

(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2014-105159

(P2014-105159A)

(43) 公開日 平成26年6月9日(2014.6.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 07 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 D	4 B O 6 4
G O 1 N 33/536 (2006.01)	G O 1 N 33/536 D	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	G O 1 N 33/536 E	4 H O 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	
審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2012-256774 (P2012-256774)
 (22) 出願日 平成24年11月22日 (2012.11.22)

(71) 出願人 000230962
 日本光電工業株式会社
 東京都新宿区西落合1丁目31番4号
 (74) 代理人 110000671
 八田国際特許業務法人
 (72) 発明者 永井 豊
 東京都新宿区西落合一丁目31番4号 日
 本光電工業株式会社内
 (72) 発明者 高尾 雅
 宮城県仙台市青葉区角五郎2-11-15
 -401
 Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 CA01 CA04
 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04
 GA01 GA11 HA01 HA11

最終頁に続く

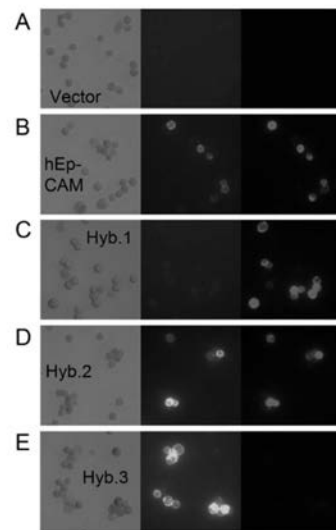
(54) 【発明の名称】 ヒト由来上皮細胞接着分子に対するモノクローナル抗体、およびこれを用いた循環腫瘍細胞の検出方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】従来公知の抗 E p C A Mモノクローナル抗体が認識するエピトープ(N末端 E G F様ドメイン)とは異なるエピトープを特異的に認識する抗 E p C A Mモノクローナル抗体の提供。

【解決手段】ヒト由来上皮細胞接着分子(E p C A M)に対するモノクローナル抗体であって、ヒト由来上皮細胞接着分子(E p C A M)の C P領域に対して特異的に反応するモノクローナル抗体、および受託番号が N I T E B P - 1 4 4 9であるハイブリドーマにより産生される、ヒト由来上皮細胞接着分子(E p C A M)に対するモノクローナル抗体。

【選択図】 図3



	EGF TY	CP	HEA125	KI122
hEpCAM	+	+	+	+
Hyb.1	+	+	-	-
Hyb.2	+	+	+	+
Hyb.3	-	-	+	-

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト由来上皮細胞接着分子 (E p C A M) に対するモノクローナル抗体であって、ヒト由来上皮細胞接着分子 (E p C A M) の C P 領域に対して特異的に反応するモノクローナル抗体。

【請求項 2】

ヒト由来上皮細胞接着分子 (E p C A M) の N 末端 E G F 様ドメインに反応しない、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

サブクラスがマウス I g M である、請求項 1 または 2 に記載のモノクローナル抗体。

10

【請求項 4】

受領番号が N I T E A B P - 1 4 4 9 であるハイブリドーマ K I J Y 2 により產生される、ヒト由来上皮細胞接着分子 (E p C A M) に対するモノクローナル抗体。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のモノクローナル抗体と同一のエピトープに結合するモノクローナル抗体。

【請求項 6】

以下の工程：

(a) 被験者から血液試料を採取する工程；および、

(b) 請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いて、前記血液試料に含まれる循環腫瘍細胞を検出する工程、
を含む、循環腫瘍細胞の検出方法。

20

【請求項 7】

前記モノクローナル抗体が蛍光標識されたものである、請求項 6 に記載の検出方法。

【請求項 8】

前記 (b) 工程において、ヒト由来上皮細胞接着分子 (E p C A M) の N 末端 E G F 様ドメインに対して特異的に反応する第 2 のモノクローナル抗体をさらに用いる、請求項 6 または 7 に記載の検出方法。

【請求項 9】

前記第 2 のモノクローナル抗体が磁性ビーズに結合したものである、請求項 8 に記載の検出方法。

30

【請求項 10】

前記 (b) 工程を、完全循環腫瘍細胞計数分析 (i C e a p) 法により行う、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の検出方法。

【請求項 11】

請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の検出方法に用いられる循環腫瘍細胞検出用キットであって、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を含む、循環腫瘍細胞検出用キット。

【請求項 12】

受領番号が N I T E A B P - 1 4 4 9 であるハイブリドーマ K I J Y 2 。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト由来上皮細胞接着分子に対するモノクローナル抗体、およびこれを用いた循環腫瘍細胞の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

循環腫瘍細胞 (C i r c u l a t i n g T u m o r C e l l ; C T C) は、がん患者の末梢血流を循環する腫瘍細胞と定義され、原発腫瘍または転移腫瘍から血管中へ浸潤した腫瘍細胞である。この C T C の検出は、転移性悪性腫瘍の早期発見の方法の一つとして

50

近年注目されている。その理由は、X線写真や血清中の腫瘍マーカー検出よりも低侵襲かつ正確に転移性悪性腫瘍の診断を行え、患者の予後予測や治療効果の指標として利用できる点にある。

【0003】

CTCは非常に稀少な細胞であり、転移性がん患者の血液に含まれる $10^9 \sim 10^{10}$ 個/mLの血液細胞のうち、わずか1細胞程度しか存在しないことが知られている。このため、末梢血から稀少なCTCを正確に検出するための技術開発に多大な努力が注がれている。これまでに開発されてきた主要な検出方法には、免疫組織化学法、PCR法、フローサイトメトリー法などがある。しかしながら、前述したようにCTCは非常に稀少な細胞であるため、血液をそのままこれらの検出方法に供することはできない。したがって、通常は前処理として、CTCの濃縮操作が必須であり、検出法に則したレベルまでCTCを濃縮する必要がある。

10

【0004】

CTCの濃縮方法として開発されてきた様々な手法の中で、最も広く利用されているのは、細胞表面の特異的抗原を標的とした腫瘍細胞の濃縮である。その多くは、上皮細胞接着分子(Epithelial cell adhesion molecule; EpCAM; 「CD326」とも称される)に対するモノクローナル抗体を固定化した磁気ビーズを血液試料と混合した後、磁石を用いて腫瘍細胞を濃縮する方法をとっている。

【0005】

CTCの検出を効率的かつ正確なものにするためには、濃縮と検出といった技術を首尾一貫して行うことが必要である。多段階のハンドリング操作、例えば細胞の染色、洗浄、分離、分注などの操作はCTCのロスを引き起こすため、可能な限りこれらの操作を避け、一体の検出装置中で分析が一貫して行える形が望ましい。Cell Search(登録商標)(Veridex社)システムはCTC検出装置として唯一FDAの認可を受けた装置であり、転移性乳がん、大腸がんおよび前立腺がんの無増悪生存率(PFS)および全生存率(OS)を予測するのに用いられている。この装置では、全血に対して抗EpCAM抗体固定化磁気ビーズによるCTCの濃縮を行い、腫瘍細胞に対して免疫染色を行った後、自動化蛍光顕微鏡を用いて腫瘍細胞の計数が行われる。より具体的には、まず、血液試料7.5mLをコニカルチューブに移し、緩衝液と混和した後に遠心分離器で赤血球層を分離し、除去する。その後、抗EpCAM抗体がナノ鉄粒子に結合されてなる磁気ビーズにより血液中の多くの細胞から上皮細胞を特異的に分離・抽出する。次いで、分離された上皮細胞に蛍光標識サイトケラチンモノクローナル抗体を反応させるとともに蛍光性のDNA染色物質(DAPI)を用いて細胞の核を染色する。この際、混入した白血球をCTCと識別するために、同様に蛍光標識した抗CD45抗体を反応させる。このようにして、血液試料中のCTCの検出・定量が行われるのである。

20

30

【0006】

上述したCell Searchシステムによる血液試料中のCTCの検出・定量方法では、細胞内への抗体透過が必要なため、細胞固定と細胞膜透過処理を行う必要があった。したがって、Cell Searchシステムによる分析が終了した試料を別途のさらなる分析(例えば、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction; RT-PCR、染色体異数性検査、変異分析などの遺伝子診断・ゲノム解析)に供することはできない。

40

【0007】

血液試料中のCTCの検出・定量を経た血液試料が別途のさらなる分析に供されようようにするためには、細胞の生存能力を維持したままCTCの検出・定量の分析を行う必要がある。これを可能とする技術として、完全循環腫瘍細胞計数分析(intact CTC enumeration and analysis procedure; iCeap)法が提案されている(例えば、非特許文献1)。

【0008】

iCeap法もまた、Cell Searchシステムと同様にCTCの表面に発現して

50

いる E p C A M を標的とするものであるが、2種の異なる抗 E p C A M モノクローナル抗体を用いる点で、C e l l S e a r c h システムとは異なる。i C e a p 法では、用いられる2種の異なる抗 E p C A M モノクローナル抗体の一方を磁性ビーズに結合させ、他方を蛍光標識する(以下、i C e a p 法において用いられる2種の異なる抗 E p C A M モノクローナル抗体のうち、磁性ビーズと結合するものを「第1の抗体」と称することがあり、蛍光標識されるものを「第2の抗体」と称することがある)。

【0009】

i C e a p 法は、例えば、以下のように行われる。まず、血液試料中の赤血球を溶解させ、遠心分離した後、上清を除去してペレットを得る。これに第1の抗体-磁性ビーズ複合体および蛍光標識された第2の抗体を接触させる。ここで、非特許文献1では、第1の抗体として H E A - 1 2 5 を用い、第2の抗体として E B A - 1 を用いている。このとき、第1の抗体および第2の抗体はともに C T C の表面に発現している E p C A M タンパク質を特異的に認識してこれに結合する。続いて、M A C S 磁気細胞分離システムにより C T C を磁気濃縮し、生存している細胞を識別するために核を染色するが、上述した第1の抗体および第2の抗体は試料に含まれる白血球の一部とも非特異的に結合することがある。このため、核を染色すると同時に、蛍光標識した抗 C D 4 5 モノクローナル抗体を試料に添加しておき、このようにして得られた試料を用いてフローサイトメトリー法による分析を行うことで、生存/死滅している C T C をそれぞれ、白血球に対する非特異的な結合とは区別して検出・定量することが可能となる。

【0010】

この i C e a p 法による C T C の検出・定量は、試料に含まれる細胞の生存能力にほとんど影響を及ぼさないことから、i C e a p 法による分析が終了した試料については、上述した C e l l S e a r c h システムを経た試料とは異なり、別途のさらなる分析(例えば、R T - P C R、染色体異数性検査、変異分析などの遺伝子診断・ゲノム解析)に供することが可能である。少なくともこの点で、i C e a p 法は C e l l S e a r c h システムにはない利点を有する優れた分析技術であるといえる。

