

(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2004-43486

(P2004-43486A)

(43) 公開日 平成16年2月12日(2004.2.12)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

C O 7 K 16/30

C O 7 K 16/30

Z N A

4 B O 2 4

A 6 1 K 39/395

A 6 1 K 39/395

E

4 B O 6 3

G O 1 N 33/53

A 6 1 K 39/395

T

4 B O 6 4

// C 1 2 N 15/09

G O 1 N 33/53

D

4 C O 8 5

C 1 2 P 21/08

G O 1 N 33/53

Y

4 H O 4 5

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-294484 (P2003-294484)

(22) 出願日 平成15年8月18日 (2003.8.18)

(62) 分割の表示 特願平11-376423の分割

原出願日 平成1年4月18日 (1989.4.18)

(31) 優先権主張番号 182501

(32) 優先日 昭和63年4月18日 (1988.4.18)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 297188

(32) 優先日 平成1年1月13日 (1989.1.13)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502192786

バイエル・コーポレーション

アメリカ合衆国ニューヨーク州10591

-5097, タリータウン, ベネディクト

・アベニュー 511

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫

(74) 代理人 100076691

弁理士 増井 忠武

(74) 代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74) 代理人 100080137

弁理士 千葉 昭男

(74) 代理人 100096013

弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 n e u 遺伝子産物の検出

(57) 【要約】

【課題】 腫瘍細胞中の n e u プロトオンコジーンまたはオンコジーンの増幅および過剰発現の検出方法を提供する。

【解決手段】 哺乳類起源の n e u プロトオンコジーンまたはオンコジーン中に存在するヌクレオチド配列と特異的に反応する核酸プローブを用いる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト *neu* 遺伝子産物の細胞外ドメインに特異的な単離された抗体であって、免疫原としてヒト *neu* を発現する生存細胞を用いて生成される抗体であって、但し、ヒト *neu* 遺伝子産物の細胞外ドメインはハイブリドーマ BD5 - 2 d (ATCC HB 9698) により産生されるモノクローナル抗体により認識される、抗体。

【請求項 2】

請求項 1 記載の抗体を抗腫瘍量含む、*neu* 遺伝子産物を発現する腫瘍に苦しむ患者を治療するための医薬組成物。

【請求項 3】

細胞上の *neu* 遺伝子産物の細胞発現レベルを検出するためのアッセイ法であって、
(a) 請求項 1 記載の抗体を *neu* 遺伝子産物に結合させるのに適した条件下で細胞と請求項 1 記載の抗体を接触させ；そして
(b) 細胞に結合した抗体のレベルを測定することにより細胞上の *neu* 遺伝子産物の発現のレベルを決定することよりなる、アッセイ法。

10

【請求項 4】

生物学上の液体中の *neu* 遺伝子産物の過剰発現を検出するためのアッセイ法であって、
(a) 請求項 1 記載の抗体を *neu* 遺伝子産物に結合させるのに適した条件下で生物学上の液体と請求項 1 記載の抗体を接触させ；そして
(b) そうして結合した抗体のレベルを測定することにより生物学上の液体中の *neu* 遺伝子産物の発現の量を決定することよりなる、アッセイ法。

20

【請求項 5】

液体中のヒト *neu* 遺伝子産物に関する免疫アッセイ法であって、
(a) (i) 請求項 1 記載の抗体；
(ii) 標識されており且つ *neu* 遺伝子産物の別の免疫原性領域に特異的な請求項 1 記載の二次抗体；及び
(iii) *neu* 遺伝子産物の複合体を形成させ；そして

30

(b) 工程 (a) において形成された複合体に結合した標識のレベルを検出して、それにより液体中のヒト *neu* 遺伝子産物の量を測定することを含む、アッセイ法。

【請求項 6】

ヒト *neu* 遺伝子産物の細胞外ドメインに特異的な単離された抗体であって、免疫原としてヒト *neu* を発現する生存細胞を用いて生成され、且つ、ハイブリドーマ BD5 - 2 d (ATCC HB 9698) により産生されるモノクローナル抗体 BD5 - 2 d である、抗体。

【請求項 7】

生物学上の液体中の *neu* 遺伝子産物の過剰発現を検出するためのアッセイ法であって、
(a) 生物学上の液体を、ハイブリドーマ BD5 - 2 d (ATCC HB 9698) により産生されるモノクローナル抗体 BD5 - 2 d に、抗体が *neu* 遺伝子産物に結合するのに適した条件下で接触させ；そして
(b) そうして結合した抗体のレベルを測定することにより生物学上の液体中の *neu* 遺伝子産物の発現の量を決定することよりなる、アッセイ法。

40

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

ヒト発癌の誘導に於て、体細胞の変異が重要な原因となつていことを示唆する証拠が増

50

加しつつある。これらの体細胞の変異は、それまで正常であつた細胞のゲノムに蓄積し、そのうちいくつかは悪性の増殖につながる表現型を示す。このような癌遺伝子の変異は、欠失、転座、増幅及び点ヌクレオチド変化など多くの異なるタイプのDNA構造変化を含み得る。点ヌクレオチド変化は点突然変異とも言われ、そのような変異を引き起こす変異原性の化学物質による発癌に、しばしば関与している。さらに、このような変異はDNA複製に於けるミスによつて、自発的にも生じ得る。

【0002】

点突然変異はヒト腫瘍の10 - 15%の原因に直接関与していることが示されている。これらの腫瘍は、正常な細胞のプロトオンコジーンがその遺伝子内のいくつかの場所に生じた点突然変異によつて変化した、r a s遺伝子ファミリーの癌遺伝子を持つ。これらの突然変異は腫瘍細胞ゲノムの質的变化として示され、これによつて腫瘍細胞は正常細胞と区別され、又、腫瘍の遺伝的起源を診断する基礎となる。活性型癌遺伝子を生じさせた変異を同定することは、腫瘍発生の診断上及び予後の手がかりとなる。例えば、r a s癌遺伝子の12番目のコドンには多くの変異が見つかつているが、これは通常あるべきグリシンが他の様々なアミノ酸残基に置換したことによる。これらのアミノ酸置換はそれぞれ等価ではない。ある置換（例えばバリン）は強いトランスフォーム活性をもつ一方、他の置換（例えばプロリン）は細胞の表現型にごく限られた影響を及ぼすのみである。このように、特定のヌクレオチド置換が腫瘍細胞のふるまいを強く決定付ける（例えば、増殖速度、侵襲性など）。以上のことから、変異癌遺伝子のDNAプローブは臨床腫瘍学に於ける診断用試薬として裏付けがある。

10

20

【0003】

このようなプローブは有用ではあるが、注目している遺伝子中の、点突然変異が生じ易い領域のみが同定されている。もしこのような領域が同定されなかつた場合、限られた大きさ（例えば10 - 20ヌクレオチド長）のヌクレオチドプローブを用いて、優に30,000塩基対又はそれ以上の長さをもつ遺伝子全体を検索するのは実際的ではない。例えば、もし全長33,000塩基対の遺伝子を15ヌクレオチドのプローブで検索した場合、3000 - 5000の別個のプローブが必要である。

[発明が解決しようとする課題]

【0004】

このように、変異癌遺伝子のDNAプローブは診断上の手段としての素質を持つてはいるが、癌遺伝子機能活性化の原因に関係した別個の変異領域が同定されている場合を除いては、有効に用いることはできない。変異による活性化の領域が決定されていなければ、点突然変異に対するDNAプローブの利用は非実用的である。

30

【0005】

プロトオンコジーンを増幅及び（又は）過剰発現もヒト腫瘍の原因として示唆されている。プロトオンコジーンC - m y c及びN - m y cはそれぞれ肺及び神経芽細胞での小細胞腫で増幅されている。N - m y cプロトオンコジーンは多くの第II、第III、及び第IV段階の腫瘍に於て3 - 300倍に増幅していることが見い出された。N - m y cプロトオンコジーンを増幅は、その増幅の度合いとは必ずしも比例しない、遺伝子産物の発現増加を常に伴う。より重要なことに、一次的な、未処理の神経芽細胞中のN - m y c遺伝子のコピー数は、段階にかかわらず、予後の要素として临床上重要である。（シーガーら（Seegeeret al.）、N Engl J Med., 1985; 313: 1111 - 6）ゲノム内での増幅と腫瘍の進行の早さの間には顕著な相関がある。このように、核酸ハイブリダイゼーション技術を用いたプロトオンコジーンを増幅又はそのmRNA発現の検出、或いは免疫学的手法を用いた癌遺伝子産物蛋白質の過剰発現の検出は予後のための重要な価値をもつことは明白である。

40

[課題を解決するための手段]

【0006】

この発明は細胞DNAの評価に関連し、n e u遺伝子の過剰発現又はプロトオンコジーンの活性化及び癌遺伝子への変化をもたらす遺伝子の損傷或いは増幅を含む変化が生じてい

50

るかを決定するものである。活性化変異を含む領域のヌクレオチド配列に特異的な核酸プローブが記述され、その利用法として、neuファミリー癌遺伝子の存在を決定するのに用いられることが示される。さらに、neuプロトオンコジーンmRNA及び遺伝子産物の発現レベルの決定に用いることができる。neuプロトオンコジーン又はneu遺伝子産物をそれぞれ認識する核酸プローブ及びモノクローナル抗体と、それらの使用法が記述される。

【発明の実施の形態】

【0007】

点ヌクレオチド変化又は点突然変異によつて癌遺伝子に変化した、増殖因子受容体類似の蛋白質をコードするラットneuプロトオンコジーンが決定された。この点突然変異は当初、胎盤を通じて発癌性物質（例えばエチルニトロソウレア）を作用させたラットの神経芽細胞に見られ、そのDNAがコードするp185の膜貫通領域のアミノ酸配列に影響していることが見い出された。それは、正常蛋白質のバリンがグルタミン酸残基に置換されていた。

10

【0008】

同様な点突然変異を検査するために用いた核酸プローブから、それぞれ別個に発生し、独立に腫瘍を生じさせた、さらに7つのneu癌遺伝子の存在が推測されたが、7つすべてのneu癌遺伝子に同じ活性化変異が存在することが証明された。これらの細胞では、同じアミノ酸置換（バリンからグルタミン酸への置換）が生じていた。さらに、neu遺伝子と相同な核酸を用いて分析を行つたところ、変異原のメチルニトロソウレアは神経系の腫瘍形成を誘導し、エチルニトロソウレアにより誘導された腫瘍と同じ位置でneu遺伝子の活性化を起こしていることが証明された。

20

【0009】

ヒトneu遺伝子ホモログ（c-erbB2又はHER2としても知られる）は同様な機構を通じて癌遺伝子化状態になると思われる。即ち、正常な細胞のDNA塩基配列（プロトオンコジーン）の点ヌクレオチドの変化が癌遺伝子の活性化をもたらす。ラットとヒトのneu遺伝子の塩基配列には違いがあるため、同じ変異（バリンからグルタミン酸へ）は1塩基の変化では生じない。このバリンからグルタミン酸への置換は2塩基の変化を必要とし、確率的には非常に起こりにくい。ヒトneu遺伝子のこの位置で一塩基の変化によりグルタミン酸以外のアミノ酸へ置換を起こした時の影響は、知られてはいないが、あると期待される。一方、neuプロトオンコジーンの癌遺伝子としての活性は、遺伝子の増幅又は他の要因によるneuプロトオンコジーンの過剰発現によつて活性化されるであろう。

30

【0010】

自然に生ずるヒト腫瘍の多様なDNAに於て活性化を引き起こす変化は、ヒトneu遺伝子領域に特異的に反応し、かつラットneu癌遺伝子に於て活性化を起こす変異を含む領域に対応するよう構築された核酸プローブを使うことによつて同定され得る。ヒト腫瘍細胞に於てプロトオンコジーンからneu癌遺伝子への変化の原因となる活性化点突然変異を同定することは、ヒト腫瘍DNAにneu癌遺伝子活性化の原因となる点突然変異が存在するか否かを検査するのに有効な核酸ハイブリダイゼーションプローブを作成する基礎となり得る。これらのハイブリダイゼーションプローブは細胞内でneuプロトオンコジーンやneu癌遺伝子が生じているのを検出したり、ヒト腫瘍試料での癌遺伝子活性化の概要を決定するのに用いることができる。このような核酸プローブが通常のヌクレオチドプローブ同様に記述され、それを用いて腫瘍細胞中にneu癌遺伝子が存在するか否かを検出する方法が示される。さらに、neuプロトオンコジーン又は癌遺伝子の増幅及び（或いは）過剰発現を検出するための核酸プローブも記述されている。neu癌遺伝子又はプロトオンコジーンの出現を検出するのに利用できる、neu癌遺伝子にコードされるp185蛋白質に特異的な抗体も記述されている。ヒト血清、血しょう又は尿、或いは正常な前腫瘍形成細胞又は腫瘍形成細胞のような生理溶液中でヒトneu抗原を検出するための特別な“補捉”イミユノアッセイ法が記述されている。

40

50

【0011】

n e u 癌遺伝子は最初、胎盤を通して発癌物質エチルニトロソウレアを作用させて誘導したラット神経芽細胞腫から単離された。活性化はプロトオンコジーンのパリンからグルタミン酸残基に置換させる1つの点突然変異である。n e u 癌遺伝子のヒトホモログもクローニングされ、その癌遺伝子としての能力は、2つの隣接した点突然変異が必要ではあるが、活性化したラットの遺伝子で見い出されたのと同じ変異を生ずることによつて活性化される。さらに、ヒトの遺伝子は変異による変化が全く無い場合でも、過剰発現により癌原性を示す。このことは、変異を生じていないラットのn e u 遺伝子がいかなるレベルで発現してもトランスフォーミング活性を示さないのとは著しく異なる。ヒトn e u 遺伝子活性化の第3の機構は、トランケーションによるものである。ヒトn e u プロトオンコジーンのアミノ末端が欠失した場合、トランスフォーミング活性を示す。

10

【0012】

ヒトの腫瘍形成に於けるプロトオンコジーンの関与は十分に証明されている。プロトオンコジーンが悪性過程に寄与する機構は多様である。これらの機構には、プロトオンコジーン本来の塩基配列の変化や発現の制御も含まれる。発現制御の変化は以前から存在していた遺伝子の発現増加や、遺伝子コピー数の増加（遺伝子増幅）によつて起こり得る。関与している癌遺伝子及びその活性化の様式を決定することは、診断、予後及び療法上重要な意味をもつ。最近、ヒト胸部癌に於てn e u プロトオンコジーンが増幅していることが示された。30%の胸部腫瘍で2倍から20倍以上のn e u が増幅されていた。増幅したn e u の存在は全体的な生存期間と病状のぶり返しの時間を予知する重要な指標となる（スレイモンら（S l a m o n e t a l . ）、S c i e n c e 1987；235：177 - 182）。

20

【0013】

突然変異による活性化

今日ではr a s 遺伝子を除く細胞性遺伝子が点突然変異によつて癌遺伝子に変わり得ることが知られている。最近、増殖因子受容体類似の蛋白質をコードするラットのn e u プロトオンコジーンも1個のヌクレオチド変化により癌遺伝子に変化し得ることが示された。このように、n e u プロトオンコジーン（すなわち、正常な非腫瘍細胞の正常なゲノムに存在するヌクレオチド配列）は、1個のヌクレオチド置換から、変異による活性化を経て、対応する癌遺伝子（すなわち、細胞内での発現によつて正常細胞から腫瘍細胞へと変化させるようなヌクレオチド配列）となることが示された。この点突然変異は当初、胎盤を通じてエチルニトロソウレアを作用させることにより誘導されたラット神経芽細胞腫で証明されたものであるが、個別にエチルニトロソウレアを作用させることにより独立して誘導された7個の別のn e u オンコジーンでも生じていることが示された。点突然変異の検出は、活性化変異を含むことが初めに示された領域に特異的な核酸プローブの利用によつた。すべてのケースで、同じアミノ酸置換が起こっており、コードされるp185蛋白質の膜貫通部に通常存在するパリンがグルタミン酸残基に置換されていた。この発見は、n e u プロトオンコジーンに限られた数のサイトでのヌクレオチド置換の結果、活性型癌遺伝子を生ずることを示唆している。

