

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5688699号
(P5688699)

(45) 発行日 平成27年3月25日(2015.3.25)

(24) 登録日 平成27年2月6日(2015.2.6)

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	C
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 2
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
G O 1 N	33/577	(2006.01)	G O 1 N	33/577	A
G O 1 N	33/531	(2006.01)	G O 1 N	33/531	A

請求項の数 17 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2011-501684 (P2011-501684)
 (86) (22) 出願日 平成22年2月26日(2010.2.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2010/053168
 (87) 国際公開番号 W02010/098471
 (87) 国際公開日 平成22年9月2日(2010.9.2)
 審査請求日 平成25年2月12日(2013.2.12)
 (31) 優先権主張番号 特願2009-46730 (P2009-46730)
 (32) 優先日 平成21年2月27日(2009.2.27)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 512319944
 株式会社オーダーメイドメディカルリサーチ
 千葉県流山市東深井105番地
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁
 (72) 発明者 里深 博幸
 千葉県流山市東深井105番地 株式会社
 バイオマトリックス研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がん細胞を用いた免疫方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) 転移性を有し、抗原を発現するがん細胞を実験動物(ヒトを除く)に移植する工程、

(2) 前記がん細胞を前記実験動物内に10週以上生着させて免疫する工程

を含む、実験動物を免疫する方法であって、

前記移植する部位が、リンパ節の近傍、脂肪組織、前記がん細胞が単離されたがんの原発巣が属する器官、および転移巣が属する器官からなる群より選択される少なくとも1種である前記方法。

【請求項 2】

前記工程(2)が、前記実験動物の脾臓の細胞数を 4×10^8 細胞以上に増加させる工程である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記がん細胞が、乳がん細胞である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗原が、膜タンパク質である、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記がん細胞が、MCF7-14、MDA-MB231、MDA-MB361、およびMDA-MB435からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

10

20

【請求項 6】

前記移植する部位が、前記がん細胞が単離されたがんの原発巣が属する器官である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記脂肪組織が、乳腺である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

乳腺が、第 4 乳腺である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記実験動物が、齧歯類である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記実験動物が、免疫不全動物である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記実験動物が、BALB/c-nu/nuヌードマウスである、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記工程(1)で、足場材料を用いて移植する、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記足場材料の構成成分が、ラミニン、エンタクチン、コラーゲン、フィブリン、アガロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリ乳酸、およびポリグリコール酸からなる群より選択される少なくとも 1 種である、請求項 12 に記載の方法

20

【請求項 14】

前記足場材料が、マトリゲルである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

(1) 転移性を有し、抗原を発現するがん細胞を実験動物(ヒトを除く)に移植する工程、
(2) 前記がん細胞を前記実験動物内に生着させて免疫する工程、
(3) 前記実験動物より抗体産生細胞を採取し、ミエローマ細胞と融合する工程を含む、ハイブリドーマ細胞の製造方法。

【請求項 16】

(1) 転移性を有し、抗原を発現するがん細胞を実験動物(ヒトを除く)に移植する工程、
(2) 前記がん細胞を前記実験動物内に生着させて免疫する工程、
(3) 前記実験動物より抗体産生細胞を採取し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマ細胞を作製する工程、
(4) 前記ハイブリドーマ細胞を培養する工程を含む、モノクローナル抗体の製造方法。

30

【請求項 17】

(1) 転移性を有し、抗原を発現するがん細胞を実験動物(ヒトを除く)に移植する工程、
(2) 前記がん細胞を前記実験動物内に生着させて免疫する工程、
(3) 前記実験動物から血清を採取する工程を含む、ポリクローナル抗体の製造方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、がん細胞を用いた免疫方法に関する。

【背景技術】

50

【 0 0 0 2 】

ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体は、血液などの混合溶液中に含まれる微量なタンパク質と特異的に結合できるため、研究や臨床検査における試薬あるいは医薬品などとして、産業上で有用な物質である。

抗体分子は、細胞膜上に発現している抗原に対して抗原抗体反応を強く引き起こすため、疾病患者に投与した場合に治療効果が期待できるためには、膜タンパク質を認識する抗体であることが望ましい。

【 0 0 0 3 】

現在までに上市されている疾病治療用の抗体は、大部分が膜タンパク質を認識するモノクローナル抗体であり（非特許文献1）、（1）標的細胞へ結合し、直接的または間接的に細胞死を誘導する（特許文献1）、（2）膜レセプターへのリガンドの結合を阻害して細胞内シグナル伝達を緩和する（特許文献2）、などの作用により治療効果を発揮している。

