

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A)

(11)特許出願公開番号
特開2002－194000

(P2002－194000A)

(43)公開日 平成14年7月10日(2002.7.10)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 16/18	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
15/02	ZNA	G 0 1 N 33/53	D 4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08		33/577	B 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53		C 1 2 R 1:91)	
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 6 数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000－396478(P2000－396478)

(22)出願日 平成12年12月27日(2000.12.27)

(71)出願人 000237204

富士テレビオ株式会社

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

(72)発明者 富田 直子

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富

士テレビオ株式会社内

(72)発明者 藤井 信之

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富

士テレビオ株式会社内

(74)代理人 100088546

弁理士 谷川 英次郎

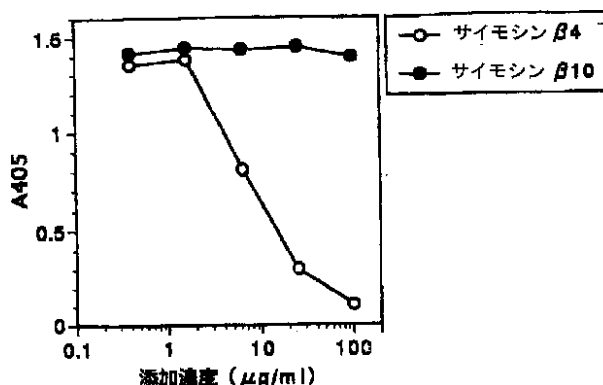
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗サイモシンβ－4モノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマ及びそれを用いたサイモシンβ－4の免疫測定方法

(57)【要約】

【課題】 抗サイモシンβ－4モノクローナル抗体及び該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供すること。

【解決手段】 サイモシンβ－4と抗原抗体反応する抗サイモシンβ－4モノクローナル抗体及びこのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供した。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 サイモシン β -4と抗原抗体反応する抗サイモシン β -4モノクローナル抗体。

【請求項2】 サイモシン β -10とは抗原抗体反応しない請求項1記載の抗サイモシン β -4モノクローナル抗体。

【請求項3】 ヒトサイモシン β -4と同一のアミノ酸配列を持つサイモシン β -4を有する動物に由来する請求項1又は2記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】 マウス又はラット由来である請求項3記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】 ハイブリドーマTB4N1-5(FERM P-18034)により産生されるモノクローナル抗体である請求項4記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】 請求項1ないし5のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項7】 ハイブリドーマTB4N1-5(FERM P-18034)である請求項6記載のハイブリドーマ。

【請求項8】 請求項1ないし5のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体と、検体中のサイモシン β -4との抗原抗体反応を利用して検体中のサイモシン β -4を免疫測定する、検体中のサイモシン β -4の免疫測定方法。

【請求項9】 請求項1ないし5のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を含む、請求項8記載の免疫測定方法を行うための免疫測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗サイモシン β -4モノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマ及びそれをを用いたサイモシン β -4の免疫測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】サイモシン(thymosin) β -4は胸腺から抽出された分子量約4,982の蛋白質として知られており、Tリンパ球の分化誘導作用を有している事が知られている。特に免疫幹細胞から前胸腺細胞への分化を促すとされている(生化学辞典、第2版、832頁、東京化学同人)。しかしながらこの物質は広く組織に分布している事から、細胞内の基本的な機能を担っている事が推察されてきた。その一次配列にはアクチン結合蛋白質に特有の配列が含まれている事から、その機能とアクチン制御機構との関係が議論され、細胞の運動機能との関係も示唆されている。特にここ最近では癌の進展に伴って癌細胞の運動能力との関係が推察されるに至っている。例えばAH130W1ラット癌細胞にTGF- β 1を作用させると、悪性度の指標の一つと言われている、in-vitroでの細胞の浸潤性が飛躍的に増強する事が報告されている(第6回がん転移研究会総会要旨集、98頁、1997年、広島)。その現象の分子レベルでの解析から、TGF- β 1刺激によ

