Ｖ領域	７
TF1413-02d039	Ｈ鎖Ｖ領域	１７
TF1413-02e004	Ｈ鎖Ｖ領域	２７
TF1413-02e014	Ｈ鎖Ｖ領域	３７
TF1413-02e030	Ｈ鎖Ｖ領域	４７
TF1413-02e040	Ｈ鎖Ｖ領域	５７
TF1413-03e001	Ｈ鎖Ｖ領域	６７
TF1413-03e004	Ｈ鎖Ｖ領域	７７
TF1413-03e005	Ｈ鎖Ｖ領域	８７
TF1413-03e015	Ｈ鎖Ｖ領域	９７
TF1413-03e034	Ｈ鎖Ｖ領域	１０７
TF1413-02d028	Ｌ鎖Ｖ領域	８
TF1413-02d039	Ｌ鎖Ｖ領域	１８
TF1413-02e004	Ｌ鎖Ｖ領域	２８
TF1413-02e014	Ｌ鎖Ｖ領域	３８
TF1413-02e030	Ｌ鎖Ｖ領域	４８
TF1413-02e040	Ｌ鎖Ｖ領域	５８
TF1413-03e001	Ｌ鎖Ｖ領域	６８
TF1413-03e004	Ｌ鎖Ｖ領域	７８
TF1413-03e005	Ｌ鎖Ｖ領域	８８
TF1413-03e015	Ｌ鎖Ｖ領域	９８
TF1413-03e034	Ｌ鎖Ｖ領域	１０８

[0096]

[表2]

クローン名及びＣＤＲ		配列番号
TF1413-02d028	Ｈ鎖ＣＤＲ１	１
	Ｈ鎖ＣＤＲ２	２
	Ｈ鎖ＣＤＲ３	３
TF1413-02d039	Ｈ鎖ＣＤＲ１	１１
	Ｈ鎖ＣＤＲ２	１２
	Ｈ鎖ＣＤＲ３	１３
TF1413-02e004	Ｈ鎖ＣＤＲ１	２１
	Ｈ鎖ＣＤＲ２	２２
	Ｈ鎖ＣＤＲ３	２３
TF1413-02e014	Ｈ鎖ＣＤＲ１	３１
	Ｈ鎖ＣＤＲ２	３２
	Ｈ鎖ＣＤＲ３	３３
TF1413-02e030	Ｈ鎖ＣＤＲ１	４１
	Ｈ鎖ＣＤＲ２	４２
	Ｈ鎖ＣＤＲ３	４３
TF1413-02e040	Ｈ鎖ＣＤＲ１	５１
	Ｈ鎖ＣＤＲ２	５２
	Ｈ鎖ＣＤＲ３	５３
TF1413-03e001	Ｈ鎖ＣＤＲ１	６１
	Ｈ鎖ＣＤＲ２	６２
	Ｈ鎖ＣＤＲ３	６３
TF1413-03e004	Ｈ鎖ＣＤＲ１	７１
	Ｈ鎖ＣＤＲ２	７２
	Ｈ鎖ＣＤＲ３	７３
TF1413-03e005	Ｈ鎖ＣＤＲ１	８１
	Ｈ鎖ＣＤＲ２	８２
	Ｈ鎖ＣＤＲ３	８３
TF1413-03e015	Ｈ鎖ＣＤＲ１	９１
	Ｈ鎖ＣＤＲ２	９２
	Ｈ鎖ＣＤＲ３	９３
TF1413-03e034	Ｈ鎖ＣＤＲ１	１０１
	Ｈ鎖ＣＤＲ２	１０２
	Ｈ鎖ＣＤＲ３	１０３

[0097] [表3]

