

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3887154号
(P3887154)

(45) 発行日 平成19年2月28日(2007.2.28)

(24) 登録日 平成18年12月1日(2006.12.1)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 R 1/91 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
請求項の数 3 (全 7 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2000-272199 (P2000-272199)	(73) 特許権者	591038945
(22) 出願日	平成12年9月7日(2000.9.7)		村松 喬
(65) 公開番号	特開2002-85058 (P2002-85058A)		愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石2845-161
(43) 公開日	平成14年3月26日(2002.3.26)	(74) 代理人	100102978
審査請求日	平成16年11月5日(2004.11.5)		弁理士 清水 初志
		(72) 発明者	門松 健治
			愛知県名古屋市天白区中平5-1905
			ライオンズマンション中平101
		(72) 発明者	村松 寿子
			愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石2845-161
		(72) 発明者	村松 喬
			愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石2845-161
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトMKに対するモノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ミッドカイン遺伝子をノックアウトしたマウスを、ヒトミッドカインまたは該ヒトミッドカインと同等のヘパリン結合能、神経突起伸長能、および/または線溶系活性化能を有するヒトミッドカイン断片で免疫し、前記免疫マウスから得られる脾細胞と、ミエローマ細胞とを細胞融合し、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選択し、選択したハイブリドーマを増殖させ、産生するモノクローナル抗体を採取することを特徴とする、抗ヒトミッドカイン・マウスモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項2】

請求項1に記載の方法により製造された抗体。

10

【請求項3】

請求項2に記載の抗ミッドカイン・モノクローナル抗体から得られる抗体断片であって、ヒトミッドカインと特異的に結合する抗ミッドカイン・モノクローナル抗体断片。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、ヒトミッドカインに特異的に結合するモノクローナル抗体、およびその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

20

ミッドカイン (midkine: MK) は、胚性腫瘍細胞 (EC) のレチノイン酸による分化誘導の過程で一過性に発現する遺伝子の産物として発見された増殖・分化因子で、塩基性アミノ酸とシテインに富む分子量 13 kDa のポリペプチドである (Kadomatsu, K. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 151: 1312-1318; Tomomura, M. et al.: J. Biol. Chem., 265: 10765-10770, 1990)。MK はヒトからアフリカツメガエルまで見出されているが、種間でのタンパク質の保存度は高く、ヒトとマウスの MK では、アミノ酸配列において、87% の相同性がある。MK は、様々な生物活性を有する。すなわち、神経突起の伸長、神経細胞の生存を促進し、神経系の構築に関与すると考えられる。損傷時の組織、多くのヒト癌、そしてアルツハイマー病の老人斑にも発現され、組織の修復、線溶系活性化能、そして病態の関連でも注目される。

このようなヒト MK (単に「MK」と称することもある) の生物活性や疾病の過程での MK の関与の可能性から、MK を高感度に測定する測定系の開発が望まれている。MK のような抗原を定量的に測定する方法として、酵素免疫測定法 (EIA) は最も適切であると考えられる。EIA による抗原の測定系で、ヘテロジニアス非競合法 (サンドイッチ法) は最もよく使用されている測定システムである。この方法は、固相上に不溶化した抗体、測定すべき抗原、酵素標識抗体の 3 者からなる免疫複合体を固相上に形成させ、固相上の酵素活性を測定して、測定すべき抗原の量を知る方法である。

【0003】

MK を測定するため EIA として、1 - ステップサンドイッチ法が提案されている (特開平 10-160735)。この方法は、固相化抗体及び標識抗体共に、異なる動物 (ウサギとニワトリ) 由来のポリクローナル抗体を用いている。ポリクローナル抗体は高いアビディティを有するが、免疫原に混在する目的外の生体分子との交差反応が問題となる場合が多く、一定の品質の抗体を無限に供給することはできない。一方、モノクローナル抗体は、抗原の一部の特定のエピトープ部位を認識することから、特異性が高く、一定の品質の抗体を無限に供給することができる。そこで、ヒト MK を測定するための 1 - ステップサンドイッチ法に用いる抗体の組み合わせを、ポリクローナル抗体 - ポリクローナル抗体の組み合わせから、ポリクローナル抗体 - モノクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体 - モノクローナル抗体などに変更することが望まれている。しかしながら、これまで MK を特異的に認識するモノクローナル抗体の作成が試みられたが、抗ヒト MK モノクローナル抗体は得られていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ヒト MK を特異的に認識するモノクローナル抗体を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

