

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2012年6月14日(14.06.2012)



(10) 国際公開番号  
WO 2012/077643 A1

- (51) 国際特許分類:  
C07K 16/18 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)  
G01N 33/574 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)  
G01N 33/577 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/078091
- (22) 国際出願日: 2011年12月5日(05.12.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2010-274879 2010年12月9日(09.12.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町二丁目1番1号 Tokyo (JP). 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 小林 道元(KOBAYASHI Michimoto) [JP/JP]; 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 田中 祥徳(TANAKA Yoshinori) [JP/JP]; 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 高山 愛子(TAKAYAMA Aiko) [JP/JP]; 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 金森 智子(KANAMORI Tomoko) [JP/JP]; 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 鄭 基晩(JUNG Gimán) [KR/JP]; 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 坂井 義治(SAKAI Yoshiharu) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区

吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内 Kyoto (JP). 岡部 寛(OKABE Hiroshi) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- 添付公開書類:
- 国際調査報告(条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則 5.2(a))

(54) Title: IMMUNOLOGICAL cofilin-1 PROTEIN MEASUREMENT METHOD

(54) 発明の名称: c o f i l i n 1タンパク質の免疫学的測定方法

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide: an antibody capable of recognizing cofilin-1 protein specifically or a fragment of the antibody; and a method for detecting and testing gastrointestinal cancer, which comprises measuring cofilin-1 protein immunologically using the antibody or the fragment thereof, and which has high detection performance. A immunological cofilin-1 protein measurement method is characterized by measuring cofilin-1 protein or a fragment thereof in a sample using at least two anti-cofilin-1 monoclonal antibodies or fragments thereof which can specifically recognize different peptide regions located in the amino acid sequence constituting cofilin-1 protein.

(57) 要約: c o f i l i n 1タンパク質を特異的に認識する抗体又はその断片、該抗体又はその断片を用いて c o f i l i n 1タンパク質を免疫学的に測定し、高い検出性能を有する消化器癌の検出及び検査法を実現することを目的とする。 c o f i l i n 1タンパク質を構成するアミノ酸配列の異なるペプチド領域を特異的に認識する2種類以上の抗 c o f i l i n 1モノクローナル抗体又はその断片を使用して、試料中の c o f i l i n 1又はその断片を測定することを特徴とする、 c o f i l i n 1タンパク質の免疫学的測定方法。



WO 2012/077643 A1

## 明 細 書

発明の名称 : c o f i l i n 1 タンパク質の免疫学的測定方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、c o f i l i n 1 タンパク質を免疫学的に測定する方法、抗c o f i l i n 1 モノクローナル抗体、消化器癌罹患判定方法及びc o f i l i n 1 タンパク質測定用キットに関する。

### 背景技術

[0002] c o f i l i n 1 (c o f i l i n、non-muscle isoform 18 kDa phosphoprotein) タンパク質は、ADF/C O F I L I Nファミリーに属する細胞骨格結合性タンパク質である。哺乳類で高度に保存されたタンパク質の一つで、ヒトやマウス、ラット、チンパンジー、ウシ、イヌ等においてアミノ酸配列が決定されており、これら種間では98%以上の同一性を示すことが知られている。c o f i l i n 1 タンパク質は、細胞の形態や運動性の調節(非特許文献1)、細胞質分裂(非特許文献2)、エンドサイトーシス(非特許文献3)等様々な生命現象に関与することが明らかとなっている。さらに、このタンパク質は、肺癌(非特許文献4)、膵臓癌(非特許文献5)、乳癌(非特許文献6)、卵巣癌(非特許文献7)や肝癌(非特許文献8)由来の癌組織や癌細胞においても発現が高く、癌の進展に深く関与することも報告されている(非特許文献9)。

### 先行技術文献

#### 非特許文献

[0003] 非特許文献1: Bugyi B. ら、2010年、Annual Review of Biophysics、第39巻、p. 449-470

非特許文献2: kaji N. ら、2008年、Journal of Biological Chemistry、第283巻、p. 4983-4992

非特許文献3: Okreglak V. ら、2007年、The Journal of Cell Biology、第178巻、p. 1251-1264

非特許文献4：Keshamouni V.G. ら、2006年、Journal of Proteome Research、第5巻、p.1143-1154

非特許文献5：Sinha P. ら、1999年、Electrophoresis、第20巻、p.2952-2960

非特許文献6：Zhang Y. ら、2010年、The Journal of International Medical Research、第38巻、p.1042-1048

非特許文献7：Martoglio A. ら、2000年、Molecular Medicine、第6巻、p.750-765

非特許文献8：Ding S. ら、2004年、Proteomics、第4巻、p.982-994

非特許文献9：Yamaguchi H. ら、2007年、Biochimica et Biophysica Acta、第1773巻、p.642-652

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明者らは、近年、cofilin1タンパク質が早期胃癌患者の血液中で上昇していることを見出し、cofilin1タンパク質、その変異体及び／又はそれらの断片を胃癌の早期発見に有用な診断マーカーとして、胃癌の罹患を早期に判定することのできる胃癌検出方法を開発した。cofilin1タンパク質の定量的な測定が可能になれば、胃癌をはじめとする消化器癌の早期発見と効果的な臨床治療につながることを期待できる。

[0005] しかし、cofilin1タンパク質の既存の検出法は、ウェスタンブロット法等を用いた低感度かつ非定量的な免疫学的測定法に限られており、臨床応用へ向けては新たな測定方法の開発が課題として残されていた。

[0006] そこで、本発明では、cofilin1タンパク質を高感度かつ定量的に検出する免疫学的測定方法の提供を目的とする。

## 課題を解決するための手段

- [0007] 上記の課題を解決するために鋭意研究を行った結果、本発明者らは、*cofilin*1タンパク質を構成するアミノ酸配列上の異なる特定のペプチド領域上に存在するエピトープをそれぞれ特異的に認識して結合する2種以上のモノクローナル抗体を組み合わせて、*cofilin*1及び／又はその断片を免疫学的に測定することにより、高感度かつ定量的に検出できることを見出した。本発明は、上記知見に基づいて成されたものであり、すなわち以下を提供することである。
- [0008] (1) 以下のいずれかのペプチド領域に存在するエピトープを特異的に認識する抗*cofilin*1モノクローナル抗体又はその断片。
- [0009] a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列のうち、少なくとも配列番号5で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域
- b) 前記a)のペプチド領域のアミノ酸配列に1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたペプチド領域
- c) 前記a)のペプチド領域のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するペプチド領域
- (2) 軽鎖において、CDR1が配列番号8で示される配列を含み、CDR2が配列番号9で示される配列を含み、及びCDR3が配列番号10で示される配列を含み、ならびに重鎖において、CDR1が配列番号11で示される配列を含み、CDR2が配列番号12で示される配列を含み、及びCDR3が配列番号13で示される配列を含む、(1)に記載の抗*cofilin*1モノクローナル抗体又はその断片。
- [0010] (3) 軽鎖において、CDR1が配列番号14で示される配列を含み、CDR2が配列番号15で示される配列を含み、及びCDR3が配列番号16で示される配列を含み、ならびに重鎖において、CDR1が配列番号17で示される配列を含み、CDR2が配列番号18で示される配列を含み、及びCDR3が配列番号19で示される配列を含む、(1)に記載の抗*cofilin*1モノクローナル抗体又はその断片。

[0011] (4) 以下のいずれかのペプチド領域に存在するエピトープを特異的に認識する抗c o f i l i n 1モノクローナル抗体又はその断片。

[0012] a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列のうち、少なくとも配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域

b) 前記a)のペプチド領域のアミノ酸配列に1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたペプチド領域

c) 前記a)のペプチド領域のアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するペプチド領域

(5) 軽鎖において、CDR1が配列番号20で示される配列を含み、CDR2が配列番号21で示される配列を含み、及びCDR3が配列番号22で示される配列を含み、ならびに重鎖において、CDR1が配列番号23で示される配列を含み、CDR2が配列番号24で示される配列を含み、及びCDR3が配列番号25で示される配列を含む、(4)に記載の抗c o f i l i n 1モノクローナル抗体又はその断片。

[0013] (6) 以下のいずれかのペプチド領域に存在するエピトープを特異的に認識する抗c o f i l i n 1モノクローナル抗体又はその断片。

[0014] a) 配列番号2で示されるアミノ酸配列のうち、少なくとも配列番号7で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域

b) 前記a)のペプチド領域のアミノ酸配列に1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたペプチド領域

c) 前記a)のペプチド領域のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するペプチド領域

(7) 軽鎖において、CDR1が配列番号26で示される配列を含み、CDR2が配列番号27で示される配列を含み、及びCDR3が配列番号28で示される配列を含み、ならびに重鎖において、CDR1が配列番号29で示される配列を含み、CDR2が配列番号30で示される配列を含み、及びCDR3が配列番号31で示される配列を含む、(6)に記載の抗c o f i l i n 1モノクローナル抗体又はその断片。

- [0015] (8) *cofilin*1タンパク質のアミノ酸配列上の異なるエピトープをそれぞれ特異的に認識する2種以上の抗*cofilin*1モノクローナル抗体及び／又はその断片を使用して、試料中の*cofilin*1及び／又はその断片を測定する、*cofilin*1タンパク質の免疫学的測定方法。
- [0016] (9) 前記異なるエピトープが配列番号1及び／又は2で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域に存在する、(8)に記載の測定方法。
- [0017] (10) 前記異なるエピトープが配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域のうち、少なくとも配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域、及び／又は配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域のうち、少なくとも配列番号4で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域に存在する、(9)に記載の測定方法。
- [0018] (11) 前記異なるエピトープが配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域のうち、少なくとも配列番号5及び／又は6で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域、及び／又は配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域のうち、少なくとも配列番号7で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域に存在する、(9)に記載の測定方法。
- [0019] (12) 前記異なるエピトープが配列番号5～7で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域から選択される2つのペプチド領域にそれぞれ存在する、(8)に記載の測定方法。
- [0020] (13) 前記異なるエピトープが配列番号1及び／又は2で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域における連続する6個以上21個以下のアミノ酸からなるペプチド領域に存在する、(9)に記載の測定方法。
- [0021] (14) 前記2種以上の抗*cofilin*1モノクローナル抗体及び／又はその断片が(2)、(3)、(5)及び(7)に記載の抗*cofilin*1モノクローナル抗体又はその断片から選択される、(8)に記載の測定方法。
- [0022] (15) 2種の抗*cofilin*1モノクローナル抗体及び／又はその断片が、以下のいずれかの抗*cofilin*1モノクローナル抗体及び／又はそ

の断片の組合せである、(14)に記載の測定方法。

[0023] a) (2) 及び (5) のそれぞれに記載の抗 *cofilin* 1 モノクローナル抗体及び／又はその断片の組合せ

b) (2) 及び (7) のそれぞれに記載の抗 *cofilin* 1 モノクローナル抗体及び／又はその断片の組合せ

c) (3) 及び (5) のそれぞれに記載の抗 *cofilin* 1 モノクローナル抗体及び／又はその断片の組合せ

d) (5) 及び (7) のそれぞれに記載の抗 *cofilin* 1 モノクローナル抗体及び／又はその断片の組合せ

(16) 前記試料が血液、尿、細胞上清、細胞抽出液、組織抽出液、胃液、唾液、リンパ液、涙液又は精液である、(8)～(15)のいずれかに記載の測定方法。

[0024] (17) (8)～(16)のいずれかに記載の測定方法を用いて被検体及び健常体由来の試料中の *cofilin* 1 タンパク質及び／又はその断片の量を測定するステップ、前記測定ステップで測定された *cofilin* 1 タンパク質及び／又はその断片の量を比較して、被検体の *cofilin* 1 タンパク質及び／又はその断片の量が健常者のそれよりも統計学的に有意に多い場合には被検体が消化器癌に罹患していると判定する判定ステップを含む、消化器癌罹患判定方法。

[0025] (18) 前記消化器癌が早期消化器癌である、(17)に記載の判定方法。

[0026] (19) 前記消化器癌が胃癌である、(17)又は(18)に記載の判定方法。

[0027] (20) *cofilin* 1 タンパク質の異なるエピトープをそれぞれ特異的に認識する2種以上の抗 *cofilin* 1 モノクローナル抗体及び／又はその断片を含む、*cofilin* 1 タンパク質の測定用キット。

[0028] (21) (1)～(7)のいずれかに記載の抗 *cofilin* 1 モノクローナル抗体又はその断片を2種以上含む、(20)に記載のキット。

[0029] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2010-274879号の明細

書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

### 発明の効果

[0030] 本発明の免疫学的測定方法によれば、既存の方法と比較して、試料中の *cofilin1* タンパク質を、定量的かつ高感度に検出することができる。また、簡易な実験操作で簡便に測定を完了できる。

[0031] さらに、本発明の消化器癌罹患判定方法によれば、血液等の被検体試料に含まれる *cofilin1* の量を測定することにより、消化器癌に罹患しているか否かを早期に判定することができる。

### 図面の簡単な説明

[0032] [図1] エピトープ解析に用いた欠失変異体の一次構造及び各ペプチド領域とそのアミノ酸配列番号を示す。

[図2] ヒト *cofilin1* タンパク質を発現した細胞株試料におけるウェスタンブロットング図を示す。+は pCMV-Myc\_ヒト *cofilin1* を、-は pCMV-Myc ベクターのみを、それぞれ導入した HEK293 細胞である。

[図3] A～E：異なる2種の抗 *cofilin1* モノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAによる *cofilin1* タンパク質の検出感度を示す。

[図4] *cofilin1* タンパク質測定用サンドイッチELISAの検出感度の評価。Bは、Aにおける破線円部分を拡大したグラフである。Bにおいて、矢印で示す値がELISA法の最小検出限界値となる。

[図5] 胃癌患者及び健常者の血漿中の *cofilin1* タンパク質を、サンドイッチELISAにより検出したグラフである。

[図6] 胃癌患者及び健常者の血清中の *cofilin1* タンパク質を、サンドイッチELISAにより検出したグラフである。

### 発明を実施するための形態

[0033] 1. 抗 *cofilin1* モノクローナル抗体及びその断片

本発明の第1の実施形態は、抗 *cofilin1* モノクローナル抗体及び



その断片である。

[0034] 1-1. 抗 *cofilin1* モノクローナル抗体

「*cofilin1*」とは、GenBank アクセションNP\_005498.1に記載のアミノ酸配列からなるヒト *cofilin1* タンパク質又はその天然変異体、あるいは同アクセションNP\_058843に記載のアミノ酸配列からなるラット *cofilin1* タンパク質、同アクセションNP\_031713.1に記載のアミノ酸配列からなるマウス *cofilin1* タンパク質、同アクセションNP\_001170183.1に記載のアミノ酸配列からなるチンパンジー *cofilin1* タンパク質、同アクセションNP\_001015655に記載のアミノ酸配列からなるウシ *cofilin1* タンパク質、又は同アクセションNP\_533231.1に記載のアミノ酸配列からなるイヌ *cofilin1* タンパク質のようにヒト *cofilin1* タンパク質と95%以上の相同性を示す哺乳動物におけるオーソログ又はそれらの天然変異体も含む。

[0035] ここでいう「天然変異体」とは、自然界に存在する変異体であって、例えば、前記アミノ酸配列において1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたもの、前記アミノ酸配列と90%以上、92%以上又は94%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは約97%以上、一層好ましくは約99%以上の同一性を有するものをいう。「同一性」とは、二つのアミノ酸配列が、最大的一致度とならないようにギャップを導入して、又は導入しないで整列（アラインメント）させたときに、一方のアミノ酸配列の全アミノ酸残基数（ギャップ数も含む）に対する他方のアミノ酸配列の同一アミノ酸残基数の割合（%）をいう。「数個」とは、2～10の整数、例えば、2～7、2～5、2～4、2～3の整数をいう。天然変異体の具体例としては、SNP（一塩基多型）等の多型に基づく変異体やスプライス変異体等が挙げられる。前記置換は、保存的アミノ酸置換であることが好ましい。保存的アミノ酸置換であれば、前記アミノ酸配列を有する *cofilin1* タンパク質と実質的に同等な構造又は性質を有し得るからである。保存的アミノ

酸とは、互いに、非極性アミノ酸（グリシン、アラニン、フェニルアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、プロリン、トリプトファン）及び極性アミノ酸（非極性アミノ酸以外のアミノ酸）、荷電アミノ酸（酸性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）及び塩基性アミノ酸（アルギニン、ヒスチジン、リジン））及び非荷電アミノ酸（荷電アミノ酸以外のアミノ酸）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン）、分岐状アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、バリン）、ならびに脂肪族アミノ酸（グリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン）等が知られている。

[0036] 本明細書で使用する「モノクローナル抗体」とは、単一の免疫グロブリン、又はそのフレームワーク領域（Frame work region：以下、「FR」とする）及び相補鎖決定領域（Complementarity determining region：以下、「CDR」とする）を含み、特定の抗原を特異的に認識し、かつ結合することのできるポリペプチドをいう。したがって、本発明の「抗cofilin1モノクローナル抗体」とは、cofilin1タンパク質を特異的に認識し、かつ結合することができるポリペプチドをいう。「特異的に認識し、かつ結合する」とは、交差反応性が無いか又は極めて弱く、標的抗原以外の抗原は認識も結合もしないか、又はほとんどしないことを意味する。

[0037] 典型的な免疫グロブリン分子は、重鎖及び軽鎖と呼ばれる2本のポリペプチド鎖の組がジスルフィド結合によって2組相互接続された四量体として構成される。重鎖は、N末側の重鎖可変領域（H鎖V領域：以下、「VH」とする）とC末側の重鎖定常領域（H鎖C領域：以下、「CH」とする）からなり、軽鎖は、N末側の軽鎖可変領域（L鎖V領域：以下、「VL」とする）とC末側の軽鎖定常領域（L鎖C領域：以下、「CL」とする）からなる。このうち、VH及びVLは、抗体の結合特異性に関与する点で特に重要である。このVH及びVLは、いずれも約110個のアミノ酸残基からなり、その内部に抗原との結合特異性に直接関与する3つのCDR（CDR1、C

DR2、CDR3)と、可変領域の骨格構造として機能する4つのFR (FR1、FR2、FR3、FR4)を有している。CDRは、抗原分子と相補的な立体構造を形成し、抗体の特異性を決定することで知られている (E. A. Kabat et al, 1991, Sequences of proteins of immunological interest, Vol. 1, eds. 5, NIH publication)。定常領域のアミノ酸配列が種内抗体間ではほとんど一定なのに対して、CDRのアミノ酸配列は各抗体間において変異性が高く、それ故、超可変領域 (Hyper variable region)とも呼ばれている。可変領域において、前記CDRとFRは、アミノ酸末端からカルボキシ末端方向にFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序で配列されている。免疫グロブリン分子内においてVL及びVHは、相対して二量体を形成することによって抗原結合部位を形成している。免疫グロブリンには、IgG、IgM、IgA、IgE、及びIgDの各クラスが知られているが、本発明の抗体は、いずれのクラスであっても良い。好ましくはIgGである。

