(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3920556号
(P3920556)
(45)発行日　平成19年5月30日(2007.5.30)　(24)登録日　平成19年2月23日(2007.2.23)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	C
C07K 16/24	(2006.01)	C07K	16/24	
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA

請求項の数 4　(全 14 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2000-330325 (P2000-330325)
(22)出願日　平成12年10月30日 (2000.10.30)
(65)公開番号　特開2002-125666 (P2002-125666A)
(43)公開日　平成14年5月8日 (2002.5.8)
審査請求日　平成15年4月18日 (2003.4.18)

微生物の受託番号　FERM　P-18069

前置審査

(73)特許権者　502277924
工藤　憲雄
東京都千代田区三番町５－１０－４０２
(74)代理人　100058479
弁理士　鈴江　武彦
(74)代理人　100091351
弁理士　河野　哲
(74)代理人　100088683
弁理士　中村　誠
(74)代理人　100108855
弁理士　蔵田　昌俊
(74)代理人　100075672
弁理士　峰　隆司
(74)代理人　100109830
弁理士　福原　淑弘

最終頁に続く

(54)【発明の名称】短縮型ミッドカイン（ｔＭＫ）タンパク質特異的モノクローナル抗体及びその用途

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
短縮型ミッドカインタンパク質と反応するが、ミッドカインタンパク質とは反応しないモノクローナル抗体又はその結合性断片であって、受託番号ＦＥＲＭ　Ｐ－１８０６９のハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体。
【請求項２】
請求項１に記載のモノクローナル抗体又はその結合性断片を用いて、腫瘍細胞に特異的に発現している短縮型ミッドカインタンパク質を検出することを特徴とする、短縮型ミッドカインタンパク質の検出方法。
【請求項３】
請求項１に記載のモノクローナル抗体又はその結合性断片を用いて、腫瘍細胞に特異的に発現している短縮型ミッドカインタンパク質を検出することを特徴とする、腫瘍細胞の検出方法。
【請求項４】
短縮型ミッドカインタンパク質で免疫化したマウス脾細胞とマウス骨髄腫細胞とを融合させて得られ、請求項１に記載のモノクローナル抗体を産生する、受託番号ＦＥＲＭ　Ｐ－１８０６９のハイブリドーマ。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】

本発明は、短縮型ミッドカイン（tMK)タンパク質に特異的なモノクローナル抗体又はその断片、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、該モノクローナル抗体を用いた短縮型ミッドカイン（tMK)タンパク質の検出方法及び腫瘍細胞の検出方法ならびに該モノクローナル抗体を含む短縮型ミッドカイン（tMK)タンパク質検出キットに関する。

【０００２】

【従来の技術】

ミッドカイン(Midkine:MK)は、胚性腫瘍細胞の分化時のレチノイン酸応答遺伝子産物として発見された成長因子である。MKは、ヘパリン結合能を持ち、神経成長・分化作用、造血管作用、内皮細胞におけるプラスミノーゲン活性増強等の作用が報告されており、これらの作用を介して発癌過程に関与していると推察されている。またウィルムス(Wilms’)腫瘍や胃ガン、結腸ガン等では正常組織と比較して発現が増強されており、MK遺伝子を導入したマウス繊維芽細胞NIH3T3でMKを過剰発現させることによって、細胞がガン化することが報告されている [K.Kadomatsu et al., Br. J. Cancer, 75, 354-359 (1997)]。MKは塩基性アミノ酸に富み、分子量13,000のタンパク質で [M.Tomomura et al., J. Biol. Chem., 265, 10765-10770 (1990)] 、二つのドメイン（Ｎ－ドメイン；1-61アミノ酸，Ｃ－ドメイン；62-121アミノ酸）から成り [L. Fabri et al., J. Chromatogr., 213-225 (1993)]、活性部位はＣ－ドメインに偏在する [H. Muramatsu et al., Biochem. Biophys. Res. Commn., 203, 1131-1139 (1994)] 。

【０００３】

一方、1996年、MKに対するプライマーを用いたPCR法によって、そのプライマーによって増幅されるMKmRNAよりも全長の短い、280bpのmRNAが腫瘍細胞において発現していることが発見された [I.Miyashiro et al., Cancer Letters, 106, 287-291 (1996) ; T.Kaname et al., Biochemical and Biophysical Reseach Communications, 219, 256-260 (1996)] 。この短縮型 MK(Truncated Midkine:tMK) mRNA （tMKmRNA）は、５個のエキソンから成るMK遺伝子から第３エキソンが欠損した変異体である。mRNAの配列から予測されるそのタンパク質構造は、MKにおけるN-ドメインを持たず、Ｎ－末端の一部とMKの主要活性部位のＣ－ドメインを保持したものと考えられている。しかしながら、tMK タンパク質としての存在は明らかではなく、その検出法も確立されていない。

【０００４】

これまでtMKmRNA の発現が確認されている腫瘍細胞には、ウィルムス腫瘍、膵臓癌・胃癌・肺癌・直腸上皮癌等があるが、対応する正常細胞では、tMKmRNAの発現をしていないことが明らかとなっている[K.Aridome et al., British Journal of Cancer, 78, 472-477 (1998)等] 。また、tMK発現の有無によって胃腸癌でのリンパ節転移の診断マーカーになるとの報告がある [K. Aridome et al, Cancer Research Campaign, 78(4), 472-477 (1998)]。

