

明 細 書

発明の名称：

免疫チェックポイント阻害剤、免疫チェックポイント関連疾患の治療剤、免疫抑制剤、抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体、フィブロネクチンアナログ、フィブロネクチンまたはその部分タンパク質を検出するためのキット、及びフィブロネクチンまたはその部分タンパク質を検出する方法

技術分野

[0001] 本発明は、免疫チェックポイント阻害剤、免疫チェックポイント関連疾患の治療剤、免疫抑制剤、抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体、フィブロネクチンアナログ、フィブロネクチンまたはその部分タンパク質を検出するためのキット、及びフィブロネクチンまたはその部分タンパク質を検出する方法に関する。

本願は、2019年8月13日に、日本に出願された特願2019-148423号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 近年、免疫チェックポイント阻害剤を用いる癌免疫療法が注目されている。免疫チェックポイント阻害薬とは、自己に対する免疫応答を抑制し、過剰な免疫反応を抑制する作用を有する免疫チェックポイント分子もしくはそのリガンドに結合して、免疫抑制シグナルの伝達を阻害することで、免疫チェックポイント分子によるT細胞の活性化抑制を解除する薬剤である。

[0003] 本願発明者らは未知のリガンドに対する免疫抑制性受容体であるLILRB4（白血球Ig様受容体（Leukocyte Ig-like receptor）B4、以下、B4とも称する）を用いることにより、感染又は自己免疫に由来する炎症性疾患を判定できることを見出した（特許文献1）。

[0004] LILRB4のリガンドとしては、最近、CD166、ApoE、Angptls等が報告されている（非特許文献1～3）。しかしながら、これら

が生理的リガンドであることの証明は十分とは言えない。

[0005] フィブロネクチン (Fibronectin; 以下、FNとも称する) は細胞外マトリックス (Extracellular Matrix; 以下、ECMとも称する)、細胞表面上および体液中に存在する約259kDaの糖蛋白である。フィブロネクチンはタンパク分解酵素であるサーモリシン (thermolysin) 処理により6つの領域 (ドメイン) に分割される。これらはそれぞれの特異的な分子結合能をもとに1. フィブリン・ヘパリン結合領域 (Fibrin/Heparin binding-FN)、2. コラーゲン結合領域 (Collagen binding-FN)、3. ヘパリン結合領域 (Heparin binding-FN)、4. 細胞/インテグリン結合領域 (cell/integrin-binding-domain (CBD)-FN)、5. 第二ヘパリン結合領域 (second Heparin binding-FN)、6. 第二フィブリン結合領域 (second Fibrin binding-FN) と呼称されている。このように、FNは生理的分子への結合能を異にする複数のドメインから構成される。これまで、全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus Erythematosus; SLE) やリウマチ関節炎 (Rheumatoid Arthritis; RA) といった一部の自己免疫疾患では血漿中や体液 (例えば、関節液) 中のFN濃度の変動がみられるほか、モノクローナル抗体を用いてFNの断片化 (fragmentation) を評価するドメイン解析が、疾患の診断ないし重症度評価に有用であると報告されている (非特許文献4~6)。特に、Fibrin/Heparin binding-FN濃度は健常人 ($61 \pm 18 \mu\text{g}/\text{ml}$) との比較で、SLEは $24 \pm 12 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0.003$)、RAは $36 \pm 22 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0.00002$) であり、診断への活用が見込まれる。また、FNが肺癌細胞株の転移能と浸潤能を促進することが報告されている (非特許文献7)。しかしながら、上記の何れの文献にも、FNがLILRB4のリガンドであることは報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開 2 0 1 8 - 2 5 5 5 4 号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：J Immunol. 2018 Feb 1;200(3):1207-1219.

非特許文献2：Blood. 2014 Aug 7;124(6):924-935.

非特許文献3：Nature. 2018 Oct;562(7728):605-609.

非特許文献4：Rheumatology (Oxford). 2007 Jul;46(7):1071-1075.

非特許文献5：J Rheumatol. 1987 Oct;14(5):1052-1054.

非特許文献6：Rheumatol Int. 2013 Jan;33(1):37-43.

非特許文献7：Br J Cancer 2009 Jul 21;101(2):327-334.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、免疫チェックポイント阻害剤、免疫チェックポイント関連疾患の治療剤、免疫抑制剤、抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体、フィブロネクチンアナログ、フィブロネクチンまたはその部分タンパク質を検出するためのキット、及びフィブロネクチンまたはその部分タンパク質を検出する方法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

[0009] 本発明者らは、L I L R B 4 の生理的リガンドがECMの主要構成タンパク質の一つであるフィブロネクチンであることを見出し、フィブロネクチン中のL I L R B 4 の標的配列を特定し、この標的配列とフィブロネクチンの結合を阻害する物質が、免疫チェックポイント阻害剤、免疫チェックポイント関連疾患の治療剤、及び免疫抑制剤として有用であることを見出し、本発明を完成させた。

本発明は以下の態様を含む。

[1] フィブロネクチンと免疫抑制性受容体L I L R B 4 との結合を阻害

する物質を有効成分として含有する免疫チェックポイント阻害剤。

〔２〕 前記フィブロネクチンが、前記フィブロネクチン中の配列番号１で表されるアミノ酸配列を介して、免疫抑制性受容体Ｌ１ＬＲＢ４と結合する、〔１〕に記載の免疫チェックポイント阻害剤。

〔３〕 前記フィブロネクチンと免疫抑制性受容体Ｌ１ＬＲＢ４との結合を阻害する物質が、抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体、抗免疫抑制性受容体Ｌ１ＬＲＢ４抗体又はその誘導体、若しくはフィブロネクチンアナログである、〔１〕又は〔２〕に記載の免疫チェックポイント阻害剤。

〔４〕 前記抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体が、フィブロネクチン中の配列番号１で表されるアミノ酸配列と結合する、〔３〕に記載の免疫チェックポイント阻害剤。

〔５〕 前記フィブロネクチンアナログが、以下の（ａ）～（ｃ）のいずれか一つのペプチドである、〔３〕に記載の免疫チェックポイント阻害剤。

（ａ）配列番号１で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、

（ｂ）配列番号１で表されるアミノ酸配列において、１～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、免疫抑制性受容体Ｌ１ＬＲＢ４のフィブロネクチン結合部位に対し結合能を有するペプチド、

（ｃ）配列番号１で表されるアミノ酸配列において、８０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、免疫抑制性受容体Ｌ１ＬＲＢ４のフィブロネクチン結合部位に対し結合能を有するペプチド

〔６〕 フィブロネクチンと免疫抑制性受容体Ｌ１ＬＲＢ４との結合を阻害する物質を有効成分として含有する免疫チェックポイント関連疾患の治療剤。

〔７〕 前記フィブロネクチンが、前記フィブロネクチン中の配列番号１で表されるアミノ酸配列を介して、免疫抑制性受容体Ｌ１ＬＲＢ４と結合する、〔６〕に記載の治療剤。

〔８〕 前記フィブロネクチンと免疫抑制性受容体Ｌ１ＬＲＢ４との結合を

阻害する物質が、抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体、抗免疫抑制性受容体 L I L R B 4 抗体又はその誘導体、若しくはフィブロネクチンアナログである、[6] 又は [7] に記載の治療剤。

[9] 前記抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体が、フィブロネクチン中の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と結合する、[8] に記載の治療剤。

[10] 前記フィブロネクチンアナログが、以下の (a) ~ (c) のいずれか一つのペプチドである、[8] に記載の治療剤。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、免疫抑制性受容体 L I L R B 4 のフィブロネクチン結合部位に対し結合能を有するペプチド、

(c) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、免疫抑制性受容体 L I L R B 4 のフィブロネクチン結合部位に対し結合能を有するペプチド

[11] 前記免疫チェックポイント関連疾患が、自己免疫疾患、がん、炎症性疾患、及びアレルギー性疾患からなる群から選択される、[6] ~ [10] のいずれか一項に記載の治療剤。

[12] 前記がんが、がん転移によるものである、[11] に記載の治療剤。

[13] 免疫抑制性受容体 L I L R B 4 を活性化する物質を有効成分として含有する免疫チェックポイント関連疾患の治療剤。

[14] 前記免疫抑制性受容体 L I L R B 4 を活性化する物質が、抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体、抗免疫抑制性受容体 L I L R B 4 抗体又はその誘導体、若しくはフィブロネクチン又はフィブロネクチンアナログである、[13] に記載の治療剤。

[15] 前記フィブロネクチンアナログが、以下の (a) ~ (c) のいずれ

れか一つのペプチドである、[14]に記載の治療剤。

(a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、

(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、免疫抑制性受容体LILRB4のフィブロネクチン結合部位に対し結合能を有するペプチド、

(c) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、免疫抑制性受容体LILRB4のフィブロネクチン結合部位に対し結合能を有するペプチド

[16] 前記免疫チェックポイント関連疾患が、骨疾患である、[13]～[15]のいずれか一項に記載の治療剤。

[17] 免疫抑制性受容体LILRB4を活性化する物質を有効成分として含有する免疫抑制剤。

[18] 前記免疫抑制性受容体LILRB4を活性化する物質が、抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体、抗免疫抑制性受容体LILRB4抗体又はその誘導体、若しくはフィブロネクチン又はフィブロネクチンアナログである、[17]に記載の免疫抑制剤。

[19] 前記フィブロネクチンアナログが、以下の(a)～(c)のいずれか一つのペプチドである、[18]に記載の免疫抑制剤。

(a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、

(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、免疫抑制性受容体LILRB4のフィブロネクチン結合部位に対し結合能を有するペプチド、

(c) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、免疫抑制性受容体LILRB4のフィブロネクチン結合部位に対し結合能を有するペプチド

[20] 配列番号1で表されるアミノ酸配列に結合する抗フィブロネクチ

ン抗体又はその誘導体。

[21] 以下の(a)～(c)のいずれか一つのペプチドと免疫グロブリンGのFc領域とが融合したフィブロネクチンアナログ。

(a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、

(b) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、免疫抑制性受容体LILRB4のフィブロネクチン結合部位に対し結合能を有するペプチド、

(c) 配列番号1で表されるアミノ酸配列において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、免疫抑制性受容体LILRB4のフィブロネクチン結合部位に対し結合能を有するペプチド

[22] [20]に記載の抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体を含み、生体試料中に含まれる配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むフィブロネクチンまたはその部分タンパク質を検出するためのキット。