30

【0014】

メチルニトロソウレアにより誘導された、10個の神経系腫瘍から調製したDNAより生じたトランスフェクタントは活性型n e u 遺伝子を含み、トランスフォーミング活性をもつ遺伝子に対応するオリゴヌクレオチドプローブに対するハイブリダイゼーションの差から判断するとそれらはDNA中に同じ変化を持ち、エチルニトロソウレアによつて誘導された腫瘍に存在するのと同じ塩基配列の変化を持つと考えられた。このように、n e u 遺伝子と相似な核酸プローブはメチルニトロソウレアを作用させることによつて誘導された腫瘍中の活性型n e u 遺伝子の検出にも使用できることが示された。さらにこのことはどちらの変異原も同じ位置でn e u 遺伝子を活性化し、活性化n e u 遺伝子はBDIXラット（エチルニトロソウレアで誘導した腫瘍）及びB u f f a l o ラット（メチルニトロソウレアで誘導した腫瘍）の両方に生ずることが証明された。

40

50

【0015】

ラット neu 遺伝子に対応するヒト遺伝子が単離され、c-erbB2 又は HER2 と呼ばれている。ヤマモト, T. ら (Yamamoto, T. et al.), Nature, 319: 230-234 (1986); コーセンス, L. ら (Coussens, L. et al., Science, 230: 1132-1139 (1985)) ラット及びヒトのクローンの DNA 塩基配列から、いずれも neu 遺伝子産物の 1260 アミノ酸の蛋白質が予想される。ここではヒト neu 癌遺伝子と呼ぶが、ラット neu 遺伝子のヒトホモログの変異による活性化は同様な機構、即ちヒト neu 遺伝子内での 1 つのヌクレオチド置換又は点突然変異によつて生ずるらしい。1 つのヌクレオチド置換は、ラット neu 癌遺伝子に於て活性化変異を含むことが示された領域に対応するヒト neu プロトオンコジーンの領域で起きているということがかなり確実である。neu 癌遺伝子に特有の領域又はそれに対応する neu プロトオンコジーンに特有な領域にそれぞれ特異的に反応する核酸プローブの利用により、多様な、自発的に生じたヒト腫瘍の DNA に活性化をもたらす損傷が存在するか否かを決定することが可能である。つまり、neu 癌遺伝子又はそれに対応するプロトオンコジーンのそれぞれに (しかし、両方にではなく) 生じているヌクレオチド配列と反応 (ハイブリダイズ) するハイブリダイゼーションプローブを作成できる。そのようなプローブはヒト腫瘍 DNA に於て neu 癌遺伝子を活性化する点突然変異を検査するのに用いることができる。例えば、臨床上対象としているヒト腫瘍の neu 癌遺伝子活性化を検出するのに、サザンブロットハイブリダイゼーション法で放射線標識した核酸プローブを用いることができる。

10

20

【0016】

増幅 / 過剰発現 ヒト neu プロトオンコジーンを増幅は、ヒト neu プロトオンコジーン癌遺伝子としての性質を活性化するもう一つの機構であろう。ヒト neu プロトオンコジーンを増幅は、neu 遺伝子のいずれの部分由来のハイブリダイゼーションプローブを用いても検出できる。これらのプローブは癌遺伝子とプロトオンコジーンを区別する必要はない。このような手法は神経芽細胞腫中でのヒト N-myc 遺伝子を増幅を検出するのに有効に利用されている。いくつかの種類の腫瘍で、ヒト癌遺伝子が増幅が見い出されている。最も良く報告されているのは、神経芽細胞腫に於ける N-myc の増幅である。この遺伝子は多くの第 II、第 III 及び第 IV 段階の腫瘍で 3 - 300 倍の増幅が見い出された。さらに重要なことに、一次的な、未処理の神経芽細胞腫中の N-myc コピー数は、段階とは無関係に予後の要素として臨床上重要である。(シーガーら、N. Engl. J. Med. 1985; 313: 1111-6) ゲノムの増幅と腫瘍の進行の早さとの間には顕著な相関関係がある。遺伝子増幅を伴わない N-myc 遺伝子の過剰発現も予後に同様な関係があることを示す証拠もある。癌遺伝子が増幅は、他の種々の腫瘍でも検出されている。その中には網膜芽細胞腫 (N-myc)、急性前骨髄球白血病、結腸、胸部、肺及び胃の癌腫 (c-myc) がその他多くのものと同様に含まれる。

30

【0017】

neu 遺伝子が増幅及び / 又は過剰発現の検出はホニユウ類細胞中の癌の存在を検査するのに利用できる。増幅や過剰発現は DNA、RNA 又は蛋白質レベルで測定できる。このような検査の 1 つの具体例は、テストされる細胞から調製した核酸 (DNA 又は RNA) について、neu 遺伝子のヌクレオチド配列に相補的な、放射線標識した核酸プローブとを結合させることである。プローブは試料に存在する相補的塩基配列の neu 遺伝子とハイブリダイズする。このようなハイブリダイゼーションの程度は、オートラジオグラフィとその後の濃度計測定のような、良く知られた技術によつて測定される。対照と比較して高いレベルのハイブリダイゼーションは neu 遺伝子が増幅を示唆し、腫瘍の原因として示唆されてきた。このように、ハイブリダイゼーションのレベルは細胞中の癌の存在を暗示する。以下に示される neu 遺伝子の 1.6 キロベースの EcoRI 制限酵素断片は、neu 遺伝子の他のどの部分とも同様に、ハイブリダイゼーションプローブとして用いることができる。過剰発現の検出は、蛋白質レベルでも行われる。neu 癌遺伝子にコードされる p185 蛋白質はそれに対応するプロトオンコジーンにコードされる蛋白質とは

40

50

異なり、このため、これらの蛋白質中の、変化した又は正常なアミノ酸配列に特異的なポリクローナル抗体やモノクローナル抗体などの血清学的試薬を開発することが可能である。これらの試薬は、変異や変化を起こした遺伝子産物を検出することにより、neu癌遺伝子が存在するか否かを高感度で検査するのに用いられ得る。血清学的試薬を用いて、免疫組織化学技術により細胞表面の、又、イミユノアツセイ技術により生理学溶液中のneu遺伝子にコードされる蛋白質を検出できる。これらの検査には、前述のアミノ酸配列又はneuがコードする産物のアミノ酸配列の一部に特異的な抗体が用いられる。免疫ペルオキシダーゼ染色法のような免疫組織化学技術により、ヒト組織標本（例えば生検試料）のneu遺伝子の発現を検査できる。或いは、免疫蛍光法も用いられる。これらの検査では、neu遺伝子産物に特異的な抗体は、抗体がneu遺伝子産物に結合するのに適当な条件下で、組織試料（細胞）と接触する。好ましい抗体はneu遺伝子産物の細胞外ドメインに特異的なものである。細胞に対する結合の程度（標準的な免疫組織化学又は免疫蛍光技術により決定できる）は、neu遺伝子産物の発現レベルを示唆する。

10

20

【0018】

免疫学的検査法で、生理的溶液中でneu遺伝子産物を検出できる。それらはコンペティティブアツセイや免疫学的計量法（放射免疫計量法又は酵素計量法）による検査を含む。生理的溶液（即ち、血液、唾液）はテストするべき検体から調製する。試料中の抗体とneu遺伝子産物の複合体形成ができる条件下で、試料をneu遺伝子産物に特異的な抗体と接触させる。複合体形成（抗体／抗原反応）の程度は試料中のneu遺伝子産物の量を示唆する。抗体－抗原複合体の量は広く知られている方法によつて測定する。例えば、免疫計量法では、抗体／抗原複合体の定量に二次標識抗体が使われる。

【0019】

血清や体液中のヒトneu抗原を検出する免疫計量法検査は、正常な前腫瘍形成及び腫瘍形成細胞中のものと同様に、実施例7Aから7Cに記述されている。"捕捉"免疫検査法は、実施例に詳細に記述されているように行い、概略的には、その方法に従つて行つたヒト生理溶液中のヒトneu抗原を検出するための捕捉イミユノアツセイは次のようなものを含む。

a．モノクローナル又はポリクローナルの抗neu一次抗体で固相のインキュベーション混合液を用意する。

b．抗neu抗体が固相に結合するのに適した条件で混合液をインキュベーションする。

c．液体試料から固相を分離し、抗neu抗体を含まない固相上のサイトを排除（即ち、ブロッキング）する。

d．抗neu抗体を含む免疫吸収剤とneu抗原を含む、ヒト生理溶液のインキュベーション混合液を用意する。

e．溶液中のヒトneu抗原が免疫吸収剤と結合するのに十分な時間、適当な条件でインキュベートする。

f．液体試料から免疫吸収剤を分離する。

g．免疫吸収剤を標識した抗neuモノクローナル二次抗体とインキュベートし、h．良く知られた技法を用いて免疫吸収剤に結合したラベルの量を検出する。

【0020】

特に、neu抗原は実施例7に詳述される新しい捕捉イミユノアツセイにより検出できる。簡単に述べれば、生物標本からneu抗原を捕捉する目的で、ポリスチレンプレートを抗neuモノクローナル抗体又は抗neuモノクローナル抗体の化合物でコートする。一度コートした後は、捕捉抗体と結合しないサイトは緩衝液のウシ血清アルブミンでブロッキングされる。neu抗原を含む又は含む疑いのある試料をインキュベートし、ビオチン標識した抗neu抗体が加えられる。ビオチンを検出するため、ストレプトアビジンホースラディツシユペルオキシダーゼ溶液を酵素の基質と共に加え、反応産物の光学密度を測定する。neu抗原の量は試料の光学密度を、予め測定しておいた標準neu抗原の量とその光学密度との関係と比較することにより決定する。この検査法により、三重の複合体が形成され、それらは、1) 抗neu一次抗体 2) neu遺伝子産物（"neu抗原"）及び

40

50

3) 抗 n e u 二次抗体から成る。この二次抗体は複合体形成前又は後で標識される。標識は良く知られたいずれかの方法で抗体に直接又は間接に付けられる。例えば、抗体とビオチンの複合体を形成させ得る。本発明のイミユノアッセイは一次抗体が抗 n e u モノクローナル抗体でも、抗 n e u モノクローナル抗体の混合物でも或いは抗 n e u ポリクローナル抗体でも n e u 抗原を検出できる。

【0021】

複合体はそれが固相に固定される以前に形成され得る。他の体系を用いれば、複合体は形成されると同時に固相に固定され得る。好ましい検査に於いては、n e u 遺伝子産物は、それを特異的に"捕捉"又は結合する免疫吸着剤に固定される。この免疫吸着剤は n e u 遺伝子産物のあるイデオトープに特異的な抗体の付着によつて形成される。このように、ほとんどの目的で、免疫吸着剤及び標識抗体の形成に2つの異なる抗 n e u 抗体が用いられる。

10

【0022】

捕捉アッセイはフオワード、リバース及び同時のモードで行える。n e u 遺伝子産物に対するフオワード捕捉アッセイでは、抗 n e u 抗体は固相に付けられる。テストされる液体試料は免疫吸着剤とインキュベートされる。インキュベーションは液体試料中の n e u 遺伝子産物が、免疫吸着剤上に固定された抗 n e u 抗体に結合するのに十分な時間行われる。この最初のインキュベーションの後、固相の免疫吸着剤を試料から分離する。液体試料中に存在する可能性がある非結合抗原や非特異的結合蛋白質のような阻害物質を除去するため、免疫吸着剤を洗浄する。固定された抗体に結合した、n e u 抗原を含む免疫吸着剤は、続いて、標識抗 n e u 抗体とインキュベートされ、固定化抗体 - n e u 抗原 - 標識抗体の三重の複合体を形成する。インキュベーションは標識抗 n e u 抗体が n e u 抗原に確実に結合する時間と条件で行われる。二度目のインキュベーションの後、固相の免疫吸着剤から結合していない標識を除くため、もう一度洗浄する。固相の免疫吸着剤に結合した標識抗 n e u 抗体を測定し、検出されたラベルの量は液体試料中に存在した n e u 抗原の量の直接の測定結果を与える。

20

【0023】

このサンドウィッチ型のイミユノアッセイはリバース及び同時のモードでも行うことができる。リバースモードでは、インキュベーション混合液は検査される液体試料と可溶性の標識抗 n e u 抗体から成る。混合液をインキュベートし、同じ或いは異なる抗体を持つ固相の免疫吸着剤に接触させる。さらにインキュベートした後、混合液から免疫吸着剤を分離し、液体試料中に存在した n e u 抗原の量を示す、免疫吸着剤に結合したラベルを測定する。同時モードでは、インキュベーション混合液は測定される n e u 抗原を含む液体試料と、標識抗 n e u 抗体、及び固相の免疫吸着剤より成る。三重の複合体を形成させる適切なインキュベーションの後、混合液から固相の免疫吸着剤を分離し、免疫吸着剤に結合したラベルを測定して液体試料中の n e u 抗原の量のデータを得る。

30

【0024】

腫瘍の治療 n e u

遺伝子産物に特異的な抗体は腫瘍の治療に用いることができる。治療としては、抗体は単独で受動免疫療法に、又は免疫毒の一成分として用いることができる。受動免疫療法では、腫瘍に対抗する量のモノクローナル抗体を生理学的に適切な媒体(例えば、通常の塩水)に入れて、n e u 遺伝子産物を発現する腫瘍に苦しむ患者に投与する(実施例8を見よ)。例えば、n e u 遺伝子産物の細胞外ドメインに特異的な抗体が腫瘍の治療に用いられる。免疫毒療法では、抗体は抗癌剤やサイトトキシンと結合させて免疫毒を作る。多様な医薬、細胞毒性をもつ試薬が共有結合又は非共有結合で抗体と結合できる。便利な治療用試薬の例としては、放射性化合物(例えばホウ素やレニウムの同位元素)、アルキル化剤や抗生物質のようなDNA結合試薬(例えばダウノマイシン、アドリアマイシン、クロラムブチル)、代謝阻害剤(例えば、メトトレキサート)、及び蛋白質合成阻害剤(例えば、ジフテリア毒素、毒性植物蛋白質)などを含む。ここに記述した治療上の利用には、n e u 遺伝子産物に対する抗体はキメラ抗体として設計することもできる。キメラ抗体は

40

50

ヒト以外（例えばマウス）の可変領域（抗原結合領域）とヒト由来の不変領域をもつ。キメラ抗体はヒト由来の部分が優勢なため、ヒト体内で免疫原性は低く、ヒトへの外来蛋白質の投与に伴う諸問題を解消し得る。

この発明は、さらに以下の実施例で説明される。

【実施例】

【0025】

実施例 1: neu cDNA クローンと neu 遺伝子産物の単離

A. neu 遺伝子族

周産期の B D I X ラットに、アルキル化剤であるエチルニトロソウレアを 1 回投与する事により神経外胚葉性腫瘍が高い効率で生起される。ラジユースキー, M. F. ら、O r i g i n s o f H u m a n C a n c e r, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー, 709 - 726 (1977); ラジユースキー, M. F., R e c e n t R e s u l t s i n C a n c e r R e s e a r c h 84: 63 - 76 (1983)。妊娠 15 日後に胎盤経由で変異処理を行うか、誕生後 10 日間にわたってエチルニトロソウレアを直接注射した動物の 95% は、投与量および株ごとの潜伏期を経た後、中枢および末梢神経系の腫瘍を誘起するだろう。これらの腫瘍由来のこれらの腫瘍および細胞系列は、広範な種類の神経細胞およびグリア細胞タイプの特徴を示す。シュバート, D., N a t u r e, 294: 224 - 227 (1974)。この細胞タイプの、独立に由来した 4 つの腫瘍細胞系列から単離した DNA は N I H 3 T 3 フォーカス形成アッセイにおいて検出され得る活性化されたガン遺伝子を含んでいる。このアッセイで検出されるガン遺伝子の大部分は、r a s 遺伝子に密接に関連した 3 つのうちのひとつが、遺伝的に変化したものである事が示されている (バーマス, 1984)。しかし、これらの神経/グリア芽腫由来の遺伝子は r a s 遺伝子に関連しておらず、neu と呼ばれている。neu は、はじめ、トランスフェクトした細胞表面に示される 185000 Da の腫瘍抗原 p185 との結合より、特異な遺伝子である事が認められた。neu は、上皮成長因子 (EGF) 受容体をコードする。e a r B 遺伝子の DNA 配列に関連しており、EGF 受容体に対する抗血清が p185 といくらかの交差反応性を示す。しかし、詳細な分析により、neu は、e a r B に対してごく限られた相同性しかもっており、この 2 つの遺伝子が異なる染色体上に位置する事が示されている。シエクター, A. L. ら、S c i e n c e, 229: 976 - 978 (1985)。したがって、neu 遺伝子は、EGF 受容体をコードする遺伝子に関連しているが、異なるものである。neu ガン遺伝子の cDNA クローンは、この遺伝子によりトランスフォームされた細胞系列から単離した。バーグマン, C. I. ら、N a t u r e, 319: 226 - 230 (1986)。ヒトのこれと同じ遺伝子も単離されており、c - e r b B あるいは H E R 2 など、様々に呼ばれている。これらラットおよびヒトクローンの DNA 配列は、neu 遺伝子のタンパク質産物が 1260 アミノ酸からなることを推定し、これは、EGF 受容体で推定されるアミノ酸配列に対し並列的であり、50% 同一である。EGF 受容体からの類推により、neu 産物は、650 アミノ酸のシステインが豊富な細胞外領域および、膜貫通ドメイン、チロシンキナーゼドメイン部分を含む 580 アミノ酸の細胞内領域からなる膜貫通タンパク質と考えられる。p185 タンパク質に関する生化学的研究はこの結論を支持している。p185 は、グリコシル化されており、無傷の細胞においても抗血清と反応する事ができ、これは、このタンパク質が細胞表面に局在する事に合致する。また、このタンパク質は、関連するチロシン特異的タンパク質リン酸化活性を有している。しかし、p185 は EGF を結合せず、そのため未同定の成長因子に対する受容体ではないかと考えられる。

