

(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2018-138520

(P2018-138520A)

(43) 公開日 平成30年9月6日(2018.9.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/24 (2006.01)	CO7K 16/24	4B064
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	D 4H045
GO1N 33/574 (2006.01)	GO1N 33/574	A
GO1N 33/577 (2006.01)	GO1N 33/577	B
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-32996 (P2017-32996)
 (22) 出願日 平成29年2月24日 (2017.2.24)

(71) 出願人 504190548
 国立大学法人埼玉大学
 埼玉県さいたま市桜区下大久保255
 (71) 出願人 597011784
 株式会社イムノ・プローブ
 埼玉県比企郡嵐山町大字鎌形1331-3
 (74) 代理人 110002332
 特許業務法人綾船国際特許事務所
 (72) 発明者 松岡 浩司
 埼玉県さいたま市桜区下大久保255 国立大学法人埼玉大学 大学院 理工学研究科内

最終頁に続く

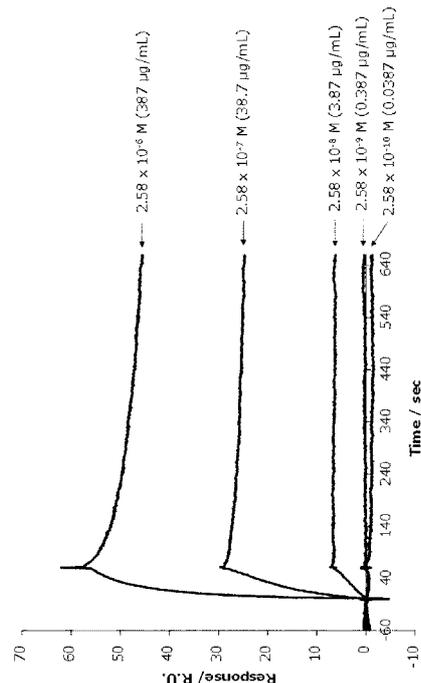
(54) 【発明の名称】 抗ミッドカインモノクローナル抗体及びそれを用いた免疫学的測定キット

(57) 【要約】

【課題】 ヒト由来ミッドカインに対して特異的に結合する癌診断用モノクローナル抗体、及びそれを使用した癌診断測定キットを提供することを目的とする。

【解決手段】 前立腺癌、悪性リンパ腫、肝臓癌、食道癌、十二指腸癌、結腸癌、胆管癌、胆嚢癌、膵臓癌、甲状腺癌、肺癌及び乳癌等で発現増大しているヒト由来ミッドカインに対して、高い親和性で特異的に結合することで、信頼性の高い結果を得ることができる抗ミッドカインモノクローナル抗体、及びそれを用いた免疫学的測定法による癌診断キットを提供する。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ゲル電気泳動における完全長抗体の分子量が250kDa以上である、ヒト由来ミッドカインに特異的に結合する癌診断用モノクローナル抗体。

【請求項 2】

前記ヒト由来ミッドカインとの解離定数 (Kd) は、 $0.5 \times 10^{-7}M \sim 1.5 \times 10^{-7}M$ であることを特徴とする、請求項 1 に記載の癌診断用モノクローナル抗体。

【請求項 3】

前記ヒト由来ミッドカインとの解離定数 (Kd) は、 $1.0 \times 10^{-9}M \sim 5.0 \times 10^{-9}M$ であることを特徴とする、請求項 1 に記載の癌診断用モノクローナル抗体。

10

【請求項 4】

前記癌が、前立腺癌、悪性リンパ腫、肝臓癌、食道癌、十二指腸癌、結腸癌、胆管癌、胆嚢癌、膵臓癌、甲状腺癌、肺癌及び乳癌からなる群から選ばれるいずれかであることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の癌診断用モノクローナル抗体。

【請求項 5】

前記癌が、前立腺癌又は悪性リンパ腫であることを特徴とする、請求項 4 に記載の癌診断用モノクローナル抗体。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 に記載の癌診断用モノクローナル抗体を用いた、癌診断キット。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトミッドカインに対するモノクローナル抗体及び当該抗体を用いた免疫学的測定キットに関する。

【背景技術】

【0002】

ミッドカイン (midkine: 以下、「MK」という) は、塩基性アミノ酸とシステインに富む分子量約13kDaのヘパリン結合性成長因子で、胚性癌細胞のレチノイン酸による分化誘導の過程で一過性に発現する遺伝子の産物として発見された。MKのアミノ酸配列と50%の相同性を示すプレイオトロフィンは、ヘパリン結合性のファミリータンパク質と考えられている。

30

【0003】

MKは、細胞の増殖・分化に関係し、細胞保護及び成長作用、マクロファージや好中球等の炎症性細胞の遊走促進、アポトーシスの抑制などの作用を有する。また、癌細胞の生存及び遊走、並びに血管新生を促し、癌の進展に参与している。

【0004】

MKは、様々な生物学的機能を有していることが知られている。例えば癌に関しては、胃癌、食道癌、甲状腺癌、膵臓癌、肝臓癌、膀胱癌、肺癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、神経芽腫、神経膠芽腫などの多くの腫瘍において、癌の種類によらず70%以上でMKの発現増大が認められている (非特許文献1~4)。

40

【0005】

また、MKは、マクロファージや好中球等の炎症性細胞の遊走を促進させる機能を有すること、破骨細胞の分化を引き起こすこと、及びMKを欠損させたノックアウトマウスにおいて、手術後の癒着が軽減されること等も知られている。このように、MKは自己免疫疾患、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、変形性関節症、手術後の癒着、炎症性大腸炎、乾癬、狼瘡、喘息、好中球機能異常等の炎症性疾患に参与することが知られている (特許文献1)。