[23] [22]に記載のキットを用いる、生体試料中のフィブロネクチン又はその部分タンパク質を検出する方法。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、免疫チェックポイント阻害剤、免疫チェックポイント関連疾患の治療剤、免疫抑制剤、抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体、フィブロネクチンアナログ、フィブロネクチンまたはその部分タンパク質を検出するためのキット、及びフィブロネクチンまたはその部分タンパク質を検出する方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]マウス野生型ナイーブCD8陽性T細胞（上段）およびB4欠損ナイーブCD8陽性T細胞（下段）におけるB4（左）、PD-1（中央）、Tim-3（右）の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果を示す。縦軸はヒストグラムのピーク値を100%としたときの細胞の割合、横軸は蛍光強度（タンパク質の発現強度）を示している。実線は、各抗原特異的抗体

による染色、実線無しグレーは、アイソタイプコントロール抗体による染色の結果をそれぞれ示す。

[図2]マウス野生型CD8陽性T細胞（上段）およびB4欠損CD8陽性T細胞（下段）の抗CD3抗体／抗CD28抗体による活性化刺激におけるB4（左）、PD-1（中央）、Tim-3（右）の発現をフローサイトメトリーにより継時的（0-3日目）に解析した結果を示す。縦軸にヒストグラムのピーク値を100%としたときの細胞の割合および横軸に蛍光強度（タンパク質の発現強度）で示した各測定日のヒストグラムを重ね合わせた図として示している。実線は、各抗原特異的抗体による染色、実線無しグレーは、アイソタイプコントロール抗体による染色の結果を示す。

[図3]マウス野生型ナイーブCD4陽性T細胞（上段）およびB4欠損ナイーブCD4陽性T細胞（下段）におけるB4（左）、PD-1（中央）、Tim-3（右）の発現をフローサイトメトリーにより解析した結果を示す。縦軸はヒストグラムのピーク値を100%としたときの細胞の割合、横軸は蛍光強度（タンパク質の発現強度）を示している。実線は、各抗原特異的抗体による染色、実線無しグレーは、アイソタイプコントロール抗体による染色の結果をそれぞれ示す。

[図4]マウス野生型CD4陽性T細胞（上段）およびB4欠損CD4陽性T細胞（下段）の抗CD3抗体／抗CD28抗体による活性化刺激におけるB4（左）、PD-1（中央）、Tim-3（右）の発現をフローサイトメトリーにより継時的（0-3日目）に解析した結果を示す。縦軸にヒストグラムのピーク値を100%としたときの細胞の割合および横軸に蛍光強度（タンパク質の発現強度）で示した各測定日のヒストグラムを重ね合わせた図として示している。実線は、各抗原特異的抗体による染色、実線無しグレーは、アイソタイプコントロール抗体による染色の結果を示す。

[図5]マウスCD8陽性T細胞（上段）およびCD4陽性T細胞（下段）の抗CD3抗体／抗CD28抗体による活性化刺激におけるB4とPD-1の共発現についてフローサイトメトリーにより継時的（0-3日目）に解析した

結果を示す。縦軸はPD-1の発現強度、横軸はB4の発現強度を表し、十字で区切った左下のエリアはPD-1陰性B4陰性、左上のエリアはPD-1単独陽性、右上のエリアはPD-1陽性B4陽性、右下のエリアはPD-1陰性B4陽性をそれぞれ表す。

[図6]ヒトCD8陽性T細胞（上段）およびCD4陽性T細胞（下段）の抗CD3抗体／抗CD28抗体による活性化刺激におけるB4（左）、PD-1（中央）、Tim-3（右）の発現をフローサイトメトリーにより継時的（0-3日目）に解析した結果を示す。縦軸にヒストグラムのピーク値を100%としたときの細胞の割合および横軸に蛍光強度（タンパク質の発現強度）で示した各測定日のヒストグラムを重ね合わせた図として示している。実線は、各抗原特異的抗体による染色、薄いグレーは、アイソタイプコントロール抗体による染色の結果を示す。

[図7]ヒトMSCとB4-GFPレポーター細胞との共培養において、抗FN30モノクローナル抗体によるFN-B4結合阻害効果をB4-GFPレポーター細胞のGFP発現細胞の割合により評価した結果を示す。プロット図の縦軸は細胞の大きさ、横軸はGFPの蛍光強度を表し、プロット図中の数値は、GFP陽性細胞（枠内）の割合（%）を示している。棒グラフは、各抗体で処理した際のGFP陽性細胞の割合（%）を示している。

[図8]マウス骨髄由来間葉系幹細胞およびヒト骨髄由来間葉系幹細胞を抗FN30モノクローナル抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した結果を示す。実線は、抗FN30モノクローナル抗体による染色、実線無しグレーは、アイソタイプコントロール抗体による染色の結果をそれぞれ示す。

[図9]抗FN30モノクローナル抗体No. 5を用いて、マウスがん細胞株（上段）およびヒトがん細胞株（下段）を染色し、フローサイトメーターで解析した結果を示す。実線は抗FN30モノクローナル抗体による染色、実線無しグレーは、アイソタイプコントロール抗体による染色の結果をそれぞれ示す。

[図10]野生型マウスにB16F10細胞株（上段、2匹分）および3LL細

胞株（下段、3 匹分）を摂取して形成された腫瘍内に浸潤している CD 8 陽性 T 細胞について、B 4 および PD-1 の発現をフローサイトメーターで解析した結果を示す。縦軸は PD-1 の発現強度、横軸は B 4 の発現強度を表し、十字で区切った左下のエリアは PD-1 陰性 B 4 陰性、左上のエリアは PD-1 単独陽性、右上のエリアは PD-1 陽性 B 4 陽性、右下のエリアは PD-1 陰性 B 4 陽性をそれぞれ表す。

[図11]野生型マウスに B 1 6 F 1 0 細胞株（上段、2 匹分）および 3 L L 細胞株（下段、3 匹分）を摂取して形成された腫瘍内に浸潤している CD 4 陽性 T 細胞について、B 4 および PD-1 の発現をフローサイトメーターで解析した結果を示す。縦軸は PD-1 の発現強度、横軸は B 4 の発現強度を表し、十字で区切った左下のエリアは PD-1 陰性 B 4 陰性、左上のエリアは PD-1 単独陽性、右上のエリアは PD-1 陽性 B 4 陽性、右下のエリアは PD-1 陰性 B 4 陽性をそれぞれ表す。

[図12]ヒト血漿サンプル中の抗フィブロンネクチン抗体を用いたウエスタンブロット法によるタンパク質の検出結果を示す。左に、抗フィブロンネクチンポリクローナル抗体を用いた染色、右に、抗 FN 3 0 モノクローナル抗体 No. 4 及び No. 5 で染色した結果をそれぞれ示す。

[図13]抗フィブロンネクチン抗体を用いた健常ヒト血漿中フィブロンネクチン全長分子、及びフィブロンネクチン 2 4 k D a 断片の定量結果を示す。スタンダードタンパクの吸光度をもとに 4 パラメーターロジスティック回帰にて非線形近似を行い、サンプルの吸光度値より濃度を算出した。上段は、抗 FN 3 0 モノクローナル抗体で検出されるフィブロンネクチン濃度 $[A (\mu g / ml)]$ 、下段は、抗 FN 4 4 抗体で検出されるフィブロンネクチン濃度 $[B (\mu g / ml)]$ を示す。

[図14]抗 FN モノクローナル抗体を用いた健常ヒト血漿中のフィブロンネクチン全長分子、及びフィブロンネクチン 2 4 k D a 断片の濃度の、第一、第二、第三四分位点および最大値、最小値を表した箱ひげ図を示す。左が、フィブロンネクチン全長分子濃度、右がフィブロンネクチン 2 4 k D a 断片の濃度を示

す。

[図15] B X S B / Y a a マウスにコントロール I g G または F N 3 O - F c を腹腔内投与し、血清中の抗 d s D N A I g G レベルを測定した結果を示す。

[図16] B X S B / Y a a マウスにコントロール I g G または抗 g p 4 9 B モノクローナル抗体 H 1 . 1 を腹腔内投与し、血清中の抗 d s D N A I g G レベルを測定した結果を示す。

[図17A] 野生型 (W T) B 6 マウスおよび g p 4 9 B 欠損マウスに L e w i s l u n g c a r c i n o m a 細胞 (L L C) を尾静脈から注入し、30 日経過後に、肺表面を H & E 染色した結果を示す。W T は野生型マウス、g p 4 9 B - / - は、g p 4 9 B 欠損マウスの結果を示す。

[図17B] 野生型 (W T) B 6 マウスおよび g p 4 9 B 欠損マウスに L e w i s l u n g c a r c i n o m a 細胞 (L L C) を尾静脈から注入し、30 日経過後の、肺の転移巣数の定量結果を示す。

[図17C] 野生型 (W T) B 6 マウスおよび g p 4 9 B 欠損マウスに L e w i s l u n g c a r c i n o m a 細胞 (L L C) を尾静脈から注入し、30 日経過後に、肝臓を H & E 染色した結果を示す。W T は野生型マウス、g p 4 9 B - / - は、g p 4 9 B 欠損マウスの結果を示す。

[図17D] 野生型 (W T) B 6 マウスおよび g p 4 9 B 欠損マウスに L e w i s l u n g c a r c i n o m a 細胞 (L L C) を尾静脈から注入し、30 日経過後の、肝臓の転移巣数の定量結果を示す。

[図18A] 野生型 (W T) B 6 マウスおよび g p 4 9 B 欠損マウスにマウスメラノーマ細胞 B 1 6 F 1 0 を尾静脈から注入し、20 日経過後の肺表面を H & E 染色した結果を示す。W T は野生型マウス、g p 4 9 B - / - は、g p 4 9 B 欠損マウスを示す。

[図18B] 野生型 (W T) B 6 マウスおよび g p 4 9 B 欠損マウスにマウスメラノーマ細胞 B 1 6 F 1 0 を尾静脈から注入し、20 日経過後の肝臓を H & E 染色した結果を示す。W T は野生型マウス、g p 4 9 B - / - は、g p 4 9 B 欠

損マウスを示す。

[図19]野生型マウスの骨髄細胞又はg p 4 9 B欠損マウスの骨髄細胞を養子移入した結果を示す。左が肺（上段）、肝臓（下段）のH & E染色の結果、右が肺（上段）、肝臓（下段）の転移巣数を示す。WT-Rは野生型マウス、g p 4 9 B^{-/-}-Rは、g p 4 9 B欠損マウスを示す。

[図20A]野生型（WT）B 6マウスに、マウスメラノーマ細胞B 1 6 F 1 0を注入した後、対照アイソタイプI g G抗体、抗PD-1モノクローナル抗体、抗g p 4 9 Bモノクローナル抗体、又は抗PD-1モノクローナル抗体と抗g p 4 9 Bモノクローナル抗体との組み合わせを投与するスケジュールを示す。

