(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2014-204669
(P2014-204669A)
(43)公開日　平成26年10月30日(2014.10.30)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18		4B065
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	102	4H045
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	C	
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D	

審査請求 未請求　請求項の数 10　ＯＬ　（全 16 頁）

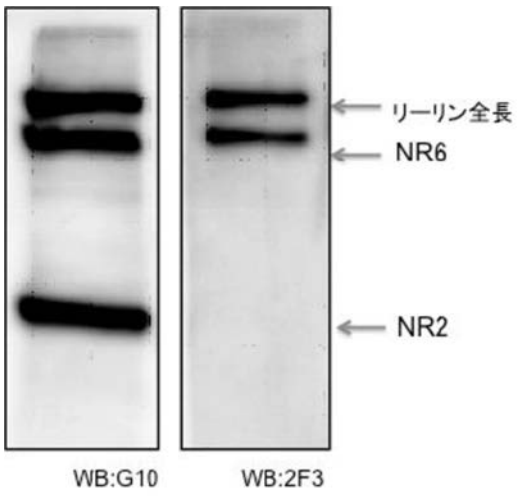
(21)出願番号　特願2011-179161 (P2011-179161)
(22)出願日　平成23年8月18日 (2011.8.18)

(71)出願人　506218664
公立大学法人名古屋市立大学
愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄１
(74)代理人　100097733
弁理士　北川　治
(74)代理人　100162466
弁理士　北川　英陸
(72)発明者　服部　光治
愛知県名古屋市瑞穂区田辺通３－１　公立大学法人名古屋市立大学　大学院薬学研究科内
(72)発明者　河野　孝夫
愛知県名古屋市瑞穂区田辺通３－１　公立大学法人名古屋市立大学　大学院薬学研究科内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗体とその利用

(57)【要約】　（修正有）
【課題】大量のサンプルであっても簡便、迅速に活性型リーリンを選択的に測定できる手段を提供する。
【解決手段】活性型リーリンに対して特異的に結合し、不活性型リーリンに対しては結合しない抗活性型リーリン抗体、あるいは、特定のアミノ酸配列を有するペプチドに対して特異的に結合する抗活性型リーリン抗体。
【選択図】図２



【特許請求の範囲】
【請求項１】
活性型リーリンに対して特異的に結合し、不活性型リーリンに対しては結合しない抗体であることを特徴とする抗活性型リーリン抗体。
【請求項２】
配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列を有するペプチドに対して特異的に結合する抗体であることを特徴とする抗活性型リーリン抗体。
【請求項３】
配列表の配列番号２に示すアミノ酸配列を有するＨ鎖可変領域と、配列表の配列番号３に示すアミノ酸配列を有するＬ鎖可変領域とを有するポリペプチドからなる抗体であることを特徴とする抗活性型リーリン抗体。
【請求項４】
配列表の配列番号２に示すアミノ酸配列に対して１～数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を有するＨ鎖可変領域と、配列表の配列番号３に示すアミノ酸配列に対して１～数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を有するＬ鎖可変領域とを有するポリペプチドからなり、以下の（１）、（２）の少なくとも一方に該当する抗体であることを特徴とする抗活性型リーリン抗体。
（１）活性型リーリンに対して特異的に結合し、不活性型リーリンに対しては結合しない。
（２）配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列を有するペプチドに対して特異的に結合する。
【請求項５】
配列表の配列番号４～６に示すアミノ酸配列からなるＣＤＲ配列の全てを含むＨ鎖可変領域と、配列表の配列番号７～９に示すアミノ酸配列からなるＣＤＲ配列の全てを含むＬ鎖可変領域とを有するポリペプチドからなる抗体であることを特徴とする抗活性型リーリン抗体。
【請求項６】
以下（３）～（８）のいずれかに該当することを特徴とする核酸。
（３）配列表の配列番号４に示すアミノ酸配列をコードする核酸。
（４）配列表の配列番号５に示すアミノ酸配列をコードする核酸。
（５）配列表の配列番号６に示すアミノ酸配列をコードする核酸。
（６）配列表の配列番号７に示すアミノ酸配列をコードする核酸。
（７）配列表の配列番号８に示すアミノ酸配列をコードする核酸。
（８）配列表の配列番号９に示すアミノ酸配列をコードする核酸。
【請求項７】
請求項６に記載の（３）～（８）の全ての塩基配列を含み、第１発明～第５発明のいずれかに記載の抗活性型リーリン抗体をコードすることを特徴とする核酸。
【請求項８】
哺乳動物のミエローマ細胞と、配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列を有するペプチドで免疫された哺乳動物の脾細胞との融合によって作製され、請求項１～５のいずれかに記載の抗活性型リーリン抗体を生産することを特徴とするハイブリドーマ細胞。
【請求項９】
請求項１～５のいずれかに記載の抗活性型リーリン抗体を用いた抗原－抗体反応により、被験試料中の活性型リーリンを測定することを特徴とする活性型リーリン測定方法。
【請求項１０】
請求項１～５のいずれかに記載の抗活性型リーリン抗体を含んで構成され、被験試料中の活性型リーリンを測定するために用いるものであることを特徴とする活性型リーリン測定用キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【０００１】
本発明は抗体とその利用に関する。更に詳しくは本発明は、活性型リーリンに対して特異的に結合し、不活性型リーリンに対しては結合しない新規な抗活性型リーリン抗体と、この抗体のＨ鎖、Ｌ鎖の可変領域をコードする核酸又はこれらの領域におけるＣＤＲ配列部分をコードする核酸と、この抗体を生産するハイブリドーマ細胞と、この抗体を利用する活性型リーリン測定方法、及びそのために用いる活性型リーリン測定用キットに関する。

