

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公 開 特 許 公 報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-121211**(P2004-121211A)**(43) 公開日 **平成16年4月22日(2004.4.22)**

(51) Int.Cl. ⁷ C 1 2 N 15/09 A 6 1 K 39/395 A 6 1 P 25/08 A 6 1 P 25/18 A 6 1 P 25/28	F I C 1 2 N 15/00 A A 6 1 K 39/395 N A 6 1 P 25/08 A 6 1 P 25/18 A 6 1 P 25/28	テーマコード (参考) 2 G 0 4 5 4 B 0 2 4 4 B 0 6 3 4 B 0 6 4 4 C 0 8 5
審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 23 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2003-39856 (P2003-39856) (22) 出願日 平成15年2月18日 (2003.2.18) (31) 優先権主張番号 特願2002-186974 (P2002-186974) (32) 優先日 平成14年6月26日 (2002.6.26) (33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(71) 出願人 503360115 独立行政法人 科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 (74) 代理人 100107984 弁理士 廣田 雅紀 (72) 発明者 平田 たつみ 静岡県三島市谷田150遺伝研城の内宿舎4 Fターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA36 FB03 FB11 JA01 4B024 AA11 BA31 BA43 BA53 CA04 DA02 EA04 GA03 GA11 HA15 4B063 QA13 QA18 QQ08 QQ13 QQ43 QR48 QR77 QR80 QS33 QS36 QX01	
特許法第30条第1項適用申請有り	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 哺乳類細胞 c D N A 発現ライブラリーを用いた抗原分子同定法

(57) 【要約】

【課題】モノクローナル抗体が認識する抗原を効率よく短時間で同定できる方法を提供すること。

【解決手段】哺乳類培養細胞用発現ベクターに全長 c D N A を組み込み、全長 c D N A ライブラリーを作製し、かかる全長 c D N A ライブラリーを哺乳類動物細胞に導入して培養し、c D N A にコードされたタンパク質を哺乳類培養細胞上に立体構造を形成した状態で発現させ、かかる立体構造を形成した状態でタンパク質を発現している哺乳類培養細胞を被検モノクローナル抗体で免疫染色することにより、抗原遺伝子 c D N A を同定する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

c D N A ライブラリーを哺乳類培養細胞に導入し、前記 c D N A がコードするタンパク質を哺乳類培養細胞上に発現させ、かかるタンパク質を発現した哺乳類培養細胞を被検モノクローナル抗体で免疫染色し、被検モノクローナル抗体により免疫染色された免疫陽性細胞を選択し、選択された免疫陽性細胞から c D N A クローンを単離し、前記哺乳類培養細胞上に発現したタンパク質をコードする遺伝子を同定することを特徴とするモノクローナル抗体の抗原分子同定法。

【請求項 2】

c D N A ライブラリーが、哺乳類培養細胞用発現ベクターに c D N A を組み込むことにより調製した c D N A ライブラリーであることを特徴とする請求項 1 記載のモノクローナル抗体の抗原分子同定法。 10

【請求項 3】

c D N A ライブラリーが、哺乳類培養細胞用発現ベクターに全長 c D N A を組み込むことにより調製した全長 c D N A ライブラリーであることを特徴とする請求項 2 記載のモノクローナル抗体の抗原分子同定法。

【請求項 4】

哺乳類培養細胞用発現ベクターが、プラスミドベクター p C A G G S であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか記載のモノクローナル抗体の抗原分子同定法。

【請求項 5】

哺乳類培養細胞が、C O S 細胞であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか記載のモノクローナル抗体の抗原分子同定法。 20

【請求項 6】

哺乳類培養細胞用発現ベクターに全長 c D N A をクローニングすることにより構築した全長 c D N A ライブラリーを導入した哺乳類培養細胞を含むことを特徴とするモノクローナル抗体の抗原分子同定キット。

【請求項 7】

哺乳類培養細胞用発現ベクターが、プラスミドベクター p C A G G S であることを特徴とする請求項 6 記載のモノクローナル抗体の抗原分子同定キット。

【請求項 8】

哺乳類培養細胞が、C O S 細胞であることを特徴とする請求項 6 又は 7 記載のモノクローナル抗体の抗原分子同定キット。 30

【請求項 9】

請求項 1 ~ 5 のいずれか記載のモノクローナル抗体の抗原分子同定法により得られることを特徴とする抗原が同定されたモノクローナル抗体。

【請求項 10】

請求項 8 記載のモノクローナル抗体を有効成分とすることを特徴とする抗原に対する疾病の診断薬。

【請求項 11】

請求項 8 記載のモノクローナル抗体を有効成分とすることを特徴とする抗原に対する疾病の治療薬。 40

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、モノクローナル抗体の抗原分子同定法、詳しくは、哺乳類細胞 c D N A 発現ライブラリーを用いたモノクローナル抗体の抗原分子同定法に関する。

【0002】

【従来の技術】

目的とするタンパク質に対する抗体を入手することは、その同定・機能解析において重要な位置を占めるが、動物に目的とする抗原を投与して免疫する従来の方法は、多種・多量 50

の抗原と長い時間、多大な労力を要することから、近年、ファージ抗体ライブラリーを用いて抗体を作製する方法が確立されている。かかる方法は、繊維状ファージのコートタンパク質に抗体を融合させることにより、ファージの表面上に抗体を提示（ディスプレイ）するシステムを応用したもので、抗体遺伝子をPCRで増幅して多種類の抗体遺伝子を含むライブラリーを作製し、これをファージ上に提示させることによってファージディスプレイライブラリーとするものであって、このファージシステム（例えば、非特許文献1参照。）によるとヒトの抗体の抗原を同定することが可能となる。このファージ抗体ライブラリーを用いるスクリーニング方法は、ファージディスプレイ法と呼ばれ、従来から種々の細胞表面レセプターと特異的に結合するリガンドや種々の抗原を同定するために使用されている。ファージ抗体ライブラリーの作製方法やそれを用いたイムノチューブ法、マグネティックビーズ法等のスクリーニング法についても既に数多く報告されている。（例えば、非特許文献2、3参照。）。 10

【0003】

その他、膜分子のクローニング方法として、例えばCOS7細胞とSV40の複製起点を含んだ発現ベクターによる一過性発現を利用して、動物細胞発現ベクターで作製されたcDNAライブラリーをCOS7細胞に導入し、細胞表面上にcDNAライブラリー由来の膜蛋白質を発現させ、目的とする膜分子を発現している細胞をその膜分子に対する抗体やリガンドを用いてパニングあるいはFACSで濃縮し、プラスミドDNAを回収して再びCOS7細胞にトランスフェクションし、濃縮操作を繰り返す方法や、発現ベクターcDNAライブラリーをいくつかの小さなプールに分け、COS7細胞に導入し、アイソトープで標識した抗体やリガンドを用いて膜分子の発現を検出し、陽性プールをさらに少数のプラスミドからなるプールに分けてトランスフェクションを繰り返しクローン化する方法が知られている（例えば、非特許文献4参照。）。 20

【0004】

また、ヒト細胞からポリアデニル化RNAを単離し、単離されたポリアデニル化RNAを用いて2本鎖cDNAを作り、この2本鎖cDNAをクローニングベクターに挿入して組換え発現ベクターを作製し、この組換え発現ベクターで宿主をトランスフォームして前記抗原を発現させ、リウマチ性関節炎患者の血清からの抗体を用いて、前記抗体が前記発現抗原に結合することを、抗ヒトIgM抗体-アルカリホスファターゼ複合体とアルカリホスファターゼ顕色基質とによって検出することによりトランスフォームされた宿主を選択する、リウマチ性関節炎関連抗体に対して反応性を有するリウマチ性関節炎の診断用抗原をコードする組換えDNAの作製方法（例えば、特許文献1参照。）も知られている。 30

【0005】

他方、神経軸索の成長等に関して以下の知見が報告されている。

神経系の発達、軸索が活発に成長する能力によって特徴づけられており、成長円錐という特異化された先端によって率先されることにより、多くの軸索が胚脳中において活発に伸張する（例えば、非特許文献5、6参照。）。しかし、中枢神経系が成熟すると、軸索は成長能力を喪失する（例えば、非特許文献7参照。）。中枢軸索の再生に関する研究がこれまで盛んに行なわれてきたが、臨床において軸索の再生を誘導することはたいへん難しいとされている。胚軸索と成体軸索は成長能力に関して異なっているが、これは成体神経系における成長抑制環境が原因の一つであると考えられている（例えば、非特許文献8参照。）。例えば、インビボ及びインビトロの両方において調査を行なった過去の研究から、中枢ミエリンが成体神経系における軸索成長の阻止に関与していることがすでに知られている（例えば、非特許文献9、10参照。）。 40

【0006】

嗅覚体系は、嗅球及びそれが終脳中まで成長した嗅索（LOT）とよばれるものから成り立っている。嗅索は単純であり（例えば、非特許文献11、12参照。）器官培養により簡単に再生できることから（例えば、非特許文献13参照。）、軸索ガイダンスの細胞機構及び分子機構に関する有益な情報を提供してきた（例えば、非特許文献14～17参照。）。 50

。)。また、ミエリンにおける軸索反発因子(axonal repulsive factor)であるNogo(例えば、非特許文献18~22参照。)が成体神経系中において希突起膠細胞により産出されることは、過去の研究からすでに知られている(例えば、非特許文献23~25参照。)。また、Nogoが中枢軸索の成長を阻止することもすでに知られている(例えば、非特許文献26、27参照。))。

【0007】

抗Nogoモノクローナル抗体として知られているIN-1が、中枢神経系において軸索の再生をインビトロとインビボの両方で増進させることが報告されている(例えば、非特許文献17、23、25~30参照。)。Nogoは、小胞体(ER)膜貫通蛋白質の一部であるレチキュロン(Reticulon)ファミリーに属している(例えば、非特許文献31、32参照。)。レチキュロンファミリーの他のメンバーと同様に、Nogoは主にERに局在しているが、細胞表面にも存在している(例えば、非特許文献19、20、23参照。)。Nogoには、3つのスプライシングアイソフォーム、Nogo-A、Nogo-B及びNogo-Cがあり、これらはC-末端ドメインが共通しているが、N-末端配列が相違している。Nogo-Aは最も長いアイソフォームで、ラットでは1163個のアミノ酸残基からなっている。Nogo-Bは、Nogo-AのN-末端部分と、スプライスされた共通のC-末端ドメインを有している。Nogo-Cは最も短いアイソフォームで、共通のC-末端ドメイン以外に、N-末端上にある独特の短いアミノ酸を含んでいる。最近の研究により、Nogoは、反発作用に対する2つの機能的ドメイン、すなわち、共通するC-末端ドメインにある66アミノ酸配列と、Nogo-Aに特異的なN-末端配列をもつことがわかっている(例えば、非特許文献33参照。))。