[0038] 本発明の抗cofilin1モノクローナル抗体は、(1)配列番号1で示されるアミノ酸配列のうち、少なくとも配列番号5又は6で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域、(2)配列番号2で示されるアミノ酸配列のうち、少なくとも配列番号7で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域、(3)前記(1)又は(2)のペプチド領域のアミノ酸配列に1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたペプチド領域、又は(4)前記(1)又は(2)のペプチド領域のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するペプチド領域、に存在するエピトープを特異的に認識することを特徴とする。

[0039] 配列番号1で示されるアミノ酸配列は、ヒトcofilin1タンパク質のC末端側ペプチド領域 (図1ではM領域のC末端側5アミノ酸とC1~C3領域)のアミノ酸配列であって、開始メチオニンを1位としたときに122位~166位に相当する。配列番号5で示されるアミノ酸配列は、図1に

おけるC1領域のアミノ酸配列であって、ヒト*cofilin1*タンパク質の158位～166位に相当する。配列番号6で示されるアミノ酸配列は、図1におけるC3領域のアミノ酸配列であって、ヒト*cofilin1*タンパク質の127位～146位に相当する。配列番号5又は6で示されるアミノ酸配列のペプチド領域には、高感度な抗*cofilin1*抗体を作製する上で有効なエピトープが存在する。

[0040] 配列番号5で示されるC1領域に存在するエピトープを認識する抗*cofilin1*モノクローナル抗体の具体的な例としては、例えば、後述する実施例3に記載の表1において、抗体クローン名1E2及び2C4で表される抗体クローン等が挙げられる。1E2クローンは、軽鎖におけるCDR1が配列番号8で示される配列、CDR2が配列番号9で示される配列、そしてCDR3が配列番号10で示される配列からなり、かつ重鎖におけるCDR1が配列番号11で示される配列、CDR2が配列番号12で示される配列、そしてCDR3が配列番号13で示される配列からなる。また、2C4クローンは、軽鎖におけるCDR1が配列番号14で示される配列、CDR2が配列番号15で示される配列、そしてCDR3が配列番号16で示される配列からなり、かつ重鎖におけるCDR1が配列番号17で示される配列、CDR2が配列番号18で示される配列、そしてCDR3が配列番号19で示される配列からなる。

[0041] 配列番号6で示されるC3領域に存在するエピトープを認識する抗*cofilin1*モノクローナル抗体の具体的な例としては、例えば、表1において抗体クローン名4E12で表される抗体クローンが挙げられる。4E12クローンは、軽鎖におけるCDR1が配列番号20で示される配列、CDR2が配列番号21で示される配列、そしてCDR3が配列番号22で示される配列からなり、かつ重鎖におけるCDR1が配列番号23で示される配列、CDR2が配列番号24で示される配列、そしてCDR3が配列番号25で示される配列からなる。なお、C3領域は、僅か9アミノ酸で構成されることから、C3領域はエピトープそのものを構成している可能性が高い。

また、配列番号2で示されるアミノ酸配列は、ヒト *cofilin* 1タンパク質のN末端側ペプチド領域（図1ではN1及びN2領域とM領域のN末端側5アミノ酸）のアミノ酸配列であって、開始メチオニンを1位としたときに1位～54位に相当する。配列番号7で示されるアミノ酸配列は、図1におけるN2領域のアミノ酸配列であって、ヒト *cofilin* 1タンパク質の29位～49位の配列に相当する。配列番号7で示されるアミノ酸配列のペプチド領域には、高感度な抗ヒト *cofilin* 1抗体を作製する上で有効なエピトープが存在する。

[0042] 配列番号7で示されるN2領域のエピトープを認識する抗 *cofilin* 1モノクローナル抗体の具体的な例としては、例えば、表1において抗体クローン名4F12で表される抗体クローンが挙げられる。4F12クローンは、軽鎖におけるCDR1が配列番号26で示される配列、CDR2が配列番号27で示される配列、そしてCDR3が配列番号28で示される配列からなり、かつ重鎖におけるCDR1が配列番号29で示される配列、CDR2が配列番号30で示される配列、そしてCDR3が配列番号31で示される配列からなる。

[0043] 本発明において有用な抗体は、鳥及び哺乳動物を含めたあらゆる動物由来とすることができる。例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ロバ、ヒツジ、ラクダ、ウマ、ニワトリ、又はヒト等が挙げられる。通常は、マウス、ラット、ウサギの抗体が好適に使用される。

[0044] さらに、本発明において「抗体」は、多重特異性抗体であってもよい。多重特異性抗体とは、多価抗体、すなわち抗原結合部位を一分子内に複数有する抗体において、それぞれの抗原結合部位が異なるエピトープと結合する抗体をいう。例えば、IgGのように2つの抗原結合部位を有する抗体で、それぞれの抗原結合部位が異なるエピトープと結合する二重特異性抗体（*Bispecific*抗体）が挙げられる。本発明においては、この多重特異性抗体は、それぞれの抗原結合部位が *cofilin* 1タンパク質上に存在する異なるエピトープと結合できることが好ましい。これらの抗体は、組換え

DNA技術を用いて、公知方法によりIgG等を人工的に改変することにより得ることができる。

[0045] 1-2. 抗cofilin1モノクローナル抗体の断片

本明細書で使用する場合、「モノクローナル抗体又はその断片」における「その断片」とは、前記モノクローナル抗体の部分断片であって、該抗体が有する抗原特異的結合活性と実質的に同等の活性を有するポリペプチド鎖又はその複合体をいう。例えば、前述の抗原結合部位を少なくとも1つ包含する抗体部分、すなわち、少なくとも1組のVLとVHを有するポリペプチド鎖又はその複合体が該当する。具体例としては、免疫グロブリンを様々なペプチダーゼで切断することによって生じる多数の十分に特徴付けられた抗体断片等が挙げられる。より具体的な例としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'等が挙げられる。Fabは、パパインによりIgG分子がヒンジ部のジスルフィド結合よりもN末端側で切断されることによって生じる断片であって、VH及びCHを構成する3つのドメイン(CH1、CH2、CH3)のうちVHに隣接するCH1からなるポリペプチドと、軽鎖から構成される。F(ab')<sub>2</sub>は、ペプシンによりIgG分子がヒンジ部のジスルフィド結合よりもC末端側で切断されることによって生じるFab'の二量体である。Fab'は、Fabよりもヒンジ部を含む分だけH鎖が若干長いが実質的にはFabと同等の構造を有する。Fundamental Immunology、Paul ed.、3rd ed.、1993。Fab'は、F(ab')<sub>2</sub>をマイルドな条件下で還元し、ヒンジ領域のジスルフィド連結を切断することによって得ることができる。これらの抗体断片は、いずれも抗原結合部位を包含しており、抗原（すなわち本発明においてはcofilin1タンパク質又はその断片）と特異的に結合する能力を有している。

[0046] 本発明のモノクローナル抗体の断片は、化学的に、又は組換えDNA法を用いることによって合成したものであってもよい。例えば、組換えDNA法を用いて新たに合成された抗体断片が挙げられる。具体的には、限定はしないが、本発明のモノクローナル抗体の一以上のVL及び一以上のVHを適当

な長さと配列を有するリンカーペプチド等を介して人工的に連結させた一量体ポリペプチド分子、又はその多量体ポリペプチドが該当する。このようなポリペプチドの例としては、一本鎖Fv (single chain Fragment of variable region) (Pierce catalog and Handbook, 1994-1995, Pierce Chemical co., Rockford, IL参照)、ダイアボディ (diabody)、トリアボディ (triabody) 又はテトラボディ (tetrabody) 等の合成抗体等が挙げられる。免疫グロブリン分子において、VL及びVHは、通常別々のポリペプチド鎖(L鎖とH鎖)上に位置する。一本鎖Fvは、これらの可変領域を十分な長さの柔軟性リンカーによって連結し、1本のポリペプチド鎖にVL及びVHを包含した構造を有する合成抗体断片である。一本鎖Fv内において両可変領域は、互いに自己集合して1つの機能的な抗原結合部位を形成することができる。一本鎖Fvは、それをコードする組換えDNAを、公知技術を用いてファージゲノムに組み込み、発現させることで得ることができる。ダイアボディは、一本鎖Fvの二量体構造を基礎とした構造を有する分子である (Holliger et al, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 6444-6448)。例えば、前記リンカーの長さが約12アミノ酸残基よりも短い場合、一本鎖Fv内の2つの可変部位は自己集合できないが、ダイアボディを形成させることにより、すなわち、2つの一本鎖Fvを相互作用させることにより、一方のFv鎖のVLが他方のFv鎖のVHと集合可能となり、2つの機能的な抗原結合部位を形成することができる (Marvin et al, 2005, Acta Pharmacol. Sin., 26: 649-658)。さらに、一本鎖FvのC末端にシステイン残基を付加させることにより、2本のFv鎖同士のジスルフィド結合が可能となり、安定的なダイアボディを形成させることもできる (Alafsen et al, 2004, Prot. Engr. Des. Sel., 17: 21-27)。このようにダイアボディは二価の抗体断片であるが、それぞれの抗原

結合部位は、同一エピトープと結合する必要はなく、それぞれが異なるエピトープを認識し、特異的に結合する二重特異性を有していても構わない。トリアボディ、及びテトラボディは、ダイアボディと同様に一本鎖Fv構造を基本としたその三量体、及び四量体構造を有する。それぞれ、三価、及び四価の抗体断片であり、多重特異性抗体であってもよい。さらに、本発明の抗体断片は、ファージディスプレイライブラリーを用いて同定された抗体断片（例えば、McCafferty et al.、1990、Nature、Vol. 348、522-554参照）であって、かつ抗原結合能力を有しているものが含まれる。この他、例えば、Kuby、J.、Immunology、3rd Ed.、1998、W. H. Freeman & Co.、New York、も参照されたい。

[0047] 1-3. 抗cofilin1モノクローナル抗体及びその断片のその他の特徴

本発明の抗体又はその断片は、修飾することができる。ここでいう修飾は、本発明の抗体又はその断片がcofilin1タンパク質との特異的結合活性を有する上で必要な機能上の修飾（例えば、グリコシル化）、及び本発明の抗体又はその断片を検出する上で必要な標識のいずれをも含む。前記抗体標識には、例えば、蛍光色素（FITC、ローダミン、テキサスレッド、Cy3、Cy5）、蛍光タンパク質（例えば、PE、APC、GFP）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ）、又はビオチン若しくは（ストレプト）アビジンによる標識が挙げられる。また、本発明の抗体のグリコシル化は、標的抗原に対する抗体の親和性を調整するために改変されていてもよい。このような改変は、例えば、抗体配列内の一以上のグリコシル化部位を変更することで達成できる。より具体的に説明すると、例えば、FR内の一以上のグリコシル化部位を構成するアミノ酸配列に一以上のアミノ酸置換を導入して該グリコシル化部位を除去することにより、その部位のグリコシル化を喪失させることができる。このような脱グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を



増加させる上で有効である（米国特許第5714350号、及び同第6350861号）。

[0048] 本発明で使用されるモノクローナル抗体又はその断片は、*cofilin* 1タンパク質又はその断片に対する特異性を確認するため、使用前に予め他の抗原（タンパク質又はその断片）との交差反応性を検証しておくことが好ましい。本発明の抗体又はその断片において、交差性を確認すべき抗原は、ADF/COFILINファミリーに属するタンパク質、特に、*cofilin* 1タンパク質と構造的に類似する*cofilin* 2タンパク質が挙げられる。また、前記タンパク質以外にも、部分構造が*cofilin* 1タンパク質と共通する他のタンパク質についても本発明で使用される抗体又はその断片の交差反応性を確認しておくことがより好ましい。交差反応の確認には、*cofilin* 1タンパク質を抗原としたELISA法を使うことが可能である。反応特異性を試験すべき抗体、すなわち、抗*cofilin* 1モノクローナル抗体、及びその断片と*cofilin* 1タンパク質との反応の場合に、交差性を確認すべき他の抗原タンパク質を共存させれば、両者の競合状態を観察することによって交差性の確認を行うことができる。競合阻害の原理を利用したこのような交差性の確認方法は、すべての抗原について反応系を調製する必要がないのでスクリーニングを迅速に行うことができる。

[0049] 1-4. 抗*cofilin* 1モノクローナル抗体及びハイブリドーマ作製方法

本発明の抗*cofilin* 1モノクローナル抗体又はその抗体を産生するハイブリドーマは、以下に記載する方法によって作製することができる。ただし、本方法に限定されるものではなく、当該分野で公知の他のあらゆる方法で作製することもできる。

[0050] 1-4-1. 抗*cofilin* 1モノクローナル抗体作製方法

*cofilin* 1タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち、配列番号1～7で示されるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチド領域に存在するエピトープと特異的に結合する抗*cofilin* 1モノクローナル抗体を作製

するには、*cofilin1*タンパク質の全長を免疫原としてモノクローナル抗体を作製し、その後、配列番号1～7で示されるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチド領域と特異的に結合する抗体をスクリーニングする方法と、予め配列番号1～7で示される*cofilin1*タンパク質の断片からなるペプチドを免疫原としてモノクローナル抗体を作製する方法がある。

[0051] (1) *cofilin1*タンパク質の調製

免疫原（抗原）として用いる*cofilin1*タンパク質は、例えば、以下の方法によって調製することができる。

[0052] *cofilin1*タンパク質は、天然型、組換え型、又はペプチド合成のようにアミノ酸配列の全部又は一部を化学的に合成した合成*cofilin1*タンパク質のいずれであってもよい。天然型*cofilin1*タンパク質は、血液若しくは尿のような体液をはじめとする試料、又は培養細胞の培養上清から公知のタンパク質分離・精製技術、例えばゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーを用いて回収することができる。組換え型*cofilin1*タンパク質は、該タンパク質をコードするDNAを導入した微生物、昆虫細胞、又は動物細胞で発現させた後、当該細胞から公知のタンパク質分離・精製技術を用いて回収することができる。合成*cofilin1*タンパク質は、例えば、公開された*cofilin1*タンパク質アミノ酸配列情報を利用して、当技術分野で公知の手法、例えば固相ペプチド合成法等により合成することができる。この合成*cofilin1*タンパク質には、KLH（スカシ貝ヘモシアニン）、OVA（卵白アルブミン）、BSA（ウシ血清アルブミン）等のキャリアータンパク質に連結させてもよい。

[0053] 配列番号1～7で示される*cofilin1*タンパク質の断片を免疫原とする場合も、天然型*cofilin1*タンパク質断片、組換え型*cofilin1*タンパク質断片、又は合成*cofilin1*タンパク質断片のいずれを使用することもできる。*cofilin1*タンパク質断片としては、配列番号1～7で示される配列において、6以上、7以上、8以上、9以上、1

0以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、16以上、17以上、18以上、19以上、20以上、21以上、22以上、又は23以上の連続したアミノ酸残基を含むオリゴペプチド又はポリペプチドを抗原として使用することができる。

[0054] 天然型 *cofilin* 1タンパク質の断片を免疫原として用いる場合は、例えば、精製した *cofilin* 1タンパク質をトリプシン等の適切なプロテアーゼで処理した後、逆相カラムでピークを分離分取し、各ピークに含まれるペプチドのアミノ酸配列を質量分析器により決定して、配列番号1～7で示される部分配列又はその一部であるピークを免疫原として用いることができる。

[0055] 組換え型 *cofilin* 1タンパク質のアミノ酸部分配列を免疫原として用いる場合は、前述した *cofilin* 1タンパク質をコードするDNA配列のうち、配列番号1～7で示されるアミノ酸部分配列、又はその一部をコードするDNA配列部分を、全長 *cofilin* 1タンパク質を作製する場合と同様に発現用ベクターに挿入し、各種細胞に導入することで、配列番号1～7で示されるアミノ酸部分配列、又はその一部の組換え型 *cofilin* 1タンパク質を得ることが出来る。

[0056] 以下で、配列番号1～7で示される組み換え型 *cofilin* 1タンパク質断片（以下、*cofilin* 1タンパク質断片という。）の調製について詳述する。

[0057] (a) 組換え型 *cofilin* 1タンパク質断片をコードするポリヌクレオチドの調製

*cofilin* 1タンパク質断片の発現に用いるベクターとしては、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドを使用することができる。例えば、プラスミドとしては、大腸菌由来のプラスミド（pET30a、pGEX6p、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19等）、枯草菌由来のプラスミド（pUB110、pTP5等）、酵母由来のプラスミド（YE p13、YE p24、YC p50等）が挙げられる。また、

ファージとしては、 $\lambda$ ファージ ( $\lambda$ gt11、 $\lambda$ ZAP等)が挙げられる。さらに、ワクシニアウイルス等の動物ウイルス、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスベクターも用いることができる。

[0058] 上記ベクターに *cofilin1* タンパク質断片をコードするポリヌクレオチドを挿入するには、例えば、精製した該ポリヌクレオチドを適当な制限酵素で切断し、適当な制限酵素で切断したベクター内部にDNAリガーゼ等を用いて連結する方法がある。

[0059] (b) *cofilin1* タンパク質断片発現ベクターの宿主内への導入  
得られた *cofilin1* タンパク質断片発現ベクターを、その発現ベクターを発現し得る宿主中に導入して、*cofilin1* タンパク質断片発現形質転換体を得る。使用する宿主については、使用したベクターに適する宿主であって、*cofilin1* タンパク質を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌（大腸菌（例えば、*Escherichia coli*）、枯草菌（例えば、*Bacillus subtilis*）等）、酵母、昆虫細胞、動物細胞（COS細胞、CHO細胞（*Journal of immunology*, 1998, Vol. 160, 3393-3402）等）が好適に用いられる。細菌への前記ベクターの導入方法は、細菌に該ベクターを導入する公知の方法であれば特に限定されない。例えば、ヒートショック法、カルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。これらの技術は、いずれも当該分野で公知であり、様々な文献に記載されている。例えば、Sambrook, J. et al, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkを参照されたい。また、動物細胞の形質転換には、リポフェクチン法（*PNAS*, 1989, Vol. 86, 6077）、（*PNAS*, 1987, Vol. 84, 7413）、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法（*Virol*

ogy、1973、Vol. 52、456-467)、DEAE-Dextran法等が好適に用いられる。

[0060] 細菌を宿主とする場合は、cofilin1タンパク質断片発現ベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター配列、リボゾーム結合配列、cofilin1タンパク質断片をコードするDNA配列、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する調節因子をコードする遺伝子が含まれていてもよい。プロモーターは、大腸菌等の宿主中で機能できるものであればいずれを用いてもよい。