【背景技術】
【０００２】
リーリンは、脳の機能に重要な、３４００を超えるアミノ酸からなる巨大な分泌タンパク質である。リーリンが脳の特徴的な層構造の形成に必須であること、ヒトでもリーリンが欠損すると脳構造形成不全が起こることも報告されている。一方、リーリンは成体の脳でも発現しており、その発現量の低下や分解亢進が統合失調症、アルツハイマー病、気分障害等の疾患の一因となることが明らかになってきている。
リーリンに関して、例えば下記の特許文献１ではリーリンのエピトープ領域ポリペプチド及びこれをコードするポリヌクレオチドを開示し、これによってリーリンの機能を更に研究すると共に、リーリン遺伝子の異常並びにニューロンの配置異常に起因する脳障害に対する診断・治療手段を提供できるとしている。又、下記の特許文献２では、中枢神経系の他の重要成分におけるＤＩＩＡレベルを非破壊的に評価又は予想するためのバイオマーカーとしてのリーリンを測定する方法を提案している。

【先行技術文献】
【特許文献】
【０００３】
【特許文献１】特開２００２－１７３６１号公報
【特許文献２】特開２００７－５２４６７４号公報
【非特許文献】
【０００４】
【非特許文献１】“Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutantmice, is processed by a metalloproteinase.” Lambert de Rouvroit C, de Bergeyck V,Cortvrindt C, Bar I, Eeckhout Y, Goffinet AM. Exp Neurol. 1999 Mar;156(1):214-7.
【非特許文献２】“Mechanism and significance of specific proteolytic cleavage of Reelin.” Kohno S, Kohno T, NakanoY, Suzuki K, Ishii M, Tagami H, Baba A, Hattori M. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Feb27;380(1):93-7.

【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
リーリンについては、更に、公知の各種文献により、あるいは本願発明者の研究により、以下の点が分かっている。
【０００６】
即ち、リーリンは分子内で特異的な分解を受けるが、その分解部位として、リーリンタンパク質のアミノ酸配列におけるＮ末端側に近い未知のサイト（以下、このサイトを「N-t site」と呼ぶ）とＣ末端側に近い未知のサイト（以下、このサイトを「C-t site」と呼ぶ）とがある（非特許文献１参照）。実際には、リーリンの分子内分解の大部分はN-t siteで起こり、C-t siteで起こる分解は比較的少ない。
【０００７】
従って、リーリンの研究又は測定用に調製された被験試料には、一般的に、分子内分解を受けていない全長リーリンと分子内分解を受けた分解型リーリンとが混在している。そして前記したリーリンの生理的機能について、全長リーリンは活性であるが、N-t siteでの分子内分解を受けた分解型リーリンは不活性であり（非特許文献２参照）、一方、C-t

siteでの分子内分解を受けた分解型リーリンは、幾分低下した活性を維持することが分かっている。

【０００８】

以上の点を踏まえれば、リーリンの機能の研究のため、あるいはリーリンの発現量低下等に基づく疾患の診断・治療手段の開発のため、被験試料中のリーリンの測定を行う場合には、活性型リーリンのみを選択的に測定する必要がある。

【０００９】

このような要求に応えるために、従来は、例えば全長リーリンと分解型リーリンとの分子量の差を利用して電気泳動を行っていた。しかし、巨大タンパク質である全長リーリンや分解型リーリンの電気泳動は非常に時間がかかり、効率面で実用性に欠けていた。しかも大量のサンプルについて同時に測定を行うことは、手間の面で事実上は不可能であった。

【００１０】

又、被験試料中の不活性型リーリンを検出することなく活性型リーリンのみを選択的に測定するためには、その目的に適う抗体、特にモノクローナル抗体の利用が特に有効であると考えられるが、このような抗原特異性を備える抗体は、未だ提案も提供もされていない。

【００１１】

そこで本発明は、大量のサンプルであっても簡便、迅速に活性型リーリンを選択的に測定できる手段を提供することを、解決すべき技術的課題とする。

【００１２】

本願発明者は、リーリンタンパク質のアミノ酸配列において未解明であったN-t siteの分解部位を具体的に突き止めた。更に、このアミノ酸配列を有するペプチドを抗原とするモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞を作製することに成功した。その結果、N-t siteでの分解を受けていないリーリン、即ち活性型リーリンのみに特異的に結合する抗活性型リーリン抗体を得るに至り、本発明を完成した。

【課題を解決するための手段】

【００１３】

（第１発明の構成）

上記課題を解決するための第１発明の構成は、活性型リーリンに対して特異的に結合し、不活性型リーリンに対しては結合しない抗体である、抗活性型リーリン抗体である。

【００１４】

上記の第１発明において「抗体」のカテゴリーは限定されないが、必要な条件を備えたハイブリドーマ細胞によって生産されるモノクローナル抗体であることが特に好ましい。「活性型リーリン」とは、N-t siteでの分解を受けていないリーリンを言い、「不活性型リーリン」とは、N-t siteでの分解を受けたリーリンを言う。

【００１５】

（第２発明の構成）

上記課題を解決するための第２発明の構成は、配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列を有するペプチドに対して特異的に結合する抗体である、抗活性型リーリン抗体である。

【００１６】

上記の第２発明において、配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列は、未解明であったリーリンタンパク質のN-t siteの分解部位を中心とする８個のアミノ酸配列であり、N-t siteでの分解は、このアミノ酸配列中のプロリン（Pro）とアラニン（Ala）との間で起こる。なお、配列表において後述するように、この８個のアミノ酸配列及びその分解部位は、実際にはマウスのリーリンから割り出したものであるが、ヒトのリーリンにおいても上記のアミノ酸配列及びその分解部位は全く同一である。

【００１７】

又、「（配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列を）有する」とは、当該アミノ酸配列からなり、又は、このアミノ酸配列を一部に含むことを意味する。本願明細書の以下の記

載においても、特定のアミノ酸配列又は塩基配列について「有する」と言うときは、同上の意味である。

【００１８】

（第３発明の構成）

上記課題を解決するための第３発明の構成は、配列表の配列番号２に示すアミノ酸配列を有するＨ鎖可変領域と、配列表の配列番号３に示すアミノ酸配列を有するＬ鎖可変領域とを有するポリペプチドからなる抗体である、抗活性型リーリン抗体である。