【0008】

また、嗅球の神経細胞の軸索は、終脳の特定領域を選択的に伸長し(例えば、非特許文献13、34参照。)、この軸索の道標となる神経細胞(道標細胞)を特異的に標識するマーカー抗体としてモノクローナル抗体(mAb)lot1が知られている(例えば、非特許文献35参照。)。道標細胞は、軸索の伸長に先だって、将来の軸索伸長経路に並び、軸索をこの経路へと誘導するが、モノクローナル抗体lot1がどのような抗原分子を認識しているのかは不明であった。この抗原分子は、少なくとも発生期の終脳においては道標細胞のみで発現されており、道標細胞特有の何らかの機能と関係する可能性が考えられている。

【0009】

そしてまた、グルタミン酸は、神経終末より放出され、シナプス後膜あるいは神経終末に存在するグルタミン酸受容体を介して神経細胞活性あるいは神経伝達物質の放出を調節するなど、高等動物の中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質であると考えられており、グルタミン酸受容体は、中枢における興奮性シナプス伝達に中心的役割を担っていることが知られている。グルタミン酸受容体は、シグナル伝達機構等から、イオンチャネルを内蔵して速いシナプス伝達を担うイオンチャネル型グルタミン酸受容体と、Gタンパク質と共役することにより間接的にシグナルを伝える代謝調節型グルタミン酸受容体(mGluR)とに大別され、遺伝子のクローニングによりmGluRには異なる8種類のサブタイプmGluR1~mGluR8が存在することも知られている。mGluR1~mGluR8はそれぞれ異なる脳内分布を示し、mGluR1及びmGluR5はGタンパク質を介してホスホリパーゼ、イノシトール3リン酸、カルシウムと情報を伝える受容体とされ、mGluR1は長い細胞該ドメインをもつ7回膜貫通タンパク質で、神経伝達物質グルタミン酸のレセプターとして機能すると考えられている(例えば、非特許文献36、37参照。))。

【0010】

【特許文献1】

特表平10-513257号公報

【非特許文献1】

Proc. Acad. Sci. USA 80, 1194-1198, 1983 50

【非特許文献2】

Science 249, 386 - 390, 1990

【非特許文献3】

Methods in Enzymology 217, 228 - 257, 1993

【非特許文献4】

Proc. Acad. Sci. USA 84, 3365 - 3369, 1987

【非特許文献5】

Science 233, 740 - 746, 1986

【非特許文献6】

Science 274, 1123 - 1131, 1996

10

【非特許文献7】

Curr. Opin. Neurobiol 11, 89 - 94, 2001

【非特許文献8】

Nature 296, 150 - 152, 1982

【非特許文献9】

Neuron 24, 639 - 647, 1999

【非特許文献10】

J. Neurosci. 8, 2381 - 2393, 1988

【非特許文献11】

Brain Res. Rev. 11, 1 - 45, 1986

20

【非特許文献12】

J. Comp. Neurol. 223, 177 - 202, 1984

【非特許文献13】

J. Neurobiol. 29, 127 - 137, 1996

【非特許文献14】

J. Neurobiol. 32, 415 - 425, 1997

【非特許文献15】

J. Neurobiol. 38, 93 - 104, 1999

【非特許文献16】

J. Neurobiol. 21, 2373 - 2379, 2001

30

【非特許文献17】

Nature 343, 269 - 343, 1990

【非特許文献18】

J. Cell Biol. 106, 1281 - 1288, 1988

【非特許文献19】

Nature 403, 434 - 438, 2000

【非特許文献20】

Nature 403, 439 - 444, 2000

【非特許文献21】

Nature 403, 383 - 384, 2000

40

【非特許文献22】

J. Biol. Chem. 273, 19283 - 19293, 1998

【非特許文献23】

Neuron 1, 85 - 96, 1988

【非特許文献24】

J. Neurocytol. 23, 209 - 217, 1994

【非特許文献25】

J. Neurosci. 9, 1126 - 1133, 1989

【非特許文献26】

Nature 378, 498 - 501, 1995

50

【非特許文献 27】

J. Neurosci. 20, 8061-8068, 2000

【非特許文献 28】

J. Neurosci. 20, 2275-2286, 2000

【非特許文献 29】

J. Neurosci. 12, 2112-2119, 1992

【非特許文献 30】

J. Neurosci. 9, 1126-1133, 1989

【非特許文献 31】

Genomics 32, 191-199, 1996

10

【非特許文献 32】

J. Biol. Chem. 268, 13439-13447, 1993

【非特許文献 33】

Nature 409, 341-346, 2001

【非特許文献 34】

Neurol. 223, 177-202, 1984

【非特許文献 35】

J. Neurosci. 18, 7800-7810, 1998

【非特許文献 36】

Nature 349, 760-765, 1991

20

【非特許文献 37】

Science 252, 1318-1321, 1991

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

上記のように、これまでモノクローナル抗体の抗原分子同定法には、ファージライブラリーを用いた発現スクリーニングの系が実用化されていたが、この系では半ば変性した蛋白質断片を抗体に認識させるので、抗原蛋白質の立体構造を認識するような抗体については適用できず、かかる方法では同定できない抗原が多数存在していた。そのため、抗原タンパク質に対する疾病の診断薬・治療薬に有効なモノクローナル抗体を立体構造の視点から同定することができなかった。本発明の課題は、モノクローナル抗体が認識する抗原を効率よく短時間で同定できる方法を提供することにある。抗原が明らかとなったモノクローナル抗体は、その抗原の機能や性質によって、例えば、疾患の診断マーカー、再生医療、疾患治療などへの応用が期待できる。

30

【0012】

【課題を解決するための手段】

モノクローナル抗体 lot 1 の認識する抗原は、免疫染色のパターンから膜タンパク質であると予想されたが、ウエスタンブロットでも免疫沈降でも、この抗原分子を検出することはできなかった。このことは、モノクローナル抗体 lot 1 の抗原決定部位が、膜からの抽出や可溶性にともなって破壊されたためであると考えられていた。このような性質の抗原決定部位をもつモノクローナル抗体の場合、その抗原分子を同定することは極めて困難である。免疫沈降により抗原タンパク質を精製することはもちろん不可能であるし、ファージライブラリーを用いた発現検索系でも抗原を同定できる可能性は極めて低い。そこで発想を変えて、タンパク質をなるべく本来の立体構造に近い形で発現することにより、抗原分子を検索しようと考えた。具体的には、モノクローナル抗体 lot 1 の抗原物質を豊富に発現する領域から mRNA を調製して全長 cDNA を合成し、これを哺乳類用発現ベクターに組み込んでライブラリーを作製した。この cDNA ライブラリーを哺乳類培養株細胞 (COS 細胞) に導入し、コードするタンパク質を強制発現させた。この方法であれば、たとえその cDNA に膜タンパク質がコードされていたとしても、その産物は通常どおり細胞膜に組み込まれていて本来の立体構造を取りうるはずである。このように考えて、cDNA ライブラリーを導入した COS 細胞を、モノクローナル抗体 lot 1 を用い

40

50

て免疫染色し、顕微鏡下で染色される細胞を検索した。上記の発現検索系を用いて cDNA クローンを検索したところ、モノクローナル抗体 lot 1 で強く染色される細胞を生じる cDNA クローンを単離し、このクローンの塩基配列を決定したところ、代謝型グルタミン酸レセプター 1 (mGluR1) をコードしていることが明らかになった。すなわち、本発明者らは、哺乳類培養細胞用発現ベクターに全長 cDNA を組み込み、全長 cDNA ライブラリーを作製し、かかる全長 cDNA ライブラリーを哺乳類動物細胞に導入して培養し、cDNA にコードされたタンパク質を哺乳類培養細胞上に立体構造を形成した状態で発現させ、かかる立体構造を形成した状態でタンパク質を発現している哺乳類培養細胞を被検モノクローナル抗体で免疫染色することにより、抗原遺伝子 cDNA を同定することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

10

【0013】

すなわち本発明は、cDNA ライブラリーを哺乳類培養細胞に導入し、前記 cDNA がコードするタンパク質を哺乳類培養細胞上に発現させ、かかるタンパク質を発現した哺乳類培養細胞を被検モノクローナル抗体で免疫染色し、被検モノクローナル抗体により免疫染色された免疫陽性細胞を選択し、選択された免疫陽性細胞から cDNA クローンを単離し、前記哺乳類培養細胞上に発現したタンパク質をコードする遺伝子を同定することの特徴とするモノクローナル抗体の抗原分子同定法(請求項1)や、cDNA ライブラリーが、哺乳類培養細胞用発現ベクターに cDNA を組み込むことにより調製した cDNA ライブラリーであることを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体の抗原分子同定法(請求項2)や、cDNA ライブラリーが、哺乳類培養細胞用発現ベクターに全長 cDNA を組み込むことにより調製した全長 cDNA ライブラリーであることを特徴とする請求項2記載のモノクローナル抗体の抗原分子同定法(請求項3)や、哺乳類培養細胞用発現ベクターが、プラスミドベクター pCAGGS であることを特徴とする請求項1~3のいずれか記載のモノクローナル抗体の抗原分子同定法(請求項4)や、哺乳類培養細胞が、COS細胞であることを特徴とする請求項1~4のいずれか記載のモノクローナル抗体の抗原分子同定法(請求項5)に関する。

20

【0014】

また本発明は、哺乳類培養細胞用発現ベクターに全長 cDNA をクローニングすることにより構築した全長 cDNA ライブラリーを導入した哺乳類培養細胞を含むことを特徴とするモノクローナル抗体の抗原分子同定キット(請求項6)や、哺乳類培養細胞用発現ベクターが、プラスミドベクター pCAGGS であることを特徴とする請求項6記載のモノクローナル抗体の抗原分子同定キット(請求項7)や、哺乳類培養細胞が、COS細胞であることを特徴とする請求項6又は7記載のモノクローナル抗体の抗原分子同定キット(請求項8)や、請求項1~5のいずれか記載のモノクローナル抗体の抗原分子同定法により得られることを特徴とする抗原が同定されたモノクローナル抗体(請求項9)や、請求項8記載のモノクローナル抗体を有効成分とすることを特徴とする抗原に対する疾病の診断薬(請求項10)や、請求項8記載のモノクローナル抗体を有効成分とすることを特徴とする抗原に対する疾病の治療薬(請求項11)に関する。