クローン名及びＣＤＲ		配列番号
TF1413-02d028	Ｌ鎖ＣＤＲ１	４
	Ｌ鎖ＣＤＲ２	５
	Ｌ鎖ＣＤＲ３	６
TF1413-02d039	Ｌ鎖ＣＤＲ１	１４
	Ｌ鎖ＣＤＲ２	１５
	Ｌ鎖ＣＤＲ３	１６
TF1413-02e004	Ｌ鎖ＣＤＲ１	２４
	Ｌ鎖ＣＤＲ２	２５
	Ｌ鎖ＣＤＲ３	２６
TF1413-02e014	Ｌ鎖ＣＤＲ１	３４
	Ｌ鎖ＣＤＲ２	３５
	Ｌ鎖ＣＤＲ３	３６
TF1413-02e030	Ｌ鎖ＣＤＲ１	４４
	Ｌ鎖ＣＤＲ２	４５
	Ｌ鎖ＣＤＲ３	４６
TF1413-02e040	Ｌ鎖ＣＤＲ１	５４
	Ｌ鎖ＣＤＲ２	５５
	Ｌ鎖ＣＤＲ３	５６
TF1413-03e001	Ｌ鎖ＣＤＲ１	６４
	Ｌ鎖ＣＤＲ２	６５
	Ｌ鎖ＣＤＲ３	６６
TF1413-03e004	Ｌ鎖ＣＤＲ１	７４
	Ｌ鎖ＣＤＲ２	７５
	Ｌ鎖ＣＤＲ３	７６
TF1413-03e005	Ｌ鎖ＣＤＲ１	８４
	Ｌ鎖ＣＤＲ２	８５
	Ｌ鎖ＣＤＲ３	８６
TF1413-03e015	Ｌ鎖ＣＤＲ１	９４
	Ｌ鎖ＣＤＲ２	９５
	Ｌ鎖ＣＤＲ３	９６
TF1413-03e034	Ｌ鎖ＣＤＲ１	１０４
	Ｌ鎖ＣＤＲ２	１０５
	Ｌ鎖ＣＤＲ３	１０６

[0098] ［抗ＧＰＣ３ ｓｃＦｖ抗体のＩｇＧ化とその結合能］

選択した上記１１種類のｓｃＦｖクローンについて、Ｈ鎖及びＬ鎖可変部領域を、マウスＩｇＧの定常領域に結合し、組換えＩｇＧ発現用ベクターにて完全長の組換え抗体として発現させ、アフィニティー精製を行った。これらＩｇＧ抗体と、ＧＰＣ３Ｎ末断片との結合能を、ＧＰＣ３Ｎ末断片発現細胞株を用いて解析したところ、９種類のＩｇＧクローン（TF1413-02d028、02d039、02e004、02e014、02e030、02e040、03e004、03e005、及び03e034）は、ＧＰＣ３Ｎ末断片と結合性は維持されていたものの、残りの２種類のＩｇＧクローン（TF1413-03e001、及び03e015）は、ＧＰＣ３Ｎ末断片と結合性が消失した（図３参照）。また、上記９種類のＩｇＧクローンは、ＧＰＣ３Ｃ末断片には結合しなかった（図３参照）

以上の結果は、１１種類のｓｃＦｖクローンのうち、９種類（TF1413-02d028、02d039、02e004、02e014、02e030、02e040、03e004、03e005、及び03e034）については、ＩｇＧ型に変換可能なものであることを示している。表４には、上記１１種類のＩｇＧクローンのＨ鎖及びＬ鎖と、配列番号との対応を示す。

[0099]

[表4]

ＩｇＧクローン名及び領域		配列番号
TF1413-02d028	H鎖	9
TF1413-02d039	H鎖	１９
TF1413-02e004	H鎖	２９
TF1413-02e014	H鎖	３９
TF1413-02e030	H鎖	４９
TF1413-02e040	H鎖	５９
TF1413-03e001	H鎖	６９
TF1413-03e004	H鎖	７９
TF1413-03e005	H鎖	８９
TF1413-03e015	H鎖	９９
TF1413-03e034	H鎖	１０９
TF1413-02d028	L鎖	１０
TF1413-02d039	L鎖	２０
TF1413-02e004	L鎖	３０
TF1413-02e014	L鎖	４０
TF1413-02e030	L鎖	５０
TF1413-02e040	L鎖	６０
TF1413-03e001	L鎖	７０
TF1413-03e004	L鎖	８０
TF1413-03e005	L鎖	９０
TF1413-03e015	L鎖	１００
TF1413-03e034	L鎖	１１０