【００１９】

（第４発明の構成）

上記課題を解決するための第４発明の構成は、配列表の配列番号２に示すアミノ酸配列に対して１～数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を有するＨ鎖可変領域と、配列表の配列番号３に示すアミノ酸配列に対して１～数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を有するＬ鎖可変領域とを有するポリペプチドからなり、以下の（１）、（２）の少なくとも一方に該当する抗体である、抗活性型リーリン抗体である。

【００２０】

（１）活性型リーリンに対して特異的に結合し、不活性型リーリンに対しては結合しない。

【００２１】

（２）配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列を有するペプチドに対して特異的に結合する。

【００２２】

上記の第４発明において、「配列表の配列番号２又は３に示すアミノ酸配列に対して１～数個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列」の好ましい例として、アミノ酸の同類置換を挙げることができる。「同類置換」とは、ポリペプチドの機能が全体的に実質的に不変のまま維持されるように、所定のアミノ酸残基を化学的又は機能的に類似した別のアミノ酸残基で置換することを言う。化学的又は機能的に類似したアミノ酸の例示として、疎水性アミノ酸（Ala、Ile、Leu、Phe、Pro、Trp、Val、Met）同士、極性だが電荷のないアミノ酸（Asn、Cys、Gln、Gly、Ser、Thr、Tyr）同士、塩基性アミノ酸（Arg、His、Lys）同士、酸性アミノ酸（Asp、Glu）同士、等が挙げられる（E.E.Cornnら著、田宮信雄ら訳、「コーン・スタンプ生化学　第５版」東京化学同人刊、p56-58、1988）。

【００２３】

（第５発明の構成）

上記課題を解決するための第５発明の構成は、配列表の配列番号４～６に示すアミノ酸配列からなるＣＤＲ配列の全てを含むＨ鎖可変領域と、配列表の配列番号７～９に示すアミノ酸配列からなるＣＤＲ配列の全てを含むＬ鎖可変領域とを有するポリペプチドからなる抗体である、抗活性型リーリン抗体である。

【００２４】

上記の第５発明において、「（～ＣＤＲ配列の全てを）含む」とは、当該ＣＤＲ配列の全てを一部に含むことを意味する。本願明細書の以下の記載においても、特定のアミノ酸配列又は塩基配列について「含む」と言うときは、同上の意味である。

【００２５】

（第６発明の構成）

上記課題を解決するための第６発明の構成は、以下（３）～（８）のいずれかに該当する、核酸である。

【００２６】

（３）配列表の配列番号４に示すアミノ酸配列をコードする核酸。

【００２７】

（４）配列表の配列番号５に示すアミノ酸配列をコードする核酸。

【００２８】

（５）配列表の配列番号６に示すアミノ酸配列をコードする核酸。
【００２９】
（６）配列表の配列番号７に示すアミノ酸配列をコードする核酸。
【００３０】
（７）配列表の配列番号８に示すアミノ酸配列をコードする核酸。
【００３１】
（８）配列表の配列番号９に示すアミノ酸配列をコードする核酸。
【００３２】
上記の第６発明において、配列番号４～９に示すアミノ酸配列をそれぞれコードする核酸は、第５発明に規定した６種のＣＤＲ配列をコードする核酸である。又、「核酸」とはセンス／アンチセンスＤＮＡ又はＲＮＡや、ハイブリダイゼーション用プローブ、ＰＣＲ用プライマー、融合遺伝子作製時における鋳型等を含む概念であり、１本鎖、２本鎖又は３本鎖のものを包含する。
【００３３】
（第７発明の構成）
上記課題を解決するための第７発明の構成は、第６発明に記載した（３）～（８）の全ての塩基配列を含み、第１発明～第５発明のいずれかに記載の抗活性型リーリン抗体をコードする、核酸である。
【００３４】
上記の第７発明において、「核酸」とは、センス／アンチセンスＤＮＡ又はＲＮＡを含む概念である。
【００３５】
（第８発明の構成）
上記課題を解決するための８発明の構成は、哺乳動物のミエローマ細胞と、配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列を有するペプチドで免疫された哺乳動物の脾細胞との融合によって作製され、第１発明～第５発明のいずれかに記載の抗活性型リーリン抗体を生産する、ハイブリドーマ細胞である。
【００３６】
上記の第８発明に係るハイブリドーマ細胞は、免疫すべきペプチドのアミノ酸配列が開示された状況下においては、専門家であれば技術常識に基づいて作製することが可能である。従って、第８発明に係るハイブリドーマ細胞については、いわゆる特許寄託を要しない。
【００３７】
（第９発明の構成）
上記課題を解決するための第９発明の構成は、第１発明～第５発明のいずれかに記載の抗活性型リーリン抗体を用いた抗原－抗体反応により、被験試料中の活性型リーリンを測定する、活性型リーリン測定方法である。
【００３８】
（第１０発明の構成）
上記課題を解決するための第１０発明の構成は、第１発明～第５発明のいずれかに記載の抗活性型リーリン抗体を含んで構成され、被験試料中の活性型リーリンを測定するために用いるものである、活性型リーリン測定用キットである。
【発明の効果】
【００３９】
第１発明の抗活性型リーリン抗体は、活性型リーリンに対して特異的に結合し不活性型リーリンに対しては結合しないため、この抗体を用いて、被験試料中の不活性型リーリンを検出することなく活性型リーリンのみを選択的に測定することができる。そのため、大量のサンプルについても、例えばマルチウエルプレートを用いて、簡便、迅速に活性型リーリンを選択的に測定することが可能になった。
【００４０】

第２発明に関して、配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列は、従来は未解明であったリーリンタンパク質のN-t siteの分解部位の両側の各４個のアミノ酸配列であるため、第２発明の抗活性型リーリン抗体は、N-t siteでの分解を受けた不活性型リーリンに対しては結合せず、このサイトでの分解を受けていないN-t site非分解型リーリンに対して特異的に結合する。

【００４１】

N-t site非分解型リーリンは活性型であり、これには全長リーリンとC-t siteでの分子内分解のみを受けた分解型リーリンとが包含される。なお、前記のようにリーリンの分子内分解の大部分はN-t siteで起こり、C-t siteで起こる分解は比較的少ないため、C-t siteでの分子内分解のみを受けた分解型リーリンの存在は、測定誤差の範囲内として事実上無視することも可能である。

