

(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2009-173612

(P2009-173612A)

(43) 公開日 平成21年8月6日(2009.8.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18 ZNA	2G045
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 B	4B024
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	4B064
GO1N 33/48 (2006.01)	GO1N 33/53 Y	4B065
C12P 21/02 (2006.01)	GO1N 33/48 P	4H045
審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-16602(P2008-16602)

(22) 出願日 平成20年1月28日(2008.1.28)

特許法第30条第1項適用申請有り 電気通信回線での
 刊行物投稿論文発表 刊行物名: The Tohoku
 Journal of Experimental
 Medicine 号数: Vol. 212 (2007)
 , No. 4 電子通信回線掲載日: 2007年7月27
 日 掲載アドレス: [http://www.jstag
 e.jst.go.jp/browse/tjem/2
 12/4/_contents](http://www.jstag.e.jst.go.jp/browse/tjem/212/4/_contents)

(71) 出願人 504157024

国立大学法人東北大学
 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74) 代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(72) 発明者 平林 泰彦

宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
 国立大学法人東北大学内

(72) 発明者 岡 友美子

宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
 国立大学法人東北大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】モノクローナル抗ヒトホモシステイン誘導小胞体(ER)蛋白Herp抗体

(57) 【要約】

【課題】Herpの定性的又は定量的な測定を可能とする。

【解決手段】ホモシステイン誘導小胞体(ER)蛋白Herpに結合するモノクローナル抗体又はその機能断片である。特に、ホモシステイン誘導小胞体(ER)蛋白のN末端から細胞膜貫通ドメインに至る1~302アミノ酸残基を感作抗原として作製されたハイブリドーマにより産生されることが好ましい。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ホモシステイン誘導小胞体(ER)蛋白Herpに結合するモノクローナル抗体又はその機能断片。

【請求項 2】

ホモシステイン誘導小胞体(ER)蛋白HerpのN末端から細胞膜貫通ドメインに至る1～302アミノ酸残基を感作抗原として作製されたハイブリドーマにより産生されることを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体又はその機能断片。

【請求項 3】

上記感作抗原は、配列番号1に示すアミノ酸配列又は配列番号1に示すアミノ酸配列に対して80%の相同性を有するアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項2記載のモノクローナル抗体又はその機能断片。

【請求項 4】

ハイブリドーマHT2(NITE AP-481)から生産されることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体又は機能断片。

【請求項 5】

請求項1～4のいずれか1項記載のモノクローナル抗体又は機能断片を用いて、ホモシステイン誘導小胞体(ER)蛋白Herpを免疫学的に検出する方法。

【請求項 6】

検出する方法が、免疫細胞染色法又は免疫組織染色法である請求項5記載の方法。

【請求項 7】

請求項1～4のいずれか1項記載のモノクローナル抗体又は機能断片を含む、ホモシステイン誘導小胞体(ER)蛋白Herpの検出用試薬。

【請求項 8】

請求項1～4のいずれか1項記載のモノクローナル抗体又は機能断片を含む、ホモシステイン誘導小胞体(ER)蛋白Herpの定量用試薬。

【請求項 9】

請求項1～4のいずれか1項記載のモノクローナル抗体又は機能断片を含む、小胞体(ER)ストレスの評価用試薬。

【請求項 10】

請求項1～4のいずれか1項記載のモノクローナル抗体又は機能断片を含む、小胞体(ER)ストレスに起因する疾患の診断試薬。

【請求項 11】

小胞体(ER)ストレスに起因する疾患が、糖尿病、自己免疫筋炎、心肥大、アルコール性肝障害及び薬物由来腎障害からなる群から選択される疾患である請求項10記載の診断薬。

【請求項 12】

請求項1～4のいずれか1項記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

【請求項 13】

ハイブリドーマHT2(NITE AP-481)である、請求項12記載のハイブリドーマ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ホモシステイン誘導小胞体(ER)蛋白Herpに結合するモノクローナル抗体又はその機能断片、並びにその使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

血管内皮細胞障害は、ウイルス感染、低酸素状態およびCaイオン非平衡状態などの環境因子によりもたらされる。高ホモシステイン血症は、ホモシステインがアポトーシスやERストレスを介して血管内皮細胞の機能障害をもたらすために、血管障害の原因の一つとな

10

20

30

40

50

っている。ホモシステイン誘起ERストレスは、アポリポ蛋白E欠乏マウスで粥状動脈硬化の進展に關与し、高濃度の血漿中ホモシステインは、粥状動脈硬化症、虚血性冠動脈疾患、脳血管障害および血栓症などの危険因子の一つである。血漿中ホモシステインの増加は全身性エリテマトーシス(SLE)患者で認められ、これらの患者においては塞栓症あるいは冠血管異常の独立危険因子である。

【0003】

ERストレスは、ER内における、誤った折りたたみや折りたたまれない(misfold又はunfold)蛋白の蓄積と定義される。このストレスに対処するために、細胞は異常な蛋白のこれ以上の蓄積を防ぐように蛋白への翻訳を減弱させるのみならず、異常な蛋白の分解に必要なERシャペロンや蛋白の発現を上向き制御する。ホモシステイン誘導小胞体蛋白(以下、Herp)は、ヒト臍帯動脈上皮細胞においてホモシステインによって上向き制御される蛋白のひとつであると同定された。HerpはER膜に局在し、N末端ユビキチン様のドメインを有する54 kDaの膜蛋白である。Herp分子の主要な部分はER膜の細胞質側に存在する。

10

【0004】

Herpの欠損は、胎児ガン細胞のERストレスに対する脆弱性を増す(非特許文献1)。血管細胞におけるアミロイド蛋白蓄積の形成を伴うHerpの高度発現が、アルツハイマー患者の脳において観察された(非特許文献2)。Herpは神経Caイオンシグナリングを制御し(非特許文献3)、ERストレスにさらされたラットの神経細胞において顕著に発現している可能性がある。HerpはERストレスに対して防御の役割を果たしている(非特許文献1)。

20

【0005】

この防御の役割を明らかにする研究領域において、Herpの動力学および分布は、ERストレスと疾病との関係について新しい知見をもたらすことが期待される。しかしながら、Herpを正確に検出できる抗体や試薬等がなく、上述した新規な知見を得ることはできないのが現状であった。

【0006】

【非特許文献1】Hori et al., Genes Cells, 9, 457-469 (2004)

【非特許文献2】Sai et al., J. Biol. Chem., 277, 12915-12920 (2002)

【非特許文献3】Chan et al., J. Biol. Chem., 279, 28733-28743 (2004)