免疫原が動物由来の生物活性物質である場合は、被免疫動物も同様の生物活性をもっており、化学構造には相同性をもつ部分が多く、種特異的構造の部分は少ないこともありうるので、免疫動物の選択は難しい。

MK の場合、上記したように種間でのタンパク質の保存度は高く、ヒトとマウスの MK では、アミノ酸配列において 87% の相同性がある。このようなことから、ヒト MK タンパク質を免疫原として、マウスに免疫した場合、マウスの方で外来の異種タンパク質として認識する程度が低下することが考えられる。実際に、これまで、マウスを免疫動物として用いて抗ヒト MK モノクローナル抗体が作製されたという報告はない。

本発明者らは、MK 遺伝子をノックアウトした複数のラインのマウスを免疫動物として用いた。マウスについて性別、週齢を検討し、免疫方法について、免疫量、注射部位 (皮下、皮内、筋肉内、静脈内、腹腔内、リンパ節内、フットパッド内)、投与間隔などを検討し、抗体価の高いマウス抗ヒト MK モノクローナル抗体を作製することができた。

【0006】

すなわち、本発明は、ヒトミッドカインと特異的に結合する抗ミッドカイン・モノクロー

10

20

30

40

50

ナル抗体を提供する。

また、ミッドカイン遺伝子をノックアウトしたマウスを、ヒトミッドカインまたは該ヒトミッドカインと同様の生物活性を有するヒトミッドカイン断片で免疫し、前記免疫マウスから得られる脾細胞と、ミエローム細胞とを細胞融合し、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選択し、選択したハイブリドーマを増殖させ、産生するモノクローナル抗体を採取することを特徴とする、抗ヒトミッドカイン・マウスモノクローナル抗体の製造方法も提供する。

【 0 0 0 7 】

【 発明の実施の形態 】

1. MK 遺伝子ノックアウトマウスの作製

相同組換えによる遺伝子破壊の技術は、もはや確立されたものとして、多数の遺伝子に対して試みられるようになってきている。特に、胚性幹細胞（ES細胞）の特定の遺伝子を破壊（ノックアウト）し、その後、その細胞を胚盤胞に注入してキメラマウスを作製する手段は、ねらった遺伝子の突然変異マウスを作製しその機能を探ることができるという意味で非常に有用である。今日では新規の遺伝子を単離したら、まずノックアウトマウスを作製してみることが当然の研究手法となっている。

ヒトMKの遺伝子は既にクローニングされている（Uehara, K. et al.: J. Biochem., 111: 563-567, 1992）。そしてMK遺伝子をノックアウトしたマウスについては、129/Sv系マウスのエクソン2の一部とエクソン3の一部を破壊したノックアウトマウスが既に作製されている（Nakamura, E. et al.: Genes to Cells, 3: 811-822, 1998）。このMK遺伝子ノックアウトマウスは、胎生期に、致命的とはならず、ヘテロ接合体、あるいは野生型に比して、有意に体重が少ない。マウスの系統によって、ES細胞株の樹立が容易な系統と、そうでない系統とがある。129系からはフィーダー細胞がなくても容易に樹立が可能である。

さまざまな遺伝子をノックアウトしたマウス作製に関連する技術に関しては、数多く報告（例えば、Mansor, S.L. et al.: Nature, 336: 348-352, 1988; Joyner, A., ed.: Gene targeting, IRL Press, 1993; 相沢 慎一: ジーンターゲティング ES細胞を用いた変異マウスの作成. 洋土社, 1995）がなされており、また、ヒトMK遺伝子は文献公知であるので、当業者であれば、これらの文献を参考にして、容易にMK遺伝子ノックアウトマウスを作製することができる。