実施例 2

[0100] ２．ＥＤＴＡ（Ethylenediaminetetraacetic acid）、トリプシン又はコラゲナーゼ処理したＧＰＣ３に対する新規抗ＧＰＣ３抗体の結合性

［ＥＤＴＡ又はトリプシン処理した細胞の調製］

ＧＰＣ３を強制発現させたＳＫ－Ｈｅｐ－１細胞株を、２つのＴ－７５フラスコで培養した。各フラスコの培養上清を吸引し、ＰＢＳ　３ｍＬで洗浄後、各フラスコに、０．０２％のＥＤＴＡ／ＰＢＳ溶液（以下、単に「ＥＤＴＡ」という）３ｍＬ、又は０．０５％のトリプシン溶液（以下、単に「トリプシン」という）を加え、３７℃でそれぞれ５分間（ＥＤＴＡ）又は２分

３０秒間（トリプシン）インキュベートし、細胞をフラスコから剥離した。その後、各フラスコに７ｍＬのＤＭＥＭ培養液を加え、ピペッティングした後、細胞懸濁液を５０ｍＬコニカルチューブに回収した。さらに１０ｍＬのＤＭＥＭ培養液で各フラスコを洗浄後、回収した洗浄液も各細胞懸濁液の入った５０ｍＬコニカルチューブにそれぞれ回収して遠心(１，５００ｒｐｍ、４℃、４分間)した。コニカルチューブから上清を吸引後、ペレットに１０ｍＬのＤＭＥＭ培養液を加え、ＥＤＴＡ又はトリプシンで剥離した細胞数をそれぞれ計測した。

[0101] ＥＤＴＡ又はトリプシン処理した細胞は、細胞数がそれぞれ２×１０^{5}個／チューブとなるように調整し、ＦＡＣＳ（ＥＣ８００）解析を行った。ＦＡＣＳ解析には、３種類の抗体（ＡＰＣで蛍光標識した抗マウスＩｇＧ抗体［５μｇ／チューブ：Biolejend社製］、ＧＣ３３抗体［１．０μｇ／チューブ：ＭＢＬライフサイエンス社製］、及び上記ｓｃＦｖクローン［TF1413-02d028］抗体［１．０μｇ／チューブ］）を使用した。

[0102] ［コラゲナーゼ処理した細胞の調製］

上記のようにＥＤＴＡで剥離した１×１０^{6}個の細胞を、５０ｍＬコニカルチューブに入れ、遠心(１，５００ｒｐｍ、４℃、４分間)して上清を吸引し、細胞塊（ペレット）を調製した。ペレットに５ｍＬのコラゲナーゼＰ溶液を加え、３０分間、３７℃でインキュベートし、細胞懸濁液を調製後、３０ｍＬのＤＭＥＭ培養液で洗浄しながら、１００μｍセルストレーナーに通した。細胞懸濁液を再度１００μｍセルストレーナーに通し、遠心(３００ｇ、４℃、１０分間)して上清を吸引し、ＰＢＳ　２０ｍＬを加えて洗浄後、遠心(３００ｇ、４℃、５分間)して上清を吸引した。５ｍＬのＤＭＥＭ培養液を加え懸濁した後、細胞数を計測し、２×１０^{5}個／チューブの細胞を、ＦＡＣＳ（ＥＣ８００）解析した。ＦＡＣＳ解析には、ＥＤＴＡ又はトリプシン処理をした細胞と同様に、３種類の抗体（ＡＰＣで蛍光標識した抗マウスＩｇＧ抗体［５μｇ／チューブ：Biolejend社製］、ＧＣ３３抗体［１．０μｇ／チューブ：ＭＢＬライフサイエンス社製］、及び上記ｓｃＦｖクローン［TF1

