

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02007/122820

発行日 平成21年9月3日(2009.9.3)

(43) 国際公開日 平成19年11月1日(2007.11.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00 A	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	4 H O 4 5
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/02 C	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2008-511970 (P2008-511970)	(71) 出願人	503196776
(21) 国際出願番号	PCT/JP2007/000423		株式会社ベルセウスプロテオミクス
(22) 国際出願日	平成19年4月18日(2007.4.18)		東京都目黒区駒場四丁目7番6号 パークビル
(31) 優先権主張番号	特願2006-114134 (P2006-114134)	(71) 出願人	504137912
(32) 優先日	平成18年4月18日(2006.4.18)		国立大学法人 東京大学
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		東京都文京区本郷七丁目3番1号
(31) 優先権主張番号	特願2006-291091 (P2006-291091)	(74) 代理人	110000084
(32) 優先日	平成18年10月26日(2006.10.26)		特許業務法人アルガ特許事務所
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100068700
(31) 優先権主張番号	特願2006-347544 (P2006-347544)		弁理士 有賀 三幸
(32) 優先日	平成18年12月25日(2006.12.25)	(74) 代理人	100077562
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膵臓癌の診断薬及び治療薬

(57) 【要約】

血中マーカーを用いて膵臓癌を診断および治療する新規方法を提供すること。
抗 A M I G O 2 抗体を含有する膵臓癌の診断薬および治療薬。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗 A M I G O 2 抗体を含有する膵臓癌診断薬。

【請求項 2】

抗 A M I G O 2 抗体が A M I G O 2 タンパク質細胞外領域と結合する抗体である請求項 1 記載の膵臓癌診断薬。

【請求項 3】

血液中、血清中、血漿中または臓器組織に抗 A M I G O 2 抗体を反応させて A M I G O 2 タンパク質を検出することにより使用されるものである請求項 1 又は 2 記載の膵臓癌診断薬。

【請求項 4】

標識した抗 A M I G O 2 抗体を投与後画像診断により A M I G O 2 タンパク質を検出することにより使用されるものである請求項 1 又は 2 記載の膵臓癌診断薬。

【請求項 5】

膵臓癌患者のうち、治療対象患者を選択するための診断薬である請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の膵臓癌診断薬。

【請求項 6】

抗 A M I G O 2 抗体の、膵臓癌診断薬の製造のための使用。

【請求項 7】

抗 A M I G O 2 抗体が A M I G O 2 タンパク質細胞外領域と結合する抗体である請求項 6 記載の使用。

【請求項 8】

血液中、血清中、血漿中または臓器組織に抗 A M I G O 2 抗体を反応させて A M I G O 2 タンパク質を検出することにより診断されるものである請求項 6 又は 7 記載の使用。

【請求項 9】

標識した抗 A M I G O 2 抗体を投与後画像診断により A M I G O 2 タンパク質を検出することにより診断されるものである請求項 6 又は 7 記載の使用。

【請求項 10】

被験者から採取された試料に抗 A M I G O 2 抗体を反応させ、当該試料中の A M I G O 2 タンパク質を検出することを特徴とする膵臓癌の診断方法。

【請求項 11】

被験者から採取された試料が血液、血清、血漿または臓器組織である請求項 10 記載の膵臓癌の診断方法。

【請求項 12】

抗 A M I G O 2 抗体を有効成分とする膵臓癌治療薬。

【請求項 13】

抗 A M I G O 2 抗体が A M I G O 2 タンパク質細胞外領域と結合する抗体である請求項 12 記載の膵臓癌治療薬。

【請求項 14】

抗 A M I G O 2 抗体が細胞傷害活性を有する抗体である請求項 12 記載の膵臓癌治療薬。

【請求項 15】

抗 A M I G O 2 抗体がアイソトープ標識あるいは細胞傷害活性を有する化合物を結合させた抗体である請求項 12 記載の膵臓癌治療薬。

【請求項 16】

抗 A M I G O 2 抗体の、膵臓癌治療薬の製造のための使用。

【請求項 17】

抗 A M I G O 2 抗体が A M I G O 2 タンパク質細胞外領域と結合する抗体である請求項 16 記載の膵臓癌治療薬の使用。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

抗 A M I G O 2 抗体が細胞傷害活性を有する抗体である請求項 1 6 記載の使用。

【請求項 1 9】

抗 A M I G O 2 抗体がアイソトープ標識あるいは細胞傷害活性を有する化合物を結合させた抗体である請求項 1 6 記載の使用。

【請求項 2 0】

抗 A M I G O 2 抗体を投与することを特徴とする、膵臓癌治療方法。

【請求項 2 1】

抗 A M I G O 2 抗体が A M I G O 2 タンパク質細胞外領域と結合する抗体である請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】

抗 A M I G O 2 抗体が細胞傷害活性を有する抗体である請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 3】

抗 A M I G O 2 抗体がアイソトープ標識あるいは細胞傷害活性を有する化合物を結合させた抗体である請求項 2 0 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、抗 A M I G O 2 抗体を利用した膵臓癌の診断薬及び治療薬に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

膵臓癌患者は、毎年増加する傾向にあり、2 0 0 1 年の日本国内の年間死亡者数は、約 2 万人である。また、男性の癌死の第 5 位、女性の癌死の第 6 位をそれぞれ占めている。膵臓癌は予後が悪く、切除例の 5 年生存率は 5 ~ 2 0 % である。膵臓癌の予後が悪い原因は、癌病巣が 2 c m 程度のときに、既に膵臓の外に浸潤をきたし、肝臓に転移するケースが多いためである。従って、膵臓癌は早期診断が非常に重要であるが、現在のところ膵臓癌が周囲臓器に浸潤する前に診断する方法は、存在していない。

【0 0 0 3】

日本国内の全国調査では、最初に膵臓癌を発見した方法として、C T が 4 4 % と最も多く、超音波が 4 1 % である。従って、現在この 2 つの検査方法が膵臓癌の診断に重要である。しかし、現在一般的に使用されている C T の場合、癌組織と非癌組織の区別がつきにくく、診断に熟練した技術を要する。膵臓癌の腫瘍マーカーには、C A 1 9 - 9、D U P A N - 2、S p a n - 1、C E A などがある。これらのマーカーは、いずれも進行癌で陽性となるが、早期の診断率は低く、早期診断に有用と言えるマーカーはない。さらに、C A 1 9 - 9 は肝炎、肝硬変、膵炎のような非悪性腫瘍でも血中濃度が上昇するため、膵臓癌の診断への使用は、適切ではないことが知られている。

【0 0 0 4】

F D G - P E T による膵臓癌診断も実施されているが、検査コストが高いことや、画像の分解能が悪い、などといった問題がある。従って、P E T 検査の費用対効果や効率を考慮した場合、膵臓癌組織を特異的に認識するプローブを開発し、高精度な診断方法を開発することが望まれている。

【0 0 0 5】

一方、膵臓癌の治療は、手術、化学療法、放射線療法により行われる。全症例のうち切除が可能なものは、4 0 % 以下である。術後の 5 年生存率は 5 ~ 2 0 % と、極めて低い。手術による合併症の併発も多く、問題となっている。局所進展や遠隔転移によって見つかった膵臓癌の多くは、手術適応にはならず、化学療法や放射線療法を適応する。放射線療法は、消化管への負担が少ないため、外来でも施行可能であるため、近年では症例が増加する傾向にある。

【0 0 0 6】

従って、膵臓癌診断においては、簡便かつ的確な検査が可能な新たな膵臓癌診断マーカーが求められている。また、膵臓癌の治療においては、非侵襲的で、かつ効果的な治療方

10

20

30

40

50

法、すなわち、膵臓癌細胞に対して特異的に傷害を与える治療薬の開発が望まれている。

【0007】

近年、癌細胞に特異的に発現されているタンパク質を標的にした癌の診断および治療法の開発が盛んである。すなわち、癌細胞に高発現であるが、正常組織では発現が少ないかあるいは発現していない細胞表面タンパク質をターゲットとして、血液および組織等を用いた診断および治療を行う方法である。既に、ハーセプチン等の診断および治療薬が臨床の場に提供され、多くの患者の治療に貢献しているが、さらに、他の癌についても特異的な治療薬の開発が望まれている。

【0008】

AMIGO2は、同じファミリーであるAMIGO1及びAMIGO3と、アミノ酸数、ドメイン、及び遺伝子配列のホモロジーが極めて類似している。これらは全て、1回膜貫通型タンパク質で、シグナルペプチドを持つ。このことは、AMIGO2タンパク質が膜タンパク質であると同時に、血液中にも分泌される可能性を示唆している。AMIGOファミリーのタンパク質の構造は、全て類似し細胞外に6つのLeucine repeats (LRRs)を持ち、これらのドメインを挟むようにしてLRRアミノ末端ドメインとLRRカルボキシル末端ドメインが存在する。また、細胞外の膜貫通ドメインの近くには、immunoglobulinドメインが存在する。AMIGOファミリーは、神経組織に発現し、細胞接着分子として機能することが示唆されている(非特許文献1)。

10

【0009】

特許文献1および特許文献2には胃癌、甲状腺癌、乳癌、子宮癌、腎臓癌、肺癌、大腸癌および脳腫瘍についてAMIGO2遺伝子発現亢進の記載があるものの、膵臓癌ではAMIGO2遺伝子発現が正常組織と差がないことを示している。さらに、これら文献における抗体を用いた実施例においては、ラット胎児脳における分化進展に伴うAMIGOのタンパク質発現を免疫染色、免疫沈降、ウェスタンブロットにて確認しているにすぎず、具体的に抗AMIGO2抗体が癌の診断や治療に使用できるとの記載はない。

20

【非特許文献1】J Cell Biol. 2003 Mar 17; 160(69): 963-73.

【特許文献1】国際公開W02004/003165パンフレット

【特許文献2】国際公開W02004/055055パンフレット

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

膵臓癌は他の癌と同様に、早期の治療が予後を決定付けるため、初期の癌を診断する必要がある。しかし、現在の技術では、膵臓癌を早期診断する技術は存在しない。一方、膵臓癌の手術による治療は、転移巣の治療が困難であるばかりでなく、侵襲と合併症の併発を伴うことが多い。また、放射線治療については、健常組織への被爆が問題である。

【0011】

本発明の目的は、精度良く、早期膵臓癌を診断する方法と、効果的な治療方法を提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0012】

従来の研究では、膵臓癌組織にはAMIGO2遺伝子の発現が認められないと報告されていたが、意外にも、本発明者らは、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果より、膵臓癌組織において、AMIGO2遺伝子の発現量が正常な膵臓組織よりも多いことを見出した。さらに、AMIGO2タンパク質に対する抗体を作製し、以下の目的に合致した抗体を選択した。

1) ELISA測定系用を選択した抗AMIGO2モノクローナル抗体PPZ3122およびPPZ3133により膵臓癌細胞株抽出液および培養液中に放出されたAMIGO2タンパク質を検出することに成功した。

50

2) また、免疫染色用に選択した抗 AM I G O 2 モノクローナル抗体 P P Z 2 9 1 3、P P Z 2 9 5 2 および P P Z 3 1 3 0 では、膵臓癌患者摘出組織において、約 8 3 % の患者で陽性であることが確認できた。

3) さらに、良好に細胞増殖に影響を及ぼす抗体として抗 AM I G O 2 モノクローナル抗体 P P Z 2 9 1 9、P P Z 2 9 5 2、P P Z 3 1 2 2、P P Z 3 1 2 4、P P Z 3 1 3 5 および P P Z 3 1 4 8 を選択した。

4) それら抗体は、*in vitro* 試験において AM I G O 2 全長発現 C H O クローンあるいは膵臓癌細胞株である P K - 4 5 P への抗 AM I G O 2 抗体の投与において細胞傷害活性の指標とされる C D C および / あるいは A D C C 活性を示した。

5) さらに、*scid* マウスを用いた *in vivo* 試験において、膵臓癌細胞株 P K - 4 5 P および AM I G O 2 強制発現膵臓癌細胞株 M I A P a C a 2 のマウスへの生着および増殖を抗 AM I G O 2 抗体が抑制した。

6) また、膵臓癌細胞株 P K - 4 5 P を担癌させた *scid* マウスに蛍光物質で標識した抗 AM I G O 2 抗体を投与し、*in vivo* 蛍光イメージングによって腫瘍塊への抗 AM I G O 2 抗体の集積を確認できた。

7) 細胞表面上に存在する AM I G O 2 に結合した抗 AM I G O 2 抗体を介し、細胞傷害性を持つ物質がエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることで細胞増殖抑制効果が認められた。

以上 1) ~ 7) のことから、本発明を完成させるに至った。

【 0 0 1 3 】

すなわち、本発明は、抗 AM I G O 2 抗体を含有する膵臓癌の診断薬及び治療薬を提供するものである。

【 0 0 1 4 】

また、本発明は、抗 AM I G O 2 抗体の、膵臓癌診断薬の製造のための使用を提供するものである。

また、本発明は、抗 AM I G O 2 抗体の、膵臓癌治療薬の製造のための使用を提供するものである。

【 0 0 1 5 】

また、本発明は、被験者から採取された試料に抗 AM I G O 2 抗体を反応させ、あるいは被験者に抗 AM I G O 2 抗体を投与して、AM I G O 2 タンパク質を検出することを特徴とする膵臓癌の診断方法を提供するものである。

さらに、本発明は、抗 AM I G O 2 抗体を投与することを特徴とする膵臓癌の治療方法を提供するものである。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 6 】

従来の代表的な癌の画像診断である、グルコース類似物質を用いた陽電子放出核種で標識した物質をプローブとする *Positron Emission Tomography* (F D G - P E T) は、膵臓癌の初期診断において偽陽性や偽陰性が多い。

本発明によれば、特異的に検出できる分子イメージング (P E T) で行う方法および血液診断ならびにバイオプシーにより採取した組織を用いた診断 (生検) が可能となり、早急に新たな治療計画の策定が可能となる。また、手術を伴わず、患者に負担をかけない膵臓癌の非侵襲的な治療の実施が可能となる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 7 】

【 図 1 - a 】 *GeneChip* U 1 3 3 を用いた AM I G O 2 の遺伝子発現解析の結果を示す。 : 正常組織、非癌部における AM I G O 2 遺伝子の発現解析

【 図 1 - b 】 *GeneChip* U 1 3 3 を用いた AM I G O 2 の遺伝子発現解析の結果を示す。 : 臨床検体における AM I G O 2 遺伝子の発現解析

【 図 1 - c 】 *GeneChip* U 1 3 3 を用いた AM I G O 2 の遺伝子発現解析の結果を示す。 : 癌細胞株における AM I G O 2 遺伝子の発現解析

10

20

30

40

50

【図2】GeneChip U133 plus 2を用いた膵癌臨床検体におけるAMIGO 2の遺伝子発現解析の結果を示す。

【図3】精製sAMIGO 2の非還元下のSDS-PAGEによる解析結果を示す。

【図4】市販の抗AMIGO 2モノクローナル抗体を用いたAMIGO 2全長発現CHOクローン(EXZ1005)ライゼートおよび膵癌細胞株ライゼートのウェスタンブロットによる解析結果を示す。

【図5】AMIGO 2全長発現CHOクローン(EXZ1005)のフローサイトメトリーによる解析結果を示す。

【図6】膵癌細胞株PK-45Pのフローサイトメトリーによる解析結果を示す。

【図7】AMIGO 2全長発現CHOクローン(EXZ1005)を標的細胞としたCDC活性の定量的解析結果を示す。

【図8】膵癌細胞株PK-45Pを標的細胞としたCDC活性の定量的解析結果を示す。

【図9】抗AMIGO 2抗体による膵癌組織の免疫組織染色の結果を示す。

【図10】膵癌細胞株をscidマウスに移植し形成された腫瘍塊の免疫染色の結果を示す。

【図11】膵癌細胞株を移植したscidマウスにおける抗AMIGO 2モノクローナル抗体(サブクラスがIgG1の抗体群)の腫瘍生着・増殖抑制試験の評価結果を示す。

【図12】膵癌細胞株を移植したscidマウスにおける抗AMIGO 2モノクローナル抗体(サブクラスがIgG2aの抗体群)の腫瘍生着・増殖抑制試験の評価結果を示す。

【図13】AMIGO 2強制発現膵癌細胞株MIA PaCa2および、野生株MIA PaCa2でのAMIGO 2の免疫染色結果を示す。

【図14】AMIGO 2強制発現膵癌細胞株を移植したscidマウスにおける抗AMIGO 2モノクローナル抗体の腫瘍生着抑制に関する評価結果を示す。

【図15】AMIGO 2強制発現膵癌細胞株を移植したscidマウスにおける抗AMIGO 2モノクローナル抗体PPZ3124の腫瘍増殖抑制に関する評価結果を示す。

【図16】AMIGO 2強制発現膵癌細胞株を移植したscidマウスにおける抗AMIGO 2モノクローナル抗体PPZ3148の腫瘍増殖抑制に関する評価結果を示す。

【図17】scidマウスに膵癌細胞株を移植して形成させた腫瘍への抗AMIGO 2モノクローナル抗体の集積をin vivo蛍光イメージングにより確認した結果を示す。

【図18】抗AMIGO 2モノクローナル抗体が細胞膜表面上のAMIGO 2に結合することでエンドサイトーシスされることを確認した結果を示す。

【図19】細胞傷害活性を持つ物質のコンジュゲート抗体によるAMIGO 2発現細胞の増殖抑制効果を調べた結果を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本発明により、診断及び治療される疾患は、膵臓癌である。診断及び治療の対象となる動物は、ヒトであることが好ましいが、イヌ、ネコ、ウサギ、マウス、ラット、モルモット等の哺乳類でも良い。

【0019】

本発明において膵臓癌診断を行う場合、被験者の血液中および臓器組織にAMIGO 2タンパク質が検出された場合に、被験者が膵臓癌である可能性が高いと判定される。また、膵臓癌と診断された患者の血液あるいは組織中AMIGO 2タンパク質濃度を測定することにより、その患者が治療対象患者か否かを判定すること(治療対象患者の選択)ができる。さらに、膵臓癌の治療後、AMIGO 2タンパク質測定において、AMIGO 2タンパク質の量が術前より減少した場合、治療の経過が良好であると判定される。一方、治療後のAMIGO 2タンパク質の量が低下しないあるいは増加する場合には、再発および転移があると判定される。膵臓癌診断は、画像診断、生検および血液診断により行うことができる。

【0020】

画像診断においては、標識した抗AMIGO 2抗体を投与後画像診断によりAMIGO

10

20

30

40

50

2タンパク質を検出することにより行うことができる。より具体的には、抗AMIGO2抗体に、標識物質として放射性同位元素で標識したプローブを被験者に投与し、PETまたはSPECTで癌組織を検出することができる。使用する放射性同位元素は、当業者に公知の物質を用いることができるが、好ましくは陽電子放出放射性同位元素であり、さらに好ましくは ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{18}F 、 ^{15}O 、 ^{94}mTc 、 ^{124}I である。抗AMIGO2抗体への放射性同位元素の標識は、当業者公知の方法により行うことができる。

【0021】

生検により膵臓癌診断を行う方法としては、被験者から得られた臓器組織を試料として、免疫学的測定法を行うことができる。例えば、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイ、免疫沈降法、免疫比濁法、ウェスタンブロット、免疫染色、免疫拡散法などを挙げることができるが、好ましくは免疫染色である。免疫染色などの上述した免疫学的方法は当業者に公知の方法により行うことが可能である。