る細胞内での遺伝子強発現が認められているものの中にサイモシン β -4が明確に示されている。

【0003】又、サイモシン β -4の類縁体であるサイモシン β -15の発現量の差が前立腺癌の悪性度と深い相関関係がある事も示されている(Nature Medicine、2、1322 1328 (1996))。サイモシン類はこれまで複数の類縁体が知られており、それらの間でのホモロジーに関してもかなりのデータが集積されているが、特にサイモシン β -4は広く種を越えて同じ配列を有することが明かになっている。又解析自体はまだ少ないがサイモシン β -15も同様にホモロジーが高い事が示唆されている。これまでにサイモシン β -4やサイモシン β -15に関して遺伝子レベルの研究は比較的容易に解析できるが、遺伝子情報の表現型である蛋白質レベルの研究となると種々研究を行う上で抗体が必要となる。抗血清は、たまたま1アミノ酸の配列が異なっていた為に兎を用いる事で、かろうじて得られているが、サイモシン β -4に対する親和性が満足できるものではなく、同じ品質・性質を常に供給するには極めて不確かな状況にある事は明白である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】従って、サイモシン β -4に対するモノクローナル抗体を提供することが望まれている。しかしながら、サイモシン β -4のアミノ酸配列は、極めて保存性が高く、ヒトとマウスやラットという、生物分類上かなり離れた動物種の間でさえ、そのアミノ酸配列は完全に一致している。従って、サイモシン β -4をマウスやラットに免疫しても、免疫応答は起きず、抗サイモシン β -4抗体を得ることができない。また、上記の通り、ウサギは、ヒトとサイモシン β -4のアミノ酸配列が1アミノ酸だけ異なっているが、やはりアミノ酸配列がほぼ完全に同一であるため、免疫応答が弱く、これまでに抗サイモシン β -4モノクローナル抗体は得られていない。

【0005】従って、本発明の目的は、抗サイモシン β -4モノクローナル抗体及び該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供することである。さらに、本発明の目的は、抗サイモシン β -4モノクローナル抗体を用いた、検体中のサイモシン β -4の免疫測定方法及びそのためのキットを提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、鋭意研究の結果、サイモシン β -4の特定の領域から成る部分ペプチドをキャリアタンパク質であるヘモシアニンに結合したものを免疫原として用いることによりサイモシン β -4と抗原抗体反応する抗サイモシン β -4モノクローナル抗体を得ることに成功し、本発明を完成した。

【0007】すなわち、本発明は、サイモシン β -4と抗原抗体反応する抗サイモシン β -4モノクローナル抗体を提供する。また、本発明は、該モノクローナル抗体

を産生するハイブリドーマを提供する。さらに本発明は、該本発明のモノクローナル抗体と、検体中のサイモシンβ-4との抗原抗体反応を利用して検体中のサイモシンβ-4を免疫測定する、検体中のサイモシンβ-4の免疫測定方法を提供する。さらに、本発明は、上記本発明のモノクローナル抗体を含む、上記本発明の免疫測定方法を行うための免疫測定用キットを提供する。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明の抗サイモシンβ-4モノクローナル抗体は、サイモシンβ-4と抗原抗体反応するモノクローナル抗体であり、好ましくは、下記実施例に記載するようにサイモシンβ-10とは抗原抗体反応しないものである。なお、ヒト、マウス及びラットのサイモシンβ-4のアミノ酸配列を配列番号1に示す。

【0009】本発明のモノクローナル抗体は、下記実施例に詳述する方法により得られた。すなわち、サイモシンβ-4のN末端から27アミノ酸から成るポリペプチドのC末端にCysを結合したポリペプチドをキャリアタンパク質であるヘモシアニンに結合したものを免疫原としてマウスに免疫し、KohlerとMilsteinの常法に従って、サイモシンβ-4と抗原抗体反応するモノクローナル抗体を得た。免疫する動物は、特に限定されるものではなく、ヒト以外のいずれの哺乳動物でもよい。マウスやラットのようにそのサイモシンβ-4のアミノ酸配列がヒトサイモシンβ-4と同一の動物を用いた場合、すなわち、サイモシンβ-4を免疫原として抗サイモシンβ-4抗体を誘起することが理論的に不可能な動物を用いた場合でも、上記方法により抗サイモシンβ-4モノクローナル抗体を得ることが可能である。下記実施例において得られた3種類の抗サイモシンβ-4モノクローナル抗体のうち、サイモシンβ-4との結合親和性が最も高いモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマTB4N1-5は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その受託番号はFERM P-18034である。

