

(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2003 - 180345

(P2003 - 180345A)

(43)公開日 平成15年7月2日(2003.7.2)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/02	ZNA	C 0 7 K 16/28	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/28		G 0 1 N 33/53	S 4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		33/577	B 4 B 0 6 5
G 0 1 N 33/53		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
33/577		C 1 2 N 15/00	ZNA C
審査請求 未請求 請求項の数 21 O L (全 16数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 387864(P2001 - 387864)

(22)出願日 平成13年12月20日(2001.12.20)

(71)出願人 000005968
三菱化学株式会社
東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(72)発明者 伊神 恒
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地
三菱化学株式会社内
(72)発明者 長池 一博
茨城県稲敷郡阿見町中央8 - 5 - 1 三菱化学
メディカル株式会社内
(74)代理人 100089244
弁理士 遠山 勉 (外 2 名)

最終頁に続く

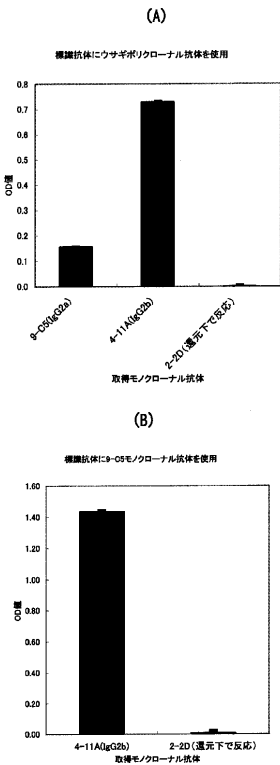
(54)【発明の名称】 遊離型肝細胞増殖因子受容体の測定方法

(57)【要約】

【課題】 血液等の体液中の肝細胞増殖因子受容体（遊離型HGFR）を認識する抗体、及び同抗体を用いて遊離型HGFRを検出、測定する方法を提供する。

【解決手段】 可溶性肝細胞増殖因子受容体を認識する抗体であって、下記性質を有する抗体の1種又は複数種を用いて、臓器炎症、癌、肝疾患、心筋梗塞、狭心症、または血栓症疾患等の疑いのある患者から採取された生体成分中の遊離型HGFRを免疫学的方法により測定することにより、前記疾患を検出する。

(a) 体液中で観察される可溶性肝細胞増殖因子受容体（遊離型肝細胞増殖因子受容体）を認識し、(b) 還元条件下で変性した可溶性肝細胞増殖因子受容体を認識しない。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 可溶性肝細胞増殖因子受容体を認識する抗体であって、下記性質を有する抗体；

(a) 体液中で観察される可溶性肝細胞増殖因子受容体（遊離型肝細胞増殖因子受容体）を認識し、(b) 還元条件下で変性した可溶性肝細胞増殖因子受容体を認識しない。

【請求項 2】 モノクローナル抗体である請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】 肝細胞増殖因子受容体の細胞外ドメインからなるポリペプチドを認識し、同ポリペプチドに対する解離定数が、 1×10^{-8} M 以下である請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

【請求項 4】 肝細胞増殖因子と肝細胞増殖因子受容体との複合体を認識する請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 5】 受託番号 FERM P - 18582、又は FERM P - 18583 であるハイブリドーマにより産生される請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 6】 請求項 2 ～ 5 に記載の抗体を生産するハイブリドーマ細胞系。

【請求項 7】 請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の抗体の 1 種又は複数種を用いて、遊離型肝細胞増殖因子受容体を免疫学的方法により測定することを特徴とする、遊離型肝細胞増殖因子受容体の測定方法。

【請求項 8】 遊離型肝細胞増殖因子受容体を測定する検体が、疾患の疑いのある被検者または被検動物から採取された生体成分である請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 前記疾患が、臓器炎症、癌、肝疾患、炎症性腸疾患、血液疾患、心筋梗塞、狭心症、または血栓症である請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】 前記生体成分が血液又はその分画物もしくは処理物である請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 11】 前記生体成分が血漿もしくは血清である請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】 前記生体成分が尿である請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 13】 疾患の疑いのある被検者から採取された生体成分中の遊離型肝細胞増殖因子受容体を検出または測定することを特徴とする疾患の検出方法。

【請求項 14】 前記疾患が、臓器炎症、癌、肝疾患、炎症性腸疾患、血液疾患、心筋梗塞、狭心症、または血栓症である請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】 前記生体成分が血液又はその分画物もしくは処理物である請求項 13 又は 14 に記載の方法。

【請求項 16】 前記生体成分が血漿もしくは血清である請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】 前記生体成分が尿である請求項 13 又は 14 に記載の方法。

【請求項 18】 請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の

抗体の 1 種又は複数種を含み、遊離型肝細胞増殖因子受容体を検出または測定するためのキット。

【請求項 19】 遊離型肝細胞増殖因子受容体上の異なるエピトープを認識する少なくとも 2 種のモノクローナル抗体を含む請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】 臓器炎症、癌、肝疾患、炎症性腸疾患、血液疾患、心筋梗塞、狭心症、または血栓症の診断に用いられる請求項 18 又は 19 に記載のキット。

【請求項 21】 疾患の疑いのある患者から採取された生体成分中の遊離型肝細胞増殖因子受容体を測定することを特徴とする請求項 18 ～ 20 のいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、体液中で観察される可溶性肝細胞増殖因子受容体（遊離型肝細胞増殖因子受容体）を認識する抗体、同抗体を用いて遊離型肝細胞増殖因子受容体を検出又は測定する方法及びキットに関する。さらに、遊離型肝細胞増殖因子受容体を指標にした疾患状態の患者、特に癌、肝疾患、炎症性腸疾患、心筋梗塞等の臓器障害の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor；以下「HGF」と略す）は、もともと肝細胞において、細胞分裂を誘導促進する物質（マイトジェン）として同定された物質であるが（Michalopoulosら，Cancer Res.，44: 4414-4419 (1984)）、現在では、メラニン細胞、内皮細胞、上皮細胞などの細胞に対しても、増殖因子としての機能を持つことが知られる（J. S. Rubinら，Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.，88: 415 (1991)）。

【0003】一方、肝細胞増殖因子受容体（Hepatocyte Growth Factor Receptor；以下「HGFR」と略する）は、HGFの高アフィニティー受容体である。HGFRはもと、トランスフォーミング活性を指標にして、発ガン性化学物質で処理したヒト骨肉腫細胞から単離した原癌遺伝子c-Metの産物として同定された（CooperらNature，311: 29-33 (1984)）。このHGFRは、通常c-Metまたはp190^{Met}として表されている。天然型のHGFRは、50kDaのαサブユニットと145kDaのβサブユニットからなる190kDaのヘテロ二量体であり、βサブユニットは細胞内領域にチロシンキナーゼドメインを有している（Parkら，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.，84: 6379-6383(1987)）。一方、in vitroにおいては、そのC末端部分が切除された形態のものが数種見つかった（Pratら，Mol. Cell. Biol.，11: 5954-5962 (1991)）。そのうちの一種は、ヒト胃癌細胞株GTL-16の細胞培養上清中から検出されたものであり、分子量130kDの可溶性タンパク質（以下「p130MET」と略する）であることが分かっている。本明細書においては、このような可溶性のHGFRを

「可溶性HGFR」と呼ぶ。

【0004】しかし、上記の細胞培養上清中から検出されたHGFRは、可溶性のHGFRであっても、あくまでin vitroで検出されたものであり、in vivoにおける、即ち、ヒトの血液等の体液中に存在している可溶性HGFRについての報告は未だなされていない。本発明においては、このようなin vivoで検出される可溶性のHGFRを「遊離型HGFR」と呼ぶこととする。

【0005】HGFおよびHGFRに関しては、様々な疾患との関係が示唆されている。HGFは、肝機能不全の患者の血漿内でその濃度が上昇することが知られる（Gohdaら、J. Clin. Invest., 81: 414-419 (1988)）。また、HGFは、NBT-II膀胱ガン腫細胞の運動性と侵入性を促進するとの報告もある（Bellusciら、Oncogene, 9: 1091-1099 (1994)）。

【0006】一方、HGFR (c-Met) は、その細胞表面上での過剰発現が、胃、腸を含む消化器癌（Ponzettoら、Oncogene, 6: 553-559 (1991)）、甲状腺癌（Renzoら、Oncogene, 7: 2549-2553 (1992)）、膵癌（Renzoら、Cancer res., 55: 1129-1138(1995)）、肝癌（Uekiら、Hepatology, 25, 3: 619-623 (1997)）等の癌細胞株、又は患者組織において観測されており、癌の進展と関連する可能性が示唆されている。そのため、HGFRを上記疾患の治療・診断に応用すべく、以下に示すようにHGFRを認識する抗体を作製する試みがなされてきた。