【 0 0 0 8 】

2. マウス抗ヒトMKモノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体に関しては、1975年にケーラーとミルシュタインにより、その作製方法が報告されており、その後、モノクローナル抗体の作製について数多くの文献や実験書が発行されている。しかしながら、一般的にあらゆる抗原に対して、特異性および親和性が高いモノクローナル抗体を得ることは現在でも確立された技術となっていない。

【 0 0 0 9 】

モノクローナル抗体は、一般的には次のような工程で作製される。

1. 抗原の調製
2. 抗原による動物の免疫
3. 細胞融合
4. モノクローナル抗体のスクリーニング
5. 抗体産生細胞の増殖と凍結

本発明の抗ヒトMKモノクローナル抗体作製もこの工程にしたがって作製される。

【 0 0 1 0 】

1. 免疫原の調製

ヒトMKのcDNAはクローニングされている（特開平5-91880）。免疫原のMKタンパク質は、組み換えMKとして調製することができる。例えば、このcDNAをピキア酵母などで発現させた組み換えMKが報告されている（特開平9-95454）。また、化学合成MKも免疫原として試みることもできる。全長MKは化学合成されている（Inui, T. et al

10

20

30

40

50

.: J. Peptide Sci., 2: 28-39, 1996)。本発明においては、ヒトMKと生物活性（ヘパリン結合能、神経突起伸長能、線溶系活性化能）が同等のMK断片、例えばNドメインを欠く短縮型MK（Kaname, T. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 219: 256-260, 1996）断片を免疫原として試みてもよい。このようなMK断片は、十分な免疫原性をもつように、キャリアタンパク質と共有結合させて用いるとよい。

キャリアタンパク質としては、アルブミン（ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、卵白アルブミン）、血清グロブリン分画（ウシガンマグロブリン、ウマ血清グロブリン、ヒツジガンマグロブリン）、チログロブリン（ウシチログロブリン、ブタチログロブリン）、ヘモシアニン（KLH）、合成ポリペプチド（ポリ-L-リジン、ポリグルタミン酸）などが挙げられる。

MK断片をキャリアタンパク質に結合する方法としては、（１）システイン残基のSHを利用する方法（MBS法）、（２）アミノ基を利用する方法（ビスイミドエステル法、グルタルアルデヒド法）、（３）フェノール基を利用する方法（ビス-ジアゾベンゼン法）、（４）カルボキシル基を利用する方法（カルボジイミド法）などが挙げられる。

MKと結合するキャリアタンパク質、及び結合方法の組み合わせをいろいろ試み、最も免疫原性の強い組み合わせを選択することが必要である。このような選択は、当業者であればルーチンの実験により容易に行うことができるので、このようにして選択された組み合わせは本発明に包含される。

【0011】

2. MK抗原によるMKノックアウトマウスの免疫

MKノックアウトマウスを免疫する場合、動物種および抗原に対する免疫応答能力が重要なポイントとなる。一般に、免疫に用いる動物種とミエローマ細胞の動物種が同一の場合には、ハイブリドーマが効率よく形成される。特に、マウス由来のミエローマ細胞が全てBALB/cマウスを起源にしているために、免疫動物のMKノックアウトマウスの系統は、BALB/cマウスが適していると考えられる。この場合、脾細胞とミエローマ細胞が共にBALB/c由来であり、得られるハイブリドーマはBALB/cの腹腔内で増殖できるため、特別な処理なしで腹水から、高濃度のモノクローナル抗体を得ることができる。しかしBALB/cマウスからES細胞を樹立することはなかなか難しい。