【0010】本発明の免疫測定方法は、上記本発明の抗サイモシンβ-4モノクローナル抗体と、検体中のサイモシンβ-4との抗原抗体反応を利用して検体中のサイモシンβ-4を免疫測定するものである。検体としては、何ら限定されるものではないが、血液、血清、血漿、尿、髄液、各種組織液等の体液を例示することができる。また、免疫測定方法自体は周知であり、公知のいずれの免疫測定法をも採用することができる。すなわち、測定原理に基づいて分類すると、サンドイッチ法、競合法、凝集法等があるがこれらのいずれをも採用することができる。また、用いる標識に基づいて分類すると、酵素免疫測定、放射免疫測定、蛍光免疫測定、ビオチン免疫測定等があるがこれらのいずれをも採用することができる。さらに、これらの各免疫測定は、さらに種々の測定方法に細分化されるが、それらのいずれをも採用することができる。また、本発明のモノクローナル抗

体（標識したものでよい）をプローブとして用いてウェスタンブロットを行うことも可能であり、ウェスタンブロットも免疫測定方法に包含される。なお、免疫測定方法は、サイモシンβ-4を検出する方法と定量する方法の両者が包含される。すなわち、本明細書において、「測定」には検出、定量及び半定量のいずれもが包含される。なお、周知の免疫測定方法を行うためのキットも当然周知であり、本発明は、上記本発明の抗サイモシンβ-4モノクローナル抗体を用いてサイモシンβ-4を測定するための免疫測定用キットも提供するものである。

【0011】上記の通り、サイモシンβ-4は、癌の進行を判断するためのマーカーとして有用であるので、本発明の免疫測定方法により体液中のサイモシンβ-4を測定することは、癌の検出又はその進行の程度を判断するのに有用である。

【0012】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0013】参考例1

サイモシンβ-4を遺伝子組換え技術により作成し、マウスに免疫したが、抗体値は全く上昇しなかった。即ち上記に述べたように、天然型の抗原では自己抗原として処理されているものと理解できる。

【0014】実施例1

(1) 抗サイモシンβ-4モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作成
サイモシンβ-4のアミノ酸配列（配列番号1）のうち、N末端から27個のアミノ酸配列に相当するペプチド（Thyb4-2）を合成した。その際にC-末端側にCys残基を導入しておいた。Thyb4-2ペプチドとヘモシアニンとを常法によりCysを介して結合させ免疫原として用いた。Thyb4-2抗原をフロイント完全アジュバントと等量混合し、マウス（BALB/c）の腹腔内に投与した。約2週間後、同じくThyb4-2抗原をフロイント不完全アジュバントと等量混合し、マウスの腹腔内に投与した。抗体価の上昇を確認した後、最終免疫としてThyb4-2抗原を静脈内に投与し、その3日後に脾臓を摘出した。単離した脾細胞とマウス骨髓腫細胞株であるP3-x63-Ag8-U1（P3U1）（大日本製薬社製）とを3：1の細胞比で混合し、50%ポリエチレングリコール1500を用いて細胞融合を行った。細胞はHAT（ 1×10^{-4} Mヒポキサンチン、 4×10^{-7} Mアミノプテリン、 1.6×10^{-5} Mチミジン）及び10%ウシ胎仔血清（FCS）添加RPMI-1640培地に懸濁し、96穴のマикроカルチャープレートに分注して培養した。約2週間後、ハイブリドーマが増殖してきたウェルの培養上清を以下の方法により調べ、サイモシンβ-4抗原に反応するモノクローナル抗体を産生している

ハイブリドーマを選択した。すなわち、サイモシンβ-4抗原をリン酸緩衝液(PBS)で希釈し、96穴マイクロアッセイプレートに分注し、4℃で一晩放置して固相に結合させた。次に、0.05%ツィーン20を含むPBS(PBS-T)で3回洗浄した後、ハイブリドーマの培養上清を各ウェルに加え、37℃で1時間反応させた。同様に洗浄後、1000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体(ダコ社製)を加え、37℃で1時間反応させた。さらに洗浄後、POD基質(ABTS-過酸化水素系)を加え、10分間発色させ、405nmの吸収を測定した。

