

(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2005-97200

(P2005-97200A)

(43) 公開日 平成17年4月14日(2005.4.14)

|                           |             |             |
|---------------------------|-------------|-------------|
| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | F I         | テーマコード (参考) |
| CO7K 16/18                | CO7K 16/18  | 4B064       |
| GO1N 33/53                | GO1N 33/53  | 4H045       |
| GO1N 33/577               | GO1N 33/577 |             |
| // C12P 21/08             | C12P 21/08  |             |

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 8 頁)

|  |  |
|--|--|
| (21) 出願番号 特願2003-334959 (P2003-334959) | (71) 出願人 503360115<br>独立行政法人科学技術振興機構<br>埼玉県川口市本町4丁目1番8号  |
| (22) 出願日 平成15年9月26日(2003.9.26)         | (74) 代理人 100110249<br>弁理士 下田 昭   |
| 特許法第30条第1項適用申請有り                       | (72) 発明者 鳥橋 茂子<br>東京都世田谷区松原3-27-7  |
|  | (72) 発明者 藤本 豊士<br>愛知県名古屋市瑞穂区下山町2-53-1  |
|  | Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CC01 CC24 CD30<br>CE04 CE06 DA13<br>4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76<br>EA50 FA72 GA06 GA10 |

(54) 【発明の名称】 消化管平滑筋のペースメーカー細胞に特異的なモノクローナル抗体

(57) 【要約】

【課題】 消化管平滑筋のペースメーカー細胞を特異的に染色する新規なモノクローナル抗体を提供する。

【解決手段】 消化管平滑筋のペースメーカー細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体であって、ホルマリン固定した場合にも免疫活性を保持し、該平滑筋層内でペースメーカー細胞以外と反応しないことを特徴とする消化管平滑筋のペースメーカー細胞に特異的なモノクローナル抗体である。このモノクローナル抗体と検体を反応させることにより従来用いられていた抗c-Kit抗体等に比べより効果的に消化管平滑筋のペースメーカー細胞を同定することができる。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

消化管平滑筋のペースメーカー細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体であって、該ペースメーカー細胞を含む組織又はその一部をホルマリン固定した場合にも該ペースメーカー細胞に対する免疫活性を保持し、該平滑筋層内でペースメーカー細胞以外と反応しないことを特徴とする消化管平滑筋のペースメーカー細胞に特異的なモノクローナル抗体。

**【請求項 2】**

検体を請求項 1 に記載のモノクローナル抗体と反応させることから成る消化管平滑筋のペースメーカー細胞を同定する方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

この発明は、消化管平滑筋のペースメーカー細胞を特異的に染色する新規なモノクローナル抗体に関する。

**【背景技術】****【0002】**

消化管平滑筋はその支配神経の作用を遮断してもなお継続する規則的な自発性収縮運動をしめす。これは消化管平滑筋に特徴的な生理現象で、血管平滑筋などには見られない。この収縮リズムを発生する細胞、即ち、ペースメーカー細胞がカハールの介在細胞 (ICC) であることが明らかにされた (非特許文献 1、2)。

また実験的にあるいは先天的にこの細胞を欠損している個体は自発性収縮運動が見られず、このために便秘や腸閉塞症状を起こすことが知られている。

カハールの介在細胞は、癌原遺伝子 c-Kit の遺伝子産物 c-Kit レセプターを発現することから、これに対する抗体 (抗 c-Kit 抗体) で同定される (非特許文献 3)。

しかし、c-Kit を発現している細胞はこの他に肥満細胞やメラノサイト (色素細胞) などがあり、特に肥満細胞は平滑筋層にも混入しているので c-Kit の免疫染色だけでは分別ができない。

また、c-Kit の過剰発現は消化管の癌 (gastrointestinal stromal tumor: GIST) を発症する。従って、GIST はペースメーカー細胞が癌化したものが多い。しかし、ヒトのペースメーカー細胞の中には、c-Kit の発現が弱くて、同定困難なものも含まれている。