[0061] 酵母、動物細胞、昆虫細胞等の真核細胞を宿主とする場合にも、同様に当該技術分野で公知の手法に従ってcofilin1タンパク質断片発現形質転換体を得ることができる。真核細胞において用いられるcofilin1タンパク質断片発現ベクターには、プロモーター配列、cofilin1タンパク質断片をコードするDNA配列のほか、所望によりエンハンサー等のシスエレメント、スプライシングシグナル（ドナー部位、アクセプター部位、ブランチポイント等）、ポリA付加シグナル、選択マーカー配列、リボゾーム結合配列（SD配列）等が連結されていてもよい。

[0062] (c) 形質転換体の培養及び組換え型cofilin1タンパク質断片の発現

続いて、上記作製した形質転換体を培養する。形質転換体を培地で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。例えば、細菌を宿主とする場合、培地は、細菌が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、かつ生育、増殖可能なものであれば、特に限定はしない。天然培地、合成培地のいずれを用いることもできる。より具体的な例としては、LB培地が挙げられるが、もちろんこれに限定はされない。また、形質転換体の培養を選択的に行うために、必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。培養は、通常、通気攪拌培養等の好氣的条件下、37℃で6~24時間行う。培養期間中、pHは中性付近に保持することが好ましい。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶

液等を用いて行う。形質転換体がCHO細胞等の動物細胞である場合には、Gibco社製DMEM培地に $1 \times 10^5$ 細胞/mLとなるように宿主細胞を接種し、37℃の5%CO<sub>2</sub>インキュベータにて培養すればよい。培養中には必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

[0063] 前記cofilin1タンパク質断片発現ベクターがタンパク質発現制御システム（例えば、宿主が細菌の場合、リプレッサー遺伝子及びオペレーター等が該当する）を含むタンパク質発現誘導型ベクターである場合には、前記形質転換体に所定の処理を行い、cofilin1タンパク質断片の発現を誘導させる必要がある。発現誘導の方法は、ベクターに含まれるタンパク質発現制御システムによって異なるため、そのシステムに適した誘導処理を行えばよい。例えば、細菌を宿主とするタンパク質発現誘導型ベクターにおいて最も一般的に利用されているタンパク質発現制御システムは、lacリプレッサー遺伝子及びlacオペレーターからなるシステムである。本システムは、IPTG (isopropyl-1- $\beta$ -D-Galactoside) 処理により発現を誘導することが可能である。このシステムを含むcofilin1タンパク質発現ベクターを有する形質転換体において、目的とするcofilin1タンパク質を発現させるためには、培地中に適当量（例えば、終濃度1mM）のIPTGを添加すればよい。

[0064] (d) 組換え型cofilin1タンパク質断片の抽出及び／又は回収  
培養後、cofilin1タンパク質断片が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を回収して破碎することによりタンパク質を抽出することができる。また、cofilin1タンパク質断片が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去し、上清を使用すればよい。その後、一般的なタンパク質の精製方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で、又は適宜組合せて用いることにより、前記培養物中からcofilin1

n1タンパク質を単離精製することができる。cofilin1タンパク質断片が得られたか否かは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動等により確認すればよい。

[0065] (2) 抗cofilin1タンパク質断片抗体の産生細胞の作製

前記(1)で得られた免疫原である組換え型cofilin1タンパク質断片を、緩衝液に溶解して免疫原溶液を調製する。この際、免疫を効果的に行うために、必要であればアジュバントを添加してもよい。アジュバントの例としては、市販の完全フロイントアジュバント(FCA)、不完全フロイントアジュバント(FIA)等が挙げられ、これらを単独で又は混合して用いてもよい。

[0066] 次に、前記調製した免疫原溶液を哺乳動物、例えばラット、マウス(例えば近交系マウスのBALB/c)、ウサギ等に投与し、免疫する。免疫原の投与方法としては、例えば、FIA又はFCAを用いた皮下注射、FIAを用いた腹腔内注射、又は0.15mol/L塩化ナトリウムを用いた静脈注射が挙げられるが、この限りでない。免疫原の1回の投与量は、免疫動物の種類、投与経路等により適宜決定されるものであるが、動物1匹当たり約50~200 $\mu$ gである。また、免疫の間隔は特に限定されず、初回免疫後、数日から数週間間隔で、好ましくは1~4週間間隔で、2~6回、好ましくは3~4回追加免疫を行う。初回免疫より後に、免疫動物の血清中の抗体価の測定をELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)法等により行い、抗体価がプラトーに達すれば、免疫原を静脈内又は腹腔内に注射し、最終免疫とする。そして、最終免疫の日から2~5日後、好ましくは3日後に、抗体産生細胞を採取する。

[0067] 1-4-2. 抗cofilin1部分配列モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ作製方法

(1) 免疫動物からの抗体産生細胞の回収と細胞融合

免疫動物から得た抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行うことで、cofilin1タンパク質の部分配列を特異的に認識するモノクロー

ナル抗体を生産するハイブリドーマを作製することができる。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられるが、脾臓細胞又は局所リンパ節細胞が好ましい。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞としては、一般に入手可能なマウス等由来の株化細胞を使用することができる。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態ではHAT選択培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミンを含む）で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生育できる性質を有するものが好ましい。また、株化細胞は、免疫動物と同種系の動物に由来するものが好ましい。ミエローマ細胞の具体例としては、BALB/cマウス由来のヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ（HGPRT）欠損細胞株である、P3X62-Ag. 8株（ATCCTIB9）、P3X63-Ag. 8. U1株（JCRB9085）、P3/NSI/1-Ag4-1株（JCRB0009）、P3x63Ag8. 653株（JCRB0028）又はSp2/0-Ag14株（JCRB0029）等が挙げられる。

[0068] 上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させるには、血清を含まないDMEM、RPMI1640培地等の動物細胞培養用培地中で、抗体産生細胞とミエローマ細胞とを約1:1~20:1の割合で混合し、細胞融合促進剤の存在下にて融合反応を行う。細胞融合促進剤としては、平均分子量1,500~4,000Daのポリエチレングリコール等を約10~80%の濃度で使用することができる。また、場合によっては、融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を併用してもよい。さらに、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ミエローマ細胞とを融合させることもできる（Nature、1977、Vol. 266、550-552）。

[0069] (2) 目的とするハイブリドーマの選抜

細胞融合処理後の細胞から目的とする抗cofilin1断片モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを選別する方法としては、細胞懸濁液を、例えば、ウシ胎児血清含有RPMI1640培地等で適当に希釈後、96



ウェルマイクロタイタープレート上に $2 \times 10^6$ 個/ウェル程度播種し、各ウェルに選択培地を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。培養温度は $20 \sim 40^\circ\text{C}$ 、好ましくは約 $37^\circ\text{C}$ である。ミエローマ細胞がHGPRT欠損株又はチミジンキナーゼ(TK)欠損株のものである場合には、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジンを含む選択培地(HAT培地)を用いることにより、抗体産生細胞とミエローマ細胞のハイブリドーマのみを選択的に生育、増殖させることができるため、選択培地で培養開始後約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選択することができる。

[0070] HAT培地で選択されたハイブリドーマは、まず、天然型又は組換え型cofilin1タンパク質、又は配列番号1~7で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域に対する結合活性を指標としてスクリーニングを行う。次いでcofilin1タンパク質への結合活性を持つ抗体を産生するハイブリドーマについては、交差性の試験を行う。すなわち、他のCXCファミリー等への結合活性を検証し、許容できるものを選択する。許容できる交差性とは、目的とする抗体の用途において、無視しうる程度の交差性を意味する。たとえば、免疫学的な測定に用いるためのモノクローナル抗体であれば、最終的な測定系において交差反応によるシグナル強度が、バックグラウンドレベルから特異的反応によるシグナル強度の1%未満に抑えられれば、事実上交差反応しないといえることができる。

[0071] cofilin1タンパク質への反応性や、他のADF/Cofilinファミリーとの交差反応性を確認するには、例えば、ELISA法を利用することができる。ELISA法では、抗原となるcofilin1タンパク質又はその断片を固相化したマイクロプレートを用意し、これに前記ハイブリドーマの培養上清を適当に希釈した試料を加えて反応させる。十分に反応させた後にウェルを洗浄し、免疫グロブリンに対する2次抗体の標識体を加えて更に反応させる。再度ウェルを洗浄し、最終的にウェルに結合した2次抗体の標識を利用して測定すれば、培養上清中に存在する抗体の、抗原に対する結合活性を定量的に知ることができる。

[0072] ハイブリドーマは組換えDNA技術を用いて選抜することもできる。まず、前述の方法に従って取得したハイブリドーマ群からmRNAを抽出する。mRNAの抽出は、例えば、実施例1に記載のような公知の方法を用いればよい。続いて、Oligo dTプライマーやランダムプライマーを用いて前記mRNAのcDNAを取得する。このcDNAを鋳型に、可変領域をコードする遺伝子上流にあるシグナル配列の塩基配列と、定常領域側の塩基配列を含むプライマーセットを利用してPCRを行う。得られた増幅産物を適当なクローニングベクターに挿入してクローン化し、そのハイブリドーマが生産する抗体の可変領域遺伝子のライブラリーを得ることができる。より具体的な例として、限定はしないが、Novagen社の提供するMouse Ig Primerを用いてPCRを行い、増幅産物（マウス免疫グロブリン可変領域cDNA）をInvitrogen社の提供するZERO BLUNT PCR TOPO VectorのEcoRI部位に挿入してクローン化し、得られたベクター群を、可変領域アミノ酸配列をコードする遺伝子ライブラリーとすることができる。次に、前記本発明で開示された可変領域又は各CDRのアミノ酸配列を元にプローブを設計し、前記ライブラリーからポジティブクローンをスクリーニングすることで、本発明の抗体を生産するハイブリドーマを選抜することができる。

[0073] (3) ハイブリドーマを用いた抗体産生

本発明におけるハイブリドーマは、マウスを用いて腹水化することにより抗体生産に用いることができる。具体的には、ハイブリドーマを作製する際に用いた融合パートナーに用いた細胞の由来のマウスや、ヌードマウスの腹腔内にハイブリドーマを接種し、腹水を適宜採取することにより、抗体を含む腹水液を回収することができる。より具体的には、SP/O細胞を融合パートナーとしたハイブリドーマを、プリスタン接種後10日間を経たBALB/cマウスの腹腔中に接種することにより、抗体を含む腹水液を回収できる。

[0074] また、本発明におけるハイブリドーマは、適した培地を用いて培養を行う

ことにより抗体生産に用いることが出来る。具体的には、Gibco社製のハイブリドーマSFM培地中に $1 \times 10^5$ 細胞/mLとなるようにハイブリドーマを接種し、 $37^\circ\text{C}$ の5% $\text{CO}_2$ インキュベータにてハイブリドーマが死滅するまで培養することにより抗体を含む培養液上清を得ることが出来るが、この限りではない。

[0075] (4) 組換え抗c o f i l i n 1タンパク質断片モノクローナル抗体の作製方法

本発明の抗体又はその断片は、本発明で開示されたc o f i l i n 1断片を特異的に認識するモノクローナル抗体のアミノ酸配列をコードするcDNA配列を利用して、組換えDNA操作によって得ることもできる。

[0076] 例えば、上記「1-4-2(2)」の手法で取得した抗c o f i l i n 1タンパク質断片モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ由来の該抗体の可変領域をコードするアミノ酸配列をコードするDNA配列を用いて、VH及びVLの塩基配列を任意のCL、及びCHをコードする塩基配列にそれぞれ連結し、それぞれのポリヌクレオチドを適当な発現ベクターに組み込み、宿主細胞に導入後、完全な免疫グロブリン分子として発現させることもできる。また、CDRグラフト抗体技術を用いて、上記「1-4-2(2)」の手法で取得した可変領域をコードするアミノ酸配列のうち、CDR配列のアミノ酸配列を、任意の免疫グロブリンの各CDRに組み込んだ可変領域をコードするポリヌクレオチドを適当な発現ベクターに組み込み、宿主細胞に導入後、完全な免疫グロブリン分子として発現させてもよい。このとき重鎖と軽鎖とが同一宿主細胞内で発現し、重鎖/軽鎖からなる2量体として産生できるようにすると便利である。具体的には、例えば、軽鎖発現ベクター及び重鎖発現ベクターにより細胞を共形質転換し、この形質転換細胞から本発明による抗体を得ることもできる。又は、上記アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドをそのまま適当な発現ベクターに組み込み、宿主細胞に導入後、免疫グロブリン分子の断片として発現させることもできる。あるいは、上述したように、前記アミノ酸配列を含むVL及びVH、又は軽鎖及び重鎖をそれ

ぞれコードするポリヌクレオチドを適当なリンカーで連結してファージに組み込んだ一本鎖Fvとして、又はダイアボディ等の合成抗体断片として発現させてもよい。その他、近年開発された、遺伝子工学技術を活用して組換え抗体をファージ表面に発現させるファージディスプレイ抗体技術（Brinkmann et al、1995、J Immunol Methods、182、41-50、国際公開WO97/13844号、同90-02809号）により、人工的に重鎖、軽鎖をコードする遺伝子をシャッフリングさせ多様化した一本鎖Fv抗体をファージ融合タンパクとして発現させ、特異抗体を得ることもできる。

[0077] 組換え抗cofilin1タンパク質断片モノクローナル抗体又はその断片をコードするポリヌクレオチドの調製、該ポリヌクレオチドを組み込んだベクター、該ベクターの宿主導入法については、上記「1-4-1. 抗cofilin1モノクローナル抗体作製方法」に記載したような当該分野で公知の組換えDNA技術を用いて行えばよい。目的とする組換え抗cofilin1タンパク質抗体又はその断片は、形質転換細胞の培養液中又は当該細胞内から得ることができる。

[0078] 免疫グロブリン発現ベクターとしては、例えば、プラスミド、ファージミド、コスミド、ウイルスベクター（例えば、SV40 virus basedベクター、EB virus basedベクター、BPV basedベクター）等を用いることができるが、これらに限定されない。例えば、BPV basedベクターの1種であるBCMGS Neoベクターは、COS7細胞等に形質転換することによって外来遺伝子を効率良く発現する望ましいベクターである（烏山一「ウシパピローマウイルスベクター」、村松正実及び岡山博人編、実験医学別冊：遺伝子工学ハンドブック、1991、羊土社、297-299）。

[0079] 前記ベクターは、抗体又はその断片をコードするポリヌクレオチドの他に、前記抗体又はその断片を発現する上で必要な制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、ポリアデニル化部位、スプラ

イシング部位)、又は、必要であれば選択マーカを含むことができる。

[0080] 形質転換の宿主としては、上記「1-4-1. 抗cofilin1モノクローナル抗体作製方法」に記載した宿主の他、SP2/0 (マウスミエローマ) 細胞 (European Journal of Cancer Research Preview (1996) Vol. 5, 512-519; Cancer Research (1990) Vol. 50, 1495-1502) が好適に用いられる。

[0081] 本発明における、抗体又はその断片を発現するベクターを含有する宿主細胞は、常法にしたがって培養を行うことにより、その培養液上清又は宿主細胞内に抗体を産生させることができる。具体的には、CHO細胞を宿主とした場合にはGibco社製DMEM培地に $1 \times 10^5$ 細胞/mLとなるように宿主細胞を接種し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベータにて培養することにより抗体を含む培養液上清を得ることが出来る。また、例えば宿主細胞を大腸菌とした場合には、LB培地等大腸菌の培養に用いられる一般的な培地に接種して培養し、タンパク質の発現を誘導することにより、培養液上清又は宿主細胞内に抗体を産生することができる。

[0082] なお、発現産物である抗体又はその断片が定常領域を含む場合には、プロテインAカラム、プロテインGカラム、抗イムノグロブリン抗体アフィニティーカラム等を用いて培養液上清や、細胞破碎液から精製・回収することができる。一方、可変領域のみで構成され、定常領域を含まない状態で発現させた場合には、前記精製方法は適用できないので、他の適当な精製方法を応用する。例えば、そのC末端にヒスチジンタグ等の精製に有利なタグ配列を融合させた構造として発現させれば、対応するリガンドを利用したアフィニティークロマトグラフィーによって精製することが可能である。タグとの融合タンパク質ではない場合は、硫安沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーといったタンパク質精製の常法に従って精製することができる。

[0083] 1-4-3. 得られた抗c o f i l l i n 1モノクローナル抗体が認識するc o f i l l i n 1タンパク質上のエピトープの確認

得られた抗c o f i l l i n 1モノクローナル抗体が特異的に認識するc o f i l l i n 1タンパク質上の配列、すなわちエピトープ配列は、該タンパク質の遺伝子をもとにPCR反応等を用いて各種の欠失変異遺伝子を作製し、該変異型遺伝子から得られる変異型c o f i l l i n 1タンパク質とモノクローナル抗体の結合性を解析することにより決定できる。具体的には、次のような方法により行われる。まずc o f i l l i n 1遺伝子の5'末端側、又は3'末端側、若しくは5'末端と3'末端の両側の10~400塩基が欠失した種々の長さの断片を調製し、これら断片を挿入した発現ベクターを作製する。このような欠失変異を伴う遺伝子断片の調製法は「続生化学実験講座、第1巻、遺伝子研究法ⅠⅠ、289-305頁、日本生化学会編」に記載されている。まず、それぞれの欠失変異体の発現ベクター及び完全長c o f i l l i n 1タンパク質の発現ベクターを導入した宿主細胞から、前述の方法により各種欠失変異体タンパク質及び完全長c o f i l l i n 1タンパク質を調製する。続いて、これらタンパク質を抗原としてELISA法により、抗c o f i l l i n 1モノクローナル抗体の各種欠失変異体及び完全長タンパク質への結合性の評価を行う。完全長に対して特定のアミノ酸配列の欠失を導入した変異体において、モノクローナル抗体の結合性が失われた場合、該モノクローナル抗体のエピトープ配列のうち、少なくとも一部の領域は欠失させたアミノ酸配列に含まれると判断できる。さらに、欠失変異体の異なる2種、好ましくは3種に対する該モノクローナル抗体の反応性を評価することにより、エピトープ配列をさらに絞り込むことができる。

[0084] また、得られた抗c o f i l l i n 1モノクローナル抗体が認識するc o f i l l i n 1タンパク質上のエピトープ配列は、次のような方法によって確認することもできる。

[0085] まず、還元アルキル化したc o f i l l i n 1タンパク質と、抗c o f i l l i n 1モノクローナル抗体を反応させて抗原抗体複合体を形成させた後、ト