【０００５】

腫瘍の確認・特性づけは診断及び治療の最も重要な項目である。現在行われている腫瘍診断の一般的な方法は、細胞又は組織片を顕微鏡下で観察することによって行われる。しかし、このような形態学的診断法である顕微鏡下での細胞診は幾つかの問題が存在する。たとえば、検査に必要な量の試料が採取できず、その量が不十分である場合は診断が非常に困難であり、また、試料採取自体が不可能である場合がある。これらの理由によって、腫瘍であるか無いかの判断ができない例が50%以上となり、明らかに癌であるという証拠や、癌であるといった確信が持てない場合が多い。また、かかる診断では、剥離細胞等が得られない場合は穿刺による試料採取を行わねばならず患者への負担が大きいこと、判定には熟練した技術を要し誰もがわかるといった一般性に欠けていること、多数の検体を迅速に判定することが困難であること等の問題も存在する。

【０００６】

一方、予後の判定も、顕微鏡下で検視された場合の細胞の外観に依存する。一般に、原発腫瘍細胞が異様であるほど、転移の可能性が高くなるが、その関連性はわかっていない。何が最も効果的な処置であるかを判断するには、転移が起こる可能性があるか否かを正確

に予知することが有効である。
【０００７】
近年、特異性の高いモノクローナル抗体の製造が可能になったことにより、腫瘍診断の領域は著しく進歩した。ここで検出のターゲットとなる腫瘍マーカーの選定が特に重要である。腫瘍マーカーとは、腫瘍細胞の産生物で、腫瘍細胞のみで産生する物質、正常細胞でも産生するがとりわけ腫瘍細胞での産生が増加している物質、あるいは、悪性増殖に対しての生体反応として正常細胞で形成される物質を意味する。既知の腫瘍マーカーの例として、αフェトプロテイン（ＡＦＰ）、ガン胎児性抗原（ＣＥＡ）等が知られており、腫瘍患者の治療と進行のモニタリングに利用される。しかしながら、現実には腫瘍マーカーは、正常時においても検出されるケースがあったり、腫瘍組織がある程度の大きさにならないと検出されない等の問題があり、また、特定の腫瘍でしか判定できないという欠点もある。
これに対し、前述のようにtMKは他の腫瘍マーカーとは異なって、多種類の腫瘍で発現し、正常細胞では発現しないことから、これを特異的に検出することが可能となれば、広範囲にわたる腫瘍診断の優れた指標になると考えられる。
【０００８】
【発明が解決しようとする課題】
本発明は、腫瘍マーカーとして有効な短縮型ミッドカイン（tMK)タンパク質に特異的なモノクローナル抗体、及び当該モノクローナル抗体を利用した腫瘍細胞の検出方法を提供することを目的とする。
【０００９】
【課題を解決するための手段】
本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、短縮型ミッドカイン（tMK)タンパク質で免疫化したマウス脾細胞とマウス骨髄腫細胞とを融合し、得られたハイブリドーマから短縮型ミッドカイン（tMK)タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を得ることに成功し、本発明を完成するに至った。
【００１０】
すなわち、本発明は以下の(1) ～(7) の発明である。
(1) 短縮型ミッドカイン（tMK)タンパク質とは反応するが、ミッドカイン（MK)タンパク質とは反応しない、モノクローナル抗体又はその断片。
(2) 短縮型ミッドカイン（tMK)タンパク質が、ミッドカイン（MK) タンパク質の完全長アミノ酸配列から第３エキソン部分にコードされるアミノ酸配列を除いたアミノ酸配列からなることを特徴とする、上記(1)のモノクローナル抗体又はその断片。
【００１１】
(3) 短縮型ミッドカイン（tMK)タンパク質で免疫化したマウス脾細胞とマウス骨髄腫細胞とを融合させて得られ、上記(1) のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。
(4) 上記(1) のモノクローナル抗体又はその断片を用いて腫瘍細胞に特異的に発現している短縮型ミッドカイン（tMK)タンパク質を検出することを特徴とする、短縮型ミッドカイン（tMK)タンパク質の検出方法。
【００１２】
(5) 上記(1) のモノクローナル抗体又はその断片を用いて腫瘍細胞に特異的に発現している短縮型ミッドカイン（tMK)タンパク質を検出することを特徴とする、腫瘍細胞の検出方法。
(6) 上記(1) のモノクローナル抗体又はその断片を含むことを特徴とする、短縮型ミッドカイン（tMK)タンパク質を検出するためのキット。
(7) 上記(1) のモノクローナル抗体又はその断片により特異的に認識される、短縮型ミッドカイン（tMK)タンパク質及びその相同体。
以下、本発明を詳細に説明する。
【００１３】
【発明の実施の形態】