【0011】

上述したように、非特許文献1に開示されている i C e a p 法の実施形態では、第1の抗体として H E A - 1 2 5 抗体を用い、第2の抗体として E B A - 1 抗体を用いている。従来知られている抗 E p C A M モノクローナル抗体としては、これらの H E A - 1 2 5 抗体や E B A - 1 抗体のほかにも V U - 1 D 9 抗体などがあり、いずれもマウスに腫瘍細胞株を免疫処置することによって確立されたものである。そして、H E A - 1 2 5 抗体はヒト由来 E p C A M に特異的であるのに対し、E B A - 1 抗体は他の動物に対しても交差反応性を示すものであることが従来知られていたことから、H E A - 1 2 5 抗体が認識するヒト由来 E p C A M タンパク質のエピトープと E B A - 1 抗体のエピトープとは異なることが示唆されていた。このため、非特許文献1ではこれら2種の抗 E p C A M モノクローナル抗体がそれぞれ第1の抗体および第2の抗体として採用されていたのである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Takao et al., Cytometry, Part A, 79A: 107-117, 2011

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明者らは、非特許文献1に開示されている i C e a p 法のさらなる改良のために鋭意検討を行った。そしてその過程において、驚くべきことに、上述したような従来の当業者による認識とは異なり、H E A - 1 2 5 抗体および E B A - 1 抗体はヒト由来 E p C A M タンパク質において同一のエピトープを認識するという事実を突き止めた。具体的には、これら2種の抗 E p C A M モノクローナル抗体はいずれも、ヒト由来 E p C A M タンパク質の N 末端上皮成長因子 (E p i d e r m a l G r o w t h F a c t o r ; E G F)

様ドメインをエピトープとして認識することを見出したのである。

【0014】

本発明は、上述した予期せぬ発見に基づきなされたものである。すなわち、ヒト由来 E p C A M タンパク質の同一のエピトープを認識する H E A - 1 2 5 抗体と E B A - 1 抗体との組み合わせを用いて i C e a p 法を行うと、これらの抗体がエピトープ部位において競合的に拮抗してしまい、検出効率の低下といった問題が生じる虞がある。そこで本発明は、従来公知の抗 E p C A M モノクローナル抗体が認識するエピトープ（N末端 E G F 様ドメイン）とは異なるエピトープを特異的に認識する抗 E p C A M モノクローナル抗体を提供することを目的とする。また本発明は、当該モノクローナル抗体を産生しうるハイブリドーマ、並びに、当該モノクローナル抗体を用いた C T C の検出方法およびこれに用いるための C T C 検出用キットをも提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者らは、ヒト由来 E p C A M タンパク質を一過性に発現させた H E K 2 9 3 細胞を用いてマウスに免疫処置を施し、ヒト由来 E p C A M タンパク質に対する免疫応答を誘導した。そして、当該マウスの脾臓細胞とミエローマとを融合させてハイブリドーマの集団を作製し、ヒト由来 E p C A M タンパク質の N 末端 E G F 様ドメインとは異なるエピトープを特異的に認識する抗 E p C A M モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを探索した。その結果、この条件を満たすハイブリドーマのクローンを選抜することに成功した。そして、当該ハイブリドーマから所望のモノクローナル抗体を取得することに成功し、本発明を完成させた。

20

【0016】

すなわち、本発明の第 1 の形態によれば、ヒト由来 E p C A M に対するモノクローナル抗体であって、ヒト由来 E p C A M の C P 領域に対して特異的に反応するモノクローナル抗体が提供される。

【0017】

上記第 1 の形態に係るモノクローナル抗体は、ヒト由来 E p C A M の N 末端 E G F 様ドメインに反応しないものであることが好ましい。また、上記第 1 の形態に係るモノクローナル抗体のサブクラスは、マウス I g M であることが好ましい。

【0018】

また、本発明の第 2 の形態によれば、受領番号が N I T E A B P - 1 4 4 9 であるハイブリドーマ K I J Y 2 により産生される、ヒト由来 E p C A M に対するモノクローナル抗体が提供される。

30

【0019】

さらに、本発明の第 3 の形態によれば、上記第 2 の形態に係るモノクローナル抗体と同一のエピトープに結合するモノクローナル抗体が提供される。

【0020】

また、本発明の第 4 の形態によれば、以下の工程：

(a) 被験者から血液試料を採取する工程；および、

(b) 上記のいずれかのモノクローナル抗体を用いて、前記血液試料に含まれる循環腫瘍細胞を検出する工程、を含む、循環腫瘍細胞の検出方法が提供される。

40

【0021】

上記第 4 の形態に係る検出方法において、前記モノクローナル抗体は蛍光標識されたものであることが好ましい。また、上記第 4 の形態に係る検出方法では、前記 (b) 工程において、ヒト由来 E p C A M の N 末端 E G F 様ドメインに対して特異的に反応する第 2 のモノクローナル抗体をさらに用いることが好ましい。そして、前記第 2 のモノクローナル抗体は磁性ビーズに結合したものであることが好ましい。上記第 4 の形態における特に好ましい実施形態では、前記 (b) 工程が、完全循環腫瘍細胞計数分析 (i C e a p) 法により行われる。

50

【 0 0 2 2 】

さらに、本発明の第5の形態によれば、上記第4の形態に係る検出方法に用いられるCTC検出用キットであって、上記第1～第3の形態のいずれかに係るモノクローナル抗体を含む、CTC検出用キットが提供される。

【 0 0 2 3 】

そして、本発明の第6の形態によれば、受領番号がN I T E A B P - 1 4 4 9であるハイブリドーマK I J Y 2が提供される。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 4 】

本発明によれば、従来公知の抗E p C A Mモノクローナル抗体が認識するエピトープ（N末端E G F様ドメイン）とは異なるエピトープを特異的に認識する抗E p C A Mモノクローナル抗体が提供される。また、本発明によれば、当該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、並びに、当該モノクローナル抗体を用いたCTCの検出方法およびこれに用いるためのCTC検出用キットもまた、提供される。

10

【 0 0 2 5 】

本発明により新たに提供される抗E p C A Mモノクローナル抗体がエピトープとして認識するヒト由来E p C A Mタンパク質のC P領域は、その特性が未知のものである。したがって、本発明に係る抗E p C A Mモノクローナル抗体を利用することで、E p C A Mタンパク質の構造および機能に関する研究のさらなる進展が期待される。また、本発明に係る抗E p C A Mモノクローナル抗体を利用することで、i C e a p法に代表されるようなCTCの検出方法における検出感度や検出精度のよりいっそうの向上も期待される。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 6 】

【 図 1 】 実施例における「免疫染色」の実験において、H E A - 1 2 5 - F I T CおよびK I J Y 2 - 5 5 5を用いて共免疫染色したL N C a P細胞について、B I O R E V O B Z - 9 0 0 0（株式会社キーエンス）により撮影した位相コントラスト画像および蛍光画像である。図1において、左（P h C）は位相コントラスト画像を示し、中央（H E A 1 2 5 - F I T C）はH E A 1 2 5 - F I T Cによる蛍光画像を示し、右（K I J Y 2 - 5 5 5）はK I J Y 2 - 5 5 5による蛍光画像を示す。なお、対物レンズとしては2 0 × P l a n F lを用いた。また、図1に示す画像において蛍光を呈している細胞内の部位は、H E A - 1 2 5 - F I T CおよびK I J Y 2 - 5 5 5のいずれについても細胞膜である。

30

【 図 2 A 】 実施例における「E L I S A」の実験において、固相E L I S Aによる力価試験を行った結果を示すグラフである。

【 図 2 B 】 実施例における「E L I S A」の実験において、液相E L I S Aによる結合特異性試験を行った結果を示すグラフである。

【 図 2 C 】 実施例における「P C - 3細胞へのK I J Y 2抗体の結合能の評価」の実験において、P C - 3細胞の表面に発現したE p C A MへのK I J Y 2抗体の結合能を評価するために、K I J Y 2およびV U - 1 D 9抗体を並列で、ストレプトアビジン - P E共役体を用いて可視化した結果を示す写真である。図2Cの左は位相コントラスト画像であり、中央は12ビット画像であり、右は輝度調整後の画像である。なお、中央の12ビット画像において矢尻で示された円の部位は、左の輝度調整後の画像において可視化されるようになったE p C A M低発現P C - 3細胞の位置を示す。

40

【 図 3 】 実施例における「エピトープマッピング」の実験において、K I J Y 2抗体のヒト由来E p C A Mへの結合ドメインを同定する目的で、エピトープマッピングを行った結果を示す写真および説明図である。図3のそれぞれは以下の通りである。A：空ベクター、B：全長ヒトE p C A M構築物、C～E：マウスE G Fドメイン、T Yドメイン、またはC P領域で置換されたE p C A M構築物（それぞれ、H y b . 1、H y b . 2、またはH y b . 3）。図3のA～Eについては、左からそれぞれ、位相コントラスト画像、F I T C蛍光画像、およびH i L y t e F l u o r 5 5 5蛍光画像を示す。また、図3のF

50

はエピトープマッピングの内容を要約した説明図であり、黒塗り領域は置換マウス E p C A M を示す。

【図4】図4のAは、実施例における「がん細胞の同時検出」の実験において、P C - 3細胞へのK I J Y 2抗体の反応性をさらに定量化する目的で、フローサイトメトリー（F C M）分析により、E B A - 1抗体、V U - 1 D 9抗体、およびK I J Y 2抗体の3種の抗体によるP C - 3細胞への競合的結合性を試験した結果を示す図である。処理したサンプルをF C M分析した結果を示すヒストグラムである。また、図4のBは、H E A 1 2 5 - F I T C および、H i l y t e F l u o r 6 4 7 で標識されたK I J Y 2抗体（K I J Y 2 - 6 4 7）によるP C - 3細胞の二重染色試験を行った結果を示す図である。なお、図4のBにおいて、上段のパネルは、蛍光補正後に得られたスキャッタグラムである。また、図4のBにおいて、下段のパネルは、K I J Y 2 - 6 4 7 およびH E A 1 2 5 - F I T C の双方で染色された細胞のヒストグラムを、いずれか一方のみの抗体で染色したヒストグラムと比較した結果を示す図である（上のパネルがK I J Y 2 - 6 4 7 単独との対比であり、下のパネルがH E A 1 2 5 - F I T C との対比である）。