リプシン等の適切なプロテアーゼを用いて分解処理を行う。分解処理を受けても、抗体はトリプシン消化されにくいいため、Protein Gセファロース等を用いて抗原抗体複合体を回収することができる。この際、抗原はプロテアーゼ処理により、抗体と結合して保護された部分以外は消化されているため、回収された抗原抗体複合体を、LC-MSにより分析することで、抗体と結合して保護された部分、すなわち抗体が認識するcofilin1タンパク質上のエピトープを同定することが出来る。

[0086] さらに、抗cofilin1モノクローナル抗体が認識するcofilin1タンパク質上のエピトープ配列は、例えば、合成ペプチドを用いた競合法によっても確認することが出来る。まず、cofilin1タンパク質を構成するアミノ酸配列のうち6~21アミノ酸ずつの合成ペプチドを固相合成法等により調製する。前述のELISA法を利用したcofilin1タンパク質に対する結合性を確認する実験において、抗cofilin1モノクローナル抗体を固相cofilin1タンパク質と反応させる際にこの合成ペプチドを作用させ、抗cofilin1モノクローナル抗体の結合が阻害されることが確認されれば、当該合成ペプチドのアミノ酸配列が抗cofilin1モノクローナル抗体の認識するエピトープ配列であると判断できる。

[0087] 2. cofilin1タンパク質の免疫学的測定方法

本発明の第2の実施形態は、cofilin1タンパク質の免疫学的測定方法に関する。本発明の免疫学的測定方法は、cofilin1タンパク質のアミノ酸配列上の異なるエピトープをそれぞれ特異的に認識する2種以上の抗cofilin1モノクローナル抗体及び／又はその断片を使用して、試料中のcofilin1及び／又はその断片を測定することを特徴とする。モノクローナル抗体又はその断片を用いることによって、cofilin1タンパク質の定量性と検出感度に優れた測定が実現できる。

[0088] 本発明の測定方法で使用する「試料」とは、cofilin1タンパク質及び／又はその断片を含み得る様々な試料をいう。例えば、cofilin

1 タンパク質をコードするDNA又はその断片を含む培養細胞、培養細胞破砕液、培養液上清、又は哺乳動物試料である。「哺乳動物試料」とは、哺乳動物から採取される組織（例えば、術後採取組織）や、血液、リンパ液、尿、髄液、唾液、精液等の体液等のあらゆる哺乳動物由来の生体試料であり、好ましくは血液又は尿である。本発明でいう血液は、血清、血漿又は間質液を包含する。また、哺乳動物の種類に特に制限はないが、好ましくは霊長類、より好ましくはヒトである。

[0089] エピトープが存在するペプチド領域の具体例としては、配列番号1及び2で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域が挙げられる。配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域のうち、少なくとも配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域、及び配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域のうち、少なくとも配列番号4で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域は、より好ましい。また、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域のうち、少なくとも配列番号5及び6で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域、及び配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域のうち少なくとも配列番号7で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域は、さらに好ましい。配列番号5、6及び7で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域は、エピトープが存在するペプチド領域として一層好ましい。これは、前述のように、これらのペプチド領域には、高感度な抗体を作製する上で有効なエピトープが存在するからである。

[0090] 本発明においてエピトープは、*cofilin*1タンパク質又はその断片上に存在するものであれば、特に制限はしない。例えば、異なるエピトープが*cofilin*1タンパク質上で互いに離れた位置に存在していてもよいし、近接した位置に存在していてもよい。また、異なるエピトープのそれぞれが前記配列番号1～7で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域のいずれかに存在する場合、異なるエピトープは、それぞれ異なるペプチド領域上に存在していてもよいし、又は複数のエピトープを包含し得る十分な長さ



のアミノ酸からなるペプチド領域であれば、単一のペプチド領域上に存在していてもよい。エピトープが異なるペプチド領域上に存在する場合、ペプチド領域の組合せは特に限定しない。例えば、エピトープがそれぞれ配列番号1及び2で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域のそれぞれに存在していてもよいし、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域上の配列番号5及び6で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域のそれぞれに存在していてもよい。あるいは、配列番号5及び6、配列番号5及び7又は配列番号6及び7で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域のそれぞれに存在していてもよい。

[0091] 本実施形態において使用する2種以上の抗*cofilin*1モノクローナル抗体及び／又はその断片には、前記第1実施形態に記載の抗*cofilin*1モノクローナル抗体及び／又はその断片を使用することができる。例えば、後述する表1に記載の抗体クローン群、好ましくは少なくとも1E2、2C4、2D12、2F5、3F11、3G2、4F12、4E12及び4G10を含む抗体クローン群、より好ましくは少なくとも1E2、2C4、4F12、4E12を含む抗体クローン群から選択される2種以上の抗*cofilin*1モノクローナル抗体及び／又はその断片の組合せ、又は、少なくとも、4F12と1E2、4F12と4E12、1E2と3F11、1E2と4E12、2C4と4E12、3G2と4E12、4G10と4E12、2D12と1E2、2D12と2C4、又は4E12と2F5の組合せを含む。

[0092] 本実施形態において使用される、より好ましい2種以上の抗*cofilin*1モノクローナル抗体及び／又はその断片は、(1) 少なくとも、軽鎖において、CDR1が配列番号8で示される配列を、CDR2が配列番号9で示される配列を及びCDR3が配列番号10で示される配列を含み、ならびに重鎖において、CDR1が配列番号11で示される配列を、CDR2が配列番号12で示される配列を及びCDR3が配列番号13で示される配列を含む抗*cofilin*1モノクローナル抗体又はその断片、(2) 軽鎖にお

いて、CDR1が配列番号14で示される配列を、CDR2が配列番号15で示される配列を及びCDR3が配列番号16で示される配列を含み、ならびに重鎖において、CDR1が配列番号17で示される配列を、CDR2が配列番号18で示される配列を及びCDR3が配列番号19で示される配列を含む抗*cofilin*1モノクローナル抗体又はその断片、(3)軽鎖において、CDR1が配列番号20で示される配列を、CDR2が配列番号21で示される配列を、及びCDR3が配列番号22で示される配列を含み、ならびに重鎖において、CDR1が配列番号23で示される配列を、CDR2が配列番号24で示される配列を及びCDR3が配列番号25で示される配列を含む抗*cofilin*1モノクローナル抗体又はその断片、及び(4)軽鎖において、CDR1が配列番号26で示される配列を、CDR2が配列番号27で示される配列を及びCDR3が配列番号28で示される配列を含み、ならびに重鎖において、CDR1が配列番号29で示される配列を、CDR2が配列番号30で示される配列を及びCDR3が配列番号31で示される配列を含む抗*cofilin*1モノクローナル抗体又はその断片をからなる群から選択される2種以上の抗*cofilin*1モノクローナル抗体及び／又はその断片の組合せを含む。

[0093] 本実施形態において使用される、さらに好ましい2種以上の抗*cofilin*1モノクローナル抗体及び／又はその断片は、(1)少なくとも、軽鎖におけるCDR1が配列番号8で示される配列、CDR2が配列番号9で示される配列及びCDR3が配列番号10で示される配列からなり、かつ重鎖におけるCDR1が配列番号11で示される配列、CDR2が配列番号12で示される配列及びCDR3が配列番号13で示される配列からなる抗体又はその断片と、軽鎖におけるCDR1が配列番号26で示される配列、CDR2が配列番号27で示される配列及びCDR3が配列番号28で示される配列からなり、かつ重鎖におけるCDR1が配列番号29で示される配列、CDR2が配列番号30で示される配列及びCDR3が配列番号31で示される配列からなる抗体又はその断片の組合せ、(2)少なくとも、軽鎖にお

けるCDR1が配列番号8で示される配列、CDR2が配列番号9で示される配列及びCDR3が配列番号10で示される配列からなり、かつ重鎖におけるCDR1が配列番号11で示される配列、CDR2が配列番号12で示される配列及びCDR3が配列番号13で示される配列からなる抗体又はその断片と、軽鎖におけるCDR1が配列番号20で示される配列、CDR2が配列番号21で示される配列及びCDR3が配列番号22で示される配列からなり、かつ重鎖におけるCDR1が配列番号23で示される配列、CDR2が配列番号24で示される配列及びCDR3が配列番号25で示される配列からなる抗体又はその断片の組合せ、(3)少なくとも、軽鎖におけるCDR1が配列番号14で示される配列、CDR2が配列番号15で示される配列及びCDR3が配列番号16で示される配列からなり、かつ重鎖におけるCDR1が配列番号17で示される配列、CDR2が配列番号18で示される配列及びCDR3が配列番号19で示される配列からなる抗体又はその断片と、軽鎖におけるCDR1が配列番号20で示される配列、CDR2が配列番号21で示される配列、そしてCDR3が配列番号22で示される配列からなり、かつ重鎖におけるCDR1が配列番号23で示される配列、CDR2が配列番号24で示される配列及びCDR3が配列番号25で示される配列からなる抗体又はその断片の組合せ、及び(4)少なくとも、軽鎖におけるCDR1が配列番号20で示される配列、CDR2が配列番号21で示される配列及びCDR3が配列番号22で示される配列からなり、かつ重鎖におけるCDR1が配列番号23で示される配列、CDR2が配列番号24で示される配列及びCDR3が配列番号25で示される配列からなる抗体又はその断片と、軽鎖におけるCDR1が配列番号26で示される配列、CDR2が配列番号27で示される配列及びCDR3が配列番号28で示される配列からなり、かつ重鎖におけるCDR1が配列番号29で示される配列、CDR2が配列番号30で示される配列及びCDR3が配列番号31で示される配列からなる抗体又はその断片の組合せが挙げられる。

[0094] *cofilin1*タンパク質を構成するアミノ酸配列の部分配列である配

列番号1～7で示されるアミノ酸配列は、ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ及びチンパンジーにおいて100%相同性を示す、哺乳動物で高度に保存された領域であり、これら配列を認識する抗体を用いることにより、様々な哺乳動物種由来の試料に対応した、汎用的なcofilin1タンパク質測定系の構築が可能となる。

[0095] 本発明の免疫学的測定は、2種以上の抗体及び／又はその断片を用いる公知の免疫学的測定方法を使用することができる。例えば、ELISA法、EIA法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法又は発光免疫測定法のような標識抗体を用いた免疫学的測定法、表面プラズモン共鳴法（SPR法）、又は水晶振動子マイクロバランス測定法（QCM法）により実施することができる。また、本発明の免疫学的測定方法は、免疫比濁法、ラテックス凝集反応、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応又は粒子凝集反応等の免疫複合体凝集物の生成を、その透過光や散乱光を光学的方法により測るか、目視的に測る測定法により実施することもできる。

[0096] ELISA（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay）法は、酵素免疫吸着分析法とも呼ばれ、試料中に含まれる微量の標的抗原を、酵素標識した抗体又は抗原を用いて、当該酵素の作用を利用して抗原抗体反応を発色濃度や蛍光強度として検出し、標的抗原を定量する方法である。すなわち、本発明の抗体若しくはその断片、又はcofilin1タンパク質若しくはその断片を固相担体に固定して、当該抗体等及びcofilin1タンパク質等との免疫学的反応を酵素的に検出する方法である。直接法、間接法、サンドイッチ法等の方法が知られているが、本発明においては、特にサンドイッチ法が好ましく適用される。サンドイッチ法は、固相担体に固定した第1抗体（固相化抗体）を、抗原と結合させた後、第1抗体とは異なるエピトープを認識する第2抗体（標識抗体／一次抗体）を加えて抗原と結合させ、第2抗体が標識抗体の場合にはその標識を、また第2抗体が一次抗体の場合には第3抗体（二次抗体）によって、検出する方法である。ELISA法の測定方法の詳細については、公知の方法（日本臨床病

理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号臨床検査のためのイムノアッセイ—技術と応用—」、臨床病理刊行会、1983年、石川榮治ら編「酵素免疫測定法」、第3版、医学書院、1987年、北川常廣ら編「タンパク質核酸酵素別冊No. 31 酵素免疫測定法」、共立出版、1987年、入江實編「ラジオイムノアッセイ」、講談社サイエンティフィック、1974年、入江實編「続ラジオイムノアッセイ」、講談社サイエンティフィック、1979年)を参照されたい。

[0097] 前記固相担体としては、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ラテックス、ゼラチン、アガロース、セルロース、セファロース、ガラス、金属、セラミックス又は磁性体等の材質よりなるビーズ、マイクロプレート、試験管、スティック又は試験片等の形状の不溶性担体を用いることができる。本発明の抗体若しくはその断片又はc o f i l i n 1タンパク質若しくはその断片の固相担体への固定は、物理的吸着法、化学的結合法又はこれらの併用する方法等、公知の方法に従って結合させることにより達成できる。

[0098] 前記標識物質としては、ELISA法の場合には、例えば、ペルオキシダーゼ(POD)、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸脱水素酵素、アミラーゼ又はビオチン-アビジン複合体等を、蛍光免疫測定法の場合には、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、置換ローダミンイソチオシアネート、ジクロロトリアジンイソチオシアネート、Alexa480又はAlexaFluor488等を、そして放射免疫測定法の場合には、トリチウム( $^3\text{H}$ )、ヨウ素125( $^{125}\text{I}$ )又はヨウ素131( $^{131}\text{I}$ )等を用いることができるが、この限りでない。また、発光免疫測定法は、NADH-FMN $\text{H}_2$ -ルシフェラーゼ系、ルミノール-過酸化水素-POD系、アクリジニウムエステル系又はジオキセタン化合物系等を用いることができる。標識物質と抗体との結合法は、ELISA法の場

合にはグルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジリジルスルフィド法又は過ヨウ素酸法等の公知の方法を、放射免疫測定法の場合にはクロラミンT法、ボルトンハンター法等の公知の方法を用いることができる。

[0099] 以下で配列番号5及び6で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域に存在するエピトープをそれぞれ特異的に認識する抗*cofilin1*タンパク質モノクローナル抗体を用いて、サンドイッチELISA法により本発明の免疫学的測定方法を実施する場合を例に挙げて具体的に説明する。ただし、本発明の実施の態様は、この限りでない。

[0100] まず、配列番号5で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域に存在するエピトープを特異的に認識するモノクローナル抗体を、不溶性の担体に固相化する。固相化する抗体（固相化抗体）は、1種類であっても数種類であってもよい。次に、固相化抗体の表面に、*cofilin1*タンパク質を含む試料を作用させ、固相化抗体と*cofilin1*タンパク質からなる抗原抗体複合体を固相担体の表面に形成させる。その後、洗浄液を用いて十分に洗浄して、固相化抗体と未結合の物質を除去する。続いて、配列番号6で示されるアミノ酸配列で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域に存在するエピトープを特異的に認識するモノクローナル抗体を標識抗体として標識し、該標識抗体を前記固相化抗体と*cofilin1*タンパク質の複合体が結合した担体に作用させる。固相化抗体と標識抗体は、*cofilin1*タンパク質の異なるエピトープを認識することから、固相担体上に固相化抗体／*cofilin1*タンパク質／標識抗体からなる三重複合体が形成される。その後、洗浄液を用いて未結合の標識抗体を十分に洗浄した後、三重複合体における標識抗体の標識を利用して検出することで試料中に存在した*cofilin1*タンパク質を検出及び定量することができる。標識抗体は、1種類であっても数種類であってもよいが、2種類以上使用することが好ましく、3種類使用することがより好ましい。また、固相化抗体と標識抗体の由来する動物種が異なる場合には、標識抗体を標識しなくても、一次抗体として固相化抗体／*cofilin1*タンパク質に作用させて、その一次抗体を

認識する標識二次抗体を使用して、検出することもできる。なお、固相化に用いた抗体と標識に用いた抗体は、それぞれ逆に用いることも可能である。

[0101] また、標識抗体と *cofilin* 1 タンパク質を含む試料を予め混合して抗原抗体複合体を形成させた後、固相化抗体に作用させることもできる。固相化する抗体をビオチン標識しておけば、ビオチン化固相化抗体、*cofilin* 1 タンパク質を含む試料、ビオチン以外の標識を施した抗体を混合して抗原抗体複合体を形成させた後、アビジンを固相化した担体に作用させることで、ビオチン化以外の標識を利用して抗原抗体複合体を検出することができる。

[0102] さらに、本発明の免疫学的測定方法は、免疫クロマト用テストストリップを用いることもできる。免疫クロマト用テストストリップとは、例えば、試料を吸収しやすい材料からなる試料受容部、本発明の診断薬を含有する試薬部、試料と診断薬との反応物が移動する展開部、展開してきた反応物を呈色する標識部、呈色された反応物が展開してくる提示部等から構成される。市販の妊娠診断薬等がこれと同様の形態を有する。本測定方法の原理は、以下の通りである。まず、試料受容部に試料を与えると、試料受容部は、試料を吸収して試料を試薬部にまで到達させる。続いて、試薬部において試料中の *cofilin* 1 タンパク質と前述の抗 *cofilin* 1 部分配列モノクローナル抗体又はその断片が抗原抗体反応し、反応複合体が展開部を移動して標識部に到達する。標識部では、上記反応複合体と標識二次抗体との反応が生じ、その標識二次抗体との反応物が提示部にまで展開すると、呈色が認められることになる。上記免疫クロマト用テストストリップは、侵襲性がきわめて低く、使用者に対し苦痛や試薬使用による危険性を一切与えないものであるため、家庭におけるモニターに使用することができ、その結果を各医療機関レベルで精査・治療（外科的切除等）し、転移・再発予防に結びつけることが可能となる。また現在、このテストストリップは、例えば特開平 10-54830 号公報に記載されるような製造方法により安価に大量生産できるものである。

[0103] 免疫クロマト用テストストリップを用いた免疫学的測定方法を配列番号5で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域に存在するエピトープを特異的に認識するモノクローナル抗体（第1抗体とする）と、配列番号6で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域に存在するエピトープを特異的に認識するモノクローナル抗体（第2抗体とする）を用いる場合を例に挙げて具体的に説明する。まず、試料受容部に *cofilin* 1タンパク質を含む試料を接触させると、試料受容部は、該試料を吸収して該試料を試薬部にまで到達させる。続いて、試薬部において、試料中の *cofilin* 1タンパク質と第1抗体との間で抗原抗体反応が起こり、形成された抗原抗体複合体が展開部を移動して標識部に到達する。標識部においては、上記抗原抗体複合体と、標識した第2抗体との反応が起こって、その標識化第2抗体との反応物が提示部にまで展開すると呈色が認められることになる。