[図20B]野生型（WT）B 6マウスに、マウスメラノーマ細胞B 1 6 F 1 0を注入した後、対照アイソタイプI g G抗体、抗PD-1モノクローナル抗体、抗g p 4 9 Bモノクローナル抗体、又は抗PD-1モノクローナル抗体と抗g p 4 9 Bモノクローナル抗体との組み合わせを投与し、B 1 6 F 1 0腫瘍を生じているマウスの肺及び肝臓の転移状態を示した図である。上段は、肺の腫瘍結節、下段は、肝臓のH & E染色像を示す。

[図20C]野生型（WT）B 6マウスに、マウスメラノーマ細胞B 1 6 F 1 0を注入した後、対照アイソタイプI g G抗体、抗PD-1モノクローナル抗体、抗g p 4 9 Bモノクローナル抗体、又は抗PD-1モノクローナル抗体と抗g p 4 9 Bモノクローナル抗体との組み合わせを投与し、肺の腫瘍結節数を各抗体処置群で比較したグラフである。

[図20D]野生型（WT）B 6マウスに、マウスメラノーマ細胞B 1 6 F 1 0を注入した後、対照アイソタイプI g G抗体、抗PD-1モノクローナル抗体、抗g p 4 9 Bモノクローナル抗体、又は抗PD-1モノクローナル抗体と抗g p 4 9 Bモノクローナル抗体との組み合わせを投与し、肝臓へのB 1 6 F 1 0転移巣数を各抗体処置群で比較したグラフである。

[図20E]野生型（WT）B 6マウスに、Lewis lung carcinoma細胞（LLC）を注入した後、対照アイソタイプI g G抗体、抗PD

ー1モノクローナル抗体、抗gp49Bモノクローナル抗体、又は抗PD-1モノクローナル抗体と抗gp49Bモノクローナル抗体との組み合わせを投与するスケジュールを示す。

[図20F]野生型(WT)B6マウスに、Lewis lung carcinoma細胞(LLC)を注入した後、対照アイソタイプIgG抗体、抗PD-1モノクローナル抗体、抗gp49Bモノクローナル抗体、又は抗PD-1モノクローナル抗体と抗gp49Bモノクローナル抗体との組み合わせを投与し、LLC細胞を注入されたマウスの21日後のIn vivo bioluminescence imagingの結果を示す。

[図20G]野生型(WT)B6マウスに、Lewis lung carcinoma細胞(LLC)を注入した後、対照アイソタイプIgG抗体、抗PD-1モノクローナル抗体、抗gp49Bモノクローナル抗体、又は抗PD-1モノクローナル抗体と抗gp49Bモノクローナル抗体との組み合わせを投与し、LLC細胞を注入されたマウスの21日後のIn vivo bioluminescence imagingの像をもとに、平均径(photons/s/cm²/steradian)でBioluminescence解析し、各抗体処置群で比較した結果を示す。

[図21]野生型(WT)B6マウスに、Lewis lung carcinoma細胞(LLC)を注入した後、対照アイソタイプIgG抗体、抗PD-1モノクローナル抗体、抗gp49Bモノクローナル抗体、又は抗PD-1モノクローナル抗体と抗gp49Bモノクローナル抗体との組み合わせを投与したマウスの肺と肝臓の病理切片の解析結果を示す。上段が肺表面、下段が肝臓のH&E染色を示す。矢印は、がん転移巣の位置を示す。

[図22]対照アイソタイプIgG抗体、抗gp49Bモノクローナル抗体H1.1、抗gp49Bモノクローナル抗体H1.1のF(ab')₂フラグメント又は抗FN30モノクローナル抗体No.6添加による骨髓細胞からの破骨細胞への分化誘導の結果を示す。写真が破骨細胞のTRAP染色像を示し、グラフは、各抗体添加による分化誘導率を示す。写真及びグラフにおいて

、M o c k は抗体非添加の場合を示す。

[図23]抗L I L R B 4モノクローナル抗体Z M 4 . 1 (右図)又はマウス I g G 1 κ (左図)を添加した場合の破骨細胞のT R A P 染色像を示す。

[図24]野生型B 6マウス又はg p 4 9 B 欠損マウスの骨髓細胞から破骨細胞を分化誘導した結果を示す。写真左が野生型B 6マウスの骨髓細胞から分化した破骨細胞、写真右がg p 4 9 B 欠損マウスの骨髓細胞から分化した破骨細胞のT R A P 染色像を示す。グラフは、野生型B 6マウスの骨髓細胞、g p 4 9 B 欠損マウスの骨髓細胞からそれぞれ破骨細胞を分化誘導させた場合の分化誘導率を示す。W T は野生型B 6マウス、g p 4 9 B $^{-/-}$ 及びK O は、g p 4 9 B 欠損マウスを示す。

[図25]野生型B 6マウスおよびg p 4 9 B 欠損マウスの大腿骨中の破骨細胞のT R A P 染色像を示す。左図が野生型B 6マウス、右図がg p 4 9 B 欠損マウスの破骨細胞のT R A P 染色像を示す。

発明を実施するための形態

[0012] [免疫チェックポイント阻害剤]

本発明の免疫チェックポイント阻害剤は、フィブロネクチンと免疫抑制性受容体L I L R B 4との結合を阻害する物質を有効成分として含有する。フィブロネクチンは、前記フィブロネクチン中の配列番号1で表されるアミノ酸配列を介して、L I L R B 4と結合することができる。すなわち、配列番号1で表されるアミノ酸配列は、L I L R B 4のフィブロネクチン中の標的配列である。

フィブロネクチンとL I L R B 4との結合を阻害する物質としては、フィブロネクチンとL I L R B 4との結合を阻害する活性を有する物質であれば特に制限はないが、抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体、抗L I L R B 4抗体又はその誘導体、フィブロネクチンアナログ等が挙げられる。

[0013] 抗フィブロネクチン抗体としては、フィブロネクチンと反応する抗体であれば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれでも良いが、モノクローナル抗体が好ましく用いられる。当該抗体の作製は周知の方法にて作

製することができる。例えば、ポリクローナル抗体の作製には、免疫する動物としてマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリなどが用いられる。抗血清は、抗原を動物の皮下、皮内、腹腔などに一回又は複数回投与した後、血清から得ることができる。タンパク質、ペプチドを抗原として用いる時は、免疫賦活効果を有する補液との混合物の免疫がより好ましい。

[0014] また、モノクローナル抗体の作製には、公知のモノクローナル抗体作製方法、例えば、長宗香明、寺田弘共著、「モノクローナル抗体」廣川書店（1990年）や、Jame W. Golding, “Monoclonal Antibody”, 3rd edition, Academic Press, 1996年に従い作製することができる。また、DNA免疫法によりモノクローナル抗体を作製することもでき、Nature 1992 Mar 12; 356 152-154やJ. Immunol Methods Mar 1; 249 147-154を参考に作製することができる。

[0015] 抗体作製に用いられる抗原としては、フィブロネクチン、又はその一部断片（ペプチド）、或いはフィブロネクチンまたはその一部断片をコードするcDNAを組み込んだベクターを用いることができる。フィブロネクチンとL1LRB4との結合を阻害するモノクローナル抗体を得るためには、フィブロネクチン中のL1LRB4の標的配列である配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むペプチドを用いることが好ましい。配列番号1で表されるアミノ酸配列を含むペプチドをコードする遺伝子が入った構築物であるフィブロネクチンベクターが最適な免疫用抗原遺伝子として使用できる。DNA免疫法は、上記遺伝子構築物を単独又は混合して、免疫動物に対して様々な遺伝子導入法（例えば筋肉注射、エレクトロポレーション、遺伝子銃など）のいずれかを用いて、動物（マウス、又はラット等）の皮下に注入し、細胞内に取り込ませることにより実施できる。

[0016] 前記抗フィブロネクチンモノクローナル抗体は、常法に従い作成したハイブリドーマを培養し、培養上清から分離する方法、該ハイブリドーマをこれ

と適合性のある哺乳類動物に投与し、腹水として回収する方法により製造できる。また、前記抗フィブロネクチンモノクローナル抗体は、公知の遺伝子組換え技術を用いて作製することもできる。具体的には、前記で作製したハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体、前記抗体をコードする遺伝子をクローニングし、前記遺伝子を含むベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して形質転換させることによって、抗フィブロネクチン抗体を発現する細胞を取得し、これを細胞培養することにより作製することができる。この調製に使用される細胞、ベクターの種類、細胞の種類、培養条件等は、当業者の技術的範囲内であり、適宜適切な条件を設定することができる。

[0017] 抗体は、必要に応じてそれをより精製して使用することができる。抗体を精製・単離する手法としては、従来公知の方法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィ法、プロテインAカラムなどによるアフィニティ精製法等が挙げられる。

[0018] 抗フィブロネクチン抗体の誘導体としては、例えば、前記抗フィブロネクチン抗体の $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、 $scFv$ 、それらの変異体、抗体部分を含む融合タンパク質又は融合ペプチド等が挙げられる。抗フィブロネクチン抗体の誘導体は、公知の抗体の誘導体の製造方法に従って製造することができる。

[0019] 抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体は、フィブロネクチン中の配列番号1で表されるアミノ酸配列またはその部分配列に結合する。本発明の免疫チェックポイント阻害剤において、抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体は、フィブロネクチン中の配列番号1で表されるアミノ酸配列またはその部分配列に結合することにより、フィブロネクチンとLILRB4との結合を阻害することができる。

[0020] 抗LILRB4抗体としては、LILRB4と結合する抗体であれば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれでも良いが、モノクローナル抗体が好ましく用いられる。前記抗LILRB4抗体は前記抗フィブロネ

クチン抗体と同様の方法により作製することができる。

[0021] 抗L I L R B 4抗体作製に用いられる抗原としては、L I L R B 4タンパク質、又はその一部断片（ペプチド）、或いはL I L R B 4タンパクをコードするcDNAを組み込んだベクターを用いることができる。L I L R B 4の高次構造を認識するモノクローナル抗体を得るために、ヒトL I L R B 4全長遺伝子が入った構築物である全長L I L R B 4ベクターが最適な免疫用抗原遺伝子となるが、そのほか、L I L R B 4配列の一部領域が挿入された構築物も、免疫用抗原遺伝子として使用できる。L I L R B 4配列の一部領域としては、フィブロネクチン中のL I L R B 4の標的配列である、配列番号1で表されるアミノ酸配列が、L I L R B 4に結合するL I L R B 4の領域（フィブロネクチン結合部位）が好ましい。DNA免疫法は、上記遺伝子構築物を単独又は混合して、免疫動物に対して様々な遺伝子導入法（例えば筋肉注射、エレクトロポレーション、遺伝子銃など）のいずれかを用いて、動物（マウス、又はラット等）の皮下に注入し、細胞内に取り込ませることにより実施できる。