【0015】陽性ウェルの細胞を選択し、限界希釈法にてクローニングした。単一コロニーを含むウェルの培養上清の抗体活性を上記の方法で調べ選択後、さらに培養し、サイモシンβ-4抗原に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマTB4N1-5、TB4N2-5、TB4N3-23を樹立した。これらのハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体をそれぞれモノクローナル抗体TB4N1-5、TB4N2-5、TB4N3-23と命名した。なお、上記の通り、ハイブリドーマTB4N1-5は工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その受託番号はFERM P-18034である。

【0016】(2) 抗体のサブクラスの決定
実施例1で作製したハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のサブクラスを、マウス・モノクローナル抗体アイソタイピングキット(アマシャム社製)を用いて調べた結果、TB4N1-5はIgG1(κ)、TB4N2-5はIgG1(κ)、TB4N3-23はIgG*

*2a(κ)であった。

【0017】(3) 抗サイモシンβ-4モノクローナル抗体の調製
実施例1で樹立したハイブリドーマTB4N1-5の細胞 1×10^7 個を、プリスタン0.5ml投与後2週間のBALB/cマウスに腹腔内投与した。約10日後、マウス腹腔内に貯留した腹水を採取した。この腹水からアフィニティプロテインAマップス・キット(パイオラド社)を用いてモノクローナル抗体を精製した。

【0018】(4) 抗サイモシンβ-4モノクローナル抗体の反応性
サイモシンβ-4のアミノ酸配列(配列番号1)及びサイモシンβ-10のアミノ酸配列(配列番号2)を有する合成ペプチドをそれぞれPBSで5μg/mlに希釈し、マイクロアッセイプレートに分注し、4℃で一晩放置して固相に結合させた。ハイブリドーマTB4N1-5、TB4N2-5、TB4N3-23の培養上清を、サイモシンβ-4またはサイモシンβ-10結合プレートに加え、37℃で1時間反応させた。PBS-Tで3回洗浄後、1000倍に希釈したペルオキシダーゼ(POD)標識抗マウス免疫グロブリン抗体(ダコ社製)を加え、さらに37℃で1時間反応させた。同様に洗浄し、POD基質(ABTS-過酸化水素系)を加え、10分間発色させ、405nmの吸光度を測定した。結果を下記表1に示す。

【0019】

【表1】表1 抗サイモシンβ-4モノクローナル抗体の反応性

モノクローナル抗体	吸光度(405 nm)	
	サイモシンβ-4固相	サイモシンβ-10固相
TB4N1-5	2.416	0.055
TB4N2-5	2.116	0.061
TB4N3-23	2.227	0.063
陰性コントロール	0.056	0.070

【0020】表1から、本発明のモノクローナル抗体であるTB4N1-5、TB4N2-5及びTB4N3-23は、いずれもサイモシンβ-4と強く抗原抗体反応するが、サイモシンβ-10とは抗原抗体反応しないことがわかる。

【0021】実施例2 ウェスタンブロット
サイモシンβ-4及びβ-10の合成ペプチドを、1レーン当たり1.5μgレムリー法による20% SDS-PAGE後、10%グルタルアルデヒドで固定した。その後、1枚のゲルはCBB染色、他の1枚はニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を5%スキムミルクを含むリン酸緩衝液でブロッキング後、サイモシンβ-4に対するモノクローナル抗体(TB4N1-5) 1μg/mlと合成ペプチドを室温で1時間反応させ、次いで、POD標識マウスIgGを

室温で1時間反応させた。続いて4-クロロ-1-ナフトール及び過酸化水素で発色を行ったところ、CBB染色と同じ位置に、バンドが認められた。コントロールとして泳動したサイモシンβ-10にはバンドは生じなかった。従ってこのモノクローナル抗体TB4N1-5はサイモシンβ-4に特異的である。

【0022】実施例3 競合法による免疫測定
実施例1(4)と同様の方法でサイモシンβ-4 2μg/mlを結合したプレートを調製した。これに、モノクローナル抗体TB4N1-5を5μg/mlと種々の濃度のサイモシンβ-4合成ペプチド又はサイモシンβ-10合成ペプチドを加え、37℃で1時間反応させた。PBS-Tで3回洗浄後、1000倍に希釈したPOD標