[0104] また、本発明の測定方法は、表面プラズモン共鳴法（SPR法）を用いることもできる。表面プラズモン共鳴現象とは、金属薄膜に特定の入射角度（共鳴角）でレーザー光を照射すると反射光強度が著しく減衰する現象をいう。SPR現象の原理を利用したSPRセンサは、金属薄膜表面上の吸着物を高感度に測定することができる。したがって、該金属薄膜表面上に予め抗体及び／又は標的抗原を固定化しておき、その金属薄膜表面上に試料を通過させることにより、抗原抗体反応の結果生じた試料通過前後の金属表面上の吸着物の差を検出することができる。置換法、間接競合法等が知られるが、いずれを用いてもよい。本技術は、当該分野において周知である。例えば、永田和弘、及び半田宏、生体物質相互作用のリアルタイム解析実験法、シュプリンガー・フェアラーク東京、東京、2000を参照されたい。

[0105] さらに、本発明の測定方法は、水晶振動子マイクロバランス測定法（QCM法）を用いることもできる。この方法は、晶振動子に取り付けた電極表面に物質が吸着するとその質量に応じて水晶振動子の共振周波数が減少する現象を利用するものである。該方法を用いたQCMセンサは、水共振周波数の変化量によって極微量な吸着物を定量的に捕らえる質量測定センサである。



本技術は、当該分野において周知である。例えば、J. Christopher Love、L. A. Estroff、J. K. Kriebel、R. G. Nuzzo、G. M. Whitesides、2005、Self-Assembled Monolayers of a Form of Nanotechnology、Chemical Review、105:1103-1169；森泉豊榮、中本高道、1997、センサ工学、昭晃堂、等を参照されたい。

[0106] 3. 消化器癌罹患判定方法

本発明の第3の実施形態は、消化器癌罹患判定方法に関する。本実施形態の判定方法は、試料中のcofilin1タンパク質及び／又はその断片を消化器癌罹患判定用マーカーとしてその量を測定し、健常体との量比に基づいて被検体における消化器癌の罹患の有無を判定することを特徴とする。本実施形態の方法は、測定ステップ(1)及び判定ステップ(2)を含む。以下、各ステップについて具体的に説明をする。

[0107] (1) 測定ステップ 「測定ステップ」とは、前記第2実施形態に記載の測定方法を用いて被検体及び健常体由来の試料中のcofilin1タンパク質の量を測定するステップである。

[0108] 「被検体」とは、本発明の判定方法に供される個体をいう。被検体の種類は、哺乳動物であれば特に限定しない。好ましくはヒトである(以下、本明細書では、ヒトが被検体の場合、「被験者」とする)。

[0109] 「健常体」とは、少なくとも消化器癌に罹患していない個体、好ましくは健康な個体をいう。健常体は、被検体と同一の生物種であることを要する。例えば、被検者の場合には、健常体もヒト(本明細書では、この場合、以降「健常者」とする)でなければならぬ。健常体の身体的条件は、被検体と同一又は近似することが好ましい。身体的条件とは、例えば、ヒトの場合であれば、人種、性別、年齢、身長、体重等が該当する。

[0110] 本実施形態における試料は、被検体及び健常体由来であることから、哺乳動物試料である。すなわち、哺乳動物から採取される組織(例えば、術後採

取組織) や、血液、リンパ液、尿、髄液、唾液、精液等の体液等のあらゆる哺乳動物由来の生体試料が該当する。好ましくは血液、特に好ましくは血清又は血漿である。また、測定値の比較を前提とすることから、原則として、被検体と健常体由来の試料の種類は同一にしておく必要がある。例えば、被検体由来の試料が血清であった場合には、原則として健常体由来の試料も血清であることが望ましい。

[0111] 試料中の *cofilin1* タンパク質の測定方法は、第2実施形態の測定方法に準じて行えばよいので、ここではその詳細についての説明は省略する。

[0112] (2) 判定ステップ

「判定ステップ」とは、前記測定ステップで測定された被検体及び健常体由来の試料における *cofilin1* タンパク質及び／又はその断片の量を比較して、被検体の *cofilin1* タンパク質及び／又はその断片の量が健常者のそれよりも統計学的に有意に多い場合には被検体が消化器癌に罹患していると判定するステップである。「消化器癌」とは、消化器系器官に発生する原発性悪性腫瘍をいう。例えば、食道癌、胃癌、十二指腸癌、小腸癌(空腸癌、回腸癌を含む)、大腸癌(盲腸癌、結腸癌、直腸癌を含む)、及び膵臓癌を含む。本実施形態の判定対象として特に好ましい消化器癌は、胃癌である。ただし、消化器癌に限定されず、乳癌、肝臓癌、肺癌等の他の上皮系腫瘍や、悪性黒色腫等の皮膚癌であってもよい。

[0113] 本ステップでは、前記測定ステップにより被検体と健常体由来のそれぞれの試料から得られた *cofilin1* タンパク質及び／又はその断片の量を比較する。比較する量は、濃度のような相対量であってもよいし、又は絶対量であってもよい。絶対量の場合には、測定に供した試料の量を被検体と健常体で予め等量にしておくか、測定に供した試料の量比に基づいて等量となるように換算する必要がある。本ステップでは、被検体由来の試料中の *cofilin1* タンパク質及び／又はその断片の量が健常体由来の試料中の *cofilin1* タンパク質及び／又はその断片の量よりも統計学的に有意に

多いか否かに基づいて、有意に多い被検体を消化器癌罹患群に、有意差のない被検体を消化器癌非罹患群に分類する。そして、消化器癌罹患群に分類された被検体は、消化器癌に罹患しているか、その可能性が極めて高いと判定され、また消化器癌非罹患群に分類された被検体は、消化器癌に罹患している可能性を完全排除できないが、その可能性は低いと判定される。

[0114] ここで「統計学的に有意」とは、例えば、得られた値の危険率（有意水準）が5%、1%又は0.1%より小さい場合をいう。それ故、「統計学的に有意に多い」とは、被検体と健常体のそれぞれから得られたc o f i l i n 1タンパク質及び／又はその断片の量的差異を統計学的に処理したときに両者間に有意差があり、かつ被検体の前記タンパク質量が健常体のそれと比較して多いことをいう。通常、血液試料中のc o f i l i n 1タンパク質量に関して、被検体が健常体の2倍以上、好ましくは3倍以上、より好ましくは4倍以上、最も好ましくは5倍以上多い場合が該当する。量的差異が3倍以上であれば信頼度は高く、統計学的にも有意に多いといえる。統計学的処理の検定方法は、有意性の有無を判断可能な公知の検定方法を適宜使用すればよく、特に限定しない。例えば、スチューデントt検定法、多重比較検定法を用いることができる。

[0115] 健常体の血液試料中におけるc o f i l i n 1タンパク質量は、被検体の血液試料中におけるc o f i l i n 1タンパク質量を測定する都度、測定することもできるが、予め測定しておいたc o f i l i n 1タンパク質量を利用することもできる。特に、健常体の様々な身体的条件におけるc o f i l i n 1タンパク質量を予め測定しておき、その値をコンピューターに入力してデータベース化しておけば、被検体の身体的条件を当該コンピューターに入力することで、その被験体との比較に最適な身体的条件を有する健常体のc o f i l i n 1タンパク質量を即座に利用できるのも便利である。

[0116] 本発明において対象となる消化器癌の病期は、特に限定はなく、早期消化器癌から末期消化器癌に及ぶ。特に、本発明の判定方法は、実施形態1の抗

体及び／又はその断片の高感度性により、従来の方法では困難であった早期消化器癌であっても、その検出が可能である点において優れている。「早期消化器癌」とは、腫瘍が発生した局所（粘膜内）に限局していて、周囲組織への浸潤の無いもの、又は浸潤があってもその範囲が局所に限局しているものを言う。消化器癌の早期発見は、5年生存率を著しく向上させることから、早期にその罹患を判定できる本発明の実益は高い。

[0117] このように、本発明の消化器癌の検出方法によれば、血液試料中の消化器癌検出用マーカーを、抗体を用いて免疫学的に測定することにより、被検体が消化器癌に罹患しているか否かを簡便かつ迅速に、また早期に判定することができる

本発明の判定方法によれば、被検体の血漿や血清等の試料を用いて、該被検体が消化器癌に罹患しているか否かを早期から判定することができる。

[0118] 4. 本発明測定法を用いた *cofilin* 1 タンパク質測定用キット

本発明の第4の実施形態は、*cofilin* 1 タンパク質の測定用キットに関する。本実施形態のキットは、必須の構成物として、*cofilin* 1 タンパク質を構成するアミノ酸配列上の異なるエピトープをそれぞれ特異的に認識する抗 *cofilin* 1 モノクローナル抗体及び／又はその断片を2種以上含むことを特徴とする。本キットに含まれる前記抗体及び／又はその断片には、例えば、前記実施形態1に記載の抗体及び／又はその断片が挙げられる。また、本キットに含まれる2種以上の抗体及び／又はその断片の組合せには、例えば、前記第2の実施形態に記載の抗体及び／又はその断片の組合せが挙げられる。この他、本キットは、必要に応じて、標識二次抗体、標識の検出に必要な基質、陽性対照や陰性対照、試料の希釈や洗浄に用いる緩衝液及び／又は使用説明書等を加えることもできる。

[0119] 本発明によれば、血液等の適当な試料に含まれる *cofilin* 1 タンパク質を前記第1実施形態に記載の免疫学的測定方法により容易かつ簡便に測定することができる。また、その結果と前記第3実施形態の方法に基づき、試料提供者の消化器癌の罹患の有無を簡便かつ迅速に判定することも可能と

なる。

## 実施例

[0120] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら制限されるものではない。

[0121] <実施例1>大腸菌による組換え型c o f i l i n 1タンパク質の調製  
(ヒトc o f i l i n 1遺伝子の調製)

抗体の免疫原として用いる組換え型ヒトc o f i l i n 1タンパク質を調製するために、ヒト胎児腎細胞株であるHEK293細胞より、ヒトc o f i l i n 1 mRNAの調製を行った。mRNAの調製は、Q i a s h r e d d e r 及びR N e a s y m i n i k i t (Q i a g e n 社製) を使用し、詳細は付属のプロトコールに従った。

[0122] 次に、逆転写酵素S u p e r s c r i p t I I (i n v i t r o g e n 社製) を用いて、得られたトータルmRNAを鋳型にcDNAを合成し、ヒトcDNAライブラリーを作製した。逆転写反応は、前記酵素に付属のプロトコールに従った。

[0123] 続いて、得られたヒトcDNAライブラリーを鋳型に、配列番号32及び35に示す塩基配列からなるプライマーセットを用いてPCRを行った。配列番号32で示した塩基配列は、ヒトc o f i l i n 1 遺伝子の5'末端領域の一部とその上流側にB a m H I 認識配列を含む。配列番号35で示した塩基配列は、ヒトc o f i l i n 1 遺伝子の3'末端領域の一部とその下流側にE c o R I 認識配列を含む。PCRの反応液は、DNAポリメラーゼにK O D (東洋紡社製) を用いて、cDNAライブラリー10ngと各プライマー10pmolを含むようにして、KODに添付のプロトコールに従い調製した。反応条件は、94℃の温度で5分間加熱した後、94℃で15秒間、55℃で30秒間、68℃で30秒間保つサイクルを35回繰り返した後、最後に68℃で4分間保温する条件で行った。増幅したDNA断片は、W i z a r d S V G e l a n d P C R C l e a n - u p S y s t e m (P r o m e g a 社製) を用いて精製した。この反応により全長約500bp

のPCR産物を得た。

[0124] 得られたDNA断片をBamHI切断及びEcoRI切断した後、BamHI切断、EcoRI切断及びBAP処理した開環pET30a (Novagen社製) 内に組み込むためライゲーション反応を行った。DNAリガーゼにはLigation High (東洋紡社製) を使用し、反応は付属のプロトコールに従った。続いて、ライゲーション反応後の溶液を用いて、コンピテント細胞の形質転換を行った。コンピテント細胞は、大腸菌株DH5 $\alpha$  (タカラバイオ社製) を用い、詳細は付属のプロトコールに従った。形質転換処理後の菌は、抗生物質カナマイシンを100 $\mu$ g/mLを含有するLBプレート上に塗布し、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。得られた形質転換体を100 $\mu$ g/mLのカナマイシンを含有するLB液体培地で37 $^{\circ}$ Cにて一晩培養し、ミニプレップによって目的とするpET30a\_cofilin1を得た。

[0125] 続いて、得られたpET30a\_cofilin1遺伝子(10ng)を鋳型として、配列番号39及び40に示す塩基配列からなるプライマーセットを用いてPCRを行った。配列番号39で示した塩基配列は、ヒトcofilin1遺伝子の5'末端領域の一部とその上流側にEcoRI認識配列を含む。配列番号40で示した塩基配列は、ヒトcofilin1遺伝子の3'末端領域の一部とその下流側にBglII認識配列を含む。PCRの反応液は、DNAポリメラーゼにKOD (東洋紡社製) を用いて、cDNAライブラリー10ngと各プライマー10pmolを含むようにして、KODに添付のプロトコールに従い調製した。反応条件は、94 $^{\circ}$ Cの温度で5分間加熱した後、94 $^{\circ}$ Cで15秒間、55 $^{\circ}$ Cで30秒間、68 $^{\circ}$ Cで30秒間保つサイクルを35回繰り返した後、最後に68 $^{\circ}$ Cで4分間保温する条件で行った。増幅したDNA断片は、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega社製) を用いて精製した。この反応により全長約500bpのPCR産物を得た。

[0126] 得られたDNA断片をEcoRI切断及びBglII切断した後、Eco

R I 切断、B a m H I 切断及びB A P 処理した開環 p C M V - M y c ( C l o n t e c h 社製) 内に組み込むためライゲーション反応を行った。DNA リガーゼにはL i g a t i o n H i g h ( 東洋紡社製) を使用し、反応は付属のプロトコールに従った。続いて、ライゲーション反応後の溶液を用いて、コンピテント細胞の形質転換を行った。コンピテント細胞は、大腸菌株D H 5  $\alpha$  ( タカラバイオ社製) を用い、詳細は付属のプロトコールに従った。形質転換処理後の菌は、抗生物質カナマイシンを50  $\mu$  g / m L を含有するL B プレート上に塗布し、37  $^{\circ}$  C で一晩培養した。得られた形質転換体を100  $\mu$  g / m L のアンピシリンを含有するL B 液体培地で37  $^{\circ}$  C にて一晩培養し、ミニプレップによって目的とするp C M V - M y c \_ \_ h i t c o f i l i n 1 を得た。

[0127] (組換え型ヒトc o f i l i n 1 タンパク質の調製)

組換え型ヒトc o f i l i n 1 タンパク質を調製するために、p E T 3 0 a \_ \_ c o f i l i n 1 を用いて、大腸菌株R o s e t t a - G a m i 2 ( N o v a g e n 社製) の形質転換を行った。得られた形質転換体を、カナマイシン及びクロラムフェニコールを含むL B 培地10 m L で37  $^{\circ}$  C にて一晩前培養を行った。次に、1 L の同培地に前培養を接種し、37  $^{\circ}$  C にて5時間培養し、終濃度0.25 m M のI P T G を添加して32  $^{\circ}$  C にて12時間培養を行い、目的の組換え型ヒトc o f i l i n 1 タンパク質の発現を誘導させた後、遠心分離により菌体を回収した。

[0128] 得られた菌体をP B S にて洗浄した後、B - P E R ( P I E R C E 社製) を用いて不溶性画分を沈殿として調製した。詳細は付属のプロトコールに従った。次に不溶性画分を6 M のウレアにて可溶化した後、T A L O N M e t a l A f f i n i t y R e s i n ( C L O N E T E C H 社製) を用いてヒスチジンタグ融合ヒトc o f i l i n 1 タンパク質を吸着させた。タンパク質の吸着したレジン、10 m M イミダゾールを含む6 M のウレアにて洗浄した後、1 M イミダゾールを含む6 M のウレア溶液を用いて溶出した。

[0129] 次に得られた溶出画分から、タンパク質のリフォールディングを行った。

まず、6 Mのウレアを加えたPBS溶液に一晩透析した後、透析液中のウレアの終濃度が1 MになるまでPBSを透析液に段階的に添加して、希釈した。最後に新たに調製したPBS溶液に一晩透析し、得られたリフォールディング溶液についてアクリルアミドゲル電気泳動を行い、クマシーブリリアントブルー染色により分子量約16,000 Daのヒスチジntag融合ヒトc o f i l i n 1タンパク質の精製を確認した。

[0130] <実施例2>ヒトc o f i l i n 1タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体の作製と選抜

(抗ヒトc o f i l i n 1抗体産生マウスの作製)

実施例1で得られた50  $\mu$ Lの1 mg/mLのヒトc o f i l i n 1タンパク質溶液を50  $\mu$ LのSigma adjuvant system (Sigma社製)と混合し、全量を6週齢のBALB/cマウスに腹腔投与した。2週間後、及び4週間後に同様に調製したヒトc o f i l i n 1タンパク質溶液を同量投与した。続いて、マウス尾部静脈より血液を100  $\mu$ L採取し、一晩清置した後、5000  $\times$  gで5分間遠心して上清を血清として回収した。

[0131] Flat bottom 96wellプレート (Nunc社製)のウェルに100  $\mu$ Lの0.1  $\mu$ g/mLヒトc o f i l i n 1タンパク質溶液を入れ、一晩固相化した。ウェル中のタンパク質溶液を廃棄後、4倍に希釈したブロッキング溶液(1%BSAを含むPBS-T)を400  $\mu$ L注ぎ、1時間室温で静置した。その後、PBS-Tで洗浄し、ヒトc o f i l i n 1タンパク質固相化プレートとした。前記で得られた血清を1000倍希釈し、ヒトc o f i l i n 1タンパク質固相化プレートのウェルに100  $\mu$ L入れ、室温で1時間静置した。その後、ウェル中の溶液を廃棄し、PBS-Tで洗浄した後、HRP標識抗マウスIgG溶液(GEヘルスケア社製)を100  $\mu$ L入れ、さらに室温で1時間静置した。ウェル中の溶液を廃棄し、PBS-Tにて洗浄後、TMB溶液100  $\mu$ Lを入れて15分間反応させた。反応によって生じる発色を450 nmの吸光度で確認し、発色した血液試料を採



取したマウスにおいて、ヒト *cofilin 1* タンパク質に対する抗体が産生されていると判断した。

[0132] (抗ヒト *cofilin 1* モノクローナル抗体の作製)