[0022] 前記抗L I L R B 4抗体の精製は、前記抗フィブロネクチン抗体と同様の方法により行うことができる。前記抗L I L R B 4抗体の誘導体としては、例えば、前記抗L I L R B 4抗体の $F(a b')_2$ 、 $F(a b)_2$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ 、 $F v$ 、 $s c F v$ 、それらの変異体、抗体部分を含む融合タンパク質又は融合ペプチド等が挙げられる。

[0023] 本発明の免疫チェックポイント阻害剤において、抗L I L R B 4抗体又はその誘導体は、フィブロネクチンが、フィブロネクチン中の配列番号1で表されるアミノ酸配列を介してL I L R B 4に結合することを阻害することができる。

[0024] フィブロネクチンとL I L R B 4の結合の阻害は、L I L R B 4を発現している細胞へのフィブロネクチンの結合を阻害することを評価することにより行うことができる。L I L R B 4を発現している細胞としては、L I L R B 4を発現している細胞であれば、特に制限はないが、例えば、脾臓細胞、

末梢血白血球、骨髓細胞、もしくはそれらから単離されたB細胞、形質細胞、単球・マクロファージ、樹状細胞、好酸球、好塩基球、好中球、マスト細胞、活性化T細胞等が挙げられる。

[0025] LILRB4の塩基配列及びアミノ酸配列は、米国生物工学情報センター(NCBI)により提供されているデータベースから知ることができる。ヒト(Homo sapiens)LILRB4の場合、例えばEntrez GeneIDは11006(2019年6月17日時点)、RefSeq ProteinIDはNP_001265355.2、NP_001265356.2、NP_001265357.2、NP_001265358.2、NP_001265359.2(アイソフォーム1~5に相当)が挙げられる。マウス(Mus musculus)LILRB4としては、GeneIDは14728(2016年6月24日時点)、NP_038560.1が挙げられ、ラット(Rattus norvegicus)LILRB4としては、GeneIDは292594(2019年4月18日時点)、RefSeq ProteinIDはNP_001013916が挙げられ、他の動物もLILRB4を有することが知られている。上記のLILRB4には限定されず、他のLILRB4も本発明におけるLILRB4に含まれる。

[0026] フィブロネクチンの塩基配列及びアミノ酸配列は、米国生物工学情報センター(NCBI)により提供されているデータベースから知ることができる。ヒト(Homo sapiens)フィブロネクチンの場合、例えばEntrez GeneIDは2335、RefSeq ProteinIDはNP_997647、NP_001352447、XP_005246463などが挙げられる。マウス(Mus musculus)フィブロネクチンとしては、GeneIDは14268が挙げられ、ラット(Rattus norvegicus)フィブロネクチンとしては、GeneIDは25661、RefSeq ProteinIDはNP_062016が挙げられ、他の動物もフィブロネクチンを有することが知られている。上記のフィ

ブロネクチンには限定されず、他のフィブロネクチンも本発明におけるフィブロネクチンに含まれる。

[0027] フィブロネクチンは、前記フィブロネクチン中の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を介して、形質細胞、T細胞、マクロファージ等の細胞表面に存在する L I L R B 4 と結合し、免疫チェックポイント分子を活性化する。言い換えれば、L I L R B 4 は、フィブロネクチン中の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を介してフィブロネクチンと結合することにより、免疫抑制機能を発現する。

[0028] 本発明において、フィブロネクチンアナログとしては、フィブロネクチンと L I L R B 4 との結合を阻害する作用を有していれば、いかなるフィブロネクチンのアナログも包含するが、例えば、以下の (a) ~ (c) のいずれか一つのペプチドが挙げられる。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むペプチド、

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、且つ、免疫抑制性受容体 L I L R B 4 のフィブロネクチン結合部位に対し結合能を有するペプチド、

(c) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、免疫抑制性受容体 L I L R B 4 のフィブロネクチン結合部位に対し結合能を有するペプチド

[0029] 上記アミノ酸配列の同一性は、80%以上であるが、85%以上が好ましく、90%以上がより好ましく、95%以上がさらに好ましく、98%以上がさらに好ましい。また、上記のアミノ酸配列の欠失、置換若しくは付加の数は、1 ~ 5 個が好ましく、1 ~ 4 個がより好ましく、1 ~ 3 個がさらに好ましく、1 ~ 2 個がさらに好ましい。アミノ酸配列の同一性は、GenBank データベース上で提供される BLAST 検索により求めることができる。

[0030] 前記フィブロネクチンアナログとしては、前記 (a) ~ (c) のいずれか

一つのペプチドと免疫グロブリンGのFc領域とが融合したフィブロネクチンアナログであってもよい。

[0031] 前記フィブロネクチンアナログは、公知の方法、例えば、遺伝子組換え技術によって作製することができる。

[0032] 本発明の免疫チェックポイント阻害剤は、フィブロネクチンとL1LRB4との結合を阻害する物質を有効成分として含み、さらに薬学的に許容できる担体や添加物を含んでいてもよい。

[0033] 担体及び添加物の例としては、水、食塩水、リン酸緩衝液、デキストロース、グリセロール、エタノール等薬学的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、界面活性剤等が挙げられるがこれらに限定されない。

[0034] 本発明の免疫チェックポイント阻害剤は、様々な形態、例えば、液剤（例えば注射剤）、分散剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末剤、坐剤等とすることができる。好ましい態様は、注射剤であり、非経口（例えば、静脈内、経皮、腹腔内、筋内）で投与することが好ましい。

[0035] 本発明の免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイント関連疾患の治療剤として用いることができる。

本発明の免疫チェックポイント阻害剤の投与量は、例えば、0.025～50mg/kg、好ましくは0.1～50mg/kgであり、より好ましくは0.1～25mg/kg、さらに好ましくは0.1～10mg/kg又は0.1～3mg/kgとすることができるが、これに限定されない。

[0036] [免疫チェックポイント関連疾患の治療剤]

本発明の免疫チェックポイント関連疾患の治療剤は、フィブロネクチンと L I L R B 4 との結合を阻害する物質を有効成分として含有する。

フィブロネクチンと L I L R B 4 との結合を阻害する物質としては、フィブロネクチンと L I L R B 4 との結合を阻害する活性を有する物質であれば特に制限はないが、抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体、抗 L I L R B 4 抗体又はその誘導体、フィブロネクチンアナログ等が挙げられる。抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体、抗 L I L R B 4 抗体又はその誘導体、及びフィブロネクチンアナログとしては、前記したものが挙げられる。

[0037] 本発明において、免疫チェックポイント関連疾患としては、免疫チェックポイント分子である L I L R B 4 が関与する疾患であれば、特に制限はないが、例えば、自己免疫疾患、がん、炎症性疾患、アレルギー性疾患等が挙げられる。

[0038] 自己免疫疾患としては、例えば、バセドウ病、リウマチ関節炎、橋本甲状腺炎、1型糖尿病、全身性エリテマトーデス、血管炎、アジソン病、多発性筋炎、皮膚筋炎、乾癬、シェーグレン症候群、全身性強皮症、糸球体腎炎等が挙げられる。

がんとしては、例えば、肺がん、大腸がん、腎がん、悪性黒色腫、ホジキンリンパ腫、頭頸部がん、膵がん、肝がん、前立腺がん、骨肉腫、白血病等が挙げられる。がんは、原発性であっても、転移性であってもよいが、転移性のがんに対して、好ましく用いられる。

[0039] 炎症性疾患としては、例えば、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、川崎病、乾癬、帯状疱疹、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、リウマチ関節炎、抗リン脂質抗体症候群、多発性筋炎、血管炎症候群、シェーグレン症候群、ベーチェット病、バセドウ病、橋本病、心筋炎、大動脈炎症候群、潰瘍性大腸炎、クローン病、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、自己免疫性膵炎、多発性硬化症、重症筋無力症、ギラン・バレー症候群、糸球体腎炎、ANCA関連腎炎、アミロイドーシス、TINU症候群、過敏性肺炎、好酸球性肺炎、サルコイドーシス等が挙げられる。

- [0040] アレルギー疾患としては、アレルギー性鼻炎、気管支喘息、じんましん・アトピー性皮膚炎、带状疱疹、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、アレルギー性結膜炎、食物アレルギー、アナフィラキシー、自己免疫性溶血性貧血、血小板減少症、顆粒球減少症、新生児溶血性黄疸、血清病、過敏性肺炎、ループス腎炎（慢性糸球体腎炎）、全身性エリテマトーデス、接触皮膚炎、橋本病、ベーチェット病、臓器移植後の拒絶反応や移植片対宿主病（GVHD）等が挙げられる。
- [0041] 本発明の免疫チェックポイント関連疾患の治療剤は、LILRB4を活性化する物質を有効成分として含有してもよい。LILRB4を活性化する物質としては、LILRB4と結合することにより、LILRB4を活性化する物質であれば、特に制限はないが、例えば、抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体、抗LILRB4抗体又はその誘導体、フィブロネクチン又はフィブロネクチンアナログ等が挙げられる。抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体、抗LILRB4抗体又はその誘導体、フィブロネクチン又はフィブロネクチンアナログとしては、前記したものが挙げられるが、本発明のLILRB4を活性化する物質を有効成分として含有する免疫チェックポイント関連疾患の治療剤においては、抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体、抗LILRB4抗体又はその誘導体、フィブロネクチン又はフィブロネクチンアナログは、LILRB4と結合することにより、LILRB4を活性化し、LILRB4の免疫抑制機能を発現させる。
- [0042] 本発明のLILRB4を活性化する物質を有効成分として含有する免疫チェックポイント関連疾患の治療剤において、前記免疫チェックポイント関連疾患としては、LILRB4を活性化することによる免疫機能抑制により治療効果を有する疾患であれば特に制限はないが、例えば、リウマチ性関節炎、大理石骨病、骨粗鬆症等の骨疾患等が挙げられる。本発明のLILRB4を活性化する物質は、例えば、破骨細胞の増殖を抑制することにより、骨疾患を治療することができる。
- [0043] 本発明の免疫チェックポイント関連疾患の治療剤は、さらに薬学的に許容