413-02d028］抗体［１．０μｇ／チューブ］）を使用した。結果を図４に示す。なお、図４において、横軸の右側にピークがある場合、ＧＣ３３抗体又はｓｃＦｖクローン［TF1413-02d028］抗体が、ＧＰＣ３タンパク質に結合していることを示す。

[0103] ［結果］

図４に示すように、トリプシン処理やコラゲナーゼ処理したＧＰＣ３タンパク質に対する本発明の抗体（TF1413-02d028）の結合性は、著しく減少していた。これらの結果は、本発明の抗体は、ＧＰＣ３タンパク質の立体構造を特異的に認識することを示しており、本発明の抗体は、生体における特異性が高いと考えられる。

実施例 3

[0104] ３．新規抗ＧＰＣ３抗体を利用したＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞の開発

［概要］

ＧＰＣ３は、成人では胎盤以外には発現が認められない一方、肝細胞がん、メラノーマ、卵巣明細胞がん、肺扁平上皮がんなど様々ながん組織で発現している細胞表面分子であり、キメラ抗原受容体（Chimeric Antigen Receptor；ＣＡＲ）を利用したＣＡＲ－Ｔ細胞療法の標的分子となりうる。そこで、実施例１で調製した１１種類のｓｃＦｖクローンを利用したＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞を作製し、がん細胞傷害活性やインターフェロンγ（ＩＦＮ－γ）産生能について解析した。

[0105] ［ＧＰＣ３ ＣＡＲベクターの作製］

実施例１で調製した１１種類のｓｃＦｖクローン（TF1413-02d028、02d039、02e004、02e014、02e030、02e040、03e001、03e004、03e005、03e015、及び03e034）について、それぞれのV_H及びV_Lのアミノ酸配列に基づき、V_H－リンカー－V_L配列のｓｃＦｖをデザインした（表５参照）。リンカーは、ポリペプチド「ＧＧＧＧＳ」を３回繰り返した１５アミノ酸残基からなるものを使用した。また、V_HのＮ末端には、配列番号１８８に示されるアミノ酸配列からなるヒトイムノグロブリンＨ鎖由来シグナルシーケンスを付加した。

[0106] [表5-1]

配列番号１６５：TF1413-02d028 由来のｓｃＦｖ
QVQLKESGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNGKSLEWIGNIDPYYGGTSYNQKF KGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARGDYRAYYFDYWGQGTTLTVSGGGGSGGGGS GGGGSDIQMTQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQNVRTAVAWYQQKPGQSPKALIYLASNRHTGVP DRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYPLTFGAGTKLELKR
配列番号１６６：TF1413-02d039 由来のｓｃＦｖ
EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGGSTYYPDTVK GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARRGLRRAMDYWGQGTSVTVSGGGGSGGGGSG GGGSDVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPLTFGAGTKLELKR
配列番号１６７：TF1413-02e004 由来のｓｃＦｖ
QVQLQQSGAELVKPGAPVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGRGLEWIGRIDPSDSETHYNQK FKDEATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCARGYYAMDYWGQGTSVTVSGGGGSGGGGSGG GGSDIVLTQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFT GSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPTFGGGTKLEIKR
配列番号１６８：TF1413-02e014 由来のｓｃＦｖ
QVQLKQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYMHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTEYAPKF QGKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCNAGYYDYDGYAMDYWGQGTSVTVSGGGGSGG GGSGGGGSDIVLTQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTG VPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPLTFGGGTKLEIKR
配列番号１６９：TF1413-02e030 由来のｓｃＦｖ
EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYYMHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGNTIYDPKF QGKASITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCAISTMITTLDYWGQGTTLTVSGGGGSGGGGSGG GGSDIQMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTRE SGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELKR
配列番号１７０：TF1413-02e040 由来のｓｃＦｖ
EVMLVESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQN FKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARGYYGRFDYWGQGTTLTVSGGGGSGGGGSG GGGSDILLTQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQNVRTAVAWYQQKPGQSPKALIYLASNRHTGVPDR FTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYPLTFGAGTKLELKR

[0107]

[表5-2]

配列番号１７１：TF1413-03e001 由来のｓｃＦｖ
QVQLKQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYYMHWVKQSHVKSLEWIGRINPYNGATSYNQNF KDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCARNYGYFDYWGQGTTLTVSGGGGSGGGGSGG GGSDIKMTQSPKFMSTSVGDRVSVTCEASQNVDNNVVWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDR FTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLEIKR
配列番号１７２：TF1413-03e004 由来のｓｃＦｖ
QVQLKQSGAELVKPGAPVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGRGLEWIGRIDPSDSETHYNQK FKDKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCARGYYGSNYWGQGTTLTVSGGGGSGGGGSGGG GSDIKMTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRF TGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLELKR
配列番号１７３：TF1413-03e005 由来のｓｃＦｖ
QVQLKESGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYMHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTEYAPKF QGKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCNAFYYDYDGYAMDYWGQGTSVTVSGGGGSGG GGSGGGGSDVVMTQTPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGYLSWLQQKPDGTIKRLIYAASTLDSG VPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFADYYCLQYASYPLTFGAGTKLELKR
配列番号１７４：TF1413-03e015 由来のｓｃＦｖ
EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQK FKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARGDYYPPYAMDYWGQGTSVTVSGGGGSGGG GSGGGGSDIVMSQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSASYRYSG VPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNRYPLTFGVGTKLEIKR
配列番号１７５：TF1413-03e034 由来のｓｃＦｖ
EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNGKSLEWIGNIDPYYGGTSYNQKF KGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARGNYGYYAMDYWGQGTSVTVSGGGGSGGGG SGGGGSDIVMSQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQNVRTAVAWYQQKPGQSPKALIYLASNRHTGV PDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYPLTFGAGTKLELKR

表中、二重四角はリンカーを示し、一重下線はV_Hを示し、二重下線はV_Lを示す。

[0108] 表５の抗ＧＰＣ３ ｓｃＦｖをコードするヌクレオチド配列は、ヒトコドンに最適化したものを合成し、ＣＡＲ発現ベクターに挿入した。使用したＣＡＲ遺伝子は、ｓｃＦｖの下流に、ヒトＣＤ８由来細胞膜貫通領域；及びヒトＣＤ２８／４－１ＢＢ／ＣＤ３zeta由来免疫担当細胞活性化シグナル伝達領域；からなる融合ペプチド（配列番号１８５に示されるアミノ酸配列からなるペプチド）をコードする遺伝子と、２Ａ自己切断配列、ヒトＩＬ－７遺伝子、２Ａ自己切断配列、ヒトＣＣＬ１９遺伝子、２Ａ自己切断配列、及びＨＳＶ－ＴＫ遺伝子とを有し、全体をＭＳＧＶ１レトロウイルスベクターに組み込んだものである（国際公開２０１６／０５６２２８号パンフレット参照

）。

[0109] ［ＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞の作製］

上記１１種類のｓｃＦｖクローンに由来するＧＰＣ３ ＣＡＲベクターを、各々ＧＰ２パッケージング細胞に一過性導入してレトロウイルスベクターを作製し、それらをＴ細胞に感染させて遺伝子導入し、ＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞を誘導した。遺伝子導入Ｔ細胞におけるＧＰＣ３ ＣＡＲを発現する細胞の割合は、５．３～３９．２％とばらつきがあった。そこで、当該割合が２５％以上を示す５種類のｓｃＦｖクローン（TF1413-02d028、TF1413-02d039、TF1413-02e014、TF1413-02e030、及びTF1413-03e005）に由来するＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞を用いて、以下の機能アッセイを実施した。