30

【0015】**【発明の実施の形態】**

本発明のモノクローナル抗体の抗原分子同定法としては、cDNA ライブラリーを哺乳類培養細胞に導入し、前記 cDNA がコードするタンパク質を哺乳類培養細胞上に発現させ、かかるタンパク質を発現した哺乳類培養細胞を被検モノクローナル抗体で免疫染色し、被検モノクローナル抗体により免疫染色された免疫陽性細胞を選択し、選択された免疫陽性細胞から cDNA クローンを単離し、前記哺乳類培養細胞上に発現したタンパク質をコードする遺伝子を同定する方法であれば特に制限されるものではなく、上記被検モノクローナル抗体は、例えば、所定の組織、器官、臓器の一部又は全部を用いて免疫したラットのリンパ球と、マウスのミエローマ細胞とを用いて常法により作製することができる。

40

【0016】

上記 cDNA ライブラリーとしては、哺乳類培養細胞用発現ベクターに cDNA、好まし

50

くは全長 c D N A を組み込むことにより調製した c D N A ライブラリー、好ましくは全長 c D N A ライブラリーを挙げる事ができる。c D N A ライブラリーは、前記被検モノクローナル抗体の作製に用いた所定の組織、器官、臓器と同じ組織、器官、臓器等から抽出した m R N A を鋳型としてオリゴ d T をプライマーとした逆転写により相補的 D N A を合成し、これを二本鎖 D N A としてクローニングベクターに組み込むことにより調製することが好ましい。

【 0 0 1 7 】

上記 c D N A ライブラリーの作製に用いられる哺乳類培養細胞用発現ベクターとしては、真核細胞中に蛋白質を効率的に発現可能とし、且つコンピテント細胞に形質転換することができるプラスミドベクターやトランスフェクションすることができるファージベクター 10
であればどのようなものでもよく、発現ベクターの複製を可能とする複製オリジン、発現のためのプロモーター、スプライスシグナル、ポリ A 付加シグナル、薬剤選択マーカー、エンハンサー等を必要に応じて選択し、組み合わせる事ができる。発現ベクターの複製を可能とする複製オリジンとしては、S V 4 0 ウィルス、パピロマウィルス、E B ウィルス等を挙げる事ができ、また発現のためのプロモーターとしては、β - アクチンプロモーター、チミジンキナーゼプロモーター、S V 4 0 プロモーター、アデノウィルス主要後期プロモーター、サイトメガロウィルスプロモーター等を挙げる事ができる。さらに、スプライスシグナル、ポリ A 付加シグナル、クローン選択を効率化するための薬剤選択マーカー、細胞特異的に働くエンハンサーの他、導入遺伝子の発現を制御する転写制御遺伝子等を付加してもよい。具体的には、上記プラスミドベクターとして p C A G 20
G S (G e n e 1 0 8 , 1 9 3 - 2 0 0 , 1 9 9 1) 、 p c D L - S R α 2 9 6 (M o l e c u l a r a n d C e l l u l a r B i o l o g y 8 , 4 6 6 - 4 7 2 , 1 9 8 8) 、 p E F - B O S (N u c l e i c A c i d R e s e a r c h 1 8 , 5 3 2 2 , 1 9 9 0) 等を好適に例示することができるが、これらの中でも、サイトメガロウィルスのエンハンサー、チキン β - アクチンプロモーター、ラビット β - グロビン 3 ' スプライスシグナル、ラビット β - グロビン 3 ' 隣接領域、S V 4 0 複製オリジンを有し、哺乳動物細胞中で組込んだ遺伝子を高い効率で発現することができる p C A G G S (図 1 1 参照) が特に好ましい。また、上記哺乳類培養細胞としては、哺乳類培養細胞用発現ベクターに c D N A を組み込んだ c D N A ライブラリー由来の膜抗原タンパク質 30
をトランジェントにあるいはステイブルに細胞表面上に立体構造を形成した状態で発現させることができる、哺乳類由来の培養細胞であれば特に制限されるものではなく、C O S 細胞、B H K 2 1 細胞、H e L a 細胞、L 細胞、N I H 3 T 3 細胞、n e u r o 2 a 細胞等を例示することができるが、上記膜抗原タンパク質を効率よくトランジェントに発現させうる点で C O S 細胞が好ましい。

【 0 0 1 8 】

また、モノクローナル抗体での免疫染色方法としては、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、β - ガラクトシダーゼ等で酵素標識されたモノクローナル抗体を、抗原抗体反応により細胞表面上に立体構造を形成した状態で発現している膜タンパク質に反応させた後、前記酵素の基質及び発色剤の添加によって色素を生成させ、呈色した色素を観察する酵素免疫染色方法や、F I T C 等で蛍光標識されたモノクローナル抗体を、 40
抗原抗体反応により細胞表面上に立体構造を形成した状態で発現している膜タンパク質に反応させた後、蛍光顕微鏡で観察する蛍光免疫染色方法を挙げる事ができる。

【 0 0 1 9 】

本発明のモノクローナル抗体の抗原分子同定キットとしては、前記プラスミドベクター p C A G G S 等の哺乳類培養細胞用発現ベクターに全長 c D N A をクローニングすることにより構築した全長 c D N A ライブラリーを導入した C O S 細胞等の哺乳類培養細胞を含むものであればどのようなものでもよく、また、本発明の抗原が同定されたモノクローナル抗体としては、上記本発明のモノクローナル抗体の抗原分子同定法により、はじめて抗原分子が明らかにされたモノクローナル抗体であれば特に制限されず、具体的には、ミエリンにおける軸索反発因子である N o g o - A を特異的に認識するモノクローナル抗体 N G 50

1 や、膜蛋白質 M 6 a を特異的に認識するモノクローナル抗体 H 1 - 1 B 4 や、r e t i c u l o n 1 を特異的に認識するモノクローナル抗体 9 - 4 c 1 や、プロゲステロン結合タンパク質 (p r o g e s t e r o n e b i n d i n g p r o t e i n) を特異的に認識するモノクローナル抗体 8 - 2 f 6 や、G A P - 4 3 を特異的に認識するモノクローナル抗体 H 2 - 1 A 7 や、代謝型グルタミン酸受容体 (m G l u R) を特異的に認識するモノクローナル抗体 l o t 1 や、膜蛋白質 N - C A M を特異的に認識するモノクローナル抗体 H 2 - 3 F 2 や、c - k i t r e c e p t o r を特異的に認識するモノクローナル抗体 h 1 2 c 7 や、N E D D 結合タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体 7 - 1 d 8 や、m N a p o r を特異的に認識するモノクローナル抗体 a - p a l e o や、C D 5 9 を特異的に認識するモノクローナル抗体 8 - 1 g 8 等を挙げることができる。

10

【 0 0 2 0 】

本発明の抗原分子が明らかにされたモノクローナル抗体は、抗原分子の細胞外ドメインに結合することを特徴とし、所定の組織、器官、臓器の一部又は全部を用いて免疫した非ヒト動物の脾細胞と、前記非ヒト動物と異種の実マウス細胞とを融合することによって得られるハイブリドマを培養し、ハイブリドマの培養上澄液を前記非ヒト動物と異種の所定の組織、器官、臓器の一部又は全部の切片上で反応させる、免疫組織化学的方法によりスクリーニングすることができるが、抗原分子の c D N A を哺乳類培養細胞に導入し、前記抗原分子を哺乳類培養細胞上に発現させ、かかる抗原分子をその表面に発現した哺乳類培養細胞を、上記免疫組織化学的方法によりスクリーニングしたモノクローナル抗体で免疫染色することにより、抗原分子の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体を再現性よく製造することができる。例えば、m G l u R 1 の c D N A を哺乳類培養細胞に導入し、前記 m G l u R 1 を哺乳類培養細胞上に発現させ、かかる m G l u R 1 を発現した哺乳類培養細胞を、嗅球で免疫した非ヒト動物の脾細胞と、前記非ヒト動物と異種の実マウス細胞とを融合することによって得られるハイブリドマを培養し、ハイブリドマの培養上澄液を前記非ヒト動物と異種の終脳の切片上で反応させる免疫組織化学的方法によりスクリーニングしたモノクローナル抗体で免疫染色することにより、m G l u R 1 の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体を再現性よく製造することができる。m G l u R 1 の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドマとしては特に制限されないが、R a t - M o u s e h y b r i d o m a l o t 1 を好適に例示することができる。この R a t - M o u s e h y b r i d o m a l o t 1 は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託番号 F E R M B P - 8 2 6 4 として寄託されている。

20

30

【 0 0 2 1 】

また、例えば N o g o - A の c D N A を哺乳類培養細胞に導入し、前記 N o g o - A を哺乳類培養細胞上に発現させ、かかる N o g o - A を発現した哺乳類培養細胞を、嗅球軸索で免疫した非ヒト動物の脾細胞と、前記非ヒト動物と異種の実マウス細胞とを融合することによって得られるハイブリドマを培養し、ハイブリドマの培養上澄液を前記非ヒト動物と異種の終脳の切片上で反応させる免疫組織化学的方法によりスクリーニングしたモノクローナル抗体で免疫染色することにより、N o g o - A の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体を再現性よく製造することができる。ミエリンにおける軸索反発因子である N o g o - A の細胞外ドメインを特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドマとしては特に制限されないが、H a m s t e r - M o u s e h y b r i d o m a N G 1 を好適に例示することができる。この H a m s t e r - M o u s e h y b r i d o m a N G 1 は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託番号 F E R M B P - 8 2 6 3 として寄託されている。

40

【 0 0 2 2 】

本発明の抗原に対する疾病の診断薬や抗原に対する疾病の治療薬は、本発明のモノクローナル抗体の抗原分子同定法により、はじめて抗原分子が明らかにされたモノクローナル抗体を有効成分とするものであればどのようなものでもよく、具体的には、抗原 m G l u R 1 に起因する神経変性疾患、精神分裂病、てんかん等の疾病や、抗原 N o g o - A に起因

50

する神経変性疾患、神経損傷等を挙げることができる。

【0023】

また、本発明の上記予防・治療薬を医薬品として用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。これら予防・治療薬を用いる予防・治療方法においては、患者の性別・体重・症状に見合った適切な投与量の上記予防・治療薬を、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。

10

【0024】

【実施例】

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 [モノクローナル抗体NG1が認識する抗原分子の同定]

実施例1A (実験材料と方法)