【0007】(i) Pratらは、HGFR細胞外ドメインに特異的ないくつかのモノクローナル抗体を記述している。それらは、HGFRを大量発現している完全に生育したGTL-16を用いてBalb/cマウスを免疫した後、ハイブリドーマをスクリーニングして得られたものである。その中から選択されたDL-21、DN-30、DN-31、D0-24の4種のモノクローナル抗体は、完全長HGFRおよびp140METと呼ばれる切除型のHGFRを認識する。この内、D0-24抗体はGTL-16およびA549細胞株において培養上清中に存在する可溶性HGFR (p130MET) を認識する。また、D0-24及びDL-21抗体は、還元条件下のSDS-PAGEにより泳動されたHGFRをWestern-blotで認識する（Mol. Cell. Biol., 11: 5954-5962 (1991)）。またPratらは、D0-24抗体を使用して、ヒト正常組織と癌組織におけるHGFRの局在を検出している（Int. J. Cancer, 49: 323-328(1991)）。

【0008】(ii) 特表平11-506327号は、HGFRに特異的に結合することができるHGF受容体拮抗剤としてのモノクローナル抗体5D5.11.6について記述している。この抗体は、HAD-MB-435ヒト胸部癌腫細胞に対するHGFのマイトジェン反応を阻害する。また、ヒト乳房上皮細胞（Clonetics Corp., No. CC-2551）に対するHGF作用剤効果を示す1A3.3.13についても記述している。これらの抗体は、HGFR-IgG融合タンパク質（ヒトIgG1H鎖に融合したHGFRの細胞外ドメインを含んでいる）を免疫抗原とし、Balb/cマウスを免疫した後ハイブリドーマをスクリ

ーニングし得られたものである。またこれら2種の抗体は、HGFR-IgG融合蛋白質と組み換えヒトHGFとの結合を阻害することが、ELISA阻害アッセイにより示されている。

【0009】尚、特表平11-506327号に記載のモノクローナル抗体は、HGFのHGFRに対する結合を阻害すると考えられており、HGFとHGFRの複合体を認識しないと推定される。

【0010】(iii) 特許第2598362号は、HGFRの細胞質ドメインを特異的に認識するモノクローナル抗体等を記述している。また、それらの抗体を、肝炎、癌などの特定の患者から採取した生物学的サンプルからHGFRを検出することにも利用しうると記載されている。

【0011】上記のように、細胞外ドメイン又は細胞質ドメインを認識するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体はいくつか報告されている。また、特表平11-506327号には、HGFRとして可溶性HGFRをも意図していることが示されている。しかし、HGFRを認識する抗体を使用して、免疫測定方法により、実際に遊離型HGFRを検出した例はこれまで報告されていない。

【0012】この理由としては、既存の抗体は細胞表面上のHGFRは認識できるが血液や尿などの生体成分中に存在しているような遊離型HGFRを認識できないか、既存の抗体はその認識する部位がある部分に偏っているため、2種以上の抗体の組み合わせからなるサンドイッチ高感度測定系には適さず、生体成分中の遊離型HGFRを検出できない、等が考えられる。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】遊離型HGFRの生体成分（例えば、血液、尿）中の濃度と病態との関連についてはまだ明らかにはされていないが、遊離型以外のHGFRに関する知見から、遊離型HGFRは腫瘍および臓器障害等において、その血中動態が疾患の状態を表す指標になる可能性があると考え、生体成分中の遊離型HGFR濃度と特定の疾患との関係を明らかにすることを企図した。そのため、遊離型HGFRを定量的に測定できる方法が必要となる。そこで、本発明は、遊離型HGFRを認識する抗体を作製し、それを用いた遊離型HGFR高感度測定技術を確立することを課題とする。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、遊離型HGFRを認識する高親和性抗体を取得し、そのなかから互いに他の認識部位を競合しない抗体の組み合わせを選別し、遊離型HGFRの高感度測定系に供し得る抗体を得た。この高感度測定系において使用されるモノクローナル抗体の好適な例は、「9-C5」、「4-11A」である。

【0015】次に本発明者らは、ヒト病態における遊離型HGFRの血中濃度と各種ヒト疾患との関連を解析するため、上記モノクローナル抗体9-C5、4-11Aの2種を用い

た酵素標識抗体測定系 (enzyme-linked immunosorbent assay ; 以下「ELISA測定系」と略す) を構築し、健常人や臓器疾患をはじめとする種々の疾患患者の血液 (血漿または血清) に対して、遊離型HGFR濃度の測定を行った。その結果、本発明の遊離型HGFR特異的高感度測定方法およびそのキットを使用することにより、遊離型HGFRの健常人の血中濃度域をはじめて明らかにし、肝炎をはじめとする臓器障害の患者や癌患者、血栓症患者の血液中に存在する遊離型HGFR量が健常人と比較して多いことをはじめて見出した。

【0016】本発明は上記の知見からなされたものであり、その要旨は以下のとおりである。

(1) 可溶性肝細胞増殖因子受容体を認識する抗体であって、下記性質を有する抗体 ;

(a) 体液中で観察される可溶性肝細胞増殖因子受容体 (遊離型肝細胞増殖因子受容体) を認識し、(b) 還元条件下で変性した可溶性肝細胞増殖因子受容体を認識しない。

(2) モノクローナル抗体である(1)に記載の抗体。

(3) 肝細胞増殖因子受容体の細胞外ドメインからなるポリペプチドを認識し、同ポリペプチドに対する解離定数が、 1×10^{-8} M以下である(1)又は(2)に記載の抗体。

(4) 肝細胞増殖因子と肝細胞増殖因子受容体との複合体を認識する(1)~(3)のいずれかに記載の抗体。

(5) 受託番号FERM P - 18582、又はFERM P - 18583であるハイブリドーマにより産生される(2)に記載の抗体。

(6) (2)~(5)に記載の抗体を生産するハイブリドーマ細胞系。

(7) (1)~(5)のいずれかに記載の抗体の1種又は複数種を用いて、遊離型肝細胞増殖因子受容体を免疫学的方法により測定することと特徴とする、遊離型肝細胞増殖因子受容体の測定方法。

(8) 遊離型肝細胞増殖因子受容体を測定する検体が、疾患の疑いのある被検者または被検動物から採取された生体成分である(7)に記載の方法。

(9) 前記疾患が、臓器炎症、癌、肝疾患、炎症性腸疾患、血液疾患、心筋梗塞、狭心症、または血栓症である(8)に記載の方法。

(10) 前記生体成分が血液又はその分画物もしくは処理物である(8)又は(9)に記載の方法。

(11) 前記生体成分が血漿もしくは血清である(10)に記載の方法。

(12) 前記生体成分が尿である(8)又は(9)に記載の方法。

(13) 疾患の疑いのある被検者から採取された生体成分中の遊離型肝細胞増殖因子受容体を検出または測定することと特徴とする疾患の検出方法。

(14) 前記疾患が、臓器炎症、癌、肝疾患、炎症性腸

疾患、血液疾患、心筋梗塞、狭心症、または血栓症である(13)に記載の方法。

(15) 前記生体成分が血液又はその分画物もしくは処理物である(13)又は(14)に記載の方法。

(16) 前記生体成分が血漿もしくは血清である(15)に記載の方法。

(17) 前記生体成分が尿である(13)又は(14)に記載の方法。

(18) (1)~(5)のいずれかに記載の抗体の1種又は複数種を含み、遊離型肝細胞増殖因子受容体を検出または測定するためのキット。

(19) 遊離型肝細胞増殖因子受容体上の異なるエピトープを認識する少なくとも2種のモノクローナル抗体を含む(18)に記載のキット。

(20) 臓器炎症、癌、肝疾患、炎症性腸疾患、血液疾患、心筋梗塞、狭心症、または血栓症の診断に用いられる(18)又は(19)に記載のキット。

(21) 疾患の疑いのある患者から採取された生体成分中の遊離型肝細胞増殖因子受容体を測定することと特徴とする(18)~(20)に記載のキット。

【0017】本明細書において、「遊離型HGFRを認識する」とは、抗原抗体反応により遊離型HGFRに結合することをいう。尚、前記したように、本明細書においては、可溶性のHGFR、例えば培養細胞の培養上清中から検出されるようなin vitroで検出される可溶性のHGFRを「可溶性HGFR」と呼び、可溶性HGFRの中でも、ヒトの血液等の体液中に存在している、すなわちin vivoで検出される可溶性のHGFRを「遊離型HGFR」と呼ぶ。このように本明細書では、検出される対象に応じて便宜上名称を区別しているが、可溶性HGFRと遊離型HGFRの構造は明らかではなく、各々の名称が異なることは各々の構造が異なることを前提としているわけではない。したがって、本発明の抗体は、少なくとも遊離型HGFRに結合するものであり、遊離型HGFR以外の可溶性HGFRに結合するか否かは問わない。尚、本発明の抗体の好ましい形態は、HGFRの細胞外ドメインからなるポリペプチドを認識するものである。

【0018】また、「還元条件下で変性したHGFRを認識しない」とは、抗原抗体反応により還元条件下で変性したHGFRに実質的に結合しないことをいう。例えば、還元条件下のSDS-PAGEにより泳動されたHGFRを転写した膜を用いたウエスタンブロットングにおいて、本発明の抗体によりHGFRが検出されない場合は、還元条件下で変性したHGFRを認識しないことに該当する。