【００４２】

第３発明には、本発明に係る抗活性型リーリン抗体のＨ鎖可変領域とＬ鎖可変領域が規定されている。従って第３発明の抗活性型リーリン抗体も、第２発明の抗活性型リーリン抗体と同様の作用・効果を期待できる。

【００４３】

第４発明によって、第３発明の抗活性型リーリン抗体と機能が同等で、そのＨ鎖可変領域及びＬ鎖可変領域のアミノ酸配列において抗体機能に影響しない僅かな「配列の変更」を伴う抗活性型リーリン抗体が提供される。

【００４４】

第５発明には、本発明に係る抗活性型リーリン抗体のＨ鎖可変領域におけるＣＤＲ配列の全てとＬ鎖可変領域におけるＣＤＲ配列の全てが規定されている。従って第５発明の抗活性型リーリン抗体も、第２発明の抗活性型リーリン抗体と同様の作用・効果を期待できる。

【００４５】

第６発明及び第７発明に係るそれぞれの核酸、第８発明に係るハイブリドーマ細胞は、いずれも、本発明に係る抗活性型リーリン抗体の生産手段あるいは研究手段として極めて有用である。

【００４６】

第９発明によって、大量のサンプルについても、簡便、迅速に、不活性型リーリンを検出することなく活性型リーリンのみを選択的に測定することができる活性型リーリン測定方法が提供される。

【００４７】

第１０発明によって、第９発明の活性型リーリン測定方法を有効に実施するための活性型リーリン測定用キットが提供される。

【図面の簡単な説明】

【００４８】

【図１】全長リーリンと分解型リーリンを図案化して示す。

【図２】抗活性型リーリン抗体の評価結果を示すwestern blottingの図である。

【発明を実施するための形態】

【００４９】

次に本発明の実施形態を、その最良の形態を含めて説明する。

【００５０】

〔抗活性型リーリン抗体〕

本発明に係る抗活性型リーリン抗体は以下の１）～５）のいずれかに該当する抗体である。なお、リーリンタンパク質自体は周知であるため、本明細書では、そのアミノ酸配列等の説明を省略する。

【００５１】

１）活性型リーリンに対して特異的に結合し、不活性型リーリンに対しては結合しない抗体である

２）配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列を有するペプチドに対して特異的に結合する抗体である。

【００５２】

３）配列表の配列番号２に示すアミノ酸配列を有するＨ鎖可変領域と、配列表の配列番号３に示すアミノ酸配列を有するＬ鎖可変領域とを有するポリペプチドからなる抗体である。

【００５３】

４）配列表の配列番号２に示すアミノ酸配列に対して１～数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を有するＨ鎖可変領域と、配列表の配列番号３に示すアミノ酸配列に対して１～数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列を有するＬ鎖可変領域とを有するポリペプチドからなり、（１）活性型リーリンに対して特異的に結合し、不活性型リーリンに対しては結合しない、（２）配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列を有するペプチドに対して特異的に結合する、の少なくとも一方に該当する抗体である。

【００５４】

５）配列表の配列番号４～６に示すアミノ酸配列からなるＣＤＲ配列の全てを含むＨ鎖可変領域と、配列表の配列番号７～９に示すアミノ酸配列からなるＣＤＲ配列の全てを含むＬ鎖可変領域とを有するポリペプチドからなる抗体である。

【００５５】

上記の各種抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体が包含されるが、特にモノクローナル抗体が好ましい。更に、これらの抗体には、検出・測定の目的のためにペルオキシダーゼ、β－Ｄ－ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコース－６－リン酸脱水素酵素等の酵素、デルフィニウム等の蛍光標識、放射性同位元素標識または同位元素標識、ビオチン等を結合させた標識化抗活性型リーリン抗体も包含される。

【００５６】

〔核酸〕

本発明に係る核酸としては、上記した配列番号４～６に示すアミノ酸配列からなるＣＤＲ配列、配列番号７～９に示すアミノ酸配列からなるＣＤＲ配列をそれぞれコードする、以下（３）～（８）のいずれかに該当する核酸が挙げられる。

【００５７】

（３）配列表の配列番号４に示すアミノ酸配列をコードする核酸。

【００５８】

（４）配列表の配列番号５に示すアミノ酸配列をコードする核酸。

【００５９】

（５）配列表の配列番号６に示すアミノ酸配列をコードする核酸。

【００６０】

（６）配列表の配列番号７に示すアミノ酸配列をコードする核酸。

【００６１】

（７）配列表の配列番号８に示すアミノ酸配列をコードする核酸。

【００６２】

（８）配列表の配列番号９に示すアミノ酸配列をコードする核酸。

【００６３】

更に本発明に係る核酸としては、上記した（３）～（８）の全ての塩基配列を含み、前記のいずれかに記載した抗活性型リーリン抗体をコードする核酸も挙げられる。

【００６４】

これらの核酸には、上記に直接に規定するものの他、これらの核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、これらの核酸と同等の機能を示す核酸が含まれる。

【００６５】

ここに「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、コロニーハイブリダイゼーション法，プラークハイブリダイゼーション法又はサザンブロットハイブリダイゼ

ーション法等の適宜なハイブリダイゼーション法において、以下の条件下で一方のポリヌクレオチド（ＤＮＡ）又は該ポリヌクレオチドの断片に対し他方のポリヌクレオチド（ＤＮＡ）がハイブリダイズできることを言う。

【００６６】

即ち、フィルターに固定化された一方のポリヌクレオチド又は該ポリヌクレオチドの断片に対し、０．７～１ＭのＮａＣｌの存在下、所定温度（Ｘ°Ｃ）下で他方のポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを行った後、０．１～２倍程度のＳＳＣ溶液（１倍濃度のＳＳＣ溶液の組成は、１５０ｍＭ塩化ナトリウム，１５ｍＭクエン酸ナトリウムよりなる）を用いてＸ°Ｃの条件下でフィルターを洗浄した場合に、他方のポリヌクレオチドを同定できることを言う。そして上記の「Ｘ°Ｃ」とは、少なくとも５０°Ｃ以上であり、より好ましくは６０°Ｃ以上であり、更に好ましくは６５°Ｃ以上である。