10

【0022】

生検により膵臓癌診断を行う他の様態として、抗AMIGO2抗体を一次抗体として使用した免疫組織学的染色法を行うことができる。具体的には、被験者から得られた検体を公知の方法によりパラフィンや凍結等により固定し、切片を作製する。次いで、切片を一次抗体として抗AMIGO2抗体、二次抗体としてIgGを認識するビオチン標識抗体をそれぞれ用いて処理する。二次抗体は、IgGを認識する公知の抗体を用いることができ、例えばウサギ抗IgG抗体などを挙げることができる。二次抗体に標識物質を結合させ、それぞれの標識物質に適した公知の方法により、切片中のAMIGO2タンパク質の有無を検出する。また、二次抗体を使用せず、抗AMIGO2抗体に標識物質を結合させ、免疫組織学的染色法を行うこともできる。標識物質は当業者公知の物質を用いることができるが、例えばペルオキシターゼ、FITCなどを挙げることができる。抗体と標識物質の結合は、当業者に公知の方法で行うことができ、具体的には、ストレプトアビジンとビオチンを利用した結合方法を挙げることができる。

20

【0023】

膵臓癌診断を行う他の様態としては、被験者から得られた血液、血清、または血漿を試料として、免疫学的測定法を行うことができる。例えば、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイ、免疫沈降法、免疫比濁法、ウェスタンブロット、免疫拡散法などを挙げることができるが、好ましくはエンザイムイムノアッセイであり、特に好ましいのは酵素結合免疫吸着定量法(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)(例えば、sandwich ELISA)である。ELISAなどの上述した免疫学的方法は当業者に公知の方法により行うことが可能である。

30

【0024】

血液、血清、または血漿を検体とした膵臓癌診断方法としては、例えば、抗AMIGO2抗体を支持体に固定し、ここに被検試料を加え、インキュベーションを行い抗AMIGO2抗体とタンパク質を結合させた後に洗浄して、抗AMIGO2抗体を介して支持体に結合したAMIGO2タンパク質の検出を行う方法を挙げることができる。

40

【0025】

本発明において抗AMIGO2抗体を固定するために用いられる支持体としては、例えば、アガロース、セルロースなどの不溶性の多糖類、シリコン樹脂、ポリスチレン樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、ナイロン樹脂、ポリカーボネイト樹脂などの合成樹脂や、ガラス、フェライトなどの不溶性の支持体を挙げることができる。これらの支持体は、ビーズやプレートなどの形状で用いることが可能である。ビーズの場合、これらが充填されたカラムなどを用いることができる。プレートの場合、マルチウェルプレート(96穴マルチウェルプレート等)、やバイオセンサーチップなどを用いることができる。抗AMIGO2抗体と支持体との結合は、化学結合や物理的な吸着などの通常用いられる方法により結合することができる。これらの支持体はすべて市販のものを用いることができる。

50

【 0 0 2 6 】

抗 A M I G O 2 抗体と試料中の A M I G O 2 タンパク質の結合は、通常、緩衝液中で行われる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、T r i s 緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸塩緩衝液、炭酸塩緩衝液などが使用され、通常用いる pH の範囲であればよい。また、インキュベーションの条件としては、すでによく用いられている条件、例えば、4 ~ 37 にて1時間 ~ 24時間のインキュベーションが行われる。インキュベート後の洗浄は、抗 A M I G O 2 抗体と A M I G O 2 タンパク質の結合を妨げないものであれば何でもよく、例えば、T w e e n - 2 0 等の界面活性剤を含む緩衝液などが使用される。

【 0 0 2 7 】

本発明による A M I G O 2 タンパク質の検出方法においては、A M I G O 2 タンパク質を検出したい被検試料の他に、コントロール試料を設置してもよい。コントロール試料としては、A M I G O 2 タンパク質を含まない陰性コントロール試料や A M I G O 2 タンパク質を含む陽性コントロール試料などがある。この場合、A M I G O 2 タンパク質を含まない陰性コントロール試料で得られた結果と、A M I G O 2 タンパク質を含む陽性コントロール試料で得られた結果と比較することにより、被検試料中の A M I G O 2 タンパク質を検出することが可能である。また、濃度を段階的に変化させた一連のコントロール試料を調製し、各コントロール試料に対する検出結果を数値として得て、標準曲線を作成し、被検試料の数値から標準曲線に基づいて、被検試料に含まれる A M I G O 2 タンパク質を定量的に検出することも可能である。

【 0 0 2 8 】

抗 A M I G O 2 抗体を介して支持体に結合した A M I G O 2 タンパク質の検出の好ましい態様として、標識物質で標識された抗 A M I G O 2 抗体を用いる方法を挙げることができる。例えば、支持体に固定された抗 A M I G O 2 抗体に被検試料を接触させ、洗浄後に、A M I G O 2 タンパク質を特異的に認識する標識抗体を用いて検出する。

【 0 0 2 9 】

抗 A M I G O 2 抗体の標識は通常知られている方法により行うことが可能である。標識物質としては、蛍光色素、酵素、補酵素、化学発光物質、放射性物質などの当業者に公知の標識物質を用いることが可能であり、具体的な例としては、ラジオアイソトープ (^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I など)、フルオレセイン、ローダミン、ダンシルクロリド、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ホースラディッシュパーオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ピオチン、ルテニウムなどを挙げることができる。標識物質としてピオチンを用いる場合には、ピオチン標識抗体を添加後に、ペルオキシダーゼなどの酵素を結合させたストレプトアビジンをさらに添加することが好ましい。標識物質と抗 A M I G O 2 抗体との結合には、グルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法、過ヨウ素酸法、などの公知の方法を用いることができる。

【 0 0 3 0 】

具体的には、抗 A M I G O 2 抗体を含む溶液をプレートまたはビーズなどの支持体に加え、抗 A M I G O 2 抗体を支持体に固定する。プレート、またはビーズを洗浄後、タンパク質の非特異的な結合を防ぐため、例えば B S A、ゼラチン、アルブミンなどでブロッキングする。再び洗浄し、被検試料をプレートまたはビーズに加える。インキュベートの後、洗浄し、標識抗 A M I G O 2 抗体を加える。適度なインキュベーションの後、プレートまたはビーズを洗浄し、支持体に残った標識抗 A M I G O 2 抗体を検出する。検出は当業者に公知の方法により行うことができ、例えば、放射性物質による標識の場合には液体シンチレーションや R I A 法により検出することができる。酵素による標識の場合には基質を加え、基質の酵素的変化、例えば発色を吸光度計により検出することができる。基質の具体的な例としては、2, 2 - アジノビス (3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸) ジアンモニウム塩 (A B T S)、1, 2 - フェニレンジアミン (オルソ - フェニレンジアミン)、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (T M B)などを挙げるこ

10

20

30

40

50

ができる。蛍光物質または化学発光物質の場合にはルミノメーターにより検出することができる。

【0031】

本発明のAMIGO2タンパク質検出方法の特に好ましい態様として、ビオチンで標識された抗AMIGO2抗体と、ストレプトアビジンを用いる方法を挙げることができる。

【0032】

具体的には、抗AMIGO2抗体を含む溶液をプレートなどの支持体に加え、抗AMIGO2抗体を固定する。プレートを洗浄後、タンパク質の非特異的な結合を防ぐため、例えばBSAなどでブロッキングする。再び洗浄し、被検試料をプレートに加える。インキュベーションの後、洗浄し、ビオチン標識抗AMIGO2抗体を加える。適度なインキュベーションの後、プレートを洗浄し、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼなどの酵素と結合したアビジンを加える。インキュベーション後、プレートを洗浄し、アビジンに結合している酵素に対応した基質を加え、基質の酵素的変化などを指標にAMIGO2タンパク質を検出する。

【0033】

本発明のAMIGO2タンパク質検出方法の他の態様として、AMIGO2タンパク質を特異的に認識する一次抗体を一種以上、および該一次抗体を特異的に認識する二次抗体を一種以上用いる方法を挙げることができる。

【0034】

例えば、支持体に固定された一種以上の抗AMIGO2抗体に被検試料を接触させ、インキュベーションした後、洗浄し、洗浄後に結合しているAMIGO2タンパク質を、一次抗AMIGO2抗体、および該一次抗体を特異的に認識する一種以上の二次抗体により検出する。この場合、二次抗体は好ましくは標識物質により標識されている。

【0035】

本発明のAMIGO2タンパク質の検出方法の他の態様としては、凝集反応を利用した検出方法を挙げることができる。該方法においては、抗AMIGO2抗体を感作した担体を用いてAMIGO2タンパク質を検出することができる。抗体を感作する担体としては、不溶性で、非特異的な反応を起こさず、かつ安定である限り、いかなる担体を使用してもよい。例えば、ラテックス粒子、ベントナイト、コロジオン、カオリン、固定羊赤血球等を使用することができるが、ラテックス粒子を使用するのが好ましい。ラテックス粒子としては、例えば、ポリスチレンラテックス粒子、スチレン-ブタジエン共重合体ラテックス粒子、ポリビニルトルエンラテックス粒子等を使用することができるが、ポリスチレンラテックス粒子を使用するのが好ましい。感作した粒子を試料と混合し、一定時間攪拌する。試料中にAMIGO2タンパク質が高濃度で含まれるほど粒子の凝集度が大きくなるので、凝集を肉眼でみることによりAMIGO2タンパク質を検出することができる。また、凝集による濁度を分光光度計等により測定することによっても検出することが可能である。

【0036】

本発明のタンパク質の検出方法の他の態様としては、例えば、表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを用いた方法を挙げることができる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーはタンパク質-タンパク質間の相互作用を微量のタンパク質を用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である。例えば、Biacore (Biacore International AB社製)等のバイオセンサーを用いることにより抗AMIGO2抗体とAMIGO2タンパク質との結合をそれぞれ検出することが可能である。具体的には抗AMIGO2抗体を固定化したセンサーチップに、被検試料を接触させ抗AMIGO2抗体に結合するAMIGO2タンパク質を共鳴シグナルの変化としてそれぞれ検出することができる。

【0037】

本発明の検出方法は、種々の自動検査装置を用いて自動化することもでき、一度に大量

10

20

30

40

50

の試料について検査を行うことも可能である。

【0038】

本発明の膵臓癌診断薬は、キットの形態であってもよい。本発明の膵臓癌診断薬は少なくとも抗AMIGO2抗体を含む。該診断薬がELISA法等のEIA法に基づく場合は、抗体を固相化する担体を含んでいてもよく、抗体があらかじめ担体に結合していてもよい。該診断薬がラテックス等の担体を用いた凝集法に基づく場合は抗体が吸着した担体を含んでいてもよい。また、該診断薬は、適宜、ブロッキング溶液、反応溶液、反応停止液、試料を処理するための試薬等を含んでいてもよい。

【0039】

本発明の生検組織および血液などの試料を用いた診断用抗AMIGO2抗体は、AMIGO2タンパク質にそれぞれ特異的に結合すればよく、その由来、種類（モノクローナル、ポリクローナル）および形状を問わない。具体的には、マウス抗体、ラット抗体、トリ抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体などの公知の抗体を用いることができる。抗体はポリクローナル抗体でもよいが、モノクローナル抗体であることが好ましく、高感度で特異的な測定が可能であれば、市販されている抗体を使用してもよい。

10

【0040】

又、支持体に固定される抗AMIGO2抗体と標識物質で標識される抗AMIGO2抗体は、AMIGO2タンパク質の同じエピトープを認識してもよいが、異なるエピトープを認識することが好ましく、部位は特に制限されない。

【0041】

本発明において膵臓癌の治療を行う場合、抗AMIGO2抗体と膵臓癌細胞に発現したAMIGO2タンパク質を特異的に結合させ、膵臓癌細胞に傷害を与えることにより行うことができる。細胞傷害は、抗AMIGO2抗体の細胞傷害活性、例えばADCC活性又はCDC活性を利用することができる。

20

【0042】

本発明の膵臓癌治療および画像診断に用いられる抗体は、AMIGO2タンパク質と特異的に結合する限り、モノクローナル抗体であればキメラ抗体、ヒト化（CDR移植）抗体、ヒト抗体のいずれであっても良い。また、それら抗体は、膵臓癌に対する治療効果があれば、市販されている抗体を使用してもよい。好ましくは細胞傷害活性を有する抗体である。さらに、本発明で使用される抗体は、糖鎖を改変された抗体であっても良い。抗体の糖鎖を改変することにより、抗体の細胞傷害活性を増強できる。また、膵臓癌治療に用いられる抗体は、抗癌作用を有する抗体であれば良く、抗腫瘍効果のある物質を結合させた抗体でも良い。モノクローナル抗体に抗腫瘍効果を持つ薬物や放射性同位元素を結合させたモノクローナル抗体により、癌の治療が可能である。

30

【0043】

本発明における細胞傷害活性とは、例えば抗体依存性細胞介在性細胞傷害（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity：ADCC）活性、補体依存性細胞傷害（complement-dependent cytotoxicity：CDC）活性などを挙げることができる。本発明においてCDC活性とは補体系による細胞傷害活性を意味し、ADCC活性とは標的細胞の細胞表面抗原に特異的抗体が付着した際、そのFc部分にFc受容体保有細胞（免疫細胞等）がFc受容体を介して結合し、標的細胞に傷害を与える活性を意味する。

40

【0044】

抗AMIGO2抗体がADCC活性を有するか否か、又はCDC活性を有するか否かは公知の方法により測定することができる。例えば、予め標的細胞に取り込ませた放射性物質⁵¹Crの放出を指標にした方法[Martin R. et al. (1990) Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. J. Immunol. 145,

50

540.等]、予め標的細胞に取り込ませた蛍光物質 Calcein の放出を指標にした方法 [Lichtenfels R. et al. (1994) CARE-LASS (calcein-release-assay), an improved fluorescence-based test system to measure cytotoxic T lymphocyte activity. J. Immunol. Methods 172, 227.等]、標的細胞に内在する乳酸脱水素酵素 (LDH) の放出を指標にした方法 [Korzeniewski C. and Callewaert D M. (1983) An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. J. Immunol. Methods 64, 313.等]が報告されている。

10

具体的には、まず、エフェクター細胞、補体溶液、標的細胞の調製を行う。

(1) エフェクター細胞の調製

BALB/cマウスなどから脾臓を摘出し、RPMI 1640培地 (Invitrogen社製) 中で脾臓細胞を分離する。5-10%ウシ胎児血清 (FBS) を含む同培地で洗浄後、細胞濃度を $5 \times 10^6 / \text{mL}$ に調製し、エフェクター細胞を調製する。

(2) 補体溶液の調製

Baby Rabbit Complement (CEDARLANE社製) を5-10% FBS含有 RPMI 1640 (Invitrogen社製) にて適宜希釈し、補体溶液を調製する。

(3) 標的細胞の調製

AMIGO2を発現する細胞 (AMIGO2をコードする遺伝子で形質転換された細胞、腫瘍細胞) を用意する。予め標的細胞に取り込ませた放射性物質 ^{51}Cr の放出を指標にした方法で細胞傷害活性を測定する場合は 0.2 mCi の ^{51}Cr -クロム酸ナトリウム (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) とともに、細胞を10% FBS含有 DMEM培地中で37 にて1時間培養することにより放射体標識する。放射体標識後、細胞を10% FBS含有 DMEM培地にて3回洗浄し、細胞濃度を $2 \times 10^5 / \text{mL}$ に調製して標的細胞を調製する。

20

予め標的細胞に取り込ませた蛍光物質の放出を指標にした方法で細胞傷害活性を測定する場合は $25 \mu\text{M}$ の Calcein-AM [3', 6'-Di(O-acetyl)-4', 5'-bis[N, N-bis(carboxymethyl)aminomethyl] fluorescein, tetraacetoxymethyl ester] とともに、細胞を PBS (Phosphate-Buffered Saline) 中で37 にて30分間培養することにより蛍光標識する。蛍光標識後、細胞を5% FBS含有 DMEM培地 (フェノールレッド不含) で2回洗浄し、細胞濃度を $2 \times 10^5 / \text{mL}$ に調製して標的細胞を調製する。標的細胞に内在する乳酸脱水素酵素 (LDH) の放出を指標にした方法で細胞傷害活性を測定する場合には、細胞を濃度 $2 \times 10^5 / \text{mL}$ に調製してそのまま用いる。

30

次いで、ADCC活性、又はCDC活性の測定を行う。ADCC活性の測定の場合は、96ウェルU底プレート (Beckton Dickinson社製) に、標的細胞と、抗AMIGO2抗体を $50 \mu\text{L}$ ずつ加え、氷上にて15分間反応させる。その後、エフェクター細胞 $100 \mu\text{L}$ を加え、炭酸ガスインキュベーター内で4時間培養する。培養後、 $100 \mu\text{L}$ の上清を回収し、 ^{51}Cr の放出を指標とする場合にはガンマカウンター (COBRA IIAUTO-GMMA、MODEL D5005、Packard Instrument Company社製) で放射活性を測定する。細胞傷害活性 (%) は $(A - C) / (B - C) \times 100$ により求めることができる。Aは各試料における放射活性 (cpm)、Bは1% Triton-X 100などの界面活性剤を加えて細胞を全溶解した試料における放射活性 (cpm)、Cは標的細胞のみを含む試料の放射活性 (cpm) を示す。蛍光物質 Calcein の放出を指標とする場合には蛍光プレートリーダー (励起波長 485 nm / 蛍光波長 520 nm) で蛍光強度を測定する。標的細胞に内在する LDH の放出を指標とする場合には、LDHとDiaphoraseの共役反応によってテトラ

40

50

ゾリウム塩から生成される赤色のホルマザンをマイクロプレートリーダー（波長490nm）で測定する。

一方、CDC活性の測定の場合は、96ウェルU底プレート（Becton Dickinson社製）に、標的細胞50 μ Lと、抗AMIGO2抗体20 μ Lを加え、氷上で30分間反応させる。その後、補体溶液10 μ Lを加え、炭酸ガスインキュベーター内で4時間培養する。培養後、50 μ Lの上清を回収し、放射活性などを測定する。細胞傷害活性はADCC活性の測定と同様にして求めることができる。

【0045】

さらに、抗AMIGO2抗体は、膵臓癌治療薬として癌組織に特異的にターゲティングさせるミサイル療法に用いることができる。すなわち、癌細胞に傷害をもたらす薬物を結合させた抗体を投与することにより、癌部特異的に移行させ、治療効果および副作用の軽減を意図した治療方法である。

薬物と抗体の結合は、当業者に公知の方法で行うことができる（Clin Cancer Res. 2004 Jul 1; 10(13): 4538-49.）。抗体に結合させる薬物は、癌細胞に傷害をもたらす公知の物質を用いることができるが、好ましくは抗癌剤と毒素であり、さらに好ましくはCalicheamicin、DM1、DM4、リシン、PseudomonasエキソトキシンAである。

【0046】

膵臓癌治療に用いられる抗体は、AMIGO2タンパク質と特異的に結合する抗体に、癌細胞に傷害をもたらす放射性同位元素を結合することにより、細胞傷害活性を付加あるいは増強させたものでもよい。抗体と放射性同位元素の結合は、当業者公知の方法により、行うことができる（Bioconj Chem. 1994 Mar-Apr; 5(2): 101-4.）。利用する放射性同位元素は、当業者に公知の物質を用いることができるが、好ましくは線や線を放出する核種であり、さらに好ましくは ^{131}I 、 ^{90}mTc 、 ^{111}In 、 ^{90}Y である。

【0047】

放射性同位元素を含む化合物を結合させた抗体を用いた膵臓癌治療は、当業者公知の方法により行うことができる（Bioconj Chem. 1998 Nov-Dec; 9(6): 773-82.）。具体的には、最初に少量の放射性同位元素を含む化合物を結合させた抗体を患者に投与し、全身のシンチグラムを行う。正常組織の細胞と抗体の結合が少なく、癌細胞と抗体の結合が多いことを確認した上で、放射性同位元素を含む化合物を結合させた抗体を大量に投与する。