【0006】

MKは発癌において重要な役割を果たしていると考えられており、MK遺伝子をプローブとしたノーザンブロットによる癌の診断法 (特許文献1: 以下、「従来技術1」という

50

)、および抗MKタンパク質抗体を含む癌の診断薬(特許文献2:以下、「従来技術2」という)が開示されている。

【0007】

また、様々なタイプの癌において、早い段階で血中や尿中のMK値が健常者の基準値と比較して上昇していることが知られており、MKを早期癌のマーカーとして使用する技術が開示されている(特許文献3:以下、「従来技術3」という)。

【0008】

MKを測定する免疫学的測定方法として、1-ステップサンドイッチ法が知られている(特許文献4)。この方法では、固相化抗体(以下、「1次抗体」ということがある)及び標識抗体(以下、「2次抗体」ということがある)共に異なる動物由来のポリクローナル抗体が使用されている(以下、「従来技術4」という)。

一方、海外の試薬メーカーから、1次抗体にモノクローナル抗体、及び標識抗体にポリクローナル抗体を使用した、ヒトMK用ELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)キットが市販されている。例えば、Boster Biological Technology社から、1次抗体にマウス由来のモノクローナル抗体、及び標識抗体にヤギ由来のポリクローナル抗体を使用した、ヒトMK用ELISAキット「Human Midkine PicoKine」が販売されている(以下、「従来技術5」という)。

【0009】

ヒトMK遺伝子は既にクローニングされている(非特許文献5)。また、MK遺伝子をノックアウトしたマウスについては、129/Sv系マウスのエクソン2の一部とエクソン3の一部を破壊したノックアウトマウスが既に作製されている(非特許文献6)。

【0010】

また、抗ヒトMKの遺伝子及びアミノ酸配列は既に知られており、様々な方法によって抗ヒトMK抗体を作製することができる(非特許文献7)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】WO2010/074218

【特許文献2】特開平6-172218

【特許文献3】特開2010-139293

【特許文献4】特開平10-160735

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Tsutsui, J. et al. Cancer Res. 53. 1281-1285, 1993

【非特許文献2】Garver, R. I. et al. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 9. 463-466, 1993

【非特許文献3】Aridome, K. et al. Jap. J. Cancer Res. 86. 655-661, 1995

【非特許文献4】O'Brien, T. et al. Cancer Res. 56, 2515-2518, 1996

【0013】

【非特許文献5】Uehara, K. et al.: J. Biochem., 111: 563-567, 1992

【非特許文献6】Nakamura, E. et al.: Genes to Cells, 3: 811-822, 1998

【非特許文献7】Tsutsui, J., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 176, 792-797, 1991

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

従来技術1は、MK遺伝子をプローブとしてノーザンブロットを行うことで、生体組織の癌化状態にあるか否かを診断することができる点では優れた発明である。しかし、組織がRNAを抽出して電気泳動用サンプルを調製する際に手間と時間を要し、簡便で迅速な結果を得るには課題が残っていた。

10

20

30

40

50

【0015】

従来技術2は、MK抗原を動物に免疫して抗体を作製した後、アフィニティー精製することにより、精製された抗MK抗体を調製し、得られた抗体を用いて癌の診断薬及び治療薬を提供する点では優れた発明である。しかし、抗体の性能評価がin vitroの実験に留まり、ヒトにおける癌の診断効果は開示されていないため、診断精度に課題が残っていた。

【0016】

従来技術3は、MKを早期の胃癌、肝細胞癌及び肺癌等を検出するマーカーとして使用している点で優れた発明である。しかし、使用しているMK抗体のアミノ酸配列が全く開示されていないため、一定の品質を有する腫瘍マーカーを得ることができるかという点で課題が残っていた。

10

【0017】

従来技術4は、1次抗体にポリクローナル抗体を使用しているため、高いアビディティを有するが、免疫原に混在する検出対象外の生体分子との交差反応が生じる問題がある。また、従来技術5は、1次抗体にモノクローナル抗体を使用していることから、抗原の一部の特定のエピトープ部位を認識する点で特異的に認識できるという点で優れた発明である。しかし、同時に他のエピトープとも反応し、健常者で発現しているMKも検出してしまうため、感度と信頼性について課題が残っていた。

【0018】

以上から、感度と信頼性が高く特定の配列を有する抗MK抗体、及びそれを使用した迅速で簡便な分析キットに関する強い社会的要請があった。

20

【課題を解決するための手段】

【0019】

このような状況に鑑み、本発明の発明者等は、癌患者における血清中のMKを検出する抗体の研究を行い、所定のアミノ酸配列及び所定の分子量を有する抗MKモノクローナル抗体が、ヒト由来のMKと感度よく及び特異的に結合することを見出し、本発明を完成させた。

【0020】

すなわち、本発明のある態様は、ゲル電気泳動における完全長抗体の分子量が250kDa以上である、ヒト由来MKに特異的に結合する癌診断用モノクローナル抗体である。また、前記ヒト由来MKとの解離定数(Kd)が、 $0.5 \times 10^{-7}M \sim 1.5 \times 10^{-7}M$ 又は $1.0 \times 10^{-9}M \sim 5.0 \times 10^{-9}M$ であることが、標的となるヒト由来MKと特異的に結合する点で好ましい。また、前記癌が、前立腺癌、悪性リンパ腫、肝臓癌、食道癌、十二指腸癌、結腸癌、胆管癌、胆嚢癌、膵臓癌、甲状腺癌、肺癌及び乳癌からなる群から選ばれるいずれかであることが、これらの癌においてMKが認められているため、本願のモノクローナル抗体が特異的に結合できる点で好ましく、前立腺癌又は悪性リンパ腫であることがMKを高感度に検出できる点で特に好ましい。