10

【発明を実施するための形態】

【0027】

以下、添付した図面を参照しながら、本発明の実施形態を説明する。

【0028】

まず、ヒト由来 E p C A M の構造について説明する。ヒト由来 E p C A M は 3 1 4 個のアミノ酸からなる約 4 0 k D a の膜貫通糖タンパク質であり、上皮由来の細胞（すなわち、循環腫瘍細胞の多く）の表面に発現している。このヒト由来 E p C A M の細胞外部分（E p E x）は、N末端 E G F 様ドメイン、T Y 様ドメイン、および1回膜貫通ヘリックスに近接した未同定の低システイン（c y s t e i n e - p o o r ; C P）領域から構成されている。この E p E x は E - カドヘリンを阻害して、カドヘリンを介する細胞 - 細胞接合を無効とし、腫瘍の浸出および局所侵入を促進させる。一方、膜内タンパク質分解によって放出される E p C A M の細胞内ショートドメイン（E p I C D）は、転写因子 L E F / T C F とともに核シグナリングに役割を果たし、c - M y c およびサイクリン A / E をアップレギュレートし、細胞増殖を促進させる。

20

【0029】

従来公知の抗ヒト E p C A M モノクローナル抗体は、いずれもこの N 末端 E G F 様ドメインを特異的に認識するものであった。ここで、「E G F 様ドメイン」について簡単に説明すると、上皮増殖因子（E G F）は 5 3 個のアミノ酸からなるペプチドで、6 個のシステイン残基によって形成される 3 個のジスルフィドループからなる特徴的な構造を有している。数多くのタンパク質がこの構造を有しており、この構造が「E G F 様ドメイン」と称されているのである。

30

【0030】

ヒト由来 E p C A M をコードする遺伝子（c D N A）はすでに単離されており、ヒト由来 E p C A M のアミノ酸配列も知られている。配列番号：1 にヒト由来 E p C A M をコードする遺伝子の C D S（終止コドン含む）のヌクレオチド配列（NCBI RefSeq Accession Number: NM_002354）を示し、配列番号：2 にヒト由来 E p C A M のアミノ酸配列（NCBI RefSeq Accession Number: NP_002345）を示す。

40

【0031】

【化 1】

atggcgcccc	cgcaggtcct	cgcgttcggg	cttctgcttg	cgcggcgac	ggcgactttt	60	
gccgcagctc	aggaagaatg	tgtctgtgaa	aactacaagc	tggccgtaaa	ctgctttgtg	120	
aataataatc	gtcaatgcc	gtgtacttca	gttggtgcac	aaaatactgt	catttgctca	180	
aagctggctg	ccaaatgttt	ggtgatgaag	gcagaaatga	atggctcaaa	acttgggaga	240	
agagcaaac	ctgaaggggc	cctccagaac	aatgatgggc	tttatgatcc	tgactgcgat	300	
gagagcgggc	tctttaaggc	caagcagtg	aacggcacct	ccatgtgctg	gtgtgtgaac	360	
actgctgggg	tcagaagaac	agacaaggac	actgaaataa	cctgctctga	gcgagtgaga	420	
acctactgga	tcatcattga	actaaaacac	aaagcaagag	aaaaacctta	tgatagtaaa	480	
agtttgcgga	ctgcacttca	gaaggagatc	acaacgcggt	atcaactgga	tccaaaattt	540	10
atcacgagta	ttttgtatga	gaataatggt	atcactattg	atctggttca	aaattcttct	600	
caaaaaactc	agaatgatgt	ggacatagct	gatgtggcct	attattttga	aaaagatggt	660	
aaaggtgaat	ccttgtttca	ttctaagaaa	atggacctga	cagtaaattg	ggaacaactg	720	
gatctggatc	ctggctcaaac	tttaatttat	tatgttgatg	aaaaagcacc	tgaattctca	780	
atgcagggtc	taaaagctgg	tgttattgct	gttattgtgg	ttgtggtgat	agcagttggt	840	
gctggaattg	ttgtgctggg	tatttccaga	aagaagagaa	tggcaaagta	tgagaaggct	900	
gagataaagg	agatgggtga	gatgcatagg	gaactcaatg	cataa	945		(配列番号 : 1)

MAPPQVLAFG	LLAAATATF	AAQECCVCE	NYKLAVNCFV	NNRQCQCTS	VGAQNTVICS	60	
KLAACKLVMK	AEMNGSKLGR	RAKPEGALQN	NDGLYDPDCD	ESGLFKAKQC	NGTSMCWCVN	120	20
TAGVRRTDKD	TEITCSERV	TYWIIIEELKH	KAREKPYDSK	SLRTALQKEI	TTRYQLDPKF	180	
ITSILYENNV	ITIDLQNSS	QKTQNDVDIA	DVAYYFEKDV	KGESLFHSHK	MDLTVNGEQL	240	
DLDPGQTLIY	YVDEKAPEFS	MQGLKAGVIA	VIVVVVIAVV	AGIVVLVISR	KKRMAKYEKA	300	
EIKEMGEMHR	ELNA	314					(配列番号 : 2)

【0032】

本発明の第1の形態に係るモノクローナル抗体は、ヒト由来E p C A Mに対するモノクローナル抗体であるが、従来公知の抗ヒトE p C A Mモノクローナル抗体とは異なり、ヒト由来E p C A MのC P領域に対して特異的に反応する点に特徴を有している。

【0033】

上記第1の形態に係るモノクローナル抗体は、ヒト由来E p C A MのN末端E G F様ドメインに反応しないものであることが好ましい。また、上記第1の形態に係るモノクローナル抗体のサブクラスは特に制限されないが、マウスI g Mであることが好ましい。

【0034】

本形態に係るモノクローナル抗体を製造する方法としては、公知の方法をそのまま採用することができる。例えばケーラーとミルシュタインの細胞融合法を基礎として製造することができる。概説すれば、ヒト由来E p C A Mに対する免疫応答が誘導されたマウス等の動物の脾臓細胞とミエロマトを融合してハイブリドーマの集団を作製し、該ハイブリドーマの集団から所望のモノクローナル抗体を産生するものを選抜する。そして、選抜したハイブリドーマを培養し、その培養物から所望のモノクローナル抗体を単離・精製することができるのである。

【0035】

ヒト由来E p C A Mに対する免疫応答を誘導する方法としては、動物にヒト由来E p C A M (タンパク質) を接種する一般的なタンパク免疫の手法によってもよいが、動物にヒト由来E p C A M遺伝子を投与する遺伝子免疫の手法によってもよい。

【0036】

タンパク免疫によって動物に免疫応答を誘導する場合には、一般的に行われている方法をそのまま採用することができる。例えば、精製したヒト由来E p C A Mを用意し、アジュバントとの混合液を調製する。この混合液をマウス等に皮下注射し、ヒト由来E p C A Mに対する免疫応答を誘導する。必要に応じて、間隔をあけて複数回投与し、追加免疫してもよい。また、後述する実施例に記載のように、ヒト由来E p C A Mタンパク質を一過

性に発現させた細胞（例えば、HEK293細胞）をマウス等の動物に投与することによって、ヒト由来EpCAMに対する免疫応答を誘導してもよい。

【0037】

免疫される動物としては特に限定はないが、好ましくは、マウスが用いられる。これにより、マウス由来のモノクローナル抗体を得ることができる。

【0038】

ハイブリドーマの作製は、ケーラーとミルシュタインの方法によって行うことができる。すなわち、上記した手順でタンパク免疫または遺伝子免疫され、ヒト由来EpCAMに対する免疫応答が誘導された動物から脾臓を摘出し、脾臓細胞を採取する。そして、脾臓細胞とミエロマとを細胞融合し、ハイブリドーマの集団を作製する。ハイブリドーマの選抜は、例えば、HAT選択培地を用いて行うことができる。また、ハイブリドーマのクローニングは、例えば、限界希釈法により行うことができる。このようにして、ヒト由来EpCAMのCP領域に反応（当該領域を特異的に認識して結合）する抗ヒトEpCAMモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選抜して、クローニングすればよい。

10

【0039】

本発明に係るモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの1つは「KIJY2」と命名され、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託されている。寄託の詳細は以下のとおりである。

【0040】

微生物の識別の表示：KIJY2

受領番号：NITE ABP - 1449

受領日：2012年11月2日

選抜およびクローニングされたハイブリドーマを培養することにより、前記の性質を有する抗ヒトEpCAMモノクローナル抗体を製造することができる。ハイブリドーマの培養は、動物の腹腔内で行ってもよく、ディッシュ等を用いてインビトロで行ってもよい。動物の腹腔内でハイブリドーマを培養する場合には、腹水を採取し、その腹水からモノクローナル抗体を単離・精製することができる。インビトロで培養する場合には、その培養液からモノクローナル抗体を単離・精製することができる。

20

【0041】

モノクローナル抗体の精製については、各種クロマトグラフィー、塩析、透析、膜分離等の公知の手法を組み合わせる行うことができる。

30

【0042】

KIJY2（受領番号がNITE ABP - 1449であるハイブリドーマ）により産生される抗ヒトEpCAMモノクローナル抗体と同一のエピトープに結合するモノクローナル抗体、換言すれば、KIJY2により産生される抗ヒトEpCAMモノクローナル抗体と「機能的に同等」であるモノクローナル抗体も、本発明に含まれる。このようなモノクローナル抗体を得るには、例えば、KIJY2により産生される抗ヒトEpCAMモノクローナル抗体のエピトープを、ヒトEpCAMタンパク質の部分ペプチド等を用いたエピトープマッピング法により解析する。そして、同定されたエピトープを含む合成ペプチドを抗原として用い、前記抗ヒトEpCAMモノクローナル抗体と同一のエピトープに結合するモノクローナル抗体を得ればよい。なお、2つの抗体についてエピトープが同一か否かを調べる方法としては、競合実験による方法が挙げられる。例えば、KIJY2により産生される抗ヒトEpCAMモノクローナル抗体を第一抗体とする。そして、当該第一抗体とヒトEpCAMとの結合が、試験対象である第二抗体によって競合阻害を受ける場合には、当該第二抗体は、前記第一抗体と同じエピトープに結合するものであるといえる。

40

【0043】

本発明に係るモノクローナル抗体は、種々の用途に使用できる。例えば、本発明に係る抗EpCAMモノクローナル抗体がエピトープとして認識するヒト由来EpCAMタンパク質のCP領域は、その特性が未知のものである。したがって、本発明に係る抗EpCAM