(マウス)

日本エスエルシー株式会社からICRマウスを購入した。膣栓が見つかった日の昼を、胚日齢0.5日(E0.5)とみなした。生後2~3ヶ月の成体マウスを本実験において用いた。また、オリエンタル酵母工業株式会社から、生後8週間のアルメニアンハムスターを購入した。本実験における手法は、国立遺伝学研究所動物委員会による承認を受けている。

20

【0025】

(モノクローナル抗体の作製)

E14.5である約300個のマウス胚から嗅索(LOT)を機械的に切除し、リン酸バッファー(PBS)中で4%のパラホルムアルデヒド(PFA)を用いて固定し、PBS中で洗浄及び懸濁をした後、これを免疫源としてアルメニアンハムスターの後足に注射した。この免疫処理を3週間ごとに4回繰り返し、最後の追加抗原刺激免疫処理を行ってから3日後に、鼠径リンパ節及び膝窩リンパ節を回収して、それらをマウス骨髄腫細胞(NS1)と公知の方法を用いて融合させた(J. Immunol. 130, 309-312, 1983; J. Neurosci. 18, 7800-7810, 1998; Dev. Biol. 122, 90-100, 1987)。胚日齢14.5日のマウス終脳由来の免疫ハイブリドーマ培養物の培養上澄液を免疫組織化学的方法によってスクリーニングした。クローニングを行なうため、先端の尖ったガラス製キャピラリーを用いてハイブリドーマ細胞個体を取りだし、10%のウシ胎児血清(JRH Bioscience社製)及び10%のハイブリドーマクローニング因子(Igen社製)を添加したダルベッコ改良イーグル培地(DMEM)(Sigma社製)を含む96ウェル細胞プレート(Becton Dickinson社製)上に蒔いた。

30

【0026】

(免疫組織化学法)

マウス胚の脳を、4%パラホルムアルデヒド(PFA)を含むPBSに4℃で一晩固定し、20%スクロースを含むPBSに一晩浸し、OCTコンパウンド(Sakura Finetechnical社製)中で凍結させた。これを凍結切片作製装置(クリオスタット)上で厚さ14~20µmの切片に分け、ガラススライド(松浪ガラス社製)上に載せた。かかる切片を、1%スキムミルク/TBST(10mMのTris-HCl、pH7.4、130mMのNaCl、0.1%のTween20)を有するモノクローナル抗体NG1ハイブリドーマクローンの培養上澄液を1/10に希釈した溶液中で一晩インキュベーションし、TESTを用いて洗浄した後、蛍光発光(FITC)が結合している抗アルメニアンハムスターIgG(Jackson ImmunoResearch社製)を用いて結合抗体を視覚化した。ラビット抗グルタチオン-S-トランスフェラーゼπ抗

40

50

体 (Medical Biological Laboratories 社製) 及び Cy3 結合抗ラビット IgG 抗体 (Jackson 社製) を用いてラビット抗希突起膠細胞を染色した。ホールマウント免疫染色法は、公知の方法 (J. Neurobiol. 29, 127-137, 1996; J. Neurosci. 20, 5802-5812, 2000) に準拠した方法で行った。すなわち、E13.5 マウス胚の終脳半球を切断し、24~28 時間、5% のスキムミルク / TBS T を用いてモノクローナル抗体 NG1 培養上澄液を 10 倍に希釈した溶液中においてインキュベーションした。この免疫反応を視覚化するために、ビオチン化した抗アルミニウムハムスター IgG 抗体 (Jackson 社製) 及び Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を用いて処理した。

10

【0027】

(嗅球神経の分離培養)

Masuda-Nakagawa (Neurosci. Res. 23, 171, 1999) 及び Mori (Neurosci. Res. 24, 160, 2000) に記載の方法に従い、E14.5 の嗅球をトリプシン処理し、穏やかなピペット処理を行なうことにより単一細胞に分離した。ポリリシン (Sigma 社製) によりコーティングした 4 ウェルチャンバースライド (Nalge Nunc 社製) の各ウェルに細胞密度が 1×10^5 細胞となるように調整した。神経膠細胞を用いて条件づけ、B-27 component (Invitrogen 社製) を補った神経細胞培養用基礎培地 Neurobasal medium を用いて CO₂ インキュベーター中において 5 日間、かかる細胞を培養した。培養が終了してから 2 時間、4% の PFA で得られた細胞を固定し、上記方法によりモノクローナル抗体を用いてかかる細胞に対して免疫染色を行なった。

20

【0028】

(モノクローナル抗体 NG1 の抗原の発現クローニング)

モノクローナル抗体 NG1 の抗原の発現クローニングは以下のように行った。E14.5 のマウス胚の背軸嗅球から得たポリ A RNA を、cDNA ライブラリー構築キット (Stratagene 社製) を用いて cDNA に逆転写した。真核細胞中に蛋白質を効率的に発現可能とし、且つコンピテント細胞に形質転換するプラスミドベクター pCAGGS (大阪大学宮崎純一博士より供与) 中に、前記 cDNA を挿入することにより、約 100 クローンのプラスミドのプールを調製し、トランスフェクション試薬 (FuGene 6; Roche 社製) を用いて COS-7 細胞中にトランスフェクションした。続けて 2 日間、PBS 中の 4% の PFA を用いて固定し、モノクローナル抗体 NG1 を用いて免疫染色した。免疫応答細胞は、蛍光顕微鏡を用いてスクリーニングした (Axioplan 2; Carl Zeiss 社製)。スクリーニングで得た約 240 個のプールから、強い免疫陽性細胞を産出するプールを同定した。かかるプールをさらに小さなプールに分け、単一ポジティブ cDNA クローンが得られるまでアッセイを繰り返した。単離した cDNA クローンをサブクローンし、DNA シーケンサー (CEQ2000; Beckman 社製) を用いて配列を決定した。また、マウス Nogo-A のヌクレオチド配列をデータベースに登録した (受入番号: AB073672)。

30

【0029】

実施例 1B (結果)

(モノクローナル抗体 NG1 の作製)

E14.5 のマウスの終脳から機械で切除した嗅球軸索を用いてハムスターを免疫した。かかるハムスターから調製したリンパ球をマウス骨髄腫細胞と融合させた。ハイブリドーマ細胞の培養上澄液を、嗅球軸索からなる LOT に結合させるため、切片上で免疫組織化学的にスクリーニングした (図 1A、B)。スクリーニングを行った約 2000 のハイブリドーマ細胞株から、LOT への強い結合を示したモノクローナル抗体 NG1 を単離した。かかるモノクローナル抗体 NG1 を用いた免疫染色パターンを以下に示す。

40

【0030】

(モノクローナル抗体 NG1 による中枢嗅覚系の免疫染色)

50

嗅球軸索の盛んな伸長が、E 1 4 . 5 の終脳に認められている (J . N e u r o b i o l . 2 9 , 1 2 7 - 1 3 7 , 1 9 9 6) が、モノクローナル抗体 N G 1 は、L O T における成長中の軸索を強く標識した (図 1 C)。これらの軸索は均一には染色されず、ところどころに強く標識される部位が斑点状に認められた (図 1 D) が、こうした斑点に対応する構造は同定できなかった。L O T のより深い領域では、嗅覚皮質中で腺維の染色も認められた (図 1 C)。これは、嗅覚皮質の内在ニューロン (i n t r i n s i c n e u r o n) の突起部が染色されたものと思われる。嗅球においては、嗅球を通る多くの腺維が至るところで染色されていた (図 1 E)。L O T へと伸長している軸索も同様に染色されているが、こうした伸長ニューロンの細胞体は、はっきりとは染色されていなかった (図 1 E)。

10

【 0 0 3 1 】

胚形成期の終脳のホルマウント調製物において、嗅球軸索がモノクローナル抗体 N G 1 によって強く染色されているのが認められた (図 1 E)。標識した軸索は、嗅覚皮質でアーチ形の突起部を形成しており、これは、以前に報告 (J . N e u r o s c i . 2 1 , 2 3 7 3 - 2 3 7 9 , 2 0 0 1、J . N e u r o b i o l . 2 9 , 1 2 7 - 1 3 7 , 1 9 9 6) されている嗅球軸索用マーカーによる染色と類似している。しかし、終脳の他の部分では、モノクローナル抗体 N G 1 による標識は弱いものだった。このことは、弱いものではあるが至るところで生じている抗原の発現が、発生期の神経系において、モノクローナル抗体 N G 1 に認識されたことを示唆している。

出生後も、L O T はモノクローナル抗体 N G 1 により染色された (図 1 G)。しかし、その場合は、終脳の他の部位で染色が広範囲に及ぶことは少なかった。それ以前の発生ステージの場合と比較して、軸索には斑点が見られず、もっと均一に染色されていた。

20

【 0 0 3 2 】

(神経系の他の部位の免疫染色パターン)

一般に、モノクローナル抗体 N G 1 は、長く成長した軸索を強く標識していた。内包、前交連、脳梁、分界条といった主要な軸索経路はすべて、胚形成期中に強く染色された (図 2 A、B)。分化したニューロンが豊富な、皮質板などの領域も染色された (図 1 C、2 A)。脳とは別個に、嗅神経及び視神経は、かかるモノクローナル抗体に強く染色された (図 2 C、D)。モノクローナル抗体 N G 1 は、末梢神経及び筋肉も標識したが、他の非神経組織は標識しなかった (図 2 D)。これは、神経系及び筋肉においてかかる抗原の特異的発現がモノクローナル抗体 N G 1 に認識されたことを示唆している。発生が進行するにつれ、モノクローナル抗体 N G 1 による軸索の標識の鮮明度は低下していった。P 7 の時点で、まだ基線レベルより強く染色される軸索もあった (図 2 E、F) が、周辺部に弱い染色部位が偏在していたため、不鮮明だった。

30

【 0 0 3 3 】

(モノクローナル抗体 N G 1 による成長円錐の標識)

モノクローナル抗体 N G 1 は、発生期の神経系における成長中の軸索を強く標識するため、培養中に盛んに伸長する神経突起における、モノクローナル抗体 N G 1 が認識する抗原の細胞中の局在について調べた。モノクローナル抗体 N G 1 は、嗅球ニューロンの神経突起の遠位部分を優先的に標識した (図 3)。遠位末端 (d i s t a l t i p) の成長円錐はとくに強く標識された。細胞体及び神経突起で、小胞染色が明瞭に認められることもあった。生存ニューロンを、固定を行わずにモノクローナル抗体と共にインキュベーションしたところ、細胞表面の標識は検出されなかった。これは、モノクローナル抗体 N G 1 に対するエピトープが、これらのニューロンの細胞質中に存在することを示唆している。