【発明の開示】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

そこで、本発明は、上述した実情に鑑み、ヒトHerpに対する高い特異性を有するモノクローナル抗体及びその利用方法を提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上述した目的を達成した本発明は以下を包含する。

(1)ホモシステイン誘導小胞体(ER)蛋白Herpに結合するモノクローナル抗体又はその機能断片。

(2)ホモシステイン誘導小胞体(ER)蛋白HerpのN末端から細胞膜貫通ドメインに至る1~302アミノ酸残基を感作抗原として作製されたハイブリドーマにより産生されることを特徴とする(1)記載のモノクローナル抗体又はその機能断片。

40

(3)上記感作抗原は、配列番号1に示すアミノ酸配列又は配列番号1に示すアミノ酸配列に対して80%の相同性を有するアミノ酸配列を有することを特徴とする(2)記載のモノクローナル抗体又はその機能断片。

(4)ハイブリドーマHT2(NITE AP-481)から生産されることを特徴とする(1)~(3)のいずれか1に記載のモノクローナル抗体又は機能断片。

(5)上記(1)~(4)のいずれか1記載のモノクローナル抗体又は機能断片を用いて、ホモシステイン誘導小胞体(ER)蛋白Herpを免疫学的に検出する方法。

【0009】

50

(6) 検出する方法が、免疫細胞染色法又は免疫組織染色法である(5)記載の方法。

(7) 上記(1)~(4)のいずれか1記載のモノクローナル抗体又は機能断片を含む、ホモシステイン誘導小胞体(ER)蛋白Herpの検出用試薬。

(8) 上記(1)~(4)のいずれか1記載のモノクローナル抗体又は機能断片を含む、ホモシステイン誘導小胞体(ER)蛋白Herpの定量用試薬。

(9) 上記(1)~(4)のいずれか1記載のモノクローナル抗体又は機能断片を含む、小胞体(ER)ストレスの評価用試薬。

(10) 上記(1)~(4)のいずれか1記載のモノクローナル抗体又は機能断片を含む、小胞体(ER)ストレスに起因する疾患の診断試薬。

【0010】

(11) 小胞体(ER)ストレスに起因する疾患が、糖尿病、自己免疫筋炎、心肥大、アルコール性肝障害及び薬物由来腎障害からなる群から選択される疾患である(10)記載の診断薬。

(12) 上記(1)~(4)のいずれか1記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

(13) ハイブリドーマHT2(NITE AP-481)である(12)記載のハイブリドーマ。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、Herpの定性的及び定量的な検出が可能となり、Herpが生体内で果たす具体的役割を解明するための手段を提供することができる。また、本発明によれば、Herpの定性的及び定量的な検出が可能となり、Herpに起因する疾患の診断薬を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に係るモノクローナル抗体又はその機能断片は、Herpに特異的に結合するといった特徴を有する。ここでHerpとしては、いかなる生物種の由来であってもよいが、具体的には、配列番号1に示すアミノ酸配列を有するヒト由来Herpがあげられる。ヒト由来のHerpとしては、配列番号1に示すアミノ酸配列を有するものに限定されず、配列番号1に示すアミノ酸配列において1~30、好ましくは1~20、より好ましくは1~10のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、及び配列番号1に示すアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、Herpと実質的に同一の活性を有するポリペプチドなどがあげられる。

【0013】

配列番号1に示すアミノ酸配列において1~30のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、[Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Second Edition(Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989)、Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley & Sons 1987-1997)、Nucleic Acids Research、10、6487(1982)、Proc. Natl. Acad. Sci.、USA、79、6409(1982)、Gene、34、315(1985)、Nucleic Acids Research、13、4431(1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA、82、488(1985)]などに記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号1に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより得ることができる。また、相同性の数値は、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、アミノ酸配列については、BLAST2[Nucleic Acids Res.、25、3389(1997); Genome Res.、7、649(1997)]においてデフォルトパラメータを用いて算出される数値などがあげられる。

【0014】

本発明に係るモノクローナル抗体は、ハイブリドーマにより生産される抗体及び抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換え抗体を

10

20

30

40

50

あげることができる。

【0015】

ハイブリドーマは、例えば上記のHerpが発現した細胞、Herp組換え体などを抗原として調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性をもつ抗体生産細胞を誘導し、さらに、それと骨髄腫細胞とを融合させて調製することができる。該ハイブリドーマを培養するか、あるいは該ハイブリドーマ細胞を動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより本発明のモノクローナル抗体を取得することができる。

【0016】

抗原を免疫する動物としてはハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができるが、マウス、ラット、ハムスター、ラビットウサギなどが好適に用いられる。またこのような動物から抗体産生能を有する細胞を取得し、該細胞に *in vitro* で免疫を施した後に、ミエローマ細胞と融合して作製したハイブリドーマから生産されるモノクローナル抗体なども本発明の抗体に包含される。

【0017】

本発明のモノクローナル抗体の具体例としては、ハイブリドーマHT2が生産するマウス抗体があげられる。ハイブリドーマHT2は平成20年1月25日付でブダペスト条約に基づき独立行政法人 製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目5番地8）に受領番号NITE AP-481として寄託されている。

【0018】

また、本発明のモノクローナル抗体としては、上記のハイブリドーマHT2（NITE AP-481）により生産されるモノクローナル抗体が結合するエピトープに結合する、他のモノクローナル抗体なども包含される。

【0019】

遺伝子組換え抗体は、上記本発明のモノクローナル抗体を遺伝子組換え技術を用いて改変したものである。遺伝子組換え抗体としては、ヒト化抗体、ヒト抗体または抗体断片など、遺伝子組換えにより製造される抗体を包含する。遺伝子組換え抗体において、モノクローナル抗体の特徴を有し、抗原性が低く、血中半減期が延長されたものは、診断薬として好ましい。

【0020】

本発明におけるヒト化抗体とは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR（Complementarity Determining Region；相補性決定領域；以下、CDRと記す）移植抗体を包含する。ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体の重鎖可変領域（以下、VHと記す）および軽鎖可変領域（以下、VLと記す）とヒト抗体の重鎖定常領域（以下、CHと記す）および軽鎖定常領域（以下、CLと記す）とからなる抗体をいう。

【0021】

本発明のヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgと表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgGクラスのもの好適であり、さらにhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、クラスあるいはサブクラスのものを用いることができる。

【0022】

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体をいう。本発明のヒト型CDR移植抗体は、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから産生されるヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を任意のヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現