50

Mモノクローナル抗体を利用することで、E p C A Mタンパク質の構造および機能に関する研究のさらなる進展が期待される。また、本発明に係る抗E p C A Mモノクローナル抗体を利用することで、i C e a p法に代表されるような循環腫瘍細胞（C T C）の検出方法における検出感度や検出精度のよりいっそうの向上も期待される。

【0044】

以下、i C e a p法に代表される循環腫瘍細胞（C T C）の検出方法について、説明する。

【0045】

本発明に係るC T Cの検出方法は、以下の工程：

（a）被験者から血液試料を採取する工程；および、

（b）上述した本発明に係るいずれかの抗E p C A Mモノクローナル抗体を用いて、前記血液試料に含まれるC T Cを検出する工程、を含む。

【0046】

本明細書において、「被験者」は、がん罹患するまたは罹患した可能性のある動物であればよく、ヒトへの適用が好ましい。本発明に係る検出方法は、このうち、がん罹患している疑いのあるヒト、またはがん罹患した後のヒト等において特に好ましく行われる。

【0047】

循環腫瘍細胞（C T C）を検出する「血液試料」としては、C T Cが含まれる場合に当該C T Cを検出できるものであれば特に制限されない。ただし、血液試料中の赤血球を溶解させ、遠心分離した後、上清を除去して得られたペレットを用いることが好ましい。また、血液試料には、凝固防止等を目的としてE D T Aカリウム塩やヘパリン等の添加剤が添加されてもよい。被験者から血液試料を採取するために採血するタイミングは、特に制限されない。

【0048】

本発明に係る検出方法で使用する血液試料は、被験者から採取直後のものを測定に用いることが好ましいが、保存したものをを用いてもよい。血液試料の保存方法としては、試料中のC T Cの量が変化しない条件であれば特に制限はなく、例えば0～10の凍結しない程度の低温条件、暗所条件および無振動条件下が好ましい。

【0049】

血液試料中のC T Cを検出（および場合によっては定量）する方法について特に制限はなく、従来公知の手法が適宜採用されうる。本発明の好ましい実施形態として、完全循環腫瘍細胞計数分析（i C e a p）法があるが、i C e a p法による場合には、例えば非特許文献1（Takao et al., Cytometry, Part A, 79A: 107-117, 2011）の記載が参照されうる。

【0050】

ここで、例えばi C e a p法などによってC T Cの検出（および定量）を行う場合には、上述した本発明に係る抗E p C A Mモノクローナル抗体は、蛍光標識されたものであることが好ましい。この際、蛍光標識するための蛍光色素について特に制限はなく、F I T C、H i L y t e F l u o r 5 5 5、H i L y t e F l u o r 6 4 7などが用いられうる。

【0051】

また、上記（b）工程において、本発明に係る抗E p C A Mモノクローナル抗体とは異なるエピトープ（例えば、E p C A MのN末端E G F様ドメイン）に対して特異的に反応する第2のモノクローナル抗体をさらに用いて、検出をより確実にすることもよい。この際、第2のモノクローナル抗体としては、従来公知の抗E p C A Mモノクローナル抗体であるH E A - 1 2 5、V U - 1 D 9、E B A - 1、B e r - E P 4、3 2 3 / A 3、3 1 1 - 1 K 1などが用いられうる。この第2のモノクローナル抗体は、本発明に係る抗E p C A Mモノクローナル抗体とは異なる蛍光標識されたものであってもよいし、磁性

10

20

30

40

50

ビーズに結合したものであってもよい。第2のモノクローナル抗体として磁性ビーズに結合したものをを用いることによって、i C e a p法においてそうであるように、磁気を用いたE p C A M発現C T Cの分離（磁気濃縮）と、本発明に係る抗E p C A Mモノクローナル抗体によるその検出（免疫蛍光染色）との2つのメカニズムによって、C T Cの存在を確実に把握し、場合によってはその存在量を定量することが可能となる。なお、場合によっては、本発明に係る抗E p C A Mモノクローナル抗体を磁性ビーズと結合したものとし、第2のモノクローナル抗体を上記した蛍光色素により蛍光標識して、同様に用いてもよい。

【0052】

このような本発明に係る検出方法によれば、例えば本発明に係る抗E p C A Mモノクローナル抗体と、これとは異なるエピトープを認識する第2のモノクローナル抗体とを併用することで、エピトープに対する競合阻害の虞がなくなることから、i C e a p法などによるC T Cの検出効率のよりいっそうの向上が期待される。また、本発明に係る抗E p C A Mモノクローナル抗体がエピトープとして認識するヒト由来E p C A Mタンパク質のC P領域は、その特性が未知のものである。したがって、本発明に係る抗E p C A Mモノクローナル抗体を利用することで、E p C A Mタンパク質の構造および機能に関する研究のさらなる進展も期待される。

【0053】

本発明の他の形態によれば、上述したC T Cの検出方法に用いられるC T C検出用キットもまた、提供される。この検出用キットは、上述した検出方法で使用される試薬等を含むものである。具体的には、当該検出用キットに含まれる試薬として、上述した本発明に係る抗E p C A Mモノクローナル抗体（例えば、蛍光標識されたものや、磁性ビーズと結合したもの）が挙げられる。上述した第2のモノクローナル抗体（例えば、磁性ビーズと結合したものや、蛍光標識されたもの）もまた、当該検出用キットに含まれる。さらに、検出用キットは、上記抗体や採取された試料を希釈するための緩衝液、洗浄液、二次抗体、蛍光色素、反応容器、陽性対照、陰性対照、検査プロトコルを記載した指示書等の構成要素をさらにも含むことができる。この検出用キットを使用することにより、本発明に係るC T Cの検出が簡便となり、早期の治療方針決定や予後の診断、治療効果の確認などに非常に有用である。

【実施例】

【0054】

以下、実施例を用いて本発明の実施形態をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲が下記の実施例に限定されるわけではない。

【0055】

（細胞株および培養）

乳腺腺がん細胞株であるM C F - 7は、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターの細胞バンクから入手した。転移性前立腺がん細胞株であるL N C a PおよびP C - 3は、国立大学法人東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから入手した。これらの細胞株については、ペニシリンおよびストレプトマイシン添加10% F C S含有R P M I 1 6 4 0（Gibco-Life Technologies）中で培養した。また、H E K 2 9 3細胞株および形質転換体は、抗生物質添加10% F C S含有D - M E M（和光純薬工業株式会社）中で培養した。

【0056】

（H E K 2 9 3細胞株におけるE p C A Mの発現）

ヒトまたはマウスのE p C A Mタンパク質をコードするc D N Aを、それぞれNCBI Ref Seq Accession Number: NM_002354（ヒト）およびGenBank: BC094465.1（マウス）のヌクレオチド配列に基づいてタカラバイオ株式会社に委託することにより合成した。なお、ヒト-マウスハイブリッドc D N Aを作製するために、アミノ酸配列を変更することなくドメイン内に適切な制限酵素部位を導入した。そして、ヒトE p C A Mタンパク質をコード

10

20

30

40

50

する cDNA を、発現ベクター pB Apo - CMV Neo (タカラバイオ株式会社) にクローニングした。また、ヒト EpCAM 骨格中にマウス EpCAM の EGF ドメイン、TY ドメインおよび CP 領域をそれぞれ有する Hyb. 1、Hyb. 2 および Hyb. 3 ポリペプチドをコードする各 cDNA を、同様に発現ベクター pB Apo - CMV Neo にクローニングした。ここで、Hyb. 1、Hyb. 2 および Hyb. 3 のそれぞれをコードする cDNA のヌクレオチド配列は以下のとおりである (下線部がマウス EpCAM に対応する配列である)。

【 0 0 5 7 】

【 化 2 - 1 】

<Hyb. 1 (マウス EpCAM の EGF ドメインを有する) をコードする cDNA の配列>

10

```

atggcgcccc cgcaggtcct cgcgttcggg cttctgcttg cgcggcgac ggcgactttt      60
gccgcagctc agagagactg tgtctgtgac aactacaagc tggcaacaag ttgctctctg      120
aatgaatatg gtgaatgccca gtgtacttcc tatggtacac agaatactgt catttgctcc      180
aaactggcgg ccaaagtgtt ggtgatgaag gcagaaatga atggctcaaa acttgggaga      240
agagcaaac ctgaaggggc cctccagaac aatgatgggc tttatgatcc tgactgcgat      300
gagagcgggc tctttaaggc caagcagtgc aacggcacct ccacgtgctg gtgtgtgaac      360
actgctgggg tcagaagaac agacaaggac actgaaataa cctgctctga gcgagtgaga      420
acctactgga tcatcattga actaaaacac aaagcaagag aaaaacctta tgatagtaaa      480
agtttgcgga ctgcacttca gaaggagatc acaacgcggt atcaactgga tccaaaattt      540
atcacgagta ttttgtatga gaataatggt atcactattg atctggttca aaattcttct      600
caaaaaactc agaatgatgt ggacatagct gatgtggcct attattttga aaaagatggt      660
aaaggtgaat ccttgtttca ttctaagaaa atggacctga cagtaaattg ggaacaactg      720
gatctggatc ctggtcaaac tttaatttat tatgttgatg aaaaagcacc tgaattctca      780
atgcagggtc taaaagctgg tgttattgct gttattgtgg ttgtggtgat agcagttggt      840
gctggaattg ttgtgctggt tatttccaga aagaagagaa tggcaaagta tgagaaggct      900
gagataaagg agatgggtga gatgcatagg gaactcaatg cataa 945 (配列番号 : 3)

```

20

【 0 0 5 8 】

【 化 2 - 2 】

<Hyb. 2 (マウス EpCAM の TY ドメインを有する) をコードする cDNA の配列>

30

```

atggcgcccc cgcaggtcct cgcgttcggg cttctgcttg cgcggcgac ggcgactttt      60
gccgcagctc aggaagaatg tgtctgtgaa aactacaagc tggccgtaaa ctgctttgtg      120
aataataatc gtcaatgccca gtgtacttca gttggtgcac aaaatactgt catttgctca      180
aagcttgcgt ctaaattgctt ggcgatgaaa gcagaaatga ctacagcaa gtctgggagg      240
aggataaagc ccgaaggggc gatccagaac aacgatgggc tgtacgacc cgactgcgac      300
gagcaggggc tcttcaaagc caagcagtgc aacggcaccg ccacgtgctg gtgtgtgaac      360
actgctgggg tcagaagaac agacaaggac actgaaataa cctgctctga gcgagtgaga      420
acctactgga tcatcattga actaaaacac aaagcaagag aaaaacctta tgatagtaaa      480
agtttgcgga ctgcacttca gaaggagatc acaacgcggt atcaactgga cccaaaattt      540
atcacgagta ttttgtatga gaataatggt atcactattg atctggttca aaattcttct      600
caaaaaactc agaatgatgt ggacatagct gatgtggcct attattttga aaaagatggt      660
aaaggtgaat ccttgtttca ttctaagaaa atggacctga cagtaaattg ggaacaactg      720
gatctggacc ctggtcaaac tttaatttat tatgttgatg aaaaagcacc tgaattctca      780
atgcagggtc taaaagctgg tgttattgct gttattgtgg ttgtggtgat agcagttggt      840
gctggaattg ttgtgctggt tatttccaga aagaagagaa tggcaaagta tgagaaggct      900
gagataaagg agatgggtga gatgcatagg gaactcaatg cataa 945 (配列番号 : 4)