【００６７】

〔ハイブリドーマ細胞〕

細胞融合によりハイブリドーマ細胞を構成すべきミエローマ細胞と、配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列を有するペプチドで免疫された脾細胞としては、ヒトを除く哺乳動物の細胞を用いることができる。哺乳動物としてはこの種の目的に常用されるサル，ラット，マウス等の哺乳動物が好ましい。ミエローマ細胞の系が確立され、扱い易いと言う理由から特にマウスが好ましい。

【００６８】

又、リーリンは血中をはじめ体内のいたるところに存在するため、普通の（正常な）マウスにリーリン由来のペプチドを免疫しても、「自己抗体」と認識されて排除されてしまう可能性が非常に高い。そこで、例えば、米国のJackson Lab.社が提供している「リーリン欠損マウス」の使用がとりわけ好ましい。

【００６９】

配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列を有するペプチドで免疫された脾細胞を取得する方法、細胞融合によりハイブリドーマ細胞を取得する方法、ハイブリドーマ細胞を培養する方法、その培地から抗活性型リーリン抗体（モノクローナル抗体）を取得する方法等については、公知の各種の方法を任意に採用することができる。

【００７０】

〔活性型リーリン測定方法〕

本発明の活性型リーリン測定方法は、上記いずれかの抗活性型リーリン抗体を用いた抗原－抗体反応により、被験試料中の活性型リーリンを測定する方法である。その具体的な実施形態としては、この種の抗原－抗体反応を利用する公知の各種の方法を任意に採用することができ、特段に限定されない。

【００７１】

被験試料としては、ヒト、哺乳動物、又はリーリン欠損症等に好適な表現型を示すモデル動物等から採取した血液その他の体液、これらの体液から調製した組成物（例えば、ｐＨ緩衝液による希釈物等）、あるいはこれらの凍結乾燥物等を任意に利用することができる。

【００７２】

〔活性型リーリン測定用キット〕

本発明の活性型リーリン測定用キットは、上記いずれかの抗活性型リーリン抗体を含んで構成され、被験試料中の活性型リーリンを測定するために用いるものである。

【００７３】

この測定用キットは、この種のキットが備えることがある必要又は有益な他の任意の構成要素、例えば希釈用の緩衝液その他の構成要素を備えることができる。

【実施例】

【００７４】

次に本発明の実施例を説明する。本発明の技術的範囲は以下の実施例によって限定されない。

【００７５】
（免疫）
配列表の配列番号１に示すアミノ酸配列を有するペプチドである抗原ペプチドの溶液（0.8mg/mL）200μLを、等量のフロイントアジュバントと氷上でSONIFIER250を用いてエッペンドルフチューブ内にて１分間超音波処理（output 15%、Duty Cycle 20%）を行い、エマルジョンとした。
【００７６】
このエマルジョンを別の注射器に１ｍＬ取り、投与抗原量が40μｇとなるように、雌10週齢リーラーマウスの腹腔内に注射した。この操作を２週間毎に２回行い、ＥＬＩＳＡ法により抗体生産を確認した後、同マウスの腹腔内に抗原注射を行った。
【００７７】
（細胞の調製）
免疫終了後のマウス脾細胞を取り出し、1 wellあたり3 mLのDMEMが入ったNet wellで5 mLのピストンを用いて細胞をほぐした。Net wellの下層を15mL tubeに移した後、各wellを等量のDMEMでwashして15mL tubeに移した。300ｇで10分間遠心分離した後、上清を捨て、10 mLのDMEMを加えサスペンドした。この操作を3回繰り返した後、細胞数をカウントした。
【００７８】
ミエローマ細胞については、３７℃、５％ CO_2存在下、10cm dish内で培養していたミエローマ細胞（PAI細胞）をサスペンドして50 mL tubeに回収した。その後、1000 rpmで５分間遠心分離し上清を捨て、DMEM 10 mLを加え、細胞数をカウントした。
【００７９】
（ハイブリドーマの作製）
上記により調製された脾細胞とミエローマ細胞とを、１０：１の細胞数割合で混合した後、1000 rpmで10分間遠心分離した後、上清を捨てPEG（polyethylene glycol 1500）をtubeの壁をつたわらせながら30秒かけて加えた。その後、3 mLのDMEMを30秒かけて加えた。その後FCSを30秒かけて加え1000 rpmで５分間遠心分離した。上清を捨ていわゆるHAT培地を20ml添加し1000 rpmで５分間遠心分離し上清を捨てた。その後、それぞれ5.0×10^5cells/wellおよび2.5×10^5cells/wellになるように適量のHAT培地を加えサスペンドした。サスペンド後、あらかじめ100μL/wellのHAT培地を入れ、37℃、５％、CO_2存在下に反応させておいた96well plate に、100μL/wellで播種した。
【００８０】
培養7日後、培養上清を50μl回収し抗原ペプチドを抗原としたＥＬＩＳＡ法により抗体価を測定した。その結果を表1に示す。表１において、「5.0×10＾5cells/well」と表記したテーブルは上記の5.0×10^5 cells/wellとした群を示し、「2.5×10＾5cells/well」と表記したテーブルは上記の2.5×10^5 cells/wellとした群を示す。また、表１中の縦方向の「Ａ」～「Ｈ」の区分は96well plateの「Ａ」～「Ｈ」を示し、横方向の「１」～「１２」の区分は96well plateの「１」～「１２」を示す。これらの内、Ｈ１２ではポジティブコントロールとして免疫終了後のマウスの血清を用いた。
【００８１】