B. ラット neu 遺伝子の正常型およびトランスフォーム型アリルクローンの単離

ラット neu 遺伝子の正常型およびトランスフォーム型アリルの、生物学的に活性のあるゲノムクローンが最近単離された。ハング M. - C, ら、P r o c e e d i n g s o f t h e N a t i o n a l A c a d e m y o f S c i e n c e s , U . S . A ., 83: 261 - 264 (1986)。これらのクローンの構造的比較からは、大幅な組換えが起きたという証拠は一切示されず、このことは、わずかな遺伝的改変が neu ガン遺伝

10

20

30

40

50

子の活性化の原因である事を示唆している。正常型アリルを含むトランスフォームされていない細胞および、変異型アリルを含むトランスフォームされた細胞系列において発現された p 1 8 5 の 相 対 的 レベルが示され、これは、n e uの活性化の原因となる改変は、この遺伝子の発現の調節を失わせないことを示唆するものである。この結果はトランスフォームの原因がコードされている p 1 8 5 タンパク質内にあり、それはこの遺伝子の c D N A において示されるであろう。

C . 正常型 n e u 遺伝子の c D N A クローンとトランスフォーム型 c D N A クローンの比較

n e u 遺伝子の活性化の原因となる改変の効果を調べるために、すでに単離されていたトランスフォーム型 c D N A クローン、エチルニトロソウレアにより誘導された 3 種の異なる活性型 n e u 遺伝子由来の D N A、および n e u 正常型アリルの c D N A クローンの比較が行われた。

正常型 n e u c D N A クローンの単離

まず、正常型 n e u c D N A クローンを単離することが必要とされた。そのために、細胞系列 D H F R G 8 由来の R N A を用いて c D N A を構築した。ハング M . - C , ら、Proceedings of the National Academy of Sciences, U . S . A . , 83 : 261 - 264 (1986)。D H F R 細胞系列は、ラットの B D I X 株由来の完全な正常型 n e u 遺伝子を含むゲノムコスミドクローンを、N I H 3 T 3 細胞にトランスフェクトすることにより作成された。これらの細胞は、トランスフェクトした遺伝子から高レベルの n e u 遺伝子産物である p 1 8 5 と高レベルの n e u R N A を発現する。c D N A クローンは S 1 スナツプバック法で、ターミナル・トランスフェラーゼを用いて d C T P によりテイリングし、d G テイルをもつた p B R 3 2 2 の P s t I 部位に挿入することにより作成された。n e u プローブと反応する 3 0 個の組換え体プラスミドが単離された。これらのプラスミドクローンは、制限酵素地図により、活性型 n e u ガン遺伝子の全長 c D N A クローンと比較された。これらの正常型 c D N A クローンは、すでに同定されているトランスフォーム型 c D N A クローンと共通の配列をもっているが、どれも n e u の全コード領域を含んではいなかった。しかし、n e u の全コード領域を含むクローンは、ユニークな N a e I 部位を共通にもつ、部分的に重複した 2 つのクローンを i n v i t r o で組換えることにより構築された。これにより生じたクローンの 5 ' 末端について、n e u がコードする p 1 8 5 タンパク質に対する開始コードの存在を調べるためにその配列を決定した。第 1 図に示されるように、この正常型 n e u クローンを p S V 2 発現ベクターに挿入して p S V 2 n e u N を作成した。マリガン , R . C . ら、Nature, 277 : 108 - 114 (1979) B 1 0 4 - 1 - 1 細胞系列由来のトランスフォーム型 n e u c D N A クローンは、活性型ラット n e u 遺伝子の 2 次トランスフェクタントであるが、これを p S V 2 に挿入して p S V 2 n e u T と呼ばれるプラスミドを構築した (第 1 図)。p S V 2 n e u T は、N I H 3 T 3 細胞あるいは R a t 1 繊維芽細胞におけるフォーカス形成アッセイにおいて高い活性を示した。このアッセイは、トランスフェクションによつて細胞に導入された D N A 分子が、単層で生育しているこれらの細胞をトランスフォームした状態に転換し、その子孫が、細胞単層上に形態的にトランスフォームした細胞の集塊あるいはフォーカスを形成せしむ能力を測定するものである。しかし、同様に p S V 2 ベクターに挿入された正常型 n e u c D N A を同一の条件で N I H 3 T 3 細胞にトランスフェクトした場合、フォーカスはいつさい観察されなかった。

トランスフォーム型細胞および非トランスフォーム型細胞による、p 1 8 5 産生の比較。

p S V 2 n e u N および p S V 2 n e u T プラスミドを含む細胞系列は、p S V 2 n e o (以下、n e o - r マーカーと呼ぶ) とのコトランスフェクションおよび G 4 1 8 の選択により単離された。サザン , P . J . と P . バーク , Journal of Molecular and Applied Genetics, 1 : 327 - 341 (1982)。p S V 2 n e u T を発現している細胞系列は、形態的にトランスフォームし、レフラクタイルになる ; p S V 2 n e u N を含む細胞系列は、形態的には偏平で非トランスフォ

10

20

30

40

50

ーム型である。これらの細胞系列を³²P正リン酸により代謝的に標識し、その細胞破碎液をラット neu 遺伝子産物を特異的に沈澱させるモノクローナル抗体とともにインキュベーションした。第2B図のレーン c, d および i に示されているように、標識された p 185 のレベルは、トランスフォーム型細胞と非トランスフォーム型細胞とで同等であつた。この結果は、neu は発現の非調節化というよりはむしろ、コード領域における突然変異によつて活性化されることを示唆する初期の研究と合致するものである。ハング M. - C, ら、Proceedings of the National Academy of Sciences, U. S. A., 83: 261 - 264 (1986)。

【0026】

実施例 2: neu 遺伝子の遺伝的解析

10

A. neu 遺伝子の活性化の原因となる DNA 配列の同定

pSV2 neu T クローンのトランスフォーム活性を担う配列の同定は、このクローンと正常型アリルを担う pSV2 neu N との組換え体を用いることにより行われた。この組換え体は、クローン化された適当な DNA 断片をライゲーションする事によつて構築された。第1図は、活性化型変異を担う neu の領域を明らかにする一連のクローンの構造を示している。ここに示されるそれぞれの組換え体クローンの構造は、制限酵素地図によつて評価された。各例において、少なくとも2つの単離されたプラスミドに関して、NIH 3T3 細胞を形態的にトランスフォームする能力を試験した。全ての組換え体クローンは、neo - r マーカーとともにコトランスフェクションされ、得られた G418 耐性コロニーの形態が記録された。形態的にトランスフォームしていないコロニーは、獲得した cDNA クローンから、構造的に無傷の p 185 タンパク質を発現していることを確認するために試験された。クローン pSV2 neu F および pSV2 neu B は、正常型クローンの残りの部分の配列に融合したトランスフォーム型クローンの、それぞれ、はじめの 719 と 1899 ヌクレオチドを含んでおり（第1図）、それらは p 185 の合成を指示することができるにもかかわらずトランスフォーム活性を示さなかつた。この遺伝子の 5' 末端からヌクレオチド 2387 まではトランスフォーム型 neu 配列を含み、それ以後は正常型 neu 配列を含むクローン pSV2 neu H は、トランスフェクションによりフォーカスを形成し、もとの pSV2 neu T クローンによつて形成されるコロニーと区別できないトランスフォームしたコロニーを生ずる。pSV2 neu C もまた、トランスフォーム能をもつていた。これは正常型 neu 遺伝子のヌクレオチド 2337 からヌクレオチド 3534 までの Xba I 断片を含み、これにより対応するトランスフォーム型 cDNA の部分が置換されている。この結果は、正常型 cDNA とトランスフォーム型 cDNA が、ヌクレオチド 1889 から 2337 の間の配列において異なっており、トランスフォーム型クローン中にこの配列が存在することがトランスフォーメーションに必須であることを示している。この配列がトランスフォーメーションの生起に充分であることを証明するために、相互的コンストラクトである pSV2 neu TN と pSV2 neu NT（第1図）が構築され、NIH 3T3 細胞および Rat I 繊維芽細胞へのトランスフェクションによつて試験された。pSV2 neu TN は、Nde I と Bgl I により規定される、正常型 neu クローン由来のヌクレオチド 1899 から 2387 を除いてはトランスフォーム型 cDNA 全長を含んでいる。pSV2 neu NT は、トランスフォーム型クローン由来の配列により置換された、対応する 488 ヌクレオチドを除く全長の正常型 neu cDNA 配列を含んでいる。比較実験において、pSV2 neu NT はもとのトランスフォーム型クローンである pSV2 neu T と同等の数のフォーカスを与え；pSV2 neu TN、pSV2 neu N および偽トランスフェクションでは、フォーカスはいつさい見られなかつた。この実験は、正常型とトランスフォーム型クローンの間の、基本的な遺伝的差異はこの 488 ヌクレオチドからなる断片に存在することを示している。第2図に示されているデータはこれらの結論を指示するものである。pSV2 neu プラスミドと選択 neo - r 遺伝子のコトランスフェクションにより単離された G418 耐性細胞系列は、第2A図に示されている。pSV2 neu TN および pSV2 neu N を含む系列は、形態的に偏平で、neo - r 遺伝子のみでトランスフェクションした系列と区別する

20

30

40

50

ことができない。それとは対照的に、pSV2neuNTおよびpSV2neutを含む細胞は、非常にレフラクタイルで、形態的にお互い極めて類似している。これらの細胞系列は³²P正リン酸により代謝的に標識し、その細胞破砕液を抗p185モノクローナル抗体16.4とともにインキュベーションした。ドレピン, J. A. ら、Nature, 312: 545 - 548 (1984)。第2B図は、pSV2neuN (レーンcとd)、pSV2neut (レーンi)、pSV2neutN (レーンeとf) およびpSV2neuNT (レーンgとh) を含む典型的な細胞系列で発現しているp185のレベルを示している。正常型およびトランスフォーム型cDNAが単離された細胞系列であるDHF RG8とB104-1-1細胞 (レーンbとj) 由来の細胞破砕液についても分析を行った。それぞれの細胞クローンは広範なp185レベルを示すが、正常型およびトランスフォーム型細胞両方においてp185発現が似た範囲にあることは明かである。neo-マーカークローンのみでトランスフェクションした系列において、p185は全く見いだされない (レーンa)。したがって、これらの細胞における相違は、それらが発現しているp185の性質に関する。内在性の違いによると説明されねばならない。

10

B. 正常型neuアリルと活性型neu遺伝子を区別する変異の定義

トランスフォーム型neu cDNAのコード領域の完全なDNA配列が決定されている。バーグマン, C. I. ら、Nature, 319: 226 - 230 (1986)。この2つのアリルを区別する厳密な変異を定義するために、ヌクレオチド1899から2387の間の領域のDNA配列が正常型neu cDNAについて決定された。この配列とすでに決定されていたトランスフォーム型クローンの配列の間には、ただ1つの違いしか見つからなかった。ヌクレオチド1012の位置に、発ガン遺伝子型クローンではAが存在するが、一方、正常型はこの位置にTをもつていた。この結果、コードされるp185の残基644に存在することが推定されるアミノ酸が影響を受ける；正常型タンパク質で見られるバリンが発ガン型では、グルタミン酸によつて置換されている。第3図は、正常型neu遺伝子とトランスフォーム型neu遺伝子両方について、ヌクレオチド1968から2073のDNA配列および推定されるアミノ酸配列を示している。予想される変異は、neu遺伝子産物p185で推定される膜貫通ドメイン内に帰属している。neuの正常型およびトランスフォーム型アリルのゲノムクローンは、すでに単離されている。これらのクローンはcDNAにみられるヌクレオチドの相違を見るために独立に用いられた。このような共同研究からのデータは、cDNAで観察される差異が、cDNAクローニングにおいて生じたものである可能性を除外するために役だっている。この2つのアリルをゲノムからサブクローニングし、配列を決定することにより、同様なTからAへの置換がこれらのゲノムクローンにおいても存在することを確認した。これは、TからAへの変換という変異がB104神経芽細胞腫瘍あるいは細胞系列を生成する際に、体細胞において生起することを示している。

20

30

【0027】

実施例 3: neuガン遺伝子の活性化

A. 独立のneuガン遺伝子活性化の決定。

初期の結果は、6つの神経/グリア芽種細胞系列の内、4つから調製したDNAがNIH 3T3フォーカス形成アッセイにおいて活性型のneuガン遺伝子を示すことを明らかにしていた。シー, C. ら: Nature, 290: 261 - 264 (1981)。これら6つの細胞系列はエチルニトロソウレアを用いて、BDIXラット胚を胎盤を介して変異源処理することによつて得られたものである。これらの独立な活性型neu遺伝子は、それらが同じ活性型変異を含んでいるかで評価された。これらのneu遺伝子を含むトランスフェクタント由来のDNAについて、neu遺伝子のひとつあるいは他のアリルを優先的に認識する核酸プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。この方法は、ras遺伝子の種々の活性型アリルを同定する際に用いられ、成功している。ボス, J. L. ら、Nature, 315: 726 - 730 (1985)；ザーブル, J. ら、Nature, 315: 382 - 385 (1985)。neu遺伝子の野生型あるいは変異型neuいずれかの配列に対応する核酸が合成された。これらの2つの20-merの配列が

40

50

第4図に示されている。これらの20-merを、次に、適当な制限酵素で切断したDNAを含む、乾燥したアガロースゲルに対して厳しい条件（完全な2重鎖について計算されたTmよりも2 低い温度）下でハイブリダイゼーションさせた。野生型配列に対応する20-merは、pSV2neutにハイブリダイゼーションする場合に比べ、pSV2neuNに対し約10倍強くハイブリダイゼーションした。それとは対照的に、トランスフォーム型アリル由来の配列をもつ核酸は、同じ比率で優先的にpSV2neutとハイブリダイゼーションした。DNAは、上述の4つの独立な活性型neuガン遺伝子をもつたトランスフェクタントから単離され、HindIIIで切断した。それにより生じた断片を1%アガロースゲルで分離した。このアガロースゲルを、第4図で示される、上述のクローン化されたDNAの分析で用いられたものと同じ条件下でインキュベーションした。DHFR G8からのDNAは、正常のゲノムneu遺伝子をゲノムあたり約50コピー含んでおり、対照として含まれている。第5A図は、トランスフェクタントDNAと野生型配列に対応する核酸とのハイブリダイゼーションを示している。DHFR G8 DNAに強いシグナルが現れ、これは導入された正常型neu遺伝子のものである（レーンb）。neuでトランスフォームしたトランスフェクタントDNA（レーンc-f）および、トランスフェクションしていないNIT 3T3細胞（レーンa）を含むレーンに有意な弱いシグナルがみられた。第5B図は、変異配列を含む核酸をプローブとして、同じゲルについてハイブリダイゼーションを行つた結果を示している。DHFR G8 DNAはこのプローブとわずかに弱く反応したが（レーンb）、neuによりトランスフォームしたトランスフェクタントDNA（レーンcからf）は、いずれもこのプローブにより強いシグナルを生じた。レーンdに示されているトランスフェクタントDNAは、トランスフォームに用いた遺伝子の3'末端が欠けているために、他のトランスフェクタントよりも小さいneu-相同HindIII断片をもっている。野生型のプローブとトランスフェクタントとの反応性の低さは、同じプローブを用いたクローン化pSV2neutの分析の際に見られるシグナルと同程度であるため、（第4図のレーンbとdを、第5A図および第5B図にあるレーンc-fと比較のこと）このプローブの交差反応性に起因するものであろう。DNAのロード量とトランスフェクタントのコピー数によるシグナル強度の違いを調節するために、5Bのゲルからプローブをはがし、neu遺伝子の異なる部分由来の核酸プローブを用いて再びハイブリダイゼーションを行つた。トランスフェクタント細胞系列はトランスフェクションの際の種々の増幅により、異なるコピー数のラットneu遺伝子を含んでいるかもしれない。このハイブリダイゼーションの結果は第5C図に示されている。第5A図、第5B図、第5C図において、それぞれ対応するレーンと比較すると、全てのneuガン遺伝子トランスフェクタントは、野生型プローブに比べ変異型プローブと強いハイブリダイゼーションを示し、変異型プローブとそれらのハイブリダイゼーションの程度は、種々のDNA中に存在するneu遺伝子のコピー数と良い相関を見せることが判る。このデータは、調べられた活性型neu遺伝子は、全て同一のヌクレオチドの位置で改変をもっていることを強く示唆するにもかかわらず、全ての例において変異が同一のTからAへの転換を含んでいるのかは明かではなかつた。TからGへの転換は、それにより野生型核酸とA/Gのミスマッチを生じ、変異型核酸とは比較的安定なG/Tミスマッチを生ずるために、おそらく同じハイブリダイゼーションのパターンを与えるだろう。この可能性を調べるため、第4図に示される配列をもつた第3の20-merを合成した。この核酸は、第5A図で分析したゲルから初めに用いたプローブを除去した後に、このゲルとハイブリダイゼーション条件下でインキュベーションした。この核酸は、厳しい条件下ではトランスフェクタントDNAと優先的にハイブリダイゼーションしなかつた（第5D図）。したがって、これらの活性型neu遺伝子それぞれにおける改変は、おそらく同じTからAへの転換であろう。点突然変異は腫瘍形成時に生じ、そのため、ラットゲノムに最初から存在していた多型性、あるいはトランスフェクション過程における活性化を反映しているわけではないこともまた確証された。DNAは、BDIXラット肝および、BDIXラットに由来し、トランスフェクションアッセイにおいて活性型neu遺伝子を与える4種のラット腫瘍細胞系列から単離された。2連でゲルを作成し、野