[0110] ［ＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞のＧＰＣ３発現細胞株に対する傷害活性］

ＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞のがん細胞に対する傷害活性を検討するため、ＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞と、ＧＰＣ３発現細胞株、すなわち、肝細胞がん由来の細胞株であるＳｋ－ＨＥＰ－１に、ＧＰＣ３を発現させた細胞株（Ｓｋ－ＨＥＰ－１ ＧＰＣ３細胞株）や、ＧＰＣ３を発現しない細胞株（Ｓｋ－ＨＥＰ－１ ｍｏｃｋ細胞株）との共培養アッセイを実施した。ＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞と、標的がん細胞（Ｓｋ－ＨＥＰ－１ ＧＰＣ３細胞株、又はＳｋ－ＨＥＰ－１ ｍｏｃｋ細胞株）を、１：１（1×10^{5}／ウェルずつ）にて混合し、２４ウェルプレートで培養した。４８時間後に細胞を回収し、抗ＣＤ４５抗体で染色し、ＣＤ４５陽性細胞をＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞として、ＣＤ４５陰性細胞は、残存がん細胞［Ｓｋ－ＨＥＰ－１ ＧＰＣ３細胞］としてＦＣＭにて解析した。その結果、上記５種類のｓｃＦｖクローンに由来するＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞は、いずれもＳｋ－ＨＥＰ－１ ＧＰＣ３細胞を、ほぼ完全に傷害させる一方、Ｓｋ－ＨＥＰ－１ ｍｏｃｋ細胞に対しては傷害活性を示さなかった（図５及び６参照）。ＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞に対するネガティブコントロールとして、ウイルスベクターを感染させていない細胞（遺伝子非導入細胞［図５及び６中の「Non infection」］）を用いた場合には、Ｓｋ－ＨＥＰ－１ ＧＰＣ３細胞、及びＳｋ－ＨＥＰ－１ ｍｏｃｋ細胞

のいずれにも傷害活性を示さなかった。

[0111] 以上の結果より、選択した５種類の抗ＧＰＣ３ ｓｃＦｖクローン（TF1413-02d028、TF1413-02d039、TF1413-02e014、TF1413-02e030、及びTF1413-03e005）に由来するＧＰＣ３ＣＡＲ－Ｔ細胞は、ＧＰＣ３を発現するがん細胞特異的に細胞傷害活性を発揮することが示された。

[0112] ［ＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞のＧＰＣ３発現細胞認識によるＩＦＮ－γ産生能］

ＧＰＣ３発現（陽性）がん細胞に対する傷害活性に加えて、ＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞のIFN-γ産生能について解析した。ＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞と、標的がん細胞（Ｓｋ－ＨＥＰ－１ ＧＰＣ３細胞株、又はＳｋ－ＨＥＰ－１ ｍｏｃｋ細胞株）を、１：１（１×１０^5／ウェルずつ）にて混合し、２４ウェルプレートで４８時間培養し、培養上清中に産生されるＩＦＮ－γの濃度をＥＬＩＳＡにて測定した。その結果、上記５種類のｓｃＦｖクローンに由来するＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞は、いずれもＧＰＣ３の発現依存的なＩＦＮ－γの産生能を示し、特にクローンTF1413-02d028に由来するＧＰＣ３ ＣＡＲ－Ｔ細胞は、最も高いＩＦＮ－γ産生能を示した（図７参照）。

実施例 4

[0113] ４．ヒト化抗体の作製

実施例１で調製した２種類のｓｃＦｖクローン（TF1413-02d028及び02d039）をベースに、ｓｃＦｖヒト化抗体をデザインした（表６参照）。リンカーは、ポリペプチド「ＧＧＧＧＳ」を３回繰り返した１５アミノ酸残基からなるものを使用した。また、V_HのＮ末端には、配列番号１８８に示されるアミノ酸配列からなるヒトイムノグロブリンＨ鎖由来シグナルシーケンスを付加した。