```

40

【 0 0 5 9 】

【化 2 - 3】

<Hyb.3 (マウス EpCAM の CP 領域 (ヒトよりも 1 コドン (3 塩基) 長い) を有する) をコードする cDNA の配列>

```

atggcgcccc cgcaggtcct cgcgttcggg cttctgcttg ccgcgcgac ggcgactttt      60
gccgcagctc aggaagaatg tgtctgtgaa aactacaagc tggccgtaaa ctgctttgtg      120
aataataatc gtcaatgcca gtgtacttca gttggtgcac aaaataactgt cattttgctca      180
aagctggctg ccaaatgttt ggtgatgaag gcagaaatga atggctcaaa acttgggaga      240
agagcaaaac ctgaaggggc cctccagaac aatgatgggc tttatgatcc tgactgcgat      300
gagagcgggc tctttaaggc caagcagtgc aacggcacct ccacgtgctg gtgtgtcaac      360
accgccggag tccgaagaac cgacaaggac acggagatca cgtgctccga gcgcgtgagg      420
acctactgga tcatcattga actaaaacac aaagaaagag aaagccccta cgaccatcag      480
agcttgcaga ctgcgcttca agaggcgttc acatctcgat ataagctgaa tcagaaattt      540
atcaaaaaca ttatgtatga gaataatgtt atcaccattg atctgatgca aaactcttct      600
cagaaaacac aagacgacgt ggacatagct gatgtggctt actattttga aaaagatgtg      660
aagggggagt ccttcttcca ttcttctaag agcatggacc tgagagtgaa cggagagccg      720
ctcgatctgg accccgggca gactctgatt tactacgttg atgaaaaggc acccgaattc      780
tcaatgcagg gtctaaaagc tgggtgttatt gctgttattg tggtttgtgt gatagcagtt      840
gttgctggaa ttgtttgtgt ggttatttcc agaaagaaga gaatggcaaa gtatgagaag      900
gctgagataa aggagatggg tgagatgcat agggaactca atgcataa 948 (配列番号: 5)

```

【0060】

その後、トランスフェクション試薬として X-treme GENE HP (ロシュ) を用いて、HEK293細胞にそれぞれの発現ベクターをトランスフェクションした。そして、G418 (ロシュ) を用いた選択によりそれぞれについて安定的な HEK293-EpCAM クローン を樹立した。

【0061】

(マウスの免疫処置およびハイブリドーマクローンの作製)

上記で樹立した一過性 EpCAM 発現 HEK293細胞を用いて、Balb/cマウスを免疫処置した。なお、ハイブリドーマクローンの作製およびモノクローナル抗体の精製は、委託研究として株式会社日本バイオテスト研究所において行われた。その手法を概説すれば、まず、免疫処置したマウスから脾臓を摘出し、脾臓細胞を採取し、これをミエロマ P3U1細胞株と細胞融合してハイブリドーマの集団を作製した。このようにして得られたハイブリドーマの集団から、所望のハイブリドーマクローンを EpCAM 過剰発現細胞株である MCF-7細胞株を用いてスクリーニングした。陽性をさらに親の HEK293陰性細胞および EpCAM 安定発現 HEK293陽性細胞を基準としてスクリーニングした。その結果得られたハイブリドーマクローンを「KIJY2」と名付け、無血清培地中で培養した。そして、これが産生する抗体 (KIJY2抗体) を均質に精製した。なお、KIJY2抗体は、有意な非特異的結合を有しない IgM に属する。

【0062】

(免疫染色)

精製した KIJY2抗体を、メーカー説明書に従って N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) 系標識キット (株式会社同仁化学研究所) で蛍光標識した。LNCAp細胞を 35mm 培養ディッシュ中で培養し、PBS を用いて洗浄し、上記で得られた蛍光色素結合 KIJY2抗体と反応させた。そして、HEA-125-FITC (ミルテニーバイオテック) に対する適切な希釈および HiLyte Fluor 555 結合 KIJY2抗体 (KIJY2-555) に対する濃度を $1 \sim 2 \times 10^5$ / サンプルの培養細胞に対してそれぞれ $1/25$ および $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ と決定した。

【0063】

HEA-125-FITC および KIJY2-555 を用いて共免疫染色した LNCAp細胞について、BIOREVO BZ-9000 (株式会社キーエンス) により、位相コントラスト画像および蛍光画像を得た。

【0064】

得られた画像を示す写真を図1に示す。図1において、左(PhC)は位相コントラスト画像を示し、中央(HEA 125 - FITC)はHEA 125 - FITCによる蛍光画像を示し、右(KI J Y 2 - 555)はKI J Y 2 - 555による蛍光画像を示す。なお、対物レンズとしては20×Plan Flを用いた。また、図1に示す画像において蛍光を呈している細胞の部位は、HEA - 125 - FITCおよびKI J Y 2 - 555のいずれについても細胞膜である。

【0065】

(ELISA)

E p C A Mを発現するM C F - 7細胞およびP C - 3細胞($\sim 5 \times 10^4 / \text{mL}$)をそれぞれ96ウェルポリ-L-リジンコートマイクロプレート(住友ベークライト株式会社)上に播種し、24時間培養した。接着細胞を4%パラホルムアルデヒド(PFA)のPBS溶液を用いて15分間固定し、これをELISAにおける抗原として用いて、ハイブリドマクローンを選択し、力価試験を行い、滴定曲線を作成した。

10

【0066】

固相ELISAについては、HRP Protein Detector Microwell Kit(KPL)を用いて行った。この際、抗E p C A Mモノクローナル抗体であるHEA - 125(IgG1、ab46714、Abcam、UK)をポジティブコントロールとして用いた。そして、未希釈のHEA - 125または $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ のKI J Y 1抗体もしくはKI J Y 2抗体から始めて、文献に記載されているM C F - 7細胞およびP C - 3細胞に対して力価を決定した。KI J Y 2抗体の検出用に、二次抗体を抗マウスIgM - HRP等価物(Sigma - Aldrich)で置換した。

20

【0067】

この固相ELISAによる力価試験の結果を図2Aに示す。図2Aに示すように、HEA - 125ではM C F - 7細胞よりもP C - 3細胞を検出する際により高濃度の抗体を要することがわかる。また、予期せぬことに、KI J Y 2抗体はM C F - 7細胞にはある程度結合するものの、P C - 3細胞にはほとんど結合しなかった。これにより、KI J Y 2抗体のエピトープがPFA処理に対して非常に高い感受性を示す一方で、そのままの(非固定)細胞に対する結合能は維持できることが示された。

30

【0068】

次に、懸濁液における非固定細胞の結合特異性を試験する目的で、以下の手法により液相ELISAを行った: TrypLE Express(Life Technologies)を用いて剥離したP C - 3細胞を4%PFA含有PBS中に懸濁し、 10^5 細胞/サンプルで低結合マイクロチューブ(PROTEOSAVE SS、住友ベークライト株式会社)に分けた。次いで、すぐに $10 \times$ 体積の培地で希釈し、活性剤フリーPBSで2回洗浄して、得られた細胞ペレットを液相ELISAに用いた。なお、液相ELISAにはM - Buffer(0.5%BSAおよび2mMEDTA含有PBS)を用いた。また、パラホルムアルデヒド感受性を試験するために、HEA - 125(1/10希釈)またはKI J Y 2抗体($5 \mu\text{g} / \text{mL}$)の過剰量を分析条件中維持し、同様の実験を3回行った。

40

【0069】

この液相ELISAによる結合特異性試験の結果を図2Bに示す。図2Bに示すように、HEA - 125のエピトープは4%PFAによる処理の直後に若干露出した(最大1.5倍)。一方、KI J Y 2抗体のエピトープは4%PFAによる処理の後、迅速に消失した。ここで、E p C A Mは多量体を形成しうること、および、他のタンパク質と相互作用しうるということが知られている。E p C A Mのこれらの性質は、PFAによる固定エピトープへのKI J Y 2抗体の接近可能性を阻害する可能性がある。また、他の可能性としては、PFA処理によってE p C A Mの固有の構造が壊れることも考えられるが、いずれにせよ、細胞の固定化が免疫反応性に影響を及ぼすことがあることに留意すべきであろう。

【0070】

50

(P C - 3 細胞への K I J Y 2 抗体の結合能の評価)

天然のがん細胞 (P C - 3 細胞) の表面に発現した E p C A M への K I J Y 2 抗体の結合能を評価するために、 K I J Y 2 および V U - 1 D 9 抗体を並列で可視化した。具体的には、それぞれの抗体に結合した細胞を、ストレプトアビジン - P E 共役体を用いて可視化した。ここで、 P C - 3 細胞の E p C A M レベルは既知の E p C A M 陽性がん細胞株の中では比較的 low、かつ、 E p C A M の発現レベルの異なる亜集団を含む。このため、本実験では、 C T C 検出への実用化を考慮し、検出が困難ながん細胞株として、 P C - 3 細胞が選ばれたのである。

【 0 0 7 1 】

具体的には、 B S A フリーの抗 E p C A M モノクローナル抗体である V U - 1 D 9 (サンタクルーズバイオテクノロジー) および K I J Y 2 抗体 (各 1 0 0 μ g) をビオチン標識キット - N H 2 (株式会社同仁化学研究所) を用いて並行してビオチン化した。 P C - 3 細胞をビオチン化モノクローナル抗体 (0 . 4 μ g / 1 0 ⁵ 細胞) の存在下、 M - B u f f e r 中、室温にて 3 0 分間インキュベートした。 P B S で洗浄した後、細胞をストレプトアビジン - P E (ベクターラボラトリーズ) と推奨希釈 (1 / 1 0 0) で 1 5 分間混合した。懸濁液中の細胞をディスプレイ血球計算板 C - C h i p (ソウル、韓国) 中に静置し、 B Z - 9 0 0 0 によって分析した (対物レンズ : 1 0 x P l a n A p o) 。