【0012】

免疫は、多くのタンパク質抗原、多糖類抗原については、1～100μgの抗原と等量のフロイント完全アジュバントを混合してエマルジョンを作製し、腹腔または皮下に投与する。アジュバントの働きは十分には分かっていないが、少なくとも2つの重要な働きがあると考えられている。1つは、抗原が速やかに処理されるのを防ぐ働きで、いま1つは、非特異的な免疫反応を惹起して目的の抗原に対する免疫反応を起こりやすくする働きである。一般に広く用いられているのは前者で、水溶液とのエマルジョンを作製して使用する。最近では、リポソームや合成サーファクタントなどもアジュバントとして用いられている。後者では、Lipid Aや死菌が用いられている。現在最も用いられている死菌は、Bordetella pertussisとMycobacterium tuberculosisである。Mycobacterium tuberculosisはフロイント完全アジュバントに加えられている死菌である。その活性部位はムラミルジペプチド(MDP)に存在することが明らかにされており、様々な性状MDPが市販されている。このように、抗原を保持する物質と非特異的に免疫反応を惹起する物質を組み合わせアジュバント（死菌を含む）として使用する。一般には、初回免疫にはフロイント完全アジュバント、追加免疫には不完全アジュバント（死菌を含まない）が用いられることが多い。アジュバントの最適な選択および組み合わせは当業者であればルーチンの実験により容易に行うことができるので、このようにして選択された組み合わせは本発明に包含される。

初回免疫後2～3週の間隔で1ないし数回の追加免疫を行う。追加免疫の直前、およびその1週間後、試験的に採血し抗体価を測定する。抗体価の一番上がったマウスを選び追加免疫し実験に供する。

【0013】

以上の免疫方法は、抗原の性状や量によって変わりうるものであり、最適の方法の選択は、当業者であればルーチン的な仕事である。

【0014】

3. 細胞融合

細胞融合に関しては基本的には、ミルステタンらの方法 (Galfre, G. & Milstein, C., Methods Enzymol. 73:3-46, 1981) に準じて行う。モノクローナル抗体作製に用いられる代表的なマウスラインのミエローマ細胞は、P3-X63-Ag8、P3-X63-Ag8U1、X63Ag8.653、SP2/0-Ag14、F0、NSI/1-Ag4-1、NS0/1、FOX-NYであるが、これらの細胞株は全てP3K株由来である。P3Kは、鉱物油で誘発されたBALB/cマウス由来のミエローマ株M0PC21由来の細胞で、P3KのHGPRT遺伝子をもたない細胞株として得られたのがP3とMS-1である。

10

【0015】

4. モノクローナル抗体のスクリーニング

細胞融合後、培養上清中の抗体の有無を7~14日後にスクリーニングするに際しては、MKを固相に結合させたEIAによるのが簡便である。EIAでのスクリーニング後、陽性ウエルの細胞を増殖させてクローニングを行う。

5. 抗体産生細胞の増殖と凍結

スクリーニングで検出された陽性ウエルには目的の細胞が含まれているはずである。ところが継代を続けていくと、別の細胞との生存競争に敗れたり、染色体が脱落したりして、目的の細胞がなくなってしまう事態に陥ることがある。このような事態に備えて、クローニングを行う一方で、細胞を凍結しておくことが重要である。

20

本発明においては、このようにして得られたマウス抗ヒトMKモノクローナル抗体、および該抗体をトリプシン、パパイン、ペプシンなどの酵素により処理して、場合によっては還元して得られるFab、Fab'、F(ab')を含む。

【0016】

本発明によって得られたマウス抗ヒトMKモノクローナル抗体は、1-ステップサンドイッチ法 (特開平10-160735) のマウス抗ヒトポリクローナル抗体に代えて用いることもできる。この場合、標識物を付与する抗体としては、IgG画分、さらにはペプシン消化後還元して得られる特異的Fab'を用いることができる。

【0017】

【実施例】

30

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0018】

[実施例1] マウス抗ヒトMKの作製

免疫動物は、2ライン (A及びB) のES細胞由来のMKノックアウトマウス (Nakamura, E. et al.: Genes to Cells, 3: 811-822, 1998) のそれぞれについて、雄及び雌を免疫動物として使用した。抗原はヒトMKタンパク質 (特開平9-95454) を用いた。ラインおよび抗原投与量は以下のとおり。

- ・ラインA (雄、3匹)・・・MK100 μ g/匹
- ・ラインA (雌、2匹)・・・MK1 μ g/匹
- ・ラインB (雄、4匹)・・・MK1 μ g/匹
- ・ラインB (雌、5匹)・・・MK10 μ g/匹