【0019】

【発明の実施の形態】以下に、本発明を詳細に説明する。

【0020】<1>遊離型HGFRを認識する抗体作製用の免疫抗原およびスクリーニング抗原
免疫抗原またはモノクローナル抗体のスクリーニング等

に使用するHGFRは、ヒトのHGFRが好ましい。HGFR全長でもよく、細胞外ドメイン又はその一部のペプチドであってもよい。遊離型HGFRを認識する抗体を効率よく取得するためには、HGFRの細胞外ドメイン又はその一部のペプチドを用いることが好ましい。尚、免疫抗原とモノクローナル抗体のスクリーニング等に使用するHGFRの少なくとも一方は、細胞外ドメイン又はその一部のペプチドであることが好ましい。

【0021】特に、HGFR特異的高親和性抗体を取得するためには、高純度のHGFRを調製することが好ましい。このような目的から、ここで使用するHGFRとしては、HGFR cDNAを使用した組換え蛋白質が望ましい。例えば、Parkら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:6379-6383 (1987)) に記載されているようなHGFR cDNAを使用し、その全長または一部を適当な発現ベクターに挿入し、これを大腸菌などの微生物、昆虫細胞、酵母、動物細胞または動物に導入し、組換え蛋白質として産生させることにより、組換えHGFRを取得することができる。ここでは、その純度を高めるためにタグあるいはキャリアー蛋白質を付加した形で融合蛋白質を発現させ、タグあるいはキャリアー蛋白質に対して高い親和性を持つリガンドを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製する方法が望まれる。例えば、FLAG-tag法では8個のアミノ酸からなるペプチドのタグをHGFRのN末端あるいはC末端部位に導入し、融合蛋白をモノクローナル抗体カラムでアフィニティ精製することができる。このような融合蛋白質からエンテロキナーゼ処理を行うことによりFLAG配列を切断除去し、精製抗原として使用することができる。また、HGFRを発現している培養細胞又は形質転換細胞の培養上清もしくは細胞抽出物、又はHGFRを含む組織もしくは体液より精製操作を実施して、HGFRを得ることも可能である。HGFRを発現している培養細胞としては、ヒト胃癌細胞株MKN45が挙げられる。また、細胞系を使用することなく、Rapid Translation System RTS500 (Roshe Diagnostics社) などを使用した試験管内での転写・翻訳システムにより、目的とするHGFRを作製することも可能である。さらには、HGFRの部分配列を化学合成により作製したペプチドも利用することが可能である。

【0022】精製純度の高いHGFRは、免疫原として重要であるだけでなく、HGFR特異的なポリクローナル抗体をアフィニティ精製により選別したり、HGFR特異的な高親和性モノクローナル抗体をスクリーニングする際に、極めて重要な材料となる。また、定量測定時の標準品HGFRとしても重要である。

【0023】＜2＞遊離型HGFRを認識する抗体の作製
遊離型HGFRを検出する抗体は、上記組み換え蛋白質HGFRを免疫抗原として使用し、通常行われる免疫学的方法で取得すればよい。用いるHGFRは、上述の通りである。

【0024】免疫に使用する動物は特に限定されないがウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラット、モルモット、

ニワトリ等はいずれも使用できる。免疫用抗原の動物への接種は、皮下、筋肉内、腹腔内に完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントとよく混和して行う。接種は2～5週間ごとに実施し、抗原に対する免疫動物の抗体価が十分に上昇するまで続ける。この後、免疫動物に対して抗原のみの静脈注射を行い3～7日後に血清を取得する。

【0025】上記のようにして得られた血清からポリクローナル抗体を精製する方法は、通常の免疫グロブリン精製法を用いれば良く、例えば、硫酸分画法、ポリエチレン分画法、エタノール分画法、陰イオン交換クロマトグラフィー、HGFRもしくはその断片、又はプロテインAもしくはプロテインGが結合したアフィニティークロマトグラフィー等により実施することが出来る。

【0026】得られたポリクローナル抗体が遊離型HGFRを認識することの確認は、例えば、遊離型HGFRを含む肝炎、心筋梗塞等の患者血液に対して、健常者の血液よりも反応性が高いことを確認すること等によって、行うことができる。

【0027】一方、モノクローナル抗体を取得する際は、免疫を行った動物より抗体産生細胞を含むと考えられる脾臓又はリンパ節を採取し、この脾臓細胞又はリンパ細胞を腫瘍細胞と細胞融合を行う。この後、細胞融合して不死化した抗体産生細胞（ハイブリドーマ）を単離する。ここで使用する腫瘍細胞は一般的に免疫を行った動物から調製される脾臓細胞もしくはリンパ細胞と同一種のものであることが望ましいが、異種動物間でも可能である。

【0028】例えば腫瘍細胞の例として、P3 (p3/x63-Ag8)、P3-U1、NS-1、MPC-11、SP2/0、F0、x63.6.5.3、S194、R210等の骨髓腫細胞が使用される。細胞融合は一般に行われている方法、例えば「単クローン抗体実験マニュアル」（講談社サイエンティフィック1987年出版）に記載の方法に従って実施すればよい。細胞融合促進剤としてはセンダイウイルスや平均分子量1000～6000のポリエチレングリコールなどが挙げられる。この際、更に融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤やIL-6等のサイトカインを添加することも出来る。免疫を行った脾臓細胞またはリンパ細胞に対する腫瘍細胞の混合比は、例えば腫瘍細胞に対し、脾臓細胞もしくはリンパ細胞を約1～10倍程度用いればよい。

【0029】上記融合培地としてはERDF培地、RPMI-1640培地、MEM培地等の通常の各種培地を使用することが出来、融合時は通常、牛胎児血清(FCS)等の血清を抜いておくのがよい。融合は上記の免疫を行った脾臓細胞もしくはリンパ細胞と腫瘍細胞との所定量を上記培地内でよく混合し、予め37℃程度に加温しておいたポリエチレングリコール溶液を20～50%程度加え、好ましくは30～37℃で1～10分程度反応させることによって実施する。以降、適当な培地を逐次添加して遠心し、上清を除去する

操作を繰り返す。

【0030】目的とするハイブリドーマは、通常の選択培地、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）で培養する。このHAT培地での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（未融合細胞等）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間行えばよい。さらに得られたハイブリドーマの選別は、前述した方法により得たHGFRなどの材料を用い、種々の免疫化学的方法で解析することにより可能となる。例えば、HGFRをスクリーニング用抗原として用い、これら10のスクリーニング用抗原とハイブリドーマ培養上清中に分泌されるモノクローナル抗体との結合を、ELISA法などの酵素免疫測定法、またはウエスタンブロッティング法などで解析して、目的とするハイブリドーマを選択することが出来る。

【0031】具体的には、HGFRをスクリーニングプレートなどに付着させ、BSA等でブロッキングしたものに対して、上記ハイブリドーマの培養上清を添加して、HGFRを認識する抗体を分泌しているハイブリドーマを選別する。例えば、選択するハイブリドーマの培養上清をHGFR10が付着したELISA法用のプレートに添加して反応させ、十分な洗浄操作後、標識抗マウスIgGポリクローナル抗体を添加してさらに反応させる。洗浄操作後に標識の検出を行い、HGFRを付着したプレートに反応性がある培養上清を有するハイブリドーマを選択する。標識としては、後述する各種酵素、蛍光物質、化学発光物質、ラジオアイソトープ、ビオチンまたはアビジン等が用いられる。

【0032】尚、最終的には、ハイブリドーマ培養上清中に、遊離型HGFRを含む肝炎、心筋梗塞等の患者血液に30に対して、健常者の血液よりも反応性が高いモノクローナル抗体が含まれていることを確認することによって、遊離型HGFRを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。

【0033】上記の様な方法で目的とする抗体産生能を確認した後、例えば限界希釈法により単一のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを得ることが出来る。このハイブリドーマクローンは、あらかじめFCS中に含まれるウシ抗体(IgG)を除いたFBSを1～5%程度加えた培地を用いて培養を行い、得られた培養上清を40目的のモノクローナル抗体を精製する原料とする。もしくは得られたハイブリドーマクローンをあらかじめプリステンを投与したBalb/Cマウス又はBalb/c(nu/nu)マウスの腹腔内に移植し、10～14日後にモノクローナル抗体を高濃度を含む腹水を採取し、目的のモノクローナル抗体を精製する原料としてもよい。

【0034】ハイブリドーマの培養上清又は腹水よりモノクローナル抗体を精製する際は、前記のポリクローナル抗体の精製と同様に、通常の免疫グロブリン精製法を用いればよく、例えば、硫酸分画法、ポリエチレン分画50

法、エタノール分画法、陰イオン交換クロマトグラフィー、HGFRもしくはその断片、又はプロテインAもしくはプロテインGが結合したアフィニティークロマトグラフィー等により実施することが出来る。

【0035】本発明のモノクローナル抗体を、2抗体サンドイッチアッセイ法を用いたELISA測定系による遊離型HGFRの測定に用いる場合には、エピトープが異なる少なくとも2種類のモノクローナル抗体が必要となる。その場合は、上記したハイブリドーマの選別に際し、エピトープの異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを2種又は3種以上選別する。