できる担体や添加物を含んでいてもよい。薬学的に許容できる担体及び添加物は、前記したものが挙げられる。

[0044] 本発明の免疫チェックポイント関連疾患の治療剤は、様々な形態、例えば、液剤（例えば注射剤）、分散剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末剤、坐剤等とすることができる。好ましい態様は、注射剤であり、非経口（例えば、静脈内、経皮、腹腔内、筋内）で投与することが好ましい。

[0045] 本発明の免疫チェックポイント関連疾患の治療剤の投与量は、例えば、0.025～50 mg/kg、好ましくは0.1～50 mg/kgであり、より好ましくは0.1～25 mg/kg、さらに好ましくは0.1～10 mg/kg又は0.1～3 mg/kgとすることができるが、これに限定されない。

[0046] [免疫抑制剤]

本発明の免疫抑制剤は、LILRB4を活性化する物質を有効成分として含有する。LILRB4を活性化する物質としては、前記免疫チェックポイント関連疾患の治療剤で挙げられたものが挙げられる。本発明のLILRB4を活性化する物質を有効成分として含有する免疫抑制剤においては、抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体、抗LILRB4抗体又はその誘導体、フィブロネクチン又はフィブロネクチンアナログは、LILRB4と結合することにより、LILRB4を活性化し、LILRB4の免疫抑制機能を発現させる。本発明の免疫抑制剤は、移植医療への応用が可能である。

[0047] 本発明の免疫抑制剤は、さらに薬学的に許容できる担体や添加物を含んでいてもよい。薬学的に許容できる担体及び添加物は、前記したものが挙げられる。

[0048] 本発明の免疫抑制剤は、様々な形態、例えば、液剤（例えば注射剤）、分散剤、懸濁剤、錠剤、丸剤、粉末剤、坐剤等とすることができる。好ましい態様は、注射剤であり、非経口（例えば、静脈内、経皮、腹腔内、筋内）で投与することが好ましい。

[0049] 本発明の免疫抑制剤の投与量は、例えば、0.025～50 mg/kg、

好ましくは0.1～50mg/kgであり、より好ましくは0.1～25mg/kg、さらに好ましくは0.1～10mg/kg又は0.1～3mg/kgとすることができるが、これに限定されない。

[0050] [フィブロネクチン検出キット及びフィブロネクチン検出方法]

本発明のフィブロネクチンまたはその部分ペプチドを検出するためのキットは、配列番号1で表されるアミノ酸配列に結合する抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体を含み、生体試料中の前記フィブロネクチンまたはその部分ペプチドを検出することができる。

生体試料としては、特に制限はなく、例えば血液、唾液、尿、髄液、骨髄液、胸水、腹水、関節液、涙液、眼房水、硝子体液、リンパ液等が挙げられる。

[0051] 本発明のキットにおいて、フィブロネクチンの部分ペプチドとしては、抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体が結合するものであれば特に制限はないが、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含む分子量24kDaの部分ペプチドであることが好ましい。

[0052] 本発明のキットには、配列番号1で表されるアミノ酸配列に結合する抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体の他に、フィブロネクチンの検出に必要な他の構成要素、例えば、反応緩衝液や反応容器を含むことができる。

[0053] 本発明のフィブロネクチンまたはその部分ペプチドを検出するためのキットを用いることにより、生体試料中のフィブロネクチンまたはその部分ペプチドを検出することができる。

生体試料中のフィブロネクチンまたはその部分ペプチドを検出する方法としては、配列番号1で表されるアミノ酸配列に結合する抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体を含み、生体試料中のフィブロネクチンまたはその部分ペプチドを検出することができれば特に制限はないが、前記抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体を用いた免疫学的方法により測定することが好ましい。免疫学的方法としては、例えば免疫染色（ウェスタンブロット）、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、サンドイッチELISA、免疫沈降法

、免疫比濁法（T I AやL T I A）、エンザイムイムノアッセイ、化学発光イムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、フローサイトメトリー法等に供し、フィブロネクチンまたはその部分ペプチドの分子量と一致するバンド若しくはスポット、又はピークを検出することにより行うことができるが、これらに限定されない。

実施例

[0054] 次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0055] [実施例1] マウスT細胞におけるL I L R B 4の発現

48ウェルプレート（Thermo社製、#150687）に抗マウスCD3抗体（BD Bioscience社製、Clone:145-2C11、#553058）および抗マウスCD28抗体（BD Bioscience社製、Clone:37.51、#553298）を各々10μg/mL濃度で含むPBS（-）緩衝液を100μL加え室温で30分間、ウェルをコーティングし、その後500μLのPBS（-）緩衝液で3回ウェルを洗浄した。10週齢のメスのgp49B欠損マウスまたは野生型マウスの脾臓から採取した脾臓細胞を溶血処理後に10%ウシ胎仔血清（BioWest社製、#S1530）、50μM 2-メルカプトエタノール（富士フイルム和光社製、#139-06861）、1%ペニシリン（5000U/mL）／ストレプトマイシン（5000μg/mL）溶液（Sigma社製、#P4458）を含むRPMI-1640培地（Sigma社製、#R8758）に懸濁した。なお、gp49Bは、マウスにおける、ヒトL I L R B 4と相同な分子である。

[0056] 抗体をコーティングしたウェルに、懸濁した脾臓細胞を1×10⁶細胞/200μL／ウェルの濃度で播種し、37℃、5%二酸化炭素の条件下で0～3日間培養した。細胞は、ウェルから回収した後、2%ウシ胎仔血清と0.05%アジ化ナトリウム（Sigma社製、#S8032）を含むPBS（-）緩衝液に懸濁し、氷温条件下で、F I T C標識抗マウスCD4抗体（B

ioLegend社製、Clone: GK1. 5、#100406)、Alexa647標識抗マウスCD8α抗体(BD Biosciences社製、Clone: 53-6. 7、#557882)、PE標識抗マウスgp49A/B抗体(BioLegend社製、Clone: H1. 1、#144904)、BV421標識抗マウスPD-1抗体(BioLegend社製、Clone: 29F. 1A12、#135218)、PerCP-Cy5. 5標識抗マウスTim-3(BioLegend社製、Clone: B8. 2C12、#134012)、アイソタイプコントロール抗体としてPE標識アルメニアンハムスターIgG(BioLegend社製、Clone: HTK888、#400908)、BV421標識ラットIgG2a(BioLegend社製、Clone: RTK2758、#400549)、PerCP-Cy5. 5標識ラットIgG1(BioLegend社製、Clone: RTK2071、#400426)を用いて染色し、BD FACS Aria IIIセルソーター(BD Biosciences社製)により測定し、FlowJoソフトウェア(BD Biosciences社製)によりデータを解析した。その結果を図1～5に示す。

[0057] 図1にマウスナイーブCD8陽性T細胞におけるB4、PD-1、Tim-3の発現を示す。図1に示したように、マウスナイーブCD8陽性T細胞では、わずかにPD-1の発現が認められたが、B4およびTim-3の発現は認められなかった。また、B4を欠損することでPD-1やTim-3の発現に影響は見られなかった。

[0058] 図2に、マウスCD8陽性T細胞における抗CD3抗体/抗CD28抗体刺激後のB4、PD-1、Tim-3の発現を示す。図2に示したように、抗CD3抗体/抗CD28抗体による活性化刺激により、マウスCD8陽性T細胞上のPD-1の発現は1日目でほぼ極大となるが、B4とTim-3の発現は1日目でわずかに発現が上昇し2日目以降で極大となり、PD-1の発現とは異なる調節を受けていることが示唆された。B4欠損CD8陽性T細胞では、抗CD3抗体/抗CD28抗体による活性化刺激によりPD-

1の発現に影響は認めなかったが、T i m-3の発現に減弱が認められた。

[0059] 図3に、マウスナイーブCD4陽性T細胞におけるB4、PD-1、T i m-3の発現を示す。図3に示したように、マウスナイーブCD4陽性T細胞では、PD-1の弱いながらも明らかな発現が認められたが、B4およびT i m-3の発現は認められなかった。また、B4を欠損することでPD-1やT i m-3の発現に影響は見られなかった。

[0060] 図4に、マウスCD4陽性T細胞における抗CD3抗体／抗CD28抗体刺激後のB4、PD-1、T i m-3の発現を示す。図4に示したように、抗CD3抗体／抗CD28抗体による活性化刺激により、マウスCD4陽性T細胞上のPD-1の発現は1日目でほぼ極大となるが、B4とT i m-3の発現は1日目でわずかに発現が上昇し2日目以降で極大となり、PD-1の発現とは異なる調節を受けていることが示唆された。B4欠損CD4陽性T細胞では、抗CD3抗体／抗CD28抗体による活性化刺激によりPD-1の発現に影響は認めなかったがT i m-3の発現に減弱が認められた。

[0061] 図5に、マウスCD8陽性T細胞およびCD4陽性T細胞における抗CD3抗体／抗CD28抗体刺激後のB4およびPD-1の発現を示す。図5に示したように、マウスCD8陽性T細胞およびCD4陽性T細胞は、いずれもPD-1の発現が先に上昇し、その後B4の発現が遅れて上昇し、PD-1とB4の二重陽性細胞となることが認められた。

[0062] 以上の結果から、B4は、マウスT細胞に発現し、PD-1やT i m-3とは異なる免疫チェックポイント分子であることが明らかとなった。

[0063] [実施例2] ヒトT細胞におけるL I L R B4の発現

48ウェルプレート(Thermo社製、#150687)に抗ヒトCD3抗体(BD Bioscience社製、Clone:UCHT1、#55329)および抗ヒトCD28抗体(BD Bioscience社製、Clone:CD28.2、#555725)を各々10 μ g/mL濃度で含むPBS(-)緩衝液を100 μ L加え室温で30分間、ウェルをコーティングし、その後500 μ LのPBS(-)緩衝液で3回ウェルを洗浄し