これまでに上市された抗体は、一つ一つが創意工夫と膨大な作業を繰り返すことによって得られたものであり、膜タンパク質に対するモノクローナル抗体の製法として簡便な方法は依然確立されていない。

【 0 0 0 4 】

膜タンパク質を認識する抗体の取得技術について、これまでのところ、様々な試みがなされている。

例えば、細胞膜の表面に露出しているペプチド配列を、大腸菌などでの強制発現や化学合成により作製し、該ペプチド配列をキャリアタンパク質と結合させて、免疫応答を行なわせる方法が知られている。

しかし、斯かる方法では、立体構造の形成や糖鎖などの翻訳後修飾が行われず、膜タンパク質の本来の構造を認識する抗体を得ることができないという欠点がある。

【 0 0 0 5 】

膜タンパク質に対するモノクローナル抗体を得るためには、膜タンパク質が本来の立体構造を保持したまま、実験動物を免疫する必要がある。しかし、細胞膜から膜タンパク質を抽出する際に、界面活性剤を使用すると膜タンパク質の立体構造が崩れたり、界面活性剤を使用しないと膜タンパク質が疎水性領域同士で凝集したりするなどの問題があり、抗原として立体構造を保った膜タンパク質を容易に調製することはできない。

【 0 0 0 6 】

全長タンパク質を免疫する方法として、マウスに発現用のDNAベクターを直接導入する遺伝子免疫法が報告されている（特許文献3）。

しかし、斯かる方法では、精製抗原を必要としない、標的分子の立体構造を認識する抗体が得られるなどの利点も多いが、（1）細胞表面に発現させなければ免疫応答を誘導できない、（2）導入遺伝子の発現量の低さが原因で十分な免疫が行われず、（3）細胞外領域が小さすぎる場合は免疫システムが反応せず、抗体ができない、（4）膜タンパク質である複数回膜貫通型のタンパク質に対して抗体を得るのが困難である、などの欠点も多く指摘されている（非特許文献2）。

【 0 0 0 7 】

バキュロウイルスの膜に機能的な膜タンパク質を再構成させて免疫する方法が報告されている（非特許文献3）。

しかし、標的分子に特異的な抗体誘導を行う場合に免疫応答性が弱いことが文献中に記載されている。また、斯かる方法では、昆虫細胞でバキュロウイルスを調製するため、翻訳後修飾（例えば複合型のN型糖鎖付加）が哺乳類細胞に見られる翻訳後修飾とは異なる点や、全ての膜タンパク質がウイルス膜上で機能的な構造を取ることができるのか、という問題とその検証が依然として残されている。

【 0 0 0 8 】

立体構造の問題を考慮せずに済むよう、増殖させた細胞をそのままマウスの尾静脈や腹腔へ投与して、免疫応答を行う方法が報告されている（特許文献4～6および非特許文献

10

20

30

40

50

4～8)。これらの方法では、通常の抗原量(100～200 μgの標的タンパク質)よりも多量な1～10×10⁶個の細胞(約4～40 mgのタンパク質に相当)を短期間(1週間間隔)で投与し、免疫開始から1～6週間後には抗体産生細胞を取り出している。

【0009】

細胞投与の手法として改良された方法として、ヒトがん組織をマウスの皮下または性腺脂肪パッド内へ投与することが報告されている(特許文献7)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開2001-010974号公報

10

【特許文献2】特開平7-188056号公報

【特許文献3】特開平7-313187号公報

【特許文献4】国際公開第2006/109533号パンフレット

【特許文献5】特開平6-327491号公報

【特許文献6】特表2004-517885号公報

【特許文献7】特表2001-520011号公報

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】日薬理誌 2008 131 p.102-108

【非特許文献2】生物工学 2008 86(8) p.384-386

20

【非特許文献3】J. Immunol. Methods 2007 322 (1-2) p.104-117

【非特許文献4】Somatic Cell Genet. 1979 5(6) p.957-971

【非特許文献5】J. Clin. Invest. 1981 68(5) p.1331-1337

【非特許文献6】Cancer Res. 1986 46(10) p.5137-5143

【非特許文献7】Cancer Res. 1982 42(2) p.601-608

【非特許文献8】Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1979 76(3) p.1438-1442