[0114]

[表6-1]

配列番号１７８：#5 VH1-15-VL1（TF1413-02d028 由来のｓｃＦｖヒト化抗体１）
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYNMNWVRQAPGQGLEWIGNIDPYYGGTSYNQK FKGRATLTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGDYRAYYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVRTAVAWYQQKPGKAPKALIYLASNRHTGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHWNYPLTFGGGTKVEIK
配列番号１７９：#5 VH2-15-VL1（TF1413-02d028 由来のｓｃＦｖヒト化抗体２）
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYNMNWVRQAPGQGLEWIGNIDPYYGGTSYNQK FKGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGDYRAYYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVRTAVAWYQQKPGKAPKALIYLASNRHTGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHWNYPLTFGGGTKVEIK
配列番号１８０：#5 VH3-15-VL1（TF1413-02d028 由来のｓｃＦｖヒト化抗体３）
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYNMNWVRQAPGQGLEWIGNIDPYYGGTSYNQK FKGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGDYRAYYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVRTAVAWYQQKPGKAPKALIYLASNRHTGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCLQHWNYPLTFGGGTKVEIK
配列番号１８１：#6 VH1-15-VL1（TF1413-02d039 由来のｓｃＦｖヒト化抗体１）
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGSTYYPDTVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLRRAMDYWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSDIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPLTFGGGTKVEIK
配列番号１８２：#6 VH1-15-VL2（TF1413-02d039 由来のｓｃＦｖヒト化抗体２）
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGSTYYPDTVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLRRAMDYWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSDIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSSGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCSQSTHVPLTFGGGTKVEIK
配列番号１８３：#6 VH2-15-VL1（TF1413-02d039 由来のｓｃＦｖヒト化抗体３）
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKRLEWVAYISSGGGSTYYPDTVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLRRAMDYWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSDIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCSQSTHVPLTFGGGTKVEIK

[0115] [表6-2]

配列番号１８４：#6 VH2-15-VL2（TF1413-02d039 由来のｓｃＦｖヒト化抗体４）
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKRLEWVAYISSGGGSTYYPDTVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLRRAMDYWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSDIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSSGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCSQSTHVPLTFGGGTKVEIK

表中、二重四角はリンカーを示し、一重下線はV_Hを示し、二重下線はV_Lを示す。

産業上の利用可能性

[0116] 本発明は、がん免疫療法の分野に資するものである。

請求の範囲

[請求項1] 配列番号１５５に示されるアミノ酸配列からなるヒトＧＰＣ３（Glypican-3）由来のポリペプチドに特異的に結合する抗体であって、

（１－１）配列番号１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖相補性決定領域（ＣＤＲ）１、配列番号２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、

配列番号４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（２－１）配列番号１１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号１２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、

配列番号１４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（３－１）配列番号２１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号２２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、

配列番号２４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号２５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（４－１）配列番号３１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号３２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号３３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、

配列番号３４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号３５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号３６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（５－１）配列番号４１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号４２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号４３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、

配列番号４４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号４５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号４６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（６－１）配列番号５１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号５２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号５３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、

配列番号５４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号５５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号５６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（７－１）配列番号６１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号６２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号６３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、

配列番号６４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号６５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号６６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（８－１）配列番号７１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号７２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、

配列番号７４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号７５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（９－１）配列番号８１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号８２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、

配列番号８４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号８５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；

（１０－１）配列番号９１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号９２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号９３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、

配列番号９４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号９５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号９６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含むか；或いは

（１１－１）配列番号１０１に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ１、配列番号１０２に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１０３に示されるアミノ酸配列からなる重鎖ＣＤＲ３と、

配列番号１０４に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１０５に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１０６に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖ＣＤＲ３とを含む；