１．組換え短縮型ミッドカインタンパク質の産生
組換え短縮型ミッドカインタンパク質は、ヒトMK遺伝子から第３エキソン部分を欠損させた遺伝子断片を大腸菌で発現させ、精製することによって得ることができる。
【００１４】
本発明において、「ミッドカインタンパク質」とは、図１に示すような121 個の完全長のアミノ酸配列からなるタンパク質をいい、「短縮型ミッドカインタンパク質」とは、前記完全長のアミノ酸配列から、MK遺伝子の第３エキソン部分にコードされるアミノ酸配列を除いた、65個のアミノ酸配列からなるタンパク質をいう。
以下、「ミッドカインタンパク質」を「MK」と、「短縮型ミッドカインタンパク質」を「tMK 」と表記する。
【００１５】
２．本発明モノクローナル抗体の製造
本発明のtMK タンパク質特異的モノクローナル抗体は、次の各工程を経て製造される。
(1) 動物の免疫及び抗体産生細胞の採取
１．で得られた組換えtMK タンパク質を抗原として、３～10週齢、好ましくは４週齢のマウスに投与する。免疫は、既存の方法であれば何れの方法をも用いることができるが、主として静脈内、皮下、腹腔内に適当なアジュバンド、例えば市販のフロイント完全アジュバンド、フロイントの不完全アジュバンド、ＢＣＧ、水酸化アルミニウムゲル、百日咳菌ワクチン等とともに注入するのが好ましい。免疫の間隔は特に限定されないが、例えば１～２週間おきに、２～５回免疫すればよい。抗原の免疫量は例えば１回にマウス１匹当たり、10～500μg 用いればよい。
【００１６】
最終の免疫日から３～10日後に、抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、胸腺細胞、末梢血細胞が挙げられるが、脾臓細胞を用いるのが一般的である。かかる抗体産生細胞は、マウスから脾臓、リンパ節、胸腺、末梢血等を摘出又は採取し、これら組織を破砕する。得られる破砕物をPBS 、DMEM、RPMI1640、E-RDF 等の培地又は緩衝液に懸濁し、 200～250 μm のステンレスメッシュ等で濾過後、遠心分離を行うこと等により目的とする抗体産生細胞を調製する。
【００１７】
(2) 細胞融合
上記の抗体産生細胞と融合させる骨髄腫（ミエローマ）細胞としては、マウスから得られた当業者が一般に入手可能な株化細胞を使用する。使用する細胞株としては、薬剤抵抗性を有し、未融合の状態では選択培地（例えばＨＡＴ培地）で生存できず、抗体産生細胞として融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。一般的に８－アザグアニン耐性株が用いられ、この細胞株は、ヒポキサンチン－グアニンホスフォリボシルトランスフェラーゼを欠損し（HGPRT-）、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（ＨＡＴ）培地に生育できない。骨髄腫細胞の具体例としては、Sp2/0-Ag14 [ATCC CRL-1581 ; Nature, 276, 271 (1978)]、P3X63Ag8［ATCC TIB-9; Nature, 256, 495-497(1978)］、P3 X63 Ag8U.1(P3U1) ［ATCC CRL-1580; Current Topics in Microbiology and Immunology , 81, 1-7(1978) ］、P3X63Ag8.653［ATCC TIB-18; Europian J. Immunology, 6, 511-519(1976) ］、P2/NSI/1-Ag4-1［ATCC CRL-1581; Nature, 276, 269-270(1978) ］等のマウス骨髄腫細胞株等が挙げられる。
【００１８】
(1) で免疫した抗体産生細胞と上記で得られた骨髄腫細胞とを細胞融合させる。細胞融合はMEM 、DMEM、RPMI-1640 、E-RDF 等の動物細胞培養用培地中で10^{7} ～10^{8} 細胞／mLの骨髄腫細胞と抗体産生細胞とを、混合比１：１～１：10で、例えば約１：５の割合で、融合促進剤存在下、30～37℃で１～３分間細胞同士を接触させることによって効率的に融合反応を進めることができる。細胞融合を促進させるためには、平均分子量 1,000～6,000 のポリエチレングリコール、ポリビニールアルコール、又はセンダイウイルス等の融合促進剤や融合ウイルスを使用することができる。また、電気刺激（例えばエレクトロポレ

ーション）を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞と骨髄腫細胞とを融合させてもよい。

【００１９】

(3) ハイブリドーマの選択及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイリドーマを選別する。その方法として、選択培地における細胞の選択的増殖を利用する方法を用いることができる。細胞懸濁液を例えばＨＡＴサプリメント（Gibco BRL)及びインターロイキン－６（1unit/mL）を添加したイスコフ培地(IMDM)に10^3 ～10^7 細胞/mL となるよう希釈後、96ウェルの細胞培養用マイクロプレートに10^2 ～10^6 細胞/ ウェルまき、各ウェルに選択培地、例えば HAT培地等を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。

【００２０】

骨髄腫細胞として８－アザグアニン耐性株、選択培地として HAT培地を用いた場合は、未融合の骨髄腫細胞は培養約７～10日目には死滅し、正常細胞である抗体産生細胞もインビトロでは長く生存できず、培養約７～10日目には死滅する。その結果、培養６～10日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

【００２１】

増殖してきた細胞の培養上清につき、目的とするtMK 抗体の産生があるか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは通常の方法によれば良く、特に限定はされない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採集し、固相化したtMK 抗原に該上清を添加した後、標識した第二抗体を加えてインキュベートし、その結合能を酵素免疫測定法（EIA, ELISA）、放射線免疫測定法（RIA)によって測定することができる。

【００２２】

具体的には、まず、免疫源として使用したtMK 抗原を吸着させた96ウェルマイクロプレートにモノクローナル抗体を含む培養上清を添加して抗原と反応させる。次いで、結合した特異的抗体に酵素標識抗免疫グロブリン抗体を反応させ、各ウェルに酵素基質を加えて発色させる。免疫源として使用したtMK 抗原を固相化したウェルでのみ発色する培養上清を選別することにより、tMK 抗原に対して結合性を有する抗体を産生するハイブリドーマを検索することができる。

ハイブリドーマのクローニングは、限界希釈法、軟寒天法、フィブリンゲル法、蛍光励起セルソーター法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得できる。