30

【0021】

本発明の別の態様は、上述した癌診断用モノクローナル抗体を用いた、癌診断キットである。

【発明の効果】

40

【0022】

本発明によれば、前立腺癌、悪性リンパ腫、肝臓癌、食道癌、十二指腸癌、結腸癌、胆管癌、胆嚢癌、膵臓癌、甲状腺癌、肺癌及び乳癌等で発現が増大しているMKに対して、本発明の抗ヒトMKモノクローナル抗体が感度よく特異的に結合することができるため、信頼性の高い癌診断を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は、抗ヒトMKモノクローナル抗体の、SDS-PAGE電気泳動写真である。

【図2】図2は、抗ヒトMKモノクローナル抗体#12の表面プラズモン共鳴法による分子間相互作用を測定した結果を示したグラフである。

50

【図3】図3は、抗ヒトMKモノクローナル抗体#13の表面プラズモン共鳴法による分子間相互作用を測定した結果を示したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0024】

以下に、本発明を詳細に説明する。

モノクローナル抗体は、(1)抗原の調製、(2)抗原による動物の免疫、(3)細胞融合、(4)モノクローナル抗体のスクリーニング、及び(5)抗体産生細胞の増殖の工程に従って作製される。本願の抗ヒトMKモノクローナル抗体もこの工程によって作製される。

【0025】

(1)抗原の調製

感作抗原として使用される抗ヒトMK抗体は、以下のように調製することができる。

【0026】

MKをコードする遺伝子は、公知の方法によって得ることができる。例えば所定の培養株細胞、例えばウィルムス腫瘍由来の培養株細胞より得られたヒトMK mRNAを調製し、EcoRI等の所定の制限酵素で消化される配列を含むフォワードプライマー及びリバースプライマーを用いて、mRNAを鋳型としてPCRを行い、得られたPCR産物を精製した後逆転写を行って、ヒトMKcDNAを得ることができる。

【0027】

このようにして得られたヒトMKcDNAと、例えば宿主細胞に用いることができる発現ベクターを、所定の制限酵素で消化した後、市販のライゲーションキット等を用いて組換え発現ベクターを作製する。

これを、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法等を用いて大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等の適当な宿主細胞を形質転換させる。宿主細胞としては、例えばピキア酵母を使用することができる。発現ベクターにpHIL301を使用することができる。

【0028】

その後、所定の選択培地で培養し、目的のMK遺伝子を有するクローンを得る。得られたクローンを、所定の培地で培養し、細胞中又は培養上清中を採取して、例えばウサギ抗マウスMKポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析を行い、当該クローンのMK分泌の有無を確認する。得られたクローンを培養して得られたMKを、公知の方法、例えばイオン交換クロマトグラフィー等を用いて精製し、感作抗原として使用する抗ヒトMK抗体を得ることができる。

【0029】

化学合成によっても調製したMKタンパク質を感作抗原として使用することもできる。例えば、MKのC末端のアミノ酸をポリスチレン担体に固定化し、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基又はtert-ブトキシカルボニル基で保護されたアミノ酸を、ジイソプロピルカルボジイミド等の縮合剤を用いて結合させることで、所望の配列を有するMKを得ることができる。

【0030】

また、PSSM-S((株)島津製作所製)、ABI433Aペプチドシンセサイザー(アプライドバイオシステム社製)及びACT396Apex(アドバンストケムテック社製)等の、ペプチドシンセサイザーを用いて、MKを合成することもできる。

【0031】

(2)抗原による動物の免疫

免疫される動物としては、特に限定されないが、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ニワトリ、アヒル等のハイブリドーマを作製することが可能な動物が好ましく、一般的には、マウス、ラット、ハムスター等の齧歯類が好ましい。抗体産生能の観点から、C57BL6等のMK欠損のノックアウトマウス等が特に好ましい。

【0032】

10

20

30

40

50

感作抗原としてのM Kの動物への投与は、例えば、腹腔内注射、皮下注射、静脈内注射、皮内注射等の一般的な公知の方法によって行うことができる。投与時の抗原量は動物のサイズによるが、抗体を産生できる量であれば特に限定は無い。例えば、PBSや生理食塩水等で希釈した感作抗原を、例えばFCA (Freund's complete adjuvant) 等のアジュバントを加えて乳化した混合液を、1回0.1~1000 µg程度を、適当な間隔をあけて投与する。例えば1~5週間に1回の割合で、合計2~5回程度行う。最後の免疫から1~2週間後に、免疫した動物の眼窩又は尾静脈から採血を行い、その血清を使用して抗体価を測定する。

【 0 0 3 3 】

抗体価の測定は、酵素免疫測定法 (ELISA法)、蛍光抗体法、放射免疫測定法 (RIA法) 等により行うことができる。

例えば、ELISA法で抗体価を測定する場合、PBS (pH7.2~7.4) 等を用いて、M Kの抗原溶液を0.5~1.5 µg/mlに調製する。これを40~60 µl/ウェルとなるようにプレートに分注し、3~5 で一晩静置してM Kを固相化させる。0.04%~0.06% Tween PBSで数回洗浄した後、市販のブロッキング剤、例えばブロックエース (大日本製薬 (株) 製) 等の3~5倍希釈液を、90~110 µl/ウェルとなるように加え、37 で数時間静置してブロッキング処理を行う。その後、0.04%~0.06% Tween PBSで数回洗浄した後、培養上清原液を40~60 µl/ウェルとなるように加え、37 で30分~1時間半静置する。