10

20

30

40

50

生型核酸あるいは変異型核酸いずれかをプローブとして用いた（第6図）。BDIX肝DNAは野生型核酸と良く反応したが、変異型核酸とは反応しない（第6図、レーンaとf）。これとは対照的に、4つの腫瘍細胞系列は変異型核酸とのみ反応した（第6図、レーンb-eおよびi-l）。このことは、ヌクレオチド2012でのTからAへの転換は、腫瘍あるいは腫瘍細胞系列の生成時に生じたことを示している。また、腫瘍細胞系列は、neu遺伝子の活性型アリルに関してヘミ接合あるいはホモ接合型のようなものである。正常型アリルの欠失が腫瘍形成時あるいは、腫瘍細胞系列の途上で起こるのかも知れない。正常型rasアリルの同じ様な欠失あるいは発現の低下はこれらのras遺伝子の発ガン型を含むいくつかの腫瘍、および腫瘍細胞系列で観察されている。カボンら Nature, 304: 507-513 (1983); ジエレロ, Iら Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 82: 7810-7814 (1985)。

10

【0028】

neuの多様な独立の活性化

見かけ上ランダムに作用する試薬により刺激することによる化学的発ガンは、それにより生じた腫瘍細胞中に特異的な遺伝的变化をしばしばもたらす。neuは、分析されたトランスフォーム型neuアリルの4種それぞれにおいて、同一のヌクレオチドの変化によつて活性化されているようである。これらのアリルはそれぞれ、アルキル化試薬であるエチルニトロソウレアを胎盤経由で与えることにより生じた、神経芽細胞腫あるいはグリア芽細胞腫から単離された。シュバート, D.ら、Nature, 249: 224-227 (1974)。neuは、関連したアルキル化試薬メチルニトロソウレアによつて生じた、4種の独立の神経系腫瘍においても同じ残基で活性化されている。メチルニトロソウレアによる、Buf/Nラットにおける乳ガンの生起に関する、同じ様な広範な研究により、約100例の独立に生じた腫瘍にはすべて、残基35で同一のGからAへの転換によつて活性化されたH-ras発ガン遺伝子が含まれていることが示されている。スクマー, S.ら、Nature, 306: 658-661 (1983); ザーブル, H.ら、Nature, 315: 382-385 (1985)。活性化の特異性に関するそのほかの例には、遺伝的に感受性のSencarマウスにおける、ジメチルベンザトラセンにより誘導された乳頭腫が活性型H-ras遺伝子を有していることや、ガンマ線照射あるいはメチルニトロソウレアにより誘導される胸腺リンパ腫が、それぞれトランスフェクション能をもつK-rasおよびN-rasを生ずるなどの例が含まれている。バルメイン, AとI. A. プラグネル、Nature, 303: 72-74 (1983); グレロ, I.ら、Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 81: 202-205 (1984)。前者で検出されるK-ras発ガン遺伝子は調べた4つの腫瘍のうち少なくとも3つにおいて同じ活性型変異を有しているようである。異なる条件下での、同じ変異誘起剤、つまりメチルニトロソウレアの投与が、乳腺腫瘍ではH-rasを特異的に活性化し、胸腺リンパ腫ではN-rasを、神経外胚葉腫ではneuを特異的に活性化する点は興味深い。グレロ, I.ら、Science, 225: 1159-1162 (1984)。これらの腫瘍をそれぞれ誘導する催奇剤は、はじめ、細胞のDNAに広範な損傷を与えるはずである。しかし、最終的に検出される変異は極めて特異的である。明らかに、多段階のガン化過程において、強力な生物学的な圧力が、確立した腫瘍中で観察される遺伝的損傷を担った細胞の成長に選択的に働くはずである。細胞内の遺伝子のわずかな部分のみが生物学的に活性な発ガン遺伝子に転換され得るようである。これらの遺伝子のひとつでは、多くの可能な変異のいくつかのみがトランスフォーム活性をもつた発ガン遺伝子を生ずる。発ガン遺伝子を生ずる相対的にまれな変異は、まず腫瘍に対し選択的な優位性をもつていなくてはならないために、また後に、フォーカス形成アッセイにおいて検出され得るために濃縮されるのである。ひとつの腫瘍型における特異的な損傷が繰り返し現れることにより、可能な活性型変異の間で他の選択圧も存在することが示唆される。活性型変異の性質は、催奇剤の化学的反応性によつて強い影響を受ける。例えば、胸腺腫を誘起するために用いられた異なる変異誘

20

30

40

50

起剤は、生じた腫瘍において異なる遺伝子の活性化を引き起こす。同様に、ジメチルベンズアントラセンによつて誘起された乳ガンは、メチルニトロソウレアによつて誘起されたものとは異なる特異的な改変を含んでいる。前述の神経芽細胞腫を誘起する薬剤である、エチルニトロソウレアの反応性はDNAに多数の異なる副次的障害を形成させる。シンガー、B.とJ. T. カスマーレク、Annual Review of Biochemistry, 52: 655 - 693 (1982)。これらのうち、GからAへの転移を起こす障害については、詳しい記載がなされている。ラジユースキー、M. F., Recent Results in Cancer Research, 84: 63 - 76 (1983)。こういった変異は、関連した催奇剤であるメチルニトロソウレアによつて誘起された乳ガンの、H - ras 発ガン遺伝子中の活性型障害として繰り返し見いだされている。ザープル、H. ら、Nature, 315: 382 - 385 (1985)。しかし、ここで述べている変異はTからAへの転換であり、その生起は、これらのアルキル化剤の投与の後に形成される多くの別の損傷を含む、他の機構によつて説明されねばならない。この種の変異は先例がないわけではない：生殖系列の変異誘起処理後に単離された、他の2つのエチルニトロソウレアによつて生じた変異もまた、TからAへの転換であることが示されている。ポツプ、R. A. ら、Genetics, 105: 157 - 167 (1983)；ルイス、S. E. ら、Proceeding of the National Academy of Sciences, U. S. A., 82: 5829 - 5831 (1985)。メチルニトロソウレアによつて誘導されたリンパ腫から単離したN - ras 発ガン遺伝子は、CからAへの転換によつて活性化されていることが見いだされており、これは、アルキル化剤によつて誘起されるいくつかの異なる付随的障害が、変異を起こし得ることを示唆している。グレロ、I. ら、Proceedings of the National Academy of Sciences, U. S. A., 82: 7810 - 7814 (1985)。

【0029】

実施例 4：核酸プローブを用いたneu発ガン遺伝子の検出

A. neu 遺伝子に相同な核酸プローブを用いたバツファロー・ラット由来の腫瘍DNAに関する検討

スクマーとバーバシッド（米国国立ガン研究所、ベセスダ）は、活性型neu 遺伝子を含む10種のメチルニトロソウレアによつて誘起された述経系腫瘍を単離した。これらの腫瘍DNAから得られたトランスフェクタントは、これらのneu 遺伝子中の変異が、すでに記載のある腫瘍で見つかるものと同じであるか決定するために検定された。これは以下のようにして行われた；10種の独立な活性型neu 遺伝子を含む14のトランスフェクタントが第7図に示されている（トラック1 - 14）。ゲルを2連で作成し、上述の核酸プローブにより検索した。すなわち、それらは、正常型（第7図、上）あるいはトランスフォーム型遺伝子に相当する核酸（第7図、下）により検索された。NIH DNA（トラックN）、DHFRG8 DNA（トラックG）（高コピーの正常型neu 遺伝子）、B104 - 1 - 1 DNA（トラックB）（高コピーのトランスフォーム型neu 遺伝子）および、活性型neu 遺伝子を含まない2つのバツファロー・ラット腫瘍（トラックc1とc2）が対照として含まれていた。トランスフェクションされたneu 遺伝子は全て、上述のトランスフォーム型neu c DNA クローンが取られた細胞系列である、B104 - 1 - 1 DNA と同じ改変をもつていた。トランスフォーム型遺伝子に対応した核酸に対するハイブリダイゼーションの違いに基づいて、トランスフェクションしたneu 遺伝子は、B104 - 1 - 1 neu 遺伝子と同じ配列の変化を有していると推定される。これらの結果は、この核酸によつて検出される活性型neu 遺伝子に関する、10種の独立な事例を与えるものであり；第2の変異誘起剤であるメチルニトロソウレアが、エチルニトロソウレアと同様な機作でこの位置においてneu 遺伝子を活性化に導いたことを示し；活性型neu 遺伝子がBDIXラットと同様に、バツファロー・ラットにおいても生じることを示している。

【0030】

B. オリゴヌクレオチドによる変異導入

オリゴヌクレオチドによる変異導入は、通常アミノ酸の第664番目に見いだされるバリン残基をグルタミン残基に置換するために用いられた。この変異 n e u 遺伝子を発現ベクターに挿入し、受容細胞にトランスフェクションあるいは感染させると、生じた安定な細胞系列は100%ガン化した。(それとは対照的に、アミノ酸第664番目にバリン残基を含むタンパク質をコードする正常型 n e u 遺伝子(ガン原遺伝子)でトランスフォームした受容細胞は、0.1%がガン化しただけである。)したがって、グルタミン酸と同様に、第664番目のグルタミンもまたトランスフォーム型 n e u 遺伝子を生じ、グルタミンを認識する核酸プローブで検出される変異は、トランスフォーム型変異であることが予想される。第664番目におけるアスパラギン酸への置換は、ガン化していない細胞へトランスフェクションあるいは感染することにより、受容細胞の2-3%にガン化した形質を生ずる。これは、ガン化を生起するためには、その変異と共に、過剰発現を伴わねばならないような弱いトランスフォーム型の n e u 遺伝子アリルを表していると考えられる。

10

【0031】

C. ヒト n e u 遺伝子における活性型変異の同定

すでに記載された実験と同様に、この点に関する議論は、ラット n e u 発ガン遺伝子の活性化の原因となる点突然変異に関連しているが、ヒト腫瘍細胞DNAにある、それに相当するヒト n e u 遺伝子における活性型変異の同定と、n e u 発ガン遺伝子(あるいは、それに相当するガン原遺伝子)の存在の検出に同様な研究方法を用いることは可能である。例えば、ラット n e u 発ガン遺伝子の活性化の原因である点突然変異を含むことが示されている領域に相当する、ヒト n e u 遺伝子の領域と特異的に反応する核酸プローブを構築することが可能である。構築可能なプローブの例としては、n e u 発ガン遺伝子とそのガン原遺伝子の間で異なる、1ヌクレオチドに基づいたものであり、この1ヌクレオチドの改変は、n e u ガン原遺伝子を活性型発ガン遺伝子に転換する原因である。これらのプローブは、どのような長さのものも可能であるが、一般に15から20ヌクレオチド長であり、ラット n e u 発ガン遺伝子について上述されたように、腫瘍細胞ゲノムを分析し、n e u 発ガン遺伝子中に損傷(変異)があるかを決定し、またその正確な配置を決定するために用いることができる。

20

【0032】

D. n e u 発ガン遺伝子の存在の検出 n e u

ガン原遺伝子から n e u 発ガン遺伝子への変異を引き起こすガン化を検出するためのアッセイは、ガン原遺伝子あるいは発ガン遺伝子中に存在し、他のものには存在しない(あるいは転写される)ヌクレオチド配列に対し特異的な、標識された核酸を用いることからなるものである。ヒト細胞におけるガン化のアッセイは、検定する細胞からDNAを単離し、このDNAを、発ガンあるいはガン原遺伝子のDNA配列のいずれかに特異的な、標識したポリヌクレオチドプローブと接触させ、その後、どちらのプローブがDNAにハイブリダイゼーションしたかを決定することによって行うことができる。放射性同位体により標識すると、これらのプローブは、例えば点突然変異の生起などについて、腫瘍細胞DNAを検定するためのサザンブロット法に用いることができる。このタイプのアッセイは、ヒト腫瘍DNA中で活性化されている発ガン遺伝子の性質を決定するための診断法として、臨床的に用いることができる。このアッセイ法は、n e u 族遺伝子の1ヌクレオチドの改変を検出することができ、アッセイされる腫瘍細胞に関して極めて決定的な情報を供給することができるため、非常に特異的なものとなるだろう。これらのプローブを用いるための試薬は、キットに収めることが可能である。したがって、キットは、プローブに加え1種以上の緩衝液、プローブの標識試薬および、サザンあるいは他のブロットに用いる試薬などを含むだろう。発ガン遺伝子によりコードされる産物から、ガン原遺伝子によつてコードされる産物タンパク質のアミノ酸配列へ変化するために、特異的な血清試薬によつてもそれぞれを検出することが可能である。この血清試薬は、タンパク質のこの部位において、正常型の n e u ガン原遺伝子に特定されるアミノ酸配列に特異的なものか、あるいはタンパク質のこの部位において、改変された発ガン遺伝子を特定するアミノ酸配列に特

30

40

50

異的なものを用いることができる。改変されていないタンパク質の領域と反応し、その結果、コードされたタンパク質の正常型あるいは異常型と反応できるような、他の血清学的試薬も用いることができる。クローニング技術を用いることにより、ガン原遺伝子の正常な部位、あるいは発ガン遺伝子の改変された部位によつてコードされる、有意な量のタンパク質を単離することができる。このような部分的タンパク質は、通常の抗体生産法によつて抗体を生産するために用いることができる。したがつて、ポリクローナル抗体を生産するために、このようなタンパク質が、ウサギあるいはラットなどの宿主を免疫するために用いられ、このタンパク質に対する抗体は宿主から得られる血清から回収されるだろう。別の用法としては、ハイブリドーマ細胞を形成する典型的な細胞融合法により、単離された遺伝子部分によつて産生されるタンパク質に対する抗体を生産する細胞を用いることによつて、モノクローナル抗体を生産することができる。基本的には、これらの技術は、抗体産生細胞を不死性を有するミエローマ細胞などと融合し、不死性と求められる抗体（この場合、単離された遺伝子部分によつてコードされる、正常型あるいは改変型タンパク質部分に対する抗体）を産生することのできる融合雑種細胞を与えることを含んでいる。この雑種細胞は、次に抗体産生を促す条件下で培養され、その後、抗体は細胞培養液から回収される。モノクローナル抗体産生のためのこのような技術は、文献に詳しく記載されている。参照するものとしては、例えば、ヒラリー・コプロウスキーらによつて提出された、米国特許第4,172,124号明細書および第4,196,265号明細書などがあり、これから得られた点については参考文献に加えられている。