【００２３】

(4) モノクローナル抗体の採取

取得したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法としては、通常の細胞培養法や腹水形成法等を用いる。

細胞培養法においては、ハイブリドーマを10～20%仔ウシ血清含有IMDM、RPMI-1640 、MEM 、E-RDF 又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件（例えば37℃, ５%CO２ 濃度）で２～14日間培養し、その培養上清から抗体を取得することができる。

【００２４】

腹水形成法においては、骨髄腫細胞由来の哺乳動物と同種の動物の腹腔内にプリスタン（2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン）等の鉱物油を投与し、その後ハイブリドーマ１×10^7 ～１×10^9 個、好ましくは５×10^7 ～１×10^8 個を腹腔内に投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、１～４週間、好適には２～３週間後に腹水又は血清を採集する。

【００２５】

上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫安塩析法、DEAEセルロース等の陰イオン交換体を利用するイオン交換クロマトグラフィー、プロテインＡセファロース等を用いるアフィニティークロマトグラフィー、分子量や構造によってふるい分ける分子ふるいクロマトグラフィー等の公知の方法を適宜に選択して、又はこれらを組み

合わせることにより精製することが可能である。かくして、本発明のtMK 特異的モノクローナル抗体を得ることができる。

【００２６】

３．本発明のモノクローナル抗体によるtMK の検出

本発明におけるtMK 特異的モノクローナル抗体を用いたtMKの検出は、例えばイムノブロット法、酵素抗体法（ＥＩＡ）、放射線免疫測定法（ＲＩＡ）、蛍光抗体法、免疫細胞染色等より行うことが可能であるが、それらに限定されるものではない。

試料としては、例えば、腫瘍が疑われる組織切片、血液、リンパ液、喀痰、肺洗浄液、尿、便、組織培養上清等があるが、これらに特に限定されるものではない。

【００２７】

また、上記tMK 特異的モノクローナル抗体は、その断片であってもよく、具体的には、当該抗体の一本鎖抗体断片(scFv)が挙げられる。

具体的には、ELISA 法による場合は、以下の通り行う。まず、希釈した血液等の試料を96ウェルマイクロプレートに吸着させた後、一次抗体として本発明のtMK 特異的モノクローナル抗体を反応させる。次いで、発色反応に必要なPOD(ペルオキシダーゼ) 等の特異的酵素で標識した抗グロブリン抗体を反応させ、洗浄後、発色基質としてABTS(2,2'-アジノ-ジ-(3-エチル-ベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) 等を添加して発色させ、比色法により測定することによって試料中のtMK を検出する。

【００２８】

あるいは、サンドイッチELISA 法による場合は、以下の通り行う。まず、希釈した血液等の試料を、予め本発明のtMK 特異的モノクローナル抗体を吸着させた96ウェルマイクロプレートに添加して一定時間インキュベートする。その後、プレートを洗浄し、ビオチンで標識した精製抗体を各ウェルに添加して一定時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、酵素標識アビジンを添加してさらにインキュベートする。インキュベート後、プレートを洗浄し、発色基質としてオルトフェニレンジアミン等を添加して発色させ、比色法によって測定する。

【００２９】

４．本発明のモノクローナル抗体を含むtMK 検出用キット

本発明のtMK 検出用キットは、少なくとも本発明のtMK 特異的モノクローナル抗体を含むものであればよいが、固相に固定されるモノクローナル抗体、及び当該モノクローナル抗体とは抗原認識部位が異なり、二次抗体として用いられるモノクローナル抗体を含むものである。二次抗体として用いられるモノクローナル抗体は、例えば酵素等で標識されていてもよく、これら２つの抗体の他に、各種試薬（例えば、酵素基質、緩衝液、希釈液等）を含んでいてもよい。

【００３０】

以上のように、本発明のtMK 特異的モノクローナル抗体を用いて細胞や組織等の生体試料中のtMK を精度よく検出することができることから、当該モノクローナル抗体は、例えば、腫瘍診断やリスクグループのスクリーニング、癌転移の予知及び癌疾患のモニタリング等に利用することができる。

また、当該抗体を投与することによって腫瘍形成を阻害したり、当該抗体に腫瘍成長阻害剤を付加することによって腫瘍細胞の選択的排除が行うことができ、腫瘍の治療・予防にも有効である。

【００３１】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

〔実施例１〕（組み換えtMK タンパク質の調製）

tMKmRNA[T. Kaname et al., Biochemical and Biophysical Reseach Communications vol.219, pp.256-260 (1996)] の情報に基づき、ヒトMKの断片アミノ酸配列 (60-121)のN-末端に4 つの付加的アミノ酸(Met-Lys-Lys-Lys) を導入することによって、tMK 発現用プラ

スミドを構築した。まず、MK配列を含むプラスミドベクター（pUC118-MK vector）上で、センスプライマー; 5'-GCC CAT GGG GAT GAA AAA GAA AGC CGA CTG-3'（配列番号１）(CC CAT GGの部位はNcoI制限酵素部位）、アンチセンスプライマー;5'-CCC AAG CTT AGT CCT TTC CCT TCC CTT TCT-3'（配列番号２）(AAG CTTの部位はHind III制限酵素部位）を用いたPCRを行うことによって、tMK タンパクをコードするＤＮＡ断片を調製した。PCRサイクルは、30サイクル行った（94℃、１分 →55℃、１分 →72℃、30秒）。PCR 産物(217bp）の配列は、TA配列ベクター(Novagen, USA)を用いる自動ＤＮＡ配列解析装置(DSQ-1000, Shimadzu, Japan）によって確認した。そのＤＮＡ配列を配列番号３に、またそれに対応するアミノ酸配列を配列番号４に示す。