これらの事情からペースメーカー細胞を認識する新たな抗体の開発はペースメーカー細胞の研究の進展と共に癌 (GIST) の細胞診断にも有用である。

**【0003】**

**【非特許文献 1】** Torihashi S. et al. Cell Tissue Research 280:97-111 (1995)

**【非特許文献 2】** Huizinga JD. et al. Nature 373:347-349 (1995)

**【非特許文献 3】** 鳥橋茂子、脳の化学, 25: 493-496, 2003

**【発明の開示】****【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

本発明は、ペースメーカー細胞を特異的に認識する新たな抗体を提供する。

**【課題を解決するための手段】****【0005】**

発明者らは、消化管平滑筋のペースメーカー細胞に対する抗体をスクリーニングした結果、抗 c-Kit 抗体とは異なる抗体を見出し、これがペースメーカー細胞を特異的に染色することを確認し、本発明を完成させるに至った。

即ち、本発明は、消化管平滑筋のペースメーカー細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体であって、該ペースメーカー細胞を含む組織又はその一部をホルマリン固定した場合にも該ペースメーカー細胞に対する免疫活性を保持し、該平滑筋層内でペースメーカー細胞以外と反応しないことを特徴とする消化管平滑筋のペースメーカー細胞に特異的なモノクローナル抗体である。

10

20

30

40

50

また本発明は、検体をこのモノクローナル抗体と反応させることから成る消化管平滑筋のペースメーカー細胞を同定する方法である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

マウス小腸筋層にあるc-Kit陽性細胞、即ち、ペースメーカー細胞を集めて、これを抗原としてモノクローナル抗体を作った。いくつかの抗体産生クローンが得られたが、ペースメーカー細胞を強く染めるクローンだけを選択した。この抗体はホルマリン固定した場合にも免疫活性を保持し、該平滑筋層内でペースメーカー細胞以外と反応しなかった。この抗体（「AIC」と呼ぶ）がペースメーカー細胞を染めることは、連続切片を作って、抗c-Kit抗体とAICでそれぞれ免疫染色して陽性細胞を一つ一つチェックして、陽性細胞が同一細胞であることを確認した。またAIC陽性細胞はネットワークを形成する細胞でペースメーカー細胞が作るネットワーク構造と一致することも確認した。

10

【0007】

即ち、本発明の抗体は以下の要件を備える。

(1) 消化管平滑筋のペースメーカー細胞と反応する。このペースメーカー細胞は抗c-Kit抗体の免疫染色により選択する。ペースメーカー細胞を選択するために他の有効な方法を用いてもよい。本発明の抗体AICを、このようにして得られた細胞に対する抗体の中からスクリーニングする。

(2) ペースメーカー細胞を含む組織（例えば、消化管）又はその一部をホルマリン固定した場合にもペースメーカー細胞に対する免疫活性を保持する。ホルマリンはタンパク質（抗原）のアミノ基と反応して、抗原の3次元構造を固める効果を持つ。その結果、通常外部に露出していたエピトープが内側に閉じ込められて抗体と結合できなくなり、その抗体は免疫活性を失うことになる。しかし、ホルマリン固定しても免疫活性を失わない抗体もある。この場合には、この抗体が反応するエピトープがホルマリン固定後にも外部に露出したままだからである。即ち、ホルマリン固定した場合に抗体AICが他の抗体（抗c-Kit抗体等）とは異なって免疫活性を保持していることは、抗体AICが反応するエピトープが他の抗体が反応するエピトープとは異なることを意味する。なお、AICが認識するエピトープは同定されていない。

20

(3) 本発明の抗体はペースメーカー細胞以外の細胞とは反応しない。ペースメーカー細胞以外の細胞として、筋層内の肥満細胞、平滑筋、神経等が挙げられる。

30

【0008】

なお、ホルマリン固定でも免疫活性を保持しているということは、古い組織（病理組織などは通常ホルマリン固定して長時間保存しておく。）にも使えることを意味する。新しい組織を使わなくても、古い組織でも免疫染色できる。さらに、ホルマリン固定した組織では微細構造が格段に明瞭で、電子顕微鏡で見ても微細構造が識別できる。また、多くの抗体がホルマリン固定の材料で免疫染色しているため、それらの抗体との二重染色ができるというメリットがある。AICはこれらの有効性を持っている。