10

20

30

40

50

【0033】

実施例5：ヒト neu 遺伝子のクローニング

ヒト neu 遺伝子は、高レベルの neu RNA を発現している2つの頸部ガン細胞系列（SW1710、ME180）の poly A + RNA 由来のラムダ gt11 cDNA ライブラリーからクローニングされた。ラット neu チロシンキナーゼドメインの1300 bp Pst I 断片を、SW1710 cDNA ライブラリーを検索するためにプローブとして用いた。2つの組換え体ブランクが、制限酵素部位の分析と部分的な配列決定により、ヒト neu として同定された。組換え体配列は、ヌクレオチド849から始まり、neu タンパク質のはじめの225から1255アミノ酸全てをコードしている。ヒト neu 遺伝子の、この欠けた領域は、SW1710 neu cDNA クローンの5' EcoRI 断片をプローブとして用いて、ME180 cDNA ライブラリーから単離された。この2つのクローンの、サブクローニングされた領域とヒト neu 遺伝子の全長の構成を表した図は、第8図に示されている。

【0034】

A. neu 発現ベクターの構築

neu をコードする全配列を、発現ベクター pLJ（ロバートら、1985, J. Virol., 56:404-413）および、pMax（無条件でバーナード・マシユー・ブレボットから譲り受けた、第9図に示されている）にクローニングした。これらのベクターはどちらも、neu 遺伝子をモロニー・ミューリン・白血病ウイルスプロモーターおよびエンハンサー（LTR）による転写調節下に置いている。pLJベクターでは、SV40プロモーターから neo^R も発現されている。

【0035】

B. 膜貫通領域の点突然変異の構築

オリゴによる変異の導入は、アマシヤム社のサイトーダイレクテッド・ミュータゲネシス・キットを用い、以下のオリゴヌクレオチドを用いて、キットの指示にしたがって行い、CTGCGGTGGAGGGCATTC TG この中で、下線を施したヌクレオチドは正常型ヒト neu アリルと異なるものである。点突然変異の存在は、デイファレンシヤル・ハイブリダイゼーションおよび、プロメガ社の2重鎖配列決定キットを用い、キットの指示にしたがって配列を分析することによつて決定された。

【0036】

C. 短縮された neu アリルの構築

p M α x ベクターは、第 9 図に示されるように、ポリリンカーに唯一の切断部位を有する N c o I により切断し、クレノーにより末端を埋めて平滑末端とした。C A T G C A T C G A T C の配列をもつ 12 塩基対の S p h I リンカー (N . E . B # 1 1 1 5) をこの部位に挿入し、ポリリンカー中に唯一の P p h I 部位を導入した。この特定のリンカーは、3 つの読み枠全てに翻訳開始シグナル (A T G) を与えるために選ばれた。これによつて生じたベクターは、p M α x - S p h として第 9 図に示されている。p M α x - S p h は、S p h - I 部位と X h o I 部位 (いずれもポリリンカー内) で切断された。遺伝子のまさに 5 ' の膜貫通領域から、3 ' 末端の n e u c D N A を含む、2 2 2 5 塩基対の S p h I / S a l I 断片が、ヒト n e u c D N A 全体を含むプラスミド (第 9 図では p A b T 5 6 5 として示されている) から単離された。制限酵素によつて切断されたベクターおよび単離された断片は、ライゲーションされ、バクテリア株 H B 1 0 1 にトランスフォーメーションされた。これにより生じたプラスミドは第 9 図に示されており、p M α x デルタ n e u あるいは p A b T 5 0 1 1 と呼ばれている。

10

【 0 0 3 7 】

D . 細胞のトランスフェクション

n e u を発現するベクターは、通常のリン酸カルシウム法によつて N I H 3 T 3 細胞にトランスフェクションされた。簡単に述べると、第 1 日目は、細胞を 1 0 c m の組織培養皿当たり、 5×10^5 プレーティングする。2 日目は、細胞に再び栄養を与え、4 時間後に D N A の沈澱を加え、細胞を 6 時間インキュベーションし、再度栄養を与える。後日、細胞を G 4 1 8 を含む培地に分配し、1 0 - 1 4 時間インキュベーションする。N I H 3 T 3 D N A をキャリアーとして用い、p S V - 2 n e o を選択マーカーとして用いた。

20

【 0 0 3 8 】

E . R N A の単離

細胞の全 R N A は、グアニジウム・イソチオシアネート / C s C l 法により単離された。培養中の細胞から R N A を単離する際には、溶解緩衝液 (4 M グアニジウム・イソチオシアネート、5 0 m M T r i s - H C l p H 7 . 5、1 0 m M E D T A、0 . 5 % ザルコシル、0 . 1 M B M E) を組織培養皿に直接加えた。凍結組織を開始材料とするときは、組織を溶解緩衝液中で、組織ホモジナイザー (バイオスペック・プロダクツ I N C .) によつて直接ホモジナイズした。次に、細胞溶解液を 1 8 ゲージの注射針に通し、S W 5 0 . 1 ベックマン・ポリアロマー・チューブに作成した 1 . 2 m l の 5 . 7 M C s C l、0 . 1 M E D T A 溶液上に重層した。これを、3 5 , 0 0 0 r p m で最低 1 2 時間遠心する。つぎに、R N A ペレットを 1 % S D S を含む T E に再溶解する。

30

【 0 0 3 9 】

F . ハイブリダイゼーションプローブ

細胞外ドメインの一部と、膜貫通ドメインおよびチロシン・キナーゼドメインのわずかな部分を含む 1 . 6 k b の E c o R I 断片を、第 1 0 図に示されるように、プロメガ社の p G E M デュアル・トランスクリプション・ベクターにサブクローニングした。ハイブリダイゼーションに用いるための標識した R N A 転写物は、プロメガ社の指示にしたがって作成した。

【 0 0 4 0 】

G . R N A スロット・プロット分析

R N A 試料は、 $6 \times S S C$ 、7 . 4 % ホルムアミドにより $1 \mu g / m l$ に希釈され、6 5 で 1 5 分間加熱し、その後氷上に置かれた。スロット・プロットは、S S S スロット・プロット装置と、制作社の指示にしたがって供給されているプレカット B A 8 5 ニトロセルローズ・シートを用いて行われた。フィルターは、あらかじめ水、次に $10 \times S S C$ で浸潤させ、2 0 0 μl の容量において、2 0 0 n g / スロットから開始して、2 倍希釈系列として R N A を加えた。スロットを次に 2 0 0 μl の $10 \times S S C$ で洗い、フィルターを真空オーブンで、8 0 で 2 時間加熱した。次に、このフィルターを $10 \times S S C$ で浸潤させ、ハイブリダイゼーション緩衝液 (5 0 % ホルムアミド、 $5 \times S S C$ 、5 0 m M リン酸ナトリウム、2 5 0 $\mu g / m l$ サケ精子 D N A、 $5 \times$ デンハルト) 中で 2 時間プレ

40

50

ハイブリダイゼーションを行つた。次に、ハイブリダイゼーション溶液をヒト neu に特異的な、 $1 - 2 \times 10^6$ c m p / m l の、変性させた³²P 標識 R N A プローブを含む新しい溶液と交換した。このフィルターを次に、65 で一晩インキュベーションした。翌朝、このフィルターを、0.1 × S S C、0.1 % S D S、80、20 分間、3 回洗つた。

【0041】

H. ヒト neu アリルのクローニングとトランスフォーム活性試験

高レベルの neu R N A を発現する頸部ガン細胞系列から作成された2つの c D N A ライブラリーは、ラット neu c D N A のチロシン・キナーゼドメイン由来のプロープによりスクリーニングされた。制限酵素地図および、部分的な配列データと発表されたデータとの比較から、このスクリーニングから単離された、もともとのクローンから構築された、本来のヒト neu クローンの同一性が確認された。このヒト neu c D N A は、つぎに L T R により発現されるベクターに移された。このヒト neu コンストラクトによりトランスフェクションされた細胞は、ヒト乳ガン細胞系列 S K B R - 3 によつて発現されたヒトの本来の neu と区別できない、185,000 Da のタンパク質を発現した。この正常型ヒト neu クローン(第10図に示される p M a x neu)を N I H 3 T 3 細胞にトランスフェクションすると、それらはガン化した。これは、ラット neu 遺伝子について記載されたデータと完全に対照的なものである。ラットでは、発現レベルにかかわらず、正常型ラット neu アリルはトランスフォーム活性をもたなかつた。これより低いレベルで neu を発現する、他の発現ベクターにおける正常型ヒト neu 遺伝子の発現は、N I H 3 T 3 細胞にガン化を引き起こさなかつた。しかし、もし、ヒト neu 遺伝子が、ラットにおいてグルタミン酸に転換されたバリンと相同なアミノ酸に変異を生じたなら、この遺伝子はどの発現ベクターにおいても細胞をガン化するだろう。短縮したヒト neu アリルをどちらかの発現ベクターにより発現すると、これもまた N I H 3 T 3 細胞をガン化する。これらの結果は、デイ・フィオリら、Science, 1987; 237: 178 - 182 によつて報告されたものと一致する。要約すると、正常型 neu に関してはより高い発現レベルが必要とされるが、正常型および変異型ヒト neu アリルはいずれも、N I H 3 T 3 細胞をガン化することができる。

【0042】

I. ヒト細胞系列および乳ガンにおける neu R N A レベルの分析

細胞の全 R N A は、グアニジウム・イソチシアネート法により、種々のヒト細胞系列および乳ガンから単離された。次に、R N A をヒト neu に特異的なプロープ、すなわち、細胞外ドメインの一部、膜貫通ドメインおよびチロシン・キナーゼドメインの一部を含む 1.6 k b の E c o R I 断片を用いたスロット・プロット分析にかけた。また、全ての R N A 試料は、フィルター上にある R N A 量を補正するために、アルファ・チューブリンを用いてハイブリダイゼーションした。ヒト乳細胞系列 H B L 100 (A T C C H T B 124) は、対照として用いられ、全ての結果は、H B L 100 との相対的なレベルを表している。E. ガフニー、Cell Tissue Res., 229: 563 - 568 (1982)。 neu の発現レベルは、H B L 100 のレベルの1から64倍まで変動した。これらの結果は第1表に示されている。

【0043】

10

20

30

40

【表 1】

第 1 表

種々の細胞系列における neu 特異的 *RNA*
の発現レベル

ヒト細胞系列	<u>neu</u> レベル
<i>HBL</i> - 100	1 X
<i>ME</i> 180	8 X
<i>SW</i> 1710	4 X
<i>MKN</i> - 7	3 2 X
<i>SK</i> - <i>BR</i> - 3	6 4 X
<i>A</i> - 431	1 - 2 X
<i>BT</i> - 483	8 X

10

20

トランスフェクションしたマウス系列

18 - 3 - 7	++++
------------	------

NIH 3T3

1 X

30

HBL - 100 は、授乳期の母親の母乳由来の上皮細胞系列である。*ME* 180 は、頸部ガン細胞系列である。*SW* 1710 は、頸部ガン細胞系列である。*MKN* - 7 は、腸ガン細胞系列である。*SK* - *BR* - 3 は、胸部の腺腫である。*A* - 431 は、上皮性ガン細胞系列である。*BT* - 483 は、胸部の輸送管腫である。18 - 3 - 7 は、neu でトランスフェクションした *NIH* 3T3 細胞である。この結果は、すでに発表されている結果（クラウスら、EMBO, 1987; 6: 605 - 610）と同様であつた。われわれはまた、ヒトの一連の初期乳ガンにおける neu の *RNA* レベルも分析した。われわれは再び、第2表に示されるように、対照の1から128倍の範囲にわたる広範な neu の発現レベルを見いだした。

40

【0044】

【表 2】

表 2

乳腫瘍試料由来の neu 特異的 RNA レベルの定量

	試 料	<u>neu</u> RNA レベル	
1.	6-8-6-86	128	
2.	8-11-20-86	64	10
3.	6-10-15-86	16	
4.	5-11-13-86	16	
5.	9-9-10-86	16	
6.	12-9-12-86	8	
7.	5-10-10-86	8	20
8.	8-8-7-86	8	
9.	1-7-7-87	8	
10.	5-9-3-86	4	
11.	4-2-4-87	4	
12.	6-6-12-87	2	
13.	12-12-17-86	2	30
14.	13-9-15-86	2	
15.	21-2-27-87	2	
16.	4-12-5-86	1/2	
17.	11-12-15-86	1/8	
18.	10-1-23-87	1/8	40

ハイブリダイゼーションの結果は、 ^{32}P neu プローブを用いたドット・プロットハイブリダイゼーションにおける、全細胞 RNA の連続的希釈を用いて決定した。数値は、チューブリンプロブを用いたハイブリダイゼーションにより、全 RNA 量に対して補正を施した。レベルは、正常な乳細胞系列 HBL-100 を 1 倍とした相対値である。上述のように、レベルは HBL-100 に対する相対値で表され、チューブリンの発現に関して補正されている。

【0045】

実施例 6. : neu 特異的モノクローナル抗体の作製

A. ハイブリドーマの作製

後に記すハイブリドーマは、n e u癌遺伝子にコードされた全長のタンパク質を発現している生細胞（後に記す18-3-7細胞系統）を用いてマウスを免疫処理することにより得られた。このことはモノクローナル抗体産生に関して、他のアプローチとは重要な違いである。生細胞により提示された全長タンパク質を免疫原として用いることで、そのタンパク質の細胞質外ドメインの全体に及ぶ特異性をもつモノクローナル抗体を収集することができるのである。このことは、もとのタンパク質から、限られた数のエピトープしか、提示できず、それ故に限られた特異性の免疫反応を上げるという、ペプチドの免疫原や、原核生物のシステムにより作られた短いポリペプチドを用いるのとは反対のものである。更にタンパク質の抗原を本来の状態として提示することにより、その免疫システムは、後にその抗体を診断あるいは治療上の応用に用いる時に見られるであろうものと非常によく似た抗原とも反応してくれることだろう。

10

【0046】

B. 18-3-7細胞の作製

18-3-7細胞は、ヒト乳癌細胞系統のSKBR-3と同じかそれ以上の水準で、全長の通常のヒトn e uを発現しているトランスフェクトされたNIH3T3細胞系統である。ヒトn e u遺伝子はネズミ白血病ウイルスLTR（プロモーター及びエンハンサー）によつて発現している。この細胞系統は形質転換されたNIH3T3細胞の全ての特徴を示す。それは、軟寒天でも成長し、ヌード・マウス（*n u d e m o u s e*）で腫瘍を形成するし、変わった形態学的特徴も示す。この細胞系統を、抗n e u特異的モノクローナル抗体の単離のための免疫原として用いた。pLJレトロウイルスのベクター（*p L J r e t r o v i r a l v e c t o r*）を改変して、ポリオーマ（*P o l y o m a*）の初期領域を取り除くことで、pLJベクターの内因的な形質転換活性を排除した。改変したベクターの構成を図11に示す。改変は、pLJをApaIで制限酵素処理して、6300塩基対の断片を分離して、それをT₄リガーゼ（*T₄ l i g a s e*）で再び環状にすることとなされた。その結果できたプラスミド（pデルタLJ = *p Δ L J*もしくは*A b T 5 0 0 9*；図11参照）を唯一のBamHIサイトで分解し、クレノー（*K l e n o w*）でフィル・イン（*f i l l i n*）して、ヒトn e uタンパク質のコーディング領域全体をもつNcoI-HindIIIをフィル・インした断片とライゲーションさせた。その結果できたプラスミド（*p Δ L J n e u*もしくは*p A b T 5 7 7*；図11参照）をカルシウムリン酸-沈澱法によりNIH3T3細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞をG418（*p Δ L J*はSV40でプロモートされるネオマイシン耐性遺伝子（*S V 4 0 p r o m o t e d n e o^R*）を持っている）で選択した。そのコロニーをRNAドットプロット（*R N A d o t b l o t s*）によりn e u発現性に対し、スクリーニングにかけた。18-3-7はスクリーニングしたおよそ50のうちで最も高い発現細胞の1つであつた。