【００３２】

tMK 遺伝子を含むプラスミドをNcoI及びHindIII にて消化し、この制限酵素処理物をアガロース電気泳動にかけ、ＤＮＡ断片をGene Clean Kit (Bio 101 Inc., USA)によって精製した。精製したＤＮＡ断片を T4 DNA リガーゼを用いて発現ベクターpET-25b(+)内のT7プロモーターの下流に存在するpelBリーダー配列にライゲートし (Ligiation Kit, Takara, Japan）、pET-25b(+)-tMKプラスミドを作成した。このpET-25b(+)-tMKプラスミドをE.coli BL21に形質転換し、陽性クローンをアンピシリン（100μg/mL)を含むLB寒天平板上で得た。

【００３３】

pET-25b(+)-tMKプラスミドを含むE.coli BL21を、アンピシリン（100μg/mL)と0.1mM IPTG(Isopropyl-1-thio-D-galactopyranoside)を含む２×ＹＴ培地中で培養し、遠心分離によって集菌し、ソニケーションによって菌を破砕した。遠心分離によって得られた沈殿に可溶化緩衝液 [20mM Tris-HCl (pH7.6), 8.0M urea, 10mM DTT, 0.1mM PMSF(Phenylmethanesulfonyl fluoride)] を加え、室温で６時間置き、遠心上清を得た。これを緩衝液 [20 mM Tris-HCl(pH8.5), 0.1M NaCl, 0.1mM PMSF, 1.0mM CaCl２, 1.0mM MgCl２]中で透析を行った。更に遠心し、上清を緩衝液Ａ(50mM sodium phosphate buffer, pH6.8, 0.1mM PMSF) で透析した。これをHi-Trap Heparin column(volume 5mL; Pharmacia Biotech, Uppsala)にかけ、1.5M NaClを含む緩衝液Ａで溶出した。このようにして得られた組換えtMKタンパク質の純度はCBB 染色によるSDS-PAGEと、抗MK抗体 [S.Kato et al., J. Neuropath. and Exp. Neurogy, 58, 430-441 (1999)]を用いたウェスタンブロッティングによってtMKであることを確認した。

【００３４】

〔実施例２〕（抗tMK特異的抗体の調製）

(1) 抗tMK特異的抗体産生細胞の作製

実施例１で調製した組換えtMKタンパク質を抗原として用いて７週齢BALB/C系雌マウスに２週間おきに合計３回免疫した。初回免疫、追加免疫にはそれぞれFCA(フロイント完全アジュバンド)、FICA（フロイント不完全アジュバンド）を等量混合し、乳状化したものを皮下接種した。最終免疫には、同量の抗原を尾静脈より接種した。最終免疫３日後、脾細胞とマウスミエローマ細胞P3X63-AG8.653を５：１の比率でPEGを用いて融合し、HAT選択培地中で培養しハイブリドーマのみを選択培養した。得られたハイブリドーマを限界希釈法によって0.5 cell/ ウェルで、96ウェルプレートに播き、ウェル中に単一コロニーとして発育したハイブリドーマのみクローンとし、この限界希釈法を２度繰り返すことによりクローニングを行った。クローン化されたハイブリドーマの培養上清を下記の抗tMK特異的抗体の検出法を用いて試験し、抗tMK特異的抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。

【００３５】

(2) 抗tMK特異的抗体の検出

96ウェルプレートに実施例１で調製したtMKタンパク質溶液（抗原溶液）100ng／ウェルとなるよう分注し、一晩４℃又は室温で２時間、静置して固相化した。対照として他のウェルにMKタンパク質溶液を同様に固相化した。抗原溶液の除去後、1%BSA/PBS溶液を用いてブロッキングを行い、抗tMK特異的抗体の検出用及び対照プレートとした。該プレートの

各ウェルに上記(1)で作製したハイブリドーマ培養上清液を滴下し、室温で、60分間インキュベートした。インキュベート後、ハイブリドーマ培養上清液を廃棄し、ＰＢＳを用いてウェル内の残留ハイブリドーマ培養上清液を洗浄し、続いて二次抗体としてPOD標識抗マウスIgG抗体液（和光純薬社製 1：200希釈液）を50uL／ウェルずつ滴下し、室温で60分間インキュベートした。インキュベート後、POD標識抗マウスIgG抗体液を廃棄し、ＰＢＳを用いてウェル内の洗浄を行った。洗浄後、POD用基質液としてABTS(2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)溶液（市販品）を100uL／ウェルずつ滴下し、室温で10～20分間インキュベートし、マイクロプレートリーダーを用いて415nmの吸光度を測定した。結果を表１に示す。

【００３６】

【表１】

	OD 415nm	
クローン	抗 tMK 活性	抗 MK 活性（対照）
MiStMK-V1	0.906	0.187
MiStMK-V3	1.406	0.186
MiS-N	1.660	1.696
MiS-O	1.683	1.48
MiS-D	1.866	0.794

【００３７】

tMKタンパク質を固相化したウェルで0.3以上の吸光度を示し、MKタンパク質を固相化したウェル（対照）で0.3以下の吸光度を示すハイブリドーマ培養上清液を陽性としたところ、２クローンが陽性であった。そのうち、クローン番号MiStMK-V3ハイブリドーマが産生する抗tMK特異的抗体を抗tMK-MiStMK-V3抗体と命名した。