40

【 0 0 3 4 】

(モノクローナル抗体 N G 1 が認識する抗原分子の同定)

モノクローナル抗体 N G 1 が認識する抗原を同定するため、C O S 7 細胞中で c D N A ライブラリーを発現させ、モノクローナル抗体 N G 1 に免疫反応性をもつ生成物を産生するクローンをスクリーニングした。およそ 2 4 , 0 0 0 の c D N A クローンを分析した後、# 4 - 1 D 9 というクローンが、強い免疫陽性をもつ物質を産生することがわかった (図

50

4 B)。挿入物のヌクレオチド配列から、N o g oのマウス相同物をコードする1つのオープンリーディングフレームが判明した。単離したc D N Aクローンである# 4 - 1 D 9は、N o g o - Aを部分的にコードしており、完全な配列の3'側半分をカバーしている(図4 A)。C O S - 7でかかるクローンを発現させたとき、N - 末端から推定593番目の残基上の内部メチオニンで翻訳が始まり、C - 末端の最後まで続くと推測された(図4 Aの# 4 - 1 D 9)。N o g oの共通するC - 末端ドメインには、2つの疎水性ドメインが含まれており、これらはE R中で膜貫通ドメインとして機能すると考えられている(J . C e l l . S c i . 107, 2403 - 2416, 1994)。# 4 - 1 D 9クローンが産生した免疫反応性生成物は、実際に、C O S - 7細胞中に広がるレース様の網状組織に分布していた(図4 B)。これは、E Rの典型的な分布を示すものである。

10

【0035】

モノクローナル抗体N G 1があらゆる形のN o g oを認識するのか、それともN o g o - Aだけを認識するのかを調べるため、c D N Aクローンから共通のC - 末端ドメインを切除した(図4 Aの# 4 - 1 D 9 ΔC)。その場合もやはりモノクローナル抗体N G 1は、前記の切除を受けた蛋白質を認識したが、C - 末端上のE Rにおける保存シグナルの欠失により、その分布は細胞質全体に広がった(図4 C)。この結果により、モノクローナル抗体N G 1はN o g o - Aに特異的に結合するが、その他の形のN o g oには結合しないことがわかった。モノクローナル抗体N G 1が認識するN o g o - A特異的ドメインには、レチキュロンファミリーの他のメンバーとの相同性がまったくない。そのため、モノクローナル抗体N G 1が他のレチキュロン蛋白質とも結合するとは考えにくい。事実、本発明者らは、モノクローナル抗体N G 1がC O S - 7細胞中で発現しているレチキュロン1 Aとは結合しないことを確認している。

20

【0036】

(モノクローナル抗体N G 1による、成体神経系中の希突起膠細胞の標識)
モノクローナル抗体N G 1が切片中のN o g o - Aを認識するかどうかを調べるため、成体の中枢神経系の切片をモノクローナル抗体N G 1で免疫染色した。成体神経系の軸索は、モノクローナル抗体N G 1によってはほとんど染色されなかった。そのかわり、脳全体に散在する細胞体が強く染色されているのが観察された(図5 A、B)。モノクローナル抗体N G 1陽性細胞の形態及び分布から、それらが希突起膠細胞であることがわかった。このことは、希突起膠細胞のマーカーであるグルタチオン - S - トランスフェラーゼ(G S T) π (E M B O J . 19, 341 - 348, 2000)によるかかる切片の二重免疫染色で確認された(図5 C、D)。

30

【0037】

成体の脊髄におけるN o g o - A蛋白質の分布については、これまでにいくつかの研究報告がある(N a t u r e 403, 434 - 438, 2000、J . N e u r o c y t o l . 23, 209 - 217, 1994)。それらに従い、成体の脊髄切片をモノクローナル抗体N G 1で染色した。かかるモノクローナル抗体により、脊髄の白質全体に分布している希突起膠細胞及びその突起部分が強く染色された(図5 E)。この染色パターンは、報告されている、N o g o - Aに対するポリクローナル抗体を用いた場合の免疫染色(N a t u r e 403, 434 - 438, 2000)と同一だった。しかし、本来N o g o - Aに対する抗体であるモノクローナル抗体I N - 1を用いた染色(J . N e u r o c y t o l . 23, 209 - 217, 1994)と比較すると、モノクローナル抗体N G 1による染色では、希突起膠細胞の細胞体がより鮮明に浮かびあがっており、かかる抗体自体は、ミエリン化軸索にはほとんど結合していなかった。染色パターンがこのように異なる理由は、現在のところ不明である。

40

【0038】

本実施例において、本発明者らは、発生期の神経系における成長中の軸索と強く結合するモノクローナル抗体N G 1を作製し、このモノクローナル抗体がN o g o - A蛋白質と特異的に結合することを示した。成体の神経系をこのモノクローナル抗体で染色した場合の

50

染色パターンは、報告されているNog o - Aの発現と一致するものだった(Nature 403, 434-438, 2000、Nature 403, 439-444, 2000)。発生期のニューロンにはNog o mRNAの強い発現が見られるとの最近の報告(Exp. Neurol. 169, 319-328, 2001)と考えあわせ、モノクローナル抗体NG1は発生期の神経系中のNog o - Aを認識すると結論づけることができる。本発明により、モノクローナル抗体NG1が発生期の神経系中のNog o - Aを認識するということから、盛んに成長している軸索中で、軸索成長の阻害因子であるNog oが強く発現しているという、やや意外な新たな知見が得られた。

【0039】

実施例2 [モノクローナル抗体lot1が認識する抗原分子の同定]

10

実施例2A (実験材料と方法)

(動物)

中部科学資材社(日本国、名古屋)からICR系統マウス及びWistar系ラットを購入した。膣栓が検出された日をE0.5とした。エーテル深麻酔下で雌親の胚をHBSS中で解離した。次に、全ての胚の発達段階をTheiler (1989)の定義に従って決定した(THE HOUSE MOUSE: ATLAS OF EMBRYONIC DEVELOPMENT, springer, 1989)。また、抗mGluR1抗体は、フナコシ社から購入したラビットポリmGluR1 α の他、生理学研究所の重本隆一博士から供与を受けた抗mGluR1抗体を用いた。

【0040】

20

(モノクローナル抗体の作製)

E14.5のマウス胚から得た約30個の嗅球を、0.1mlのHBSS中に懸濁し、27ゲージ針を用いて粉碎し、ラットの左後足に注入した。3週間おきに4回、ラットを免疫した。追加抗原を用いて最終免疫を行ってから3日間経過後に、既知の方法(SELECTED METHPODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY 351-372, Freeman, 1981、Dev Biol 122, 90-100, 1996)を用いて、左鼠径リンパ節及び左膝窩リンパ節をミエロマ細胞と融合させた(P3X63Ag8U1)。ハイブリドーマ培養物の上清をE14.5マウス終脳の切片上で免疫組織化学的方法を用いてスクリーニングした。先端が尖ったガラス製キャピラリーを用いて細胞を1個ずつ回収し、10%のウシ血清(JRH Bioscience, Lenexa, KS)及び10%のハイブリドーマ細胞・クローニング因子(Igen社製)を加えたDMEM(日水社製、東京、日本国)を加えた96ウェル培養プレート(Becton Dickinson社製)の各ウェルに移して、クローニングした。

30

【0041】

(免疫組織化学法)

マウス胚の脳を、4%パラホルムアルデヒド(PFA)を含むPBSに4下で一晩固定し、20%スクロースを含むPBSに一晩浸し、OCTコンパウンド(Tissue-Tek, Sakura Finetechnical社製)で凍結した。クリオスタットで冠状切片を14 μ m厚さに切り分け、ポリ-L-リシンでコーティングしたガラススライド(Sigma社製)上に置いた。かかる切片を、10mMのTris-HCl(pH 7.4)、130mMのNaCl、0.1%のTween20(TBST)共存下で10分間インキュベートしてOCT化合物を除去し、その後さらにハイブリドーマ培養物上清共存下で1時間培養した。結合抗体をCy3で標識した抗ラットIg抗体(1:500、Amersham社製)を用い、視覚化した。

40

ホールマウント免疫染色は、文献(J Neurobiol 29, 127-137, 1996)記載の手法に従って行った。簡潔に説明すると、終脳及び培養物を、4%PFAを含むPBSに4下で12時間固定し、5%スキムミルクを含むTBSTにおいて1時間インキュベートして抗体の非特異的結合を阻害した。プロテインAカラム(Affigel Protein A MAPs kit, Bio-Rad社製)を通過させる

50

ことにより親和精製したモノクローナル抗体 1 o t 1 (1 0 μ g / m l) 共存下において上記標本をインキュベートした。結合抗体を C y 3 又は C y 2 で標識した抗ラット I g 抗体 (1 : 5 0 0 、 A m e r s h a m 社製) を用いて視覚化した。

【 0 0 4 2 】

免疫染色処理には以下の抗体も用いた。ウサギ抗ニューロピリン - 1 抗体 (2 μ g / m l) 、マウス抗 M A P 2 抗体 (1 : 5 0 0 、 S i g m a 社製) 、マウス抗リーリンモノクローナル抗体 C R - 5 0 (2 μ g / m l ; N e u r o n 1 4 , 8 9 9 - 9 1 2 , 1 9 9 5 、 J N e u r o s c i 1 7 , 2 3 - 3 1 , 1 9 9 7) 、マウス抗ニューロフィラメントモノクローナル抗体 2 H 3 (1 : 1 0 0 ハイブリドーマ上清、D e v e l o p m e n t a l S t u d i e s H y b r i d o m B a n k) 、ウサギ抗カルレチニン抗体 (1 : 1 0 0 、 C h e m i c o n I n t e r n a t i o n a l 社製) 、ウサギ抗ネスチン抗体 (1 : 5 0 0 、大阪大学吉川博士から供与) 。二次抗体として、F I T C 標識化抗マウス I g 抗体 (1 : 1 0 0 、 A m e r s h a m 社製) 又は F I T C 標識化抗ウサギ I g 抗体 (1 : 1 0 0 、 A m e r s h a m 社製) を使用した。

10

【 0 0 4 3 】

(全胚培養法)