【 0 0 3 4 】

再度、0.04%~0.06% Tween PBSで数回洗浄した後、ブロッキング剤、例えばブロックエース等で8~12倍に希釈した標識抗体、例えばヤギ抗マウスIgG+IgM HRP標識抗体を2次抗体として、40~60 µl/ウェルとなるように加え、37 で30分~1時間半静置する。0.04%~0.06% Tween PBSで数回洗浄した後、HRP基質液を40 µl~60 µl/ウェルとなるように加え、室温で遮光した状態で15~30分静置する。その後、1Nの硫酸を加えて反応を停止させ、492nmの波長で測定する。

【 0 0 3 5 】

こうして、血清中の所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後、免疫した動物から抗体産生細胞が取り出され、細胞融合に使用される。

【 0 0 3 6 】

(3) 細胞融合

細胞融合は、上記方法により十分な抗体価を示した免疫感作動物から得られた抗体産生細胞とミエローマ細胞を用いて行う。抗体産生細胞は、免疫感作動物の脾臓、膵臓、リンパ節及び末梢血から採取することができる。

【 0 0 3 7 】

マウスの脾臓を用いる場合、取り出した脾臓を、RPMI1640 S.P培地を用いて複数回洗浄する。洗浄後、脾臓をガラス棒ですり潰し、遠沈管に脾臓細胞を集める。集めた脾臓細胞は、1,000~1,400rpmで約10分間遠心分離する。上清を除いた後、RPMI1640 S.P培地を加えて、再度1,000~1,400rpmで約10分間遠心分離する。上清を除いた後、30~50mlのRPMI1640 S.P培地を加えて、血球計算盤で細胞数を計測しておく。

【 0 0 3 8 】

ミエローマ細胞は、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ又はヒト等の哺乳動物由来の細胞であって、in vitroで増殖可能な細胞であり、公知の細胞株を使用することができる。例えば、マウス骨髄腫由来P3X63Ag8.653 (ECACC85011420)、マウス骨髄腫由来P3X63Ag8U.1 (P3U1) (JCRB9085)、マウス骨髄腫由来NS-1 (JCRB9107)、マウス骨髄腫由来MPC-11 (NCACC91031103)、マウス骨髄腫由来SP2/0 (ECACC85072401) 等を入手して使用することができる。

【 0 0 3 9 】

例えば、マウス骨髄腫由来のミエローマ細胞 (P3U1) を使用する場合、これを50mlの遠沈管に集め、800~1200rpmで3~7分間遠心分離する。上清を除いた後、RPMI1640 S.P培地を30~50ml加え、再度800~1200rpmで3~7分間遠心分離する。上清を除いた後、RPMI1640 S.P培地を30~50ml加え、血球計算盤で細胞数を計測しておく。

10

20

30

40

50

【0040】

上記抗体産生細胞及びミエローム細胞は、PBS等で洗浄後、センダイウィルス及びポリエチレングリコール（PEG）等の細胞融合促進剤の存在下、栄養培養液中で融合させることができる。融合効率を高めたい場合、ジメチルスルフォキシド等の補助剤を任意に添加する。抗体産生細胞とミエローム細胞の比率は、例えば、抗体産生細胞とミエローム細胞の割合を10対1～1対1とする。細胞融合に用いる培養液は、RPMI1640培養液及びMEM培養液等のミエローム細胞の培養に用いられる通常の培養液が使用でき、ウシ胎児血清（FCS）等の血清を併用することもできる。

【0041】

所定量の抗体産生細胞とミエローム細胞を上記培養液中でよく混合し、平均分子量1000～6000程度のPEG溶液を、10～80%（w/v）の濃度で添加して混合し、約20～40℃で約1～10分間インキュベートすることにより、効率よくハイブリドーマが形成される。その後、上記培養液を加え、遠心分離を行い上清を除去する操作を繰り返し、細胞融合剤等を除去する。

【0042】

例えば、脾臓細胞とミエローム細胞の細胞融合を行う場合、予め血球計算盤で計測した細胞数に基づいて、所定の割合になるように遠沈管に脾臓細胞とミエローム細胞を入れてよく混合する。その後、1,000rpmで約10分間遠心分離し、上清を除く。その後数mlのPEG溶液を数分かけて混合しながら添加する。添加後そのまま数分間混合した後、予めウォーターバスで37℃に温めておいたRPMI1640 S.P培地数mlを、数分間かけて混合しながらゆっくり添加する。これを3～5回繰り返した後、7℃に温めておいたRPMI1640 S.P培地5～15ml、3～5分かけて混合しながらゆっくり添加する。37℃、5%CO₂インキュベーターで3～7分間加温した後、800～1,200rpmで3～7分間遠心分離し、その後上清を除去してハイブリドーマを得る。

【0043】

(4) 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングは、マイクロプレート等の固相に免疫原として使用した抗原を直接又は担体とともに吸着させ、ハイブリドーマの培養上清を添加し、酵素等で標識した抗体又はプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法等が使用できる。

【0044】

例えばHAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地）等を添加した動物細胞培地でハイブリドーマを培養することにより、選択的に増殖させることができる。上記培地としては、RPMI1640培地、GIT培地（和光純薬工業（株）製）又はSFM-101培地（日本水産（株）製）等を用いることができる。培養は、目的のハイブリドーマ以外の非融合細胞が死滅するのに必要な時間行う。通常20～40℃で、数日～数週間行う。培養後、ELISA等により、培養上清中から抗原に結合し非抗原に結合しないサンプルを選択する。その後、限界希釈法により、目的とする抗体を産生するハイブリドーマを選択する。