た。凍結ヒト末梢血単核球 (C. T. L. 社製) を 37°C の温浴で急速解凍し、 10% ウシ胎仔血清、 $50\mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノール、 1% ペニシリン ($5000\text{U}/\text{ml}$) / ストレプトマイシン ($5000\mu\text{g}/\text{ml}$) 溶液、 $20\text{U}/\text{ml}$ DNase I (Sigma社製、#D5025) を含む RPMI-1640 培地 (Sigma社製、#R8758) に懸濁して一晩培養した後、細胞を回収して Naive Pan T cell Isolation Kit, human (Miltenyi社製、#130-097-095) を用いて T 細胞を精製し、上記組成の DNase I 不含の培地に懸濁した。抗体をコーティングしたウェルに、懸濁した T 細胞を 1×10^6 細胞 / $200\mu\text{L}$ / ウェルの濃度で播種し、 37°C 、 5% 二酸化炭素の条件下で 0~3 日間培養した。細胞は、ウェルから回収した後、 2% ウシ胎仔血清と 0.05% アジ化ナトリウムを含む PBS (-) 緩衝液に懸濁し、氷温条件下で、FITC 標識抗ヒト CD4 抗体 (BioLegend社製、Clone: RPA-T4、#300506)、Alexa647 標識抗ヒト CD8a 抗体 (BioLegend社製、Clone: RPA-T8、#301022)、PE 標識抗ヒト CD85k (LILRB4) 抗体 (eBioscience社製、Clone: ZM4.1、#12-5139-42)、BV421 標識抗ヒト PD-1 抗体 (BioLegend社製、Clone: EH12.2H7、#329920)、PerCP-Cy5.5 標識抗ヒト Tim-3 (BioLegend社製、Clone: F38-2E2、#345016)、アイソタイプコントロール抗体として PE 標識マウス IgG1, k (eBioscience社製、Clone: P3.6.2.8.1、#12-4714-42)、BV421 標識マウス IgG1 (BioLegend社製、Clone: MOPC-21、#400158)、PerCP-Cy5.5 標識マウス IgG1 (BD Biosciences社製、Clone: MOPC-21、#552834) を用いて染色し、BD FACSAria III セルソーター (BD Biosciences社製) により測定し、FlowJo ソフトウェア (BD Bioscie

n c e s 社製) によりデータを解析した。

- [0064] 図6に、ヒトCD8陽性T細胞およびCD4陽性T細胞における抗CD3抗体／抗CD28抗体刺激後のB4、PD-1、Tim-3の発現を示す。図6に示したように、ヒトCD8陽性T細胞およびCD4陽性T細胞は、無刺激(0日目)ではB4、PD-1、Tim-3のいずれも発現が認められなかった。しかし、抗CD3抗体／抗CD28抗体による活性化刺激により、PD-1とTim-3と同様にB4の発現上昇が認められた。

以上の結果から、B4は、ヒトT細胞に発現し、PD-1やTim-3とは異なる免疫チェックポイント分子であることが明らかとなった。

- [0065] [実施例3] フィブロネクチンのLILRB4への結合部位の解析

ヒトフィブロネクチンは2q35に位置する単一の遺伝子から転写される多種のmRNAアイソフォームから翻訳され、一般的には26残基のシグナルペプチドを含めて2240～2483個のアミノ酸残基からなる。フィブロネクチンは血漿中では可溶性の二量体として存在し、細胞表面や細胞外マトリックス(ECM)では二量体あるいは多量体として存在している。二量体のフィブロネクチンは二本のほぼ同一の210kDa～250kDaのポリペプチドがC末端近くで2つのジスルフィド結合した構造であり、各ポリペプチドは多数の機能的モジュールから構成され、これらモジュールはフィブリン、コラーゲン、インテグリン、ヘパリン、シンデカン、およびフィブロネクチンを含む他のタンパク質と結合する性質を有している。

- [0066] フィブロネクチン中のB4結合サイトを同定するためにそれらモジュールを含む個別のドメインをレポーター細胞アッセイおよびBLI(Bio-layer interferometry)解析でB4結合性を解析した。

BLI解析はBLItzを用いて次のようにして行った。ヒトHisタグ付きヒトLILRB4をNi-NTAセンサーに固相化し、結合しなかったタンパク質はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗い落とした。このセンサーを被験タンパク質に浸した後、PBSに浸して解離させた。曲線回帰とデータ処理はBLItz Proソフトで行った。

- [0067] レポーター細胞アッセイは、細胞外ドメインがヒト L I L R B 4 で、膜貫通ドメインと細胞内ドメインが活性化型 *paired immunoglobulin-like receptor beta* であるキメラレセプターを用い、N F A T - G F P レポーター遺伝子および D A P 1 2 を発現するマウス T 細胞ハイブリドーマ細胞株にレトロウィルスベクターを用いてトランスフェクトし、得られた 5×10^4 個のレポーター細胞を被験タンパク質と培養し、G F P の発現をフローサイトメトリーで解析することにより行った。
- [0068] その結果、ヒトフィブロネクチンの N 末端のカテプシン D 消化断片 7 0 k D a ポリペプチドとそのトリプシン消化断片である N 末端側の 3 0 k D a フラグメントに結合性があり、C 末端側の 4 5 k D a 断片にはレポーター細胞アッセイおよび B L I 解析で結合性が無かった。フィブロネクチンのより C 末端側の部分、すなわちアミノ酸残基 6 0 7 ~ 1 2 6 5、1 2 6 6 ~ 1 9 0 8、1 2 7 7 ~ 2 4 7 7 はレポーター細胞アッセイでも、B L I 解析でもシグナルを誘導しなかった。この結果から、フィブロネクチン中の B 4 結合サイトは N 末端の 3 0 k D a フラグメント (F N 3 0) 中にあることが示された。
- [0069] さらに、ペプチドマッピングを F N 3 0 の 2 0 アミノ酸残基ごとにそれぞれ 8 残基ずつオーバーラップさせて行ったところ、C y s 1 2 3 ~ H i s 1 4 2 のアミノ酸配列 (C y s T h r C y s I l e G l y A l a G l y A r g G l y A r g I l e S e r C y s T h r I l e A l a A s n A r g C y s H i s) だけがレポーター細胞で顕著なシグナルを誘導した。フィブロネクチンの C y s 1 2 3 ~ H i s 1 4 2 のアミノ酸配列を配列番号 1 に示す。この結果から、フィブロネクチンは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を介して B 4 に結合することが明らかとなった。
- [0070] [実施例 4] 組換えフィブロネクチン標的配列 - F c 融合タンパク質の調製
ヒトフィブロネクチンの N 末端 3 0 k D a (4 0 番グルタミン残基 ~ 2 8 2 番グリシン残基に相当、S i g m a 社製、# 9 9 1 1、以下、F N 3 0 と

も称する)をマウスIgG2aのFcと融合させた組換えタンパク質(以下、FN30-Fcとも称する)を以下の手順で調製した。

[0071] FN30をコードするDNAフラグメントをヒト間葉系幹細胞由来のmRNAから以下のプライマーで増幅した。

FN30 フォワードプライマー: 5' -ATAGAATTTCGCAGTCCCCGGTGGCTGTCAGT-3' (配列番号2)

FN30 リバースプライマー: 5' -TTAAGATCTTCCGCTCGATGTGGTCTGCAC-3' (配列番号3)

[0072] 増幅されたFN30 DNAフラグメントをEcoRIとBglIIで消化し、pFUSE-mIgG2Ae1-Fc2ベクターのそれぞれのサイトに挿入した。本ベクターはFc部分に、IgG2aのFcが本来有する抗体依存性細胞障害活性(ADCC)と補体依存性細胞障害活性(CDC)を低減させるためにL235E、E318A、K320A、K322Aの変異を導入したものである。

得られたプラスミドpFUSE-mIgG2Ae1-Fc2/FN30を配列解析して確認した後、タンパク質発現に供した。FN30-Fcの発現のため、本プラスミドをLipofectamine 2000を用いてCHO-K1細胞にトランスフェクトし、安定導入細胞クローンを、Zeocin(0.8mg/ml)で選択した後、限外希釈法で得た。組換えFN30-Fcは細胞培養上清からHiTrap Protein G HPカラムで精製した後、PBS(-)に対して透析した。

[0073] [実施例5] 抗フィブロネクチン抗体の調製

ヒト血漿由来フィブロネクチンをカテプシンD処理して得られる70kDa断片をトリプシン処理後にヘパリン結合性を利用して精製したフィブロネクチンのN末端側30kDa断片(FN30; Sigma社製、#9911)を抗原としてWKYラットに免疫し、腸骨リンパ節細胞を50%ポリエチレングリコール存在下でミエローマ細胞と融合させハイブリドーマを得た。ヒトFN30、実施例4で得られたFN30-Fc、マウスFN(Abca

m社製、# a b 9 2 7 8 4)、F N 3 0の合成ペプチド断片を用いたE L I S Aで選択することで、抗フィブロネクチンモノクローナル抗体（以下、F N 3 0モノクローナル抗体とも称する）を産生するハイブリドーマを9クローン得た。樹立した9種類の抗F N 3 0モノクローナル抗体のクローン名、アイソタイプ、マウスM S Cとの結合性、ヒトM S Cとの結合性を表1に示す。表中、(－)は結合性なし、(＋)は弱結合性、(＋＋)は強結合性をそれぞれ表す。

[0074] [表1]

抗体番号	アイソタイプ(ラットIgG)	マウスM S Cとの結合性	ヒトM S Cとの結合性
1	IgG2b	－	－
2	IgG2a	－	－
3	IgG2b	－	－
4	IgG2a	＋＋	＋＋
5	IgG2a	＋＋	＋＋
6	IgG2b	＋＋	＋＋
7	IgG2c	＋	＋
8	IgG2a	－	－
9	IgG2a	－	＋

[0075] [実施例6] 抗フィブロネクチン抗体のブロッキング効果

ヒト骨髓由来間葉系幹細胞(P r o m o C e l l社製、# C - 1 2 9 7 4)を間葉系幹細胞増殖培地(P r o m o C e l l社製、C - 2 8 0 0 9)に懸濁して 1×10^5 細胞/300 μ L/ウェルで48ウェルプレートに播種し、37℃、5%二酸化炭素の条件下で培養した。培養24時間後の間葉系幹細胞がプレートに十分に張り付いた状態において、培地を吸引して取り除き、実施例5で得られた抗F N 3 0モノクローナル抗体(N o. 1～N o. 9)20 μ g/mLを含むP B S (－)緩衝液300 μ Lを添加して37℃で1時間反応させた。その後、抗F N 3 0モノクローナル抗体を含むP B S (－)緩衝液を吸引して取り除き、0.5%ウシ胎仔血清、50 μ M 2-メルカプトエタノール、1%ペニシリン(5000 U/mL)/ストレプトマイシン(5000 μ g/mL)溶液を含むR P M I - 1 6 4 0培地500 μ

Lで2回ウェルを洗浄し、同じ組成のRPMI-1640培地に懸濁したB4キメラ受容体GFレポーター細胞(B4-2B4細胞)またはキメラ受容体を発現していないコントロールGFレポーター細胞(2B4細胞)を 1×10^5 細胞/ $200 \mu\text{L}$ /wellで播種し、 37°C 、5%二酸化炭素の条件下で18時間培養した。細胞は、ウェルから回収した後、2%ウシ胎仔血清と0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS(-)緩衝液に懸濁し、BD FACSCaliburフローサイトメーター(BD Biosciences社製)により測定し、FlowJoソフトウェアによりデータを解析した。その結果を図7に示す。