【表１】

5.0×10^5cells/well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.172	0.275	0.262	0.110	0.144	0.804	0.140	0.270	0.122	0.172	0.609	0.407
B	0.684	0.546	0.158	0.112	0.128	0.115	0.350	0.582	0.131	0.114	0.153	0.158
C	0.361	0.134	0.163	0.152	0.551	0.481	0.344	0.120	0.665	0.631	0.116	0.106
D	0.141	0.312	0.157	0.336	0.191	0.827	0.117	0.165	0.395	0.318	0.131	0.132
E	0.135	0.711	0.331	0.138	0.281	0.120	0.290	0.115	0.123	0.340	0.206	0.626
F	0.122	0.321	0.290	0.352	0.221	0.174	0.133	0.494	0.138	0.275	0.499	0.373
G	0.151	0.148	0.218	0.112	0.246	0.711	0.623	0.103	0.405	0.195	0.111	0.406
H	0.138	0.130	0.131	0.564	0.360	0.147	0.128	0.484	0.251	0.089	0.156	0.680

2.5×10^5cells/well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.578	0.706	0.159	0.742	0.077	0.084	0.079	0.089	0.666	0.078	0.074	0.139
B	0.075	0.096	0.658	0.377	0.149	0.792	0.063	0.104	0.103	0.577	0.102	0.336
C	0.756	0.498	0.113	0.081	0.637	0.443	0.103	0.101	0.730	0.088	0.122	0.374
D	0.106	0.444	0.141	0.101	0.876	0.436	0.092	0.099	0.459	0.448	0.086	0.415
E	0.631	0.084	0.076	0.077	0.069	0.072	0.202	0.795	0.085	0.336	0.075	0.089
F	0.092	0.062	0.425	0.101	0.080	0.082	0.078	0.102	0.595	0.076	0.095	0.117
G	0.088	0.099	0.092	0.081	0.310	0.069	0.088	0.065	0.074	0.073	0.106	0.274
H	0.560	0.063	0.531	0.065	0.060	0.087	0.182	0.081	0.074	0.066	0.066	0.789

70～80％コンフルエント状態のHEK293T細胞（10cm dishで培養）の培地をOpti-MEM（Invitrogen）に置換し、pCrl（pcDNA3にリーリンのcDNA全長を挿入したベクター）15μgと30μLのLipofectamine 2000（Invitrogen）を用いてトランスフェクションを行った。5時間後、50 Units/mL

Penicillin + 50 mg/mL Streptomycinを含むOpti-MEMに培地を交換し、37℃、5%CO_2存在下で培養した。48h後に0.45μm滅菌フィルターおよび、5mLシリンジを用いて上清を回収し、上清と4×SDS sumpling bufferを3：1で混合しサンプル化した。

【００８２】

サンプルを1レーンあたり30μL注ぎ、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）により分離し、セミドライ式転写機（Trans-blot SD cell、Bio-Red）を用いてPVDF膜（Millipore）に転写した。転写後のPVDF膜は5%スキムミルク（森永乳業）in TBSTで30分間ブロッキングを行った。ブロッキング後、PVDF膜と、表１で抗体価が０．４００以上と比較的高かった各クローンから得られた抗体とを室温で2時間インキュベートした。その後、PVDF膜をTBSTで5分間×4回洗浄し、HRP標識された二次抗体を含む5%スキムミルク in TBSTを室温で1時間インキュベートした。そして、PVDF膜をTBSTで5分間×4回洗浄し、Immobilon Western Chemiluminescent HRP
Substrate（Millipore）を用い可視化し、LAS4000（GE Healthcare）にて発光を検出した。その結果、特に活性型リーリンと特異的に結合したのが、表１の「2.5 cells/well」と表記したテーブル中の「Ｆ３」のクローンである。このクローンを「2F3株」と名付けた。

（マウスハイブリドーマ細胞からのｍＲＮＡの抽出）

培養されたハイブリドーマ細胞2F3株の細胞4.2×１０^{6}個から、ｍＲＮＡ精製用の RNeasy Protect Mini Kit（QIAGEN社）を用いて、ｍＲＮＡの抽出を行った。細胞をRLTバッファー350μLに溶解しシリンジ内でホモジナイズした後、等量の70%エタノールを添加したその後、RNeasyスピンカラムに移して10400 rpmで１５秒間遠心分離し、その下層の液を除去した。RW1バッファー700μLをRNeasyスピンカラムに添加し、10400 rpmで１５秒間遠心分離し、その下層の液を除去した。その後、RPEバッファー500μLをRNeasyスピンカラムに添加し、10400 rpmで１５秒間遠心分離し、その下層の液を除去するという操作を2回繰り返した。そして、ＲNase freeの滅菌水を50μL RNeasyスピンカラムに添加し、10400 rpmで１分間遠心分離しｍＲＮＡを溶出した。その結果、43.4μｇのｍＲＮＡを取得した。

【００８３】

（ｃＤＮＡの合成）

上記のように取得したハイブリドーマ細胞2F3株のｍＲＮＡから、ｃＤＮＡ合成用のPrimeScript Reverse
Transcriptae（タカラバイオ株式会社）を用いてｃＤＮＡの合成を行った。Oligo-ｄＴプライマー１μL,ｄＮＴＰ（2.5mM）４μL，上記2F3株のｍＲＮＡ4.3μｇを混合後、65℃５分間保温後氷上で急冷した。その後、反応液５×バッファー４μL，ＲNase 阻害剤０．５μL，ＡＭＶ（Avian Myeloblastosis Virus）由来の逆転写酵素（５Ｕ／μL）１μLを加え、ＲNase freeの滅菌水により２０μLとした。

【００８４】

上記反応液の作製後、４２℃で６０分間伸長反応を行い、７０℃，１５分間で酵素を失活させた後、氷上で５分間冷した。

【００８５】

（ＰＣＲ法による抗体遺伝子の増幅）

抗体遺伝子の可変領域は、Ｈ鎖，Ｌ鎖共にＮ末端、Ｃ末端にそれぞれ相同性を保持していることが知られている。そこで、この相同性を基にＰＣＲプライマーの設計を行った。ＰＣＲプライマーの塩基配列は、Ｈ鎖Ｎ末端が配列表の配列番号１０、Ｈ鎖Ｃ末端が配列表の配列番号１１、Ｌ鎖Ｎ末端が配列表の配列番号１２、Ｌ鎖Ｃ末端が配列表の配列番号１３に、それぞれ示す通りのものとした。これらのＰＣＲプライマーを用いて、日本バイオラッドラボラトリーズ社製のＰＣＲ装置を利用して、ＰＣＲ法によりＨ鎖，Ｌ鎖の遺伝子増幅を行った。