なお、抗tMK-MiStMK-V3抗体を産生するハイブリドーマ株MiStMK-V3は、平成12年10月3日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P- 18069として寄託されている。

【００３８】

〔実施例３〕　（腫瘍細胞中のtMKのウェスタンブロッティングによる検出）

(1)　G401細胞上清の調製

ウィルムス腫瘍由来G401細胞をMcCoy's5A培地に10% FBSを添加した培地を用いて90mmシャーレ上でコンフルエントまで培養し、その培養上清をHeparin-Sepharose column で精製したものを用いた。

【００３９】

(2)　G401細胞培養上清からのtMK検出（ELISA）

上記 (1)の培養上清を抗原として、ELISA用96ウェルプレートに固相化した。プレートのウェルに一次抗体として抗tMK-MiStMK-V3抗体を、対照として抗MK抗体を分注してインキュベートし、洗浄後、二次抗体としてPOD標識抗マウスIgG、POD標識抗ラットIgGを分注してインキュベートした。洗浄後、発色基質としてABTSを用い、415nmの吸光度を測定した。結果を表２に示す。表２より明らかなように、G401細胞培養上清中にtMKの存在を確認できた。

【００４０】

【表２】

精製tMK濃度 (ng/ウエル)	0	10	20	50	100	200
抗tMK抗体	0.05	0.16	0.23	0.58	0.98	1.56
抗MK抗体	0.04	0.05	0.05	0.06	0.06	0.08

【００４１】
(3) G401細胞培養上清からのtMK 検出（ウェスタンブロッティング）
上記(1) 培養上清をSchaggerらの方法に準じてTricin SDS-PAGEを行い、泳動後Towbinらの方法に準じてPVDF膜に転写した。この時対照として、実施例１で作成したtMKタンパク質についても同様の処理を行った。
【００４２】
転写後のPVDF膜を1%スキムミルクＰＢＳでブロッキングし、抗tMK-MiStMK-V3抗体を一次抗体としてインキュベートし、洗浄後POD標識抗マウスIgGを二次抗体としてインキュベートした。洗浄後、4クロロナフトールを発色基質としてPVDF膜をインキュベートし検出されるバンドの観察を行った。
図２に示すように、G401細胞培養上清を泳動したレーン及びtMK抗原を泳動したレーンの分子量約8,000 の位置に各々単一のバンドが認められた。
【００４３】
〔実施例４〕（免疫細胞染色による腫瘍細胞中のtMKの観察）
(1) 固定サンプルの調製
カバーガラス上にてG401細胞を培養し、PLP液(periodate-lysine-paraformaldehyde) にて固定した。
【００４４】
(2) 免疫細胞染色
上記(1) で作製したカバーガラスに3%ヤギ正常血清を50μL/glassで滴下して30分室温で静置後、抗tMK-MiStMK-V3抗体を50μL/glass滴下し、１時間室温で静置した。0.1%BSA/PBS溶液中で十分に洗浄後、ビオチン付加抗マウスIgGを50μL/glass滴下し、室温で30分間静置した。0.1%BSA/PBS溶液中にて洗浄後、1mL MeOH+8.6μL H２０２溶液を50μL/glassで滴下し、先ほどと同様に洗浄を行い、ABCkit添付のＡ、Ｂ液を50μL/glassずつ滴下し、室温で30分間静置した。PBS(-)にて、十分に洗浄後、DABを基質として100μL/glass滴下し、発色を行った。十分な発色が確認できたら大量のDW中にて洗浄を行い、50～100 %EtOH 、EtOH/Xylen (1:1)溶液、100%Xyleneによって段階的に脱水を行い、カナダバルサムによってスライドガラス上に封入した。
その結果、図３に示すように、細胞質中に強く染色された部位がみられ、G401細胞質中にtMKが発現されていることが示唆された。
【００４５】
(3)ヒト組織切片の染色
人腎腫瘍（Wilms' tumor)の組織切片を10% phosphate buffered formalin(pH7.6)で固定し、上記(2) と同様にして染色した。対照としてヘマトキシン・エオジン染色を行った。
その結果、図4に示すように管状に分化した腫瘍細胞の細胞質（長矢印部分）及び芽体細胞（腫瘍細胞）（短矢印部分）の細胞質は強く発色し、正常細胞は染色されなかった。
【００４６】
〔実施例５〕（抗体断片の調製及びそれを用いたtMK の検出）
(1) 遺伝子組換えによる抗tMK抗体断片（抗tMK-scFV断片）の作製
前記の抗tMK-MiStMK-V3抗体を産生するハイブリドーマ株MiStMK-V3より市販のキットを用いてmRNAを分離し、cDNAライブラリーを作製した。次に、VH : 5'-CGG AAT TCG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GG-3' （５’末端；配列番号５）、5'-CGG CTC GAG TGA GGA GAC GGT G

AC TGA GG-3'（３’末端；配列番号６）、VL：5'-GCG GAT CCT GAT GTT TTG ATG ACC CA A-3'（５’末端；配列番号７）、5'-CCC AAG CTT TTC CAA TTT GGT GCC CGC TCC GG-3'（３’末端；配列番号８）プライマーを用いてPCR を行い、VH、VL領域を複製し、間にliner:(GGC GGC GGT GGC TCG)３をVL-liner-VH となるように結合させ、発現ベクターpET-22b(+)に組み込んだ。このベクターをE.coli BL21 に形質転換し、0.1mM IPTGを含む2 ×YT培地で培養することで、抗tMK-scFV断片の発現を誘導し、ニッケルキレートカラムを用いて精製した。