以下、実施例にて本発明を例証するが本発明を限定することを意図するものではない。

【実施例1】

40

【0009】

マウス（BALB/c）の小腸を取り出して内容物を洗浄後、筋層を剥離した。剥離筋層をコラーゲナーゼ（和光純薬）で処理（37℃で50分）した後、ガラスピペットで物理的に組織を分解し、細胞をバラバラにした。細胞浮遊液を遠心してチューブの底に回収し、氷冷アセトンで2分固定した。固定細胞を燐酸バッファーで洗浄後、抗c-Kit抗体で4℃で一晩免疫染色し、miniMACS（Miltenyi Biotec社製）を用いて陽性細胞のみ選択的に回収した。miniMACSを使用することにより、抗体陽性細胞、即ち、ペースメーカー細胞をカラム内のマグネットビーズに一旦結合させた。カラムをマグネットからはずした後、溶出バッファーを用いて陽性細胞をビーズから解離させて回収した。

【0010】

50

得られた細胞から既報（ラットリンパ節法、重井医報 vol.16, 1-10, 1994）に従ってモノクローナル抗体を作成した。即ち、得られた細胞50 $\mu$ gを等量のアジュバンドと混合し、ラット(WKY/NCrj)の後肢パッドへ注射した。3週間後にラットの腸骨リンパ節を採集し、その中のリンパ球をポリエチレングリコールにより、ミエローマ細胞（SP2/0-Ag14）と融合させた。細胞を96穴プレートに撒き込み、融合細胞で増殖してきたものを植え継いで細胞数を増やした。

#### 【0011】

スクリーニングは以下のとおり行った。融合細胞の培養上清を採取し、マウスの腸管の凍結切片をこれによって免疫染色して、ペースメーカー細胞を染め出すものを選択した。

具体的には、未固定の腸管を凍結し、凍結切片を作成する。この切片をアセトンに2分間つけて固定し、連続する切片の1枚を抗c-Kit抗体で染色し、他の1枚を培養上清で染色した。その結果を図1に示す。 10

#### 【0012】

図1は抗c-Kit抗体及びAICによるマウス腸管筋層の免疫染色切片像を示す。A及びBはマウス胃の幽門部の連続凍結切片における免疫活性陽性の細胞を示している。AはAIC, Bは抗c-Kit抗体で染めたものである。それぞれ矢印で示された箇所は同一の細胞であることを明確に示している。連続切片であるため細かい細胞の突起は特定できないが、神経節（G）の周囲、内輪走筋のペースメーカー細胞が共通して陽性である。しかしBの矢頭で示される肥満細胞は抗c-Kit抗体では陽性であるが、AのAIC抗体では染まっていない。すなわちAICは平滑筋層内でペースメーカー細胞だけを認識する。またAICはc-Kitを認識 20

C及びDはマウス小腸の連続凍結切片における免疫活性陽性の細胞を示している。CはAIC, Dは抗c-Kit抗体で染めたものである。それぞれ矢印で示された箇所は同一の細胞であることを示している。陽性細胞は共にペースメーカー細胞の存在する外縦走筋（外）と内輪走筋（内）の間、及び内輪走筋の粘膜下層に近い部位の二箇所に限局している。

E及びFはマウス小腸の平滑筋層を膜片標本としてAICで染めたものである。Eは外縦走筋と内輪走筋の間に分布する細胞である。多極型の細胞で突起により接合してネットワークを構築するペースメーカー細胞独特の形態を示している。Fは内輪走筋の粘膜下層に近い部位の陽性細胞で、平滑筋と平行して並ぶ、この部位のペースメーカー細胞に独特の双極型細胞である。この様な膜片標本で見られるAIC陽性細胞はペースメーカー細胞に固有の形態を示し、AICがペースメーカー細胞を染めていることを支持する。 30

#### 【0013】

さらに別の凍結切片をホルマリン（実際は4%パラフォルム液）で30分固定し、培養上清で免疫染色を行った。念のために、ホルマリン固定を行った組織で作成した凍結切片でも免疫活性が残っていること、また、ホルマリン固定を行った筋層の膜片標本でペースメーカー細胞のネットワークが染色されることを確認した（図1 E, F）。

さらに、クローニングは限界希釈法により行った。即ち、細胞を96穴プレートの1穴に多くて1個の細胞が撒かれる程度まで希釈して撒き込み、凍結切片の免疫染色により、抗体を産生していることを確認しながら、最終的には1つの細胞から増えてきたクローンを得た。この限界希釈倍率法を2回繰り返して、ペースメーカー細胞に対する抗体（AIC）を産生する均一な細胞集団、クローン（細胞株）を樹立した。 40