前記抗体。

[請求項2] （１－２）配列番号７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配

列番号８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（２－２）配列番号１７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号１８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（３－２）配列番号２７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号２８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（４－２）配列番号３７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号３８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（５－２）配列番号４７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号４８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（６－２）配列番号５７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号５８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（７－２）配列番号６７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号６８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（８－２）配列番号７７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と

、配列番号７８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（９－２）配列番号８７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号８８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

（１０－２）配列番号９７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号９８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含むか；

或いは

（１１－２）配列番号１０７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域と、配列番号１０８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを含む；

請求項１に記載の抗体。

[請求項3] 一本鎖抗体である請求項１又は２のいずれかに記載の抗体。

[請求項4] 一本鎖抗体が、

（１－３）配列番号１６５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（２－３）配列番号１６６に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（３－３）配列番号１６７に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（４－３）配列番号１６８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（５－３）配列番号１６９に示されるアミノ酸配列と少なくとも

８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（６－３）配列番号１７０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（７－３）配列番号１７１に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（８－３）配列番号１７２に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（９－３）配列番号１７３に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（１０－３）配列番号１７４に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；或いは

（１１－３）配列番号１７５に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；

請求項３に記載の抗体。

[請求項5] 一本鎖抗体が、

（１－３’－１）配列番号１７８に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（１－３’－２）配列番号１７９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（１－３’－３）配列番号１８０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（２－３’－１）配列番号１８１に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（２－３’－２）配列番号１８２に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；

（２－３’－３）配列番号１８３に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか；或いは

（２－３’－４）配列番号１８４に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；

請求項３に記載の抗体。

[請求項6] （１－４）配列番号９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号１０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（２－４）配列番号１９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号２０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（３－４）配列番号２９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号３０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（４－４）配列番号３９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号４０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（５－４）配列番号４９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号５０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（６－４）配列番号５９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号６０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（７－４）配列番号６９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８

０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号７０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（８－４）配列番号７９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号８０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（９－４）配列番号８９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号９０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；

（１０－４）配列番号９９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号１００に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含むか；或いは

（１１－４）配列番号１０９に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖と、配列番号１１０に示されるアミノ酸配列と少なくとも８０％以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖とを含む；

請求項１又は２に記載の抗体。

[請求項7] 請求項３～５のいずれかに記載の抗体と、該抗体のカルボキシル末端に融合した細胞膜貫通領域と、該細胞膜貫通領域のカルボキシル末端に融合した免疫担当細胞活性化シグナル伝達領域とを含むキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）。

[請求項8] 配列番号１８５～１８７のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む請求項７に記載のＣＡＲ。

[請求項9] 請求項７又は８に記載のＣＡＲを発現する免疫担当細胞。

[請求項10] さらに、インターロイキン７（ＩＬ－７）、及びケモカインリガン

ド１９（ＣＣＬ１９）を発現する請求項９に記載の免疫担当細胞。

[請求項11] 請求項１～６のいずれかに記載の抗体をコードする抗体遺伝子、又は請求項７若しくは８に記載のＣＡＲをコードするＣＡＲ遺伝子。

[請求項12] 請求項１～４、及び６のいずれかに記載の抗体をコードする抗体遺伝子。

[請求項13] プロモーターと、該プロモーターの下流に作動可能に連結されている請求項１１に記載の抗体遺伝子、又は請求項１１に記載のＣＡＲをコードするＣＡＲ遺伝子とを含むベクター。

[請求項14] プロモーターと、該プロモーターの下流に作動可能に連結されている請求項１２に記載の抗体遺伝子とを含むベクター。

[請求項15] 請求項１３又は１４に記載のベクターが導入されている宿主細胞。

[請求項16] 請求項１～６のいずれかに記載の抗体を用いて、ＧＰＣ３（Glypican-3）を検出する工程を備えたＧＰＣ３の検出方法。

[請求項17] 請求項１～６のいずれかに記載の抗体、又はその標識物を含む、ＧＰＣ３（Glypican-3）の検出用キット。