【0048】

本発明で使用される抗AMIGO2抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗AMIGO2抗体として、哺乳動物由来あるいはトリ由来モノクローナル抗体が好ましい。特に、哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマにより産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものを含む。

【0049】

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、AMIGO2タンパク質を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

【0050】

まず、抗体取得の感作抗原として使用されるAMIGO2タンパク質はGenBank番号（NM 181847）に開示された遺伝子/アミノ酸配列（配列番号1及び2）を発現することによって得る。すなわち、AMIGO2タンパク質をコードするそれぞれの

10

20

30

40

50

遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のヒト AMIGO2 タンパク質を公知の方法で精製する。また、天然の AMIGO2 タンパク質を精製して用いることもできる。

【0051】

次に、この精製 AMIGO2 タンパク質を感作抗原として用いる。あるいは、AMIGO2 タンパク質の部分ペプチドを感作抗原として使用することもできる。この際、部分ペプチドはヒト AMIGO2 タンパク質のアミノ酸配列より化学合成により得ることもできるし、ヒト AMIGO2 遺伝子の一部を発現ベクターに組込んで得ることもでき、さらに天然のヒト AMIGO2 タンパク質をタンパク質分解酵素により分解することによっても得ることができる。部分ペプチドとして用いるヒト AMIGO2 タンパク質の部分および大きさは限られない。

10

【0052】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはトリ、ウサギ、サル等が使用される。

【0053】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的な方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原を PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4~21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。特に分子量の小さい部分ペプチドを感作抗原として用いる場合には、アルブミン、キーホールリンペットヘモシアン等

20

【0054】

このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

【0055】

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfré, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が好適に使用される。

30

40

【0056】

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

【0057】

より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、セン

50

ダイウイルス（HVJ）等が使用され、さらに所望により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添加使用することもできる。

【0058】

免疫細胞とミエローム細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローム細胞に対して免疫細胞を1～10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローム細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできる。

【0059】

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローム細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液（例えば平均分子量1000～6000程度）を通常30～60%（w/v）の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

10

【0060】

このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、数日～数週間）継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングを行う。

20

【0061】

目的とする抗体のスクリーニングおよび単一クローニングは、公知の抗原抗体反応に基づくスクリーニング方法で行えばよい。例えば、ポリスチレン等でできたビーズや市販の96ウェルのマイクロタイプレート等の担体に抗原を結合させ、ハイブリドーマの培養上清と反応させ、担体を洗浄した後に酵素標識二次抗体等を反応させることにより、培養上清中に感作抗原と反応する目的とする抗体が含まれるかどうか決定できる。目的とする抗体を産生するハイブリドーマを限界希釈法等によりクローニングすることができる。この際、抗原としては免疫に用いたものを用いればよい。

30

【0062】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を*in vitro*で、AMIGO2タンパク質に感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分能を有するミエローム細胞と融合させ、AMIGO2タンパク質への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878号公報参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるAMIGO2タンパク質を投与して抗AMIGO2抗体産生細胞を取得し、これを不死化させた細胞からAMIGO2タンパク質に対するヒト抗体をそれぞれ取得してもよい（WO 94/25585号パンフレット、WO 93/12227号パンフレット、WO 92/03918号パンフレット、WO 94/02602号パンフレット参照）。

40

【0063】

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

【0064】

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法に従い培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

50

【0065】

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型のものを用いることができる（例えば、Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990参照）。

具体的には、抗AMIGO2抗体を産生するハイブリドーマから、抗AMIGO2抗体の可変(V)領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、APGC法(Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により行って全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia製)等を使用して目的のmRNAを調製する。また、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia製)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

10

【0066】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製)等を用いて行う。また、cDNAの合成および増幅を行うには、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製)およびPCRを用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002、Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)等を使用することができる。

20

【0067】

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法等により確認する。

30

【0068】

目的とする抗AMIGO2抗体のV領域をコードするDNAをそれぞれ得たのち、これを、所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAを含有する発現ベクターへ組み込む。

【0069】

本発明で使用される抗AMIGO2抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。

【0070】

抗体遺伝子の発現は、抗体重鎖(H鎖)または軽鎖(L鎖)をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい(WO 94/11523号公報参照)。

40

【0071】

また、組換え型抗体の産生には上記宿主細胞だけではなく、トランスジェニック動物を使用することができる。例えば、抗体遺伝子を、乳汁中に固有に産生されるタンパク質(ヤギカゼインなど)をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所

50

望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K. M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

【0072】

本発明で使用される抗体は、抗体の全体分子に限られず、AMIGO2タンパク質に結合する限り、抗体の断片またはその修飾物であってもよく、二価抗体も一価抗体も含まれる。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv、1個のFabと完全なFcを有するFab/c、またはH鎖若しくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えばパパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる (例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137参照)。

10

20

【0073】

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域とを連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域は、リンカー、好ましくはペプチドリナーを介して連結される (Houston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1988) 85, 5879-5883)。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリナーとしては、例えばアミノ酸12~19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

【0074】

scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖またはH鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖またはL鎖V領域をコードするDNAのうち、それらの配列のうちの全部または所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリナー部分をコードするDNA、およびその両端が各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

30

【0075】

また、一旦scFvをコードするDNAが作製されると、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いることにより、常法に従ってscFvを得ることができる。

40

【0076】

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

【0077】

抗体の修飾物として、標識物質等の各種分子と結合した抗AMIGO2抗体を使用することもできる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。

【0078】

さらに、本発明で使用される抗体は、二重特異性抗体 (bispecific ant

50

i b o d y) であってもよい。二重特異性抗体は分子上の異なるエピトープを認識する抗原結合部位を有する二重特異性抗体であってもよいし、一方の抗原結合部位が A M I G O 2 タンパク質を認識し、他方の抗原結合部位が標識物質等を認識してもよい。二重特異性抗体は2種類の抗体のHL対を結合させて作製することもできるし、異なるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを融合させて二重特異性抗体産生融合細胞を作製し、得ることもできる。さらに、遺伝子工学的手法により二重特異性抗体を作製することも可能である。

【0079】

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーター/エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前期プロモーター/エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げるができる。

10

【0080】

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター/エンハンサーとして、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40 (SV40) 等のウイルスプロモーター/エンハンサー、あるいはヒトエロンゲーションファクター1 (HEF1) などの哺乳類細胞由来のプロモーター/エンハンサー等が挙げられる。

20

【0081】

SV40プロモーター/エンハンサーを使用する場合はMulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108) により、また、HEF1プロモーター/エンハンサーを使用する場合はMizushimaらの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) により、容易に遺伝子発現を行うことができる。

【0082】

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列および発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて当該遺伝子を発現させることができる。プロモーターとしては、例えばlacZプロモーター、araBプロモーターを挙げるができる。lacZプロモーターを使用する場合はWardらの方法 (Nature (1098) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) により、あるいはaraBプロモーターを使用する場合はBetterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) により発現することができる。

30

【0083】

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。そして、ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切に組み直して (refold) 使用する。

【0084】

複製起源としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシバピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは、選択マーカーとしてアミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

40

【0085】

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の発現系、例えば真核細胞または原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの動物細胞等が挙げられ、原核細胞としては、例えば大腸菌細胞等の細菌細胞が挙げられる。

50

【0086】

好ましくは、本発明で使用される抗体は、哺乳類細胞、例えばCHO、COS、ミエローマ、BHK、Vero、HeLa細胞中で発現される。

【0087】

次に、形質転換された宿主細胞をin vitroまたはin vivoで培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI 1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清(FCS)等の血清補液を併用することもできる。

【0088】

前記のように発現、産生された抗体は、細胞、宿主動物から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティーカラムを用いて行うことができる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、HyperD、POROS、Sephacryl FF (Pharmacia製)等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティーカラム以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる(Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

10

【0089】

本発明の膵臓癌治療薬は、抗AMIGO2抗体を当該技術分野においてよく知られる薬学的に許容しうる担体とともに、混合、溶解、顆粒化、錠剤化、乳化、カプセル封入、凍結乾燥等により、製剤化することができる。

20

【0090】

経口投与用には、抗AMIGO2抗体を、薬学的に許容しうる溶媒、賦形剤、結合剤、安定化剤、分散剤等とともに、錠剤、丸薬、糖衣剤、軟カプセル、硬カプセル、溶液、懸濁液、乳剤、ゲル、シロップ、スラリー等の剤形に製剤化することができる。

【0091】

非経口投与用には、抗AMIGO2抗体を、薬学的に許容しうる溶媒、賦形剤、結合剤、安定化剤、分散剤等とともに、注射用溶液、懸濁液、乳剤、クリーム剤、軟膏剤、吸入剤、座剤等の剤形に製剤化することができる。注射用の処方においては、抗AMIGO2抗体を水性溶液、好ましくはハンス溶液、リンゲル溶液、または生理的食塩緩衝液等の生理学的に適合性の緩衝液中に溶解することができる。さらに、組成物は、油性または水性のベヒクル中で、懸濁液、溶液、または乳濁液等の形状をとることができる。あるいは、治療剤を粉体の形態で製造し、使用前に滅菌水等を用いて水溶液または懸濁液を調製してもよい。吸入による投与用には、抗AMIGO2抗体を粉末化し、ラクトースまたはデンプン等の適当な基剤とともに粉末混合物とすることができる。坐剤処方では、抗AMIGO2抗体をカカオバター等の慣用の坐剤基剤と混合することにより製造することができる。さらに、本発明の治療剤は、ポリマーマトリクス等に封入して、持続放出用製剤として処方することができる。

30

40

【0092】

投与量および投与回数は、剤形および投与経路、ならびに患者の症状、年齢、体重によって異なるが、一般に、抗AMIGO2抗体は、1日あたり体重1kgあたり、約0.001mgから1000mgの範囲、好ましくは約0.01mgから10mgの範囲となるよう、1日に1回から数回投与することができる。

【0093】

本発明の膵臓癌治療薬は通常非経口投与経路で、例えば注射剤(皮下注、静注、筋注、腹腔内注など)、経皮、経粘膜、経鼻、経肺などで投与するのが好ましい。

【実施例】

【0094】

50

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0095】

実施例1 DNAマイクロアレイによる各種癌細胞におけるAMIGO2遺伝子発現解析
膵臓において発現が亢進する遺伝子を探索するために、表1に示す各種ヒト組織および株化癌細胞におけるRNAならびに分化度の異なる24例の膵臓癌、前癌病変1例、膵管癌2例、膵管内乳頭粘液性腫瘍1例の各摘出組織、および対照としての正常組織（摘出された膵臓癌組織の非癌部）4例よりレーザーマイクロダイセクション法（Laser Capture Microdissection）で回収したサンプルよりISOGEN（ニッポンジーン社）を用い定法に従って全RNAを調製した。

10

【0096】

上記全RNAを各10ngずつ用い、GeneChipU-133（Affimetrix社製）に供しExpression Analysis Technical Manual（Affimetrix社製）に準じて遺伝子発現解析した。全遺伝子の発現スコアの平均値を100とし、癌細胞において発現が亢進する遺伝子を探索したところ、AMIGO2 mRNA（プローブID：222108 at HG-U133A）が正常膵臓（52.9）と比較して、膵臓癌4例の内3例で発現スコア（304.0, 148.7, 448.9）がそれぞれ5.7倍、2.8倍、8.5倍と発現亢進していることが明らかとなった。（図1a, b）。

20

【0097】

膵臓癌細胞株における解析において、AMIGO2の発現は、Capan1, Panc1, PK-45H, PK-45P, PK-59およびQGP-1で発現スコア100以上を示した（図1c）。

摘出した膵臓癌組織に関して高分化型4例、中分化型17例、低分化型3例ならびに正常膵4例、前癌病変1例、膵管癌2例、膵管内乳頭粘液性腫瘍1例から調製した全RNAを各10ngずつ用い、GeneChipU133Plus2.0（Affimetrix社製）で遺伝子発現解析した。GeneChipU133Plus2.0での全遺伝子の発現スコアの平均値を100としたときの各組織での発現スコアを示す。その結果、AMIGO2 mRNA（プローブID：222108 at HG-U133 plus 2）は、正常膵、前癌病変、膵管内乳頭粘液性腫瘍、高分化型膵臓癌では発現スコアが低いのに対し、中分化型膵臓癌および低分化型膵臓癌で発現が亢進していることが明らかとなった（図2）。

30

【0098】

【表1】

AMIGO2 遺伝子発現解析に用いた組織および細胞株

正常組織	入手先	ロット	癌組織	入手先	例数	癌種	細胞株	
全脳	Clontech 64020-1	101041	グリア芽種	臨床検体	3	脳腫瘍	U251	
扁桃	Clontech 6574-1	1030830	肺癌(腺癌)	臨床検体	12	乳癌	MCF-7	
脳梁	Clontech 6577-1	1010486	肝癌(中分化)	臨床検体	3	食道癌	TE2	
尾状核	Clontech 6575-1	120289	肝癌(低分化)	臨床検体	3	胃癌	AGS	
視床	Clontech 6582-1	1070147	胃癌	臨床検体	31		GT3	
海馬	Clontech 6578-1	1050638	肺癌(小細胞癌)	臨床検体	1		KatoIII	
小脳	Clontech 64035-1	1010033	肺癌(小細胞癌)	臨床検体	1		MKN45	
脊髄	Clontech 6593-1	111062	肺癌(小細胞癌)	臨床検体	1		MKN74	
網膜	Clontech 636579	3070321	肺癌(小細胞癌)	臨床検体	1		2M	
脳下垂体	Clontech 6584-1	2010981	肺癌(小細胞癌)	臨床検体	1		2MD3	
胸腺	Ambion 7964	101P0101A	肺癌(小細胞癌)	臨床検体	1		大腸癌	CaCo2
甲状腺	Stratagene 735040	510225	肺癌(小細胞癌)	臨床検体	1			DLD1
唾液腺	Clontech 64026-1	1011322	肺癌(小細胞癌)	臨床検体	1			HCT116
肺	臨床検体	14887	肺癌(小細胞癌)	臨床検体	1	LOVO		
気管	Clontech 64091-1	1010201	肺癌(小細胞癌)	臨床検体	1	SW480		
皮膚	Stratagene 735031	120484	肺癌(扁平上皮癌)	臨床検体	1	肝癌	Alex	
乳房	Stratagene 735044	610327	肺癌(扁平上皮癌)	臨床検体	1		HepG2	
骨格筋	Ambion 7982	091P0101C	肺癌(扁平上皮癌)	臨床検体	1		HLE	
心臓	Ambion 7966	110P43B	肺癌(扁平上皮癌)	臨床検体	1		Huh6	
心房	Stratagene 835007	130025	肺癌(扁平上皮癌)	臨床検体	1		Huh7	
腎臓	Ambion 7976	071P04B	肺癌(腺癌)	臨床検体	1		膵癌	Capan1
副腎	Clontech64096-1	2020671	肺癌(腺癌)	臨床検体	1			KLM1
肝臓	臨床検体	N4	肺癌(腺癌)	臨床検体	1			MIA PaCa2
膵臓	Ambion 7954	091P0104A	肺癌(腺癌)	臨床検体	1			NOR-P1
脾臓	Ambion 7970	061P18A	肺癌(腺癌)	臨床検体	1			Panc1
胃	臨床検体	MN15	腎臓癌	臨床検体	1	PK-1		
小腸	Ambion 7984	091P0201A	腎臓癌	臨床検体	1	PK-8		
大腸	Ambion 7986	071P10B	大腸癌	臨床検体	1	PK-9		
膀胱	Ambion 7990	81P0101A	大腸癌	臨床検体	1	PK-45H		
骨髄	Clontech64106-1	1110932	大腸癌	臨床検体	1	PK-45P		
末梢血	臨床検体	-	大腸癌(肝転移)	臨床検体	1	PK-59		
精巣	Clontech64027-1	6120257	大腸癌(肝転移)	臨床検体	1	QGP-1		
前立腺	Ambion 7988	081P0103A	大腸癌(肝転移)	臨床検体	1	腎癌	Caki1	
卵巣	Ambion 7974	051P42A	大腸癌(肝転移)	臨床検体	1		Caki2	
子宮	Stratagene 735042	1100640	大腸癌(肝転移)	臨床検体	1		ACHN	
胎盤	Ambion 7950	061P33B	大腸癌(肝転移)	臨床検体	1		肺癌	A549
胎児脳	Clontech64094-1	2020902	大腸癌(肝転移)	臨床検体	1			Lu130
胎児肝臓	CHEMICON356	21060678	大腸癌	臨床検体	1	H1395		
			大腸癌	臨床検体	1	H157		
			膵臓癌	臨床検体	1	H1648		
			膵臓癌	臨床検体	1	H2009		
			膵臓癌	臨床検体	1	H23		
			膵臓癌	臨床検体	1	H2347		
						H522		
						H1437		
						H2122		
						膀胱癌	EJ1	
							T24	
						卵巣癌	OVCAR	
						子宮頸癌	HeLa	

10

20

30

40

【0099】

実施例2 AMIGO2 cDNAのクローニング

AMIGO2のcDNAは、膵臓癌細胞株PK-59細胞由来のcDNAをテンプレートにしたPCR法によって増幅した。この時、GenBank番号(NM 181847)の配列情報を元にORF領域(open reading frame)を含む断片を増幅するように設計されたプライマーセットAMIGO2FW(配列番号3)とAMIGO2RV(配列番号4)を用いた。このPCR反応にはKOD-plus(東洋紡社)を

50

用い、条件は94 - 15秒、60 - 15秒、68 - 120秒、40サイクルで行った。

その後、アガロースゲル電気泳動により目的のサイズに近い約1.6kbpのバンドを含むゲルを切り出し、このゲル断片からキアquickゲル抽出キット(QIAquick gel extraction kit; キアゲン社)を用いて精製を行うことによつて目的のAMIGO2の全長cDNA(以下、AMIGO2 full cDNA)を得た。

【0100】

実施例3 AMIGO2の抗原の調製

(1) AMIGO2の全長cDNAのほ乳類動物細胞での発現ベクターの作製

前述のAMIGO2 full cDNAをほ乳類発現用ベクターpEF4/Myc-HisB(Invitrogen社製)へ挿入するために、2種類の制限酵素KpnI(TAKARA社製)およびEcoRV(TAKARA社製)で処理した後、同じくKpnI/EcoRVで処理したpEF4/Myc-HisBにラビッドDNAライゲーションキット(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)によつてライゲーションすることによつて挿入した。定法により塩基配列解析を行い、目的の発現ベクターpEF4/AMIGO2 fullを得た。

【0101】

(2) AMIGO2の細胞外領域に相当する部分長cDNAのほ乳類動物細胞での発現ベクターの作製

AMIGO2の全長cDNA(AMIGO2 full cDNA)をテンプレートにし、GenBank番号(NM 181847)の配列情報を元にAMIGO2の細胞外領域に相当する部分のcDNA断片(sAMIGO2 cDNA)を増幅するように設計されたプライマーセットAMIGO2 FW(配列番号3)とsAMIGO2-RV-KY(配列番号5)を用いてPCR反応を行った。この反応にはKOD-plus(東洋紡社)を用い、条件は94 - 15秒、60 - 15秒、68 - 90秒、40サイクルで行った。

アガロースゲル電気泳動により目的のサイズに近い約900bpのバンドを含むゲルを切り出し、ゲル断片からキアquickゲル抽出キット(QIAquick gel extraction kit; キアゲン社)を用いて精製を行うことによつて目的のsAMIGO2 cDNAを得た。

このsAMIGO2 cDNAをほ乳類発現用ベクターpEF4/Myc-HisB(Invitrogen社製)へ挿入するために、2種類の制限酵素KpnI(TAKARA社製)およびXbaI(TAKARA社製)で処理した後、同じくKpnI/XbaIで処理したMyc-HisBにラビッドDNAライゲーションキット(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)によつてライゲーションすることによつて挿入した。定法により塩基配列解析を行い、目的の発現ベクターpEF4/sAMIGO2を得た。