既知の方法 (J N e u r o b i o l 2 9 , 1 2 7 - 1 3 7) を用いて、器官型培養を行った。具体的には、E 1 2 . 5 マウスから得た終脳半球を切片に分け、軟膜を除去し、表面がコラーゲンで覆われている膜フィルター (T r a n s w a l l - C O L 3 4 1 8 , C o s t a r 社製) 上に、心室側を下にして置いた。E 1 3 . 5 終脳から嗅球を分離し、E 1 2 . 5 終脳片の L O T 部位と結合させて共培養を行った。1 0 % のウシ血清を含む D M E M / H a m ' s F 1 2 ミディアム (混合比 1 : 1 、日水社製) において、C O ₂ 濃度 5 % の雰囲気下、3 7 ° で 2 ~ 3 日間外植片を培養した。 (H i r a t a a n d F u j i s a w a , 1 9 9 7) に記載の方法で、嗅球を培養した (J N e u r o b i o l 3 2 , 4 1 5 - 4 2 5 , 1 9 9 7) 。

20

【 0 0 4 4 】

実施例 2 B (結果)

(モノクローナル抗体 1 o t 1 の作製)

免疫処理したマウス 3 匹から得たリンパ球とマウスミエローマ細胞を融合させ、ハイブリドーマ細胞株を得た。E 1 4 . 5 マウス終脳の切片を免疫染色し、約 2 0 0 0 個のハイブリドーマ細胞株を含有している培養上清をスクリーニングした。なお、L O T 周辺にある細胞サブセットを特異的に染色するモノクローナル抗体 1 o t 1 を単離した。他のハイブリドーマ細胞株では、同様の染色パターンはみられなかった。かかるモノクローナル抗体 1 o t 1 を用いた免疫染色パターンを以下に示す。

30

【 0 0 4 5 】

(道標細胞の起源)

嗅球の神経細胞の軸索は、終脳の特定領域を選択的に伸長する (図 6 A 、 J . C o m p . N e u r o l . 2 2 3 , 1 7 7 - 2 0 2 1 9 8 4 、 J . N e u r o b i o l . 2 9 , 1 2 7 - 1 3 7 1 9 9 6) 。この軸索の道標となるのが、モノクローナル抗体 1 o t 1 が認識する神経細胞である (J . N e u r o s c i . 1 8 , 7 8 0 0 - 7 8 1 0 , 1 9 9 8) 。この道標細胞は、軸索の伸長に先立って、将来の軸索伸長経路に並び、軸索をこの経路へと誘導する。E 1 2 . 5 の終脳をモノクローナル抗体 1 o t 1 でホルマウント免疫染色した結果、道標細胞のマーカーであるモノクローナル抗体 1 o t 1 で赤く染色された道標細胞がつくる帯の上を嗅球の軸索が伸長していた (図 6 B) 。そこで、道標細胞の起源を探索するため、道標細胞が分裂をしている E 1 0 . 5 の終脳新皮質から細胞を解離して、チミジン類似体の B r d U 存在下で 5 日間培養し、モノクローナル抗体 1 o t 1 で免疫染色したところ、モノクローナル抗体 1 o t 1 で染色される細胞は、終脳新皮質と呼ばれる領域を培養したときに限って、分化してくることが示された (図 7 A) 。さらに、終脳新皮質領域の神経幹細胞を 1 つ 1 つ単離して、クローン増殖させても、その中から一定の確率で道標細胞が分化してくることがわかった (図 7 B) 。したがっ

40

50

て、道標細胞を生み出す能力は、終脳新皮質の幹細胞に自律的に備わっていると考えられた。新皮質と隣接する線状体原基の幹細胞を、同様にしてクローン培養しても、モノクローナル抗体 1 o t 1 で染色される細胞は、決して現れてこなかった。

【 0 0 4 6 】

(道標細胞の移動)

終脳新皮質は、将来道標細胞が並ぶ軸索経路に比較すると、はるかに背側に位置する、かなり広い領域であるが、この中ではどこの領域をとっても、道標細胞は同じように分化してくる (図 7 B)。もし実際の生体内でも、新皮質全体から道標細胞が発生してくるとすれば、これらの細胞は、将来の軸索経路に並ぶために、かなりの距離にわたって終脳半球を腹側方向に移動しなければならない。しかし、このような方向の細胞移動は、これまで報告されていなかった。そこで、この時期の終脳における実際の細胞移動の様子を、マウス胚全体を子宮外で培養する全胚培養法を用いて解析した。E 1 0 . 5 の胚の終脳新皮質の神経幹細胞を、蛍光色素で標識し、その胚を 2 日間全胚培養した。その結果、終脳新皮質で生まれた細胞が確かに腹側方向へと選択的に移動し、将来の軸索経路に並ぶことが確かめられた (図 8 A)。このようにして移動した細胞の少なくとも一部は、モノクローナル抗体 1 o t 1 陽性の道標細胞へと分化することも示された (図 8 B、C)。以上の結果を総合すると、道標細胞は終脳新皮質全体で発生し、腹側方向に移動して、将来の軸索経路に並ぶという興味深い発生過程をたどると考えられる。

10

【 0 0 4 7 】

(X t 突然変異マウスにおける道標細胞の分布異常)

道標細胞発生の分子機構の手がかりを得るために、終脳の発生に異常を示す様々な突然変異マウスを入手して、これらのマウス脳における道標細胞の動態を観察した。その結果、E x t r a - t o e s (X t) と呼ばれる突然変異マウスにおいて、道標細胞が終脳新皮質全体に散在していることを見出した。すなわち、野生型マウス (+ / +) 胚において、道標細胞は、終脳新皮質の広い領域から発生し、腹側方向に移動して、将来の軸索経路に配列するが、X t 突然変異マウス (X t / X t) においては、終脳の細胞が移動せず、道標細胞が新皮質全体に散在する (図 9)。この突然変異マウスの終脳では、腹側方向に向かう細胞移動も観察されず、この細胞移動の異常が道標細胞の分布異常の直接の原因であると考えられた。なお、X t 突然変異の原因遺伝子は転写制御因子 G l i 3 であることが明らかにされており (D e v e l o p m e n t 1 1 6 , 7 9 9 - 8 0 4 , 1 9 9 2、N a t u r e G e n e t . 3 , 2 4 1 - 2 4 5 , 1 9 9 3)、またこの変異により脳の背腹軸に乱れが生じるといわれている (D e v e l o p m e n t 1 2 5 , 2 3 1 5 - 2 3 2 5 , 1 9 9 8、D e v e l o p m e n t 1 2 6 , 3 5 6 1 - 3 5 7 1 , 1 9 9 9)。

20

30

【 0 0 4 8 】

(モノクローナル抗体 1 o t 1 が認識する抗原分子の同定)

モノクローナル抗体 1 o t 1 の抗原物質を豊富に発現する発生期の終脳領域から m R N A を調製して全長 c D N A を合成し、これを哺乳類用発現ベクター p C A G G S に組み込んでライブラリーを作製した。この c D N A ライブラリーを C O S 細胞に導入し、コードするタンパク質を強制発現させた。c D N A ライブラリーを導入した C O S 細胞を、モノクローナル抗体 1 o t 1 を用いて免疫染色し、顕微鏡下で染色される細胞を検索し、約 2 0 0 0 0 0 の c D N A クローンを検索したところ、モノクローナル抗体 1 o t 1 で強く染色される細胞を生じる c D N A クローン 6 - 2 E 1 0 を単離することができた。このクローンの塩基配列を決定したところ、代謝型グルタミン酸レセプター 1 (m G l u R 1) をコードしていることが明らかになった。c D N A クローン # 6 - 2 E 1 0 を導入し、m G l u R 1 タンパク質を発現する C O S 細胞をモノクローナル抗体 1 o t 1 と 2 種類の抗 m G l u R 1 抗体で免疫染色した。モノクローナル抗体 1 o t 1 (図 1 0 A) と重本博士供与の抗 m G l u R 1 抗体 (図 1 0 B) では免疫染色が認められたが、市販の抗 m G l u R 1 抗体では免疫染色が認められなかった。また、細胞内ドメインを欠失させた m G l u R 1 変異タンパク質を発現する C O S 細胞をモノクローナル抗体 1 o t 1 と 2 種類の抗 m G

40

50

l u R 1 抗体で免疫染色した。モノクローナル抗体 l o t 1 (図 1 0 C) と重本博士供与の抗 m G l u R 1 抗体 (図 1 0 D) では免疫染色が認められたが、市販の抗 m G l u R 1 抗体では免疫染色が認められなかった。これらの結果から、モノクローナル抗体 l o t 1 は m G l u R 1 の細胞外ドメインに結合することが示された。また、市販の抗 m G l u R 1 抗体は m G l u R 1 の細胞内ドメインの一部を認識すると考えられた。さらに、この m G l u R 1 が本当にモノクローナル抗体の抗原分子であるのかを確かめるために、m G l u R I 遺伝子欠損マウス (C e l l 7 9 , 3 6 5 - 3 7 5 , 1 9 9 4 、 N a t u r e 3 7 2 , 2 3 7 - 2 4 3 , 1 9 9 4) を入手して、モノクローナル抗体 l o t 1 で免疫染色した。その結果、ホモ欠損マウス胚の脳において染色性が完全に欠失していることが示された。その結果、ホモ欠損マウス胚の脳において、染色性が完全に欠失していることが示された。 10

【 0 0 4 9 】

実施例 3 [モノクローナル抗体 9 - 4 c が認識する抗原分子の同定]

(モノクローナル抗体 9 - 4 c の作製)

マウス胎児における嗅覚皮質の発生を調べるために、新規モノクローナル抗体 9 - 4 c を作製した。実施例 1 と同様にして、マウスの嗅覚皮質で免疫したラットのリンパ球とマウスのミエローマ細胞との融合によりハイブリドーマクローンを産生した。およそ 5 0 0 0 個のハイブリドーマから、胚日齢が 1 4 . 5 日のマウス終脳の冠状切片における免疫組織化学スクリーニング法により選択し、モノクローナル抗体 9 - 4 c を作製した。

【 0 0 5 0 】

(モノクローナル抗体 9 - 4 c により認識される抗原の同定)