【0045】

例えば、HAT培地を含むRPMI1640 S.P培地を入れた96ウェルプレートにハイブリドーマを播種し、37℃、5%CO₂インキュベーター内で1～2週間培養する。その後ELISA法で抗体産生能をスクリーニングする。その後、例えば、吸光度の高いウェル中の細胞をクローニング用サンプルとして選び、3列に5個/ウェル及び1個/ウェル、並びに2列に0.5個/ウェルとなるように、フィーダー細胞と共にハイブリドーマを播種する。

【0046】

クローニング後3～7日後に、コロニーが1であるウェルを確認し、数日毎に培地を交換する。その後、コロニーが4分の1～2分の1を占めるようになったところで、例えばELISA法により、陽性反応を示すウェルを選択する。こうして、得られたハイブリドーマを樹立株とすることができる。

【0047】

10

20

30

40

50

(5) 抗MKモノクローナル抗体のスクリーニング

作製したハイブリドーマからは、*in vitro*で培養し、培養上清を精製することで抗MKモノクローナル抗体を得ることができる。また、ハイブリドーマと適合性がある同系動物又は免疫不全動物にハイブリドーマを移植し、腹水化させ、採取した腹水を精製することで得ることもできる。

【0048】

抗MKモノクローナル抗体の精製は、通常のポリクローナル抗体と同様に、例えば、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体による脱吸着法、塩析法、アルコール沈殿法、超遠心法、ゲルろ過法により行うことができる。また、抗原結合固相、プロテインA又はプロテインG等の吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る方法により行うこともできる。

【0049】

例えば、プロテインAカラムやプロテインGカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより行い、IgG画分を回収することで得ることができる。プロテインAカラムに用いる担体には、HyperD(ポールコーポレーション社製)、POROS(サーモフィッシュァーサイエンティフィック社製)及びSepharose Fast Flow(GEヘルスケア・ジャパン(株)製)が使用される。

【0050】

抗体の抗原に対する親和性は、ELISA法、放射免疫測定法(Radioimmunoassay;RIA)、酵素免疫測定法(Enzyme ImmunoAssay;EIA)、蛍光免疫測定法(Fluorescence Immuno Assay;FIA)、ELISPOT法(Enzyme-Linked Immuno-Spot)、表面プラズモン共鳴法(Surface plasmon resonance;SPR)、水晶振動子法(Quartz Crystal Microbalance;QCM)等の、公知の方法によって確認することができる。表面プラズモン共鳴法を応用したBiacoaシステムによる測定が、少ないサンプルで迅速に測定できる点から好ましい。

【0051】

本発明の抗MKモノクローナル抗体を用いた癌診断用キットは、ヒトMKを検出する試薬を含み、必要に応じて、発色試薬、反応停止試薬、洗浄試薬、基質試薬、蛍光試薬、標準抗原試薬、前処理試薬、ブロッキング試薬等が含まれる。検出試薬の形状は特に限定されず、固体状、ゲル状又は液状であってよく、膜、フィルム又は樹脂等に固定されていてもよい。例えば、抗ヒトMKモノクローナル抗体が96ウェル等のプレートに固定されていてもよい。

【0052】

本願キットとしては、抗MKモノクローナル抗体固定化プレート、ビオチン標識抗MKポリクローナル抗体、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ混合溶液、TMB試薬、標準MK試薬、洗浄バッファーを備えるキット等が挙げられる。

【実施例】

【0053】

(実施例1) マウス抗ヒトMKモノクローナル抗体の調製

(1) MK遺伝子ノックアウトマウス

8-10週齢の野生型及びMK欠損のC57BL6マウスは名古屋大学村松教授より提供された。

【0054】

(2) 抗原の作製

ウィルムス腫瘍由来の培養株細胞G-401よりヒトMK mRNAを調製した(非特許文献8)。制限酵素EcoRIに消化される配列を含むように設計した、フォワードプライマー(配列番号1)、及びリバースプライマー(配列番号2)を用いて、上記ヒトMK mRNAを鋳型としてPCRを行った。PCRのプログラムは、93 37 72 を1サイクルとして、30サイクル行った。その後、得られたPCR産物を精製した後逆転写を行い、MKコーディング領域の両端にEcoRI配列部位を有するヒトMKcDNAを調製した。

【0055】

10

20

30

40

50

[配列番号 1]

フォワードプライマー：5'-GCGGAATTCATGCAGCACCGAGGCTTCCTC-3'

[配列番号 2]

リバースプライマー：5'-GCGGAATTCCTAGTCCTTTCCCTTCCCTTT-3'

【 0 0 5 6 】

ピキア・パトリスGS115 (NRRL Y - 15851:以下、「GS115」という)用発現ベクター-pHIL 301と上記ヒトMKcDNAを、制限酵素EcoRIで消化した後、ライゲーションキット(宝酒造(株)製)を用いて結合し、組換え発現ベクターを作製した。

【 0 0 5 7 】

作製した上記組換え発現ベクターを、エレクトロポレーション法を用いて、GS115へ導入した。その後、ヒスチジンを含まないG418含有培地で培養し、目的のMK遺伝子を有する複数のクローンを得た。得られたクローンを、メタノールで誘導しながら培養を行った。培養上清を採取し、ウサギ抗マウスMKポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析を行い、当該クローンのMK分泌の有無を確認した。

【 0 0 5 8 】

MKを分泌するクローンの一つを培養し、培養上清からMKの分泌産物を回収し、イオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンカラムを使用したアフィニティークロマトグラフィーによる精製を行い、高純度のMKを得た。