【0102】

(3) AMIGO2全長タンパク質およびsAMIGO2タンパク質の発現

FUGENE6トランスフェクション試薬(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)のプロトコールに準じて、トランスフェクション前日に径10cmディッシュに 8×10^5 cellのCHO細胞を播種し一晩培養を行い、翌日に、8 μ gの発現ベクターpEF4/AMIGO2 fullまたはpEF4/sAMIGO2と16 μ LのFUGENE6試薬を400 μ Lの無血清Opti-MEM培地(Invitrogen社製)に混合し、15~45分間の室温におけるインキュベーションを行った後、細胞培養液に加えてトランスフェクションを行った。トランスフェクション翌日に限界希釈法および選択試薬であるZeocin(Invitrogen社製)を用いてクローニングを開始した。

AMIGO2全長発現CHOは、抗AMIGO2モノクローナル抗体(R&D systems社製)を用いたウェスタンブロットおよびフローサイトメトリー(ベクトンディッキンソン社製FACScaliburを使用)を用いることにより、シグナルが強く、しかも増殖が良好なクローンを選択した。その結果、AMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)が得られ、EXZ1005をモノクローナル抗体作製時のスクリー

10

20

30

40

50

ニングに使用した。

s A M I G O 2 発現 C H O 細胞のスクリーニングは、抗 A M I G O 2 モノクローナル抗体 (R & D S y s t e m s 社製、 M A B 2 0 8 0) を用いたウェスタンブロットで培養上清中に分泌される s A M I G O 2 の濃度を解析することで行った。培養上清中への分泌量が多く、しかも増殖が良好なクローンを選択した結果、s A M I G O 2 発現 C H O クローン (E X Z 0 9 0 2) が得られた。この選択された s A M I G O 2 発現 C H O クローン (E X Z 0 9 0 2) を培養面積 1 , 5 0 0 c m ² のローラーボトル 3 本を用い、ローラーボトル 1 本あたり無血清培地 C H O - S - S F M - I I (I n v i t r o g e n 社) 3 3 3 m L にて 7 2 時間培養を行い、培養上清を回収した。得られた培養上清から H i s T r a p H P カラム (G E ヘルスケアバイオサイエンス社製) を用いて s A M I G O 2 M y c - H i s t a g 融合タンパク質 (以下、s A M I G O 2 タンパク質として示す) の精製を行った。非還元下の S D S - P A G E で解析したところ、9 5 % 以上の純度であることが確認された (図 3) 。この精製された融合タンパク質を P B S に対し透析を行い、免疫用抗原およびエピトープ同定などの解析用タンパク質として用いた。s A M I G O 2 タンパク質の濃度は、既知濃度の純品のウシ血清アルブミンを検量線とした B C A 法 (P I E R C E 社製キットを使用) で算出した。

【 0 1 0 3 】

(4) A M I G O 2 の i m m u n o g l o b u l i n ドメインを発現する組み換えバキュロウイルスの作製

実施例 2 で調製した A M I G O 2 f u l l c D N A をテンプレートにし、G e n B a n k 番号 (N M 1 8 1 8 4 7) の配列情報を基に A M I G O 2 の i m m u n o g l o b u l i n ドメインに相当する部分の c D N A 断片 (A M I G O 2 / I g c D N A) を増幅するように設計されたプライマーセット B S / A M I G O 2 / I g - F W (配列番号 6) と B S / A M I G O 2 / I g - R V (配列番号 7) を用いて P C R 反応を行った。この反応には K O D - p l u s (東洋紡社) を用い、9 4 - 1 5 秒、6 0 - 1 5 秒、6 8 - 5 0 秒、4 0 サイクルの条件で反応させた。アガロースゲル電気泳動を行うことによって目的のサイズの c D N A 断片を含むゲルを切り出し、ゲル断片からキアquickゲル抽出キット (Q I A q u i c k g e l e x t r a c t i o n k i t ; キアゲン社) を用いて目的の A M I G O 2 I g c D N A を得た。この A M I G O 2 I g c D N A を制限酵素 K p n I (T a K a R a 社製) によって 3 7 で 1 時間処理した後、フェノール/クロロフォルム抽出、エタノール沈殿により回収した。このようにして調製した A M I G O 2 I g c D N A を、K p n I (T a K a R a 社製) を用いて切断した p B a c S u r f 1 (N o v a g e n 社製) に挿入し、トランスファーベクター p B S / A M I G O 2 / I g を構築した。次いで、4 μ g の p B S / A M I G O 2 / I g を制限酵素 B p I I (F e r m e n t a s 社) にて切断直鎖化した後、I n v i t r o g e n 社の指示書に準じて B a c - N - B l u e D N A と共に S f 9 細胞に導入し、A M I G O 2 の i m m u n o g l o b u l i n ドメインと g p 6 4 の融合タンパク質発現組み換えバキュロウイルスを調製した。

上記により調製した組み換えバキュロウイルスを S f 9 細胞 (2 × 1 0 ⁶ 個細胞 / m L) に M O I が 5 となるように加え感染させた後、2 7 で 3 日間培養した。A M I G O 2 の i m m u n o g l o b u l i n ドメインと g p 6 4 の融合タンパク質を発現する発芽型バキュロウイルス (B V) は 3 日間培養後の培養上清より回収した。すなわち、培養液を 8 0 0 × g で 1 5 分間遠心し、細胞ならびに細胞破砕物を除去した後、回収した培養上清を 4 5 , 0 0 0 g で 3 0 分間遠心した。沈殿物を P B S で懸濁した標品を A M I G O 2 - I g - B V 画分とし、後述する抗 A M I G O 2 モノクローナル抗体のエピトープ同定に使用した。

【 0 1 0 4 】

実施例 4 膵臓癌細胞株のウェスタンブロットによる A M I G O 2 の検出

市販の抗 A M I G O 2 モノクローナル抗体 (R & D S y s t e m s 社製、 M A B 2 0 8 0) を用いて、膵臓癌細胞株 1 2 種 (C a p a n 1 , K L M 1 , M I A P a C a 2 ,

NOR - P 1 , P a n c 1 , P K - 1 , P K - 8 , P K - 9 , P K - 4 5 H , P K - 4 5 P , P K - 5 9、Q G P - 1) および陽性コントロールとしての A M I G O 2 全長発現 C H O クローン (E X Z 1 0 0 5) の細胞ライゼート中の A M I G O 2 をウェスタンブロットにより検出した。すなわち、各細胞を R I P A 緩衝液 (1 5 0 m M 塩化ナトリウム、1 % T r i t o n X - 1 0 0、1 % デオキシコール酸、0 . 1 % S D S、2 μ g / m L アプロチニン、2 μ g / m L p e p s t a t i n A、2 μ g / m L l e u p e p t i n、0 . 8 7 m g / m L P M S F、1 0 m M トリスヒドロキシアミノメタン塩酸塩 (p H 7 . 4)) にて可溶化することで調製した細胞ライゼートを非還元条件下 S D S - P A G E の各レーンに、膵臓癌細胞の場合は 1 0 μ L、陽性コントロールの A M I G O 2 全長発現 C H O クローン (E X Z 1 0 0 5) の場合は 0 . 5 μ L アプライした。

泳動終了後のゲルからタンパク質をニトロセルロース膜 (G E ヘルスケアバイオサイエンス社製) に転写し、一次抗体として抗 A M I G O 2 モノクローナル抗体 (R & D S y s t e m s 社製) を反応させ、次いで二抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス I g G 抗体 (G E ヘルスケアバイオサイエンス社製) を反応させて A M I G O 2 を検出した。

【 0 1 0 5 】

その結果、分子量約 7 5 ~ 6 5 k D a の位置に P K - 4 5 H , P K - 4 5 P , P K - 5 9 および Q G P - 1 の細胞ライゼートにおいて強いバンドが検出され、C a p a n 1 , P a n c 1 , P K - 1 の細胞ライゼートにおいて弱いバンドが検出された。その他の細胞ライゼートにおいては、バンドはほとんど検出されなかった。この結果は、GeneChip U 1 3 3 の解析結果と関連し、mRNA の発現スコアが高い細胞株においてのみ A M I G O 2 タンパク質が検出された (図 4)。陽性コントロールの A M I G O 2 全長発現 C H O クローン (E X Z 1 0 0 5) のライゼートで検出された A M I G O 2 の分子量は約 8 5 k D a であり、膵臓癌細胞のそれと比較するとやや高分子量であるが、これは陽性コントロールの A M I G O 2 タンパク質の C 末端側に付加されている M y c - H i s t a g (分子量約 3 k D a) と、糖鎖構造の違いに基づくものと推察された。

【 0 1 0 6 】

実施例 5 抗 A M I G O 2 モノクローナル抗体による A M I G O 2 全長発現 C H O クローン (E X Z 1 0 0 5) および膵臓癌細胞株のフローサイトメトリー

上述の細胞ライゼートのウェスタンブロットで A M I G O 2 が検出された A M I G O 2 全長発現 C H O クローン (E X Z 1 0 0 5) および膵臓癌細胞株 P K - 4 5 P を用いて、細胞膜表面に A M I G O 2 が発現しているか否かを F A C S c a l i b u r (ベクトンディッキンソン社製) を用いたフローサイトメトリーで解析した。すなわち、A M I G O 2 全長発現 C H O クローン (E X Z 1 0 0 5) および膵臓癌細胞株 P K - 4 5 P を 2 m M E D T A - P B S で処理することで培養プレートから剥離後、 1×10^6 個 / m L となるように F A C S 溶液 (1 % ウシ血清アルブミン、0 . 1 m M E D T A、0 . 1 % N a N ₃ を含有する P B S) に懸濁した。この細胞懸濁液を 5 0 μ L / w e l l となるように 9 6 ウェルプレート (B D フアルコン社製) に播種し市販の抗 A M I G O 2 モノクローナル抗体 (0 . 6 μ g / w e l l、R & D S y s t e m s 社製) を加えて 4 で 6 0 分間反応させ、F A C S 溶液 (2 0 0 μ L / w e l l) で 2 回洗浄した後、F I T C 標識抗マウス I g G 抗体 (ジャクソン社製) を加えて、4 で 3 0 分間反応させた。

そして F A C S 溶液で 2 回洗浄した後、使用説明書に準じて F A C S c a l i b u r (ベクトンディッキンソン社製) を用いてフローサイトメトリーを実施した。抗 A M I G O 2 モノクローナル抗体の陰性コントロールには正常マウス I g G を用いた。また、抗 A M I G O 2 モノクローナル抗体を細胞に反応させる前に、s A M I G O 2 タンパク質 (5 . 1 μ g / w e l l) と抗 A M I G O 2 モノクローナル抗体を反応させることで、フローサイトメトリーでのピークシフトが消失するか否か調べた。

【 0 1 0 7 】

A M I G O 2 全長発現 C H O クローン (E X Z 1 0 0 5) での結果を図 5 に示した。抗 A M I G O 2 モノクローナル抗体を反応させることでピークシフトが観察され、このピークシフトは抗 A M I G O 2 モノクローナル抗体を事前に s A M I G O 2 タンパク質と反応

10

20

30

40

50

させることで消失した。膵臓癌細胞株PK-45Pでの結果を図6に示した。AMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)の結果と同様に、抗AMIGO2モノクローナル抗体を反応させることでピークシフトが観察され、このピークシフトは抗AMIGO2モノクローナル抗体を事前にsAMIGO2タンパク質と反応させることでほぼ消失した。

【0108】

これらの結果より、AMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)および膵臓癌細胞株PK-45Pの細胞膜表面上にAMIGO2タンパク質が発現していることが明らかとなり、抗AMIGO2抗体作製においてスクリーニング用細胞として使用することとした。

【0109】

実施例6 抗AMIGO2モノクローナル抗体の作製

PBSに溶解した50 μ gのsAMIGO2タンパク質とTiter-MAX(TiterMax USA, Inc.)を等量混合してMRL/lprマウス(三共ラボサービス)に腹腔内注射する事により初回免疫を行った。2回目以降の免疫は同様に調製した25 μ gタンパク質量相当のsAMIGO2タンパク質とTiter-MAXを混合して腹腔内注射することにより実施した。最終免疫から3日後にマウスから脾臓細胞を無菌的に調製し、ポリエチレングリコール法によってマウスミエロマ細胞NS1との細胞融合を行った。

ハイブリドーマ培養上清中の抗AMIGO2抗体のスクリーニングは、実施例5の方法に従いAMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)を用いたフローサイトメトリー(ベクトンディッキンソン社製FACScaliburを使用)で行った。その結果、表2に示すように陽性ハイブリドーマ28種が得られた。表中、IMS(Immunized mouse serum)は陽性コントロールとして用いたsAMIGO2タンパク質を免疫したマウス抗血清(0.3 μ L/well使用)を示し、NMS(Non-immunized mouse serum)は陰性コントロールとして用いた免疫前のマウス抗血清(0.3 μ L/well使用)を示す。

【0110】

【表2】

AMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)を用いたハイブリドーマ培養上清のスクリーニング結果

No	クローン番号	フローサイトメトリー (蛍光強度平均値)		No	クローン番号	フローサイトメトリー (蛍光強度平均値)	
		EXZ1005	CHO細胞			EXZ1005	CHO細胞
1	PPZ2902	36.21	12.81	16	PPZ3117	10.81	13.06
2	PPZ2904	37.60	14.70	17	PPZ3122	90.15	11.07
3	PPZ2912	47.67	17.35	18	PPZ3124	247.24	10.02
4	PPZ2913	53.93	12.59	19	PPZ3125	215.34	12.03
5	PPZ2919	82.60	18.94	20	PPZ3126	153.77	11.89
6	PPZ2920	437.73	18.11	21	PPZ3130	20.68	12.36
7	PPZ2927	342.43	11.90	22	PPZ3133	504.83	8.88
8	PPZ2936	455.40	14.25	23	PPZ3134	260.39	12.41
9	PPZ2937	227.17	19.71	24	PPZ3135	637.44	14.67
10	PPZ2952	140.35	17.26	25	PPZ3145	763.27	12.40
11	PPZ2953	122.67	25.78	26	PPZ3148	140.80	9.75
12	PPZ2956	614.72	17.23	27	PPZ3150	103.31	12.22
13	PPZ2970	207.42	13.81	28	PPZ3160	706.05	6.88
14	PPZ3003	90.50	10.56	-	IMS	879.68	9.64
15	PPZ3016	38.71	6.79	-	NMS	17.07	7.79

10

20

30

40

50

【 0 1 1 1 】

次いで、これら 28 種の陽性ハイブリドーマの培養上清について、実施例 5 の方法に従い膵臓癌細胞 PK - 45 P を用いたフローサイトメトリーでの反応性を調べた。また、この実験においては、培養上清に含まれる抗 AMIGO2 抗体が、膵臓癌細胞 PK - 45 P の細胞膜上に発現する AMIGO2 に特異的に反応することを確認する目的で、各ハイブリドーマの培養上清を細胞に反応させる前に sAMIGO2 タンパク質 (5.1 μg/well) を培養上清に添加し、培養上清に含まれる抗体が中和されてフローサイトメトリーでのピークシフトが減弱するか否かを調べた。その結果、1 種 (PPZ2927) を除く 27 種のハイブリドーマ培養上清において、sAMIGO2 タンパク質の添加によってピークシフトが減弱し、この 27 種のハイブリドーマ培養上清に含まれる抗体は膵臓癌細胞株 PK - 45 P の細胞膜上に発現している AMIGO2 に特異的に結合することが確認された。

10

【 0 1 1 2 】

【表 3】

膵臓癌細胞株 PK - 45 P を用いたハイブリドーマ培養上清のスクリーニング結果

No	クローン番号	フローサイトメトリー (蛍光強度平均値)	
		sAMIGO2 (-)	sAMIGO2 (+)
1	PPZ2902	3.96	3.03
2	PPZ2904	4.35	3.87
3	PPZ2912	5.12	3.94
4	PPZ2913	6.16	3.59
5	PPZ2919	4.94	3.56
6	PPZ2920	6.73	3.78
7	PPZ2927	7.86	8.22
8	PPZ2936	6.01	3.72
9	PPZ2937	5.39	3.85
10	PPZ2952	6.16	3.61
11	PPZ2953	4.32	3.40
12	PPZ2956	6.64	3.40
13	PPZ2970	7.90	3.28
14	PPZ3003	7.09	3.84
15	PPZ3016	6.27	3.37

No	クローン番号	フローサイトメトリー (蛍光強度平均値)	
		sAMIGO2 (-)	sAMIGO2 (+)
16	PPZ3117	5.19	3.90
17	PPZ3122	6.70	3.33
18	PPZ3124	8.28	4.97
19	PPZ3125	7.04	3.54
20	PPZ3126	24.59	15.45
21	PPZ3130	6.83	4.46
22	PPZ3133	8.28	3.44
23	PPZ3134	13.82	10.24
24	PPZ3135	7.13	4.08
25	PPZ3145	8.03	3.71
26	PPZ3148	7.47	3.77
27	PPZ3150	6.51	3.87
28	PPZ3160	9.13	4.66

20

30

【 0 1 1 3 】

続いて、表 3 に示したハイブリドーマのうち、PPZ2927 を除く 27 種のハイブリドーマを限界希釈法によってクローニングし、最終的に 20 種のクローンを確立した。次いでクローニング後のハイブリドーマをプリスタン処理した BALB/c A J c l - n u / n u マウス (日本クレア) の腹腔内に移植 (1 × 10⁷ 個/匹) し、腹水を作製した。

40

【 0 1 1 4 】

実施例 7 各種抗 AMIGO2 モノクローナル抗体の精製とサブクラスの同定

実施例 6 で作製した腹水から、硫酸アンモニウムによる塩析および HiTrap Protein G カラム (GEヘルスケアバイオサイエンス) によるアフィニティークロマトグラフィーにより抗体を精製した。各精製抗体のサブクラスは、マウス・モノクローナル抗体アイソタイピングキット (GEヘルスケアバイオサイエンス) を用いて調べた (表 4)。

【 0 1 1 5 】

【表 4】

精製した抗AMIGO2抗体のサブクラス

No	クローン番号	サブクラス	No	クローン番号	サブクラス	No	クローン番号	サブクラス
1	PPZ2904	IgG2a, κ	8	PPZ2952	IgG1, κ	15	PPZ3130	IgG2a, κ
2	PPZ2912	IgG2a, κ	9	PPZ2956	IgG1, κ	16	PPZ3133	IgG1, κ
3	PPZ2913	IgG2b, κ	10	PPZ3003	IgG2a, κ	17	PPZ3135	IgG2a, κ
4	PPZ2919	IgG2a, κ	11	PPZ3016	IgG2a, κ	18	PPZ3145	IgG1, κ
5	PPZ2920	IgG1, κ	12	PPZ3122	IgG2a, κ	19	PPZ3148	IgG2a, κ
6	PPZ2936	IgG1, κ	13	PPZ3124	IgG2a, κ	20	PPZ3160	IgG1, κ
7	PPZ2937	IgG2a, κ	14	PPZ3125	IgG2a, κ			

10

【0116】

実施例 8 ウェスタンブロットによる抗AMIGO2モノクローナル抗体のエピトープ同定

抗原として sAMIGO2 タンパク質あるいは AMIGO2-Ig-BV 画分を還元及び非還元条件のサンプルバッファーで処理し、1レーン当たり 150 ng (sAMIGO2 タンパク質) あるいは 590 ng (AMIGO2-Ig-BV 画分) をアプライし、SDS-PAGE を行った。電気泳動終了後、ゲル内のタンパク質を Hybond-P 膜 (GEヘルスケアバイオサイエンス) に 38 V で 16 時間転写した。転写膜を 40% ブロックエース (雪印) / TBS (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl) を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。次に、40% ブロックエース (雪印) / TBS 液で 3 μg/mL に希釈した抗 AMIGO2 モノクローナル抗体を室温で 1 時間反応させた後、膜を TBS-T (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) で 5 分間 x 3 回洗浄した。