モノクローナル抗体 9 - 4 c により認識された抗原を同定するため、C O S - 7 細胞で c D N A ライブラリーを発現し、モノクローナル抗体 9 - 4 c と免疫反応する抗原を産生するクローンを選択した。胚日齢 1 4 . 5 日のマウス胚の背軸嗅球から得たポリアデニル化 R N A を、c D N A ライブラリー構築キット (S t r a t a g e n e 社製) を用いて c D N A に逆転写した。真核細胞中に蛋白質を効率的に発現可能とし、且つコンピテント細胞に形質転換するプラスミドベクター p C A G G S 中に、前記 c D N A を挿入することにより、約 1 0 0 クローンのプラスミドのプールを調製し、トランスフェクション試薬 (F u G e n e 6 ; R o c h e 社製) を用いて C O S - 7 細胞中にトランスフェクションした。続けて 2 日間、P B S 中の 4 % の P F A を用いて固定し、モノクローナル抗体 9 - 4 c を用いて免疫染色した。免疫応答細胞は、蛍光顕微鏡を用いてスクリーニングした (A x i o p l a n 2 ; C a r l Z e i s s 社製) 。スクリーニングで得た約 2 0 0 0 0 個のプールから、強い免疫陽性細胞を産出するプールを同定した。かかるプールをさらに小さなプールに分け、単一ポジティブ c D N A クローンが得られるまでアッセイを繰り返した。単離した c D N A クローン # 4 - 8 E 9 をサブクローンし、D N A シーケンサー (C E Q 2 0 0 0 ; B e c k m a n 社製) を用いて配列を決定し、モノクローナル抗体 9 - 4 c により認識される抗原が R t n 1 であることを同定した。このマウス R t n 1 - A のヌクレオチド配列をデータベースに登録した。 30

【 0 0 5 1 】

神経内分泌特異的タンパク質 (N S P) としてよく知られている R t n 1 は、膜貫通型 E R タンパク質である (図 2 A) 。 R t n 1 の機能は未だ明らかにされていないが、R t n 1 は神経及び神経内分泌において発現すること (W i e c z o r e k a n d H u g h e s , 1 9 9 1 、 v a n d e V e l d e , 1 9 9 4 b) や、3 つの異なったスプライシングアイソフォーム、R t n 1 - A 、 R t n 1 - B 及び R t n 1 - C が存在することも知られている (R o e b r o e k , 1 9 9 6) 。かかる 3 つのアイソフォームは、共通した C - 末端ドメインと変異した N 末端配列とを有している。R t n 1 - A は、最も長いアイソフォームであって、R t n 1 - B の 3 6 0 アミノ酸を全て含む 7 6 0 アミノ酸から構成されている。また、R t n 1 - C は、共通した C - 末端ドメインに加えてアミノ酸の伸長が短い N 末端を含んでいる。単離された c D N A クローン # 4 - 8 E 9 は、開始メチオニンを含む R t n 1 - B の全てのアミノ酸配列を含んでいるが、R t n 1 - B に対 40 50

する 5' 非翻訳領域のヌクレオチド配列を欠損していた (図 2 A)。このことから、かかるクローンは、R t n 1 - A 又は R t n 1 - B の m R N A のどちらかを発現することができるが、R t n 1 - B は癌細胞のみにおいて発現し、正常組織においては発現しないことが既に報告されている (R o e b r o e k , 1993) ことから、R t n 1 A の m R N A に由来すると考えられる。いずれにしても、クローン # 4 - 8 E 9 が C O S - 7 細胞において発現する際、R t n - 1 B タンパク質が産生されるのではないかと考えられる。

【0052】

R t n 1 に共通する C - 末端ドメインは、疎水性アミノ酸を親水性部分で分けた 2 つの伸長を含んでいる (図 2 A)。このことから、かかるドメインは、E R において保持したシグナルとして機能することが示唆される。実際、クローン # 4 - 8 E 9 を C O S - 7 細胞で発現させると、モノクローナル抗体 9 - 4 c は、かかる細胞においてレース様のネットワーク伸長、すなわち、E R の典型的な分布を標識していた (図 2 B)。共通する C - 末端ドメインを切除しても、なお、モノクローナル抗体 9 - 4 c はトランケート体を認識していたが、その分布は細胞質間で散布し (図 2 C)、モノクローナル抗体 9 - 4 c は、R t n 1 A 及び B に結合していたが、R t n 1 C には結合していなかった。また、モノクローナル抗体 9 - 4 c は、終脳その他、L G E 及び M G E の脳室帯や視索前部及び隔膜に対して免疫反応することや、脳室領域である V P と反応する。

【0053】

【発明の効果】

本発明によると、モノクローナル抗体が認識する抗原を効率よく短時間で同定することができ、組織的・網羅的なモノクローナル抗体の作製と応用に役立つばかりでなく、抗原の決定できた抗体については、その抗原の機能や性質によってはさまざまな応用、例えば、疾患の診断マーカー、再生医療、疾患治療などへの応用が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】モノクローナル抗体 N G 1 による中枢嗅覚系の免疫染色の様子を示す図である。(A、B) : 終脳の側面 (A) 及び冠状面 (B) の概略図。(A) の左部分が吻側であり、(B) の左部分が側面である。(A) (B) 共にその上部が背面となっている。嗅球 (O B) 軸索が、終脳内部の尾側に伸長し、終脳表面で外側嗅索 (L O T) を形成している。

(C) : モノクローナル抗体 N G 1 で染色した E 1 4 . 5 の終脳の冠状切片。L O T (矢印) が強く染色されている点に注意。嗅覚皮質 (矢頭) 及び皮質板も、かかるモノクローナル抗体で染色されている。

(D) : 高拡大率での L O T。軸索は均一に染色されておらず、強く標識された部位が斑点となっている。

(E) : 前記モノクローナル抗体で染色した、大量の繊維をもつ E 1 4 . 5 の嗅球。

(F) : モノクローナル抗体 N G 1 による、E 1 3 . 5 の終脳の全量免疫染色。他の終脳部位と同様に、L O T (矢印) を形成している嗅球軸索でも染色が認められる。

(G) : モノクローナル抗体 N G 1 で染色した P 0 の終脳。L O T (矢印) は、やはり他の部位よりも強く染色されている。

スケールバーは 50 μ m (A - D 及び F)、500 μ m (E) を表す。

【図 2】モノクローナル抗体 N G 1 による、神経系他部位の免疫染色の様子を示す図である。

(A) : モノクローナル抗体 N G 1 で染色した E 1 4 . 5 の前脳の冠状切片。内包 (矢印) 及び髄条 (矢頭) において軸索が強く染色されている点に注意。

(B) : E 1 4 . 5 の前脳の後部水平部位 (p o s t e r i o r l e v e l) 上の切片。分界条 (矢印) 中の軸索の束が強く標識されている。

(C) : E 1 4 . 5 の嗅上皮から伸長している嗅覚神経 (矢頭) の強い染色。

(D) : E 1 4 . 5 の眼球の、強く標識された視神経 (矢印)。眼筋 (矢頭) も前記モノクローナル抗体によって染色されている。

(E) : P 7 の前交連 (矢印) は、やはり前記モノクローナル抗体によって強く染色され

ている。

(F) : P7の脳梁(矢印)は、周辺部位よりもやや強いレベルで染色されている。

スケールバーは50 μ mを表す。

【図3】モノクローナル抗体NG1による、培養した嗅球ニューロンの免疫染色の様子を示す図である。

E14.5の嗅球ニューロンを解離し(dissociate)、5日間培養した。神経突起の成長円錐(矢印)が、モノクローナル抗体NG1によって強く標識されている。スケールバーは50 μ mを表す。

【図4】モノクローナル抗体NG1によるNogo-A蛋白質の認識の様子を示す図である。

(A) : Nogoの3つのアイソフォームの蛋白質構造。Nogo-Aには、Nogo-Bのアミノ酸配列がすべて含まれている。Nogo-Cは、N-末端(縞のボックス)上に、独特の配列を有している。3種類のアイソフォームすべてに共通するC-末端領域におけるグレーのボックスは、ER中で膜貫通ドメインとして機能する疎水性アミノ酸配列を示している。単離したcDNAクローンである#4-1D9の構造が、かかる3つのNogoアイソフォームの下に示されている。翻訳は、左側の点線部分、すなわちNogo-Aのほぼ中央にあたる位置で始まるとされている。底部にあるcDNA構造物の#4-1D9 Δ Cにおいては、共通するC-末端ドメインは、右側の点線部分で欠失し、Nogo-A特異的な316のアミノ酸からなるランケット蛋白質が後に残っている。

(B) : #4-1D9クローンを用いてトランスフェクションし、モノクローナル抗体NG1で免疫染色を行ったCOS細胞。ERの特徴であるレース様の網状組織が染色されている。

(C) : #4-1D9 Δ Cを用いてトランスフェクションし、モノクローナル抗体NG1で免疫染色を行ったCOS細胞。細胞質が広く染色されている。

スケールバーは50 μ mを表す。

【図5】モノクローナル抗体NG1による成体神経系の免疫染色の様子を示す図である。

(A、B) : 脳梁近辺の成体終脳の切片。モノクローナル抗体NG1は、終脳全体に散在する細胞体を染色している。切片(B)は、(A)の拡大率を高くしたものである。

(C、D) : 抗GST抗体で染色して希突起膠細胞を視覚化した(A、B)の同一の図。同じ細胞(矢頭)が、(B)及び(D)において標識されている。

(E) : モノクローナル抗体NG1で染色した成体の脊髓切片。白質中の希突起膠細胞及びその突起部が強く染色されていることに注意。灰白質中でいくつかのニューロンが染色されているのは、二次抗体の非特異的結合によるものである。

スケールバーは50 μ mを表す。

【図6】嗅球軸索と道標細胞の様子を示す図である。

(A) : 胎生12日目頃のマウス終脳の外側図。左が吻側、上が背側を示す。嗅球の軸索(緑)は、道標細胞(赤)がつくる帯の上を伸長する。

(B) : 胎生12.5日目の終脳。嗅球から最初に伸び出す軸索を、緑の色素で標識した(矢印)。道標細胞はモノクローナル抗体1ot1で赤く染色されている。

スケールバーは100 μ mを表す。

【図7】培養下における道標細胞の発生の様子を示す図である。

(A) : 道標細胞が分裂をしている胎生10.5日目の終脳新皮質から細胞を解離して、チミジン類似体のBrdU存在下で5日間培養した。モノクローナル抗体1ot1で染色される道標細胞が分化している(赤)。そのうち半数以上の細胞は、BrdU(緑)を核に取り込んでおり、培養下で分裂したことがわかる(矢頭)。

(B) : 培養下で道標細胞を生み出す終脳領域。数字は、その領域を培養したときにモノクローナル抗体1ot1陽性の道標細胞が分化した確率(%)を示す。赤字が終脳新皮質領域、黒字が線状体原基領域。赤の斜線は予想される将来の嗅球軸索経路の位置を示す。