【0036】本発明の抗体は、上記のようにして得られる遊離型HGFRを認識する抗体であって、さらに、還元条件下で変性したHGFRを認識しない抗体であることを特徴とする。このような抗体は、例えば、HGFRを認識する抗体のうち、還元条件下のSDS-PAGEにより泳動されるHGFRに対して反応性を有すモノクローナル抗体を選択することによって、取得することができる。こうして得られる抗体は、HGFRの3次元構造を認識すると考えられる。後記実施例に示すように、還元条件下のSDS-PAGEにより泳動されるHGFRに対して反応性を有すモノクローナル抗体「2-2D」は、ELISA測定系でのHGFRへの反応性が極めて微弱なものであった。一方、還元条件下のSDS-PAGEにより泳動されるHGFRに対して反応性を示さないモノクローナル抗体である「9-C5」及び「4-11A」は、ELISA測定系でHGFRに対して鋭敏な反応性を示した。この結果から、HGFRのELISA法を用いた高感度な検出には、その3次元構造を認識するモノクローナル抗体が適していると考えられる。

【0037】遊離型HGFRを高感度に測定するためには、遊離型HGFRに対する親和性の高いモノクローナル抗体を用いることが好ましい。高親和性抗体は、例えば、上記のように遊離型HGFRを認識し、還元条件下で変性したHGFRを認識しない抗体を選択することによって、取得することができる。本発明の抗体のHGFRに対する親和性は、本発明の抗体とHGFRとの解離定数を測定することによって確認することができる。本発明の抗体の遊離型HGFRに対する好ましい解離定数は、後記実施例に示すBIACORE X（ピアコア社）を用いた速度論的解析により測定される解離定数として、 1×10^{-8} 以下である。実施例に示す速度論的解析において算出された、上記「9-C5」及び「4-11A」抗体の、HGFRの細胞外ドメインからなるポリペプチドに対する解離定数は、それぞれ 6.86×10^{-9} M、 8.97×10^{-9} Mであった。

【0038】また、本発明の抗体は、遊離型HGFRを認識することに加えて、HGFとHGFRとの複合体を認識するものであってもよい。このような抗体と、HGFRは認識するがHGFとHGFRとの複合体を認識しない抗体を組み合わせると、HGFR単体のみの量や、複合体のみの量、又は単体と複合体との比率等を算出することができる。

これらの値を算出することによって、特定の疾患の検出をより詳細に行うことができることが期待される。

【0039】実施例で得られた「9-C5」、「4-11A」抗体は、HGFRを過剰発現する低分化型ヒト胃癌細胞株MKN45の培養上清を用い、HGFとのELISA結合アッセイを行ったところ、HGFとHGFRの結合を阻害することなく、HGF-HGFR複合体を認識した。このことより、前記抗体は、HGFRにおけるHGFとの結合サイトを認識するものではなく、HGFに対する拮抗剤の効果あるいはHGFRへの作用剤の効果は持ち合わせていないことが示唆される。ここで用い 10
られている「拮抗剤的」なる語は、HGFの生物学的活性またはHGFR活性化を直接間接に実質的にうち消すことができる効果を示す。また、「作用剤的」なる語は、生物学的活性またはHGFR活性化を直接間接に実質的に促進できる効果を示す。

【0040】<3>遊離型HGFRを検出又は測定する方法
本方法は、上記のようにして得られた遊離型HGFRを認識する抗体を使用して、生体試料中の遊離型HGFRを検出又は測定する方法である。ここで、「検出」とは遊離型HGFRの存在を知ることを意味し、測定とは、好ましくは定 20
量的に遊離型HGFRの量を決定することをいう。本方法は、生体試料中の遊離型HGFRを検出又は測定する様々な診断方法、測定方法、アッセイ方法に用いることが可能である。その方法としては、本発明の抗体を使用し遊離型HGFRを検出する目的であれば特に限定されない。例えば、競合的結合アッセイ方法、または直接的または間接的サンドイッチアッセイ法、2抗体サンドイッチアッセイ法などが挙げられる。また検出方法としては、酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、化学発光免疫測定法、イムノプロットング法、イ 30
ムノクロマト法、ラテックス凝集法などが挙げられる。

【0041】イムノプロットングの応用例としては、遊離型HGFRを認識する抗体をマイクロアレイやチップに添加もしくは固定したものも含まれる。また遊離型HGFRを認識する抗体を蛍光ラベル化し、蛍光偏角解消法、蛍光相関分散法を用いて遊離型HGFRとの相互作用を検出することも可能である。表面プラズモン共鳴装置を利用して遊離型HGFRを認識する抗体と、遊離型HGFRとの相互作用を測定することも可能である。例えば、この抗体をセンサーチップ上に結合させた後、このチップをとりつけ 40
た表面プラズモン共鳴装置に遊離型HGFRを含む生体試料を流し、応答シグナルの時間変化を追跡することにより、生体成分中の遊離型HGFRを定量することが可能である。

【0042】遊離型HGFRを検出又は測定する方法で使用する抗体、例えば遊離型HGFRを認識する抗体は、そのまま用いてもよいし、定法であるパパイン処理によって得られるF(ab)もしくはペプシン処理によって得られるF(ab')₂またはF(ab')₂の形態を持った抗体を用いても良い。また遊離型HGFRを認識する抗体の断片 50

も、本発明に含まれる。例えば、遊離型HGFRを認識する抗体のH鎖とL鎖の両可変ドメイン内の相補性決定領域(CDR)または超可変領域などを含む断片がこれに含まれる。

【0043】生体成分中の遊離型HGFRを定量する2抗体サンドイッチアッセイ法とは、例えば、遊離型HGFRを特異的に測定する方法であって、(1)遊離型HGFRを認識する抗体の一種または複数を含むものからなる試薬を、検体中の遊離型HGFRと反応させ、免疫反応物を生成させる工程、(2)免疫反応物を分離した後、免疫反応物中の遊離型HGFRを認識する標識抗体と反応させる工程、及び(3)免疫反応物に結合した標識抗体を測定する工程を含む方法、または、遊離型HGFRを特異的に測定する方法であって、(1)遊離型HGFRと遊離型HGFRを認識する一種または複数を第一次抗体として含むものからなる試薬を、検体中の遊離型HGFRと反応させ、免疫反応物を生成させる工程、(2)免疫反応物を分離した後、免疫反応物中の遊離型HGFRを認識する第二次抗体と反応させ、免疫反応物を生成させる工程、(3)免疫反応物を分離した後、免疫反応物中の第二次抗体を認識する標識抗体を反応させる工程、及び(4)免疫反応物に結合した標識抗体を測定する工程を含む方法、が挙げられる。

【0044】具体的には、マイクロタイターウェルやマイクロ磁気ビーズなどの固相に対して遊離型HGFRを認識する抗体を、定法により一次抗体として固相化する。次に、この固相表面の過剰な蛋白質結合部位を、ウシ血清アルブミン、スキムミルクまたはゼラチン等でブロッキングする。この後、遊離型HGFRを含む生体成分を添加して固相上で免疫反応物を形成させた後に洗浄する。次に遊離型HGFRを認識する標識ポリクローナル抗体または標識モノクローナル抗体を二次抗体として添加して反応させる。この際、一次抗体としてモノクローナル抗体を用いた場合は、一次抗体とエピトープが異なる、遊離型HGFRを認識するモノクローナル抗体を標識したものを二次抗体として使用する。さらに洗浄後、標識抗体量を測定することにより、生体成分中の遊離型HGFR量を測定することが出来る。

【0045】ここで使用するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の標識とは、アルカリホスファターゼ、西洋わさびペルオキシターゼ、β-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼなどの酵素でもよいし、フルオレッセイン誘導体やローダミン誘導体などの蛍光物質でもよい。またユーロピウムもしくはユーロピウム錯体などの時間分解蛍光測定が可能な希土類もしくは希土類錯体であってもよい。さらに、アクリジニウムエステル等の化学発光物質であってもよいし、¹²⁵I、³H、¹⁴C、³²Pなどのラジオアイソトープでもよい。すなわち、発色、蛍光、時間分解蛍光、化学発光、電気化学発光、放射活性を測定する方法を用いて生体成分中のHGFR量を定量することが本発明に含まれる。

また、二次抗体をビオチン化標識し、アビジンと複合体を形成しているアルカリホスファターゼ、西洋わさびペルオキシターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ、フルオレッセイン誘導体、ローダミン誘導体、希土類錯体、アクリジニウムエステル等の化学発光物質、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P などのラジオアイソトープを検出することも本発明に含まれる。