20

その後、10% ブロックエース (雪印) / TBS で 5,000 倍に希釈した HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (GEヘルスケアバイオサイエンス) を室温で 1 時間反応させた後、TBS-T で 5 分間 x 3 回洗浄を行った。最後に ECL 検出試薬 (GEヘルスケアバイオサイエンス) を作用させ、化学発光シグナルを X 線フィルムに 5 分間感光させた。各抗原に対する抗体の反応性はバンドの濃淡で判定し、その結果を表 5 にまとめた。

【0117】

【表 5】

抗AMIGO2モノクローナル抗体のウェスタンブロットにおける反応性

No	クローン番号	sAMIGO2		AMIGO2-Ig		No	クローン番号	sAMIGO2		AMIGO2-Ig	
		非還元	還元	非還元	還元			非還元	還元	非還元	還元
1	PPZ2904	+	+	+	+	11	PPZ3016	+	+	+	+
2	PPZ2912	+	+	+	+	12	PPZ3122	+	+	+	+
3	PPZ2913	+	+	+	+	13	PPZ3124	-	-	-	-
4	PPZ2919	-	-	-	-	14	PPZ3125	-	-	-	-
5	PPZ2920	-	-	-	-	15	PPZ3130	+	+	-	-
6	PPZ2936	+	+	+	+	16	PPZ3133	-	-	-	-
7	PPZ2937	-	-	-	-	17	PPZ3135	-	-	-	-
8	PPZ2952	+	+	+	+	18	PPZ3145	-	-	-	-
9	PPZ2956	-	-	-	-	19	PPZ3148	-	-	-	-
10	PPZ3003	-	-	-	-	20	PPZ3160	-	-	-	-

表中において、sAMIGO2 とは精製 sAMIGO2 タンパク質を示し、AMIGO2-Ig とは AMIGO2-Ig-BV 画分を示す。また、+ は反応性あり、- は反応性なしを表している。

40

【0118】

この結果から、PPZ2904, PPZ2912, PPZ2913, PPZ2936, PPZ2952, PPZ3016, PPZ3122 の 7 種の抗 AMIGO2 モノクローナル抗体は、AMIGO2 の immunoglobulin ドメインに存在するエピトープを認識することが分かった。また、この 7 種のモノクローナル抗体は、還元下の抗原にも

50

反応したことから、ジスルフィド結合によって形成されるAMIGO2の立体構造に依存しないエピトープを認識することも分かった。

PPZ3130は、sAMIGO2には反応するがAMIGO2-Igに反応しないことより、LRRAミノ末端ドメインからLRRCアルボキシル末端ドメインで構成される領域に存在するエピトープを認識することが分かった。PPZ3130も還元下の抗原に反応するので、ジスルフィド結合によって形成されるAMIGO2の立体構造に依存しないエピトープを認識することが分かった。

【0119】

他の12種の抗AMIGO2モノクローナル抗体(PPZ2919, PPZ2920, PPZ2937, PPZ2956, PPZ3003, PPZ3124, PPZ3125, PPZ3133, PPZ3135, PPZ3145, PPZ3148, PPZ3160)は、いずれの抗原にも反応しなかった。この12種のモノクローナル抗体はAMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)に強く反応するが(表2参照)、ウェスタンブロットで反応しなかった。その理由として、これらモノクローナル抗体の認識するエピトープがAMIGO2の高次構造によって形成されておりSDSに暴露されることでエピトープの構造が消失したことが考えられる。

10

【0120】

実施例9 抗AMIGO2モノクローナル抗体の解離定数の測定

BIAcore3000システム(BIAcore社)を用いてモノクローナル抗体の解離定数を測定した。まず、センサーチップCM5に、抗マウスIgG抗体(BIAcore社)に対しアミンカップリング法を用いて固相化した。次に、各種抗AMIGO2抗体を数百RU程度の固相化量となる様にHBS-EP(10mM HEPES, pH7.4, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.005% surfactant P20)に0.1% Tween 20を加えたbufferで調製した上でインジェクションし、抗AMIGO2抗体を固定化した。次いで、sAMIGO2タンパク質を上記bufferに25nMから50nM、100nM、200nMの各濃度で調製したものをインジェクションし、結合・解離を測定した後、解析プログラム(BIAevaluation)を用いて解離定数を求めた。その測定結果を表6に示した。

20

【0121】

【表6】

30

抗AMIGO2モノクローナル抗体の解離定数

No	クローン番号	解離定数 (M)	No	クローン番号	解離定数 (M)	No	クローン番号	解離定数 (M)
1	PPZ2904	3.0E-08	8	PPZ2952	ND	15	PPZ3130	ND
2	PPZ2912	1.6E-08	9	PPZ2956	9.0E-09	16	PPZ3133	2.6E-09
3	PPZ2913	ND	10	PPZ3003	5.9E-08	17	PPZ3135	4.7E-08
4	PPZ2919	2.0E-08	11	PPZ3016	7.9E-09	18	PPZ3145	6.2E-08
5	PPZ2920	9.8E-09	12	PPZ3122	3.5E-09	19	PPZ3148	4.6E-08
6	PPZ2936	2.7E-08	13	PPZ3124	3.0E-08	20	PPZ3160	2.1E-08
7	PPZ2937	4.5E-08	14	PPZ3125	5.1E-08			

表中、NDとは解離定数が検出限界以下であることを示す。また、例えば、解離定数3.0E-08は 3.0×10^{-8} であることを示す。

40

【0122】

表6より、解離定数が 10^{-9} オーダーの低い数値を示すPPZ3133, PPZ3122, PPZ3016, PPZ2956, PPZ2920の5種のモノクローナル抗体は、sAMIGO2タンパク質を捕捉する能力が高いので、ELISA法による血液あるいは組織中AMIGO2測定系の構築に応用できる。

【0123】

実施例10 AMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)および膵臓癌細胞株に対する抗AMIGO2抗体の細胞傷害活性(CDC活性)

50

CDC活性の測定は、標的細胞に内在する乳酸脱水素酵素(LDH)の放出を指標にする方法によった。具体的には、Cytotoxicity Assay Kit(プロメガ社製)を用い、キットに添付のプロトコールに従って以下の通り実施した。

【0124】

標的細胞として、AMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)および膵臓癌細胞株PK-45Pを用いた。これらの細胞をプレートから剥離後、 2×10^5 個/mLとなるように10%FBS含有DMEM培地に懸濁し、96ウェルU底プレート(Beckton Dickinson社製)に100 μ L/wellで分注して炭酸ガスインキュベーター中で一夜培養した。翌日、プレート底面に接着した細胞を5%FBS含有DMEM培地(フェノールレッド不含)で2回洗浄した後、各ウェルに5%FBS含有DMEM培地(フェノールレッド不含)を30 μ Lずつ分注し、さらに実施例7の表4に示した精製抗AMIGO2モノクローナル抗体20種それぞれを30 μ L/well(抗体濃度:10.7 μ g/mL、反応時の抗体終濃度は4 μ g/mLとなる)分注した後、氷上で30分間インキュベーションした。

次いで、Baby Rabbit Complement(CEDARLANE社製)を5%FBS含有DMEM培地(フェノールレッド不含)で16倍に希釈した補体標品(標的細胞がAMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)の場合)あるいは同培地で8倍に希釈した補体標品(標的細胞が膵臓癌細胞株PK-45Pの場合)を20 μ L/well分注し、炭酸ガスインキュベーター中で4時間培養した。培養後、50 μ Lの上清を回収し、平底の酵素アッセイ用プレートへ移した。そこへ、キット付属の基質混合液を50 μ L/well添加し、遮光下、室温で30分間インキュベートした。インキュベート後、反応停止液50 μ L/wellを添加した。反応停止後、マイクロプレートリーダーを用いて波長490nmにて吸光度を測定した。なお、陽性コントロール(IMS)としてsAMIGO2タンパク質を免疫したマウス抗血清(100倍希釈)を、陰性コントロール(NMS)として免疫前のマウス抗血清(100倍希釈)を用いた。

【0125】

細胞傷害活性は、以下の通り求めることができる。

$$\text{細胞傷害活性(\%)} = (A - B - C) / (D - C) \times 100$$

A: [各試料における吸光度] - [培養液のバックグラウンドの吸光度]

B: [補体に由来するLDHによる吸光度] - [培養液のバックグラウンドの吸光度]

C: [標的細胞から自然に放出されるLDHによる吸光度] - [培養液のバックグラウンドの吸光度]

D: [0.9%Triton-X100添加により標的細胞から100%放出されたLDHによる吸光度] - [培養液のバックグラウンドの吸光度]

【0126】

結果を表7に示した。AMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)を用いたCDC活性の測定値において、高いCDC活性(70%以上)を示すものは13クローン、低いCDC活性(70%以下)を示すものは7クローンであった。膵臓癌細胞株PK-45Pを用いたCDC活性測定値において、高いCDC活性(10%以上)を示すものは7クローン、低いCDC活性(10%未満)を示すものは13クローンであった。

AMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)を用いた場合と膵臓癌細胞株PK-45Pを用いた場合で各クローンのCDC活性値が必ずしも相関しないのは、AMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)と膵臓癌細胞株PK-45Pの細胞膜上に発現しているAMIGO2タンパク質の量の差などによると想定される。実際、図5および図6の結果から、両者でのAMIGO2タンパク質の発現量の違いは明らかである。

【0127】

【表 7】

抗AMIGO2モノクローナル抗体のCDC活性

No	クローン番号	CDC活性 (%)		No	クローン番号	CDC活性 (%)	
		EXZ1005	PK-45P			EXZ1005	PK-45P
1	PPZ2904	85.0	7.2	12	PPZ3122	78.3	7.8
2	PPZ2912	79.7	7.0	13	PPZ3124	100.0	26.2
3	PPZ2913	85.9	4.8	14	PPZ3125	79.9	17.1
4	PPZ2919	90.9	18.4	15	PPZ3130	73.4	5.8
5	PPZ2920	2.2	6.3	16	PPZ3133	5.7	5.5
6	PPZ2936	4.4	6.3	17	PPZ3135	78.8	24.8
7	PPZ2937	93.0	13.1	18	PPZ3145	5.3	6.9
8	PPZ2952	3.6	6.3	19	PPZ3148	83.4	33.7
9	PPZ2956	4.2	7.1	20	PPZ3160	3.6	7.2
10	PPZ3003	96.9	12.6	-	IMS	73.0	86.3
11	PPZ3016	79.4	4.9	-	NMS	1.7	5.6

10

【0128】

表7において、AMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)を用いた場合と膵臓癌細胞株PK-45Pを用いた場合のいずれにおいても高いCDC活性を示した7種の抗体(PPZ2919, PPZ2937, PPZ3003, PPZ3124, PPZ3125, PPZ3135, PPZ3148)について、定量的にCDC活性を求めるべく反応時の抗体濃度を200~0ng/mL[標的細胞としてAMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)を用いた場合]、200~0μg/mL[標的細胞として膵臓癌細胞株PK-45Pを用いた場合]となるように調製し、上述の方法でCDC活性を測定した。

20

AMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)を標的細胞に用いたときの結果を図7に示した。また、膵臓癌細胞株PK-45Pを標的細胞に用いた時の結果を図8に示した。図7および図8より、CDC活性50%を示すときの抗体濃度(EC₅₀、AMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)を標的細胞に用いた場合)あるいはCDC活性25%を示すときの抗体濃度(EC₂₅、膵臓癌細胞株PK-45Pを標的細胞に用いた場合)を求めたところ、表8のようになり、上位4種の抗体はPPZ2919, PPZ3124, PPZ3135, PPZ3148であった。

30

【0129】

【表 8】

AMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)および膵臓癌細胞株PK-45Pを標的細胞としたCDC活性の定量的解析結果

No	クローン番号	EC50 (ng/mL) /EXZ1005	EC25 (μg/mL) /PK-45P	No	クローン番号	EC50 (ng/mL) /EXZ1005	EC25 (μg/mL) /PK-45P
1	PPZ2919	4.6	3.0	5	PPZ3125	25.5	14.5
2	PPZ2937	24.0	32.0	6	PPZ3135	6.9	3.5
3	PPZ3003	18.0	21.5	7	PPZ3148	8.6	0.9
4	PPZ3124	11.5	4.1				

40

【0130】

このように高いCDC活性を示した抗AMIGO2モノクローナル抗体は、細胞傷害活性に基づく膵臓癌の治療薬として有用と考えられる。この4種のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、PPZ2919(識別番号:PPMX0501, 受領番号:FERM AP-21017)、PPZ3124(識別番号:PPMX0502, 受領番号:FERM AP-21018)、PPZ3135(識別番号:PPMX0503, 受領番号:FERM AP-21019)、PPZ3148(識別番号:PPMX0504,

50

受領番号：FERM AP-21020)として(独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(住所：茨城県つくば市東1-1-1 中央第6)に寄託した(受領日：平成18(2006)年9月8日)。

なお、CDC活性を示さないモノクローナル抗体であっても、フローサイトメトリーで膵臓癌細胞の膜表面上に発現するAMIGO2への結合が確認されれば、抗体をアイソトープ標識あるいは細胞傷害活性を有する化合物を結合させることで膵臓癌の治療薬として有用と考えられる。

【0131】

実施例11 ELISAによるAMIGO2検出試薬の構築

実施例9の抗AMIGO2モノクローナル抗体の解離定数の測定で、解離定数が10⁻⁹オーダーの低い数値を示す、すなわちAMIGO2の捕捉能力が高いPPZ3133, PPZ3122, PPZ3016, PPZ2956, PPZ2920の5種のモノクローナル抗体の組合せでELISAによるAMIGO2検出試薬の構築を行った。

5種のモノクローナル抗体のペルオキシダーゼ(POD)標識は、Peroxidase Labelling Kit-SH(同仁化学)を用い、キット付属のマニュアルの用法容量に従い実施した。

Maxisorp 96穴プレート(Nunc社製)に精製抗AMIGO2モノクローナル抗体(5µg/mL)を100µL/wellで分注し、4-一夜放置することで固相化した。0.05% Tween-20を含むPBS(以後、Tween-PBS)でウェルを洗浄し、40%ブロッカー(雪印乳業製)を含む20mM Tris-HCl, 150mM NaCl pH8.0(40% BA-TBS)を200µL/well分注し、室温で1時間放置することでプレート上の未吸着部分をブロッキングした。Tween-PBSでウェルを洗浄後、40% BA-TBSで0.73ng/mLとなるように希釈したsAMIGO2タンパク質を100µL/well分注し、室温で1時間反応させた。

Tween-PBSでウェルを洗浄後、10%ブロッカー(雪印乳業製)を含む20mM Tris-HCl, 150mM NaCl pH8.0(10% BA-TBS)で0.1µg/mLとなるように希釈したペルオキシダーゼ標識抗AMIGO2モノクローナル抗体を100µL/well分注し、室温で1時間反応させた。Tween-PBSで洗浄後、TMB試薬(SCYTEK社)で暗所にて室温、30分間反応させたのち、STOP液(SCYTEK社)にて反応を停止させ、マイクロプレートリーダーにて波長450nmでの吸光度を測定した。吸光度1.1以上を、吸光度1.1未満0.6以上を、吸光度0.6未満をxとして評価した(表9)。

【0132】

【表9】

抗AMIGO2モノクローナル抗体のELISAでの組合せ検討

標識抗体 固相抗体	PPZ2920-POD	PPZ2956-POD	PPZ3016-POD	PPZ3122-POD	PPZ3133-POD
PPZ2920		×	○	○	×
PPZ2956	×		○	○	×
PPZ3016	△	△		×	○
PPZ3122	△	△	×		○
PPZ3133	×	×	○	○	

【0133】

表9において「x」を示した組合せについて、後述の実施例12に記した膵臓癌細胞株の培養上清中に存在する可溶性AMIGO2に対する反応性を検討した結果、PPZ3122とPPZ3133の組合せが最も良好な反応性を示すことが分かった。

【0134】

従って、ELISAの組合せ検討で最も有用であった2種のモノクローナル抗体を産生

10

20

30

40

50

するハイブリドーマ P P Z 3 1 2 2 および P P Z 3 1 3 3 をそれぞれ識別番号： P P M X 0 5 0 7 , 受領番号： F E R M A P - 2 1 0 2 3 および識別番号： P P M X 0 5 0 8 , 受領番号： F E R M A P - 2 1 0 2 4 として (独) 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (住所：茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 中央第 6) に寄託した (受領日：平成 1 8 (2 0 0 6) 年 9 月 8 日) 。

【 0 1 3 5 】

実施例 1 2 E L I S A による膵臓癌細胞ライゼートおよび培養上清中の A M I G O 2 の検出

実施例 1 1 の結果より、 P P Z 3 1 3 3 を固相抗体、 P P Z 3 1 2 2 をペルオキシダーゼ標識抗体とした組合せで膵臓癌細胞ライゼートおよび培養上清中の A M I G O 2 の検出を試みた。

細胞がほぼコンフルエントに増殖してから 4 日目の細胞を用いて、細胞ライゼートおよび培養上清を以下のようにして調製した。

膵臓癌細胞ライゼートは、抽出用緩衝液 (1 5 0 m M 塩化ナトリウム、 1 % T r i t o n X - 1 0 0 、 2 μ g / m L アプロチニン、 2 μ g / m L p e p s t a t i n A 、 2 μ g / m L l e u p e p t i n 、 0 . 8 7 m g / m L p h e n y l m e t h a n e s u l f o n y l f l u o r i d e (P M S F) 、 1 0 m M トリスヒドロキシアミノメタン塩酸塩 (p H 7 . 4)) で細胞を可溶化させることで調製し、 4 0 % B A - T B S で 1 0 倍に希釈した標品をサンプルとした。膵臓癌細胞培養上清は、遠心分離 (3 , 0 0 0 回転、 1 0 分) で細胞を除去した上清を 4 0 % B A - T B S で 3 倍に希釈した標品をサンプルとした。

【 0 1 3 6 】

M a x i s o r p 9 6 穴プレート (N u n c 社製) に P P Z 3 1 3 3 (5 μ g / m L) を 1 0 0 μ L / w e l l で分注し、 4 一 夜放置することで固相化した。 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 を含む P B S (以後、 T w e e n - P B S) でウェルを洗浄し、 4 0 % B A - T B S を 2 0 0 μ L / w e l l 分注し、室温で 1 時間放置することでプレート上の未吸着部分をブロッキングした。 T w e e n - P B S でウェルを洗浄後、上記のようにして調製した希釈後の膵臓癌細胞ライゼートおよび細胞培養上清を 1 0 0 μ L / w e l l 分注し、室温で 1 時間反応させた。 T w e e n - P B S でウェルを洗浄後、 1 0 % B A - T B S で 0 . 1 μ g / m L となるように希釈したペルオキシダーゼ標識 P P Z 3 1 2 2 を 1 0 0 μ L / w e l l 分注し、室温で 1 時間反応させた。 T w e e n - P B S で洗浄後、 T M B 試薬で暗所にて室温、 3 0 分間反応させたのち、 S T O P 液にて反応を停止させ、マイクロプレートリーダーにて 4 5 0 n m の吸光度を測定した。

膵臓癌細胞ライゼートおよび培養上清中の A M I G O 2 の濃度は、既知濃度の s A M I G O 2 タンパク質を検量線として算出した。膵臓癌細胞ライゼート中の A M I G O 2 は、 Bradford 法 (B i o - R a d 社製 P r o t e i n A s s a y キット使用) で求めた全タンパク質濃度あたりの A M I G O 2 濃度として算出した。