20

30

【0047】

C. マウスの免疫処理

一匹あたり、 1.4×10^6 のNIH3T3生細胞を用いて、雌バルブ・シーマウス（*B a l b / c m o u s e*）の成体2匹を腹膜組織内で（*i n t r a p e r i t o n e a l l y = I . P .*）免疫処理した。これに続き、すぐにシクロホスファミド（*c y c l o p h o s p h a m i d e*）水溶液（ $30 \text{ mg / kg H}_2\text{O}$ ）をI.P.に注射した。シクロホスファミド処理は最初の注射から24、48時間後にくり返された。免疫処理後14日目に、 1.5×10^6 の18-3-7生細胞をマウスにI.P.で注射した。更に14日間休ませた後、再び、NIH3T3細胞、シクロホスファミドそして18-3-7細胞の注射という一連の操作をくり返した。2回目の18-3-7細胞の注射後4日後にその動物は犠牲にされ、その脾臓が、最初の融合用に採られた。これとはまた別に、4匹の雌バルブ・シーマウスと4匹の雌のCB6（*B a l b / c \times C 5 7 B L / 6*）マウスを用いて初めのラウンドは一匹あたり 1.8×10^6 のNIH3T3細胞、 4.8×10^6 の18-3-7細胞を2回目では 8.5×10^6 のNIH3T3細胞、 2.7×10^6 の18-3-7細胞を免疫処理に用いて、全く同じ実験を行なつた。

40

50

【0048】

D. ハイブリドーマの方法論

ハイブリドーマは、免疫処理されたマウスからの細胞をSP2/0 骨髓腫細胞 (myeloma cell) とをポリエチレングリコール (polyethylene glycol = PEG) 法に従って融合させることにより作られた。脾臓を免疫処理したマウスから無菌的に採取して、脾臓を無血清培地 (DME) で培養することにより、脾臓細胞の単細胞懸濁液 (single cell suspension) を得た。脾臓細胞とSP2/0 細胞 (対数相 (log phase) 培養液より採取) を、脾臓細胞：骨髓腫細胞 = 5：1 の比でまぜあわせた。それを $200 \times g$ で4 にて10 分間遠心して上清を吸引により取り除いた。チューブの底を軽くたたくことで、細胞のペレットを緩めた後、1 ml の滅菌した37 の10% PEG/DME 溶液を一滴ずつ加えた。1.5 分以上の間隔で、PEG を加えながら、チューブを穏やかに振った (swirl)。更に37 の無血清DME 10 ml を一滴ずつ加えて、その後、更に20 ml の培地を加えた。それから懸濁液を $200 \times g$ で室温下10 分間遠心した。培地を吸引により、細胞のペレットから取り除き、20% の胎児ウシ血清、0.2 mM ヒポキサンチン (hypoxanthine)、0.4 μ M アミノプテリン (aminopterin)、0.032 mM チミジン (thymidine) の存在下で腹膜のマクロファージを含む (2×10^4 細胞/ml) 培地 (HAT 培地) を用いて、細胞のペレットを再び懸濁した。(腹膜のマクロファージは、融合して用いられる細胞に従って、Balb/c またはC57 の免疫処理をしていないマウスから得た。注射してすぐに無血清培地を安楽死させた動物の腹膜へ移すことで、こうした細胞が得られた。) 融合後の細胞を(腹膜マクロファージを含めないで) 最終細胞濃度で 5×10^5 細胞/ml に再び懸濁した。この細胞混合液の1 ml を24 ウェル・プレート (well plate) の各ウェル (well) に分配した。

10

20

【0049】

E. エライザ (ELISA) の手順と予備のスクリーニング

融合操作後、成長したハイブリドーマについて、18-3-7 細胞の細胞ライセート (cell lysate) 上でエライザアッセイにより、抗 ne u 抗体の分泌に対するスクリーニングを先ず行なつた。新しく採取した18-3-7 細胞を低張性の溶解緩衝液 (10 mM トリス、10 mM KCl、5 mM EDTA、pH 8.0) 存在下で培養することにより、ライセートを調製し、その後トライトン X-100 (Triton X-100) を最終濃度1% になるように加えた。NIH3T3 細胞のライセートを負のコントロールとして用いるため、同様に調製した。マイクロタイタープレート (microtiter plate) (ヌンク、イムノプレート II; Nunc, Immunoplate II) を、総タンパク質濃度 $500 \mu\text{g/ml}$ なるライセート $50 \mu\text{l}$ を用いて室温で夜通しコートした。結合していない抗原を吸引して取り除いた後抗原でコートしたマイクロタイターウェル中のハイブリドーマの生コロニーから得た培養液の上清 $50 \mu\text{l}$ をまずインキュベートすることから、エライザを行なつた。37 で3 時間保温した後、洗浄緩衝液 (0.5% ツイーン20; Tween 20、20 mM トリス、pH 7.6) で3 回洗いそれから、ホースラディッシュ ペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase) で標識したヤギ抗マウスイムノグロブリン (Ig) G + IgA + IgM (HRP-GAM-GAM) $50 \mu\text{l}$ と共に37 で1 時間保温した。ウェルを洗浄緩衝液で再度、3 回洗つて、更にテトラメチルベンジジン (tetramethyl benzidine = TMB) 溶液を $50 \mu\text{l}$ 加えることでアッセイを展開した。この溶液は、ジメチルサルフォキシド (dimethyl sulfoxide = DMSO) 1 ml にTMB 10 mg を溶かし、その内 $100 \mu\text{l}$ をTMB 緩衝液 (0.1 M 酢酸ナトリウム; クエン酸で pH 6.0 にしたもの) 5 ml に、3% 過酸化水素 $10 \mu\text{l}$ と共に加えることで調製された。発色を5 分間行ない、次いで2 N 硫酸 (H_2SO_4) $50 \mu\text{l}$ を加えることで酵素反応を止めた。その結果現れた黄呈色の光学密度 (optical density = OD) をマイクロタイタープレートリーダー (microtiter plate reader) で450 nm にて読んだ。NIH3T3 細胞でコートされたウェル上でよりも

30

40

50

、18-3-7細胞でコートされたウエル上の方が、黄発色が強いことで示されるように、正反応は培養液上清中に、neu癌遺伝子産物を認識する抗体があることを表していた。

【0050】

F. ハイブリドーマのサブクローニング

最初のスクリーニングで正の結果を得たハイブリドーマを、限界希釈により広げてクローン化して、細胞及びその抗体を確実にモノクローナルなものとした。生後6週の免疫処理していないマウスから胸腺細胞を得て、HAT培地で 2×10^4 細胞/mlの濃度になるよう単一細胞懸濁液を作ることによってフィーダー細胞群 (feeder cell population) を最初に調製した。neu癌遺伝子産物に対する抗体の有無での試験で正とされたハイブリドーマのコロニーを、胸腺細胞を含んだ培地に5ハイブリドーマ細胞/mlの濃度になるように希釈した。それから、この液200 μ lを、96ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに分けた。一度コロニーを成長させてから、その上清を再び、neu癌遺伝子産物の有無に関して試験した。先に記したエライザアッセイで試験して、その結果が正であれば、そのコロニーを再度限界希釈してクローン化した。初めの融合について上記の方法で得られたハイブリドーマは、モノクローナル抗体を分泌しており、BD5-2d、TA1-1c、RC1-1c、NA3-6a、OD3-10jと名付けられている。2回目の融合についても、ハイブリドーマが得られ、PB-3、RC6-2、NB3、ID5、IB3-4と名のついた抗体を分泌している。

【0051】

G. 抗体のアイソタイプ (isotype) 及びサブクラス (subclass) の決定
ハイブリドーマによつて生産される抗体のアイソタイプ及び軽鎖のクラスを決定するため、また、IgGサブクラスを決定するため、エライザ・アッセイを行なった。この目的のため、ボエリンガー マンハイム (Boehringer Mannheim) (インディアナポリス; Indianapolis = IN) より、必要な免疫試薬全てが入っているキットを調達した。クローン化したハイブリドーマのコロニーから得た組織培養液の上清を、先に記した様に、18-3-7細胞のライセート上で保温した。この後、種々のマウス免疫グロブリンアイソタイプ、軽鎖クラス、IgGサブクラスに特異的な種々のヤギ抗血清と共に保温してから、2次抗体としてのホースディーツシユペルオキシダーゼで標識したブタ抗ヤギIgGと共に保温した。メーカーの教えにより、ABTS (2, 2'-アジノ-ビス-[3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸]; 2, 2'-azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]) を用いてアッセイを展開して、その結果生じた緑呈色のODを405nmで読んだ。この方法を用いることで、最初の融合からのモノクローナル抗体のうち、3つ (BD5-2d、RC1-4c、TA1-1c) が、IgG₁/カツパ (kappa) 抗体であり、NA3-6a、OD3-10jはIgM/カツパ抗体であることが決定された。また、2回目の融合で得られたRC6-2、NB3、ID5、IB3-4のモノクローナル抗体は、IgG₁/カツパであり、抗体PB3はIgG_{2a}/ラムダ (lambda) である。

【0052】

H. 放射免疫沈降反応

neu癌遺伝子産物の予想される分子量である185kdの分子量のタンパク質を抗体が認識するか否かを定めるために、各モノクローナル抗体を用いて、放射性標識された18-3-7細胞の免疫沈降を行なった。10cmペトリ皿 (petri dish) 内の18-3-7細胞 (もしくはNIH3T3細胞) のほとんど混じ合っている単層を、500 μ Ciの³⁵Sで標識したシステインを含む培地で、夜通し、培養した。翌朝、細胞を採取し、プロテアーゼ阻害剤PMSF及び、大豆トリプソン阻害剤の入った洗浄性緩衝液 (IP緩衝液: 1% トライトンX-100、1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、10mM トリス、0.65M NaCl、pH 7.2) 中で溶解させた。およそ、1 μ Ciの標識細胞標本を各ハイブリドーマ由来の培養液上清500 μ lと共に4で夜通

レインキュベートした。この間に、精製したウサギ抗マウスIgG（キルケガード及びペリーラボ；Kirkgaard & Perry Labs）50 μ g をIP緩衝液中の
 プロテインA-セファロース（Protein A-Sepharose）（ファルマシア；Pharmacia）1：1のスラリー（slurry）50 μ lと4 で夜通
 し混ぜた。過剰のウサギ抗体をIP緩衝液でプロテインA-セファロースを1回洗うこ
 とで取り除き、それから、標識細胞と、モノクローナル抗体を含んだ培養混合液に、その
 スラリーを加えた。この混合液を4 で夜通し反応させた。プロテインA-セファロー
 スを遠心してペレットにし、IP緩衝液で4回洗い、次いでTBS（10 mM トリス、1
 50 mM NaCl、pH 8.2）で1回洗つてからペレットを乾かした。SDSゲル用
 の試料用緩衝液（10 mM トリス、4 % SDS、20 % グリセロール、10 % 2-メル
 カプトエタノール；2-mercaptoethanol、0.04 % プロモフェノール
 ブルー；bromophenol blue）50 μ lに各ペレットを再び懸濁した
 。4.5 % アクリルアミド重層用ゲル及び7 % 分離用ゲルを用いて、各試料の半分をSD
 Sポリアクリルアミドゲル（SDS polyacrylamide gel）にかけた
 。ゲルを乾かし、オートラジオグラフィーにかけた。全てのモノクローナル抗体はNIH
 3T3細胞には見られない。18-3-7細胞中の約185 kd の分子量を持つタンパ
 ク質を認識することが、免疫沈降反応の結果から示された。このことは、標準タンパク質
 マーカーにより示される様に185 kd の分子量を持つタンパク質がゲル内で移動する
 距離に相当するバンドが、オートラジオグラフで存在したことにより決定された。同様の
 実験が、SKBR-3細胞（ヒト肺癌）及びA431細胞（ヒトの類表皮性癌）を用いて
 なされた。SKBR-3細胞は他の研究者たちにより、ヒトneu癌遺伝子産物を高水準
 で発現していることが示されていたが、上に記したモノクローナル抗体を用いた免疫沈降
 反応では、これを確かなものとする結果を得た。観察されたバンドは、18-3-7標識
 細胞から、沈降されたバンドと等しい距離だけ移動していた。一方、A431細胞系統は
 、ヒト表皮成長因子受容体（EGFR）を非常に高い水準で発現していることで知られて
 いるが、EGFRは170 kdのタンパク質で、ヒトneu癌遺伝子産物と、タンパク質
 のチロシンキナーゼドメインで、重要な相同性を持つている。これは、もし抗体が、チロ
 シンキナーゼ領域を認識していれば、neu遺伝子産物と交差反応を起こすかもしれない
 タンパク質なのである。しかしながら、上記のモノクローナル抗体を用いたA431細胞
 の免疫沈降反応は、185 kdの所も170 kdの所も反応性を示さなかつた。ヒトEG
 FRに特異的な、コントロールの抗体は予想通り、A431細胞のタンパク質とうまく反
 応して、観察されたバンドは、170 kdの分子量に相当した。18-3-7細胞に対し
 て生じたモノクローナル抗体を用いるとA431との反応性が見られなかつたことから、
 抗体はヒトneu癌遺伝子産物に特異的であり、ヒト表皮成長因子受容体とは交差反応し
 ないということが、結論づけられた。

【0053】

実施例 7：生物学的試料におけるp185 neu抗原の検出

今までの実施例は、血清、血漿、尿といったヒトの体液あるいは前新生細胞、新生細胞に
 おけるヒトneu抗原（約185000ダルトンの分子量；p185と呼ぶ）の検出を説
 明している。

【0054】

A. キヤプチャーイムノアッセイ

多様な生物標本からneu抗原を奪取（キャプチャー）する目的で、ポリスチレンプレ
 ート（コスター社、ケンブリッジ、MA）を1マイクログラム（ μ g）の抗neuモノク
 ローナル抗体（Mab）、複数の抗neuモノクローナル抗体の混合物、またはポリクロー
 ナル抗neu抗体のいずれかでコートした。Mabは炭酸緩衝液（pH = 9.6）で希釈
 し、マイクロタイタープレートの各ウェルに100 μ lを加えた。次に、プレートを37
 で一晩インキュベートした。インキュベート後、プレートを0.1 % ウシ血清アルブミ
 ン（BSA）を含むリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）で3回洗浄した。続いて抗neu
 抗体でコートされていないマイクロタイタープレートのウェル部分をブロックするために

10

20

30

40

50

、2.5%のBSAを含むPBS溶液を加えてプレートをインキュベートした。プレートを37℃で1時間インキュベートし、再度PBS/0.1%BSAで3回洗浄した。プレートを使用しない場合には使用時まで4℃で保存した。neu抗原の評価を行う標本は、正常細胞、前腫瘍細胞、腫瘍細胞、または血清、血漿、あるいは尿などの体液である。標本からneu抗原を奪取するために、標本をマイクロタイタープレートのウェル上にコートされた抗neu Mabとインキュベートした。標本を25℃で一晩インキュベートした。一晩のインキュベーション後、プレートをPBS/0.1%BSAで6回洗浄して過剰の生物標本を除去した。ビオチンで標識した別の抗neu Mabを各ウェルに加え、37℃で1時間インキュベートした。プレートをPBS/0.1%BSAで6回洗浄した。ビオチン標識した抗neu Mabを検出するために、1:4000に希釈したストレプトアビジンホースラディツシユ-ペルオキシダーゼ溶液を加えて37℃で1時間インキュベートした。プレートをPBS/0.01%BSAで6回洗浄した。反応を完了させるために、基質であるOPDを加えて37℃で15分インキュベートした。反応は硫酸で停止させ、ヌンク(Nunc)プレート読み取り機を用いて波長490nmでの吸光度を決定した。

10

【0055】

B. キヤプチャーアッセイを用いた細胞および腫瘍抽出液由来のneuの検出

生体物質における本アッセイの有用性を評価するために、幾つかのキヤプチャーイムノアッセイを行つた。第12図は、1次抗体にTA-1、2次抗体にビオチン化NA-3を用いたキヤプチャーイムノアッセイの結果を示している。細胞抽出液は幾つかのヒト細胞系から調製した。neu RNAレベルは、これらの細胞系の幾つか(SK-BR-3、ZR-75-1、MCF-7)に関して報告されている。本アッセイで検出されるneu抗原の相対的レベルは、報告されているRNAデータと一致する。neu抗原のレベルが既知の細胞系を用いたこれらのアッセイおよび他の幾つかのアッセイ(ここには示していない)の結果から、本アッセイは細胞抽出液中のneu抗原の相対レベルを決定するために使用可能であることが示唆される。neu抗原の発現の違いを第12図に示されている腫瘍細胞系の分類に使用できることも、この結果は示唆している。本アッセイが腫瘍抽出液中のneu抗原を検出できるかどうかを決定するために、ヌードマウス中でneuを発現している腫瘍細胞(X-3-5)またはneuを発現していない腫瘍細胞(3T3-ras)を増殖させた。この二つのNIH3T3由来細胞系は、X-3-5が発現されているヒトneu遺伝子を含むことを除いてはアイソジェニックである。第13図は、NB-3を1次抗体とし、ビオチン化されたTA-1を検出用抗体として用いたキヤプチャーイムノアッセイの結果を示している。neu抗原はX-3-5腫瘍抽出液で検出されたが、3T3-ras腫瘍抽出液では検出されず、本アッセイは腫瘍抽出液中のヒトneu抗原を特異的に検出できることを示唆する。何人かの研究者が、多くのヒト乳癌で高レベルで発現されていることを示した。ヒト乳癌中でneuが検出され得るかどうかを決定するために、1個体から2つの試料を調製した。抽出液を1人の患者のヒト乳癌(2747-01-050)および正常胸組織(2747-01-050)から調製した。本アッセイにおいて、TA-1を1次抗体として、ビオチン化したBD-5を検出用抗体として使用した。第14図はneuが腫瘍では検出されるが、正常胸組織では検出されないことを示す。これらのアッセイから、neuキヤプチャーイムノアッセイは細胞または腫瘍抽出液からヒトneu特異的に検出できることが示された。これらのデータはまた、試料間の相対的なneuレベルもこのアッセイで決定できることを示唆している。