【0046】<4>遊離型HGFRを検出又は測定するキット

遊離型HGFRを検出又は測定するキットとは、遊離型HGFR 10
を測定又は検出することを特徴とする、疾患の診断キットである。遊離型HGFRを測定することにより、疾患状態にある患者、例えば肝炎、腸炎、胃炎、炎症性腸疾患をはじめとする臓器炎症の患者、癌患者、肝疾患をはじめとする臓器の線維化を伴う患者、または狭心症、心筋梗塞などをはじめとする血栓症の患者、及び血液疾患の患者の診断が可能であることが本発明により初めて判明した。したがって、遊離型HGFRを測定または検出することにより、前記のような各種疾患を検出することができる。本発明においては、疾患を診断することを目的とし、遊離型HGFRを検出又は測定するキットであるならば、そのキットを構成する材料、方法には限定されない。

【0047】具体的には、例えば、電気遊動法、HPLC法、各種カラムクロマトグラフィー法、各種アレー、チップ、表面プラズモン共鳴装置等を用い、遊離型HGFRを検出又は測定することにより、疾患を診断するキットなどが挙げられる。より具体的には、抗体を用いた免疫学的方法により遊離型HGFRを検出または測定するキット 30
が挙げられる。抗体としては、前記の遊離型HGFRを認識する抗体の少なくとも一つ以上が用いられる。

【0048】例えば、本発明のキットが2抗体サンドイッチアッセイ法によるものである場合には、遊離型HGFRを検出又は測定するキットであって、(1)遊離型HGFRと遊離型HGFRを認識する抗体の一種または複数を含むものからなる試薬を、検体中の遊離型HGFRと反応させ、免疫反応物を生成させる工程、(2)免疫反応物を分離した後、免疫反応物中の遊離型HGFRを認識する標識抗体と反応させる工程、及び(3)免疫反応物に結合した標識抗体を測定する工程を含んだキット、または、遊離型HGFR 40
FRを検出又は測定するキットであって、(1)遊離型HGFRと遊離型HGFRを認識する抗体の一種または複数を第一次抗体として含むものからなる試薬を検体中の遊離型HGFRと反応させ、免疫反応物を生成させる工程、(2)免疫反応物を分離した後、免疫反応物中の遊離型HGFRを認識する第二次抗体と反応させ、免疫反応物を生成させる工程、(3)免疫反応物を分離した後、免疫反応物中の第二次抗体を認識する標識抗体を反応させる工程、及び(4)免疫反応物に結合した標識抗体を測定する工程を含んだキット、が挙げられる。

【0049】このキットは、少なくとも遊離型HGFRを認識するモノクローナル抗体さらに、遊離型HGFRを検出または測定する操作に必要な構成要素が含まれていてもよい。その構成要素の例として、標準蛋白質としてのHGFR又はその断片、酵素および基質等が挙げられる。キットに含まれるモノクローナル抗体は、酵素などの標識物質が結合した状態でもよいし、これらの抗体を認識する標識抗体が含まれていてもよい。また適切な各種緩衝液、抗原希釈液、反応希釈液、基質溶液、反応停止液等が含まれていてもよい。本キットにはラベルが付き、遊離型HGFR検出又は測定に必要な材料が封入された容器が含まれていてもよい。適した容器としては、例えばガラス、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ナイロン、テフロン(登録商標)などの各種プラスチックを材質とした容器が挙げられる。キットには、好ましくは、上述した遊離型HGFRを検出または測定するのに必要な材料、容器とともに、遊離型HGFRを検出または測定する方法が記載された説明書が含まれる。

【0050】本発明によるキットを用いることにより、 20
疾患状態にある患者から採取された生体成分中の遊離型HGFRを検出することが出来、また定量することも可能である。遊離型HGFRを検出する生体材料は特に限定されず、組織、血清、血漿、尿、漿液、髄液、組織の抽出液等、いずれの生体材料も適切な前処理を行うことによって適応可能である。疾患状態にある患者の生体材料中に存在する遊離型HGFRを検出または測定することにより、その疾患の診断、予知、経過を判断することが可能である。疾患の例として、肝炎、腸炎、胃炎などをはじめとする臓器炎症、癌、肝疾患、炎症性腸疾患、血液疾患、および心筋梗塞、狭心症をはじめとする血栓症などが挙げられる。また、癌とはグリオーマ、甲状腺癌、肺癌、乳癌、胃癌、膵臓癌、大腸癌、腎臓癌、膀胱癌、卵巣癌、前立腺癌、メラノーマ、骨肉腫、リンパ腫、白血病等を意味する。これらの疾患の検出に本測定キットは有利に用いることができる。

【0051】

【実施例】以下に実施例を挙げ本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0052】

【実施例1】遊離型HGFRを認識するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体の作製
免疫抗原、スクリーニング抗原、及びHGFR測定系における標準抗原として用いたHGFRは、前記した方法と同様にして、HGFR cDNAを使用して製造した組換え蛋白質を用いた。HGFR cDNAは、Parkら(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84: 6379-6383 (1987))に記載されているcDNAのうち、1位から948位のアミノ酸残基(すなわちヌクレオチド番号1~2844)の細胞外ドメインに相当する部分を使用し、これをCHO細胞に導入し、発現させた蛋白質を取得した。得られた組換えHGFRを、以下の

実験で使用した。

【0053】HGFR 100 µgを含む溶液を、同容量のフロイント完全アジュバントとともに、Balb/cマウスの腹腔内に2週間間隔で5回投与した。マウスの血清中に抗体が産生していることを確認後、100 µgのHGFRを含む溶液を尾静脈内に投与した。3日後に脾臓を取り出し、「単クローン抗体実験マニュアル」(講談社サイエンティフィック 1987年出版)に従い、ポリエチレングリコールを使用して脾臓細胞をミエローマ細胞P3U1と細胞融合させた後、96ウェルプレートに注入後HAT培地を添加し

て14日間の培養を行った。
【0054】この後、HGFRを認識するモノクローナル抗体を培地中に産生するハイブリドーマの選別を行った。すなわちHGFRを固相化し、BSAでブロッキングをおこなったHGFRスクリーニング用ELISAプレートに対して、選択するハイブリドーマの培養上清を添加し、培養上清に存在するモノクローナル抗体の反応性を解析した。スクリーニング用ELISAプレートに対し、選択するハイブリドーマの培養上清を100 µl/ウェルにて添加した後1時間以上反応させた。

【0055】この後、0.05% Tween20を含むPBS(-)液(以下「PBST液」と略す)を用いて十分な洗浄を行ない、HRP(西洋わさびペルオキシターゼ)標識ヤギ抗マウスIgG・Fcポリクローナル抗体(ICN社)1 µg/mlおよび1% BSAを含むPBS(-)を100 µlずつウェルに添加し、さらに室温で1時間反応させた。PBST液で十分に洗浄操作を行った後、0.4mg/mlオルトフェニレンジアミン(OPD, Sigma社 P-9029)および0.015~0.03%過酸化水素溶液を含むクエン酸-リン酸緩衝液(pH5.0)を添加して室温にて反応させ、発色を行なった。この後1 N H₂SO₄溶液を添加して反応を止め、測定波長490nm、リファレンス波長650nmにて測定を行なった。

【0056】こうして、ハイブリドーマ、「9-C5」、「4-11A」、「2-2D」が選択された。ハイブリドーマ「9-C5」、「4-11A」は、2001年11月2日に、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(〒305-8566、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に寄託され、それぞれ順に受託番号 FERMP-18582、及びFERM P-18583が付与されている。尚、「9-C5」、「4-11A」抗体は、IgGのクラスに属し、サブクラスはそれぞれIgG2a、IgG2bであった。

【0057】次に、得られたHGFRに対して反応する各ハイブリドーマは、限界希釈法による3回のクローニング操作後、培養上清を回収してプロテインAが結合したアフィニティークロマトグラフィー(アマシャムファルマシアバイオテク製)により、モノクローナル抗体の精製を行った。

【0058】一方、HGFRに対するポリクローナル抗体は、次のようにして作製した。HGFRを100 µg含む溶液を同容量のフロイント完全アジュバントとともに、ウサギ

皮下へ2週間間隔で5回投与した。血清中に抗体が産生していることを確認後、100 µgの抗原を脈内に投与し、3日後に抗血清を取得してさらに定法の精製操作により抗HGFRポリクローナル抗体を作製した。次に得られたHGFRポリクローナル抗体を上記と同様にペルオキシターゼ標識することにより標識抗HGFRポリクローナル抗体を調製した。

【0059】

【実施例2】ウエスタン・ブロッティングによる、還元条件下で変性したHGFRに対する反応性の解析

この方法は、タウピンらの方法に準じて行った(Towbinら., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76, 4350-4354(1979))。即ち、還元条件下で胃癌細胞株MKN45の培養上清をSDS-PAGE後、ゲルをPVDF膜と合わせ、ゲルのある側を-極、PVDF膜のある側を+極として電流を流し、ゲル上で泳動された蛋白質をPVDF膜にプロットした。プロットされたPVDF膜を6% BSA含有PBS液に浸してブロッキングを行った後、一次抗体として上記で取得したモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を反応させた。膜をPBST液洗浄後、二次抗体として標識ヤギ抗マウスIgG・Fcポリクローナル抗体(ICN社製)を添加して、1% BSA含有PBS液中で反応させた。さらにPBST液で洗浄後、ワーキング溶液を加えて発色させ、その反応性を確認した。この試験により、「2-2D」は還元条件下で変性したHGFRに結合したが、「9-C5」、「4-11A」抗体は、還元条件下で変性したHGFRに対して反応性をもたないことが示された(図1)。