10

20

30

40

50

ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

【0023】

ヒト型CDR移植抗体のCHとしては、hlgに属すればいかなるものでもよいが、hlgGクラスのもの好適であり、さらにhlgGクラスに属するhlgG1、hlgG2、hlgG3、hlgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型CDR移植抗体のCLとしては、hlgに属すればいずれのものでもよく、クラスあるいはクラスのものをを用いることができる。

【0024】

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体なども含まれる。

10

【0025】

ヒト体内に天然に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EBウイルスなどを感染させ不死化し、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養上清中より該抗体を精製することができる。

【0026】

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりFab、scFvなどの抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を表面に発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、さらに、遺伝子工学的手法により2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

20

【0027】

ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、例えば、マウスES細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該ES細胞をマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニックマウスを作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体の作製方法は、通常ヒト以外の動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養上清中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

30

【0028】

本発明の機能断片としては、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、diabody、dsFvおよびCDRを含むペプチドなどがあげられる。

【0029】

Fabは、IgGを蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明のFabは、モノクローナル抗体を蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。F(ab')₂は、IgGのヒンジ領域の2個のジスルフィド結合の下部を酵素ペプシンで分解して得られた、2つのFab領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約10万の抗原結合活性を有するフラグメントである。本発明のF(ab')₂は、モノクローナル抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記のFab'をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

40

【0030】

本発明のFab'は、F(ab')₂を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用

50

発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab'を製造することができる。

【0031】

scFvは、1本のVHと1本のVLとを適当なペプチドリinker（以下、Pと表記する）を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明のscFvは、モノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、scFvを製造することができる。diabodyは、scFvが二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。

10

【0032】

本発明のdiabodyは、モノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAをPのアミノ酸配列の長さが8残基以下となるように構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、diabodyを製造することができる。

【0033】

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法（Protein Engineering、7、697-704、1994）に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

20

【0034】

本発明のdsFvは、モノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、dsFvを製造することができる。

【0035】

CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリinkerを介して結合させることができる。本発明のCDRを含むペプチドは、モノクローナル抗体のVHおよびVLのCDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDRを含むペプチドを製造することができる。また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によって製造することもできる。

30

【0036】

以下に、本発明の抗体の製造方法について、具体的に説明する。

(1) 抗原の調製

本発明の抗体の製造において感作抗原として使用されるHerpは、例えば以下の方法により、HerpをコードするDNAを宿主細胞で発現させて、製造することができる。発現させるHerpは、全長のポリペプチドであってもよいが、N末端から1~302アミノ酸残基とすることが好ましい。HerpのN末端から1~302アミノ酸残基からなるポリペプチドは、細胞膜貫通部に相当している。

40

【0037】

該ポリペプチドをコードする部分のcDNAを含む完全長cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。次いで、該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、ポリペプチドを生産する形質転換体を得ることができる。

【0038】

50

宿主細胞としては、大腸菌、動物細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれをも用いることができる。

【0039】

発現ベクターとしては、使用する宿主細胞において自律複製または染色体中への組込が可能で、上記ポリペプチドをコードするDNAを転写できる位置に適当なプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0040】

大腸菌などの原核生物を宿主細胞として用いる場合には、該組換えベクターは、原核生物中で自律複製が可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明において用いられるDNAおよび転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。該組換えベクターは、さらに、プロモーターを制御する遺伝子を含んでいてもよい。

10

【0041】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもRoche Diagnostic社製）、pKK233-2（Pharmacia社製）、pSE280（Invitrogen社製）、pGEMEX-1（Promega社製）、pQE-8（QIAGEN社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, , 82, 4306 (1985)]、pBluescriptII SK(-)（Stratagene社製）、pTrs30 [大腸菌 JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [大腸菌 JM109/pTrs32 (FERM BP-5408) より調製]、pGHA2 [大腸菌 IGHA2 (FERM BP-400) より調製、特開昭60-221091]、pGKA2 [大腸菌 IGKA2 (FERM BP-6798) より調製、特開昭60-221091]、pTerm2（US4686191、US4939094、US5160735）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX（Pharmacia社製）、pETシステム（Novagen社製）、pME18SFL3などをあげることができる。

20

【0042】

プロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター（Ptrp）、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、T7プロモーターなどの、大腸菌やファージなどに由来するプロモーターなどをあげることができる。また、Ptrpを2つ直列させたタンデムプロモーター、tacプロモーター、lacT7プロモーター、letIプロモーターなどのように、人為的に設計改変されたプロモーターも用いることができる。

30

【0043】

また、上記組換えベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガルノ（Shine-Dalgarno）配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。本発明において用いられるポリペプチドをコードするDNAの塩基配列においては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより、目的とするポリペプチドの生産率を向上させることができる。さらに、上記組換えベクターにおける遺伝子の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0044】

このような宿主細胞として用いられる原核生物としては、例えば、エシェリヒア属などに属する原核生物を用いることができ、具体的には大腸菌 XL1-Blue、大腸菌 XL2-Blue、大腸菌 DH1、大腸菌 MC1000、大腸菌 KY3276、大腸菌 W1485、大腸菌 JM109、大腸菌 HB101、大腸菌 No.49、大腸菌 W3110、大腸菌 NY49などが用いることができる。

40

【0045】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)、Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)] に記載の方法などをあげることができる。

【0046】

本発明の抗体の製造において用いられるポリペプチドを大腸菌で生産した場合には、ベ

50

クターの種類によりポリペプチドは、細胞質内に可溶型として、細胞質内に不溶性顆粒としてまたはペリプラズミックスペースに可溶型としてなどの発現様式で発現させることができる。

【0047】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8（フナコシ社より市販）、pAGE107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、pAS3-3（特開平2-227075）、pCDM8 [Nature, 329, 840, (1987)]、pcDNA1/Amp（Invitrogen社製）、pREP4（Invitrogen社製）、pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210、pME18SFL3などをあげることができる。

【0048】

プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス（CMV）のIE（immediate early）遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRプロモーターなどをあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0049】

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ（Namalwa）細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637細胞などをあげることができる。

【0050】

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法などをあげることができる。

【0051】

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、分泌生産、融合蛋白質発現などを行うことができる。真核生物由来の細胞で発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された上記ポリペプチドを得ることができる。

【0052】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に上記ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明において用いられるポリペプチドを製造することができる。該形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【0053】

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドなどを、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸などを培地に添加してもよい。

【0054】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地、EagleのMEM培地、ダルベッコ改変MEM培地、またはこれら培地に牛胎児血清などを添加した培地などを用いることができる。培養は、通常pH6~8、30~40℃、5%CO₂存在下などの条件下で1~7日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