[0076] 図7に示したように、抗FN30モノクローナル抗体No. 1~5、7~9で処理した場合は、抗体なしの陽性コントロールと同等のGF発現を示しているのに対し、抗FN30モノクローナル抗体No. 6で処理した場合は、レポーター細胞のみの陰性コントロールと同等のGF発現であることから、No. 6抗体はFN30とB4との結合を阻害する抗体であると言える。

[0077] [実施例7] 各抗ヒトFN30モノクローナル抗体の交差性(マウス骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)およびヒト骨髄由来間葉系幹細胞の染色)

酵素処理等をせずにシャーレからピペティングにより回収したマウス骨髄由来間葉系幹細胞(Cyagen社製、#MUBMX-01001)およびヒト骨髄由来間葉系幹細胞を2%ウシ胎仔血清と0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS(-)緩衝液に懸濁し、氷温条件下で、実施例5で得られた抗FN30モノクローナル抗体またはPE標識ラットIgG1, k(BD Biosciences社製、Clone: R3-34、#553925)で処理し、洗浄後にPE標識ヤギ抗ラットIgGポリクローナル抗体(BioLegend社製、#405406)で染色し、BD FACSCaliburフローサイトメーターにより測定し、FlowJoソフトウェアによりデータを解析した。その結果を図8に示す。

[0078] 図8に示したように、抗FN30モノクローナル抗体No. 4、No. 5

、及びNo. 6は、マウスMSCおよびヒトMSCのいずれも強く染色し、No. 7抗体は、マウスMSCおよびヒトMSCを弱く染色した。No. 9抗体は、ヒトMSCのみを弱く染色した。No. 1、No. 2、No. 3、及びNo. 8抗体は、いずれのMSCも染色しなかった。

[0079] [実施例8] ヒトおよびマウスがん細胞株におけるフィブロネクチン (FN 30) 細胞表面発現

酵素処理等をせずにシャーレからピペッティングにより回収したマウスがん細胞株のB16F10 (メラノーマ)、3LL (ルイス肺がん)、ヒトがん細胞株のDaudi (バーキットリンパ腫)、HL60 (前骨髄球性白血病)、HeLa (子宮頸部類上皮腫)、HepG2 (肝細胞がん)、Saos-2 (骨肉腫) を2%ウシ胎仔血清と0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS (-) 緩衝液に懸濁し、氷温条件下で抗FN30モノクローナル抗体 (No. 5) またはPE標識ラットIgG2a, k (BD Biosciences社製、Clone: R35-95、#554689) で処理し、洗浄後にAlexa488標識ヤギ抗ラットIgGポリクローナル抗体 (Invitrogen社製、#A-11006) で染色し、BD FACSCaliburフローサイトメーターにより測定し、FlowJoソフトウェアによりデータを解析した。その結果を図9に示す。

[0080] 図9に示したように、マウスがん細胞株におけるフィブロネクチン (FN 30) の細胞表面での発現は、B16F10で弱く、3LLで強いことが認められた。ヒトがん細胞株においては、Daudi、HL60、HeLaで細胞表面発現が無く、HepG2およびSaos-2で強い細胞表面での発現が認められた。

[0081] [実施例9] 腫瘍内浸潤リンパ球のB4およびPD-1の発現

野生型マウスの左足大腿部に、 5×10^5 細胞/100 μ L/匹のB16F10細胞または3LL細胞を皮下接種し、その後、直径が1.5 cm程度に成長した段階でマウスを炭酸ガスの過剰吸引により安楽死させ、腫瘍を取り出してTumor Dissociation Kit, mouse (Mi

l t e n y i 社製、# 1 3 0 - 0 9 6 - 7 3 0) と g e n t l e M A C S
D i s s o c i a t o r (M i l t e n y i 社製、# 1 3 0 - 0 9 3 - 2 3
5) を用いて単細胞懸濁液を調製し、P e r c o l l (G E H e a l t h
c a r e 社製、# 1 7 0 8 9 1 0 2) による比重分離によりリンパ球を回収
した。回収した細胞は、2%ウシ胎仔血清と0.05%アジ化ナトリウムを
含むP B S (-) 緩衝液に懸濁し、氷温条件下で、F I T C 標識抗マウスC
D 4 抗体、A l e x a 6 4 7 標識抗マウスC D 8 a 抗体、P E 標識抗マウス
g p 4 9 A / B 抗体、B V 4 2 1 標識抗マウスP D - 1 抗体、アイソタイプ
コントロール抗体としてP E 標識アルメニアンハムスターI g G、B V 4 2
1 標識ラットI g G 2 a を用いて染色し、B D F A C S A r i a l I I セ
ルソーターにより測定し、F l o w J o ソフトウェアによりデータを解析し
た。その結果を図10及び図11に示す。

[0082] 図10に、腫瘍内浸潤リンパ球（マウスCD8陽性T細胞）のB4および
P D - 1 の発現を示す。図10に示したように、B 1 6 F 1 0 の腫瘍内に浸
潤しているC D 8 陽性T細胞の一部にB 4 およびP D - 1 の発現が認められ
、そのうちの大部分がB 4 とP D - 1 二重陽性細胞であり、B 4 単独陽性細
胞も認められた。3 L L の腫瘍内に浸潤しているC D 8 陽性T細胞は、ほと
んどがB 4 陽性であり、そのうちの80%以上がP D - 1 も陽性であった。

[0083] 図11に腫瘍内浸潤リンパ球（マウスCD4陽性T細胞）のB4およびP
D - 1 の発現を示す。図11に示したように、B 1 6 F 1 0 の腫瘍内に浸潤
しているC D 4 陽性T細胞の一部にB 4 およびP D - 1 の発現が認められ、
B 4 とP D - 1 二重陽性細胞とB 4 単独陽性細胞も認められた。3 L L の腫
瘍内に浸潤しているC D 4 陽性T細胞は、ほとんどがB 4 とP D - 1 二重陽
性細胞であった。

[0084] [実施例10] 血漿サンプルの抗フィブロネクチンポリクローナル抗体、抗
フィブロネクチンモノクローナル抗体によるタンパク検出（ウェスタンブ
ロット法）

血漿サンプルとして、健常男性（年齢：25～31歳）血液を用い、血液

10.5 ml/人をベノジェクトII真空採血管（登録商標）に採取し、ユニバーサル冷却遠心機（KUBOTA S911）にて2500 rpm×3分間遠心分離し、血漿を分離・回収した。

[0085] 血漿サンプルを超純水にて15倍希釈し、還元剤（1M β -ME）および界面活性剤（4% SDS）を添加し95℃×5分間加熱後の還元条件下で、7.5%アクリルアミドゲルで泳動した。泳動後、分離したタンパクをポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜に転写した。得られたブロットは一次抗体として、抗FNポリクローナル抗体、及び実施例5で得られた抗FN30モノクローナル抗体No. 4及びNo. 5、二次抗体として、それぞれ抗rabbit IgG-HRP抗体（cell signaling社製、#7074）、抗rat IgG-HRP抗体（Biolegend社製、Clone: Poly4054、#405405）を添加した後、基質にThermoFisher社製Pierce ECL Western Blotting Substrateを用いて、染色を行った。画像解析にはGEヘルスケア社製ImageQuant LAS 4000miniを用いた。結果を図12に示す。

[0086] 図12に示したように、抗FN30モノクローナル抗体No. 4、No. 5で250 kDaのバンドを確認した。抗FNポリクローナル抗体および抗FN30モノクローナル抗体のいずれにおいても分子量約24 kDaのバンドがみられ、健常ヒト血漿中の24 kDaのFN断片の存在を確認した。

[0087] [実施例11] 抗フィブロネクチン抗体を用いた健常ヒト血漿中フィブロネクチン全長分子、及びフィブロネクチン24 kDa断片の定量（ELISA法）

実施例5で得られた抗FN30モノクローナル抗体No. 6およびCollagen binding-FNを抗原とする抗FN44 kDa抗体（Origene社製、Clone: OT13F9、以下、抗FN44抗体とも称する）及びポリクローナル抗体であるAnti-Fibronectin antibody produced in rabbit（Sigma

—Aldrich社製、#F3648、以下、抗FNポリクローナル抗体とも称する)を使用し、96ウェルプレート(Greiner Bio-one社製、MICROLON(登録商標))に各モノクローナル抗体を終濃度 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう炭酸バッファー(NaHCO_3 0.01M)にて希釈し、 4°C 、12時間静置にてプレートをコーティングした。1%BSA含有PBSにてブロッキング後、スタンダードFNタンパク(R&D社製、Fibronectin ELISA DuoSet)および健常ヒト血漿を加えた。

[0088] モノクローナル抗体に結合したフィブロネクチン量は抗FNポリクローナル抗体(13500倍希釈)および抗rabbit IgG-HRP抗体(250倍希釈)を用いて検出した。各操作間のプレート洗浄にはTBS 0.1%Tween20を使用した。基質を加えたのち、マイクロプレートリーダー(BioRad社製、Model 680)にて波長450nmの吸光度測定し数値化した。

スタンダードタンパクの吸光度をもとに4パラメーターロジスティック回帰にて非線形近似を行い、サンプルの吸光度値より濃度を算出した。その結果を図13に示す。抗FN30モノクローナル抗体で検出されるフィブロネクチン濃度 $[A(\mu\text{g}/\text{ml})]$ と抗FN44抗体で検出されるフィブロネクチン濃度 $[B(\mu\text{g}/\text{ml})]$ は図13に示した濃度と考えられる。

[0089] フィブロネクチン全長分子を $x\mu\text{g}/\text{ml}$ 、24kDa欠損フィブロネクチンを $y\mu\text{g}/\text{ml}$ 、24kDaフィブロネクチンを $z\mu\text{g}/\text{ml}$ とすると、24kDa欠損フィブロネクチンと24kDaフィブロネクチンがいずれも分解産物であること、二次抗体の結合するポリクローナル抗体は分子量におおむね比例することを考慮すると下記式の関係になる。

[0090] [数1]

$$A = x + y, \quad B = x + z, \quad y = \frac{227}{24} z$$

この式から、 x 、 y 及び z は下記の式で算出される。

[0091] [数2]

$$x = \frac{227}{203} A - \frac{24}{203} B, y = \frac{227}{203} (B - A), z = \frac{24}{203} (B - A)$$

[0092] 結果を、第一、第二、第三四分位点および最大値、最小値を表した箱ひげ図表示として示した（図14）。この結果、フィブロネクチン全長分子濃度は $279 \pm 131 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、公知のFN濃度（ $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）に合致した。抗FN30モノクローナル抗体No. 6及び抗FN44抗体を用いて各濃度の差分を利用し、血漿中のFN24kDa濃度は $6.49 \pm 7.44 \mu\text{g}/\text{ml}$ と算出された。