ヒト *cofilin 1* タンパク質に対する抗体の産生が確認されたマウスについて、上記と同様に調製したヒト *cofilin 1* タンパク質溶液を腹腔投与し、3日後に脾臓の摘出を行った。摘出した脾臓にシリンジで穴を開け、RPMI 1640培地 (GIBCO社製) を注入して脾臓細胞を押し出し、脾臓細胞液を得た。得られた脾臓細胞液を1200rpmで7分間遠心した後に上清を除去し、RPMI 1640培地にて洗浄した。再びRPMI 1640培地に懸濁して細胞数をカウントし、脾臓細胞数の1/10量のSP2/0ミエローマ細胞液を調製した。両細胞液を混合し、2200rpmで10分間遠心し、上清を廃棄した。細胞をタッピングしてほぐし、PEG (ROCHE社製) とHBSS (GIBCO社製) を5:1で混合した溶液を1mL添加して攪拌した。以降の作業では、特に断りがない限り、溶液や培地は全て37°Cで保温したものをを用いた。

[0133] PEGとHBSSを加えた細胞溶液に、RPMI 1640培地9mLを5分間かけて添加し、ゆっくり混合した後、2200rpmで10分間遠心し、上清を除去した。得られた沈殿細胞を、15%FCSとHAT (ROCHE社製) を添加したRPMI 1640培地に懸濁し、96ウェル細胞培養プレート (グライナー社製) に1ウェルあたり200 $\mu$ L注ぎ、37°C、5%CO<sub>2</sub>下で1週間培養した。

[0134] HAT添加条件下で生育したコロニーを脾臓細胞とミエローマ細胞が融合したハイブリドーマと判断し、コロニーの生育しているウェルの上清を5倍希釈して、前記ヒト *cofilin 1* タンパク質固相化プレートのウェルに100 $\mu$ L添加し、前記と同様の方法で抗体産生の有無を確認した。抗体の産生が確認できたウェルを陽性とした。陽性ウェルのコロニーを15%FCSとHT (invitrogen社製) を含むRPMI培地に懸濁し、限界希釈法によって陽性クローンのクローニングを行った。クローニングの結果

得られたハイブリドーマ39種類について、SFM培地に馴化し、抗体の産生を行った。100%SFM培地60mLにハイブリドーマを $1 \times 10^5$ 細胞/mLになるように接種し、細胞が死滅するまで10日間培養を行った後、培養液を3000rpm、15分間遠心分離し、細胞を除去した。得られた培養上清について、ProSep-vA Ultra chromatography（ミリポア社製）を用いて含まれている抗体を精製した。

[0135] <実施例3>cofilin1タンパク質抗体のエピトープマッピング  
(欠失変異体の作製)

取得した39種類の精製抗体について、次のような手法でエピトープ配列を決定した。まず、実施例1に示す変異体A～変異体Eまでの5種のヒトcofilin1タンパク質欠失変異体及び完全長のヒトcofilin1タンパク質をGST融合タンパク質として調製した(図1)。

[0136] pET30a\_cofilin1遺伝子(10ng)を鋳型として、変異体Aについては配列番号32及び37に示す塩基配列からなるプライマーセットを用いて、変異体Bについては配列番号33及び35に示す塩基配列からなるプライマーセットを用いて、変異体Cについては配列番号32及び38に示す塩基配列からなるプライマーセットを用いて、変異体Dについては配列番号32及び36に示す塩基配列からなるプライマーセットを用いて、変異体Eについては配列番号34及び38に示す塩基配列からなるプライマーセットを用いて、完全長のヒトcofilin1については配列番号32及び35に示す塩基配列からなるプライマーセットを用いて、それぞれPCRにより遺伝子を取得した。配列番号32、33及び34で示した塩基配列は、ヒトcofilin1遺伝子の5'末端領域の一部とその上流側にBamHI認識配列を含む。配列番号35～38で示した塩基配列は、ヒトcofilin1遺伝子の3'末端領域の一部とその下流側にEcoRI認識配列を含む。

[0137] 得られた前記6種のPCR産物を、それぞれBamHI切断及びEcoRI切断した後、BamHI切断、EcoRI切断及びBAP処理した開環p

GEX6P-1 (GEヘルスケア) 内に組み込むためライゲーション反応を行った。DNAリガーゼにはLigation High (東洋紡社製) を使用し、反応は付属のプロトコールに従った。続いて、ライゲーション反応後の溶液を用いて、コンピテント細胞の形質転換を行った。コンピテント細胞は、大腸菌株DH5 $\alpha$  (タカラバイオ社製) を用い、詳細は付属のプロトコールに従った。形質転換処理後の菌は、抗生物質アンピシリンを100 $\mu$ g/mLを含有するLBプレート上に塗布し、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。得られた形質転換体を100 $\mu$ g/mLアンピシリンを含有するLB液体培地で37 $^{\circ}$ Cにて一晩培養し、ミニプレップによって目的とする完全長のヒトcofilin1タンパク質及び5種の欠失変異体の遺伝子を導入した発現ベクター6種を得た。

[0138] 前記6種の発現ベクターをそれぞれ大腸菌株Rosetta-Gami2 (Novagen社製) へ形質転換を行い、下記に示す操作により、完全長のヒトcofilin1及び5種の欠失変異体の組み換えGST融合タンパク質を調製した。まず、形質転換体を、アンピシリン及びクロラムフェニコールを含むLB培地10mLで37 $^{\circ}$ Cにて一晩前培養を行った。次に、1Lの同培地に前培養を接種し、37 $^{\circ}$ Cにて5時間培養し、終濃度0.5mMのIPTGを添加して37 $^{\circ}$ Cにて12時間培養を行い、目的の組換え型ヒトcofilin1タンパク質の発現を誘導させた後、遠心分離により菌体を回収した。

[0139] 得られた菌体をPBSにて洗浄した後、B-PER (PIERCE社製) を用いて可溶性画分を取得した。詳細は付属のプロトコールに従った。次にグルタチオンセファロース4B (GEヘルスケア) を用いて、可溶性画分の組み換えGST融合タンパク質を吸着させた。タンパク質の吸着したレジンを、TBS (150mM NaCl、50mM Tris-Cl、5mM EDTA、pH8.0) にて洗浄した後、10mM還元型グルタチオンを含むTBSで溶出した。得られたGST融合タンパク質を1mg/mLに調製し以下の実験に用いた。

[0140] (ヒトc o f i l i n 1 欠失変異体へのモノクローナル抗体の反応性の評価)

完全長のヒトc o f i l i n 1、5種の欠失変異体の組み換えG S T融合タンパク質について1  $\mu$ g / mL 溶液を調製し、それぞれ100  $\mu$ L ずつF l a t b o t t o m 96w e l l プレート (N u n c 社製) のウェルに入れ、3時間固相化した。それぞれについて、ウェル内のG S T融合タンパク質溶液を廃棄後、ブロッキング溶液 (1% B S A を含むP B S - T) を400  $\mu$ L 注ぎ、1時間、4  $^{\circ}$ C で静置した。その後、溶液を廃棄し、P B S - T で洗浄したものを抗原タンパク質固相化プレートとした。また、G S T融合タンパク質の固相化を施さず、ブロッキング反応のみを行ったプレートを作製し、ブランクプレートとした。次に、1% B S A を含むP B S - T で終濃度1  $\mu$ g / mL になるように希釈した前記39種の抗ヒトc o f i l i n 1モノクローナル抗体それぞれを、ブランクプレート及びG S T融合タンパク質固相化プレートに入れ、1時間、室温で反応させた。ウェル内の溶液を廃棄してP B S - T で洗浄後、100  $\mu$ L のH R P 標識抗マウスI g G 抗体溶液 (G Eヘルスケア) を1時間室温で反応させた。続いて、P B S - T にて洗浄後、T M B 溶液100  $\mu$ L を入れて1分発色反応させた。反応の停止は、100  $\mu$ L の2 N 硫酸溶液の添加によって行った。発色は、450 nm の吸光度の測定により確認した。ブランクウェルに比べ吸光度が0.5以上高い場合「反応性あり」とみなし、固相化した組み換えG S T融合タンパク質と添加したモノクローナル抗体とが結合した、と判断した。それぞれのG S T融合タンパク質に対する39種の抗ヒトc o f i l i n 1モノクローナル抗体の結合性を表1に示す。表1では、「反応性あり」と判断された場合を「○」で、「反応性なし」と判断された場合を「×」で示している。

[0141] (エピトープ配列の同定)

39種それぞれの抗ヒトc o f i l i n 1モノクローナル抗体の完全長のヒトc o f i l i n 1 及び5種の欠失変異体に対する反応性の差異を指標にエピトープ配列を決定した。例えば、4 E 1 2 抗体は、完全長のヒトc o f

i l l i n 1 タンパク質及び変異体 B にのみ反応し、その他の欠失変異体には反応しない。故に、4 E 1 2 抗体のエピトープ配列の少なくとも一部の配列は、完全長ヒト c o f i l i n 1 タンパク質及び変異体 B に存在し、その他の欠失変異体においては欠失した領域である配列番号 4 で示される C 3 領域に含まれることが分かる（図 1）。

[0142] 同様の解析をその他クローンに対しても行い、39種の抗ヒト c o f i l i n 1 モノクローナル抗体が認識するエピトープが、ヒト c o f i l i n 1 タンパク質の部分配列からなるペプチド領域である N 1、N 2、M、C 1、C 2 又は C 3 のいずれかに存在するかを分類した（表 1）。

[表1]

抗体クローン名	欠失変異体					完全長	エピトープ
	A	B	C	D	E		
1B10	○	○	○	○	○	○	M
1D5	○	○	○	○	×	○	N2
1D11	○	○	○	○	○	○	M
1E2	○	○	×	○	×	○	C1
2A1	○	○	○	○	○	○	M
2C11	×	○	×	○	×	○	C2
2C12	○	○	○	○	○	○	M
2D12	×	○	×	×	×	○	C3
2E2	○	○	○	○	×	○	N2
2F5	○	○	×	○	×	○	C1
2F13	○	○	×	○	×	○	C1
2C4	○	○	×	○	×	○	C1
3B4	○	○	○	○	○	○	M
3D2	○	○	○	○	○	○	M
3F11	×	○	×	×	×	○	C3
3F12	○	○	○	○	○	○	M
3G2	○	○	×	○	×	○	C1
4B10	○	○	○	○	○	○	M
4C4	○	○	×	○	×	○	C1
4D1	○	○	○	○	○	○	M
4E12	×	○	×	×	×	○	C3
4F12	○	○	○	○	×	○	N2
4G1	○	○	○	○	○	○	M
4G10	○	○	×	○	×	○	C1
5A10	○	○	○	○	○	○	M
5C12	○	○	○	○	○	○	M
5D12	○	○	○	○	○	○	M
5E4	○	○	○	○	×	○	N2
5E7	○	○	○	○	○	○	M
5G7	○	○	○	○	×	○	N2
6A3	○	○	○	○	○	○	M
6G6	○	○	○	○	○	○	M
6A6	○	○	○	○	×	○	N2
6B11	○	○	○	○	×	○	N2
6C1	○	○	○	○	○	○	M
6C3	○	○	○	○	×	○	N2
6C12	○	○	○	○	×	○	N2
6D12	○	○	○	○	×	○	N2
6H1	○	○	○	○	○	○	M

反応性あり:○

反応性なし:×

[0143] &lt;実施例4&gt;ヒトcofilin1タンパク質測定用ELISAの構築

(HEK293細胞でのヒトcofilin1タンパク質の発現)

HEK293細胞(2×10<sup>6</sup>細胞)を10%FCSを含むDMEM培地(GIBCO社製)中で細胞培養用ディッシュ(コーニング社製)を用いて一晩培養し、リポフェクトアミン2000(Invitrogen社製)を用いて添付のプロトコールに従いpCMV-Myc\_\_ヒトcofilin1又はpCMV-Mycを導入した。2日間培養の後、培地を取り除き、10mLのPBSで洗浄の後、1%NP40緩衝液(1%NP40、150mM NaCl、5mMEDTA、100mM Tris-Cl、pH8.0)1.0mLを加え、30分間、4℃に静置した。細胞を1%NP40緩衝液に懸濁し、1mLの遠心チューブに移して、1,5000×gで遠心の後、上澄みを回収した。各サンプル5μLをLDSサンプルバッファー(Invitrogen社製)で変性処理を行い、NuPage4-12%Bis-TrisGel(Invitrogen社製)を用いて電気泳動にかけた後、タンパク質をPVDF膜へ移した。これをウサギポリクローナル抗体(ProteintechGroup社)、さらにパーオキシダーゼ標識2次抗体と反応させた。免疫反応するタンパク質をWesternLightningPlus-ECL(PerkinElmer社製)を用いてX線フィルムに感光させ可視化した。その結果、pCMV-Myc\_\_ヒトcofilin1導入細胞でのみ、ヒトcofilin1タンパク質のバンドが検出された(図2)。

[0144] (抗体の組み合わせの選定)

高感度検出が可能なサンドイッチELISA用の2種の抗体の組み合わせを選定するために、取得した39種の抗体とビオチン標識した同39種抗体の組み合わせから得られるに1521通り(39×39通り)について、サンドイッチELISAの検出感度の優劣を比較した。試料の陽性コントロールとしてpCMV-Myc\_\_cofilin1導入細胞抽出液を、陰性コントロールとしてpCMV-Myc導入細胞抽出液を用いてELISA測定を行い、陽性コントロールの測定値から陰性コントロールの測定値を差し引いた値を指標に、検出感度の優劣を判定した。

[0145] まず、39種の精製抗体について $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液を調製し、それぞれ $100\mu\text{L}$ ずつFlat bottom 96wellプレート（Nunc社製）のウェルに入れ、5時間固相化した。ウェル内の精製抗体溶液を廃棄後、ブロッキング溶液（1%BSAを含むPBS-T）を $400\mu\text{L}$ 注ぎ、一晚、 $4^{\circ}\text{C}$ で静置した。その後、溶液を廃棄し、PBS-Tにて洗浄したものを精製抗体固相化プレートとした。次に、pCMV-Myc\_\_ヒトcofilin1導入細胞、又はpCMV-Myc導入細胞のタンパク質抽出液を、1%NP40緩衝液で10倍希釈した後、固相化抗体1種につき39wellずつ $100\mu\text{L}$ 添加し、1時間、室温で反応させた。続いて、ウェル内の溶液を廃棄してPBS-Tで洗浄した後、取得した39種抗体のビオチン体を、1%BSAを含む1%NP40緩衝液で $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、それぞれをpCMV-Myc\_\_ヒトcofilin1導入細胞の抽出液を反応させたウェルとpCMV-Myc導入細胞の抽出液を反応させたウェルに入れ、1時間、室温で反応させた。ウェル内の溶液を廃棄してPBS-Tで洗浄後、 $100\mu\text{L}$ のavidin-HRP溶液（R&D社製）を1時間室温で反応させた。さらに、avidin-HRP溶液を廃棄し、PBS-Tにて洗浄後、TMB溶液 $100\mu\text{L}$ を入れて5分反応させた。反応の停止は、 $100\mu\text{L}$ の2N硫酸溶液の添加によって行った。発色は、 $450\text{nm}$ の吸光度の測定により確認し、39種の固相化抗体と39種のビオチン標識抗体の全ての組み合わせについて、陽性コントロール及び陰性コントロールのヒトcofilin1タンパク質濃度を測定し、陽性コントロールから陰性コントロールを差し引いた値にもとに、感度が良い抗体の組み合わせを決定した。その結果、C1領域、C3領域、若しくはN2領域のいずれか1つの領域を特異的に認識する2種類の抗cofilin1モノクローナルを用いることで、ヒトcofilin1タンパク質を特に高感度に検出できることが明らかになった（図3）。

[0146] <実施例5>抗cofilin1モノクローナル抗体のアミノ酸配列の解析  
（ハイブリドーマを用いたモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖cDNA配



列とアミノ酸配列の決定)

選抜した5種類の抗体の組み合わせに必要な抗体4種について、軽鎖及び重鎖のcDNA配列とアミノ酸配列を決定した。まず、それぞれの抗体を産生するハイブリドーマを、15%FCSを添加したRPMI1640培地を用いて、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で1×10<sup>6</sup>細胞/mLになるまで培養した。その後、培養液を1200rpm、5分間遠心分離し、細胞を回収した。回収したハイブリドーマよりmRNAを調製した。調製は、Qiashredder及びRNeasy mini kit (Qiagen社製) を使用し、詳細は付属のプロトコールに従った。次に、逆転写酵素Superscript II (Invitrogen社製) を用いて、得られたTotal mRNAを鋳型にOligo dTプライマーを用いてcDNAを合成し、cDNAライブラリーを作製した。

[0147] 各ハイブリドーマごとに得られたcDNAライブラリーを鋳型に、Mouse Ig Primer (Novagen社製) を用いてPCRを行い、増幅産物 (マウス免疫グロブリン可変領域cDNA) をInvitrogen社の提供するZERO BLUNT TOPO PCR cloning Kit (Invitrogen社) を用いてライゲーションを行った。次に、ライゲーション反応液を用いて、コンピテント細胞の形質転換を行った。コンピテント細胞は、DH5α (タカラバイオ社製) を用い、詳細は付属のプロトコールにしたがって行った。形質転換処理後の菌は、50μg/mLのカナマイシンを含有するLBプレートに塗布し、37℃で一晩培養した。各増幅産物由来の形質転換体を4クローンずつ50μg/mLのカナマイシンを含有するLB液体培地に接種し、37℃で一晩培養した。各培養液からミニプレップによってベクターDNA溶液を調製した結果、モノクローナル抗体をコードするDNAを組み込んだベクター溶液を各増幅産物につき4種類ずつ得た。

[0148] 得られたベクター溶液について、M13プライマーを用いて、モノクローナル抗体をコードする領域のDNA配列解析を行った。解析は、3130x1

ジェネティックアナライザ (Applied Biosystems社製) を用いて行った。挿入領域に停止コドンのないクローンを目的のモノクローナル抗体をコードするDNA配列として判断し、前記4つの抗体 (1E2, 2C4, 4E12, 4F12) の軽鎖、重鎖のDNA配列を決定した。決定されたDNA配列について、大腸菌のコドン使用頻度にしたがってコードするアミノ酸配列を決定し、配列番号8~31に示す配列を得ることができた。

[0149] 配列番号8~31に示されるアミノ酸配列は、1E2をコードするアミノ酸配列として得られた。より詳細には、配列番号8、9、10は、それぞれ1E2の軽鎖CDR1、CDR2、CDR3を、また配列番号11、12、13に示されるアミノ酸配列は、それぞれ1E2の重鎖CDR1、CDR2、CDR3を、コードする。

[0150] 配列番号14~19に示されるアミノ酸配列は、2C4をコードするアミノ酸配列として得られた。より詳細には、配列番号14~16は、それぞれ2C4の軽鎖CDR1~3を、また配列番号17~19に示されるアミノ酸配列は、それぞれ2C4の重鎖CDR1~3を、コードする。