【0055】

上記のとおり、本発明の抗体の製造において用いられるポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換えベクターを保有する微生物、動物細胞など由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養して上記ポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物より採取することにより、本発明の抗体の製造において用いられるポリペプチドを製造することができる

10

20

30

40

50

。

【0056】

上記ポリペプチドは、例えば、以下のようにして、上記の培養物などから単離・精製することができる。

【0057】

上記ポリペプチドが細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミルなどにより細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸などによる塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）-セファロース、DIAION HPA-75（三菱化学社製）などのレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（Pharmacia社製）などのレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロースなどのレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動などの電気泳動法などの手法を単独または組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

10

【0058】

また、上記ポリペプチドが細胞質内に不溶性顆粒を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として該ポリペプチドの不溶性顆粒を回収する。回収した該蛋白質の不溶性顆粒を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該蛋白質を正常な立体構造にまき戻した後、上記と同様の単離精製法によりポリペプチドの精製標品を得ることができる。

20

【0059】

ポリペプチド又はその糖修飾体などの誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清において、ポリペプチドまたはその糖修飾体などの誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離などの手法により処理することにより、固形物を取り除いた培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

【0060】

上記ポリペプチドが細胞外膜上に生産された場合には、細胞を回収、破砕した後、細胞膜画分を適当な界面活性剤などで可溶化し、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。また、上記ポリペプチドが細胞外膜上に生産された場合には、該発現細胞を回収して免疫原に用いることもできる。

30

【0061】

また、上記ポリペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）などの化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech社、パーキン・エルマー社、Pharmacia社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所などのペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

【0062】

(2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

3~20週令のマウス、ラットまたはハムスターなどに上記のように調製した抗原を免疫して、その動物の脾臓、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。

40

【0063】

免疫は、動物の皮下あるいは静脈内あるいは腹腔内に、適当なアジュバント〔例えば、フロインドの完全アジュバント（Complete Freund's Adjuvant）や水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなど〕とともに抗原を投与することにより行う。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA（ウシ血清アルブミン）やKLH（Keyhole Limpet hemocyanin）などのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。

【0064】

50

抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに5~10回行う。各投与後3~7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が抗原と反応することを酵素免疫測定法などで調べる。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したマウス、ラットまたはハムスターを抗体産生細胞の供給源として用いる。

【0065】

抗体産生細胞と骨髄腫細胞の融合に供するにあたって、抗原の最終投与後3~7日目に、免疫したマウス、ラットまたはハムスターより脾臓などの抗体産生細胞を含む組織を摘出し、抗体産生細胞を採取する。脾臓細胞を用いる場合には、脾臓をMEM培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離（1200rpm、5分間）した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム緩衝液（pH7.65）で1~2分間処理し赤血球を除去し、MEM培地

10

【0066】

（3）骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞を使用する。たとえば、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/cマウス由来）骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1（P3-U1）、P3-NS1/1-Ag41（NS-1）、SP2/0-Ag14（SP-2）、P3-X63-Ag8653（653）、P3-X63-Ag8（X63）などが用いられる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地〔RPMI-1640培地にグルタミン（1.5mM）、2-メルカプトエタノール（ 5×10^{-5} M）、ジェンタマイシン（10 μ g/ml）および牛胎児血清（FCS）を加えた培地（以下、正常培地という。）に、さらに8-アザグアニン（15 μ g/ml）を加えた培地〕で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地に継代し、融合当日 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

20

【0067】

（4）細胞融合

前述した抗体産生細胞と骨髄腫細胞をMEM培地またはPBS（リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2）でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髄腫細胞=5~10:1になるよう混合し、遠心分離（1200rpm、5分間）した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37℃で、ポリエチレングライコール-1000（PEG-1000）2g、MEM 2mlおよびジメチルスルホキシド0.7mlの混液の0.2~1mlを、 1×10^8 個の抗体産生細胞に加え、1~2分間毎にMEM培地1~2mlを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mlになるようにする。遠心分離（900rpm、5分間）後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに細胞をHAT培地〔正常培地にヒポキサンチン（ 10^{-4} M）、チミジン（ 1.5×10^{-5} M）およびアミノプテリン（ 4×10^{-7} M）を加えた培地〕100ml中に懸濁する。この懸濁液を96ウエル培養用プレートに100 μ l/ウエルずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で7~14日間培養する。

30

【0068】

培養後、培養上清の一部をとり後述するハイブリドーマの選択方法により、Herp又はHerp 1-302断片に結合する抗体を生産するハイブリドーマを含むウエルを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、HT培地（HAT培地からアミノプテリンを除いた培地）、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

40

【0069】

（5）モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン（Pristane）0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、上記（4）で得られた抗Herpモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 細胞/匹を腹腔内注射する。10~21日でハイブリドーマは腹水癌化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離（3000rpm、5分間）して固形分を除去後、40~50%硫酸アンモニウムで塩析した後、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、プロテインA-カラムあるいはゲル濾過カラムによる精製を行ない、IgGあるいは、IgM画分を集め、精製モノクローナル抗体と

50

する。

【0070】

抗体のサブクラスの設定は、サブクラスタイピングキットを用いて酵素免疫測定法により行う。蛋白質の定量は、ローリー法および280nmでの吸光度より算出する。

【0071】

以上のように作製されたモノクローナル抗体またはその機能断片を用いて、生体試料中のHerpを測定することにより、Herpの動力学及び分布に関する研究、或いはERストレスが関連する疾患を診断することができる。

【0072】

本発明において生体試料としては、組織細胞、血液、血漿、血清、腓液、尿、糞便、組織液、培養液など、測定しようとするHerp又はHerp発現細胞を含む可能性のあるものであれば特に限定されない。

【0073】

ERストレスが関連する疾患としては、例えば、糖尿病、自己免疫筋炎、心肥大、アルコール性肝障害及び薬物由来腎障害などがあげられる。これら疾患の診断は、例えば、以下のようにして行うことができる。

【0074】

複数の健常者の生体から採取した生体試料について、本発明のモノクローナル抗体または抗体断片を用い、下記の免疫学的検出法を用いて、Herpの検出あるいは定量を行い、健常者の生体試料中のHerpまたはHerp発現細胞の存在量を調べておく。被験者の生体試料中についても同様にHerpまたはHerp発現細胞の存在量を調べ、その存在量を健常者の存在量と比較する。被験者のHerpまたはHerp発現細胞の存在量が健常者と比較して増加している場合には、上記疾患について陽性である可能性が高いと判断できる。