#### 【0014】

この抗体希釈液（500-1000倍）をニトロセルロース膜に10 $\mu$ Lずつ吸着させた。これをラットの抗体サブクラス検定キット（Zymed rat MonoAB ID/SP KIT）の二次抗体と反応させた。その結果陽性反応を示した二次抗体からAICはラット、イムノグロブリンIgG 2aであると判定した。またマウス腸管の凍結切片を用いた検定も行い、同じ結果を得た。高濃度に大量のAICを得るために、クローン細胞をヌードマウスの腹腔へ注入し、高濃度のAICを含む腹水を回収した。腹水から硫酸分画と透析によりAICを濃縮精製した。

#### 【実施例2】

#### 【0015】

本実施例では、実施例 1 で得た抗体 AIC は、ペースメーカー細胞を免疫染色する抗体であるが、抗 c-Kit 抗体ではないことを示す。

図 2 は、マウス精巣の免疫染色切片像を示す。A は抗 c-Kit 抗体による染色で、ライディヒ細胞の集団 (L) と精細管で形成過程にある精原細胞や休止期の精母細胞が陽性細胞として点状に散在している。B は同様の部位を AIC で免疫染色したものである。陽性細胞は認められない。従って AIC は c-Kit を認識していない。

#### 【実施例 3】

##### 【0016】

本実施例では、マウス小腸筋層におけるペースメーカー細胞の免疫電子顕微鏡法を行った。それを図 3 に示す。A は外縦走筋 (LM) と内輪走筋 (CM) の間に分布するペースメーカー細胞を抗 c-Kit 抗体で染めている。アセトン固定を行ったために細胞質全体に免疫活性 (黒色) が拡散し、活性の細胞内局在が識別できない。かろうじてミトコンドリア (m) が同定されるが、細胞膜は破壊されている。B は同様のペースメーカー細胞を AIC で染めている。ホルマリンを含む固定液で固定しているため、細胞膜やミトコンドリア (m) の膜が明瞭で、ペースメーカー細胞に多いギャップ結合 (矢頭) も識別される。また、黒い点で同定される免疫活性はペースメーカー細胞の細胞膜にあることが明瞭に示されている。

10

##### 【0017】

#### 比較例 1

本比較例では、実施例 1 におけるスクリーニングの過程で得られた本発明の抗体 AIC 以外の抗体を用いて実施例 1 と同様に免疫染色を行った。その結果を図 4 に示す。A ~ C はそれぞれ異なる抗体を用いた。

20

A では、抗体がホルマリン固定で免疫活性が失活し、ペースメーカー細胞が染まらなくなっていることが分かる。しかし、本発明の抗体 (AIC) はホルマリンを含む固定液で固定した組織でも免疫活性を検出した。従って、ホルマリン系固定液で使用されている他の多くの抗体と AIC との二重染色が可能である。さらにこの特性は電子顕微鏡を用いた免疫電子顕微鏡法に大変有効である。AIC は免疫活性が細胞のどの部位に局在するかを調べる上で欠かせない免疫電子顕微鏡法にも使える抗体である。形態学的な使用法に対して非常に有効な抗体であるといえる。

B は、ペースメーカー細胞も染まっているが、その他に外縦走筋が染まっている。この抗原は同定されていない。

30

C は、筋層内の肥満細胞だけが染まっている。これは抗体作成の時に混入した肥満細胞に対する抗体ができたものと考えられる。肥満細胞の何を認識しているかは不明である。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0018】

【図 1】抗 c-Kit 抗体及び AIC によるマウス腸管筋層の免疫染色切片像を示す図である。A 及び B はマウス胃の幽門部の連続凍結切片における免疫活性陽性の細胞を示す。A は AIC, B は抗 c-Kit 抗体で染めたものを示す。C 及び D はマウス小腸の連続凍結切片における免疫活性陽性の細胞を示す。C は AIC, D は抗 c-Kit 抗体で染めたものを示す。矢印は両方の抗体が共通して染色していることが明瞭な細胞を示し、矢頭は肥満細胞を示す。E 及び F はマウス小腸の平滑筋層を膜片標本として AIC で染めたものを示す。