【 0 0 5 9 】

(3) 動物の免疫

得られた抗原をMKノックアウトマウスに免疫した。MK 10 µgを生理食塩水で0.1mlに希釈したものをマウス一匹当たりの抗原溶液とし、これにFCA 0.1mlを加え乳化させた混合溶液をマウスの背中に皮下投与した。2週間毎に8回免疫操作を行った。8回目の免疫は、抗原溶液10 µgを生理食塩水0.1mlに溶解した溶液を、マウス尾静脈に注射した。

【 0 0 6 0 】

6日目の4回免疫後及び8日目の6回免疫後に、マウスの眼底から採取した血清を用いて、血中抗体価を、ELISA法により以下の方法で測定した。

まず、抗原溶液をPBS (pH7.2~7.4)を用いて1.0 µg/mlに調製した。これを、50 µl/ウェルとなるよう96ウェルプレート(Falcon社製)に分注して、4℃で一晩静置して抗原を固相化させた。0.05% Tween PBSで3回洗浄後、ブロックエース(大日本製薬(株)製)の4倍希釈液を100 µl/ウェルとなるよう加え、37℃で2時間静置してブロッキング処理を行った。0.05% Tween PBSで3回洗浄後、培養上清原液を50 µl/ウェルとなるよう加え、37℃で1時間静置した。

【 0 0 6 1 】

0.05% Tween PBSで3回洗浄後、ブロックエースで10倍希釈したヤギ抗マウスIgG + IgM HRP標識(BIOSOUSE社製)を2次抗体として50 µl/ウェルとなるよう加え、37℃で1時間静置した。0.05% Tween PBSで3回洗浄後、HRP基質(25ml HRP基質液(10.206 mg/ml クエン酸一水和物、36.82 mg/ml滅菌水 リン酸水素二ナトリウム12水)を50 µl/ウェルとなるよう加え、室温で遮光した状態で20分静置した。

【 0 0 6 2 】

その後、1N 硫酸を50 µl/ウェルとなるよう加えて反応を停止させ、492nmの波長で測定した。8日目の6回免疫後のサンプルで十分に抗体価があったので、追加で2回免疫した3日後に細胞融合を行った。

【 0 0 6 3 】

(4) 細胞融合

マウスから脾臓を取り出し、予めシャーレ5枚に分注しておいた200mlのRPMI1640 S.P培地を用いて各1回ずつ計5回洗浄した。洗浄後、脾臓をメッシュに乗せて、ハサミで数回切り込みを入れ、ガラス棒ですり潰し、RPMI1640 S.P培地でメッシュを洗って、40mlのガラス製遠沈管に脾臓細胞を集めた。集めた脾臓細胞を1,200rpmで10分間遠心し、上清を吸引ピペットで除いた後、RPMI1640 S.P培地を40ml加え、1,200rpmで10分間遠心分離した。上

10

20

30

40

50

清を除き、得られた脾臓細胞にRPMI1640 S.P培地を40ml加えてよく攪拌した後、血球計算盤で細胞数を計測した。

【0064】

ミエローマ細胞(P3U1)を50mlの遠沈管に集め、1,000rpmで5分間遠心分離した。上清を吸引ピペットで除き、RPMI1640 S.P培地を40ml加え、再度、1,000rpmで5分間遠心分離した。上清を除き、得られたミエローマ細胞にRPMI1640 S.P培地を40ml加えてよく攪拌した後、血球計算盤で細胞数を計測した。

【0065】

上記計測結果から、脾臓細胞とミエローマ細胞の割合が5対1となるように、脾臓細胞が入っていた50mlの遠沈管にミエローマ細胞を加えた。混合した後、1,200rpmで10分間遠心分離し、上清を吸引ピペットで除いてタッピングした。タッピング後、1mlのPEGを、1分間かけて混合しながらゆっくり添加し、そのまま2分間混合した。その後、予めウォーターバスで37℃に温めておいたRPMI1640 S.P培地1mlを、1分間かけて混合しながらゆっくり添加した。これを3回繰り返した。その後、37℃に温めておいたRPMI1640 S.P培地10mlを、3分間かけて混合しながらゆっくり添加した。37℃、5%CO₂インキュベーターで5分間加温した後、1,000rpmで5分間遠心分離し、上清を吸引ピペットで取り除いて、ハイブリドーマを得た

10

【0066】

(5) 抗M K陽性抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

15%FCS HAT培地を含むPMI1640 S.P培地を96ウェルプレートに入れ、上記で得られたハイブリドーマを播種した。37℃、5%CO₂インキュベーターで7日~14日培養し、コロニーの成長具合を見てELISA法で抗体産生能をスクリーニングした。

20

【0067】

細胞融合から10日後に行ったELISA法でのスクリーニングから、吸光度の高いウェル中のハイブリドーマをクローニング用サンプルとした。96ウェルプレートのうち、3列に5個/ウェル及び1個/ウェル、並びに2列に0.5個/ウェルとなるように、ハイブリドーマを播種した。各ウェルには、 1×10^6 個/ウェルとなるようにフィーダー細胞を播種した。

【0068】

クローニング後5日目にコロニーカウントを行い、コロニーが1個であるウェルを確認し、2~3日毎に培地を交換した。その後、コロニーがウェルの3分の1を占めてきたところで、ELISA法を用いてコロニー1個で陽性反応を示すウェルを選択した。こうして、2つのウェルから、ELISA法で陽性反応を示し、かつ細胞の状態が良好なハイブリドーマを得た。得られた2つのハイブリドーマを樹立株とした。これらを、ヌードマウスを用いた腹水化法により、2種類抗ヒトM Kモノクローナル抗体作製し、得られた抗体をプロテインGカラムで精製した。