【 0 1 3 7 】

その結果、表 1 0 の通り細胞ライゼート中の A M I G O 2 は、 M I A P a C a 2 において検出限界以下であったが、 P K - 1 , P K - 4 5 P および P K - 5 9 では、 1 . 9 n g / m g p r o t e i n , 4 . 4 n g / m g p r o t e i n , 6 . 7 n g / m g p r o t e i n の濃度で検出された。この濃度は、 Gene Chip U 1 3 3 での m R N A の発現スコアの程度にほぼ比例した。また、 P K - 1 , P K - 4 5 P および P K - 5 9 では、それぞれ 1 . 9 n g / m L , 2 . 9 n g / m L , 2 . 4 n g / m L の濃度で細胞培養液中にも A M I G O 2 が検出されたが、 M I A P a C a 2 では検出限界以下であった。この事実は、細胞膜上に発現した A M I G O 2 が何らかの原因により切断され、可溶型 A M I G O 2 として細胞培養液中に遊離することを示している。さらには、被験者の血液あるいは体液を検体として、この可溶型 A M I G O 2 を検出することで、膵臓癌の診断の可能性が示唆された。

【 0 1 3 8 】

10

20

30

40

50

【表 10】

ELISAにより検出した膵癌細胞ライゼートおよび培養上清中のAMIGO2濃度

膵癌細胞	細胞ライゼート中濃度 (ng/mg protein)	培養上清中濃度 (ng/mL)
MIA PaCa2	検出限界以下	検出限界以下
PK-1	1.9	1.9
PK-45P	4.4	2.9
PK-59	6.7	2.4

10

【0139】

実施例 13 膵臓癌の免疫組織染色

予備実験として膵癌細胞株 PK-45P および Capan-1 に対する免疫染色を試み、両者の細胞株あるいはいずれかの細胞株に対して反応性が認められた抗 AMIGO2 モノクローナル抗体を用い、膵臓癌の臨床検体について免疫組織染色を実施した。

膵臓癌組織および正常膵臓組織の検体として、Folio Biosciences 社製の Pancreatic Carcinoma & Normal TMA (ホルマリン固定後パラフィン包埋標本を厚さ 5 μm の組織切片としてマウントされている) を用いた。具体的には以下のように実施した。

組織スライドを 100% キシレンに 5 分間ずつ 3 回浸漬することで脱パラフィンし、続いて 100% エタノールに 1 分間ずつ 2 回浸漬、90% エタノールに 1 分間、1 回、さらに 70% エタノールに 1 分間、1 回浸漬することで親水化を行った。その後、PBS (20 mM リン酸、150 mM NaCl, pH 7.0) で 5 分間ずつ 3 回洗浄した後、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) に浸漬しオートクレーブ処理 (121、20 分間) によって抗原を賦活化した。抗原の賦活化後、PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した後、内在性のペルオキシダーゼを失活させるために 0.3% 過酸化水素加メタノール中で室温 15 分間反応させた。

20

次いで、蒸留水で 1 回洗浄後、PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄し、40% ブロックエース (雪印乳業) 含む TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0) でブロッキングした (室温、30 分間)。PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した後、10% ブロックエースを含む TBS で 20 μg/mL に希釈した抗 AMIGO2 モノクローナル抗体を 4 で一夜反応させた。PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した後、PBS で 200 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG (GEヘルスケアバイオサイエンス) を二次抗体として室温で 1 時間反応させた。PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄した後、DAB (3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩) を用いて発色させた。また、核の対比染色にはヘマトキシリンを用いた。

30

【0140】

図 9 に示したように PPZ 2913, PPZ 2952, PPZ 3130 の 3 種の抗体によって、膵臓癌組織に発現亢進する AMIGO2 を特異的に免疫染色できることが分かった。また、組織アレイ上にスポットされている膵臓癌組織 66 検体について、AMIGO2 発現のランク付けをヒストファイン HER2 キットの染色の度合いによる基準に従い行った。4 段階の判定スコアは以下の通りとした。

40

判定スコア 0 は、検体組織中の腫瘍細胞の中で AMIGO2 陽性を呈している細胞がないか、あるいは AMIGO2 陽性細胞数が 10% に満たないもの。判定スコア 1+ は、検体組織中の腫瘍細胞の中で AMIGO2 陽性を呈している細胞が 10% 以上あるが、腫瘍細胞の一部の膜に限局した弱い染色強度を有するもの。判定スコア 2+ は、検体組織中の腫瘍細胞の中で AMIGO2 陽性を呈している細胞が 10% 以上あり、腫瘍細胞の膜に限局した中程度の染色強度を有するもの。判定スコア 3+ は、検体組織中の腫瘍細胞の中で AMIGO2 陽性を呈している細胞が 10% 以上あり、腫瘍細胞の膜に限局した強度の染色強度を有するもの。

50

このスコア付けに従って、膵臓癌組織66検体を分類したところ、スコア0は24検体(36%)、スコア1+は28検体(42%)、スコア2+は9検体(14%)、スコア3+は5検体(8%)であった。

スコア1+以上を染色陽性とする計42検体となり、陽性率は64%であった。さらに厳しく、スコア2+~スコア3+に分類される検体をAMIGO2過剰発現と判断すると、計14検体であり、陽性率は21%であった。

【0141】

PPZ2913、PPZ2952およびPPZ3130のそれぞれを識別番号：PPMX0509，受領番号：FERM AP-21037、識別番号：PPMX0510，受領番号：FERM AP-21038および識別番号：PPMX0511，受領番号：FERM AP-21039として(独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(住所：茨城県つくば市東1-1-1 中央第6)に寄託した(受領日：平成18(2006)年9月27日)。

10

【0142】

実施例14 AMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)に対する抗AMIGO2抗体の細胞傷害活性(ADCC活性)

ADCC活性の測定は、標的細胞に内在する乳酸脱水素酵素(LDH)の放出を指標にする方法によった。具体的には、Cytotoxicity Assay Kit(プロメガ社製)を用い、キットに添付のプロトコールに従って以下の通り実施した。

20

【0143】

エフェクター細胞の調製

C3Hマウス(8週齢、オス、埼玉実験動物)から脾臓を摘出し、10%FBS含有RPMI1640培地中で脾細胞を分離した。同培地で洗浄後、細胞濃度を 5×10^6 個/mLに調製し、500U/mL ヒトIL-2(PEPROTEC社製)、10ng/mL マウスGM-CSF(PEPROTEC社製)存在下で5日間培養した。測定当日、脾細胞を回収し、5%FBS含有DMEM培地(フェノールレッド不含)で洗浄後、同培地で 1.25×10^7 個/mLに調製し、エフェクター細胞とした。

【0144】

標的細胞の調製

標的細胞として、AMIGO2全長発現CHOクローン(EXZ1005)を用いた。細胞をプレートから剥離後、5%FBS含有DMEM培地(フェノールレッド不含)に懸濁し、 2×10^4 個/wellとなるように96ウェルU底プレート(Beckton Dickinson社製)に30 μ L/well分注した。

30

【0145】

ADCC活性の測定

標的細胞に濃度2.4 μ g/mLの抗体液を10 μ L/well分注した後、30分間インキュベーションした。次いで、エフェクター細胞を40 μ L/well分注し、炭酸ガスインキュベーター中で4時間培養した。培養後、50 μ Lの上清を回収し、平底の酵素アッセイ用プレートへ移した。そこへ、キット付属の基質混合液を50 μ L/well添加し、遮光下、室温で30分間インキュベートした。インキュベート後、反応停止液50 μ L/wellを添加し、マイクロプレートリーダーを用いて波長490nmにて吸光度を測定した。

40

細胞傷害活性は、以下の通り求めることができる。

$$\text{細胞傷害活性(\%)} = (A - B - C) / (D - C) \times 100$$

A：[各試料における吸光度] - [培養液のバックグラウンドの吸光度]

B：[エフェクター細胞に由来するLDHによる吸光度] - [培養液のバックグラウンドの吸光度]

C：[標的細胞から自然に放出されるLDHによる吸光度] - [培養液のバックグラウンドの吸光度]

50

D : [0 . 9 % T r i t o n - X 1 0 0 添加により標的細胞から 1 0 0 % 放出された L D H による吸光度] - [培養液のバックグラウンドの吸光度]

【 0 1 4 6 】

結果を表 1 1 に示した。表中、陰性対照とは A M I G O 2 に反応性を示さないことが事前に判明している抗体である。この陰性対照の抗体が示した A D C C 活性値 3 . 2 % に対し、2 0 % 以上の高い A D C C 活性を示す 4 種抗体 (P P Z 2 9 5 2 , P P Z 3 1 2 2 , P P Z 3 1 3 3 および P P Z 3 1 4 5) が得られた。

これら 4 種の抗体を産生するハイブリドーマは、P P Z 2 9 5 2 (識別番号 : P P M X 0 5 1 0 、 F E R M A P - 2 1 0 3 8) 、 P P Z 3 1 2 2 (識別番号 : P P M X 0 5 0 7 、 F E R M A P - 2 1 0 2 3) 、 P P Z 3 1 3 3 (識別番号 : P P M X 0 5 0 8 、 F E R M A P - 2 1 0 2 4) 、 P P Z 3 1 4 5 (識別番号 : P P M X 0 5 1 9 、 F E R M A P - 2 1 0 4 2) として (独) 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (住所 : 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 中央第 6) に寄託した (P P Z 2 9 5 2 および P P Z 3 1 4 5 に関しては、受領日 : 平成 1 8 (2 0 0 6) 年 9 月 2 7 日、P P Z 3 1 2 2 および P P Z 3 1 3 3 に関しては、受領日 : 平成 1 8 (2 0 0 6) 年 9 月 8 日) 。

【 0 1 4 7 】

【 表 1 1 】

No	クローン番号	ADCC 活性 (%)	No	クローン番号	ADCC 活性 (%)	No	クローン番号	ADCC 活性 (%)
1	PPZ2904	13.1	8	PPZ2952	27.0	15	PPZ3130	15.4
2	PPZ2912	13.7	9	PPZ2956	18.0	16	PPZ3133	22.8
3	PPZ2913	9.9	10	PPZ3003	13.3	17	PPZ3135	14.5
4	PPZ2919	15.4	11	PPZ3016	17.9	18	PPZ3145	22.0
5	PPZ2920	18.0	12	PPZ3122	20.3	19	PPZ3148	16.6
6	PPZ2936	18.9	13	PPZ3124	16.7	20	PPZ3160	17.7
7	PPZ2937	18.0	14	PPZ3125	15.2	-	陰性対照	3.6

【 0 1 4 8 】

各種使用目的に対応できる抗 A M I G O 2 モノクローナル抗体を作製した。A M I G O 2 タンパク質の全長のみならず、各種部分ペプチドを哺乳類細胞の C H O 細胞および発芽型バキュロウィルスに発現させて免疫用ならびにスクリーニング用抗原として使用した。その結果、表 1 2 に示すように使用目的に対応できる抗体を選択することができた。この結果が示すように、使用目的全てに合致した抗体の取得は困難であり、使用目的に対応できる抗体を取得するためには、目的に応じたスクリーニング方法を取り入れることが必須であることが明らかとなった。

【 0 1 4 9 】

【表 1 2】

各種使用目的に対応できる抗AMIG02モノクローナル抗体の一覧

クローン番号	サブクラス	ウェスタンブロット				解離定数 (単位: M)	sandwich ELISA	CDC活性 (%)		ADCC活性 (%)			免疫染色	
		sAMIG02		AMIG02-Ig				EXZ1005	PK-45P	EXZ1005	PK-45P	Capan-1	組織アレイ	ヒト腫瘍組織
		非還元	還元	非還元	還元									
PPZ2904	G2a	+	+	+	+	3.00E-08	-	85.0	7.2	13.1	±	-	-	
PPZ2912	G2a	+	+	+	+	1.60E-08	-	79.7	7.0	13.7	-	-	(NT)	
PPZ2913	G2b	+	+	+	+	ND	-	85.9	4.8	9.9	±	+	+	
PPZ2919	G2a	-	-	-	-	2.00E-08	-	90.9	18.4	15.4	(NT)	(NT)	(NT)	
PPZ2920	G1	-	-	-	-	9.80E-09	○	2.2	6.3	18.0	-	-	(NT)	
PPZ2936	G1	+	+	+	+	2.70E-08	-	4.4	6.3	18.9	-	-	(NT)	
PPZ2937	G2a	-	-	-	-	4.50E-08	-	93.0	13.1	18.0	(NT)	(NT)	(NT)	
PPZ2952	G1	+	+	+	+	ND	-	3.6	6.3	27.0	+	+	+	
PPZ2956	G1	-	-	-	-	9.00E-09	○	4.2	7.1	18.0	(NT)	(NT)	(NT)	
PPZ3003	G2a	-	-	-	-	5.90E-08	-	96.9	12.6	13.3	(NT)	(NT)	(NT)	
PPZ3016	G2a	+	+	+	+	7.90E-09	○	79.4	4.9	17.9	-	-	(NT)	
PPZ3122	G2a	+	+	+	+	3.50E-09	◎	78.3	7.8	20.3	+	±	-	
PPZ3124	G2a	-	-	-	-	3.00E-08	-	100.0	26.2	16.7	(NT)	(NT)	(NT)	
PPZ3125	G2a	-	-	-	-	5.10E-08	-	79.9	17.1	15.2	(NT)	(NT)	(NT)	
PPZ3130	G2a	+	+	-	-	ND	-	73.4	5.8	15.4	+	+	+	
PPZ3133	G1	-	-	-	-	2.60E-09	◎	5.7	5.5	22.8	-	-	(NT)	
PPZ3135	G2a	-	-	-	-	4.70E-08	-	78.8	24.8	14.5	(NT)	(NT)	(NT)	
PPZ3145	G1	-	-	-	-	6.20E-08	-	5.3	6.9	22.0	(NT)	(NT)	(NT)	
PPZ3148	G2a	-	-	-	-	4.60E-08	-	83.4	33.7	16.6	(NT)	(NT)	(NT)	
PPZ3160	G1	-	-	-	-	2.10E-08	-	3.6	7.2	17.7	(NT)	(NT)	(NT)	

表中、NDとは解離定数が検出限界以下であることを示す。また、例えば、解離定数 3.0E-08 は 3.0×10^{-8} であることを示す。また、+は反応性あり、-は反応性なしを表している。

10

20

30

40

【0150】

実施例 15 膵臓癌細胞株の scid マウスへの移植と形成された腫瘍塊の免疫染色

膵臓癌細胞株 PK-45P を CB17-scid マウス (メス、7 週齢) に右側腹部皮下に移植し (1×10^7 個細胞/マウス)、移植 3 4 日後に腫瘍塊を摘出した後、OTC コンパウンド包埋し凍結切片を作製した。このようにして作製した凍結切片を PBS (2

50

0 mMリン酸、150 mM NaCl, pH 7.0) で5分間ずつ3回洗浄した後、10 mMクエン酸緩衝液 (pH 6.0) に浸漬しオートクレーブ処理 (121、20分間) によって抗原を賦活化した。

抗原の賦活化後、PBSで5分間ずつ3回洗浄した後、内在性のペルオキシダーゼを失活させるために0.3%過酸化水素加メタノール中で室温15分間反応させた。次いで、蒸留水で1回洗浄後、PBSで5分間ずつ3回洗浄し、40%ブロッカー (雪印乳業) を含むTBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0) でブロッキングした (室温、30分間)。PBSで5分間ずつ3回洗浄した後、10%ブロッカーを含むTBSで20 µg/mLに希釈した抗AMIGO2モノクローナル抗体を4で一夜反応させた。PBSで5分間ずつ3回洗浄した後、PBSで200倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG (GEヘルスケアバイオサイエンス) を二次抗体として室温で1時間反応させた。PBSで5分間ずつ3回洗浄した後、DAB (3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩) を用いて発色させた。また、核の対比染色にはヘマトキシリンを用いた。

【0151】

結果を図10に示した。scidマウスに移植した膵臓癌細胞株PK-45Pは、マウス皮下で腫瘍塊を形成した後もAMIGO2の発現を維持していることが分かった。また、その免疫染色の度合いを実施例13に記載した判定基準によって判断すると、スコア1+と判定された。

【0152】

実施例16 膵臓癌細胞株のscidマウスへの生着・増殖抑制試験

実施例15に示した、scidマウスの皮下に移植後もAMIGO2の発現が維持 (判定:スコア1+) されていることが判明した膵臓癌細胞株PK-45Pを新たにscidマウス (メス、7週齢) の右側腹部皮下に 2×10^6 細胞個/マウスとなるように移植し、移植日をday 0として、このday 0を含みday 15まで3日間隔でマウス尾静脈から抗体を投与し (合計6回投与)、膵臓癌細胞株の生着性確認 (触診による) ならびに生着後腫瘍塊の体積測定 (皮膚を介して腫瘍塊の長径Lと短径Wをノギスで測定し、腫瘍体積Vを計算式 $V = LW^2 / 2$ で算出した。単位 mm^3) を2~3日間隔でday 38まで実施した。

投与抗体として、CDC活性あるいはノおよびADCC活性を示した3種の抗AMIGO2モノクローナル抗体 (PPZ2952, PPZ3122, PPZ3148) を選択した。

このとき、PPZ2952はサブクラスIgG1、PPZ3122およびPPZ3148はサブクラスIgG2aであるので、移植したPK-45Pに反応しない陰性コントロール抗体として、それぞれのサブクラスに対応する3423 (サブクラスIgG1) およびK7124 (サブクラスIgG2a) も投与した。一群10匹として、一回の抗体投与量はマウス体重から換算して25 mg/kgとした。

サブクラスがIgG1の抗体群に関する結果を図11に、サブクラスがIgG2aの抗体群に関する結果を図12に示した。抗体投与期間、すなわちday 0からday 15までの期間は各試験群とも腫瘍の生着が確認された。しかし、抗体投与終了後の腫瘍体積の増加をみると、PPZ2952, PPZ3122, PPZ3148のいずれの抗体とも、陰性コントロールの3423あるいはK7124と比較し、腫瘍増殖抑制効果が認められた。実施例13および実施例15に記載したように、scidマウスに移植して形成させたPK-45P腫瘍塊の免疫染色スコアが1+であるのに比較し、臨床検体である膵臓癌組織の免疫染色スコアは1+以上を示すものが64%以上であった。このことから、AMIGO2を高発現している癌患者においてPPZ2952, PPZ3122, PPZ3148による膵臓癌治療効果が期待できる。

【0153】

実施例17 AMIGO2強制発現膵癌細胞株のscidマウスへの生着・増殖抑制試験

10

20

30

40

50

(1) AMIGO2 強制発現膵臓癌細胞株の作製

FuGENE HDトランスフェクション試薬(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)のプロトコールに準じて、実施例3(1)で調製したAMIGO2全長発現ベクターpEF4/AMIGO2fullを膵臓癌細胞株MIA PaCa2にトランスフェクションした。すなわち、トランスフェクション前日に直径35mmディッシュに 8×10^5 cellのMIA PaCa2を播種し一晩培養を行い、翌日に、3 μ gの発現ベクターpEF4/AMIGO2fullと6 μ LのFuGENE HD試薬を150 μ Lの無血清Opti-MEM培地(Invitrogen社製)に混合し、15~45分間の室温におけるインキュベーションを行った後、細胞培養液に加えトランスフェクションを行った。トランスフェクション翌日に限界希釈法および選択試薬であるZeocin(Invitrogen社製)を用いてクローニングを開始した。