10

【 0 0 7 2 】

1 0 0 μ L 細胞懸濁液中で H E K 2 9 3 一過性形質転換体 (1 . 5 ~ 2 x 1 0 ⁵ 細胞 / サンプル) に H E A 1 2 5 - F I T C (4 μ L) および K I J Y 2 (0 . 4 μ g) を混合し、上述したように C - C h i p 中でモニターした。

20

【 0 0 7 3 】

ストレプトアビジン - P E 共役体を用いて P C - 3 細胞を可視化した結果を図 2 C に示す。図 2 C において、上段は K I J Y 2 抗体を用いた結果を示し、下段は U V - 1 D 9 を用いた結果を示す。また、図 2 C の左は位相コントラスト画像であり、中央は 1 2 ビット画像であり、右は輝度調整後の画像である。なお、中央の 1 2 ビット画像において矢尻で示された円の部位は、左の輝度調整後の画像において可視化されるようになった E p C A M 低発現 P C - 3 細胞の位置を示す。図 2 C に示す結果から、 K I J Y 2 抗体および U V - 1 D 9 の双方のモノクローナル抗体が、 E p C A M の発現レベルの高い P C - 3 細胞 (中央) および発現レベルの低い P C - 3 細胞 (右) の亜集団を同様に検出することがわかる。これにより、 K I J Y 2 抗体は、細胞における E p C A M の発現レベルにかかわらず、 V U - 1 D 9 抗体と同程度に有効に無傷の (i n t a c t) がん細胞を検出することが示された。

30

【 0 0 7 4 】

(エピトープマッピング)

続いて、 K I J Y 2 抗体のヒト由来 E p C A M への結合ドメインを同定する目的で、エピトープマッピングを行った。

【 0 0 7 5 】

ここでは、 E p C A M タンパク質の三次元分子構造をそのまま維持したハイブリッドタンパク質を得るために、ヒト - マウス E p C A M ハイブリッド c D N A 構築物を調製した。具体的には、ヒト E p C A M タンパク質の E G F ドメイン、 T Y ドメイン、または C P 領域をそれぞれマウスのカウンターパートによって置換して、 H y b . 1、 H y b . 2、および H y b . 3 を得た。一時的にこれらのキメラタンパク質を発現する H E K 2 9 3 細胞を、 H E A 1 2 5 - F I T C および K I J Y 2 - 5 5 5 を用いて同時に染色した。

40

【 0 0 7 6 】

染色の結果を図 3 に示す。図 3 のそれぞれは以下の通りである。 A : 空ベクター、 B : 全長ヒト E p C A M 構築物、 C ~ E : マウス E G F ドメイン、 T Y ドメイン、または C P 領域で置換された E p C A M 構築物 (それぞれ、 H y b . 1、 H y b . 2、または H y b . 3) 。図 3 の A ~ E については、左からそれぞれ、位相コントラスト画像、 F I T C 蛍光画像、および H i L y t e F l u o r 5 5 5 蛍光画像を示す。なお、対物レンズとし

50

ては 20 × Plan Apo を用いた。また、図 3 の F はエピトープマッピングの内容を要約した説明図であり、黒塗り領域は置換マウス EpCAM を示す。

【 0 0 7 7 】

図 3 に示す結果から、HEA - 125 および KIJY2 抗体は、それぞれ EpCAM 分子の異なる部分を認識することを示している。具体的には、図 3 の B に示されるように、完全な EpCAM は HEA 125 - FITC および KIJY2 - 555 の双方により染色された。そして、図 3 の C に示されるように、EGF ドメインを欠く Hyb . 1 は KIJY2 - 555 により染色されたが、HEA - 125 により染色されなかった。この結果は、HEA - 125 がヒト由来 EpCAM の EGF ドメインを認識するという従来知見を裏付けるものである。また、図 3 の E に示されるように、CP 領域を欠く Hyb . 3 は HEA - 125 により染色されたが、KIJY2 - 555 により染色されなかった。この結果から、KIJY2 抗体はヒト由来 EpCAM の CP 領域を特異的に認識し、これと反応するものであることが示された。

10

【 0 0 7 8 】

EpCAM は細胞膜から切断される現象が知られている。この切断を調べるために、膜に近接する CP 領域に特異的なモノクローナル抗体である KIJY2 抗体は、EpCAM 切断を評価するのに有用であろう。また、CP 領域に特異的な抗 EpCAM モノクローナル抗体である 311 - 1K1 は、未変性の EpCAM を染色せず、かつ、FCM ではうまく作用しないが、初期の報告では使用されていた。KIJY2 抗体は、FCM でうまく作用するため未変性の EpCAM によりよく結合している図 2 C に示される画像から、KI

20

【 0 0 7 9 】

(がん細胞の同時検出)

PC - 3 細胞への KIJY2 抗体の反応性をさらに定量化するために、FCM 分析を行った。まず、従来エピトープがマッピングされていなかった抗ヒト由来 EpCAM モノクローナル抗体である EBA - 1、EGF ドメインに特異的な抗ヒト由来 EpCAM モノクローナル抗体である VU - 1D9、および上記で CP 領域に特異的なことが判明した KIJY2 抗体の 3 種の抗体による PC - 3 細胞への競合的結合性を試験した。

30

【 0 0 8 0 】

具体的には、まず、PC - 3 細胞 (100 μL のサンプル中に、 2×10^5 細胞) を、60 分間、M - Buffer 中で 100 μL の非希釈 HEA - 125 (Abcam, ab46714)、4 μg の VU - 1D9、4 μg の EBA - 1 (サンタクルーズバイオテクノロジー)、または 4 μg の KIJY2 抗体 (いずれも過剰量) とともに、またはこれらを含まずにプレインキュベートした。その後、15 分間、10 μL の HEA 125 - FITC を混合した。

【 0 0 8 1 】

上記のように処理したサンプルを FCM 分析した結果 (ヒストグラム) を図 4 の A に示す。図 4 の A に示すように、HEA 125 - FITC によって染色された PC - 3 細胞のみがダブルピークのヒストグラムを示すことが繰り返し観察された (図 4 の A、最上段パネル)。なお、FS / SS スキャッタグラムでは特定の亜集団は識別されなかった (図示せず)。従来、同様のヒストグラムが報告されていることから、異種 EpCAM 発現が本来の PC - 3 細胞株の性質であると考えられる。また、細胞を HEA - 125、VU - 1D9、または EBA - 1 抗体とともにプレインキュベートすると、陽性のシグナルが消え、またはかなり減弱した (図 4 の A、下の 3 つのパネル)。これらの結果から、EBA - 1 は EpCAM の EGF ドメインに特異的なモノクローナル抗体であり、EBA - 1 および VU - 1D9 抗体は EGF ドメインで HEA - 125 のエピトープに対して競合的に結合することが示された。これに対し、KIJY2 抗体でプレインキュベートしたサンプルの FITC ヒストグラムにはほとんど変化がなかった (図 4 の A、上から 2 つめのパネル

40

50

)。このことから、K I J Y 2 抗体の事前の結合は、その後の H E A - 1 2 5 の結合反応を妨げなかったことがわかる。つまり、K I J Y 2 抗体のエピトープは、H E A - 1 2 5 とは異なることが確認された。

【 0 0 8 2 】

続いて、H E A 1 2 5 - F I T C および、H i L y t e F l u o r 6 4 7 で標識された K I J Y 2 抗体 (K I J Y 2 - 6 4 7) による P C - 3 細胞の二重染色試験を行った。

【 0 0 8 3 】

具体的には、P C - 3 細胞を、30 分間、H E A 1 2 5 - F I T C (1 0 μ L) および K I J Y 2 - 6 4 7 (0 . 4 μ g) と同時に混合した。洗浄後、細胞を C y t o m i c s F C 5 0 0 F l o w C y t o m e t r y S y s t e m (ベックマン・コールター) によって分析した。なお、励起波長は、F I T C で 4 8 8 n m 、H i L y t e F l u o r 6 4 7 で 6 3 3 n m であった。また、検出チャンネルは、F L 1 (4 9 5 ~ 5 5 5 n m) および F L 4 (6 4 5 ~ 7 0 5 n m) であった。比較のために、1 0 0 0 0 事象ごとのデータを取得した。

【 0 0 8 4 】

結果を図 4 の B に示す。なお、図 4 の B において、上段のパネルは、蛍光補正後に得られたスキャッタグラムである。このスキャッタグラムに示されるように、P C - 3 細胞株細胞集団における E p C A M 高発現の亜集団 (E p C A M ^{h i g h}) および E p C A M 低発現の亜集団 (E p C A M ^{l o w}) をともに共染色することができた。

【 0 0 8 5 】

また、図 4 の B において、下段のパネルは、K I J Y 2 - 6 4 7 および H E A 1 2 5 - F I T C の双方で染色された細胞のヒストグラムを、いずれか一方のみの抗体で染色したヒストグラムと比較した結果を示す図である (上のパネルが K I J Y 2 - 6 4 7 単独との対比であり、下のパネルが H E A 1 2 5 - F I T C との対比である) 。これらのヒストグラムに示されるように、F I T C および H i L y t e F l u o r 6 4 7 の双方において蛍光強度の若干の減少および E p C A M ^{h i g h} から E p C A M ^{l o w} への分布シフトが、各単一色素を用いた染色のヒストグラムに対して観察された。ここで、E p C A M はダイマーまたはテトラマーを形成する傾向にあることが知られており、上述したように K I J Y 2 抗体は P F A で固定された E p C A M を認識しない (図 2 B) 。このように、K I J Y 2 抗体は、他の抗体または P F A 架橋による構造が固定化された分子よりも、膜での遊離形態の E p C A M 分子を優先的に認識している可能性がある。

【 0 0 8 6 】

なお、K I J Y 2 - 6 4 7 は、H E A - 1 2 5 が存在するか否かにかかわらず、バックグラウンドシグナルから全 P C - 3 細胞を識別できるという点に留意すべきである。P C - 3 が 5 1 , 6 6 7 E p C A M / 細胞を発現するという従来の報告によると、E p C A M 低発現細胞の下限は、F C M 分析で約 2 , 0 0 0 E p C A M / 細胞と推定される。この値は、転移性がん患者から推定される E p C A M 陽性 C T C における E p C A M の発現量 (細胞あたり、9 , 9 0 0 ~ 2 4 6 , 0 0 0 分子) をカバーするのに十分である。

【 配列表フリーテキスト 】

【 0 0 8 7 】

〔 配列番号 : 1 〕

ヒト由来 E p C A M をコードする遺伝子の C D S (終止コドン含む) のヌクレオチド配列 (N C B I R e f S e q A c c e s s i o n N u m b e r : N M _ 0 0 2 3 5 4) である。