【0060】

【実施例3】高親和性抗体の選別

実施例1で作製した種々の抗HGFRモノクローナル抗体を、10 µg/mlの濃度になるように0.1M炭酸-重炭酸緩衝液(pH9.3)に溶解して一次抗体溶液を調製した。一次抗体溶液を96ウェルプレートのウェルに添加し、4にて一昼夜(12時間程度以上)おいた。このようにして得られた一次抗体付着プレートより一次抗体溶液を除き、6% BSAを含むPBS(-)をウェルに添加して4にて一昼夜(12時間程度)以上おくことにより、ブロッキング操作を行った。

【0061】次に、実施例1で作製したHGFR/Fcを、0.4 M NaCl、0.1% BSA、0.05% Tween 20を含む50mMリン酸緩衝液(pH7.5)に種々の濃度で溶解したものを、先にブロッキングを行ったプレートからブロッキング溶液を除いたウェルに添加し、室温で2時間反応させた。次に0.5 M NaCl、0.05% Tween 20を含む20mMトリス緩衝液(pH7.5)(以下、「ELISA洗浄液」と略す)を用いて洗浄を行った後、標識抗HGFRモノクローナル抗体又は標識抗HGFRポリクローナル抗体1 µg/mlおよび1% BSAを含むPBS(-)をウェルに添加し、さらに37で1時間反応させた。再びELISA洗浄液で洗浄操作を行った後、0.4mg/mlオルトフェニレンジアミン(OPD, Sigma社P-9029)お

よび0.015～0.03%過酸化水素溶液を含むクエン酸-リン酸緩衝液(pH5.0)を添加して室温にて充分反応させ、発色を行った。この後1N H₂SO₄溶液を添加して反応を止め、測定波長490nm、リファレンス波長650nmにて測定を行い、その活性よりHGFRの高感度測定可能なモノクローナル抗体の選別を行った。この結果により、上記還元条件下で変性したHGFRに反応性を示さない「9-C5」、「4-11A」抗体は、ELISA測定系でHGFRに高い反応性を持つことが示された(図2)。

【0062】

【実施例4】抗HGFRモノクローナル抗体「9-C5」、「4-11A」の解離定数測定

実施例1にて作製・精製された抗HGFRモノクローナル抗体「9-C5」、「4-11A」の解離定数を測定した。測定にあたっては、BIAcore X(ピアコア社)を使用した。

【0063】HGFRの固定化はセンサーチップCM5(ピアコア社)に対して行った。固定化方法は、CMデキストラン中のカルボキシル基をNHS/EDC混合液により活性化させ、HGFR中のアミノ基と結合させるアミンカップリング法で行った。ここでHGFRのチップへの固定化量は、約50 20 ORU=0.5ng/mm²とした。

【0064】次に、HGFR固定化チップを用い、各抗体との相互作用測定を行った。測定に使用するランニング緩衝液として、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% Tween20を含む10mM HEPES緩衝液(pH7.4)を使用した。このランニング緩衝液に「9-C5」、「4-11A」抗体を、それぞれ数～数十μg/ml程度の濃度になるように溶解し、流速30μl/分でHGFRと抗体の相互作用を測定した。結合相は100～280sec、解離相は280～520secである。そのようにして得られた相互作用曲線を、解析プログラムBIAevaluation version 3.0(ピアコア社)を用い、線形あるいは非線形解析を行った(図3)。そのようにして算出された「9-C5」抗体、「4-11A」抗体の解離定数は、それぞれ6.86×10⁻⁹M、8.97×10⁻⁹Mであった。

【0065】

【実施例5】「9-C5」、「4-11A」抗体の抗原認識部位のアッセイ

「9-C5」、「4-11A」抗体について、HGFとHGFRの複合体を認識しうるか否かを確かめるために、ELISA結合アッセイを実施した。

【0066】Naka等(J. Biol. Chem., 267: 20114-20119 (1992))による方法を用いて、CHO細胞内で生産された組換えヒトHGF(rhHGF)を10μg/mlの濃度になるようにPBS(pH7.4)に溶解してrhHGF溶液を調製した。rhHGF溶液を96ウェルプレートのウェルに添加し、4 にて一昼夜(12時間程度以上)おいた。このようにして得られたrhHGF付着プレートよりrhHGF溶液を除き、6% BSAを含むPBS(-)をウェルに添加して4 にて一昼夜(12時間程度)以上おくことにより、ブロッキング操作を行っ 50

た。

【0067】次に、胃癌細胞株MKN45の培養上清を1% BSAを含むPBS(-)で段階希釈したものを、ブロッキング溶液を除いたウェルに添加し、室温で2時間反応させた。次にELISA洗浄液を用いて洗浄を行った後、標識抗「9-C5」、「4-11A」抗体1μg/mlおよび1% BSAを含むPBS(-)をウェルに添加し、さらに37 で1時間反応させた。再びELISA洗浄液で洗浄操作を行った後、0.4mg/ml オルトフェニレンジアミン(OPD, Sigma社P-9029)および0.015～0.03%過酸化水素溶液を含むクエン酸-リン酸緩衝液(pH5.0)を添加して、室温にて充分反応させ発色を行った。この後、1N H₂SO₄溶液を添加して反応を止め、測定波長490nm、リファレンス波長650nmにて測定を行った(図4)。

【0068】この測定において、胃癌細胞株MKN45培養上清中のHGFRの濃度依存的な活性が得られた。このことより、「9-C5」、「4-11A」抗体のHGFRへの認識部位は、HGFとの結合に関与しないことが示された。

【0069】

【実施例6】HGFR定量測定系の構築

実施例1で作製したハイブリドマクローン「4-11A」及び「9-C5」のモノクローナル抗体を使用して、2抗体サンドイッチアッセイ法によるELISA測定系を構築した。「4-11A」抗体を固定化抗体(一次抗体)とし、「9-C5」を標識二次抗体とした。

【0070】「4-11A」モノクローナル抗体を20μg/mlの濃度になるように0.05M炭酸-重炭酸緩衝液(pH9.6)に溶解し、100μl/ウェルにて96ウェルプレートへ添加し、4 にて一昼夜(12時間程度以上)または37 にて2時間以上おいた。この一次抗体付着プレートより一次抗体溶液を除いた後、1% BSAを含むPBS(-)を250～300μl/ウェルずつ添加し、4 にて一昼夜(12時間程度)または37 にて2時間以上おいた。このプレートからブロッキング溶液を除き、0.4M NaCl、0.1% BSA、0.05% Tween 20、及び50μg/mlマウスIgGを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)を50μlずつウェルに添加し、更に0.15M NaCl、0.05% Tween20、1% BSA、20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)に溶解させた種々の濃度のHGFRを50μlずつ添加し、室温にて1時間反応させた。

【0071】この後、500mM NaCl、0.05% Tween 20、20mM Tris-HCl(pH7.5)を組成とする洗浄液を使用して十分な洗浄を行なった後、実施例1で作製したハイブリドマクローン「9-C5」のモノクローナル抗体をビオチン標識したものを2次抗体とし、これを10μg/mlおよび1% BSAを含むPBS(-)を100μlずつウェルに添加し、室温にて1時間反応させた。

【0072】次に上記の洗浄液を使用して十分な洗浄を行ない、HRP標識ストレプトアビジン(アマシャムファルマシアバイオテック、コードRPN1231)を2000倍希釈した1% BSAを含むPBS(-)を100μlずつウェルに添加

し、さらに室温で1時間反応させた。洗浄液で十分に洗浄操作を行った後、0.4mg/ml オルトフェニレンジアミン (OPD, Sigma社 P-9029) および0.015~0.03%過酸化水素溶液を含むクエン酸-リン酸緩衝液 (pH5.0) を100 μ l/ウェルずつ添加して室温にて反応させ、発色を行なった。

【0073】この後1N H_2SO_4 溶液を100 μ l/ウェルずつ添加して反応を止め、測定波長490nm、リファレンス波長650nmにて測定を行なった。この結果を図5に示す。図5には、HGFRの濃度、0~50ng/mlの範囲で記載した。また、図6には、この測定系において、HGFRを緩衝液に溶解させた場合と健常人ヒト血清に溶解させた場合の測定値をそれぞれ示した。その結果、本発明のモノクローナル抗体は、健常人ヒト血清に溶解させたHGFRに対しても、緩衝液に溶解させたときと同等の反応性を示した。これらのことより、この測定系においてヒト血清中のHGFRを定量的に検出可能であることが推測された。

【0074】

【実施例7】健常人血液中における遊離型HGFR量の測定
実施例6で作製したHGFR定量測定系を用いて、健常人127人の血清を測定した。健常人血清は採取後に凍結して保存され、本実験の直前に解凍して使用した。まず、実施例1で作製した「4-11A」抗体付着後にブロッキング操作を行った96ウェルプレートに対し、あらかじめ0.4M NaCl、0.1% BSA、0.05% Tween 20、及び50 μ g/ml マウスIgGを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) を50 μ lずつウェルに添加し、さらに健常人の血清または標準HGFR (0、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50、200 ng/ml) を50 μ lずつ添加した。