【００４７】

(2) ELISA による組換えtMKとの反応

ELISA プレートにtMK(200ng/100μL)を固定化し、ブロッキングした後に、抗tMK-scFV断片を一次抗体として0, 0.25, 0.5, 2, 5μg/wellの濃度で加え室温で２時間でインキュベートした。反応後、プレートを洗浄し、二次抗体として抗His-Tag （マウスIgG)を加え室温で1.5 時間インキュベートし、洗浄後、三次抗体POD 標識抗マウスIgG 抗体を加えて室温で１時間インキュベートした。反応後、プレートを洗浄し、酵素基質としてABTSを加えて室温で15分間インキュベートし、415nm の吸光度を測定した。図５に示すように、添加する抗tMK-scFV断片濃度の上昇とともに吸光度の上昇が見られ、抗tMK-scFV断片がtMK と結合することが確認された。

【００４８】

(3) MKタンパク質又はその部分タンパク質との反応

ELISA プレートに全長MK（fMK）、MKc-half（MKのアミノ酸配列62-121）又は組換えtMKを0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500μg/wellの濃度で固定化し、一次抗体に抗tMK-scFV断片を、二次抗体、三次抗体は前記抗体を加えて同様にELISA を行った。その結果、図６に示すように、tMK との反応が最も高く、全長MKではわずかに反応し、MKc-halfでは見られなかった。これより、抗tMK-scFV断片は、tMK が持つ特異的配列を認識するタンパク質であることが示唆された。

【００４９】

(4) 抗tMK-MiStMK-V3 抗体と抗tMK-scFV断片の拮抗反応

ELISAプレートに組換えtMK（200ng/μL）を固定化し、１μg/wellの抗tMK-MiStMK-V3抗体と図７に示した濃度の抗tMK-scFV断片をそれぞれ添加し、室温で２時間インキュベートした。反応後、プレートを洗浄し、二次抗体としてPOD標識抗マウスIgG抗体を加えて室温で１時間インキュベートした。反応後、プレートを洗浄し、酵素基質としてABTSを加えて室温で15分間インキュベートし、415nmの吸光度を測定した。図７に示すように、抗tMK-scFV断片の添加量とともに吸光度の減少が認められた。抗tMK-scFV断片はPOD 標識抗マウスIgG 抗体と反応せず、吸光度はプレートに結合した抗tMK-MiStMK-V3 抗体量を反映しているため、tMK に対して抗tMK-MiStMK-V3 抗体と抗tMK-scFV断片は拮抗的に結合する、即ちtMK の同一部分に結合することが示唆された。

【００５０】

【発明の効果】

本発明によれば、腫瘍細胞に発現している短縮型ミッドカイン（tMK)タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体が提供される。本発明のモノクローナル抗体は、腫瘍細胞に特異的に発現しているtMK とのみ反応し、正常細胞にも発現しているミッドカイン(MK)とは反応しないので、当該抗体を生体試料と反応させ、免疫学的手法にて検出することにより、特別な機器を用いることなく腫瘍診断を簡便かつ高精度に行うことができ、また、tMKは他の腫瘍マーカーと比べて多種の腫瘍で発現していることから、特定の癌種に限定されることなくその検出を行える点で臨床上非常に有効である。

【００５１】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DENKA SENIKEN CO., LTD.

<120> Monoclonal antibody specific for truncated Midkine and its use

<130> A000505099
<140> JP Unknown
<141> 2006-05-15
<150> JP 2000-330325
<151> 2000-10-30
<160> 8
<170> Patent in Ver. 2.0
<210> 1
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 1
gcccatgggg atgaaaaaga aagccgactg 30
<210> 2
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 2
cccaagctta gtcctttccc ttccctttct 30
<210> 3
<211> 198
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> CDS
<222> 1..66
<400> 3
ATG AAA AAG AAA GCC GAC TGC AAG TAC AAG TTT GAG AAC TGG GGT GCG 48
Met Lys Lys Lys Ala Asp Cys Lys Tyr Lys Phe Glu Asn Trp Gly ALa
5 10 15
TGT CAT GGG GGC ACA GGC ACC AAA GTC CGC CAA GGC ACC CTG AAG AAG 96
Cys His Gly Gly Thr Gly Thr Lys Val Arg Gln Gly Thr Leu Lys Lys
20 25 30
GCG CGC TAC AAT GCT CAG TGC CAG GAG TCC ATC CGC GTC ACC AAG CCC 144
Ala Arg Tyr Asn Ala Gln Cys Gln Glu Ser Ile Arg Val Thr Lys Pro
35 40 45
TGC ACC CCC AAG ACC AAA GCA AAG GCC AAA GCC AAG AAA GGG AAG GGA 192
Cys Thr Pro Lys Thr Lys Ala Lys Ala Lys Ala Lys Lys Gly Lys Gly
50 55 60
AAG GAC 198
Lys Asp
<210> 4
<211> 66
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<400> 4
Met Lys Lys Lys Ala Asp Cys Lys Tyr Lys Phe Glu Asn Trp Gly ALa
5 10 15
Cys His Gly Gly Thr Gly Thr Lys Val Arg Gln Gly Thr Leu Lys Lys
20 25 30