[0151] 配列番号20~25に示されるアミノ酸配列は、4E12をコードするアミノ酸配列として得られた。より詳細には、配列番号20~22は、それぞれ4E12の軽鎖CDR1~3を、また配列番号23~25に示されるアミノ酸配列は、それぞれ4E12の重鎖CDR1~3をコードする。

[0152] 配列番号26~31に示されるアミノ酸配列は、4F12をコードするアミノ酸配列として得られた。より詳細には、配列番号26~28は、それぞれ4F12の軽鎖CDR1~3を、また配列番号29~31に示されるアミノ酸配列は、それぞれ4F12の重鎖CDR1~3をコードする。

[0153] <実施例6>モノクローナル抗体1E2とモノクローナル抗体4E12を用いたサンドイッチELISA法によるヒトcofilin1タンパク質の検出

実施例3により、配列番号1で示されるアミノ酸配列のうち、少なくとも配列番号5で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域に存在するエピト

ープを特異的に認識するモノクローナル抗体1E2と、配列番号1で示されるアミノ酸配列のうち、少なくとも配列番号6で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域に存在するエピートープを特異的に認識するモノクローナル抗体4E12のビオチン標識体を用いたサンドイッチELISA法が、最もヒトcofilin1タンパク質を高感度に検出できることが判明した。そこで、His-ヒトcofilin1タンパク質を1%BSA及び1%NP40を含むTBS緩衝液で1000ng/mLから10pg/mLまで段階的に希釈し、これを試料とした測定により本サンドイッチELISAの検出感度を算出した。その結果、1E2と4E12の組み合わせによるELISA法の最小検出限界値（平均値+2SDと被検体の平均値-2SDが重ならない最小濃度）は、10pg/mLであった（図4矢印）。

[0154] <実施例7> 血漿中のヒトcofilin1タンパク質測定による胃癌の検出

1E2と4E12のビオチン標識体を用いたサンドイッチELISA法により、胃癌患者及び健常者の血漿中のヒトcofilin1タンパク質を検出した。胃癌患者51名（ステージI：24名、ステージII：6名、ステージIII：11名、ステージIV：10名）及び対照健常者20名よりベネディクトII真空採血管（テルモ社製）を用いて採血を行い、血漿を得た。血漿はそれぞれ1%BSAと1%NP40を含むTBS緩衝液で10倍希釈した後、100μLを試料として用いた。

[0155] まず、抗ヒトcofilin1抗体1E2について3μg/mL溶液を調製し、それぞれ100μLずつFlat bottom 96wellプレート（Nunc社製）のウェルに入れ、5時間固相化した。それぞれについて、ウェル内の精製抗体溶液を廃棄後、ブロッキング溶液（1%BSAを含むPBS-T）を400μL注ぎ、一晩、4°Cで静置した。ブロッキング溶を取り除き、400μLのPBS-Tで一回洗浄した後、血漿試料100μLを添加し、1時間、室温で反応させた。ウェル内の溶液を廃棄し、PBS-Tで洗浄した後、1%NP40を含むTBS緩衝液で0.5μg/mLに希釈

した4E12のビオチン標識体を100 $\mu$ Lずつウェルに入れ、1時間、室温で反応させた。続いて、ウェル内の溶液を廃棄してPBS-Tで洗浄後、100 $\mu$ Lのavidin-HRP溶液(R&D社製)を1時間室温で反応させた。さらに、avidin-HRP溶液を廃棄し、PBS-Tにて洗浄後、TMB溶液100 $\mu$ Lを入れて5分反応させた。反応の停止は、100 $\mu$ Lの2N硫酸溶液の添加によって行った。発色は、450nmの吸光度の測定により確認した。その結果、早期及び進行性胃癌患者では、対照健常者と比べて統計学的に有意に高値のヒトcofilin1タンパク質が血漿中から検出された(図5)。

[0156] <実施例8>血清中のヒトcofilin1タンパク質測定による胃癌の検出

1E2と4E12のビオチン標識体を用いたサンドイッチELISA法により、胃癌患者及び健常者の血清中のヒトcofilin1を検出した。胃癌患者15名(ステージI:7名、ステージII:1名、ステージIII:4名、ステージIV:3名)及び対照健常者5名よりベネディクトII真空採血管(テルモ社製)を用いて採血を行い、血清を得た。血清はそれぞれ1%BSA及び1%NP40を含むTBS緩衝液で10倍希釈した後、100 $\mu$ Lを試料として用いた。

[0157] まず、抗ヒトcofilin1抗体1E2について3 $\mu$ g/mL溶液を調製し、それぞれ100 $\mu$ LずつFlat bottom 96wellプレート(Nunc社製)のウェルに入れ、5時間固相化した。それぞれについて、ウェル内の精製抗体溶液を廃棄後、ブロッキング溶液(1%BSAを含むPBS-T)を400 $\mu$ L注ぎ、一晩、4 $^{\circ}$ Cで静置した。ブロッキング液を取り除き、400 $\mu$ LのPBS-Tで一回洗浄した後、血清試料100 $\mu$ Lを添加し、1時間、室温で反応させた。ウェル内の溶液を廃棄し、PBS-Tで洗浄した後、1%NP40を含むTBS緩衝液で0.5 $\mu$ g/mLに希釈した4E12のビオチン標識体を100 $\mu$ Lずつウェルに入れ、1時間、室温で反応させた。続いて、ウェル内の溶液を廃棄してPBS-Tで洗浄後

、100 $\mu$ Lのavidin-HRP溶液（R&D社製）を1時間室温で反応させた。さらに、avidin-HRP溶液を廃棄し、PBS-Tにて洗浄後、TMB溶液100 $\mu$ Lを入れて5分反応させた。反応の停止は、100 $\mu$ Lの2N硫酸溶液の添加によって行った。発色は、450nmの吸光度の測定により確認した。その結果、血清中からも、早期及び進行性胃癌患者においては、対照健常者と比べて統計学的に有意に高値のヒトcofilin1タンパク質が検出された（図6）。

### 産業上の利用可能性

- [0158] 本発明により、様々な哺乳類細胞由来の生体試料中に存在するcofilin1タンパク質の高感度かつ定量的な検出が可能となる。また、本発明の方法によれば、患者血液を用いて早期消化器癌を高感度に検出できるため、非侵襲的な検査手法による早期癌患者のスクリーニング法としても有用である。さらには、cofilin1タンパク質が関与する細胞骨格制御機構の解明を目的とした基礎研究におけるアッセイ系としても有用である。
- [0159] なお、本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

## 請求の範囲

[請求項1] 以下のいずれかのペプチド領域に存在するエピトープを特異的に認識する抗c o f i l i n 1モノクローナル抗体又はその断片。

a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列のうち、少なくとも配列番号5で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域

b) 前記a)のペプチド領域のアミノ酸配列に1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたペプチド領域

c) 前記a)のペプチド領域のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するペプチド領域

[請求項2] 軽鎖において、

CDR1が配列番号8で示される配列を含み、

CDR2が配列番号9で示される配列を含み、及び

CDR3が配列番号10で示される配列を含み、ならびに

重鎖において、

CDR1が配列番号11で示される配列を含み、

CDR2が配列番号12で示される配列を含み、及び

CDR3が配列番号13で示される配列を含む、

請求項1に記載の抗c o f i l i n 1モノクローナル抗体又はその断片。

[請求項3] 軽鎖において、

CDR1が配列番号14で示される配列を含み、

CDR2が配列番号15で示される配列を含み、及び

CDR3が配列番号16で示される配列を含み、ならびに

重鎖において、

CDR1が配列番号17で示される配列を含み、

CDR2が配列番号18で示される配列を含み、及び

CDR3が配列番号19で示される配列を含む、

請求項1に記載の抗c o f i l i n 1モノクローナル抗体又はその断片。

片。

[請求項4]

以下のいずれかのペプチド領域に存在するエピトープを特異的に認識する抗c o f i l i n 1モノクローナル抗体又はその断片。

- a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列のうち、少なくとも配列番号6で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域
- b) 前記a)のペプチド領域のアミノ酸配列に1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたペプチド領域
- c) 前記a)のペプチド領域のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するペプチド領域

[請求項5]

軽鎖において、

CDR1が配列番号20で示される配列を含み、  
CDR2が配列番号21で示される配列を含み、及び  
CDR3が配列番号22で示される配列を含み、ならびに

重鎖において、

CDR1が配列番号23で示される配列を含み、  
CDR2が配列番号24で示される配列を含み、及び  
CDR3が配列番号25で示される配列を含む、

請求項4に記載の抗c o f i l i n 1モノクローナル抗体又はその断片。

[請求項6]

以下のいずれかのペプチド領域に存在するエピトープを特異的に認識する抗c o f i l i n 1モノクローナル抗体又はその断片。

- a) 配列番号2で示されるアミノ酸配列のうち、少なくとも配列番号7で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域
- b) 前記a)のペプチド領域のアミノ酸配列に1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたペプチド領域
- c) 前記a)のペプチド領域のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するペプチド領域

[請求項7]

軽鎖において、

CDR 1 が配列番号 26 で示される配列を含み、  
CDR 2 が配列番号 27 で示される配列を含み、及び  
CDR 3 が配列番号 28 で示される配列を含み、ならびに  
重鎖において、  
CDR 1 が配列番号 29 で示される配列を含み、  
CDR 2 が配列番号 30 で示される配列を含み、及び  
CDR 3 が配列番号 31 で示される配列を含む、  
請求項 6 に記載の抗 *cofilin* 1 モノクローナル抗体又はその断片。

[請求項 8] *cofilin* 1 タンパク質のアミノ酸配列上の異なるエピトープをそれぞれ特異的に認識する 2 種以上の抗 *cofilin* 1 モノクローナル抗体及び／又はその断片を使用して、試料中の *cofilin* 1 及び／又はその断片を測定する、*cofilin* 1 タンパク質の免疫学的測定方法。

[請求項 9] 前記異なるエピトープが配列番号 1 及び／又は 2 で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域に存在する、請求項 8 に記載の測定方法。

[請求項 10] 前記異なるエピトープが  
配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域のうち、少なくとも配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域、及び／又は  
配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域のうち、少なくとも配列番号 4 で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域に存在する、請求項 9 に記載の測定方法。

[請求項 11] 前記異なるエピトープが  
配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域のうち、少なくとも配列番号 5 及び／又は 6 で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域、及び／又は



配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域のうち、少なくとも配列番号7で示されるアミノ酸配列を含むペプチド領域に存在する、請求項9に記載の測定方法。

[請求項12] 前記異なるエピトープが配列番号5～7で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域から選択される2つのペプチド領域にそれぞれ存在する、請求項8に記載の測定方法。

[請求項13] 前記異なるエピトープが配列番号1及び／又は2で示されるアミノ酸配列からなるペプチド領域における連続する6個以上21個以下のアミノ酸からなるペプチド領域に存在する、請求項9に記載の測定方法。

[請求項14] 前記2種以上の抗*cofilin1*モノクローナル抗体及び／又はその断片が請求項2、3、5及び7に記載の抗*cofilin1*モノクローナル抗体又はその断片から選択される、請求項8に記載の測定方法。

[請求項15] 2種の抗*cofilin1*モノクローナル抗体及び／又はその断片が、以下のいずれかの抗*cofilin1*モノクローナル抗体及び／又はその断片の組合せである、請求項14に記載の測定方法。

a) 請求項2及び5のそれぞれに記載の抗*cofilin1*モノクローナル抗体及び／又はその断片の組合せ

b) 請求項2及び7のそれぞれに記載の抗*cofilin1*モノクローナル抗体及び／又はその断片の組合せ

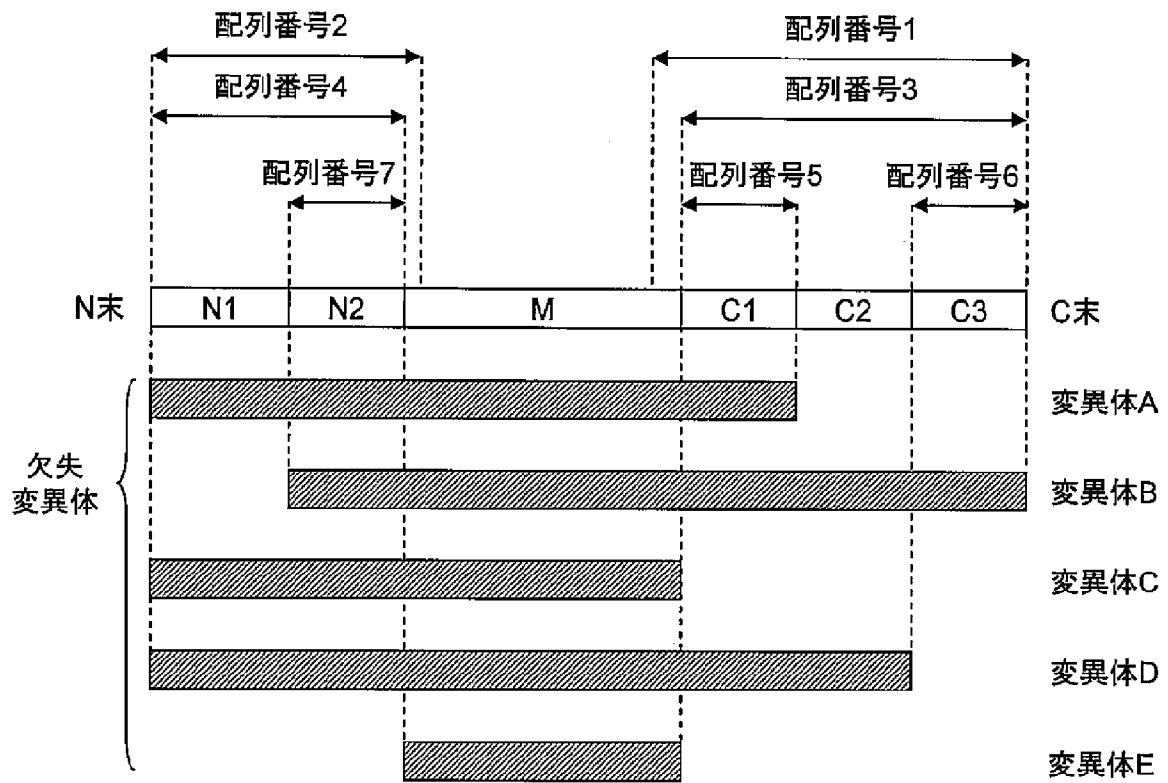
c) 請求項3及び5のそれぞれに記載の抗*cofilin1*モノクローナル抗体及び／又はその断片の組合せ

d) 請求項5及び7のそれぞれに記載の抗*cofilin1*モノクローナル抗体及び／又はその断片の組合せ

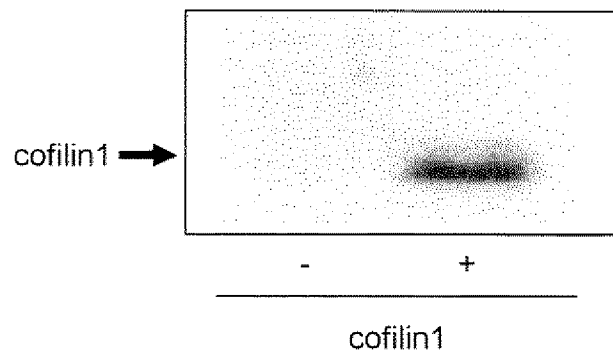
[請求項16] 前記試料が血液、尿、細胞上清、細胞抽出液、組織抽出液、胃液、唾液、リンパ液、涙液又は精液である、請求項8～15のいずれか一項に記載の測定方法。

- [請求項17] 請求項8～16のいずれか一項に記載の測定方法を用いて被検体及び健常体由来の試料中のc o f i l i n 1タンパク質及び／又はその断片の量を測定するステップ、
- 前記測定ステップで測定されたc o f i l i n 1タンパク質及び／又はその断片の量を比較して、被検体のc o f i l i n 1タンパク質及び／又はその断片の量が健常者のそれよりも統計学的に有意に多い場合には被検体が消化器癌に罹患していると判定する判定ステップを含む、消化器癌罹患判定方法。
- [請求項18] 前記消化器癌が早期消化器癌である、請求項17に記載の判定方法。
- [請求項19] 前記消化器癌が胃癌である、請求項17又は18に記載の判定方法。
- [請求項20] c o f i l i n 1タンパク質の異なるエピトープをそれぞれ特異的に認識する2種以上の抗c o f i l i n 1モノクローナル抗体及び／又はその断片を含む、c o f i l i n 1タンパク質の測定用キット。
- [請求項21] 請求項1～7のいずれか一項に記載の抗c o f i l i n 1モノクローナル抗体又はその断片を2種以上含む、請求項20に記載のキット。

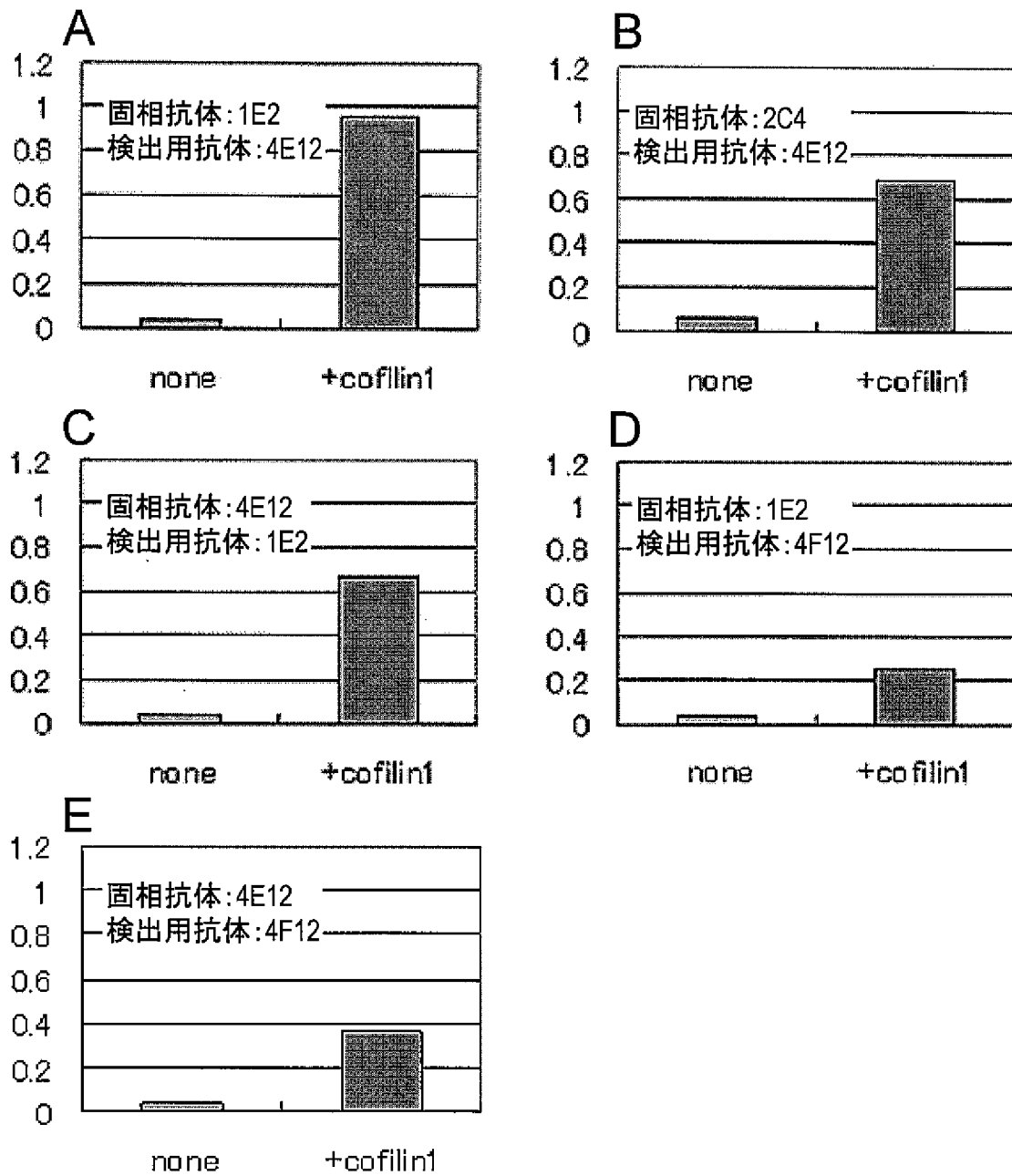
[図1]