識抗マウス免疫グロブリン抗体（ダコ社製）を加え、さらに37℃で1時間反応させた。同様に3回洗浄後、P
OD基質（ABTS-過酸化水素系）を加え、10分間
発色させ、405nmの吸光度を測定した。結果を図1
に示す。

【0023】図1に示されるように、添加したサイモシ
ンβ-4の濃度に依存して吸光度が減少し、サイモシ
ンβ-4を測定することが可能であった。一方、サイモシ
ンβ-10では吸光度の減少は見られず、モノクローナ
ル抗体TB4N1-5はサイモシンβ-4を特異的に測¹⁰

*定することが確認された。

【0024】

【発明の効果】本発明により、サイモシンβ-4と抗原
抗体反応する抗サイモシンβ-4モノクローナル抗体が
初めて提供された。本発明のモノクローナル抗体を用い
た免疫測定により体液中のサイモシンβ-4を測定する
ことが可能になる。従って、本発明は、癌の検出又は癌
の進行度の判定に大いに寄与するものと期待される。

【0025】

【配列表】

<110> FUJIREBIO INC.

<120> Anti-thymosin β-4 monoclonal antibody, hybridoma producing the same and immunoassay for thymosin β-4 using the same

【0026】

<130> 00684

<160> 43

<212> PRT

<213> Homo sapience

<400> 1

Ser Asp Lys Pro Asp Met Ala Glu Ile Glu
Lys Phe Asp Lys Ser Lys

1

5

10

15

Leu Lys Lys Thr Glu Thr Gln Glu Lys Asn
Pro Leu Pro Ser Lys Glu

20

25

30

【0027】

Thr Ile Glu Gln Glu Lys Gln Ala Gly Glu

<110> 2

<211> 4335

40

<212> PRT

<213> Homo sapience

<400> 2

Ala Asp Lys Pro Asp Met Gly Glu Ile Ala
Ser Phe Asp Lys Ala Lys

1

5

10

15

Leu Lys Lys Thr Glu Thr Gln Glu Lys Asn
Thr Leu Pro Thr Lys Glu

20

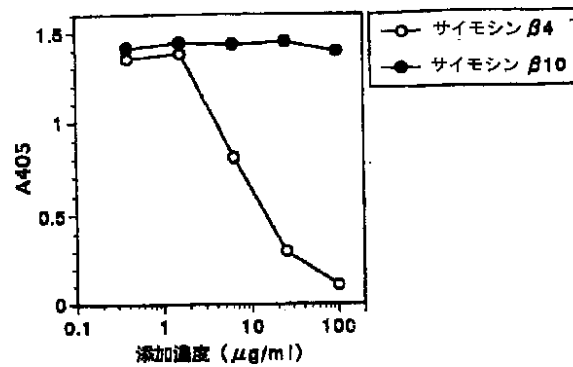
25

30

【図面の簡単な説明】¹⁰ 図1は本発明の方法により得られた検量線を示す。

【図1】本発明の実施例3で行った競合法による免疫測

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/577		C 1 2 N 5/00	B
/(C 1 2 N 5/10		15/00	Z N A C
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 R 1:91)	

(72)発明者 伊藤 哲
東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号
富士レビオ株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA43 GA05 HA11
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA91X AB05 AC14 CA25
CA46
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA50
FA72 FA74

专利名称(译)	抗胸腺素β-4单克隆抗体，产生该抗体的杂交瘤，以及使用该抗体的胸腺素β-4的免疫测定方法		
公开(公告)号	JP2002194000A	公开(公告)日	2002-07-10
申请号	JP2000396478	申请日	2000-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	富田直子 藤井信之 伊藤哲		
发明人	富田 直子 藤井 信之 伊藤 哲		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/18 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/577.B C12R1/91 C12N5/00.B C12N15/00.ZNA.C C12N15/00.C C12N15/00.CZN.A C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/GA05 4B024/HA11 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	谷川荣次郎		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供抗胸腺素β-4单克隆抗体和产生单克隆抗体的杂交瘤。提供与胸腺素β-4作为抗原和抗体反应的抗胸腺素β-4单克隆抗体，以及产生该单克隆抗体的杂交瘤。