【0075】

本発明のモノクローナル抗体または機能断片を含有する診断薬は、目的の診断法に応じて、抗原抗体反応を行なうための試薬、該反応の検出用試薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行なうための試薬としては、緩衝剤、塩などがあげられる。検出用試薬としては、モノクローナル抗体または機能断片、若しくはこれらを認識する標識された二次抗体、標識に対応した基質などの通常の免疫学的検出法に用いられる試薬があげられる。本発明においてHerpまたはHerp発現細胞を定量する方法としては、任意の公知の方法があげられる。例えば、免疫学的測定方法などがあげられる。

【0076】

免疫学的測定法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を測定する方法である。免疫学的測定方法としては、放射性物質標識免疫抗体法(RIA)、酵素免疫測定法(EIAまたはELISA)、蛍光免疫測定法(FIA)、発光免疫測定法(luminescent immunoassay)、ウエスタンブロット法および物理化学的検出法(TIA、LAPIA、PCIA)などがあげられる。抗原の検出または測定を行う方法であればいかなる方法でもよいが好ましくは免疫沈降法または蛍光細胞染色法があげられる。

【0077】

放射性物質標識免疫抗体法(RIA)としては、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する方法があげられる。

【0078】

酵素免疫測定法(EIAまたはELISA)としては、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体を反応させ、さらに標識を施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、発色色素を吸光度計で測定する方法があげられ、例えばサンドイッチELISAなどが用いられる。酵素免疫測定法で用いる標識体としては、前述のとおり、任意の公知(石川榮次ら編、酵素免疫測定法、医学書院)の酵素標識を用いることができる。例えば、アルカリフォスファターゼ標識、ペルオキシダーゼ標識、ルシフェラー

10

20

30

40

50

ゼ標識、ビオチン標識などを用いることができる。

【0079】

サンドイッチELISA法は、固相に抗体を結合させた後、測定したい抗原をトラップさせ、トラップされた抗原に第2の抗体を反応させる方法である。該ELISA法では、測定したい抗原を認識する抗体または抗体断片であって、抗原認識部位の異なる2種類の抗体を準備し、そのうち、一方の抗体または抗体断片を予めプレート（例えば、96ウェルプレート）に吸着させ、第2の抗体または抗体断片をFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素、ビオチンなどで標識しておく。上記の抗体が吸着したプレートに、生体内から分離された、細胞またはその破碎液、組織またはその破碎液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、眼液などを反応させた後、標識したモノクローナル抗体または抗体断片を反応させ、標識物質に応じた検出反応を行う。濃度既知の抗原を段階的に希釈して作製した検量線より、被験サンプルの濃度を算出することができる。サンドイッチELISA法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、Fab、Fab'、F(ab)₂などの抗体フラグメントを用いてもよい。サンドイッチELISA法で用いる2種類の抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体または抗体断片の組み合わせでもよい。

10

【0080】

蛍光免疫測定法（FIA）としては、文献 [Monoclonal Antibodies: Principles and practice, Third edition (Academic Press, 1996); 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)] などに記載された方法があげられる。蛍光免疫測定法で用いる標識体としては、前述のとおり、任意の公知（川生明著、蛍光抗体法、ソフトサイエンス社）の蛍光標識を用いることができる。例えば、FITC標識、RITC標識などを用いることができる。

20

【0081】

上記のような発光免疫測定法（luminescent immunoassay）で用いる標識体としては、前述のとおり、任意の公知 [今井一洋編、生物発光と化学発光、廣川書店；臨床検査42(1998)] の発光体標識があげられる。例えば、アクリジニウムエステル標識、ロフィン標識などを用いることができる。

【0082】

ウエスタンブロット法は、抗原または抗原を発現した細胞などをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [Antibodies-A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)] で分画した後、該ゲルをPVDF膜またはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に抗原を認識する抗体または抗体断片を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素標識、ビオチン標識などを施した抗マウスIgG抗体または結合断片を反応させた後、該標識を可視化することによって確認する方法である。ウエスタンブロット法の一例を以下に示す。

30

【0083】

本発明のモノクローナル抗体は、Herpに結合できるため、Herp発現細胞の検出に好適に用いられる。

【0084】

Herp発現細胞の検出には、公知の免疫学的測定法を用いることができるが、免疫沈降法、蛍光細胞染色法、免疫組織染色法、および免疫組織染色法などが、好ましく用いられる。また、FMAT8100HTSシステム（アプライドバイオシステム社）を用いる蛍光抗体染色法なども用いることができる。

40

【0085】

免疫沈降法とは、Herp発現細胞などを本発明のモノクローナル抗体または機能断片と反応させた後、プロテインG-セファロースなどのイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる方法である。あるいは以下のような方法によっても行なうことができる。

【0086】

50

ELISA用96ウエルプレートに上述した本発明の抗体を固相化した後、BSA-PBSによりブロッキングする。抗体が精製されていない状態の例えばハイブリドーマ株培養上清などの精製されていない状態である場合には、抗マウスイムノグロブリンあるいはラットイムノグロブリンまたはプロテインAあるいはGなどをあらかじめELISA用96ウエルプレートに固相化しBSA-PBSでブロッキングした後、ハイブリドーマ株培養上清を分注して結合させる。BSA-PBSを捨てPBSでよく洗浄した後、Herpを発現している細胞や組織の溶解液を反応させる。よく洗浄した後のプレートより免疫沈降物をSDS-PAGE用サンプルバッファーで抽出し、上記のウエスタンブロッティングにより検出を行う。

【0087】

免疫細胞染色法および免疫組織染色法とは抗原を発現した細胞または組織などを、場合によっては抗体の通過性を良くするため界面活性剤やメタノールなどで処理した後、本発明の抗体を反応させ、さらにフルオレシニン・イソチオシアネート (FITC) などの蛍光標識、ペルオキシダーゼなどの酵素標識、ビオチン標識などを施した抗イムノグロブリン抗体または結合断片を反応させた後、該標識を可視化し、顕微鏡にて顕鏡するか、あるいは蛍光標識の抗体と細胞を反応させ、フローサイトメーターにて解析する蛍光抗体染色法 (フローサイトメトリー) である。特に、本発明の抗体は、Herpを特異的に認識できるため、フローサイトメトリーにより、Herpを発現している細胞の検出に好ましく用いられる。

【0088】

また、FMAT8100HTSシステム (アプライドバイオシステム社) を用いる蛍光抗体染色法とは、形成された抗体-抗原複合体と、抗体-抗原複合体の形成に参与していない遊離の抗体または抗原とを分離することなく、抗原量または抗体量を測定することができる、ホモジニアスなアッセイ方法である。