30

【非特許文献9】Antibodies: A Laboratory Manual 1988 Chapter 5 p.114-115

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

特許文献4～6および非特許文献4～8に開示された方法では、(1)多種類のタンパク質を同時に免疫するため、特定の物質に対して免疫応答が起こり難い、(2)多量のタンパク質を投与するためにアナフィラキシーショックが引き起こされる、(3)がん細胞の転移による臓器不全などにより早期に動物が死亡しやすい、という問題がある。

40

【0013】

また、親和性の高い抗体を多種類得るには、ハイパーイミュニゼーション(hyperimmunization)を進行させることが重要であり、従来の方法では、少ない抗原量で長い期間免疫するほど、ハイパーイミュニゼーションが進みやすいことが知られている。例えば、マウスの場合は3週間以上の間隔で複数回(経験的に5回以上)投与することが好ましいことが知られている(非特許文献9)。ハイパーイミュニゼーションとは、IgGへのクラスシフトやアフニティーマチュレーション、クロナルドミナンス(アポトーシスによる特異性の低い抗体産生細胞の選択的死滅)の3つの機構をあわせて言い、親和性の高い抗体が選択的に増殖する機構として知られている(非特許文献9)。

特許文献4～6および非特許文献4～8に開示された方法では、免疫応答を惹起するた

50

めに多量の細胞を投与することから、マウスが早期に死亡しやすく、ハイパーイミュニゼーションが進行しにくい。したがって、これら文献に開示された細胞を直接投与する方法では、効果的な免疫応答を十分誘導する条件を作り出せていない。

【 0 0 1 4 】

特許文献 7 に開示された方法では、(1) B 細胞を含むヒト組織を分離する必要がある、(2) 組織に含まれる細胞の種類が異なるため免疫応答の再現性がない、(3) 試験管内での培養が困難であり、遺伝子導入などの技術が利用困難である、という問題がある。

【 0 0 1 5 】

以上のとおり、膜タンパク質に対する抗体の簡便な製法の確立が求められている。

そこで、本発明は、上記問題点を克服し、目的とする抗体を効率よく作製できる免疫方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 6 】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、転移性を有するがん細胞を実験動物に移植して生着させることにより、目的とする抗体を効率的に得ることができることを見出し、本発明を完成した。

【 0 0 1 7 】

すなわち、本発明は、以下のとおりである。

[1]

(1) 転移性を有し、抗原を発現するがん細胞を実験動物に移植する工程、
(2) 前記がん細胞を前記実験動物内に生着させて免疫する工程を含む、実験動物を免疫する方法。

[2]

前記工程 (2) が、10 週以上生着させる工程である、[1] に記載の方法。

[3]

前記工程 (2) が、前記実験動物の脾臓の細胞数を 4×10^8 細胞以上に増加させる工程である、[1] または [2] に記載の方法。

[4]

前記がん細胞が、乳がん細胞である、[1] ~ [3] のいずれかに記載の方法。

[5]

前記抗原が、膜タンパク質である、[1] ~ [4] のいずれかに記載の方法。

[6]

前記がん細胞が、MCF7 - 14、MDA - MB231、MDA - MB361、および MDA - MB435 からなる群より選択される少なくとも 1 種である、[1] ~ [5] のいずれかに記載の方法。

[7]

前記移植する部位が、リンパ節の近傍である、[1] ~ [6] のいずれかに記載の方法。

[8]

前記移植する部位が、脂肪組織である、[1] ~ [7] のいずれかに記載の方法。

[9]

前記移植する部位が、前記がん細胞が単離されたがんの原発巣が属する器官、および転移巣が属する器官からなる群より選択される少なくとも 1 種である、[1] ~ [8] のいずれかに記載の方法。

[10]

前記移植する部位が、前記がん細胞が単離されたがんの原発巣が属する器官である、[1] ~ [9] のいずれかに記載の方法。

[11]

前記移植する部位が、乳腺である、[1] ~ [10] のいずれかに記載の方法。

[12]