[0093] [実施例12] FN30の自己抗体疾患に対する治療効果

FN30の阻害がgp49Bとフィブロネクチンとの結合を阻害して病原性のプラズマセルによる自己抗体産生に対して治療的な効果を示すかどうかを以下のようにして検証した。

BXSB/Ya aマウスにコントロールIgGまたは実施例4で得られたFN30-Fcを腹腔内投与することを2週間の間隔で2回繰り返した。その結果を図15に示す。

[0094] 図15に示したように、コントロールIgGを投与されたマウスの群は抗dsDNA IgG血清抗体価が徐々に上昇したが、FN30-Fc投与群では観察した期間中、IgG自己抗体レベルは比較的一定に保たれた。

この抑制効果はBXSB/Ya aマウスに、FN30-Fc投与と同様のスケジュールで抗gp49Bモノクローナル抗体H1.1を腹腔内に投与することでも同様に観察された（図16）。自己抗体価の上昇抑制は脾臓重量、総脾臓細胞数、総骨髓細胞数、脾臓と骨髓中のプラズマセルの割合、脾臓中のdsDNA自己抗体産生細胞の頻度などに特段の影響を与えていなかった。

[0095] これらの結果はFN30-Fcあるいは抗gp49Bモノクローナル抗体H1.1をBXSB/Ya aマウスに投与することで、抗体産生細胞を特に消去させることなく、抗dsDNA IgGの更なる上昇を抑制したと示唆

された。これらの結果から、FN-30及び抗B4抗体は、B4とFNとの結合をブロックすることにより、自己免疫疾患を緩和させる効果があると考えられる。

[0096] [実施例13] がん転移におけるLILRB4の関与

LILRB4（マウスではgp49B）が腫瘍の転移に関与するかどうかを評価するため、野生型（WT）B6マウスおよびgp49B欠損マウスにLewis lung carcinoma細胞（LLC）又はマウスメラノーマ細胞B16F10を尾静脈から注入し、それぞれ30日、20日経過後、肺と肝臓を摘出し、H&E染色または表面の腫瘍結節数をカウントして評価した。LLC注入の結果を図17A～図17Dに、B16F10注入の結果を図18A、図18B及び図19示す。

図17A及び図17Bに示したように、LLCの肺への転移はWTに比べ、gp49B欠損マウスで低下した。また、図17C及び図17Dに示したように、腫瘍が転移した部位はLLCを注入されたWTマウスの肝臓のみに見られ、gp49B欠損マウスの肝臓では観察されなかった。

[0097] B16F10については、図18A及び図18Bに示したように、gp49B欠損マウスでは肺の総表面の腫瘍結節数が優位に低下（図18A）し、肝臓への転移も低下した（図18B）。

[0098] 次に、C57BL/6N.Jclマウスを8.5Gyで全身放射線照射を行い、1日後に野生型およびgp49B欠損マウス由来の骨髄細胞を尾静脈から 5×10^6 細胞/匹で注射して移入した。養子移入後、マウスを1ヶ月間、gentamycinで処置し、移入後4週間の時点で総血液像をフローサイトメーターでドナー細胞の置換状態を確認した。その結果を図19に示す。図19に示したように、肺と肝臓への転移はgp49B欠損の骨髄細胞を養子移入されたマウスでは野生型マウスの骨髄細胞を養子移入されたコントロールマウスよりも低下していた。これらの結果から、gp49Bは腫瘍細胞の転移に関与することが示された。

[0099] [実施例14] LILRB4阻害によるがん転移抑制効果

実施例 12 で示したように、g p 4 9 B を欠損すると腫瘍の転移が減少することから、抗 g p 4 9 B モノクローナル抗体 H 1. 1 を使って g p 4 9 B を阻害することで腫瘍の転移がどのように影響を受けるかを以下のようにして調べた。

[0100] B 1 6 F 1 0 を注入された B 6 マウスに对照アイソタイプ I g G 抗体、抗 P D - 1 モノクローナル抗体、抗 g p 4 9 B モノクローナル抗体、あるいは抗 P D - 1 モノクローナル抗体と抗 g p 4 9 B モノクローナル抗体の組み合わせで、6 回腹腔内注射し、抗体の投与後、肺の腫瘍結節数、肝臓の転移巣数を評価した。その結果を図 2 0 A ~ 図 2 0 D に示す。

図 2 0 A ~ 図 2 0 D に示したように、抗 g p 4 9 B モノクローナル抗体処理群は、抗 P D - 1 モノクローナル抗体処理群、あるいは抗 g p 4 9 B モノクローナル抗体と抗 P D - 1 モノクローナル抗体の組み合わせで処理した群と同等に、肺、肝臓とも B 1 6 F 1 0 腫瘍の転移巣数が低下した。さらに、B 6 マウスにルシフェラーゼ発現する L L C (L L C - L u c 2) を注射して、对照アイソタイプ I g G 抗体、抗 P D - 1 モノクローナル抗体、抗 g p 4 9 B モノクローナル抗体、あるいは抗 P D - 1 モノクローナル抗体と抗 g p 4 9 B モノクローナル抗体の組み合わせの効果を調べたところ、抗 g p 4 9 B モノクローナル抗体処理群、及び抗 P D - 1 モノクローナル抗体と抗 g p 4 9 B モノクローナル抗体の組み合わせ処理群において、肺、肝臓とも L L C - L u c 2 腫瘍の転移巣数が減少していた (図 2 0 E ~ 図 2 0 G) 。

[0101] さらに、L L C - L u c 2 腫瘍を有するマウスで抗 P D - 1 モノクローナル抗体と抗 g p 4 9 B モノクローナル抗体を併用したところ、統計的に有意に転移巣数を減少させた (図 2 0 G) 。 g p 4 9 B 阻害は P D - 1 と g p 4 9 B の同時阻害と同様、病理切片の解析でも肺と肝臓の L L C - L u c 2 の転移を抑制していた (図 2 1) 。これらの結果から、L I L R B 4 を阻害することにより、がんの転移が抑制されることが明らかとなった。

[0102] [実施例 15] L I L R B 4 阻害による破骨細胞分化促進効果の検証 1

野生型 B 6 マウスから骨髓細胞を採取し、10% F C S 及び 10 μ g / m

l の、対照アイソタイプ IgG 抗体、抗 gp49B モノクローナル抗体 H1.1、抗 gp49B モノクローナル抗体 H1.1 の F(ab')₂ フラグメント又は抗 FN30 モノクローナル抗体 No. 6 を含む α -MEM 培地を用い、48 ウェルプレートで 5.0×10^5 cells/well で培養した。培養 2 時間後に M-CSF を 20 ng/well 添加してさらに 48 時間培養した。この時点からさらに、破骨細胞への分化誘導のために 20 ng/ml M-CSF 及び 100 ng/ml RANKL を含む 10% FCS 添加 α -MEM を添加し、6 日後に TRAP 染色を行なった。その結果を、図 22 に示す。

[0103] 図 22 に示したように、破骨細胞への分化誘導は、抗 gp49B モノクローナル抗体 H1.1 又は抗 gp49B モノクローナル抗体 H1.1 の F(ab')₂ フラグメントの添加で、それぞれ分化誘導率 (%) (破骨細胞数/全細胞数 $\times 100$) が、3.5%、3.4% となり、対照アイソタイプ IgG 抗体の場合 (2.7%) と比較してやや上昇する傾向がみられた。また、抗 FN-30 モノクローナル抗体 No. 6 の添加で分化誘導率が、7.9% となり、顕著な上昇がみられた。

[0104] [実施例 16] LILRB4 阻害による破骨細胞分化促進効果の検証 2

健常人から採取した血液サンプルから調製した末梢血単核細胞 (PBMC) からマグネティックセルソーター MACS (Miltenyi Biotec 社製) を用いて CD11b 陽性の単球を得た。これを 100 ng/ml RANKL、 25 ng/ml M-CSF を含む 10% FCS 添加 α -MED 培地中で抗 LILRB4 モノクローナル抗体 ZM4.1 (Thermo Fisher Scientific 社製) $1.0 \mu\text{g/ml}$ 又は対照アイソタイプ抗体としてマウス IgG1 κ (Biolegend 社製) $1.0 \mu\text{g/ml}$ を添加して 7 日間培養し、TRAP 染色した。その結果を図 23 に示す。

[0105] 図 23 に示したように、PBMC からの破骨細胞への分化誘導率は、13.7% となり、対照アイソタイプ抗体の場合 (7.6%) と比較して、抗 L

ILRB4 抗体の添加で破骨細胞への分化誘導は約 2 倍亢進した。

[0106] [実施例 17] ILRB4 阻害による破骨細胞分化促進効果の検証 3

野生型 B6 マウス及び gp49B 欠損マウスから骨髓細胞を採取し、10% FCS、20 ng/ml M-CSF、 1.0×10^6 cells/ml の α -MEM 培地を用い、24 ウェルプレートで 2 日間培養した。その後、破骨細胞への分化誘導のため、M-CSF を 20 ng/well 及び 100 ng/ml RANKL を含む 10% FCS 添加 α -MEM を添加し、5 日後に TRAP 染色を行なった。その結果を図 24 に示す。

[0107] 図 24 に示したように、破骨細胞への分化誘導率は、野生型マウス由来の骨髓細胞と比較して、gp49B 欠損マウス由来の骨髓細胞でおよそ 3 倍上昇した。

[0108] [実施例 18] ILRB4 阻害による破骨細胞分化促進効果の検証 4

18 週齢の野生型 B6 マウス（雌）および 18 週齢の gp49B 欠損マウス（雌）から大腿骨を単離し、川本法（「非脱灰硬組織凍結切片標本作成技術（川本法 2008）とその応用」川本忠文「病理技術 72 巻 2 号 p. 76-83, 2009 年」）で包埋したのち凍結切片を作成し、TRAP 染色して破骨細胞を検出した。その結果を図 25 に示す。

[0109] 図 25 に示したように、破骨細胞は、野生型 B6 マウスと比較して、gp49B 欠損マウスの方が多数検出された。

産業上の利用可能性

[0110] 本発明によれば、免疫チェックポイント阻害剤、免疫チェックポイント関連疾患の治療剤、免疫抑制剤、抗フィブロネクチン抗体又はその誘導体、フィブロネクチンアナログ、フィブロネクチンまたはその部分タンパク質を検出するためのキット、及びフィブロネクチンまたはその部分タンパク質を検出する方法を提供することができる。