Ala Arg Tyr Asn Ala Gln Cys Gln Glu Ser Ile Arg Val Thr Lys Pro
35 40 45
Cys Thr Pro Lys Thr Lys Ala Lys Ala Lys Ala Lys Lys Gly Lys Gly
50 55 60
Lys Asp

<210> 5
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 5
cggaattcgg tgcagctgca gcagtctgg 29

<210> 6
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 6
cggctcgagt gaggagacgg tgactgagg 29

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 7
gcggatcctg atgttttgat gacccaa 27

<210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<400> 8
cccaagcttt tccaatttgg tgcccgctcc gg 32

【図面の簡単な説明】

【図１】ヒトミッドカインタンパク質のアミノ酸配列、組換え短縮型ミッドカインタンパク質のアミノ酸配列を示す。

【図２】　G401細胞培養上清中のtMK のウェスタンブロットによる検出を示す。
レーン１：精製組換えtMK(2.5μｇ/レーン)
レーン２：G401細胞培養上清中の部分精製タンパク質(８μｇ/レーン)
標準タンパク質の相対分子量(kDA)を左に示す。

【図３】抗tMK-MiStMK-V3抗体を用いたG401細胞の免疫細胞染色を示す。

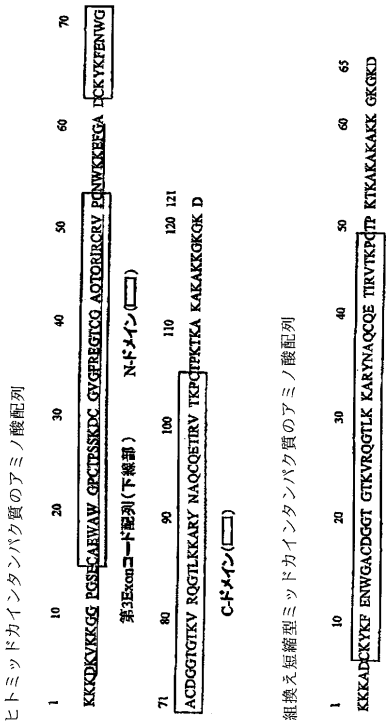
【図４】抗tMK-MiStMK-V3抗体を用いたヒトWilms’腫瘍組織切片の免疫組織染色を示す。

【図５】　抗MK-scFV断片の、ｔMKへの結合をELISAにより測定した結果を示す。

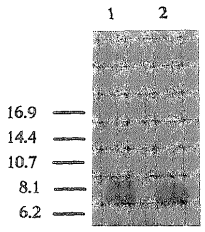
【図６】抗tMK-scFV断片の、全長MK(fMK)、MK c-half（MKのアミノ酸配列62-121）、組換えtMKへの結合をELISAにより測定した結果を示す。

【図７】抗tMK-scFV断片による抗tMK-MiStMK-V3抗体のMKへの結合阻害を示す。

【図１】



【図２】



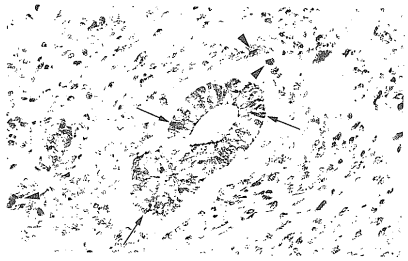
G401 細胞培養上清中の tMK のウエスタンブロット

【図３】



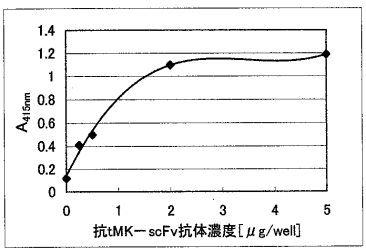
G401 細胞の免疫染色

【図４】

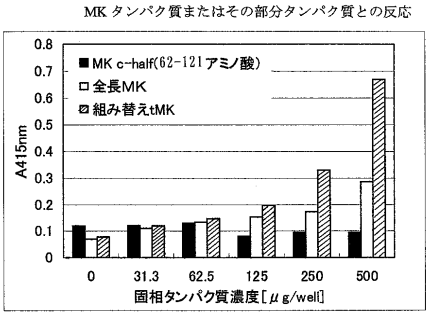


ヒト組織切片の染色

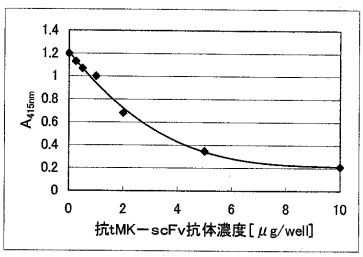
【図５】



【図６】



【図７】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
G01N 33/53	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｄ
G01N 33/574	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ	33/574	Ａ
G01N 33/577	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ	33/577	Ｂ
Ｃ１２Ｐ 21/08	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/08	

(74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男
(74)代理人 100092196
弁理士 橋本 良郎
(72)発明者 三本 朝広
新潟県見附市今町７－１０－２
(72)発明者 篠沢 隆雄
埼玉県熊谷市久下２０３８－３

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 Biochem. Biophys. Res. Commun., １９９１年 ４月３０日, 176 (2), pp. 792-797.
J. Biochem. (Tokyo)., 日本, １９９２年, 111 (5), pp. 563-567.
Biochem. Biophys. Res. Commun., １９９６年, 219 (1), pp. 256-260.

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00
C12Q 1/00
C07K 14/00
C07K 16/00
C12N 5/00
G01N 33/00
C12P 21/00
PubMed
JMEDPlus(JDream2)