10

20

30

40

50

- 前記移植する部位が、第4乳腺である、[1]～[11]のいずれかに記載の方法。
- [13]
前記実験動物が、齧歯類である、[1]～[12]のいずれかに記載の方法。
- [14]
前記実験動物が、免疫不全動物である、[1]～[13]のいずれかに記載の方法。
- [15]
前記実験動物が、BALB/c-nu/nuヌードマウスである、[1]～[14]のいずれかに記載の方法。
- [16]
前記工程(1)で、足場材料を用いて移植する、[1]～[15]のいずれかに記載の方法。 10
- [17]
前記足場材料の構成成分が、ラミニン、エンタクチン、コラーゲン、フィブリン、アガロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリ乳酸、およびポリグリコール酸からなる群より選択される少なくとも1種である、[16]に記載の方法
- [18]
前記足場材料が、マトリゲルである、[17]に記載の方法。
- [19]
(1) 転移性を有し、抗原を発現するがん細胞を実験動物に移植する工程、
(2) 前記がん細胞を前記実験動物内に生着させて免疫する工程、 20
(3) 前記実験動物より抗体産生細胞を採取し、ミエローマ細胞と融合する工程を含む、ハイブリドーマ細胞の製造方法。
- [20]
(1) 転移性を有し、抗原を発現するがん細胞を実験動物に移植する工程、
(2) 前記がん細胞を前記実験動物内に生着させて免疫する工程、
(3) 前記実験動物より抗体産生細胞を採取し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマ細胞を作製する工程、
(4) 前記ハイブリドーマ細胞を培養する工程を含む、モノクローナル抗体の製造方法。
- 【発明の効果】 30
- 【0018】
本発明によれば、目的とする抗体を効率的に得ることのできる、新規な免疫方法を提供することができる。
- 【図面の簡単な説明】
- 【0019】
【図1】 血漿中に含まれる抗体の力価を解析した結果を示す。マウス群Aは、MCF7を移植した群であり、マウス群Bは、MCF7-14を移植した群であり、マウス群Cは、免疫を行っていない群である。マウス群AおよびBは、移植した細胞との反応性を示し、マウス群Cは、MCF7とMCF7-14に対する反応性を示す。
- 【図2】 摘出した脾臓を直径6cmの培養皿上に置いて撮影した写真を示す。免疫を行っていない群の脾臓と、MCF7-14を移植した群の脾臓を示す。 40
- 【図3】 脾臓細胞数を算出した結果を示し、エラーバーは標準偏差を示す。
- 【図4】 免疫染色の結果を位相差顕微鏡(1)および蛍光顕微鏡(2)下で撮影した像を示す。
- 【図5】 細胞における抗原タンパク質の発現を確認した結果を示す。縦軸は、F3遺伝子を導入した細胞(1~7)、導入していない細胞(Negative control)と、F3を認識する抗体との反応性を表す。
- 【図6】 ハイブリドーマの培養上清に含まれる抗体および培地のみ(Negative control)の力価を解析した結果を示す。縦軸は、各抗体のF3タンパク質に対する反応性を表す。 50

【発明を実施するための形態】

【0020】

以下、本発明について、その好ましい態様を具体的に説明する。なお、本発明は、以下の発明を実施するための形態に限定されるものではなく、本発明の要旨の範囲内で種々変形して実施することができる。

【0021】

本発明の免疫方法は、

- (1) 転移性を有し、抗原を発現するがん細胞を実験動物に移植する工程、
- (2) 前記がん細胞を前記実験動物内に生着させて免疫する工程を含む、実験動物を免疫する方法である。

本発明において、転移性を有し、抗原を発現するがん細胞を実験動物に移植し生着させることで、効果的に免疫することが可能である。本発明によれば、ハイパーイミュニゼーションが十分に進行した多種類の抗体産生細胞を得ることができる。また、本発明により、従来の免疫方法と比較して高い免疫応答を引き起こすことができる。

【0022】

実験動物に移植する細胞は、転移性を有し、抗原を発現するがん細胞であればよく、がん細胞が由来する動物種や器官は特に限定されない。

以下、「転移性を有し、抗原を発現するがん細胞」を、単に、「転移性を有するがん細胞」と記載する場合がある。

本発明では転移性を有するがん細胞を生着させて、直接免疫に用いることで、機能的な立体構造や翻訳後修飾を保持したまま抗原を免疫することが可能であり、これまで取得が困難であった膜タンパク質に対する抗体を誘導することができる。また、本発明では本来の（生体環境で有する構造を意味する）立体構造を有する抗原に対する抗体を得ることができるため、抗原に対して十分な中和能力を持つ抗体を誘導することができる。さらに、本発明では膜タンパク質だけでなく細胞質および核内のタンパク質に対しても抗体が誘導されるため、免疫方法として利用価値が高い。細胞内物質に対する免疫誘導は、マクロファージなどが移植したがん細胞を貪食して分解し、細胞内物質を抗原提示するという機構によるものと考えられる。