AMIGO2全長発現MIA PaCa2は、抗AMIGO2モノクローナル抗体(R&D systems社製)を用いたウェスタンブロット、フローサイトメトリー(ベクトンディッキンソン社製FACScaliburを使用)および抗AMIGO2抗体による免疫染色により、シグナルが強く、しかも増殖が良好なクローンを選択し、AMIGO2全長発現MIA PaCa2クローンEXZ3901を得た。AMIGO2タンパク質の発現量を免疫染色によって調べると、図13に示すようにMIA PaCa2野生株に比べEXZ3901でのAMIGO2タンパク質の発現は十分に高いことが確認できた。

【0154】

(2) AMIGO2 強制発現膵臓癌細胞株のscidマウスへの移植

上記で作製したAMIGO2全長発現MIA PaCa2クローン(EXZ3901)あるいは野生株のMIA PaCa2細胞株をscidマウス(メス、7週齢)の右側腹部皮下に 1×10^7 細胞個/マウスとなるように移植した。

【0155】

(3) 腫瘍塊サイズおよびscidマウス血清中AMIGO2タンパク質の測定

膵臓癌細胞株移植後の腫瘍塊およびscidマウス血清中AMIGO2タンパク質濃度を知るために、AMIGO2全長発現MIA PaCa2クローン(EXZ3901)あるいは野生株のMIA PaCa2細胞株を移植したscidマウス各2匹のday10に腫瘍塊の摘出とマウス血清の採取を行った。摘出した腫瘍塊の長径を定規で測定し、長径3mm未満を小、長径3mm以上6mm未満を中、長径6mm以上を大としてサイズ分類した。マウス血清中AMIGO2タンパク質の検出は、実施例11に示したELISAによって実施した。表13に結果をまとめた。AMIGO2全長発現MIA PaCa2クローン(EXZ3901)を移植したマウス個体では、腫瘍サイズに比例した濃度で血清中AMIGO2タンパク質を検出できた。MIA PaCa2野生株を移植したマウス個体では、腫瘍塊のサイズは十分にもかかわらず血清中AMIGO2タンパク質が全く検出できなかったことから、EXZ3901移植マウスの血清中に検出し得たAMIGO2タンパク質は、EXZ3901腫瘍塊から何らかの原因で血液中に遊離したものと考えられた。

【0156】

【表13】

担癌マウスの摘出腫瘍塊のサイズと血清中AMIGO2濃度

マウス個体番号	移植細胞種	摘出腫瘍塊のサイズ	マウス血清中AMIGO2濃度 (ng/mL)
1	EXZ3901	大	9.0
2	EXZ3901	中	1.8
3	MIA PaCa2野生株	大	0.0
4	MIA PaCa2野生株	中	0.0

【0157】

(4) *s c i d*マウスにおけるA M I G O 2強制発現膵癌細胞株の生着・増殖抑制試験

前記実施例17(2)と同様に作製した担癌マウスモデルに対して、移植日をday 0として、このday 0を含みday 27まで3日間隔でマウス尾静脈から抗体を投与し(合計10回投与)、膵臓癌細胞株の生着性確認(触診による)ならびに生着後腫瘍塊の体積測定(皮膚を介して腫瘍塊の長径Lと短径Wをノギスで測定し、腫瘍体積Vを計算式 $V = L W^2 / 2$ で算出した。単位 mm^3)を3~4日間隔でday 42まで実施した。

投与抗体として、CDC活性あるいは/およびADC活性を示した2種の抗A M I G O 2モノクローナル抗体(PPZ3124およびPPZ3148)を選択した。

PPZ3124およびPPZ3148はサブクラスIgG2aであるので、移植したA M I G O 2全長発現M I A P a C a 2クローン(EXZ3901)に反応しない陰性コントロール抗体として、K7124(サブクラスIgG2a)も投与した。一群10匹として、一回の抗体投与量はマウス体重から換算して75mg/kgとした。

各抗体投与群での腫瘍生着率を図14に示した。いずれの抗体投与群においてもA M I G O 2全長発現M I A P a C a 2クローン(EXZ3901)は移植後12日までは80~90%の生着率を示した。しかし、PPZ3124およびPPZ3148投与群では、その後、生着率は暫時低下し抗体投与が終了した31日以降でも20~30%の生着率に止まった。一方、陰性コントロールであるK7124投与群では抗体投与期間の21日に100%の生着率を示した。

また、生着後の腫瘍体積の平均値 \pm SDの推移について、PPZ3124に関する結果を図15に、PPZ3148に関する結果を図16に示した。被験抗体(PPZ3124あるいはPPZ3148)投与群と陰性コントロール抗体(K7124)投与群との間で、各測定日での腫瘍体積の平均値の差をWilcoxon順位和検定で検定すると、PPZ3124投与群は12日以降、PPZ3148投与群は15日以降、 p 値 < 0.01 となり有意と結論づけることができた。

【0158】

実施例18 近赤外領域での*i n v i v o*蛍光イメージングによる担癌マウスの腫瘍への抗体の集積確認

(1) 蛍光物質による抗体の標識

0.5M NaClを含む50mM炭酸水素ナトリウムバッファー(pH8.5)で濃度5mg/mLとなるように調製した抗A M I G O 2モノクローナル抗体(PPZ3124)1mLに攪拌下でN,N-ジメチルフォルムアミドに溶解した25mM DY-676-NHS-Ester(Dyomics社製)2.5 μ Lを添加し、暗所にて室温で1時間反応させた(PPZ3124とDY-676のモル比=1:2)。反応液の全量を予め150mM NaClを含む20mMリン酸ナトリウムバッファー(pH7.2)で平衡化したPD-10カラム(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)にアプライし、抗体溶出画分をプール後、抗体濃度が5mg/mLとなるように限外濾過により濃縮した。波長280nmでの抗体のモル吸光係数(220,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)および波長674nmでのDY-676のモル吸光係数(145,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)より算出したPPZ3124抗体1分子あたりの蛍光物質DY-676の結合数は、0.8分子であった。

同様の方法で陰性コントロール抗体K7124もDY-676で標識した。K7124抗体1分子あたりのDY-676の結合数は0.9分子であった。

【0159】

(2) *i n v i v o*イメージング

*s c i d*マウス(メス、7週齢)の右側腹部皮下に膵臓癌細胞株PK-45Pを 2×10^6 細胞個/マウスとなるように移植することで作製した担癌マウスを用意し、上記で調製したDY-676標識PPZ3124あるいはDY-676標識K7124(いずれも濃度:5mg/mL)の0.1mLをマウス尾静脈から投与した。蛍光標識抗体の投与48時間後にペントバルビタールをマウス腹腔に注射し麻酔下で近赤外励起蛍光検出ユニット搭載のLAS-3000(富士フイルム)で蛍光イメージングデータを取得した。

DY-676 標識 PPZ3124 投与マウスの結果を図17(a)に、DY-676 標識 K7124 投与マウスの結果を図17(b)に示した。図中、腫瘍の存在部位を白色の破線円で示した。DY-676 標識 PPZ3124 は担癌マウスの腫瘍に集積が認められた。また、陰性コントロールのDY-676 標識 K7124 投与マウスの腫瘍には蛍光が検出されていないことから、DY-676 標識 PPZ3124 の集積は、腫瘍細胞上に発現する AMIGO2 蛋白質に PPZ3124 が結合することによる特異的な反応に基づくことが分かった。すなわち、蛍光標識した抗 AMIGO2 抗体 PPZ3124 を担癌マウスの静脈内に投与することで AMIGO2 を発現する腫瘍を特異的にイメージングできることが分かった。

【0160】

実施例19 抗体結合による AMIGO2 蛋白質の細胞内移行

(1) 蛍光物質による抗体の標識

0.5 M NaCl を含む 50 mM 炭酸水素ナトリウムバッファー (pH 8.5) で濃度 5 mg/mL となるように調製した抗 AMIGO2 モノクローナル抗体 (PPZ3124) 365 μ L に攪拌下でジメチルフォルムアミドに溶解した 5 mg/mL Alexa Fluor 488 Succinimidyl Ester (Molecular Probes 社) 1.7 μ L を添加し、暗所にて室温で1時間反応させた (PPZ3124 と Alexa Fluor 488 のモル比 = 1 : 2)。反応液の全量を予め 150 mM NaCl を含む 20 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.2) で平衡化した PD-10 カラム (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) にアプライし、抗体溶出画分をプールした後、抗体濃度が 1 mg/mL となるように限外濾過により濃縮した。波長 280 nm での抗体のモル吸光係数 ($220,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) および波長 495 nm での Alexa Fluor 488 のモル吸光係数 ($71,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) より算出した PPZ3124 抗体1分子あたりの蛍光物質 Alexa Fluor 488 の結合数は、0.8 分子であった。

【0161】

(2) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた抗体結合 AMIGO2 蛋白質の細胞内移行の確認

直径 35 mm のガラスベースディッシュ (IWAKI 製) に実施例3(3)で作製した AMIGO2 全長発現 CHO クローン (EXZ1005) を 5×10^5 cell で播種し2日間培養した後、培地を捨て、上記で調製した Alexa Fluor 488 標識 PPZ3124 を 20 μ g/mL の濃度で含む 10% FBS 含有 F-12 HAM 培地 200 μ L を細胞に加え室温で5分間インキュベートした。次いで、10% FBS 含有 F-12 HAM 培地で細胞を洗浄し、同培地 200 μ L を添加後、共焦点レーザー顕微鏡 (倒立型 IX81、オリンパス製) で経時的 (0, 0.5, 1, 2 時間) にデータを取得した (励起波長 488 nm / 蛍光波長 519 nm)。反応直後では細胞膜表面に局在した蛍光シグナルが、時間経過と共に細胞内に移行する様子が観察された (図18)。すなわち、細胞膜表面上に存在する AMIGO2 に抗体 (PPZ3124) が結合すると、エンドサイトーシスによって AMIGO2 - 抗体複合体が細胞内に取り込まれることが分かった。

【0162】

実施例20 細胞傷害活性を持つ物質をコンジュゲートした抗体による AMIGO2 発現細胞の増殖抑制

実施例3(3)で作製した AMIGO2 全長発現 CHO 細胞を 10% FBS 含有 F-12 HAM 培地で懸濁し、平底 96 ウェルプレートの1ウェルあたり 5×10^3 個となるように巻き込み1夜培養した (70 μ L / ウェル)。次いで、1次抗体として抗 AMIGO2 抗体 PPZ3124 あるいは陰性コントロール抗体 K7124 を種々濃度含む 10% FBS 含有 F-12 HAM 培地 (Sigma 社) を 30 μ L / ウェルで添加し (PPZ3124 あるいは K7124 のウェル内での終濃度: 0.1, 1, 10, 100 ng/mL、各濃度3重測定)、5% CO₂ インキュベーター内 (37 $^{\circ}$ C) に1時間静置した。F-12 HAM 培地 (FBS 不含) で2回細胞を洗浄し、CHO-S-SFM-III 培地 (Invitrogen 社) で 0.21 μ g/mL となるように希釈した植物由来毒素 Sapo

10

20

30

40

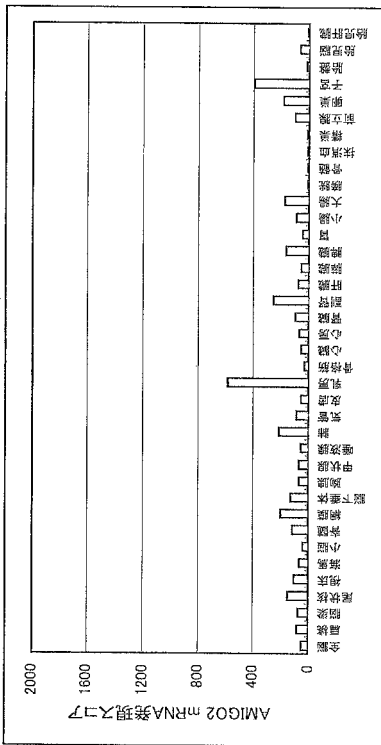
50

r i n結合抗マウスI g GヤギI g G（商品名：M a b - Z A P，フナコシ）を2次抗体として150μL/ウェルで添加し、5%CO2インキュベーター内（37℃）に48時間静置した。次いで、各ウェルにX T T試薬（ロシュ・ダイアグノスティックス社製細胞増殖キットI I）を75μL/ウェルで添加し、5%CO2インキュベーター内（37℃）に6時間静置した。マイクロプレートリーダーを用いて波長450nmにおける吸光度（各ウェルの生細胞数に比例する）を測定し、2次抗体のみ反応させたウェルの吸光度の平均値を100%とし、1次抗体を種々濃度で反応させたウェル吸光度の相対%を求めた。この相対%を生細胞数（%）として1次抗体濃度に対してプロットした結果を図19に示した。

1次抗体としてP P Z 3 1 2 4を反応させた場合、生細胞数（%）は抗体の濃度依存的に大きく低下した。この結果は、細胞膜上に存在するA M I G O 2タンパク質にP P Z 3 1 2 4が濃度依存的に結合し、それに応じて植物由来毒素S a p o r i n結合抗マウスI g GヤギI g Gが結合した後、実施例19に示したエンドサイトーシスによって植物由来毒素S a p o r i nが細胞内に取り込まれ細胞毒性を示したことを示している。すなわち、抗A M I G O 2モノクローナル抗体P P Z 3 1 2 4を間接的あるいは直接的に植物由来毒素S a p o r i nで標識し、A M I G O 2発現細胞に作用させることで細胞増殖抑制作用を持たせることができる。