【0075】この後、室温にて1時間反応させ、500mM NaCl、0.05% Tween 20、20mM Tris-HCl (pH7.5)を組成とする洗浄液を使用して十分な洗浄を行なった後、実施

表1

症例	患者1	患者2	患者3	患者4	患者5
肝炎	11.1	9.6	18.0	11.1	
12.0					
心筋梗塞	18.0	10.9	16.8	14.2	
12.7					

【0079】

【発明の効果】本発明により、遊離型HGFRに特異的に結合するモノクローナル及びポリクローナル抗体が提供される。本発明の抗体は、遊離型HGFRの特異的かつ高感度な測定、検出に用いることができる。

【0080】本発明の遊離型HGFRの測定法は、遊離型HGFRの血中濃度に反映される各種疾患の診断に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 HGFRを認識する抗体を用いたウエスタン・ブロットの結果を示す写真。

*例1で作製した「9-C5」モノクローナル抗体をビオチン標識したものを2次抗体とし、これを10 μ g/mlおよび1% BSAを含むPBS(-)を100 μ lずつウェルに添加し、室温にて1時間反応させた。次に上記の洗浄液を使用して十分な洗浄を行ない、HRP標識ストレプトアビジン (アマシャムファルマシアバイオテック、コードRPN1231) を2000倍希釈した1% BSAを含むPBS(-)を100 μ lずつウェルに添加し、さらに室温で1時間反応させた。

【0076】洗浄液で十分に洗浄操作を行った後、0.4mg/ml オルトフェニレンジアミン (OPD, Sigma社 P-9029) および0.015~0.03%過酸化水素溶液を含むクエン酸-リン酸緩衝液 (pH5.0) を100 μ l/ウェルずつ添加して室温にて反応させ、発色を行なった。この後1N H_2SO_4 溶液を100 μ l/ウェルずつ添加して反応を止め、測定波長490nm、リファレンス波長650nmにて測定を行なった。この後、標準HGFR濃度とその発色量による検量線を作製し、健常人血清中の濃度を算出した。この結果を図7に示す。健常人血清 (検体数127) においては、0 ng/ml から9 ng/mlまでの範囲を示し、平均は3.3 ng/mlであった。

【0077】

【実施例8】各種ヒト疾患患者血液中におけるHGFR量の測定

実施例6で作製したHGFR特異的測定系を用い、実施例7の方法に従って各種ヒト疾患患者血清中のHGFRを測定した。患者数は、各血清は採取後に凍結して保存され、本実験の直前に解凍して使用した。その結果を表1に示す。肝炎、心筋梗塞の患者血液中には、健常人 (検体数127、平均値3.3ng/ml) と比較してHGFRの濃度が高値であることが判った。

【0078】

【表1】

【図2】 ELISA測定系における各抗体のHGFRへの反応性を示した図。

(A) 標識抗HGFRポリクローナル抗体を用いた場合。

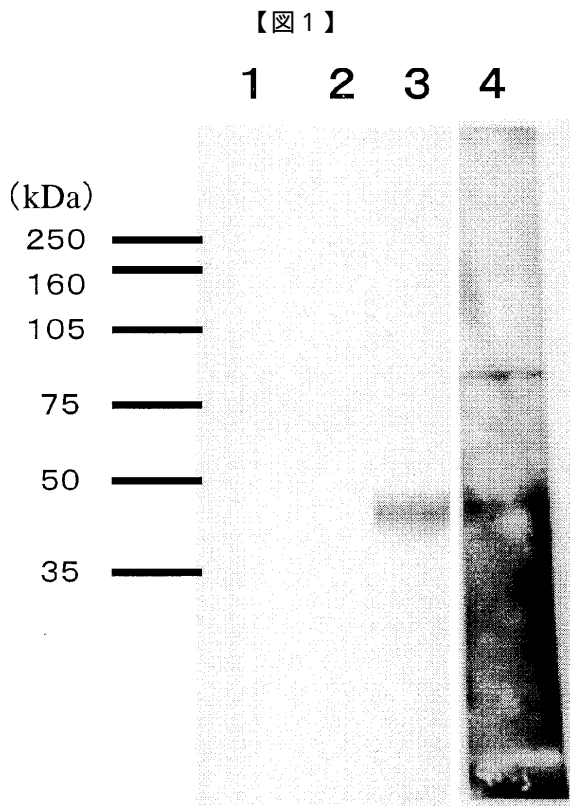
(B) 標識抗HGFRモノクローナル抗体を用いた場合。

【図3】 BIACOREを用いた測定における「9-C5」、「4-11A」抗体のHGFRへの反応曲線の一例を示す図。結合相は100~280sec、解離相は280~520secである。

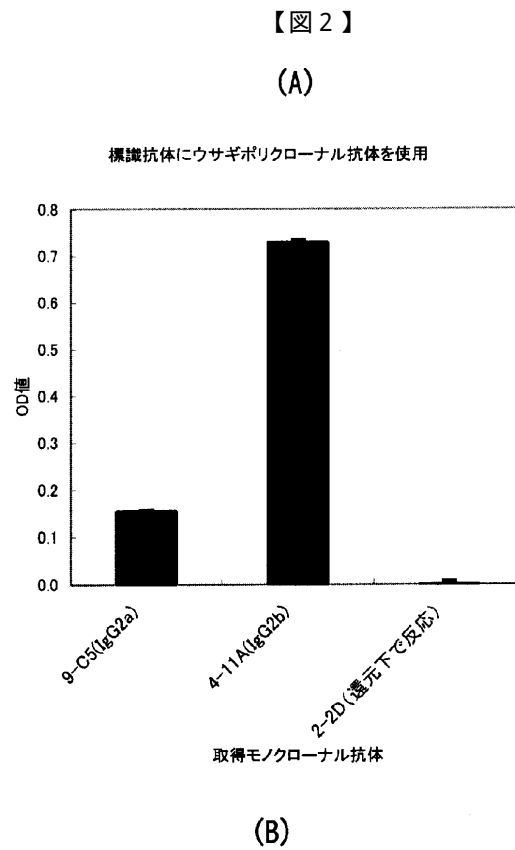
【図4】 HGFに対するHGFR結合アッセイにおける各抗体で得られた反応性を示した図。