【0023】

本発明において、「転移性を有する」とは、細胞の転移能を評価する方法により、転移能が認められることを意味する。例えば、がん細胞を実験動物に移植した場合に、遠隔転移が見られることを、転移性を有するという。

本発明において、「高転移性を有する」とは、細胞の転移能を評価する方法により、高い割合で転移能が認められることを意味する。例えば、がん細胞を実験動物に移植した場合に、移植した実験動物群において、少なくとも20%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは60%以上の個体に遠隔転移が見られることを、高転移性を有するという。

本発明において、「遠隔転移」とは、原発巣より遠く離れた器官に転移することを意味する。

【0024】

本発明において、「抗原を発現する」とは、免疫応答を引き起こすことが可能な量の抗原を含むことを意味する。

本発明において、「抗原」は、免疫応答を引き起こさせる物質を意味し、移植するがん細胞で発現し、抗原抗体反応を生じる物質であれば特に限定されない。抗原として、タンパク質、核酸、ペプチド、糖類、および脂質などを使用することができる。抗原としては、好ましくはタンパク質が挙げられ、タンパク質としては、がん細胞が本来発現しているタンパク質でもよく、任意の遺伝子を細胞に導入して発現させたタンパク質でもよい。任意の遺伝子を細胞に導入する方法としては、公知の方法、例えば、プラスミドなどベクターを用いて行うことができる。この場合、タンパク質に付加された糖鎖も抗原となりうる。抗原は、1種類だけでなく、複数種類を用いてもよい。いずれの場合も細胞内でタンパク質が局在する部位は、特に限定されず、核内、細胞質内、細胞膜上が挙げられる。

10

20

30

40

50

また、抗原の大きさも特に限定されない。抗原としてタンパク質を同種の動物に由来するがん細胞に発現させて移植した場合、タンパク質の立体構造や糖鎖などの修飾が本来の形を保ったまま免疫応答を刺激できるため好適である。

【0025】

転移性を有するがん細胞としては、例えば、骨、肺、リンパ節、皮膚、肝臓、胸膜、脳、乳房、乳腺、膀胱、大腸、または結腸から樹立された転移性を有するがん細胞などが挙げられる。

転移性を有するがん細胞としては、好ましくは転移性を有する乳がん細胞であり、MCF7が挙げられる。

転移性を有するがん細胞としては、より好ましくは高転移性を有する乳がん細胞である。高転移性を有する乳がん細胞としては、具体的には、ヒトの乳がんより樹立されたMCF7由来のMCF7-14（国際公開第2008/093886号公報、受託番号：FERM BP-10944）、MDA-MB231、MDA-MB361、およびMDA-MB435などが挙げられる。乳がん細胞以外の、高転移性を有するがん細胞としては、HT-1080（繊維肉腫）、HepG2（肝臓がん）、T-24（膀胱がん）、SW620（大腸がん）、A549（肺がん）、SW480（結腸がん）、およびA375（黒色腫）などが挙げられる。

転移性を有するがん細胞の移植部位が乳腺近傍である場合は、エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター、およびHer-2から選ばれる1つ以上のタンパク質が発現している乳がん細胞であることが好ましい。これらのタンパク質が発現している乳がん細胞は、乳腺で増殖しやすく、移植後の生着に効果的である。

【0026】

転移性を有するがん細胞として、転移性が細胞に本来備わっているほか、遺伝子を導入する、ホルモンやサイトカインなどの増殖因子を投与する、紫外線や薬剤で遺伝子変異を誘発する、および自然突然変異や後天的にクロマチンの修飾が変わった細胞を分離するなど、当業者が想到する手段により、転移性を持つよう調製したがん細胞を用いることができる。

転移性を有するがん細胞としては、単一のがん細胞であってもよく、複数種のがん細胞であってもよいが、単一のがん細胞を用いることが好ましく、中でも、株化されたがん細胞を用いることが好ましい。