30

【0069】

(実施例2) SDS-PAGE電気泳動による解析

上記で調製した2種類の抗ヒトM Kモノクローナル抗体のサンプル名を#12及び#13として、SDS-PAGE電気泳動を行った。

【0070】

先ず、上記2種類の抗体(1mg/ml)1μlをそれぞれ分取し、それぞれに水4μlを加えて計5μlとした。ここに等量の10% 2-メルカプトエタノールを含む又は含まない2 x SDSサンプルバッファー(125mM Tris-HCl(pH 6.8)、4% SDS、10% グリセロール、0.004% プロモフェノールブルー)を加えた後、95℃で約10分加熱して、#12及び#13の変性・還元又は変性・非還元条件の抗体サンプル溶液を調製した。

40

【0071】

続いて、サンプル溶液を濃縮ゲル(4% アクリルアミド、125mM Tris-HCl(pH 6.8)、0.1% SDS)を用いて、10mAの定電圧下で濃縮した。次いで、分離ゲル(12% アクリルアミド、375mM Tris-HCl(pH 8.8)、0.1% SDS)を用いて、20mAの定電圧下で抗体を分離した。電気泳動後のポリアクリルアミドゲル上のタンパク質を、CBB溶液(0.25% クマシーブ

50

リリアントブルー-R250、5% メタノール、7.5% 酢酸)で染色した。その後、脱色液(25% メタノール、7.5% 酢酸)を用いてバックグラウンドを脱色した。

【0072】

電気泳動の結果を図1に示した。抗体を2-メルカプトエタノールで還元した場合には、#12及び#13のいずれの抗体においても、約50kDaの重鎖(H鎖)及び約25kDa程度の軽鎖(L鎖)が確認された(図1;各レーン(i)及び(ii))。

また、還元していない抗体の場合では、#12及び#13のいずれの抗体においても、250kDa以上の完全長抗体のバンドが確認できた(図1;各レーン(iii)及び(iv))。抗体のY字型構造により、完全長抗体の推定分子量約150kDaに比べると大きな分子量を示していた。

10

【0073】

(実施例3)表面プラズモン共鳴法による分子間相互作用解析

(1)ヒトMKのSensor Chip上への固相化

リガンド分子であるヒトMK(ATgen社製)を、BIAcore control software(GEヘルスケア社製)のワークフローに従い、以下のようにしてBIAcore Sensor Chip CM5(GEヘルスケア社製)に固相化した。まず、10mM 水酸化ナトリウム溶液でBIAcore Sensor Chipの金表面を洗浄した後、等量の0.4 M EDC(エチル(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)と0.1M NHS(N-ヒドロキシスクシンイミド)を混合して、カルボン酸をNHSエステル活性化させた。

【0074】

続いて、ランニング緩衝液(HBS-EP、10 mM HEPES-NaOH [pH 7.4], 150 mM塩化ナトリウム, 0.05% Tween20)を、0.4 µg/mlに希釈したヒトMKを注入ターゲットレベルである50RUに達するまで加えた。その後、1M エタノールアミン-HCl (pH8.5)を用いて、未反応の活性化エステルをブロックした。これにより、42RUのヒトMKが固相化されたBIAcore Sensor Chip CM5を作製した。

20

【0075】

(2)ヒトMKモノクローナル抗体の分子間相互作用解析

上記ランニング緩衝液を用いて、アナライト分子である抗ヒトMKモノクローナル抗体の#12及び#13の以下の希釈系列サンプルを調製した。

【0076】

#12: 2.58×10^{-6} M (387 µg/ml)、 2.58×10^{-7} M (38.7 µg/ml)、 2.58×10^{-8} M (3.87 µg/ml)、 2.58×10^{-9} M (0.387 µg/ml)、 2.58×10^{-10} M (0.0387 µg/ml)

30

【0077】

#13: 800×10^{-9} M (120 µg/ml)、 400×10^{-9} M (60 µg/ml)、 200×10^{-9} M (30 µg/ml)、 100×10^{-9} M (15 µg/ml)、 50×10^{-9} M (7.5 µg/ml)、 25×10^{-9} M (3.75 µg/ml)、 12.5×10^{-9} M (1.875 µg/ml)

【0078】

上記Sensor Chipと希釈サンプルを用いて、BIAcore control softwareのワークフローに従って、マルチサイクルカイネティックス法によりヒトMKと抗MKモノクローナル抗体の分子間相互作用を測定した。測定はBIAcore X100(GEヘルスケア社製)を用いて、以下の条件で行った。

40

【0079】

Flow Rate: 30 µl/分

Contact time: 60秒

Dissociation time: 600秒

再生条件: 10 mM Glycine HCl (pH 1.5) を30秒注入

【0080】

#12及び#13の測定結果をそれぞれ図2及び図3に示した。得られた数値から、BIAcore Evaluation softwareによる速度論解析を行い、結合速度定数(k_a)、解離速度定数(k_d)及び解離定数($K_d=k_d/k_a$)を算出し、以下の表1に示した。

50

【 0 0 8 1 】

【 表 1 】

	結合速度定数 (1/M・s)	解離速度定数 (1/s)	解離定数 (M)
#12	4.664×10^5	1.353×10^{-3}	2.901×10^{-9}
#13	8.967×10^4	7.641×10^{-3}	0.852×10^{-7}

【 0 0 8 2 】

以上の結果から、本発明の抗ヒトMKモノクローナル抗体は、精度の良いキットに使用することができる。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 8 3 】