【実施例】

【0089】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

〔実施例1〕

組換えHerp蛋白の調製

全RNAをヒト単核白血球からIsogen (日本ジーン社) を用いて単離し、相補DNA (cDNA) を逆転写により調製した。RNA抽出用の白血球は、供血者に対してインフォームドコンセントに基づいて採取した。Herp遺伝子 (NCBI GenBank Accession No. AB034989) の配列に基づいて、cDNAからHerp (エクソン1-6) のアミノ酸残基1~302部分を増幅するために、プライマー (5' -GAAGTGTCTGCGTTGCAGAGATTG-3' (配列番号2) 及び5' -GCTTAGTGTGAACACAGTGTAGTG-3' (配列番号3)) をデザインした。この部位は細胞表面に突き出した部位と考えられている (Kokame et al., J. Biol. Chem., 275, 32846-32853)。

【0090】

ここで得られたPCR生成物は、5' -CTGGGATCCATGGAGTCCGAGACCGAACC-3' (配列番号4) 及び5' -CCGCTCGAGTTACAGGTACATAACAAC -3' (配列番号5) をプライマーとする次のPCR増幅の鋳型として用いた。このプライマーは各々BamHI及びXhoIの制限酵素の切断部位を含んでいる (アンダーライン部)。得られたPCR断片はQIA quick PCR精製キット (QUIGEN GmbH社) を用いて精製し、TOPOベクター (Invitrogen社) のクローニング部位に挿入した。得られたプラスミドをBamHI及びXhoIと一緒に消化し、挿入部位をpGEX-6P1ベクター (Amersham Bioscience社) と結合した。そして、これをグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) -Herp融合蛋白を発現させるためにBamHI及びXhoIで消化した。

【0091】

Herp蛋白を製造するために、このようにして得られたpGEX-6P1-HerpプラスミドをE. coli BL21細胞 (Stratagene社) に導入した。2倍希釈YT培地中におけるpGEX-6P1-Herp含有BL21細胞の一夜飽和培養液10mLを、100mg/mLアンピシリン及び2%グルコース含有2倍希釈YT培地1Lに移植した。培地の600nmにおける吸光度が0.6~0.8に達するまで、培地を激しく攪拌しながら30で培養した。この吸光度に達した時点で、組み換え蛋白の発現を促進

10

20

30

40

50

するために0.1mMイソプロピル-β-D-チオガラクトシド (IPTG) を添加し、更に2時間培養した。細胞を4000 × gで20分間遠心して分離した。バクテリアのペレットを燐酸塩-食塩緩衝液 (PBS) に懸濁させ、2300 × g、15分間遠心し、-80 °C で一夜凍結した。ペレットからの蛋白抽出は、B-PER バクテリア蛋白抽出試薬 (Pierce社) で行った。上清の可溶性GST-Herp融合蛋白を、グルタチオン-セファロースビーズ (Amersham Bioscience 社) で精製した。融合蛋白からGST部位を除去するために、溶液を分解緩衝液 (5mMトリス-塩酸、pH7.2、150mM食塩、1mM EDTA、1mMジチオエリスリトール) 中、16時間4 °C で透析し、PreScission Protease (Amersham Bioscience社) で4 °C、8時間インキュベートした。PBS中で透析後、GSTをグルタチオン-セファロースビーズを用いて溶液から分離した。組み換えHerpの純度は、15% SDS-PAGE泳動後、銀染色で確認した。

10

【0092】

抗ヒトHerp抗体

全ての動物実験は、動物愛護委員会の規定に従って実施された。6週齢の雌BALB/cマウスにRIBIアジュバンドR-700 (Corixa) に懸濁した組換えHerp100 μgを0および14日目に腹腔内投与し、28日目に更に50 μg追加投与した。31日目に脾細胞を単離し、脾細胞とミエローマ細胞 (P3X63Ag8.653) 比3:1の割合で融合させた (Kudo et al., Tohoku J. Exp. Med., 153, 55-66 (1987))。ハイブリドーマをHAT (0.1mM ヒポキサンチン、0.4mM アミノプテリン、16mM チミジン) 添加GIT培地で5% CO₂の湿潤雰囲気中、37 °C で培養し、ELISAによりHerpとの結合でスクリーニングした。限界希釈法により、5株の抗Herp mAb産生クローンを確立した。各々のmAbをUltraLink Immobilized Protein A/Gカラム (Pierce社) を用いて培養上清から精製し、親和性と特異性を酵素免疫測定法 (ELISA) で検討した。5株の中から、Herpに対する高い親和性と特異性を示すHT2 mAbを選択した。HT2 mAbのイソタイプはImmunoPure Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Pierce 社) を用いて同定した。

20

【0093】

ELISA (酵素免疫測定)

96穴マイクロプレート (Immulon 2HB、テルモ社) を、0.1M PBSに溶解した組換えHerp、GST蛋白あるいはニワトリ卵白リゾチームなどの試験用抗原100 μL/ウエルを加えて37 °C 時間固相化した。0.1% Tween20を含むPBS (T-PBS) で3回洗浄後、プレートをブロッキング液 (4% 牛血清アルブミン (BSA) を含むT-PBS) 200 μLで20 °C、60分間インキュベートした。その後、プレートをT-PBSで1回洗浄し、Canget Signal Solution1 (東洋紡) に溶解した抗Herp mAb 10 μg/mLで20 °C、1.5時間インキュベートした。T-PBSで3回洗浄後、Canget Signal Solution2 (東洋紡) で1:5000に希釈したセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウスIgG mAbヤギ抗体を添加し、20 °C、60分間インキュベートした。T-PBSで3回洗浄後、3'-5', 5'-TMBZ基質液 (Sigma社) を50 μL/ウエル添加し、60分後に0.5M硫酸を加えて反応を停止させて酵素活性を測定した。ELISAプレートリーダーで450nm/540nmの吸光度を測定した。

30

【0094】

競合的ELISAのために、Canget Signal Solution1 (東洋紡) で希釈した抗体を阻害剤 (0.001-0.1 μg/mLの組換えHerp又はGST) と共に20 °C、60分間、ポリプロピレンチューブ中でインキュベートし、抗原を固相化した96ウエルプレートに添加した。結合したIgGを前記の要領で検出した。