【0027】

転移性を有するがん細胞が移植される実験動物（ヒトを除く）は、移植した細胞が生着して、液性免疫応答が機能する動物であれば、特に限定されない。

実験動物の種類は特に限定されないが、好ましくはマウスやラットなどの齧歯類であり、より好ましくは免疫不全の齧歯類であり、さらに好ましくは免疫不全のマウスである。

実験動物としては、近交系やクローズドコロニー系の免疫不全のマウスが利用できる。免疫不全マウスとして、具体的には、BALB/cやC57BL/6、ICR系統の免疫不全マウスなどが挙げられ、中でも、BALB/c-nu/nuのメスは、T細胞の機能が低下しているために移植した細胞が生着しやすく、飼育もしやすいため好適である。

【0028】

本発明において、「移植する」とは、がん細胞を実験動物に移し植え付けることを意味し、血液中または腹腔内にがん細胞を直接投与することは含まない。

【0029】

転移性を有するがん細胞を実験動物に移植する工程においては、従来公知の方法により、がん細胞を実験動物に移植することができる。

転移性を有するがん細胞の移植を行う方法としては、細胞懸濁液の他、シート状や多層構造など、二～三次元構造様に培養した細胞を実験動物に注入する方法が挙げられる。

移植に用いる転移性を有するがん細胞数は特に限定されないが、少なくとも 0.1×10^6 個であることが好ましく、免疫応答が効果的に行われる範囲において、より多数の細胞を用いることが好ましい。

10

20

30

40

50

従来の尾静脈や腹腔内に細胞を投与する免疫方法において用いる細胞数は、初回免疫および追加免疫の各回に、 1×10^6 個から 1×10^7 個が必要である。本発明においては、移植時にのみ、少なくとも 0.1×10^6 個の細胞を用いればよいため、従来よりも少ない量で免疫応答を誘導することができる。

【0030】

転移性を有するがん細胞の生着を向上させるために、足場材料と混合した細胞懸濁液を注入することが好ましい。

足場材料としては、生着させるがん細胞が生育するための足場となる材料であれば特に限定されず、好ましくはラミニン、エンタクチン、コラーゲン、フィブリン、アガロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリ乳酸、およびポリグリコール酸などを成分として構成されたゲル、ハイドロゲル、および樹脂などが挙げられる。

足場材料としては、形成されるゲルの硬さや移植後の細胞増殖の良さの観点で、ラミニン/エンタクチンとコラーゲンを主成分とするゲルが好ましく、マトリゲル(Becton Dickinson社製)がより好ましい。マトリゲルとしては、好ましくは、J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. 1993 44(4-6) p. 671-673に開示されたグロースファクターリデューストマトリゲルなどが挙げられる。

【0031】

転移性を有するがん細胞を移植する部位については、移植した細胞が生着しやすい器官や組織であれば特に限定されない。

【0032】

転移性を有するがん細胞を移植する器官としては、当該がん細胞が単離されたがんの原発巣が属する器官および転移巣が属する器官が挙げられる。本発明において、原発巣が属する器官への移植を同所移植といい、転移巣が属する器官への移植を異所移植という。

転移巣が属する器官とは、これまでに当該がん細胞の転移巣形成が報告されている器官のほか、統計的なデータから、同種のがんにおいて遠隔転移が予測される器官も含む。

転移性を有するがん細胞として、例えば、乳がん細胞を用いる場合には、乳房への同所移植が可能であるが、骨、肺、リンパ節、皮膚、肝臓、胸膜、および脳などの転移が頻繁に発生する器官への異所移植も利用できる。移植する器官としては、好ましくは同所移植であり、例えば乳がん細胞では乳房である。

本発明において、がん細胞を単離した動物種と、がん細胞を移植する動物種が異なった場合でも、同じ機能を有する器官に移植した場合には、同所移植とする。

【0033】

転移性を有するがん細胞を移植する組織としては、原発巣が形成された組織と同じ組織が好ましく、このほか、リンパ節の近傍の組織、脂肪組織、または脂肪組織に包まれた組織が好ましい。

転移性を有するがん細胞を移植する組織としては、原発巣が形成された組織と同じ組織のように、原発巣が属する器官または転移巣が属する器官の中の、組織であってもよく、また、転移性を有するがん細胞が生着する組織であれば、原発巣が属する器官または転移巣が属する器官外にある組織であってもよい。