【 0 0 8 8 】

〔 配列番号 : 2 〕

ヒト由来 E p C A M のアミノ酸配列 (N C B I R e f S e q A c c e s s i o n N u m b e r : N P _ 0 0 2 3 4 5) である。

【 0 0 8 9 】

〔 配列番号 : 3 〕

実施例において合成した H y b . 1 (マウス E p C A M の E G F ドメインを有する) を

10

20

30

40

50

コードする c D N A のヌクレオチド配列である。

【 0 0 9 0 】

〔 配列番号 : 4 〕

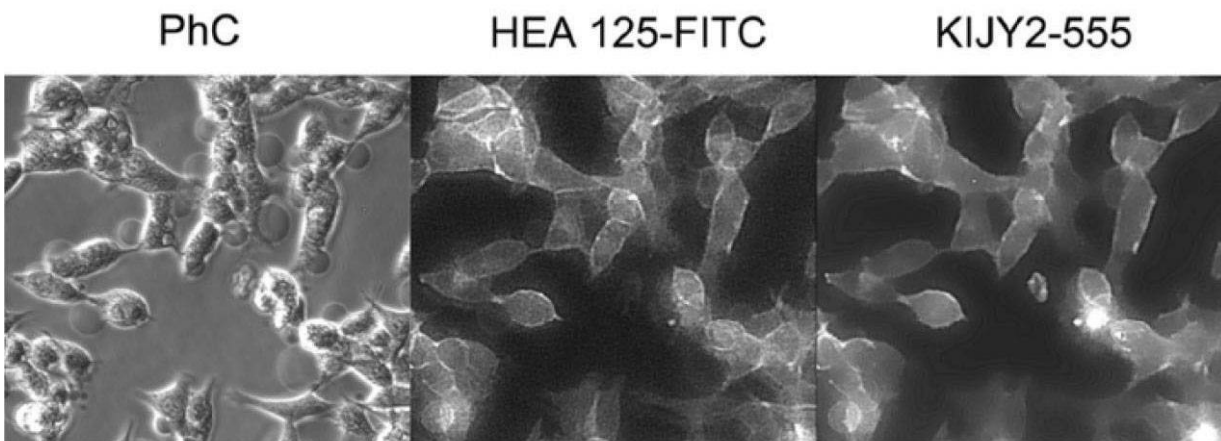
実施例において合成した H y b . 2 (マウス E p C A M の T Y ドメインを有する) をコードする c D N A のヌクレオチド配列である。