40

初回、背部皮下数カ所に免疫し、2回目以降は、腹腔内に免疫した。免疫は、約3週間に1回の間隔で行った。すべてのマウスに3回の免疫を施した後、1週間後、各マウスの眼窩より採血を行い、その血清を用いて抗体価の測定をEIAで行った。

ラインBのメスの5匹について、際だった抗体価の上昇が確認された。そこで、これら5匹のMKノックアウトマウスのマウス眼底静脈よりMKを10 μ g/匹で最終追加免疫した。

それぞれのマウス個体から得られた脾細胞とミエローマ細胞 (P3U1) の細胞融合は、基本的には、ミルステインらの方法 (Galfre, G. & Milstein, C., Methods Enzymol. 73:3-46, 1981) に準じて行った。常法によるクローニングの結果、ある特定のマウス個体1匹に由来

50

して、5つのクローン（クローンA、B、C、D、およびE）が得られた。これらのクローンは凍結保存した。これらのクローンからモノクローナル抗体を常法により調製した。これらの5つの抗体のサブクラスはすべてIgG（ ）であった。次にこれら各クローンの抗体価（希釈倍率：100、300、900、2700、8100、24300、および72900）を検討した。結果を図2に示す。

【0019】

【発明の効果】

本発明により、ヒトMKに対するモノクローナル抗体が得られた。このマウス抗ヒトMKモノクローナル抗体は、1-ステップサンドイッチ法に有効に適用できる。

【0020】

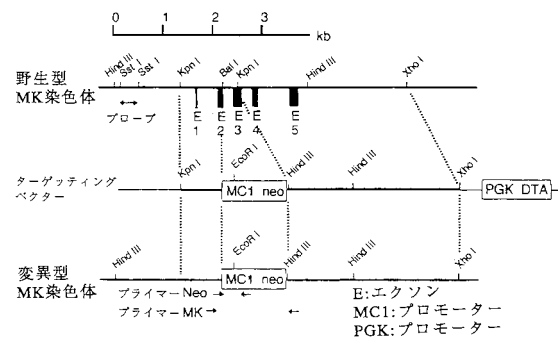
【図面の簡単な説明】

【図1】 129/Sv系マウスのエクソン2とエクソン3の一部を破壊したノックアウトマウスの変異型染色体を示す図である。

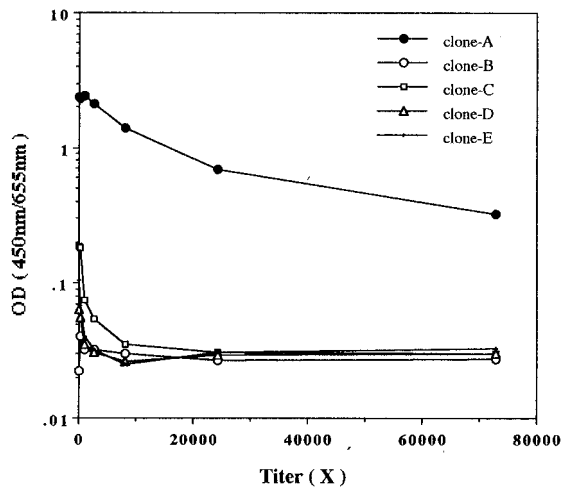
【図2】 クローンA、B、C、D、およびEから得られたモノクローナル抗体の抗体価を示す図である。

10

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 R 1:91

C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91

(72)発明者 池松 真也

神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社医薬事業部内

(72)発明者 小田 宗宏

神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所内

(72)発明者 佐久間 貞俊

神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社医薬事業部内

審査官 新留 豊

(56)参考文献 特開平 1 0 - 1 6 0 7 3 5 (J P , A)

国際公開第 0 0 / 0 1 0 6 0 8 (W O , A 1)

特開平 0 9 - 0 9 5 4 5 4 (J P , A)

Biochemical and Biophysical Research Communications , 1 9 9 1 年 , Vol.176, No.2 , p.792-797

Genes to Cells , 1 9 9 8 年 , Vol.3 , p.811-822