20

30

40

【0056】

C. 血漿および血清中のneuの検出

これらの実施例は、マウスおよびヒトの有する腫瘍由来の血清および血漿中のneu抗原の検出を例示するものである。neu抗原がヒト血清または血漿中で特異的に認識されるかどうかを決定するために、幾つかのコントロール実験を行つた。neu抗原がヒト血清または血漿中で特異的に検出され得るかどうかを決定するために、幾つかのコントロール実験を行つた。これらには、neuを高レベルで発現する細胞系の培養液上清、および腫

50

瘍を有するヌードマウスの血清中の n e u 抗原の検出が含まれる。第 15 図は、NB - 3 を 1 次抗体、ビオチン化した TA - 1 を検出抗体として用いて細胞系の培養液上清の n e u のキヤプチャーイムノアッセイの結果を示している。この結果から、n e u を高レベルで発現するマウス細胞系 (18 - 3 - 7) あるいはヒト細胞系 (SK - BR - 3) の上清には n e u 抗原が検出されたが、n e u を発現していない細胞系である 3 T 3 - r a s、あるいは培地のみには検出されないことが示された。これらの細胞系のうち 2 つ (18 - 3 - 7 および 3 T 3 - r a s) はヌードマウス中で腫瘍として増殖可能である。これらの細胞系をヌードマウスに皮下注射して生じた腫瘍を有するマウスを継代し、TA - 1 を 1 次抗体、ビオチン化した BD - 5 を検出抗体として用いるキヤプチャーイムノアッセイによつてその血清中の n e u 抗原の存在を解析した。本アッセイの結果を第 16 図に示す。

細胞や腫瘍抽出液、および培養液上清のみと同様に、腫瘍を持つヌードマウスの血清中に n e u が存在することがこのアッセイで示された。正常なヌードマウスの血清および、n e u を発現しない腫瘍を持つヌードマウスの血清は、n e u 抗原の存在は認められなかった。これらの実験から、n e u 抗原は n e u 抗原を発現する腫瘍を持つヌードマウスの血清中で検出されることが示唆される。n e u 抗原は n e u を発現するヒト細胞系 (SK - BR - 3) およびヌードマウスの腫瘍を引き起こす細胞系の上清で検出される。n e u を高レベルで発現する腫瘍の患者は n e u 抗原を含む血清を持つであろうという仮説を確かめるために、一連のアッセイをおこなった。一つのアッセイ群では、抗 n e u M a b TA - 1 をキヤプチャー抗体として、ビオチンで標識した BD - 5 を検出抗体として用いた。

分析試料としては、正常なヒト血漿および 2 人の乳癌患者からの血漿を用いた。この結果から、正常な血漿および患者 A J A C からの血漿は、本アッセイでは実質的に反応しなかったが、患者 P S U L からの血漿は本アッセイで顕著な反応性を示し、p 1 8 5 抗原は乳癌患者 P S U L の血清中に存在することが示唆された (第 17 図)。この実験を M a b NB - 3 をキヤプチャー抗体 (固相支持体に固定された物)、ビオチンで標識した M a b TA - 1 を検出抗体として、多数の患者に関して反復して行つた。このアッセイを用いて、37 の独立な血漿試料が n e u 特異的モノクローナル抗体との反応性に関して評価された。これらの標本は、正常な人からの 12 の血漿試料、良性胸部疾患患者からの 6 血漿試料、乳癌患者からの 19 血漿試料が含まれた。第 18 図は 3 グループの平均値 (n e u ユニット) を示している。正常および良性の場合は 100 - 110 の平均値を有し、19 の乳癌患者は約 200 の n e u 平均値を持つていた。表 3 は各試料に関して得られた個々のデータを示している。乳癌患者の幾つかの n e u 値は、アッセイの上限を越えており、表 3 では "500 +" として示してある。これらの場合、試料をさらに 2 倍に希釈し、アッセイを繰り返した。結果は括弧で示してある。

10

20

30

【0057】

【表 3】

表 3

3 タイプの患者の *ELISA* の結果 (*neu* ユニット)

患者	正 常	良 性	癌	
1	100	90	210	
2	90	100	210	10
3	137	87	500+(300)	
4	75	70	120	
5	112	102	200	
6	183	110	500+(210)	
7	152		175	20
8	77		500+	
9	91		142	
10	88		70	
11	81		60	
12	63		80	
13			90	30
14			90	
15			122	
16			142	
17			160	
18			123	40
19			140	

【0058】

実施例 8 : 軟寒天中の *neu* でトランスフォームされた細胞の *TA-1* 阻害

本実施例は抗 *neu* モノクローナル抗体がトランスフォームされた細胞に細胞安定化効果がある可能性があることについて示すものである。ヒト *neu* 遺伝子をトランスフェクトされ、*neu* を高レベルで発現しているマウス繊維芽細胞 (*NIH 3T3*) は軟寒天中でコロニーを形成する。この性質は *neu* タンパク質の量およびその持つチロシンキナーゼ活性と直接関連する。ヒト *neu* タンパク質の細胞外部分を認識するモノクローナル

抗体 (M a b) は、これらのタンパク質を細胞表面上でクラスター化し、パッチを作らせ、続いて細胞中に内在化させて、それによつてチロシンキナーゼ活性を減少させると考えられる。我々は、M a b T A - 1 を軟寒天中で増殖している n e u でトランスフォームした N I H 3 T 3 細胞系 (17 - 3 - 1 - 3) に加えることにより、濃度に依存してこの細胞系で形成されるコロニー数が減少することを示した。特に、ここで用いた最高濃度の T A - 1 (150 μ g / ml) では、形成されるはずのコロニー数の 5 % 以下しか形成されなかつた (未処理のコントロール群では 150 のコロニーが形成されたのに対し、7 コロニー)。T A - 1 と同じマウスサブタイプ (いずれも I g G₁) に適合する非特異的な M a b は 150 μ g / ml でも形成されるコロニーの数には影響がなかつた。軟寒天中でコロニーを形成しない細胞は依然として生育可能であることから、この増殖阻害効果は細胞毒性のものではなく、細胞安定化するものだと考えられる。この結果から、ヒト n e u タンパク質を過剰発現する腫瘍細胞にたいする抗体による毒性治療が示唆される。

10

【0059】

寄託

抗体産生細胞系 B D - 5 - 2 d は、米国メリーランド州ロックビルのアメリカーン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託されている。A T C C 番号は H B 9 6 9 8 である。

【0060】

同等のもの

本分野の技術者には理解されるように、通常の実験技術を用いて、ここで特に述べた本発明の個々の態様と同等の多くのものが可能である。このような同等物は以下の請求の範囲に含まれることが意図されるものである。

20

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】図1は指示されている n e u 遺伝子 c D N A を p S V 2 発現ベクターに挿入して構築した p S V 2 n e u の概略図である。

【図2】図2には p S V 2 n e u を含む細胞株に特有な電気泳動ゲルのパターンが示される。

【図3】図3は正常なラット n e u 遺伝子及び形質転換したラット n e u 遺伝子の 1968 から 2073 のヌクレオチド及び予想されるアミノ酸の配列を示す。

【図4】図4は a) 野生型 (正常)、b) 正常 n e u 遺伝子の変異 n e u 遺伝子、c) D H F R G 8 から調製した D N A、d) T から G へのトランスバージョンが存在する変異 n e u 遺伝子の修飾型の塩基配列に対応する核酸プローブのヌクレオチド配列を示す。

30

【図5】図5は n e u トランスフェクタントから調製した D N A に核酸プローブをハイブリダイゼーションさせた後の電気泳動ゲルのパターンを示す。

【図6】図6は腫瘍細胞株及び正常な B D I X D N A にオリゴヌクレオチドプローブをハイブリダイゼーションさせた後の電気泳動ゲルのパターンを示す。

【図7】図7は10個の独立した活性化 n e u 遺伝子を含む14のトランスフェクタントを正常遺伝子 (プロトオンコジーン) に対応するオリゴヌクレオチド (上) 又はトランスフォーム能をもつ遺伝子 (癌遺伝子) に対応するオリゴヌクレオチド (下) で探査した後の電気泳動ゲルのパターンを示す。

40

【図8】図8は2種類の頸部癌腫細胞株 (M E 180 及び S W 1710) の c D N A から構築した全長の n e u c D N A クローンの概略図である。

【図9】図9は2つのヒト n e u ベクター、指示された n e u 遺伝子 c D N A をそれぞれ p M a x 発現ベクター及び p M a x - S p h 発現ベクターに挿入して構築した p M a x n e u 及び p M a x d e l t a n e u の概略図である。

【図10】図10は指示されている n e u 遺伝子の部分を p G E M 発現ベクターに挿入して作成したハイブリダイゼーションプローブの概略図である。

【図11】図11は指示されている n e u 遺伝子 c D N A を p L J d e l t a 発現ベクターに挿入して作成したプラスミドベクター p L J d e l t a n e u の概略図である。

【図12】図12は捕捉 E L I S A システムを使つて、多様なヒト胸部腫瘍細胞株からの

50

ライセートについて neu 抗原の存在を検査した捕捉イミユノアッセイの結果を示す。抗 neu モノクローナル抗体 (TA-1) が p185 neu 抗原の捕捉に、検出試薬としてビオチン標識した抗 neu モノクローナル抗体 NA-3 が用いられた。

【図13】図13は neu を発現しているヌードマウスの腫瘍のライセート (X-3-5) 及び neu 陰性の腫瘍のライセート (3T3/ras)、p185 neu 抗原特異的な抗 neu モノクローナル抗体 (NB-3) を比較した結果 (腫瘍ライセートのマイクログラム対光学密度) を示す。

【図14】図14は正常なヒト胸部組織片 (2747-01-050) 又は胸部腫瘍 (2427-01-050) から細胞のライセートを調製し、捕捉システムを用いて neu 抗原の存在を検査した結果を示す。アッセイは捕捉用試薬として抗 neu モノクローナル抗体 TA-1 を、ビオチン標識検出試薬としてモノクローナル抗体 BD-5 を用いて行つた。

10

【図15】図15は18-3-7細胞 (ヒト neu 遺伝子でトランスフォームし、細胞表面に p185 蛋白質を発現している NIH3T3 細胞)、3T3 ras 細胞 (ras 遺伝子でトランスフォームし、細胞表面にヒト p185 蛋白質を発現していない NIH3T3 細胞) 及び SK-BR-3 ヒト胸部腫瘍細胞の培養上澄と10%ウシ胎児血清を添加した DMEM 培地の分析結果を示す。捕捉イミユノアッセイでは、捕捉用試薬として抗 neu モノクローナル抗体 NB-3 を、検出試薬としてビオチン標識した TA-1 を用いた。

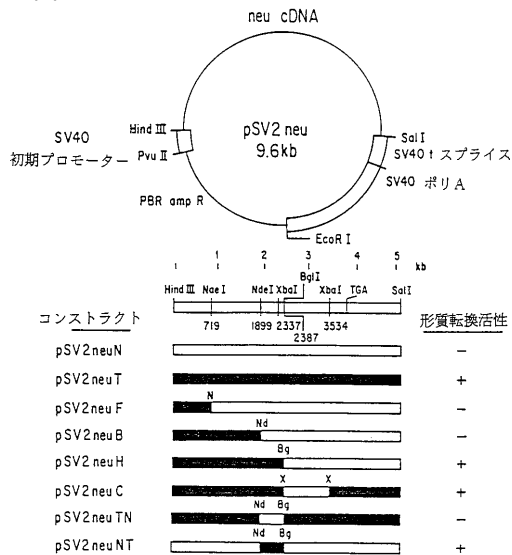
【図16】図16は正常なマウスの血清 (T144)、p185 蛋白質を発現している腫瘍をもつマウスの血清 (18-3-7 マウス) 及び p185 蛋白質を発現していない腫瘍をもつマウスの血清 (3T3 (ras)) について、捕捉抗体として抗 neu モノクローナル抗体 TA-1 を、検出試薬としてビオチン標識した抗 neu モノクローナル抗体 BD-5 を用いて捕捉イミユノアッセイを行つた結果を示す。

20

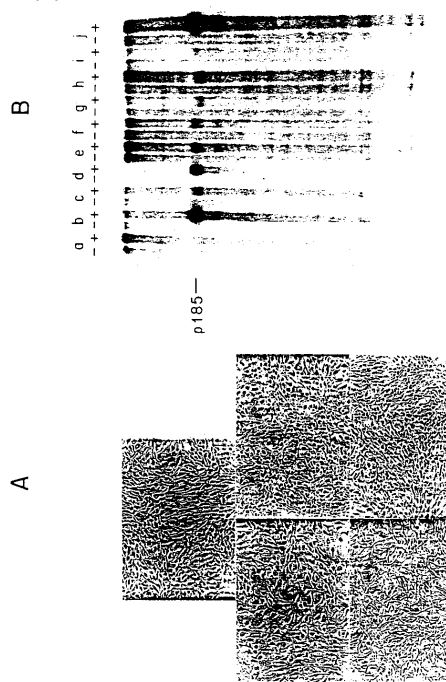
【図17】図17は捕捉試薬として抗 neu モノクローナル抗体 TA-1 を、検出試薬としてビオチン標識した BD-5 を用いて捕捉イミユノアッセイを行つた結果を示す。検査を行つた試料は正常なヒト体液及び二人の胸部腫瘍患者から調製した体液を含む。

【図18】図18は三例のヒト患者から調製した neu 癌遺伝子値の平均 (neu の単位) を図示したものである。

【図 1】



【図 2】



【図 3】

通常;

glu	gln	arg	ala	ser	pro	val	thr	phe	ile	ile	ala	thr	val	:	gly	val	aa 666
GAG	CAG	AGA	CCC	AGC	CCG	GTG	ACA	TTC	ATC	ATT	GCA	ACT	GTA	:	GGC	GTG	

形質転換活性;

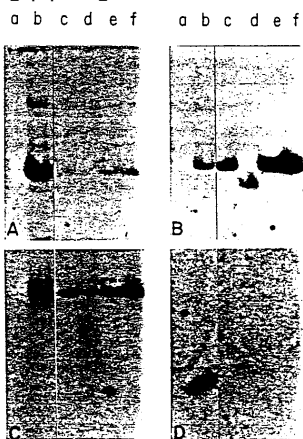
leu leu phe leu ile leu val val val val gly ile leu ile lys arg arg aa 683

CTG CTG TTC CTG ATC TTA GTG GTG GTG GTT GGA ATC CTA ATC AAA CGA AGG

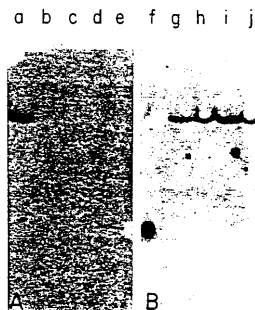
【図 4】

- A) ACGCCCACTACAGTTGCAAT ヌクレオチド 1999-2018, 野生型塩基配列
- *
B) ACGCCCTCTACAGTTGCAAT ヌクレオチド 999-2018, T₂₀₁₂ から A
- C) CCGTCCTCAGCTGTGACC ヌクレオチド 996-1013, コントロールプローブ
- *
D) ACGCCCTCTACAGTTGCAAT ヌクレオチド 1999-2018, T₂₀₁₂ から G