【 0 0 9 1 】

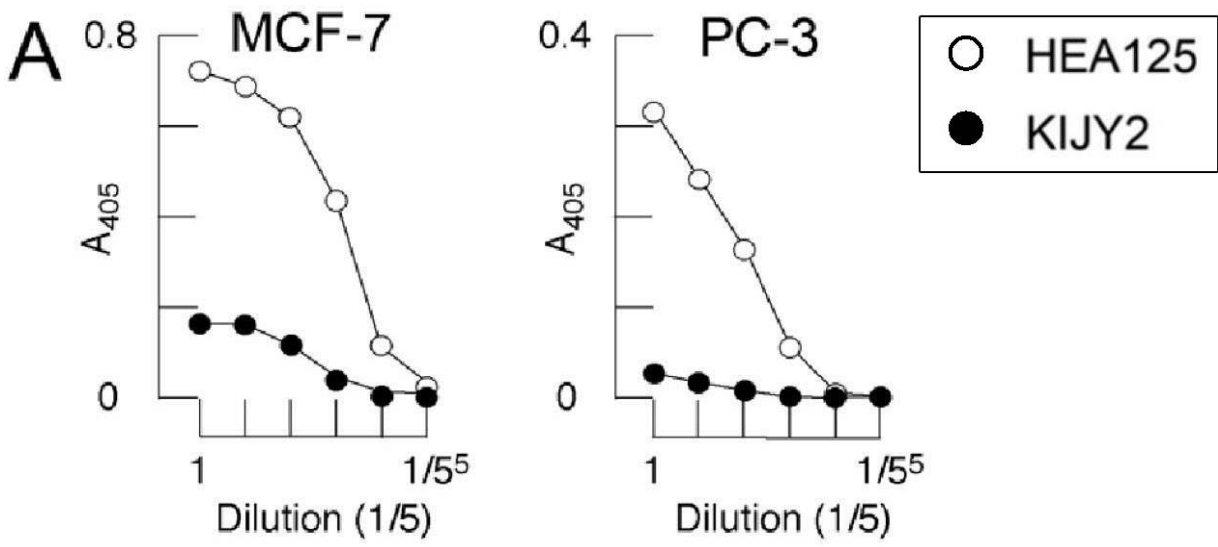
〔 配列番号 : 5 〕

実施例において合成した H y b . 3 (マウス E p C A M の C P 領域を有する) をコードする c D N A のヌクレオチド配列である。

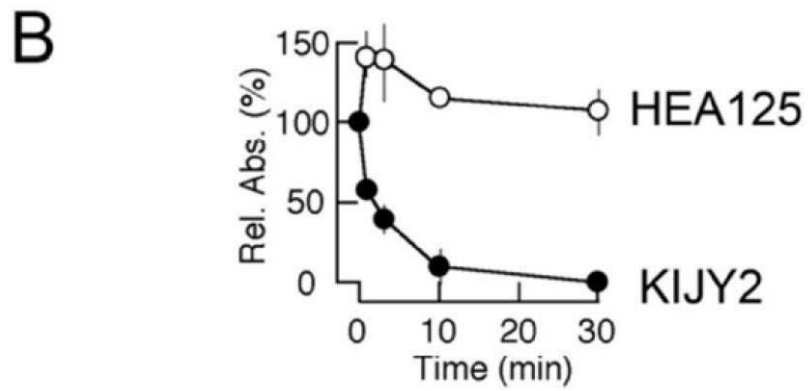
【 図 1 】



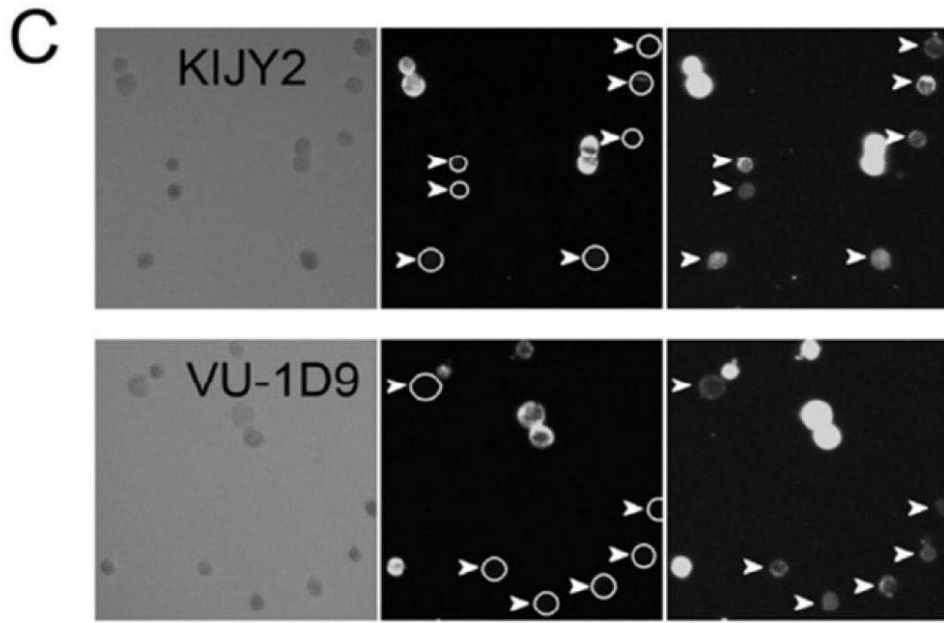
【 図 2 A 】



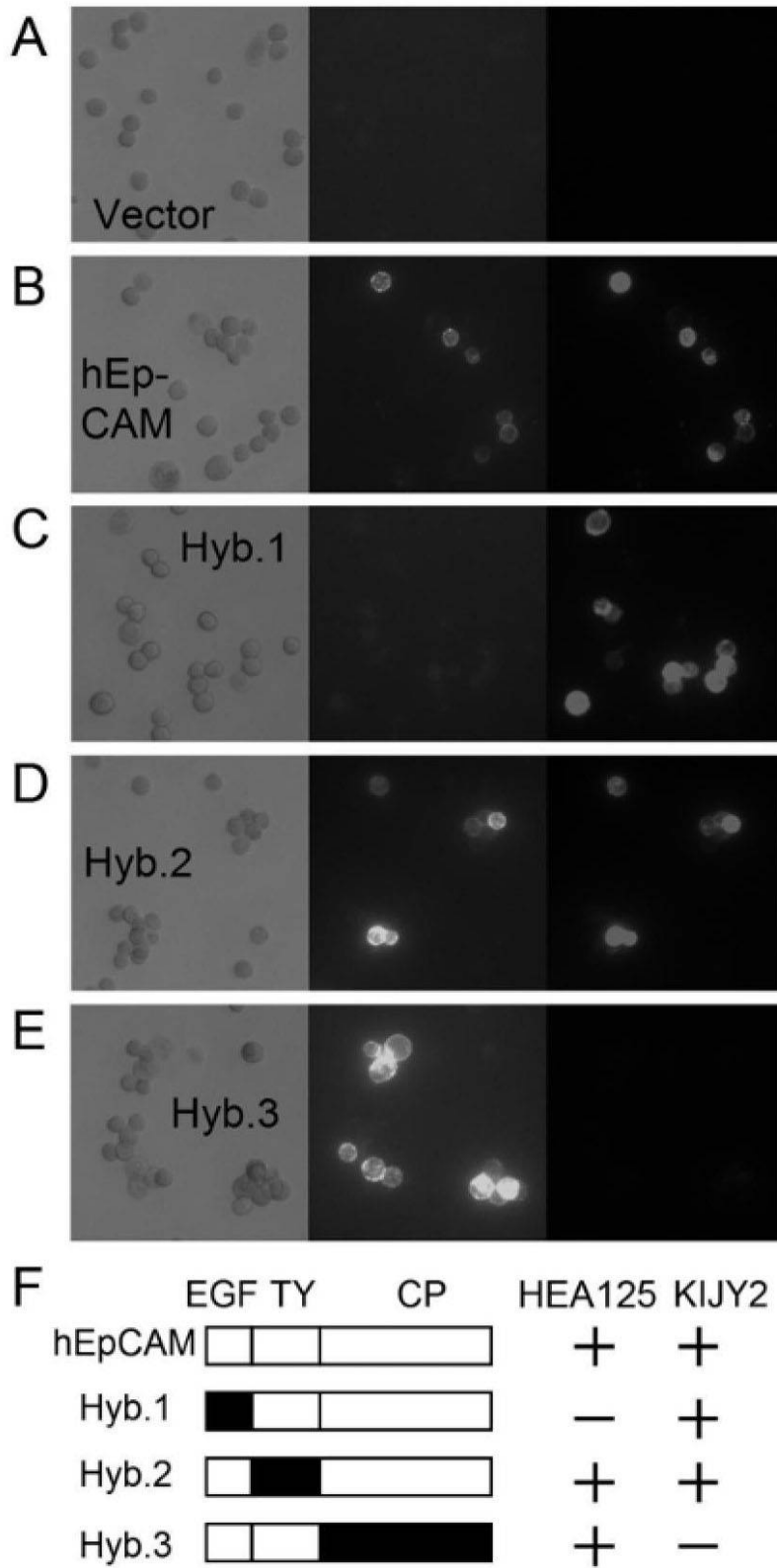
【 図 2 B 】



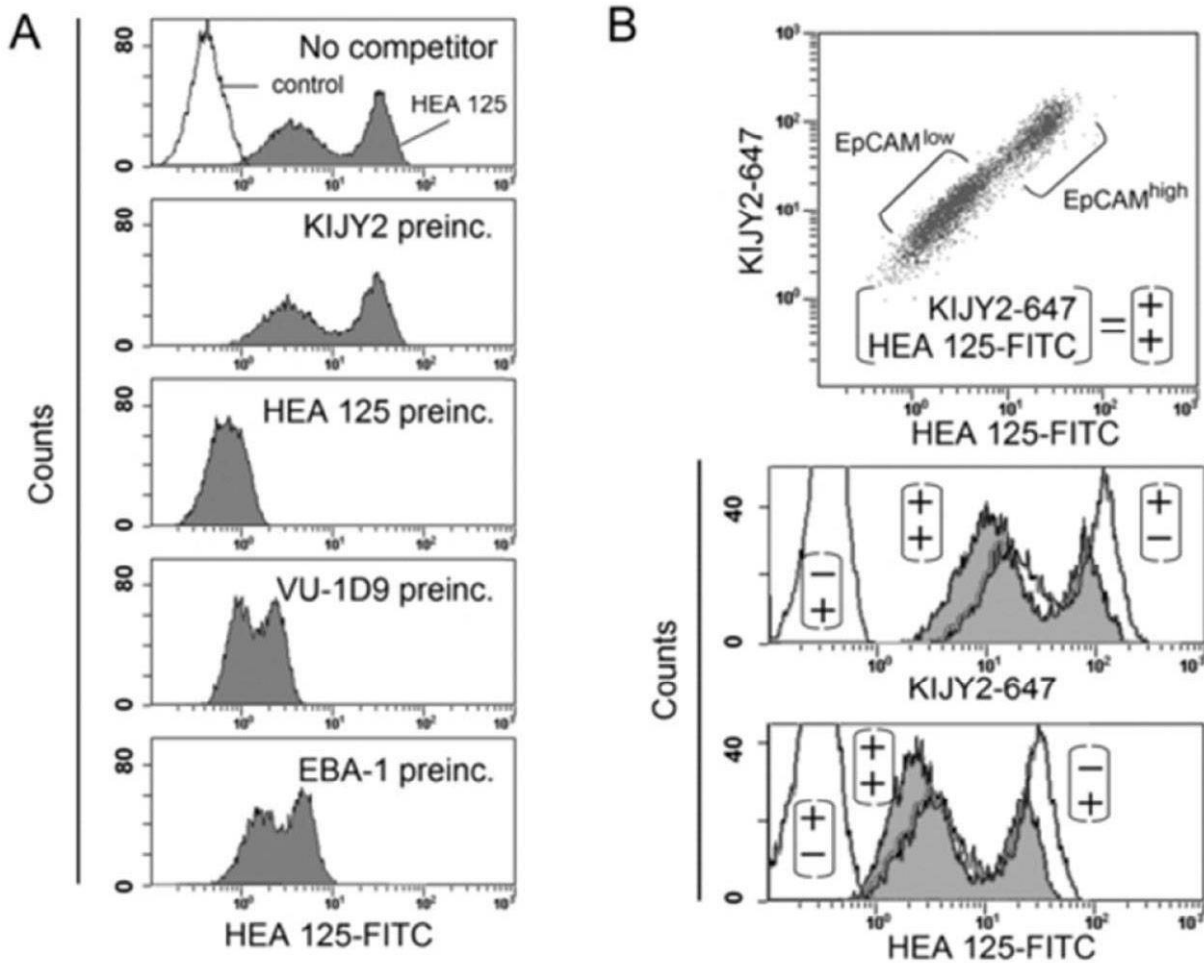
【 図 2 C 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配列表 】

[2014105159000001.app](#)

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成25年9月3日 (2013.9.3)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

ヒト由来上皮細胞接着分子 (EpCAM) に対するモノクローナル抗体であって、ヒト由来上皮細胞接着分子 (EpCAM) の CP 領域に対して特異的に反応するモノクローナル抗体。

【 請求項 2 】

ヒト由来上皮細胞接着分子 (EpCAM) の N 末端 EGF 様ドメインに反応しない、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【 請求項 3 】

サブクラスがマウス IgM である、請求項 1 または 2 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

受託番号が N I T E B P - 1 4 4 9 であるハイブリドーマ K I J Y 2 により産生される、ヒト由来上皮細胞接着分子 (E p C A M) に対するモノクローナル抗体。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のモノクローナル抗体と同一のエピトープに結合するモノクローナル抗体。

【請求項 6】

以下の工程：

(a) 被験者から血液試料を採取する工程；および、

(b) 請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を用いて、前記血液試料に含まれる循環腫瘍細胞を検出する工程、
を含む、循環腫瘍細胞の検出方法。

【請求項 7】

前記モノクローナル抗体が蛍光標識されたものである、請求項 6 に記載の検出方法。

【請求項 8】

前記 (b) 工程において、ヒト由来上皮細胞接着分子 (E p C A M) の N 末端 E G F 様ドメインに対して特異的に反応する第 2 のモノクローナル抗体をさらに用いる、請求項 6 または 7 に記載の検出方法。

【請求項 9】

前記第 2 のモノクローナル抗体が磁性ビーズに結合したものである、請求項 8 に記載の検出方法。

【請求項 10】

前記 (b) 工程を、完全循環腫瘍細胞計数分析 (i C e a p) 法により行う、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の検出方法。

【請求項 11】

請求項 6 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の検出方法に用いられる循環腫瘍細胞検出用キットであって、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を含む、循環腫瘍細胞検出用キット。

【請求項 12】

受託番号が N I T E B P - 1 4 4 9 であるハイブリドーマ K I J Y 2 。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

また、本発明の第 2 の形態によれば、受託番号が N I T E B P - 1 4 4 9 であるハイブリドーマ K I J Y 2 により産生される、ヒト由来 E p C A M に対するモノクローナル抗体が提供される。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

そして、本発明の第 6 の形態によれば、受託番号が N I T E B P - 1 4 4 9 であるハイブリドーマ K I J Y 2 が提供される。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0040

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0040】

微生物の識別の表示：K I J Y 2

受託番号：N I T E B P - 1 4 4 9

受託日（原寄託日）：2012年11月2日

選抜およびクローニングされたハイブリドーマを培養することにより、前記の性質を有する抗ヒトE p C A Mモノクローナル抗体を製造することができる。ハイブリドーマの培養は、動物の腹腔内で行ってもよく、ディッシュ等を用いてインビトロで行ってもよい。動物の腹腔内でハイブリドーマを培養する場合には、腹水を採取し、その腹水からモノクローナル抗体を単離・精製することができる。インビトロで培養する場合には、その培養液からモノクローナル抗体を単離・精製することができる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0042】

K I J Y 2（受託番号がN I T E B P - 1 4 4 9であるハイブリドーマ）により産生される抗ヒトE p C A Mモノクローナル抗体と同一のエピトープに結合するモノクローナル抗体、換言すれば、K I J Y 2により産生される抗ヒトE p C A Mモノクローナル抗体と「機能的に同等」であるモノクローナル抗体も、本発明に含まれる。このようなモノクローナル抗体を得るには、例えば、K I J Y 2により産生される抗ヒトE p C A Mモノクローナル抗体のエピトープを、ヒトE p C A Mタンパク質の部分ペプチド等を用いたエピトープマッピング法により解析する。そして、同定されたエピトープを含む合成ペプチドを抗原として用い、前記抗ヒトE p C A Mモノクローナル抗体と同一のエピトープに結合するモノクローナル抗体を得ればよい。なお、2つの抗体についてエピトープが同一か否かを調べる方法としては、競合実験による方法が挙げられる。例えば、K I J Y 2により産生される抗ヒトE p C A Mモノクローナル抗体を第一抗体とする。そして、当該第一抗体とヒトE p C A Mとの結合が、試験対象である第二抗体によって競合阻害を受ける場合には、当該第二抗体は、前記第一抗体と同じエピトープに結合するものであるといえる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 P 21/08		
		C 1 2 N 15/00	A	

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 BA08 BD22 CA25 CA44 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	抗人上皮细胞粘附分子的单克隆抗体和使用其检测循环肿瘤细胞的方法		
公开(公告)号	JP2014105159A	公开(公告)日	2014-06-09
申请号	JP2012256774	申请日	2012-11-22
[标]申请(专利权)人(译)	日本光电工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	日本光电工业株式会社		
[标]发明人	永井豊 高尾雅		
发明人	永井豊 高尾雅		
IPC分类号	C07K16/28 G01N33/574 G01N33/536 C12N5/10 C12P21/08 C12N15/09		
FI分类号	C07K16/28.ZNA G01N33/574.D G01N33/536.D G01N33/536.E C12N5/00.102 C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/06.100 C12N15/13 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/BD22 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种抗EpCAM单克隆抗体，其特异性识别不同于常规已知的抗EpCAM单克隆抗体识别的表位（N端EGF样结构域）的表位。一种抗人源上皮细胞粘附分子（EpCAM）的单克隆抗体，它与人源上皮细胞粘附分子（EpCAM）的CP区特异性反应，登录号为NITE BP-。杂交瘤1449产生的抗人源上皮细胞粘附分子（EpCAM）的单克隆抗体。
[选择图]图3