【図8】道標細胞が終脳新皮質から腹側方向に移動の様子を示す図である。

(A) : 胎生10.5日目胚の終脳新皮質の神経幹細胞を、蛍光色素で標識し(星印)、

10

20

30

40

50

その胚を2日間全胚培養した。色素標識された細胞が、腹側方向に移動し（矢印）、逆T字を描いて将来の軸索経路に配列している（矢頭）。

（B）：終脳新皮質から移動し、軸索領域に並んだ標識細胞（矢頭）。長い突起を将来の軸索経路の方向に伸長している。

（C）：（B）の標本をモノクローナル抗体10t1で免疫染色した写真。標識細胞は道標細胞と入り交じって、細胞の帯を形成している。

スケールバーは、（A）500 μm 、（B）（C）100 μm を表す。

【図9】野生型およびXt突然変異マウスにおける道標細胞の誕生と移動の様子を示す図である。

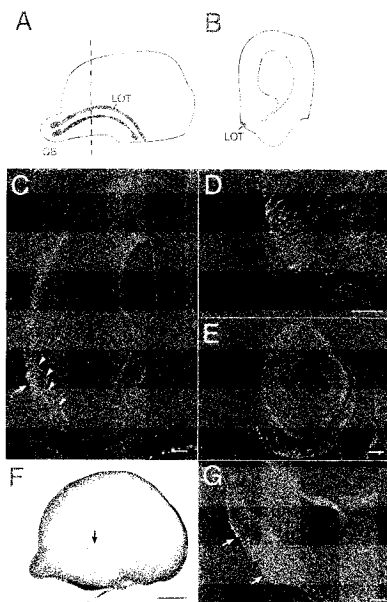
【図10】モノクローナル抗体10t1がmGluR1を認識する様子を示す図である。 10

（A）（B）：cDNAクローン#6-2E10を導入したCOS細胞。モノクローナル抗体10t1（A）と抗mGluR1抗体（B）による二重免疫染色像。

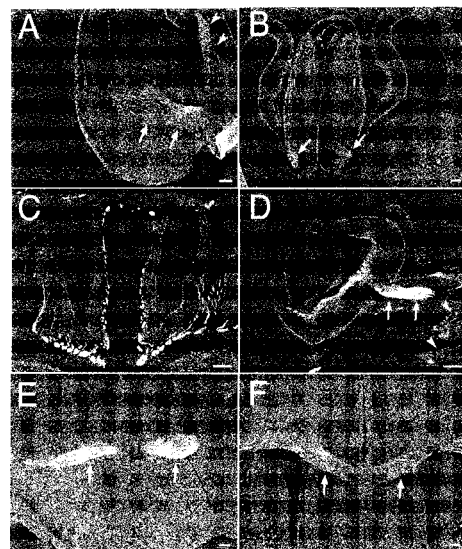
（C）（D）：細胞内ドメインを欠失させたmGluR1変異タンパク質を発現するCOS細胞。モノクローナル抗体10t1（C）も抗mGluR1抗体（D）もよく似た染色を示す。

【図11】発現ベクターpCAGGSを示す図である。

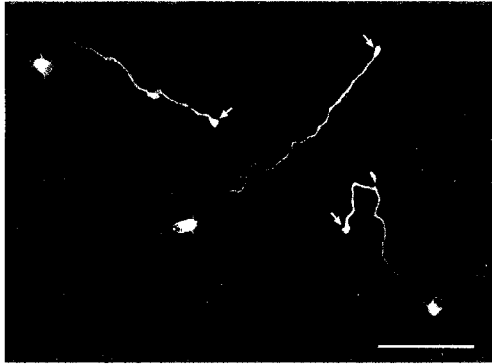
【図1】



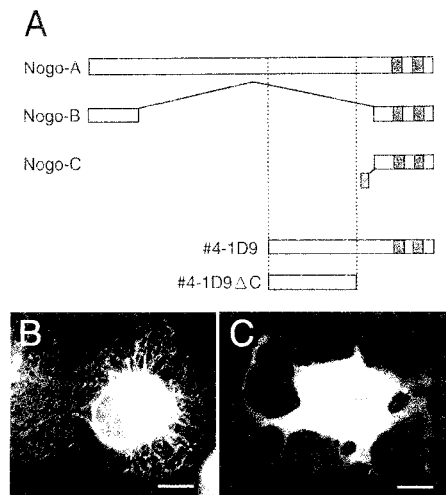
【図2】



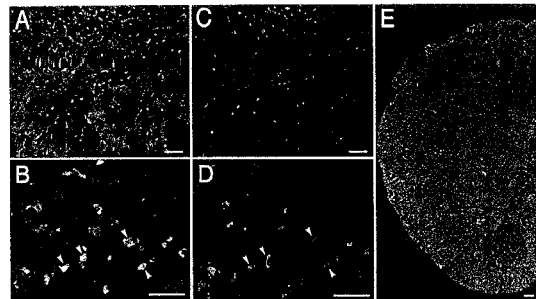
【 図 3 】



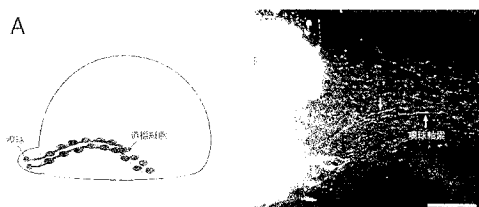
【 図 4 】



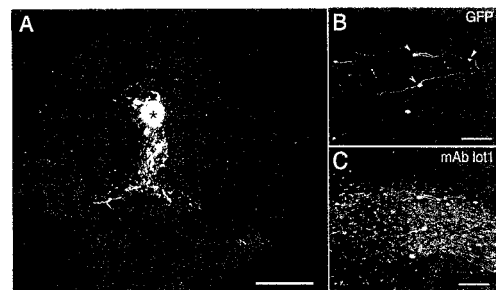
【 図 5 】



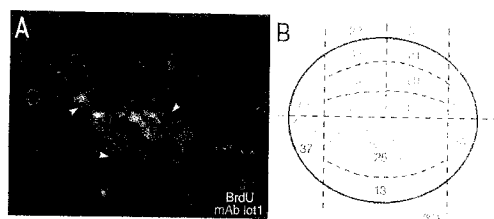
【 図 6 】



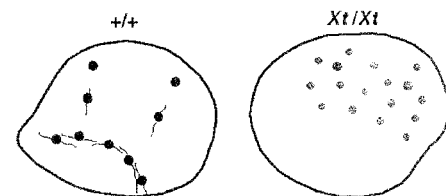
【 図 8 】



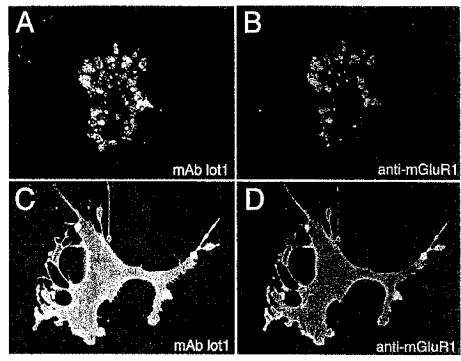
【 図 7 】



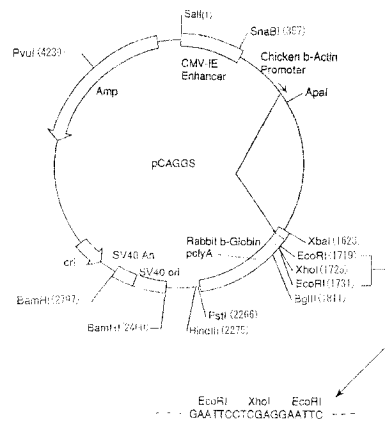
【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



 フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z N A Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 15/00	C
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	Z

F ターム(参考) 4B064 AG01 AG27 AG31 CA10 CA19 CA20 CC24 DA13
 4C085 AA14 GG01 GG08
 4H045 AA11 CA40 DA76 EA50 FA72

专利名称(译)	使用哺乳动物细胞cDNA表达文库的抗原分子鉴定方法		
公开(公告)号	JP2004121211A	公开(公告)日	2004-04-22
申请号	JP2003039856	申请日	2003-02-18
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人 科学技术振兴机构		
[标]发明人	平田 たつみ		
发明人	平田 たつみ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/395 A61P25/08 A61P25/18 A61P25/28 C07K16/18 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	C12N15/00.A A61K39/395.N A61P25/08 A61P25/18 A61P25/28 C07K16/18 G01N33/15.Z G01N33/50.ZNA.Z G01N33/53.D G01N33/566 C12N15/00.C C12P21/08 C12Q1/68.Z G01N33/50.ZZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB11 2G045/JA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA43 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA15 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ43 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4C085/AA14 4C085/GG01 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
优先权	2002186974 2002-06-26 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种能够在短时间内有效识别被单克隆抗体识别的抗原的方法。 解决方案：通过将全长cDNA整合到哺乳动物培养细胞的表达载体中来制备全长cDNA，并将全长cDNA文库导入哺乳动物细胞并进行培养，然后在哺乳动物培养细胞中培养cDNA编码的蛋白质。通过对培养的哺乳动物细胞进行免疫染色来鉴定抗原基因cDNA，所述哺乳动物细胞以上述三维结构表达蛋白质，并以测试的单克隆抗体以上述三维结构表达蛋白质。

				特開2004-042211A (P2004-042211A)
				(43) 公開日 平成16年4月22日
(51) Int. Cl. ⁷	FI			テーマコード
C12N 15/00	C12N 15/00	A		2G045
A61K 39/395	A61K 39/395	N		4B024
A61P 25/08	A61P 25/08			4B063
A61P 25/18	A61P 25/18			4B064
A61P 25/28	A61P 25/28			4C085
審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 23 頁) :				
(21) 出願番号	特願2003-39856 (P2003-39856)	(71) 出願人	503360115	
(22) 出願日	平成15年2月18日 (2003. 2. 18)		独立行政法人 科学技術振興機構	
(31) 優先権主張番号	特願2002-186974 (P2002-186974)		埼玉県川口市本町4丁目1番6	
(32) 優先日	平成14年6月26日 (2002. 6. 26)	(74) 代理人	100107984	
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 廣田 雅紀	
特許法第30条第1項適用申請有り		(72) 発明者	平田 たつみ	
			静岡県三島市谷田150遺伝研	
			4	
		Fターム(参考)	2G045 AA40 BA11 BB50 I	
			FB11 JA01	
			4B024 AA11 BA31 BA43 I	
			DA02 EA04 GA03 I	
			4B063 QA13 QA18 QQ08 I	
			no 40 no 77 no 90 I	