【００８６】

反応液は、Ｈ鎖，Ｌ鎖のいずれについても、上記でｃＤＮＡを合成した反応液を鋳型として１μL、上記Ｈ鎖又はＬ鎖のＮ末端及びＣ末端プライマーを各20 ｐmol、１０×ＰＣ

Ｒバッファー（タカラバイオ社製）を５μL，2.5mMのｄＮＴＰを３μL，ＤＮＡ合成酵素
Ex Taq（タカラバイオ社製）を0.5μL用い、これらに滅菌水を加えて５０μLとした。
【００８７】
ＰＣＲ法の条件は、解離反応を９４℃で１分、アニーリング反応を４５℃で１分、伸長反応を７２℃で２分とし、これらを３０サイクル行った。
【００８８】
こうして得られたＰＣＲ反応液の電気泳動を行った処、目的の位置約３５０ bp にバンドを確認することができた。
【００８９】
（抗体遺伝子のクローニング）
ＰＣＲ法により増幅したＨ鎖，Ｌ鎖の遺伝子をそれぞれpGEM-T Easyベクター（Promega社製）に挿入し、クローニングした。
【００９０】
（抗体遺伝子の塩基配列決定）
クローニングした株を、ＰＣＲ後目的の遺伝子が増幅されることを指標としてコロニーＰＣＲにより選択した後、それらの株からプラスミドを抽出し、塩基配列の決定を行った。
【００９１】
その結果、Ｈ鎖可変領域は配列表の配列番号２に示す504塩基（168アミノ酸）、Ｌ鎖可変領域は配列表の配列番号３に示す390塩基（130アミノ酸）で構成されていることが推定された。又、相同領域の配列及び分子量から、ｃＤＮＡのこれらの塩基配列はIgGモノクローナル抗体のＨ鎖，Ｌ鎖をコードしていると判断された。
【００９２】
なお、配列番号２の塩基配列における塩基番号163～183（H1領域）、塩基番号226～273（H2領域）、塩基番号370～381（H3領域）、及び、配列番号３の塩基配列における塩基番号94～144（L1領域）、塩基番号190～210（L2領域）、塩基番号307～333（L3領域）の各領域は、前記Ｋａｂａｔのデータベースの超可変領域に相当する部分であり、抗原との結合を決定付ける領域を示す。
【００９３】
（抗体の評価）
実験方法
70～80％コンフルエント状態のHEK293T細胞（35 mm dishで培養）の培地をOpti-MEM（Invitrogen）に置換し、pCrl（pcDNA3にリーリンのcDNA全長を挿入したベクター）2.5μgと5μLのLipofectamine 2000（Invitrogen）を用いてトランスフェクションを行った。5時間後、50 Units/mL
Penicillin + 50 mg/mL Streptomycinを含むOpti-MEMに培地を交換し、37℃、5％CO_2存在下で培養した。48h後に0.45μm滅菌フィルターおよび、5mLシリンジを用いて上清を回収し、上清と4×SDS sumpling bufferを3：1で混合しサンプル化した。
【００９４】
サンプルを1レーンあたり30μL注ぎ、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）により分離し、セミドライ式転写機（Trans-blot SD cell、Bio-Red）を用いてPVDF膜（Millipore）に転写した。転写後のPVDF膜は5％スキムミルク（森永乳業）in TBSTで30分間ブロッキングを行った。ブロッキング後、PVDF膜と一次抗体を含む5％スキムミルク in TBSTとを室温で2時間インキュベートした。その後、PVDF膜をTBSTで5分間×4回洗浄し、HRP標識された二次抗体を含む5％スキムミルク in TBSTを室温で1時間インキュベートした。そして、PVDF膜をTBSTで5分間×4回洗浄し、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate（Millipore）を用い可視化し、LAS4000（GE Healthcare）にて発光を検出した。
【００９５】

抗体

一次抗体として、市販のマウス抗リーリンN末端認識モノクローナル抗体 G10（1:3000 Millipore）と、2F3株から得られた抗体（2F3抗体）を用いた。又、二次抗体としてAnti-mouse IgG HRP-linked antibody（1:4000、GE Healthcare）を用いた。

【００９６】

結果

評価の結果を述べる前に、図１に基づいて簡単な説明を行う。図１の上段には図案化された全長リーリンと、そのN-t site及びC-t siteが示されている。図１の中段に示す「ＮＲ６」とは、全長リーリンがC-t siteで切断された場合におけるアミノ末端側の断片であり、図１の下段に示す「ＮＲ２」とは、全長リーリンがN-t siteで切断された場合におけるアミノ末端側の断片である。従って、全長リーリン、ＮＲ２断片及びＮＲ６断片の全てを認識する抗体は、活性型リーリンと不活性リーリンとを区別なく認識する抗体である。これに対して、全長リーリンとＮＲ６断片を認識するが、ＮＲ２断片を認識しない抗体は、活性型リーリンのみを認識する抗体である。