40

【0095】

イムノプロットティング

HeLa細胞を1mM タブシガーギン、2mM ホモシステイン又は1mM 2-メルカプトエタノールと共に10% 牛胎児血清 (FCS)-MEM培地中で37 °C、6時間培養した。対照細胞は、刺激試薬抜きで培養した。20 × g、5分間遠心後、5 × 10⁶個の細胞ペレットを2.4mLの検体緩衝液 (pH7.4の10mM HEPES-KOH、250mM ショ糖、10mM KCl, 15mM MgCl₂, 1mM EDTA及び1mM EGTA) に再懸濁し、4 °C、30分間、26ゲージ注射針を通してホモジネートした。融解液を1000 × g、5分間遠心し、上清を分離し、再び10000 × g、5分間遠心した。膜分画を含むペレットを1

50

× SDS緩衝液に再懸濁した。検体を95℃、5分間加熱し、電気泳動のために10% SDS-PAGEに添加した。分離された蛋白は、Immobilon転写膜 (Millipore社) に転写した。膜をブロッキング液 (4% スキムミルク、0.1% Tween20、PBS) で4℃ 一夜ブロッキング処理した。ブロッキング液に溶解したHT2 mAb 2 µg/mLまたは対照マウスIgG12 µg/mLを膜に添加し、20℃、90分間インキュベートした。いくつかの検体では、組換えHerp蛋白2 µg/mLをHT2 mAbまたはマウスIgG1に添加し、60分間インキュベートした。ブロッキング液に溶解したビオチン化ヤギ(Fab')₂、抗マウスIgG抗体 (KPL社) 0.3 µg/mLを膜に添加し、20℃、60分間インキュベートした。膜を0.1% T-PBSで洗浄し、その後ブロッキング溶液に溶解したストレプトアビジン-HRP (1:5000希釈、Amersham Bioscience社) を加え、20℃、60分間インキュベートした。0.1% T-PBSで洗浄後、陽性シグナルを可視化するために、膜をChemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life & Analysis Science社) とインキュベートした。

10

【0096】

免疫蛍光顕微鏡

HeLa細胞を1mM タブシガーギン、2mM ホモシステイン又は1mM 2-メルカプトエタノールと共に10% 牛胎児血清 (FCS) -MEM培地中で37℃ 6時間、ガラス製培養皿 (MaTek社) で培養した。対照細胞は、刺激試薬抜きで培養した。PBSで3回洗浄後、細胞を-20℃ で20分間アセトン-メタノール混液 (1:1) 処理し、皿上に固定した。細胞をPBSで3回洗浄した後、0.05% TritonX100-PBSで20℃、2分間インキュベートし、5% 正常ヤギ血清 (Dako Cytomation社) / 3% BSA / PBSで4℃、一夜ブロッキングした。PBSで3回洗浄後、細胞をER保持シグナルペプチド配列を認識する抗KDEL mAb (Assay design社) 5 µg/mLと20℃、1時間インキュベートした。PBSで3回洗浄し、FITC標識ヤギ(Fab')₂、抗マウスIgG抗体 (KPL社) 50 µg/mLを細胞に加え、皿を20℃、1時間インキュベートした。HT2 mAb及び対照マウスIgG1 (イソタイプ適合対照用、R&D system社) をQuantum dot (Q dot) 655 (Invitrogen社) で標識した。Qdot655で標識したHT2 mAb又は対照マウスIgG1を皿の洗浄細胞に加え、20℃、1時間インキュベートした。洗浄操作後、細胞をProlong Gold antifade試薬 (Invitrogen社) で密封し、蛍光顕微鏡 (キーエンス社) で観察した。

20

【0097】

< 結果 >

上述したようにHerpを特異的に認識するmAbを産生するハイブリドーマを確立するために、BALB/cマウスに組換えヒトHerp蛋白を免疫した。その結果、Herpに対する高い親和性と特異性を示す抗体 (HT2 mAbと命名) を産生するハイブリドーマHT2を選択した。得られたハイブリドーマHT2は平成20年1月25日付でブダベスト条約に基づき独立行政法人 製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター (日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目5番地8) に受領番号NITE AP-481として寄託した。

30

【0098】

ハイブリドーマHT2が産生するモノクローナル抗体は、図1に示すように、用量依存的に組換えHerpと結合した。なお、このモノクローナル抗体はGSTや鶏卵リゾチームとは結合しなかった (データ掲載なし)。また、図2に示すように、ハイブリドーマHT2が産生するモノクローナル抗体は、抗マウスIgG1及びIgGにより認識された。また、図1に示すように、イソタイプ適合対照マウスIgGはHerpと結合しなかった。競合的ELISAでは、Herpに対するモノクローナル抗体の結合はHerpにより妨害されたが、GSTでは妨害されなかった。これらの結果から、ハイブリドーマHT2が産生するモノクローナル抗体 (HT2mAb) は、GSTを交差反応せず、Herpに対する特異性及び感度が非常に優れていることが明らかとなった。

40

【0099】

ハイブリドーマHT2が産生するモノクローナル抗体 (HT2mAb) は、図3の1~4列に示すように、無処置あるいはERストレスHeLa細胞から抽出された膜分画の54kDa蛋白を認識した。なお、54kDa蛋白の発現レベルは、ERストレスHeLa細胞で増加していた。このバンドは、図3の5~8列に示すように、インキュベーション前に組換えHerpでHT2mAbを吸収

50

すると消滅した。なお、図3の9～12列に示すように、イソタイプ適合対照IgG1は僅かしかバンドを認識しなかった。これらの結果から、ハイブリドーマHT2が産生するモノクローナル抗体（HT2mAb）は、ERストレスによってHeLa細胞から誘導されるHerp（組換え体ではない）を検出することができることが明らかとなった。また、組換え体でないHerpに対する結合特異性は、Herp組換え体の吸収により確認することができた。

【0100】

また、図4に示すように、二重免疫蛍光染色によれば、ERストレスHeLa細胞の細胞質領域がHT2mAb（赤色蛍光）及び抗KDELMAb（緑色蛍光）で同様のパターンで染色されることが示された。なお、対照IgG1では辺縁部のみが染色された。データとしては示さないが健康人から得られた末梢血リンパ球はHT2mAbで染色されなかった。これらの結果から、HT2mAbは、細胞から誘導されたHerpそれ自身又はHerp発現細胞を検出するための免疫蛍光染色に用いることができることが示された。特に、HT2mAbを用いることによって、タブシガーギン、ホモシステイン又は2-メルカプトエタノールによりERストレスが負荷された細胞中でHerpが増加することが示された。