本願発明は、医薬分野、特に診断薬の分野において有用である。

【 配列表フリーテキスト 】

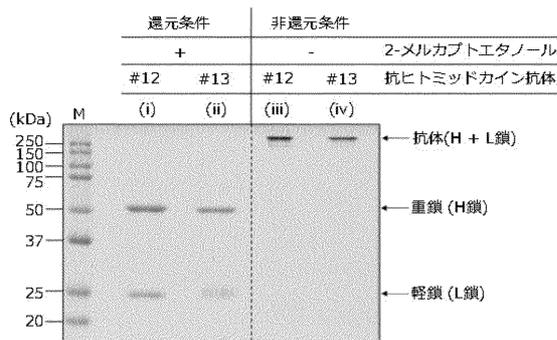
【 0 0 8 4 】

配列番号 1 : PCR用フォワードプライマー

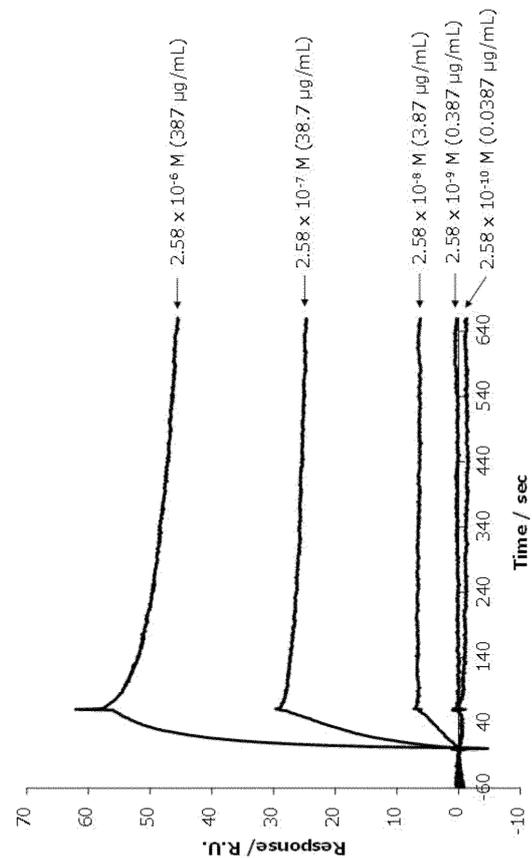
配列番号 2 : PCR用リバースプライマー

10

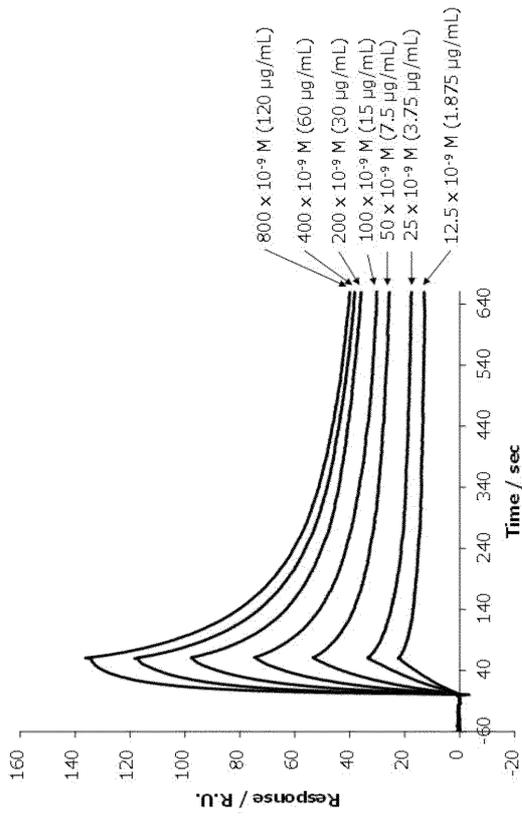
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 配列表 】

2018138520000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(72)発明者 松下 隆彦
 埼玉県さいたま市桜区下大久保 2 5 5 国立大学法人埼玉大学 大学院 理工学研究科内

(72)発明者 幡野 健
 埼玉県さいたま市桜区下大久保 2 5 5 国立大学法人埼玉大学 大学院 理工学研究科内

(72)発明者 根本 直人
 埼玉県さいたま市桜区下大久保 2 5 5 国立大学法人埼玉大学 大学院 理工学研究科内

(72)発明者 新井 秀直
 埼玉県さいたま市桜区下大久保 2 5 5 国立大学法人埼玉大学 大学院 理工学研究科内

(72)発明者 野村 博
 埼玉県比企郡嵐山町大字鎌型 1 3 3 1 - 3 株式会社イムノ・プローブ内

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC15 CC24 CE12 DA13
 4H045 AA11 DA76 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	抗毒蕈碱单克隆抗体和使用其的免疫测定试剂盒		
公开(公告)号	JP2018138520A	公开(公告)日	2018-09-06
申请号	JP2017032996	申请日	2017-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人埼玉大学 免疫探头		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人埼玉大学		
[标]发明人	松岡浩司 松下隆彦 幡野健 根本直人 新井秀直 野村博		
发明人	松岡 浩司 松下 隆彦 幡野 健 根本 直人 新井 秀直 野村 博		
IPC分类号	C07K16/24 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/577 C12P21/08 C12N15/09		
FI分类号	C07K16/24 G01N33/53.D G01N33/574.A G01N33/577.B C12P21/08 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC15 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：使用单克隆抗体提供特异性结合人源midkine的癌症诊断单克隆抗体和癌症诊断检测试剂盒。与前列腺癌，恶性淋巴瘤，肝癌，食道癌，十二指肠癌，结肠癌，胆管癌，胆囊癌，胰腺癌，甲状腺癌，肺癌中的表达增加的人源性中期因子相反，提供了一种抗中期因子单克隆抗体，其能够通过特异性结合高亲和力获得高度可靠的结果，并且通过使用其的免疫学测定获得癌症诊断试剂盒。 .The