【００９７】

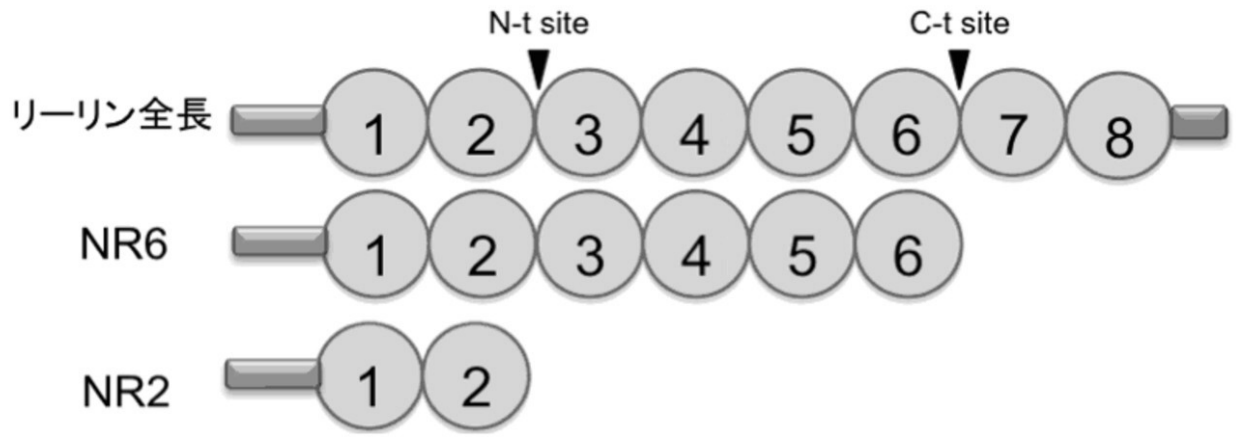
上記の評価の結果、図２に示すように、G10抗体ではNR2のバンドが検出できるのに対し、2F3抗体ではNR2バンドは検出されなかった。このことから、2F3抗体はN-t siteで分解がおきていないリーリン、即ち活性型リーリンのみを認識すると考えられる。

【産業上の利用可能性】

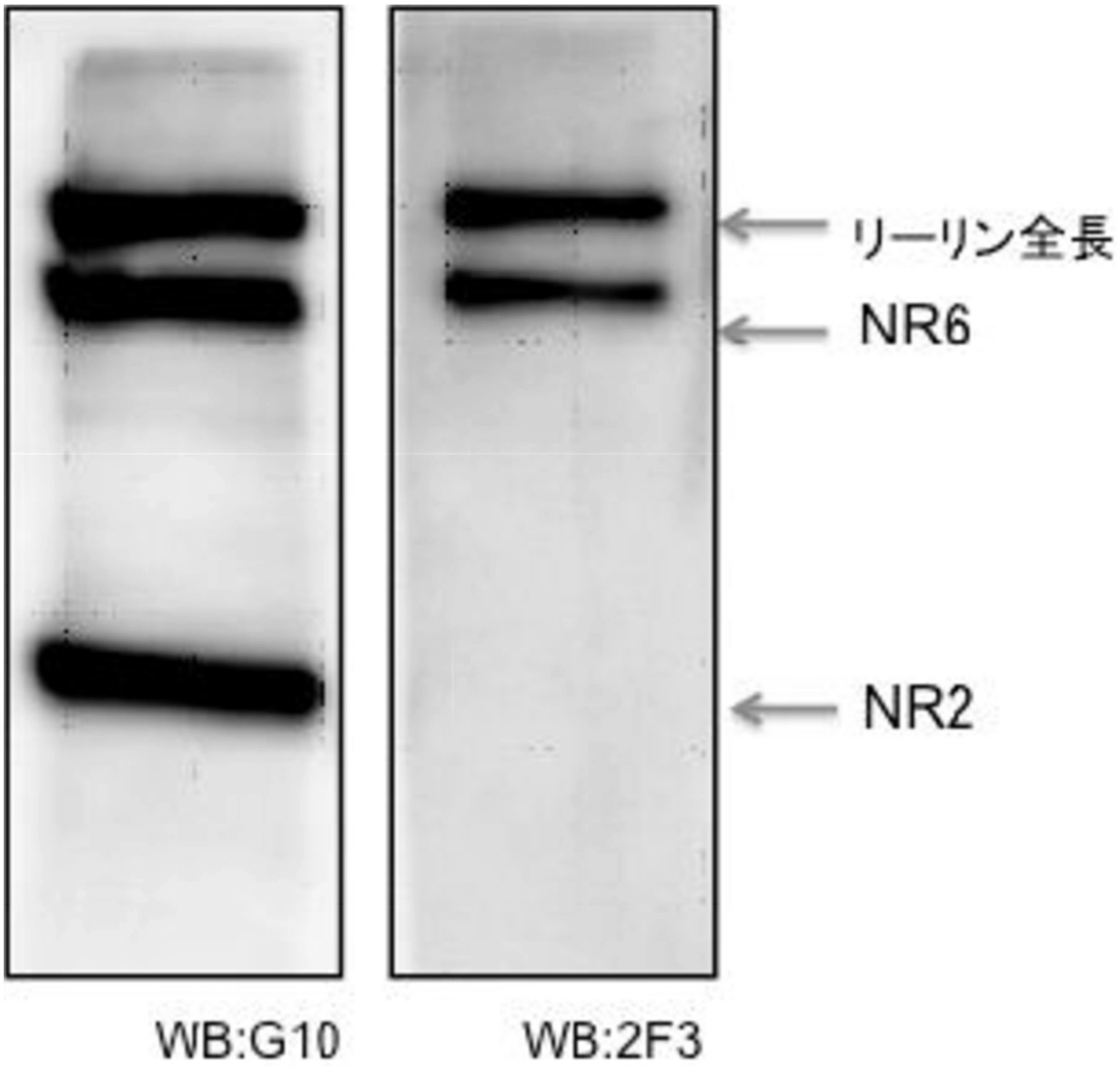
【００９８】

本発明により、大量のサンプルであっても簡便、迅速に活性型リーリンを選択的に測定できる手段が提供される。

【図１】



【図２】



【配列表】

2014204669000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　鯉江　真利
愛知県名古屋市瑞穂区田辺通３－１　公立大学法人名古屋市立大学　大学院薬学研究科内
(72)発明者　久永　有紗
愛知県名古屋市瑞穂区田辺通３－１　公立大学法人名古屋市立大学　大学院薬学研究科内

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 BA53 CA04 CA20 DA02 EA04 GA13 HA14 HA15
4B065 AA93X AB01 AC14 BA02 BA05 BB37 BC02 BC07 CA25 CA46
4H045 AA11 DA76 EA50 FA74