【図面の簡単な説明】

【0101】

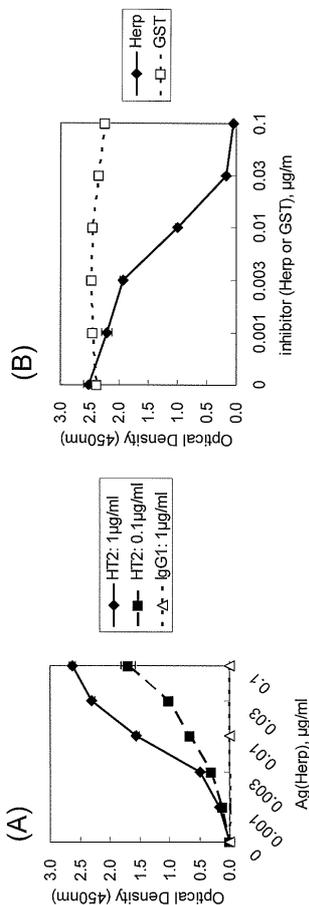
【図1】ELISAによりモノクローナル抗体（HT2mAb）のHerpに対する結合活性を評価した結果を示す特性図である。

【図2】モノクローナル抗体（HT2mAb）のイソタイプを決定した結果を示す特性図である。

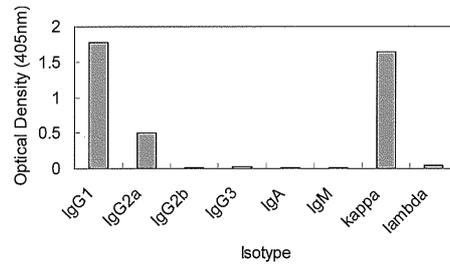
【図3】モノクローナル抗体（HT2mAb）を用いたウエスタンブロットに結果を示す特性図である。

【図4】モノクローナル抗体（HT2mAb）を用いて、タブシガーギン、ホモシステイン又は2-メルカプトエタノールによりERストレスが負荷された細胞に対して間接的蛍光観察した結果を示す写真である。

【図1】



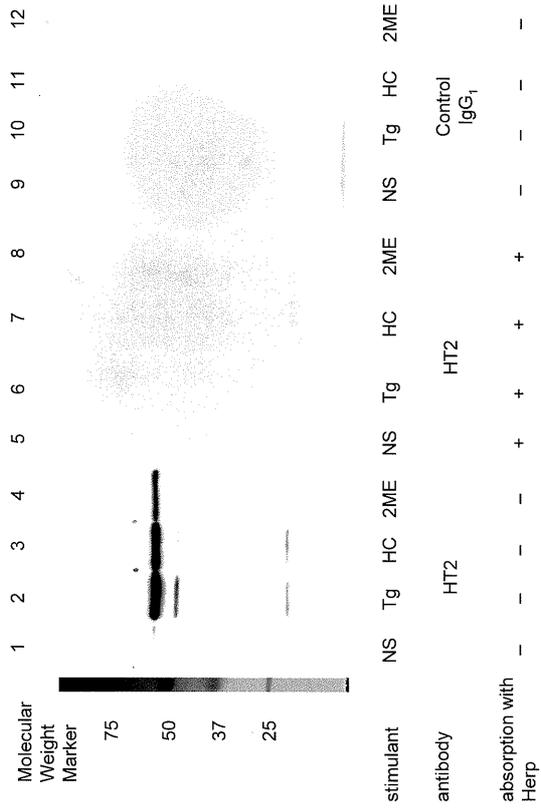
【図2】



10

20

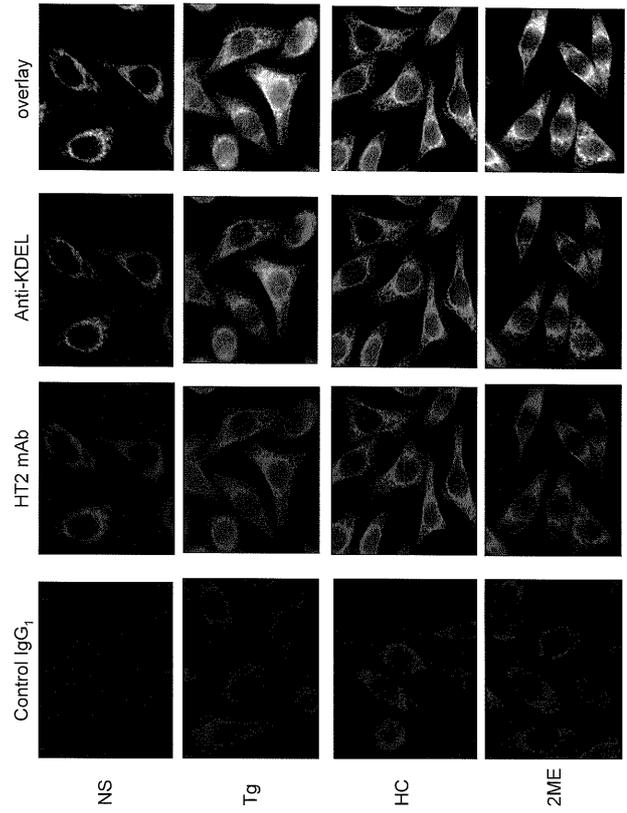
【 図 3 】



【 配列表 】

2009173612000001.app

【 図 4 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 P 21/02
C 1 2 N 15/00 A

Fターム(参考) 2G045 AA25 BB20 DA36 FA16 FB02 FB03 FB12
4B024 AA11 BA44 CA04 DA06 EA04 GA03 GA11 HA12 HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA91X AA92X AB05 AC14 CA46
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA50 FA72

专利名称(译)	单克隆抗人同型半胱氨酸诱导的内质网 (ER) 蛋白Herp抗体		
公开(公告)号	JP2009173612A	公开(公告)日	2009-08-06
申请号	JP2008016602	申请日	2008-01-28
申请(专利权)人(译)	国立大学法人东北大学		
[标]发明人	平林泰彦 网友美子		
发明人	平林 泰彦 岡 友美子		
IPC分类号	C07K16/18 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/48 C12P21/02 C12N15/09		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12N5/00.B G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/48.P C12P21/02 C12N15/00.A C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BB20 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：能够定性或定量测定Herp。ŽSOLUTION：提供结合同型半胱氨酸诱导的内质网 (ER) 蛋白Herp或其功能片段的单克隆抗体。特别优选地，单克隆抗体由通过使用致敏抗原产生的杂交瘤产生，所述致敏抗原包含从同型半胱氨酸诱导的内质网 (ER) 蛋白的N-末端延伸至跨膜结构域的1-302个氨基酸残基。Ž