本発明において、「リンパ節の近傍」とは、リンパ節の周辺を意味し、リンパ節に隣接することが好適である。

リンパ節の近傍として、特に限定されるものではないが、例えば、マウスにおいては、リンパ節から1cm以内、好ましくは5mm以内、より好ましくは1mm以内であることが挙げられる。リンパ節の近傍では、生着後に細胞がリンパ節へ供給されやすいため、免疫応答が刺激されやすく好適である。

本発明において、「脂肪組織」とは、脂肪細胞で構成された組織を意味する。脂肪組織に包まれた組織は、例えば、乳腺が挙げられる。

脂肪組織は、外科的に移植作業がしやすく、細胞が生着しやすいため、がん細胞の移植部位として適している。実験動物としてマウスを用いて乳がん細胞を移植する場合は、第

10

20

30

40

50

4 乳腺に移植することが好ましい。第4 乳腺はリンパ節の近傍に位置し、脂肪組織に包まれているうえ、乳腺の中でも特に移植作業が容易であり、かつ長期間にわたり生着しやすい部位である。

【0034】

がん細胞の原発巣や転移巣が属する器官に限らず、移植した転移性を有するがん細胞を生着させることができる部位であれば、転移性を有するがん細胞を移植することができる。

【0035】

本発明において、「生着する」とは、移植したがん細胞がその部位に留まり増殖し、細胞塊を作することを意味する。

転移性を有するがん細胞を実験動物内に生着させるためには、がん細胞を移植した後は、当該実験動物を、免疫応答が行われる期間、飼育するだけでよく、通常の免疫で行われる追加免疫は不要である。転移性を有するがん細胞を実験動物内に移植した後は、実験動物内に生着させる際に、追加免疫を行わない方法であることが好適である。

本発明において、追加免疫を行う工程を含まないのは、移植したがん細胞が転移性を有することから、生着した部位から、転移性を有するがん細胞がリンパ節や血管内に恒常的に供給され、免疫応答を継続して刺激することができると考えられるためである。

【0036】

抗原に対する親和性や特異性の高いモノクローナル抗体を得るには、ハイパーイミュニゼーションを進行させることが重要であるため、生着させて免疫する工程における実験動物の飼育期間は、生存可能な範囲で長いほど好ましい。

ハイパーイミュニゼーションの指標としては、脾臓の大きさおよび細胞数が挙げられる。脾臓の大きさおよび脾臓の細胞数は、抗体産生細胞の増殖の程度を反映しているため、脾臓の細胞数が増加するに従い、抗体産生細胞の種類も増加すると考えられている。すなわち、脾臓の細胞数を多くさせるほど、より優れた性能の抗体を取得できると考えられる。

実験動物がマウスである場合、未感作のマウスの脾臓から得られる細胞数は $0.5 \sim 1 \times 10^8$ 個であり、アジュバントなどを用いて免疫した場合は、15 週間投与を繰り返すことで $2 \sim 4 \times 10^8$ 個まで増加し、ハイパーイミュニゼーションが進行することが知られている。脾臓の細胞数が 3×10^8 個以上であると、目的の抗原に対して一定の親和性および特異性を有する抗体が得られることが分かっている。

【0037】

本発明においては、少量の細胞で免疫することができるため、早期に実験動物が死亡しにくい。

細胞を腹腔内や尾静脈へ投与して免疫する従来の方法では、マクロファージなどの貪食作用により、投与した細胞が早期に消滅しやすい。また、転移性を有するがん細胞をマウスの尾静脈に投与した場合、急激に免疫応答が刺激されることにより、短期間（移植後1～6 週間）にマウスは死亡する。実際に、投与後7 週間以内には全てのマウスが死亡する例がある（東亜合成研究年報 T R E N D 1999 第2号 p.32）。

本発明においては、移植を行った多くのマウスで、少なくとも10 週以上、大抵は15 週以上の長期間に渡り生存が確認されている。さらに、本発明においては、がん細胞の供給が持続することから、免疫応答が刺激され続け、効率よくハイパーイミュニゼーションが進み、脾臓の細胞数を $9 \sim 13 \times 10^8$ 個にまで増やすことができる。

【0038】

本発明においては、抗原や移植する細胞の種類、移植する細胞数などによって、短期間でハイパーイミュニゼーションが進行する場合がある。この場合は、早期に飼育を終了して、後述する抗体産生細胞の採取を行うことができる。