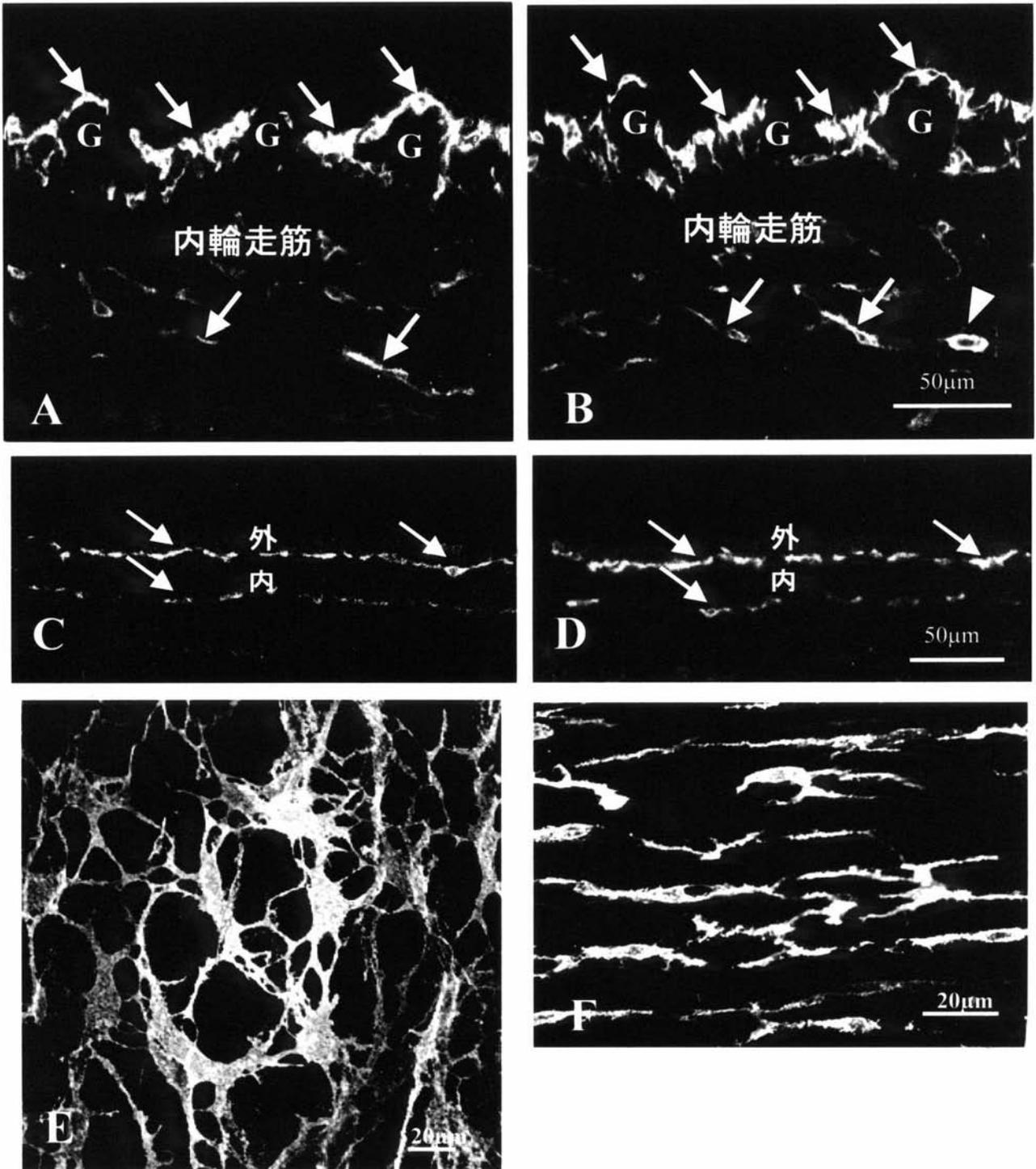
40

【図 2】マウス精巣の免疫染色切片像を示す図である。A は抗 c-Kit 抗体、B は AIC で免疫染色したものを示す。

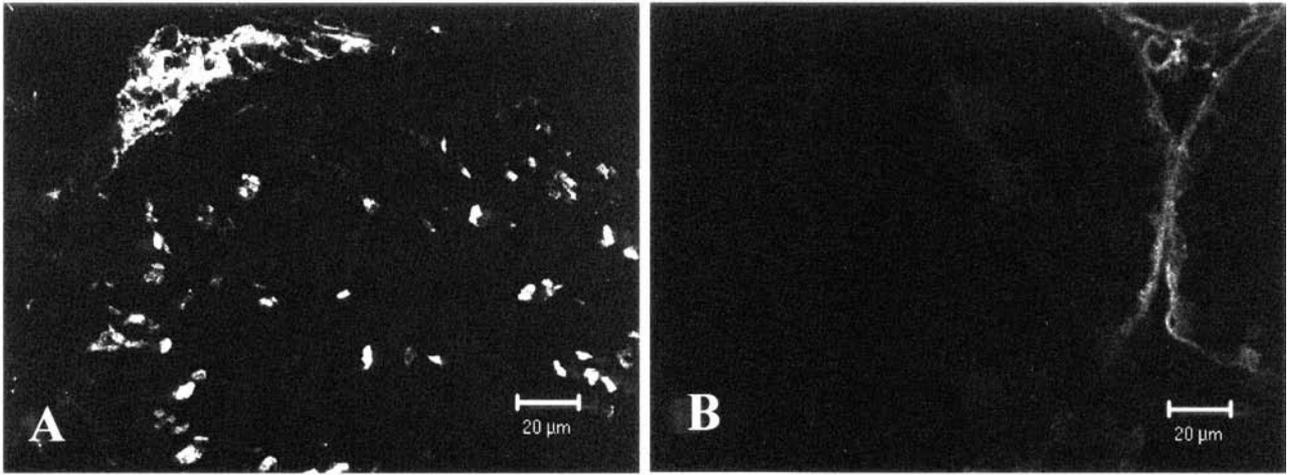
【図 3】マウス小腸筋層におけるペースメーカー細胞の免疫電子顕微鏡写真を示す。A は外縦走筋 (LM) と内輪走筋 (CM) の間に分布するペースメーカー細胞を抗 c-Kit 抗体で染めたもの、B は同様のペースメーカー細胞を AIC で染めたものを示す。m はミトコンドリアを示す。