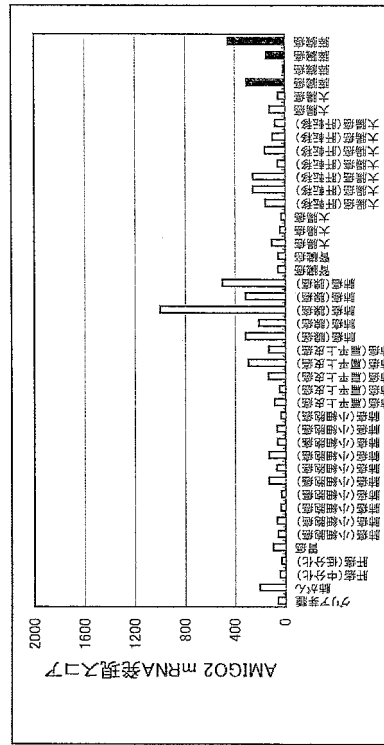
10

【図1 - a】



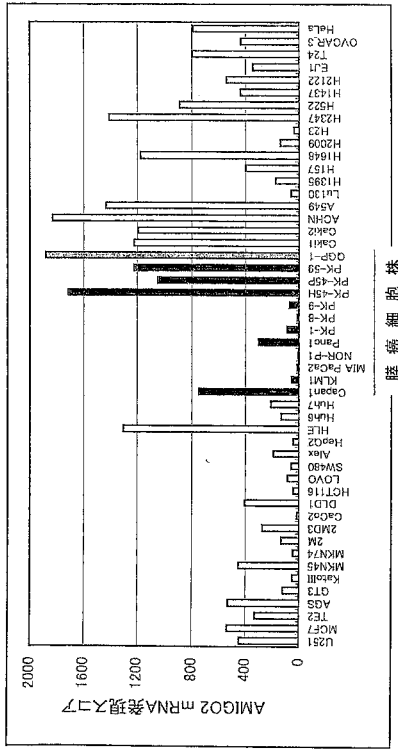
a

【図1 - b】



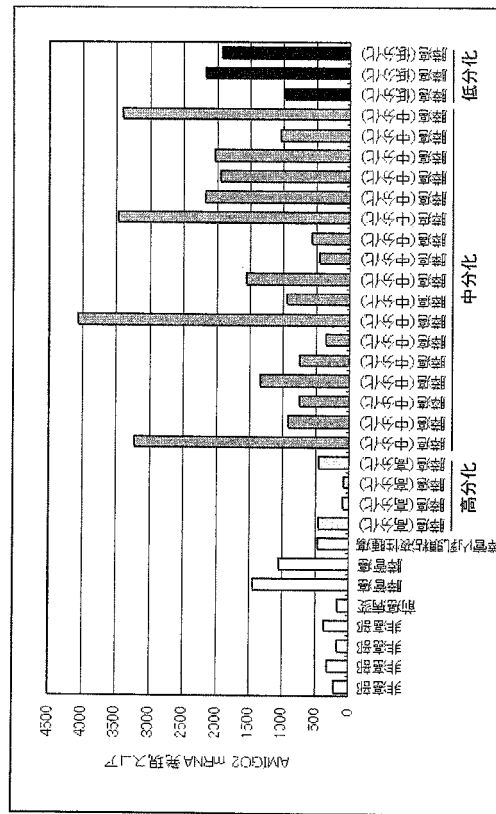
b

【 図 1 - c 】

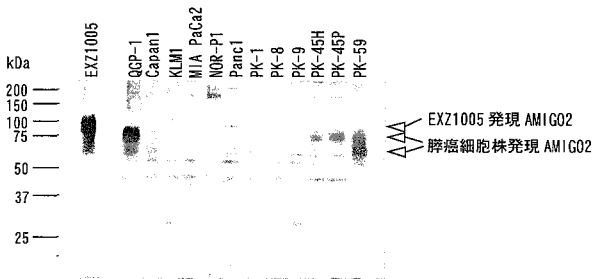


癌細胞株

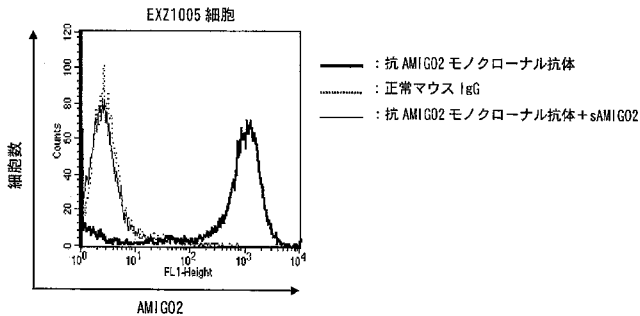
【 図 2 】



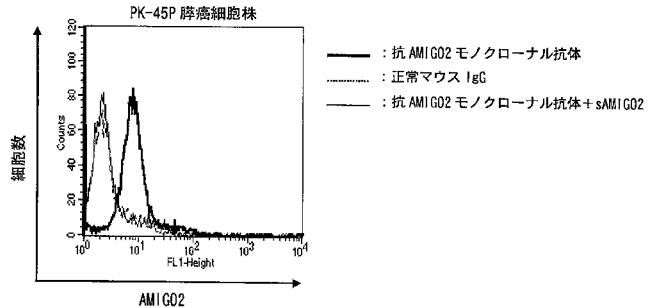
【 図 4 】



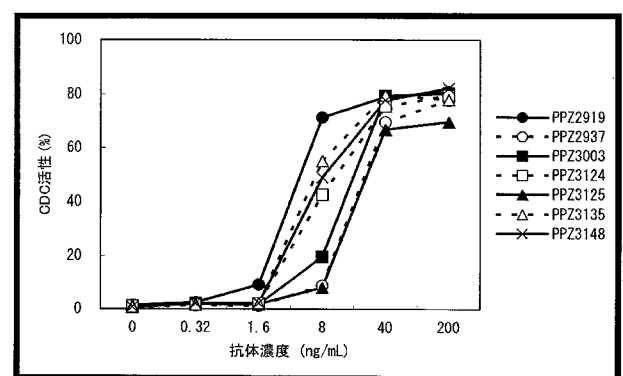
【 図 5 】



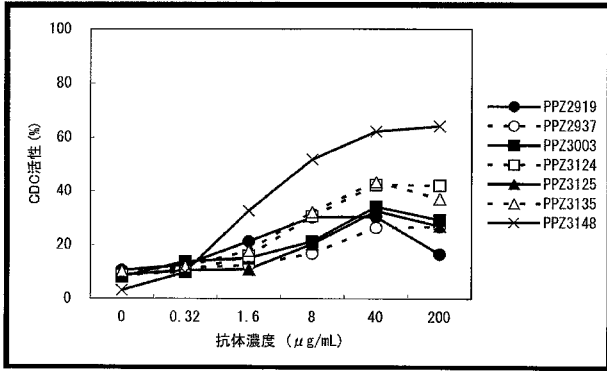
【 図 6 】



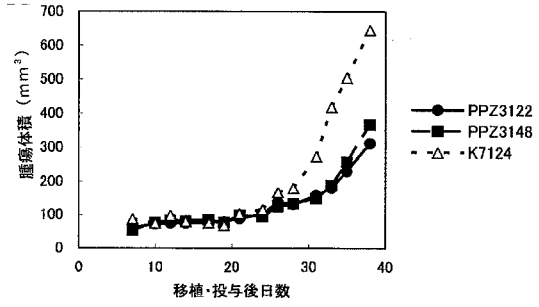
【 図 7 】



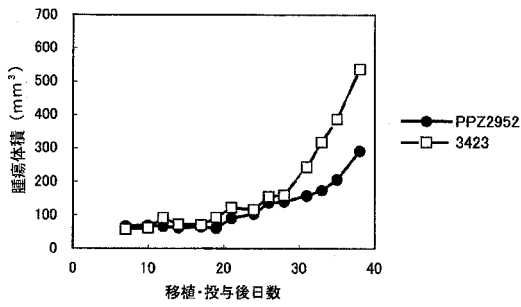
【 図 8 】



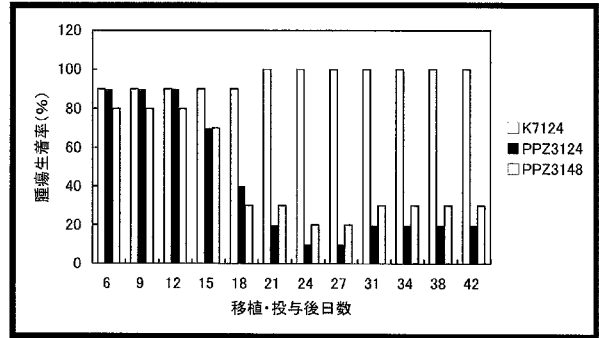
【 図 1 2 】



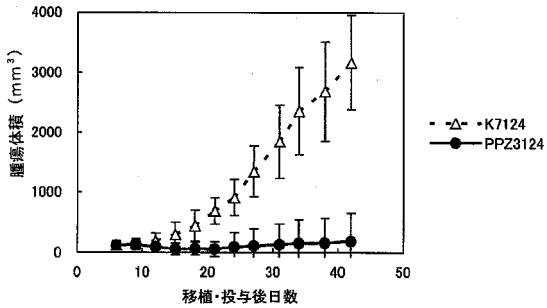
【 図 1 1 】



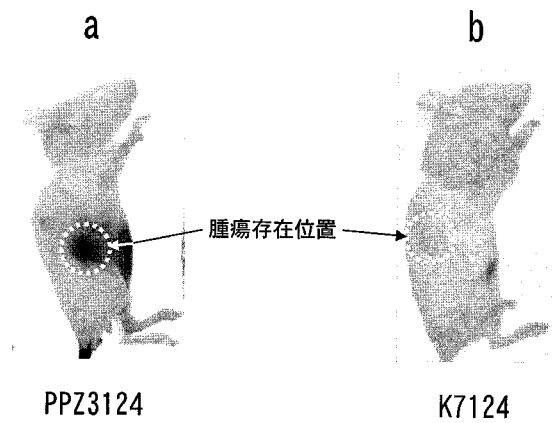
【 図 1 4 】



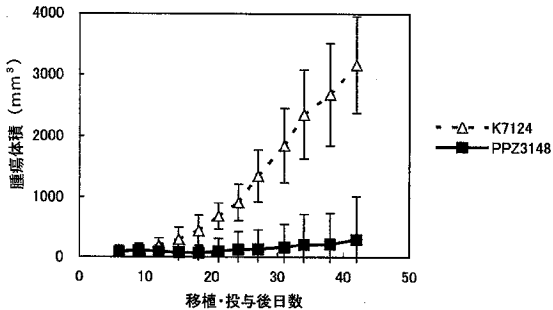
【 図 1 5 】



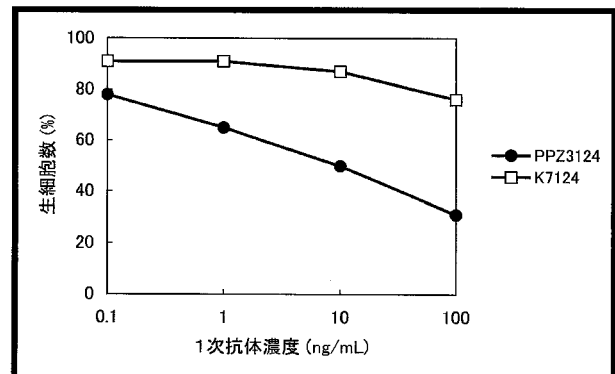
【 図 1 7 】



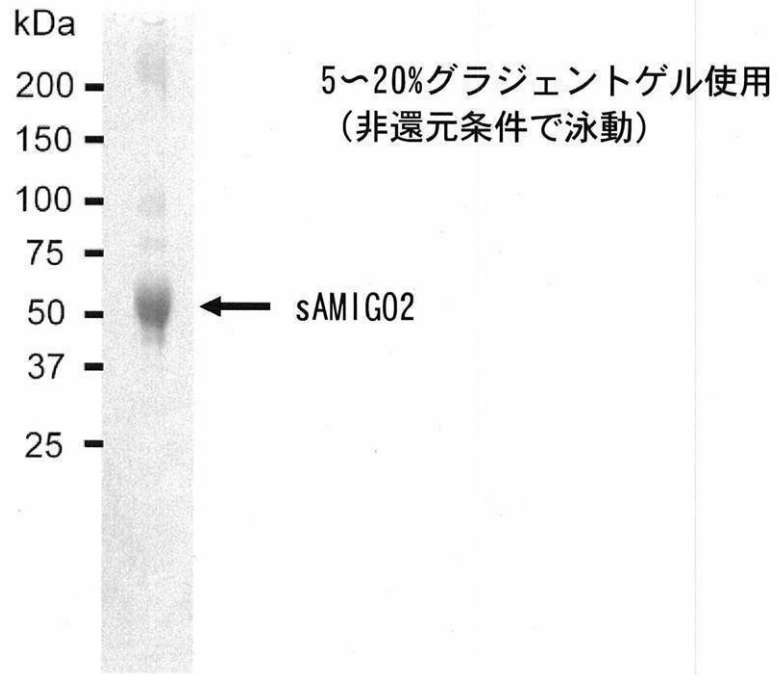
【 図 1 6 】



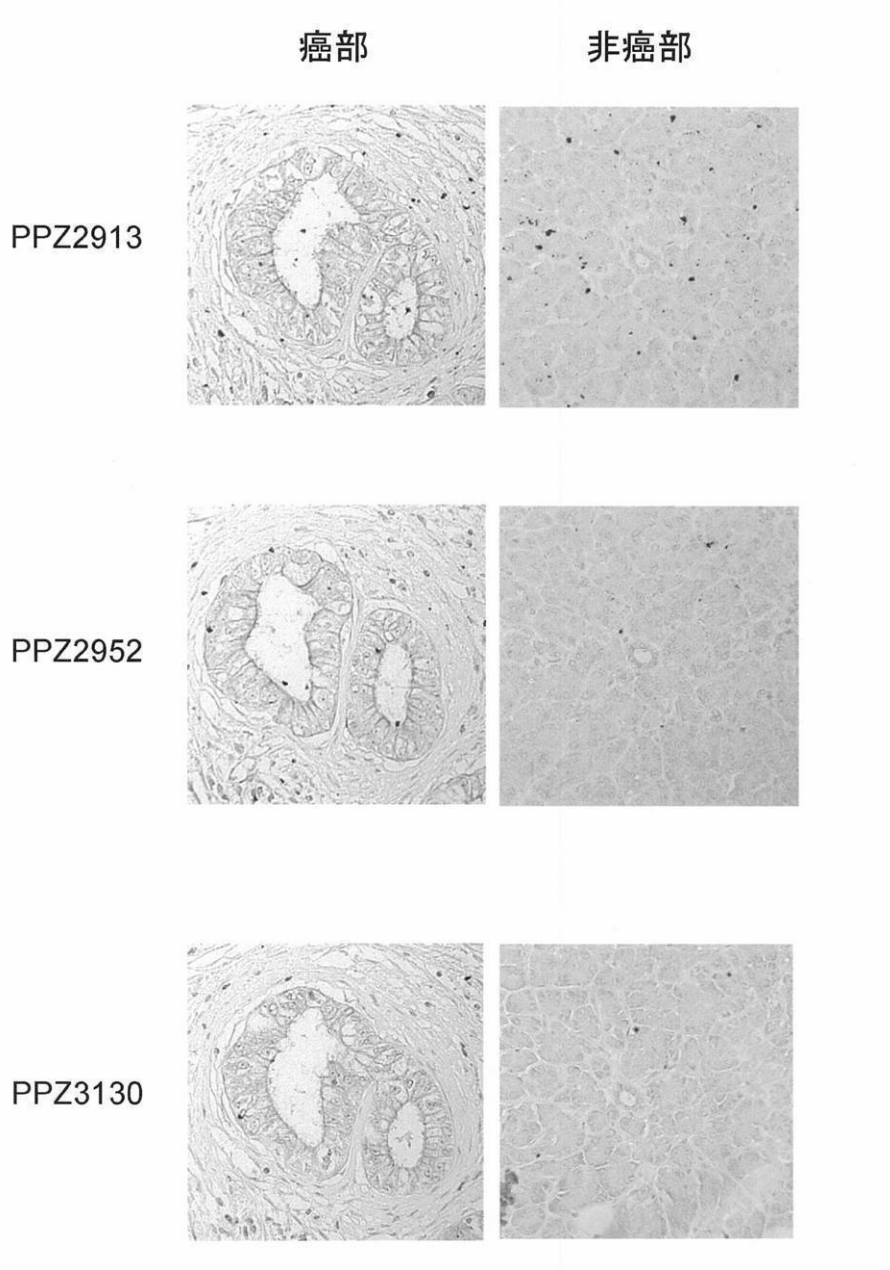
【 図 1 9 】



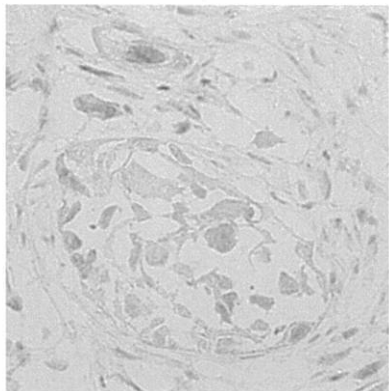
【 図 3 】



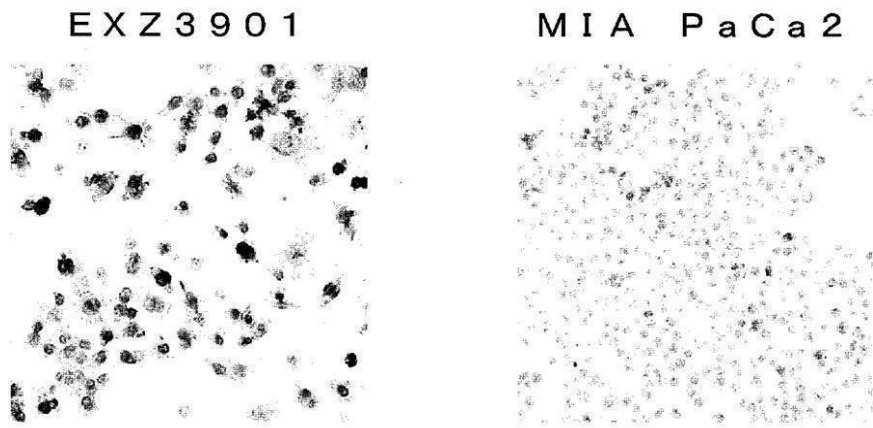
【 図 9 】



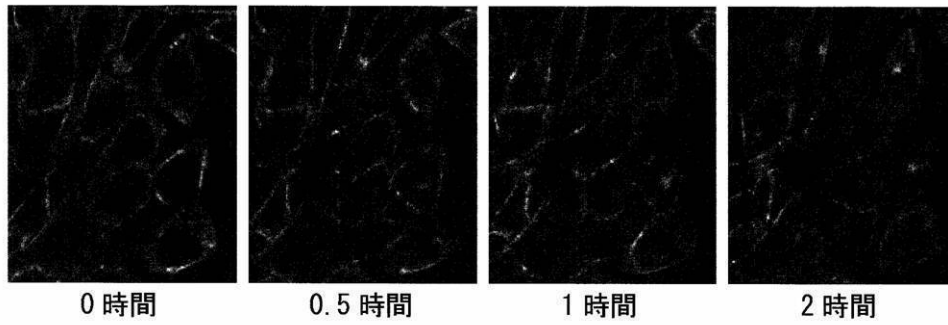
【 図 1 0 】



【 図 1 3 】



【 図 1 8 】



【 配 列 表 】

2007122820000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/000423
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/574(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K51/00(2006.01)i, A61P1/18(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i 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) G01N33/574, A61K39/395, A61K51/00, A61P1/18, A61P35/00, C12N15/09 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 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), JMEDPLUS (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPLUS (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Rabenau, Karen E., DEGA/AMIGO-2, a leucine-rich repeat family member, differentially expressed in human gastric adenocarcinoma: effects on ploidy, chromosomal stability, cell adhesion/migration and tumorigenicity, Oncogene, Vol.23, No.29, 2004, Page.5056-5067	1-9,12-19
A	Makoto SUNAMURA, "Bunshi Seibutsugakuteki Shuho ni yoru Suigan Akuseido Shindan to Bunshi Hyoteki Chiryo no Kaihatsu", Journal of Japan Surgical Society, Vol.106, special extra issue, 2005, page 261, SF5308-3	1-9,12-19
A	Yoshinori IMAI, "Proteome Kaiseki no Shuho o Mochiita Suigan Shinki Shuyo Marker no Tansaku", Annual Meeting of the Japan Cancer Association Kiji, Vol.64th, 2005, page 487, PA3-1182	1-9,12-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 16 May, 2007 (16.05.07)		Date of mailing of the international search report 29 May, 2007 (29.05.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/000423

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hisanao OKURA, "Suigan Shuyo Marker no Combination Assay no Yuyosei", Sogo Rinsho, Vol.39, No.12, 1990, pages 2781 to 2786	1-9,12-19
A	Masato MAEKAWA, "Suigan no Soki Shindan eno Approach Suigan no Shuyo Marker", The Journal of Japan Pancreas Society, Vol.19, No.6, 2004, pages 579 to 583	1-9,12-19
A	Nobuhiko SOYAMA, "Monoclonal Kotai o Mochiita Suigan Soki Shindan to Chiryō Seiseki Kojo no Tameno Rinshoteki·Jikkenteki Kenkyū", Medicina Philosophica, Vol.10, No.2, 1991, pages 73 to 75	1-9,12-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/000423

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.: 10, 11, 20-23
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 10, 11 and 20 to 23 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body or methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
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:

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 0 0 4 2 3									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/574(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K51/00(2006.01)i, A61P1/18(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i											
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. G01N33/574, A61K39/395, A61K51/00, A61P1/18, A61P35/00, C12N15/09											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2007年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2007年	日本国実用新案登録公報	1996-2007年	日本国登録実用新案公報	1994-2007年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2007年										
日本国実用新案登録公報	1996-2007年										
日本国登録実用新案公報	1994-2007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) BIOSIS (STN), Caplus (STN), MEDLINE (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)											
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 請求の範囲の番号									
A	Rabenau, Karen E., DEGA/AMIGO-2, a leucine-rich repeat family member, differentially expressed in human gastric adenocarcinoma: effects on ploidy, chromosomal stability, cell adhesion/migration and tumorigenicity, Oncogene, Vol. 23, No. 29, 2004, Page. 5056-5067	1-9, 12-19									
A	砂村 眞琴, 分子生物学的手法による膵癌悪性度診断と分子標的治療の開発, 日本外科学会雑誌, Vol. 106 臨時増刊号, 2005, Page. 261, SF5308-3	1-9, 12-19									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> 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 16.05.2007		国際調査報告の発送日 29.05.2007									
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) 三木 隆	2 J 3312								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3252								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 0 0 4 2 3
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 請求の範囲の番号
A	今井 良典, プロテオーム解析の手法を用いた膵癌新規腫瘍マーカーの探索, 日本癌学会学術総会記事, Vol. 64th, 2005, Page. 487, PA3-1182	1-9, 12-19
A	大倉 久直, 膵癌 腫瘍マーカーのコンビネーションアッセイの有 用性, 総合臨床, Vol. 39, No. 12, 1990, Page. 2781-2786	1-9, 12-19
A	前川 真人, 膵癌の早期診断へのアプローチ 膵癌の腫瘍マ ーカー, 膵臓, Vol. 19, No. 6, 2004, Page. 579-583	1-9, 12-19
A	曾山 信彦, モノクローナル抗体を用いた膵癌早期診断と治療成績 向上のための臨床的・実験的研究, 病態生理, Vol. 10, No. 2, 1991, Page. 73-75	1-9, 12-19

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2007/000423

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. 請求の範囲 10, 11, 20-23 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 10、11、20～23 は人の身体を診断または治療する方法であり、調査することを要しない。
2. 請求の範囲 _____ 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. 請求の範囲 _____ 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。

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の範囲について作成した。
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の範囲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の範囲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の範囲について作成した。

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を伴う異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2005年4月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/536 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	G 0 1 N 33/536	B
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
	C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願(独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新機能抗体創製技術開発プロジェクト委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願)

(74)代理人 100117156

弁理士 村田 正樹

(74)代理人 100111028

弁理士 山本 博人

(72)発明者 油谷 浩幸

東京都武蔵野市吉祥寺南町3丁目30番16号

(72)発明者 岩成 宏子

栃木県下野市緑6丁目30番11号

(72)発明者 河野 功

千葉県成田市中台一丁目一番2号1棟105号

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04

GA11 HA01 HA11

4C085 AA12 AA13 BB11 CC02 CC21 CC23

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JPWO2007122820A5	公开(公告)日	2010-04-02
申请号	JP2008511970	申请日	2007-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社英仙蛋白质科学 国立大学法人 东京大学		
申请(专利权)人(译)	英仙座蛋白质组学公司 东京大学		
[标]发明人	油谷浩幸 岩成宏子 河野功		
发明人	油谷 浩幸 岩成 宏子 河野 功		
IPC分类号	G01N33/574 A61K49/00 A61K39/395 A61K51/00 A61P35/00 G01N33/536 C07K16/28 C12N15/09		
CPC分类号	A61K47/6819 A61K47/6859 A61K49/0032 A61K49/0041 A61K49/0058 A61K51/1057 A61K2039/505 A61P1/18 C07K16/303 C07K2317/732 C07K2317/734 C07K2317/92 G01N33/57438		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.A A61K49/00.A A61K39/395.E A61K39/395.T A61K49/02.C A61P35/00 G01N33/536. B C07K16/28 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024 /CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4C085/AA12 4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC21 4C085/CC23 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045 /CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	村田正树		
优先权	2006114134 2006-04-18 JP 2006291091 2006-10-26 JP 2006347544 2006-12-25 JP		
其他公开文献	JP5090342B2 JPWO2007122820A1		

摘要(译)

本发明提供了一种使用血液标记物的胰腺癌的新颖诊断或治疗方法。本发明提供了包含抗AMIGO2抗体的用于胰腺癌的诊断或治疗药物。