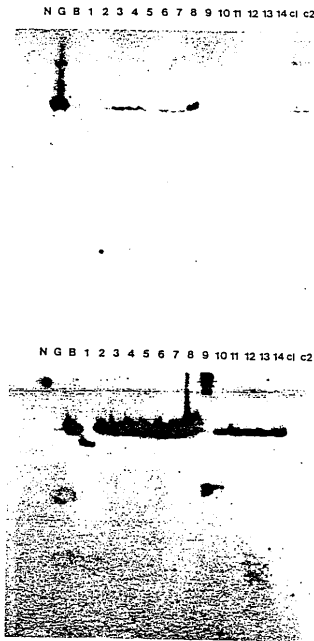
【図 5】



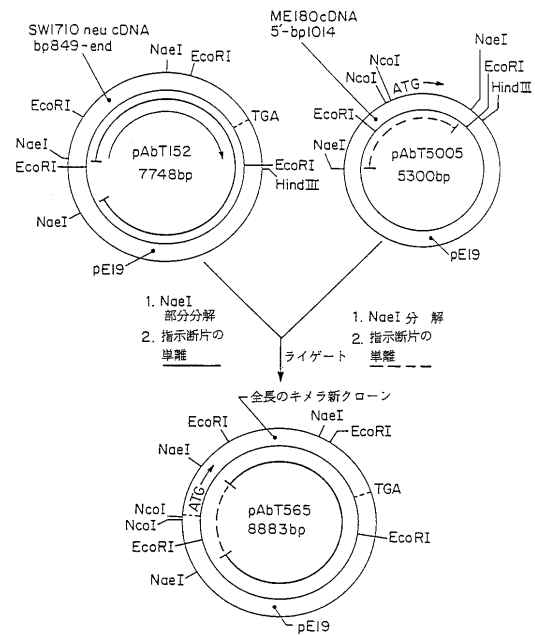
【図 6】



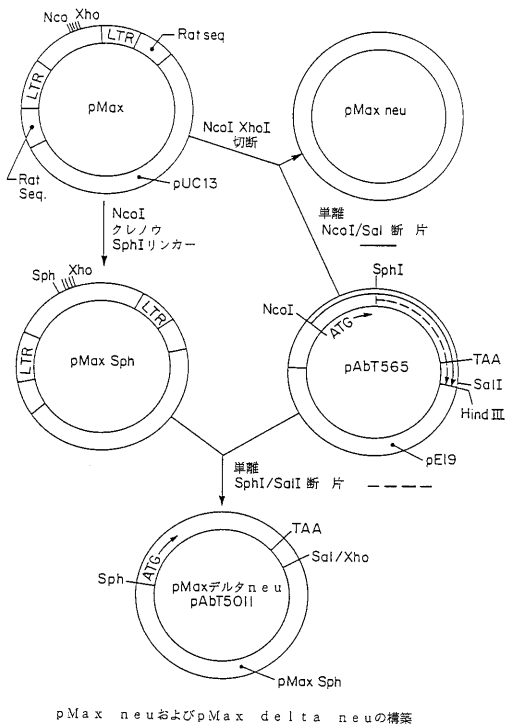
【図 7】



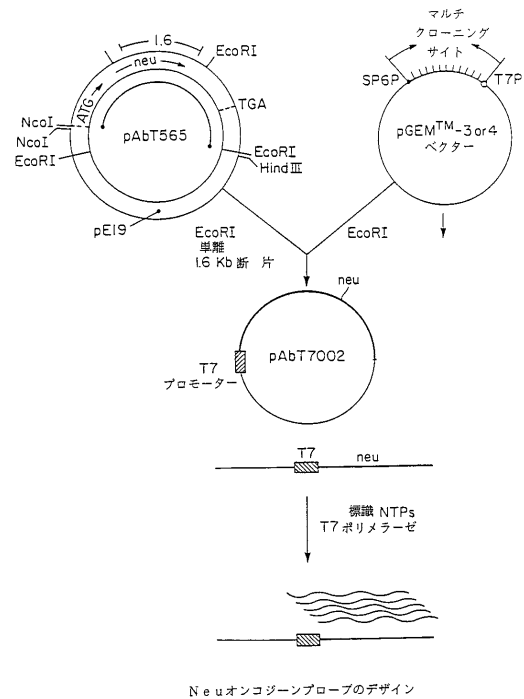
【図 8】



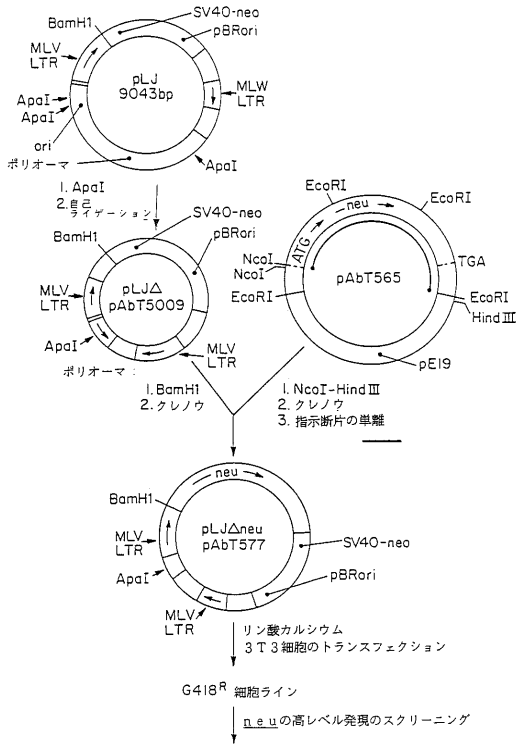
【図 9】



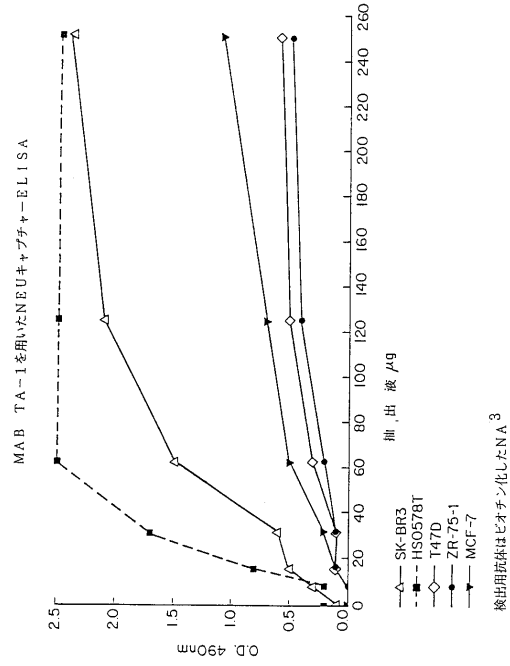
【図 10】



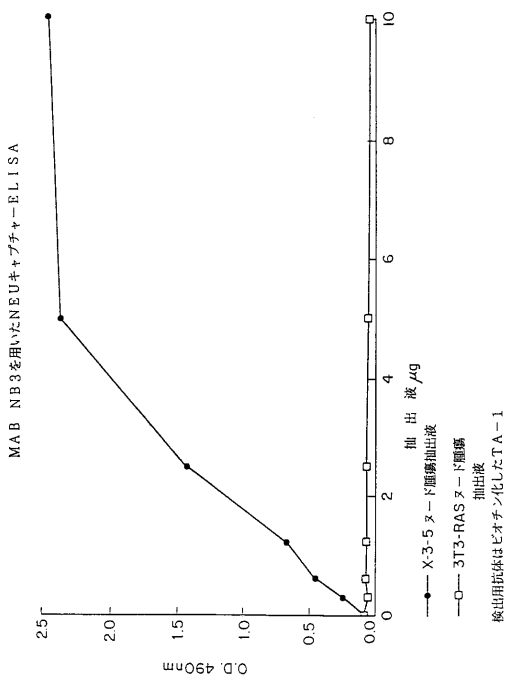
【図 1 1】



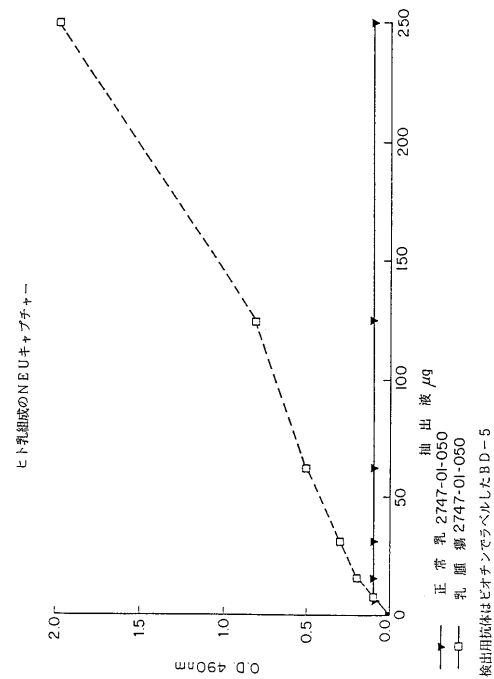
【図 1 2】



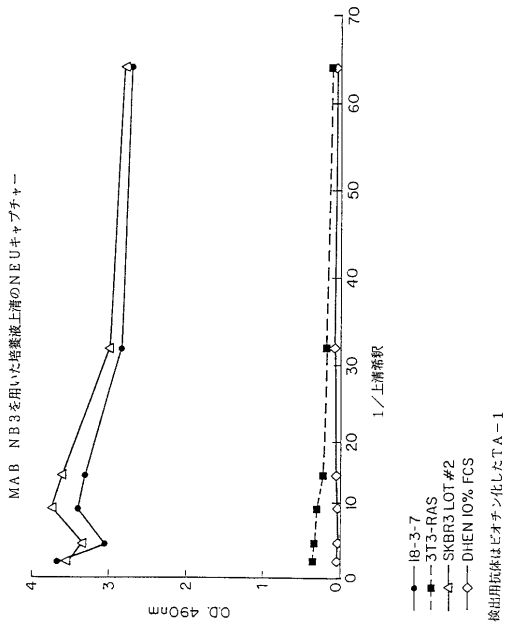
【図 1 3】



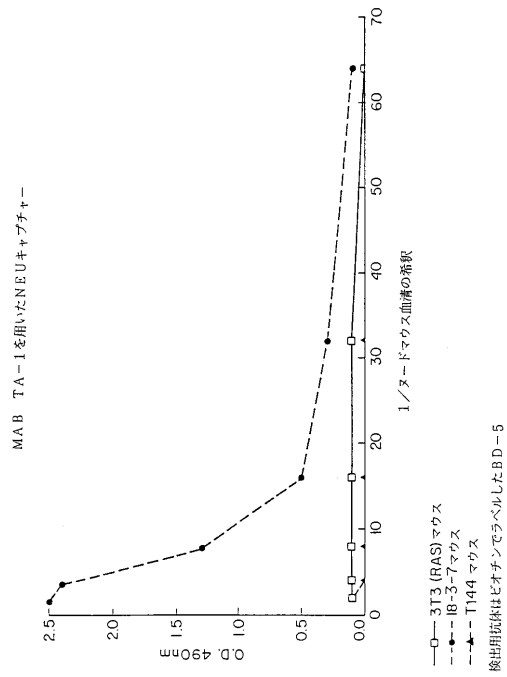
【図 1 4】



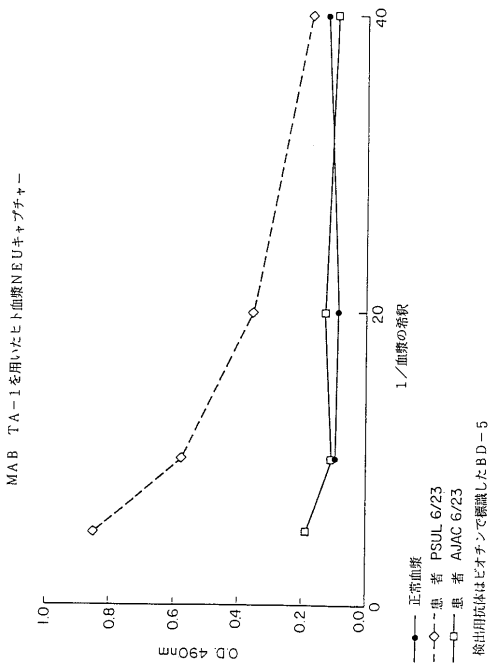
【図 15】



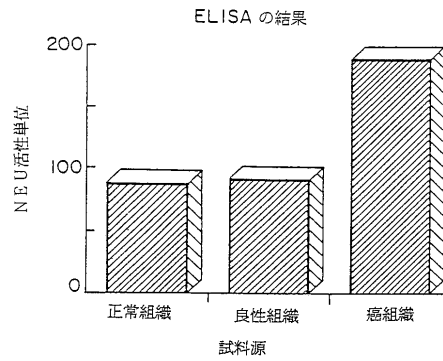
【図 16】



【図 17】



【図 18】



【配列表】

2004043486000001.app

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 1 2 Q 1/68	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 P 21/08	
	C 1 2 Q 1/68	A

(72)発明者 ウェインバーグ, ロバート・エイ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 4 6, ブルックリン, コブレイ・ストリート 2 5

(72)発明者 マザラ, ゲイル・ピー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 8 9 0, ウィンチェスター, マンチェスター, マンチェスター・ロード 1 0

(72)発明者 モーガン, ジョナサン・エイチ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 0 3 8, フランクリン, アローヘッド・レイン 3

(72)発明者 マッケンジー, サラ・ジェイ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 9 0 2, リン, オーシャン・ストリート 2 0 1

(72)発明者 マークス, ポーラ・ジェイ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 4 6, ブルックリン, エバンス・ロード 9 3

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA36 CA04 DA02 EA04 GA11 HA14 HA15
4B063 QA01 QA13 QA19 QQ52 QQ58 QQ79 QR32 QR48 QR51 QR56
QS33 QS34 QS36 QX02 QX07
4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01
4C085 AA13 AA14 BB01 BB11 CC02 CC03 CC04 CC05 CC07 CC08
CC13 CC21 CC27 CC29 CC31 DD04 DD23 DD62 DD63 DD88
EE01
4H045 AA11 AA30 DA76 EA20 EA51

专利名称(译)	检测neu基因产物		
公开(公告)号	JP2004043486A	公开(公告)日	2004-02-12
申请号	JP2003294484	申请日	2003-08-18
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔公司		
申请(专利权)人(译)	拜耳公司		
[标]发明人	ウェインバーグロバートエイ マザラゲイルピー モーガンジョナサンエイチ マッケンジーサラジェイ マークスポーラジェイ		
发明人	ウェインバーグ,ロバート・エイ マザラ,ゲイル・ピー モーガン,ジョナサン・エイチ マッケンジー,サラ・ジェイ マークス,ポーラ・ジェイ		
IPC分类号	G01N33/574 A61K38/00 A61K39/395 A61P35/00 C07K14/435 C07K14/71 C07K16/00 C07K16/30 C07K16/32 C07K19/00 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/00 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1 /68 C12R1/91 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61P35/00 C07K14/71 C07K16/32 C12Q1/6886 C12Q2600/158		
FI分类号	C07K16/30.ZNA A61K39/395.E A61K39/395.T G01N33/53.D G01N33/53.Y C12N15/00.A C12P21/08 C12Q1/68.A C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA36 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B024 /HA15 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ52 4B063/QQ58 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR56 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063 /QX07 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC03 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085 /CC07 4C085/CC08 4C085/CC13 4C085/CC21 4C085/CC27 4C085/CC29 4C085/CC31 4C085/DD04 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/DD88 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045 /DA76 4H045/EA20 4H045/EA51		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	07/182501 1988-04-18 US 07/297188 1989-01-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种检测肿瘤细胞中neu原癌基因或扩增和癌基因过度表达的方法。解决方案：使用与neu原癌基因或哺乳动物来源的癌基因中存在的核苷酸序列特异性反应的核酸探针。Ž

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 07 K 16/30	C O 7 K 16/30	Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A G 1 K 39/395	E	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53	A G 1 K 39/395	T	4 B O 6 4
// C 1 2 N 15/09	G O 1 N 33/53	D	4 C O 8 5
C 1 2 P 21/08	G O 1 N 33/53	Y	4 H O 4 5
審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 36 頁) 最終頁に続			

(21) 出願番号	特願2003-294484 (P2003-294484)	(71) 出願人	502182786
(22) 出願日	平成15年8月18日 (2003.8.18)		バイエル・コーポレーション
(62) 分割の表示	特願平11-376423の分割		アメリカ合衆国ニューヨーク州10591
原出願日	平成1年4月18日 (1989.4.18)		-5097, タリータウン, ペネディクト
(31) 優先権主張番号	182501		・アベニュー 511
(32) 優先日	昭和63年4月18日 (1988.4.18)	(74) 代理人	100089705
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 社本 一夫
(31) 優先権主張番号	297188	(74) 代理人	100076691
(32) 優先日	平成1年1月13日 (1989.1.13)		弁理士 増井 忠次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行
最終頁に続く			