【図 4】本発明の抗体以外の抗体を用いて行った免疫染色を示す図である。

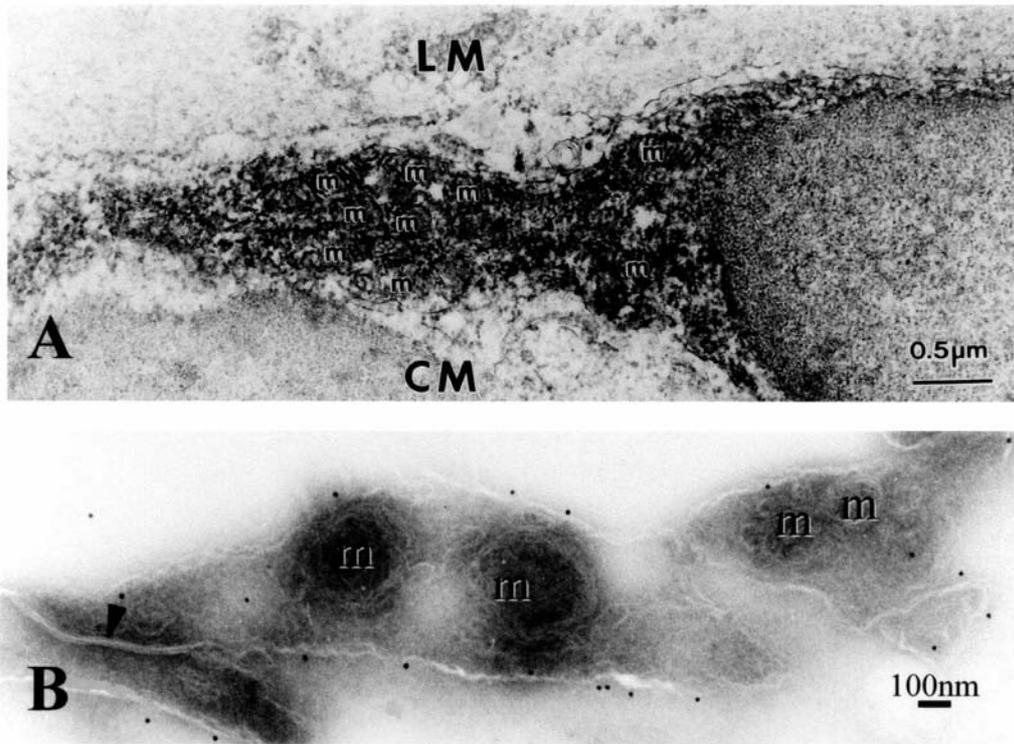
【 図 1 】



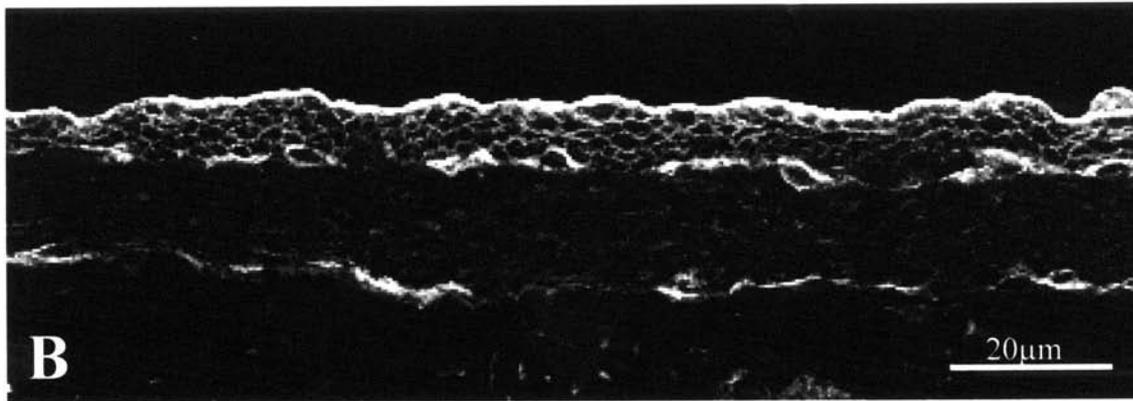
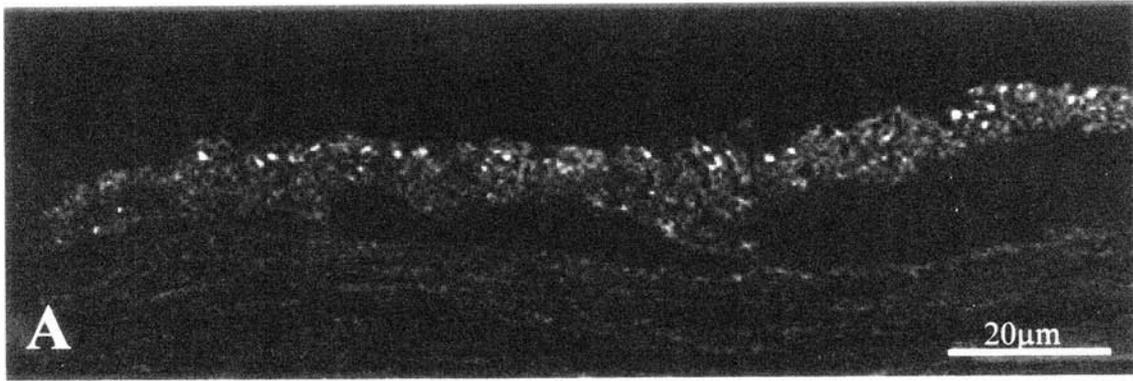
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 对胃肠平滑肌起搏细胞特异的单克隆抗体   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2005097200A</a>  | 公开(公告)日 | 2005-04-14 |
| 申请号            | JP2003334959   | 申请日     | 2003-09-26 |
| [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         | 鳥橋茂子<br>藤本豊士   |         |            |
| 发明人            | 鳥橋 茂子<br>藤本 豊士   |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/577   |         |            |
| FI分类号          | C07K16/18 G01N33/53.Y G01N33/577.B C12P21/08   |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CD30 4B064/CE04 4B064/CE06 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA06 4H045/GA10 |         |            |
| 代理人(译)         | 下田 昭   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>  |         |            |

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供一种特异性染色胃肠平滑肌起搏细胞的新型单克隆抗体。 解决方案：该单克隆抗体与胃肠道平滑肌的起搏细胞发生特异性反应，即使福尔马林固定也能保持免疫活性，并且不会与平滑肌层中起搏细胞以外的起搏细胞发生反应它是一种特异于胃肠平滑肌起搏细胞的单克隆抗体。通过使该单克隆抗体与标本反应，与常规使用的抗c-Kit抗体等相比，可以更有效地鉴定胃肠平滑肌起搏细胞。 【选择图】无