【図5】 HGFR測定系における標準HGFRの反応性を示した図。

【図6】 健常人ヒト血清に溶解させた標準HGFRの反応性を示した図。

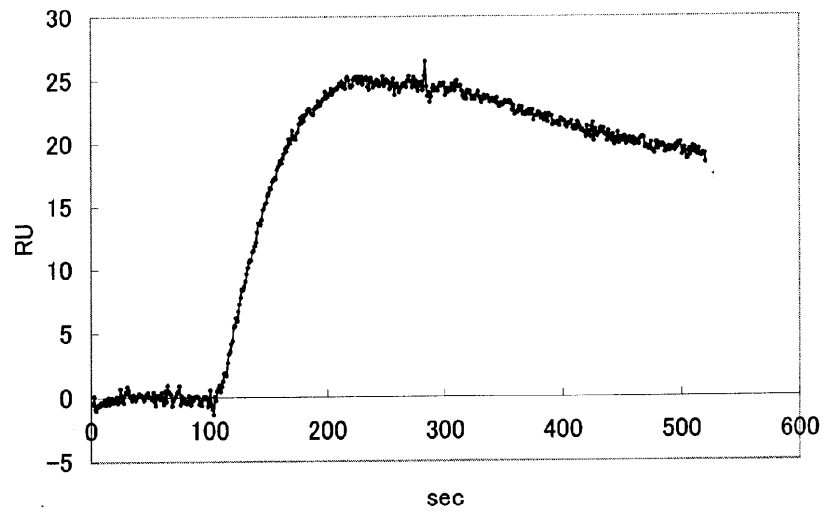


【図7】 健常人血清中における遊離型HGFR量のヒストグラムを示した図。

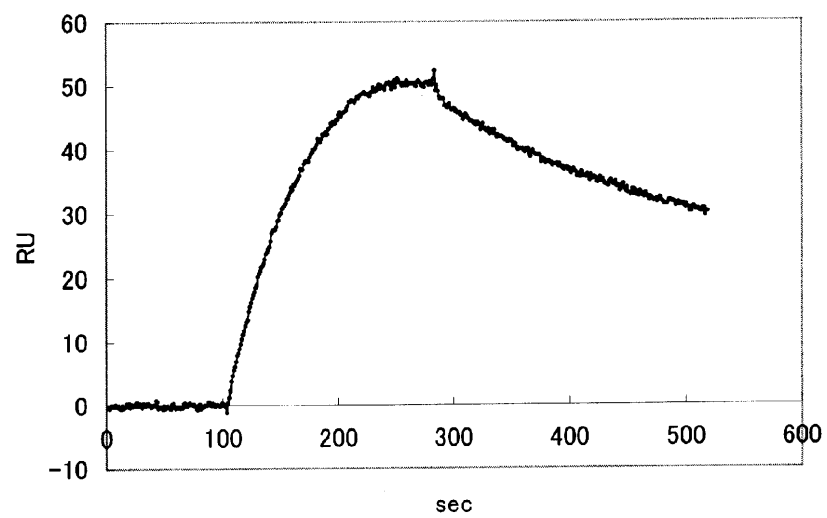


【図3】

9-C5

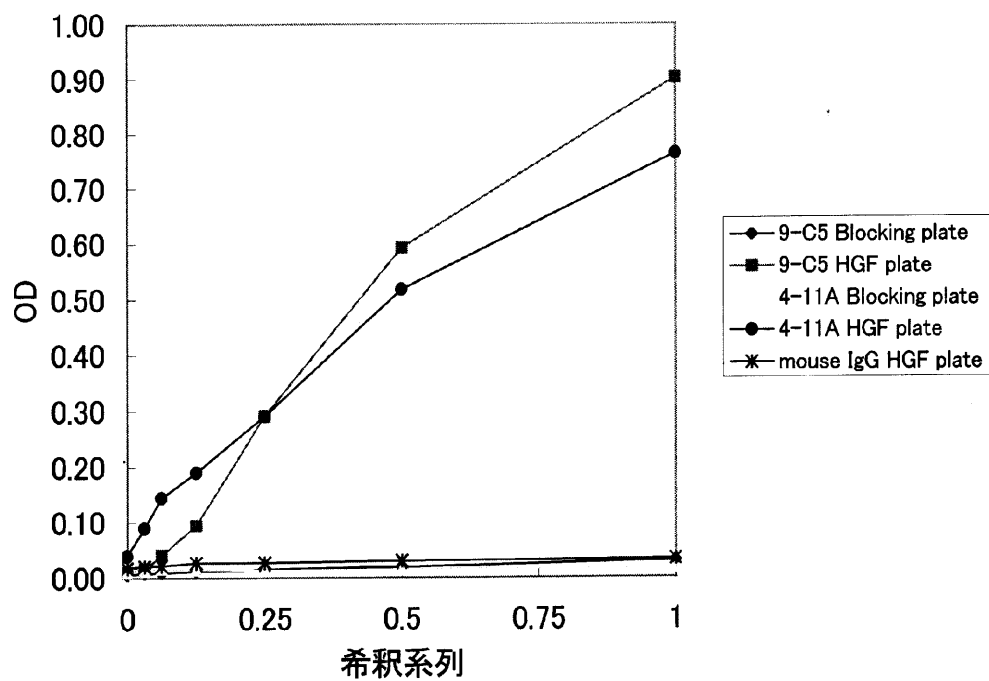


4-11A

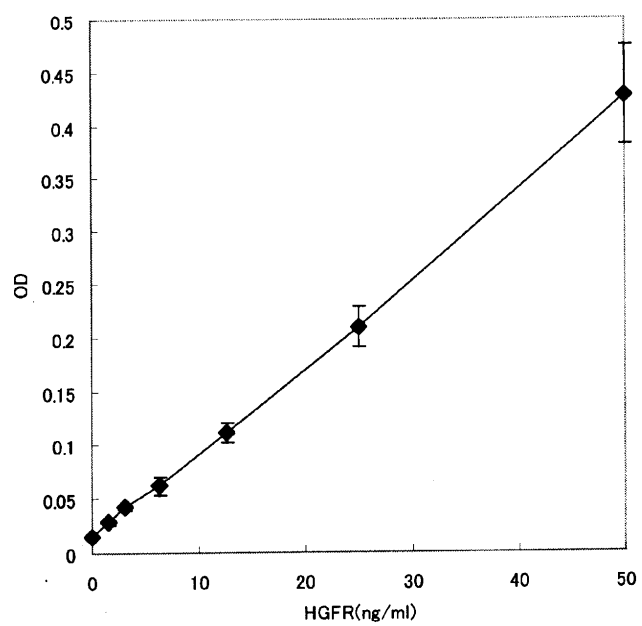


【図4】

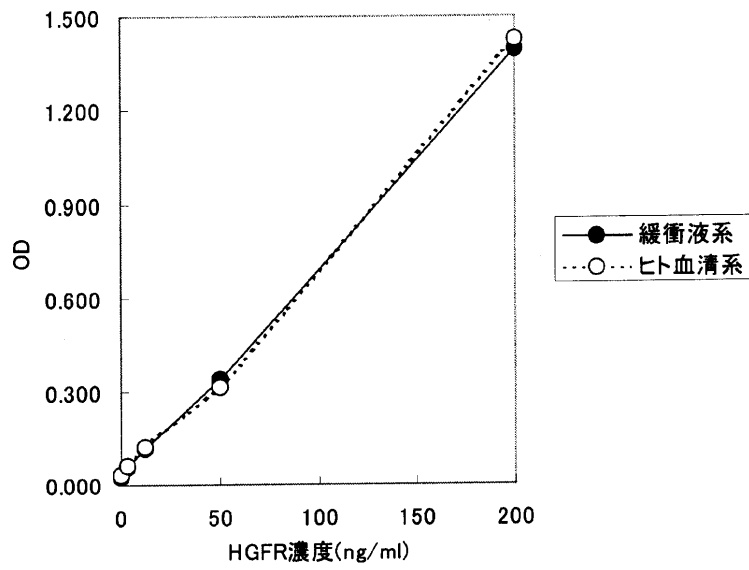
HGFR binding assay



【図5】

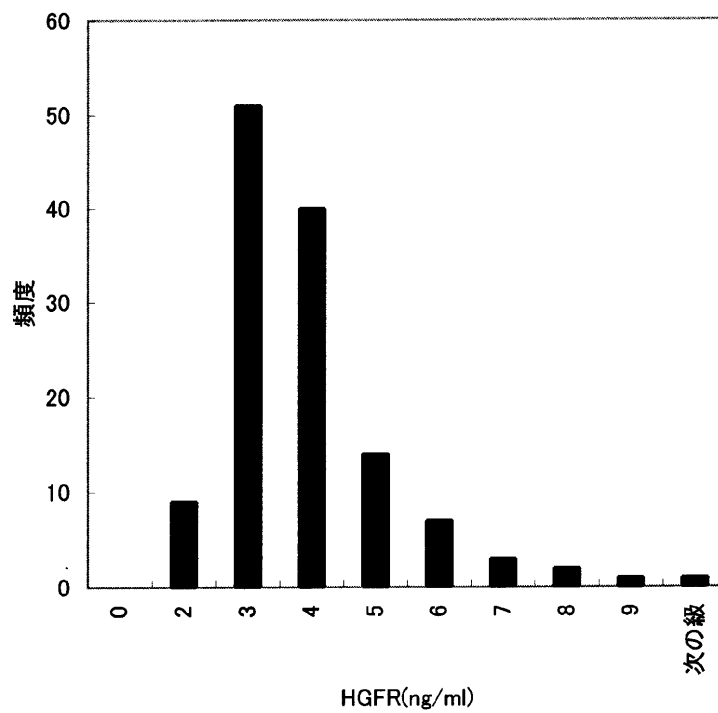
STD ($\pm$ SD)

【図6】



【図7】

健診検体(127例)



 フロントページの続き

 (51) Int.Cl.⁷
 // C 1 2 P 21/08

識別記号

 F I
 C 1 2 N 5/00

 テーマコード (参考)
 B

(72)発明者 仲 大地
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地
三菱化学株式会社内

(72)発明者 山岸 俊哉
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地
三菱化学株式会社内

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA45 GA05 HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA90X AA93Y AB05 AC14
BA08 CA25 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40
DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	测量游离肝细胞生长因子受体的方法		
公开(公告)号	JP2003180345A	公开(公告)日	2003-07-02
申请号	JP2001387864	申请日	2001-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	三菱化学株式会社		
申请(专利权)人(译)	三菱化学株式会社		
[标]发明人	伊神恒 長池一博 仲大地 山岸俊哉		
发明人	伊神 恒 長池 一博 仲 大地 山岸 俊哉		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/28 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/28 G01N33/53.S G01N33/577.B C12P21/08 C12N15/00.ZNA.C C12N5/00.B C12N15/00.C C12N15/00.CZN.A C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA45 4B024/GA05 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种识别诸如血液的体液中的肝细胞生长因子受体（游离HGFR）的抗体，以及使用该抗体检测和测量游离HGFR的方法。识别可溶性肝细胞生长因子受体的抗体，其中一种或多种具有以下特性的抗体用于引起器官炎症，癌症，肝病，心肌梗塞，心绞痛。可选择地，通过免疫学方法通过测量从怀疑患有血栓性疾病的患者收集的生物成分中的游离HGFR来检测上述疾病。（a）识别在体液中观察到的可溶性肝细胞生长因子受体（游离肝细胞生长因子受体），（b）在还原条件下变性的可溶性肝细胞生长因子受体 不认识。