[図2]

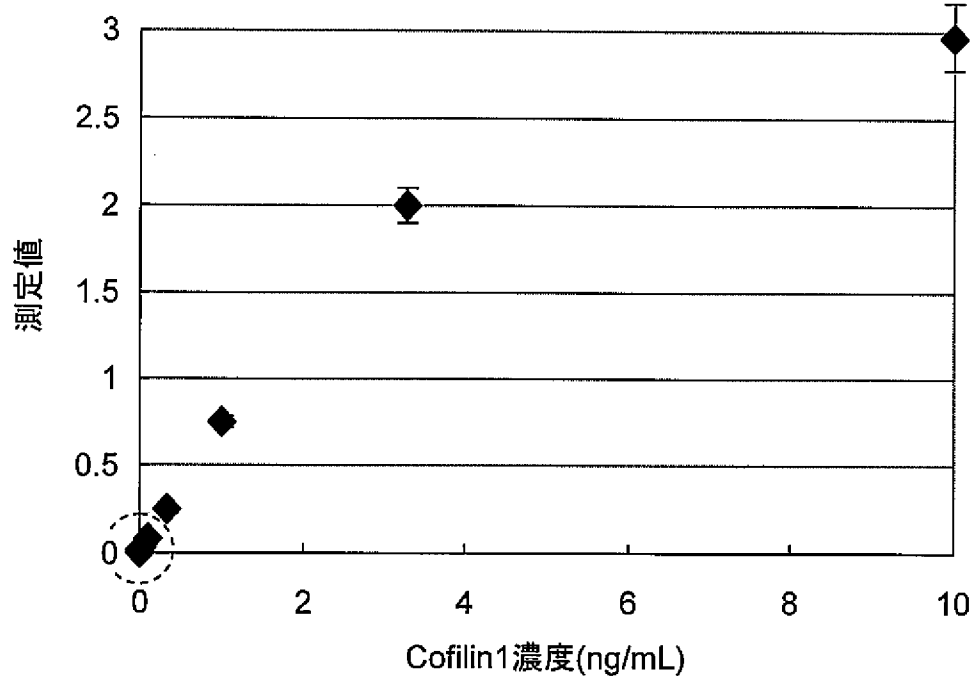


[図3]

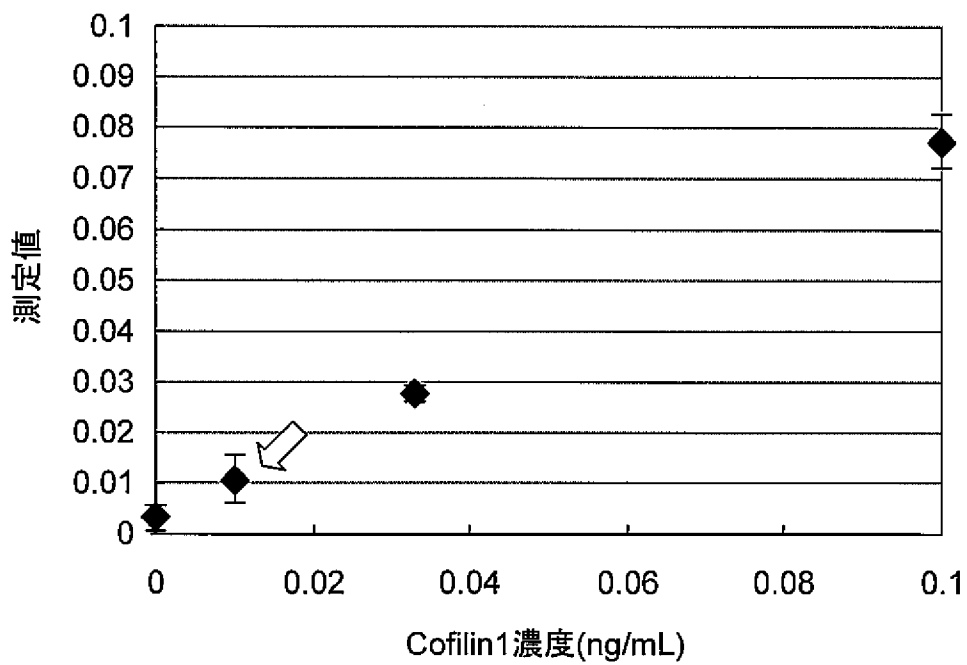


[図4]

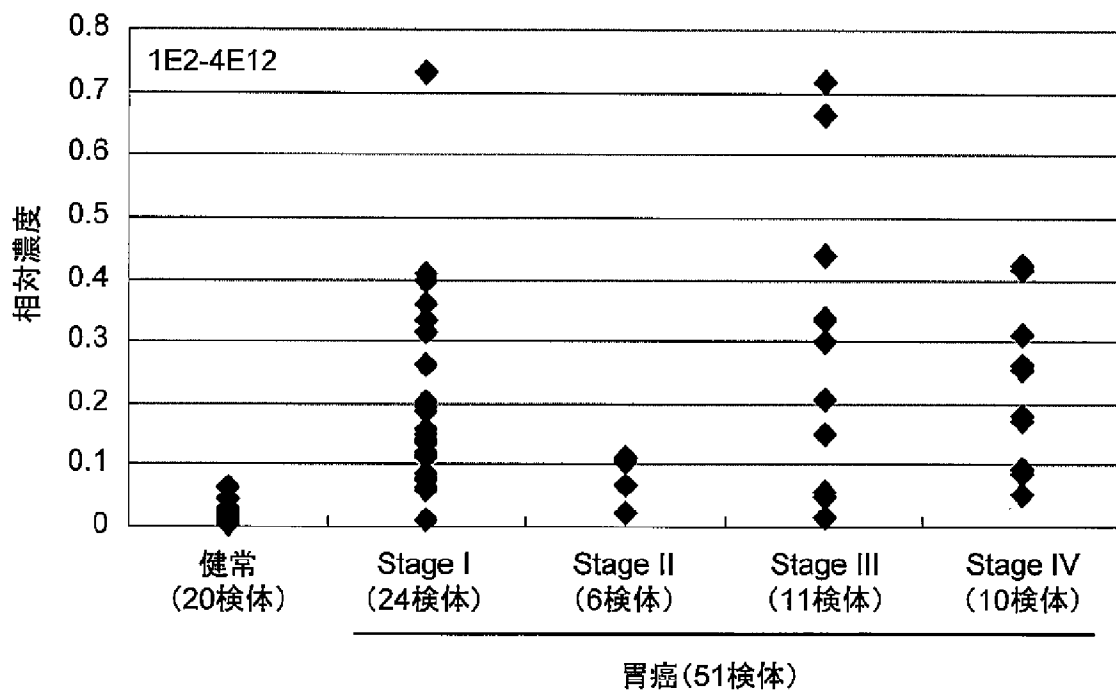
A



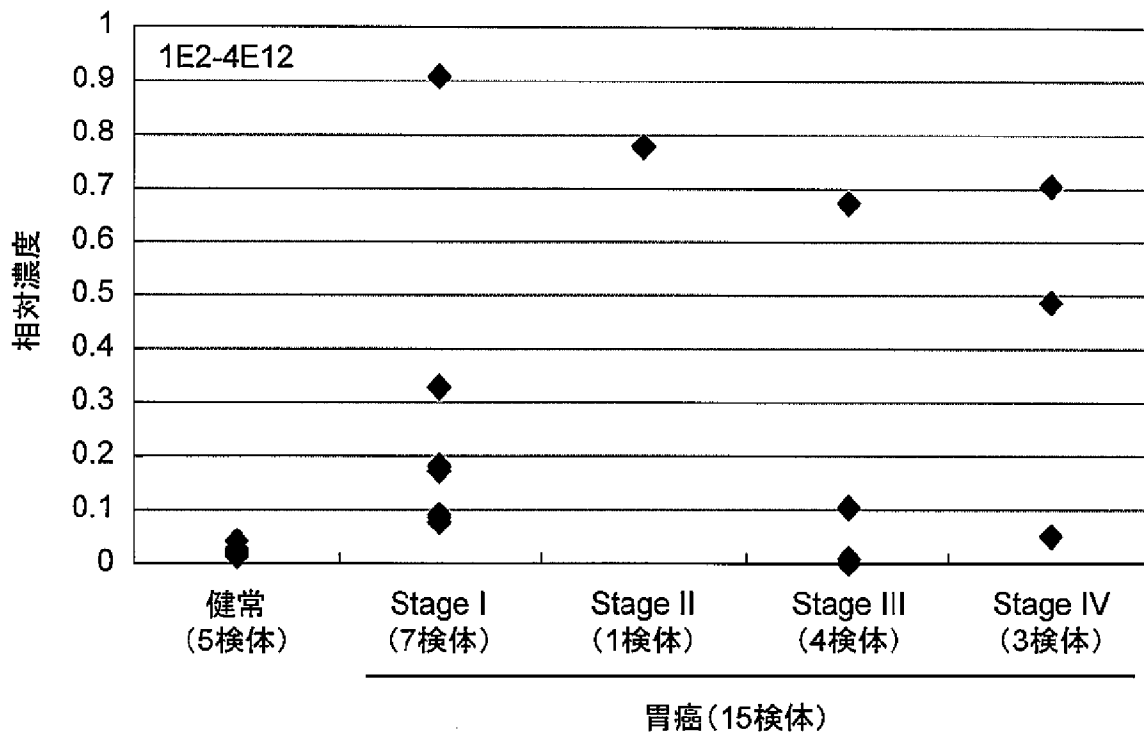
B



[図5]



[図6]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/078091

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/18(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i,  
C12N15/09(2006.01)n, C12P21/08(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K16/18, G01N33/574, G01N33/577, C12N15/09, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Amanda Y. CHAN et al., Role of Cofilin in Epidermal Growth Factor-stimulated Actin Polymerization and Lamellipod Protrusion, The Journal of Cell Biology, 2000.02.07, Vol.148, No.3, p.531-542, particularly, Materials and Methods, Preparation of Cofilin Antibodies	1-21
Y	Hiroshi ABE et al., A Cofilin-Like Protein Is Involved in the Regulation of Actin Assembly in Developing Skeletal Muscle, J. Biochem, 1989, Vol.106, p.696-702, particularly, Abstract, MATERIALS ANT METHODS, Antibodies	1-21
Y	K.OGAWA et al., Coding sequence of human placenta Cofilin cDNA, Nucleic Acids Research, 1990, Vol.18, No.23, p.7169, entire text	1-21

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
14 February, 2012 (14.02.12)

Date of mailing of the international search report  
21 February, 2012 (21.02.12)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/078091

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2000-507094 A (SIOS Inc.), 13 June 2000 (13.06.2000), & US 6376207 B1 & EP 1557431 A1 & WO 1997/032900 A1	8-21
Y	C-Peptide Kit Lumipulse C-Peptide Tenpu Bunsho, Fujirebio Inc., 2007.10	8-21
Y	Yoshiyuki AMANO et al., "Jido Kagaku Hakko Koso Men'eki Bunseki Sochi 'SphereLight180' ni yoru ProGRP Sokutei no Kiso Kento", The Japan Society for Clinical Laboratory Automation Dai 34 Kai Taikai Shorokushu, 2002, page 549	8-21
Y	WANG W. et al, The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors, J Cell Biol, 2006.05.08, Vol.173, No.3, p.395-404, particularly, Abstract, Introduction	16-19
Y	YAN B. et al., Cofilin immunolabelling correlates with depth of invasion in gastrointestinal endocrine cell tumors, Acta Histochemica, 2010.01, Vol.112, p.101-106, particularly, Summary	16-19
Y	WANG K. et al., Enhanced Invasive and Metastatic Potential Induced by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Might be Correlated with Glutathione-S-transferase- $\pi$ , Cofilin and Heat Shock Protein 27 in SGC-7901 Gastric Cancer Cells, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007.07, Vol.39, No.7, p.520-526, particularly, Abstract, Results	16-19



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2011/078091

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions described in claims 1, 4, 6, 8 and 20 share a common technical feature "an anti-cofilin-1 monoclonal antibody". However, the technical feature does not make a contribution over the prior art and cannot be regarded as a special technical feature, because document 1 (The Journal of Cell Biology, 2000.02.07, Vol.148, No.3, p.531-542) and document 2 (J. Biochem., 1989, Vol.106, p.696-702) disclose anti-cofilin-1 monoclonal antibodies. Further, there is not other same or corresponding special technical feature among these inventions.

(continued to extra sheet)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2011/078091

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

Claims include the following inventions.

(Invention 1) Claims 1-3, and parts of claims 11, 12, 14-19 and 21.  
Inventions relating to an anti-cofilin-1 monoclonal antibody capable of recognizing an epitope found in the peptide represented by SEQ ID NO: 5.

(Invention 2) Claims 4 and 5, and parts of claims 11, 12, 14-19 and 21.  
Inventions relating to an anti-cofilin-1 monoclonal antibody capable of recognizing an epitope found in the peptide represented by SEQ ID NO: 6.

(Invention 3) Claims 6 and 7, and parts of claims 11, 12, 14-19 and 21.  
Inventions relating to an anti-cofilin-1 monoclonal antibody capable of recognizing an epitope found in the peptide represented by SEQ ID NO: 7.

(Invention 4) Claims 8-21.  
Inventions relating to a method for measuring cofilin-1 using at least two types of monoclonal antibodies having different epitopes for cofilin-1 and a kit for the method.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K16/18(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, C12P21/08(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K16/18, G01N33/574, G01N33/577, C12N15/09, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2012年
日本国実用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録実用新案公報	1994-2012年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPlus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Amanda Y. CHAN et al., Role of Cofilin in Epidermal Growth Factor-stimulated Actin Polymerization and Lamellipod Protrusion, The Journal of Cell Biology, 2000.02.07, Vol.148, No.3, p.531-542, 特に、Materials and Methods の Preparation of Cofilin Antibodies の項参照	1-21

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.02.2012

国際調査報告の発送日

21.02.2012

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 悠美子

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

4501

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Hiroshi ABE et al., A Cofilin-Like Protein Is Involved in the Regulation of Actin Assembly in Developing Skeletal Muscle, J. Biochem, 1989, Vol.106, p.696-702, 特に、Abstract, MATERIALS ANT METHODS の Antibodies の項参照	1-21
Y	K. OGAWA et al., Coding sequence of human placenta Cofilin cDNA, Nucleic Acids Research, 1990, Vol.18, No.23, p.7169, 全文参照	1-21
Y	JP 2000-507094 A (サイオス インコーポレイテッド) 2000.06.13, & US 6376207 B1 & EP 1557431 A1 & WO 1997/032900 A1	8-21
Y	C-ペプチドキット ルミパルス C-ペプチド 添付文書, 富士レビオ株式会社, 2007.10	8-21
Y	天野 善之 他, 自動化学発光酵素免疫分析装置「スフィアライト 180」による ProGRP 測定の基礎検討, 日本臨床検査自動化学会第 34 回大会抄録集, 2002, p.549	8-21
Y	WANG W. et al, The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors, J Cell Biol, 2006.05.08, Vol.173, No.3, p.395-404, 特に、Abstract, Introduction 参照	16-19
Y	YAN B. et al., Cofilin immunolabelling correlates with depth of invasion in gastrointestinal endocrine cell tumors, Acta Histochemica, 2010.01, Vol.112, p.101-106, 特に、Summary 参照	16-19
Y	WANG K. et al., Enhanced Invasive and Metastatic Potential Induced by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Might be Correlated with Glutathione-S-transferase- $\pi$ , Cofilin and Heat Shock Protein 27 in SGC-7901 Gastric Cancer Cells, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007.07, Vol.39, No.7, p.520-526, 特に、Abstract, Results 参照	16-19

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
  
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
  
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項1、4、6、8、20に係る発明は、「抗コフィリン1モノクローナル抗体」という共通の技術的特徴を有しているが、文献1 (The Journal of Cell Biology, 2000.02.07, Vol.148, No.3, p.531-542) 及び文献2 (J. Biochem., 1989, Vol.106, p.696-702) には抗コフィリン1モノクローナル抗体が記載されており、当該技術的特徴は、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

(特別ページに続く)

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

そして、請求の範囲には、以下の発明が含まれる。

(発明1) 請求項1-3、及び請求項11、12、14-19、21の一部  
配列番号5に示されるペプチドに存在するエピトープを認識する抗コフィリン1モノクローナル抗体に係る発明

(発明2) 請求項4、5、及び請求項11、12、14-19、21の一部  
配列番号6に示されるペプチドに存在するエピトープを認識する抗コフィリン1モノクローナル抗体に係る発明

(発明3) 請求項6、7、及び請求項11、12、14-19、21の一部  
配列番号7に示されるペプチドに存在するエピトープを認識する抗コフィリン1モノクローナル抗体に係る発明

(発明4) 請求項8-21  
コフィリン1に対するエピトープの異なる2種以上のモノクローナル抗体を使用してコフィリン1を測定する方法、及びそのためのキットに係る発明