【0039】

転移性を有するがん細胞に発現させる抗原としては、タンパク質であることが好ましく、目的タンパク質としては、特に限定されるものではないが、膜タンパク質などが挙げら

10

20

30

40

50

れる。

【0040】

本発明のハイブリドーマ細胞を製造する方法は、

- (1) 転移性を有し、抗原を発現するがん細胞を実験動物に移植する工程、
- (2) 前記がん細胞を前記実験動物内に生着させて免疫する工程、
- (3) 前記実験動物より抗体産生細胞を採取し、ミエローマ細胞と融合する工程を含む、方法である。

【0041】

本発明のモノクローナル抗体を製造する方法は、

- (1) 転移性を有し、抗原を発現するがん細胞を実験動物に移植する工程、
- (2) 前記がん細胞を前記実験動物内に生着させて免疫する工程、
- (3) 前記実験動物より抗体産生細胞を採取し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマ細胞を作製する工程、
- (4) 前記ハイブリドーマ細胞を培養する工程を含む、方法である。

10

【0042】

本発明において、転移性を有するがん細胞を実験動物内に生着させ免疫する工程の後に、当業者周知の方法に従い、モノクローナル抗体を取得することができる。

免疫した実験動物の脾臓またはリンパ節などより抗体産生細胞を採取し、ミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマ細胞を作製した後、目的の抗原、好ましくは目的のタンパク質に対して特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞のスクリーニングを行う。

20

当該ハイブリドーマ細胞を培養することにより、安定的にモノクローナル抗体を製造することができる。

本発明によれば、高い免疫応答を引き起こすことができるため、本発明の免疫方法は、親和性の高い抗体を生産するハイブリドーマ細胞の樹立に非常に有利である。

【実施例】

【0043】

以下に、実施例および比較例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0044】

実施例1．膜タンパク質に対する抗体の作製

(1) 細胞

MCF7およびMDA-MB231は、それぞれ東北大学加齢医学研究所(TKG 0479)およびAmerican Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)から購入した。

MCF7-14は、受託番号:FERM BP-10944を継代したものをを用いた。

MCF7、MCF7-14およびMDA-MB231は、10%(v/v)の血清(EQUITECH-BIO社製)を含むRPMI1640培地(Sigma社製)で80%コンフルエントを越えないよう37、5%CO₂下で48~72時間培養および継代を行った。

40

【0045】

(2) 細胞の移植

増殖した細胞を回収し、PBS(-)(0.01M sodium-phosphate buffer、0.138M NaCl、0.0027M KCl、pH 7.4)で2回洗浄した。洗浄後の細胞を最終濃度が 8.6×10^7 細胞/mLとなるようグロースファクターリデューストマトリゲル(Becton Dickinson社製)に懸濁し、移植するまで氷上で保存した。

生理食塩水に3.5%(w/v)となるよう抱水クロラール(Sigma社製)を溶解して、3.5%抱水クロラール生理食塩水溶液を調製した。6~8週齢のヌードマウス(BALB/cALcl-nu/nu系統(日本クレア社製))の腹腔内に3.5%抱水ク

50

ロラール生理食塩水溶液を0.2 mL投与して麻酔した。マウスの第4乳腺に、マトリゲルに懸濁した細胞を1乳腺あたり 1×10^6 個、24 Gの注射針を用いて乳腺からはみ出さないよう移植した。1匹のマウスに対して、2箇所の移植となるように、胴体左右両方の第4乳腺にそれぞれ移植を行った。

本方法では、通常の免疫で行われるような追加免疫は行わなかった。

【0046】

(3) 血漿の回収

移植した後15週間以上飼育した。移植部位にがんが形成されていくことを肉眼および触診により経時的に確認した。がん細胞を移植したマウスおよび未免疫のマウスの尾静脈から、20 μ Lの血液を採取した。採取した血液を1 μ Lのヘパリン溶液（味の素ファルマ社製）と混合した。得られた混合液を3000 \times gで5分間遠心分離して、細胞を沈殿させた。血漿溶液として、上清を回収した。

【0047】

(4) 免疫応答の解析

上記(1)の方法で培養したMCF7、MCF7-14およびMDA-MB231それぞれを80%コンフルエントとなるよう96ウエルプレートに植え、37、5%CO₂下で16時間培養した。

培養上清を除去後、10% (v/v) 中性緩衝ホルマリン溶液（WAKO社製）を100 μ L添加し、10分間室温で反応させた。ホルマリン溶液を除去後、PBS(-)で3回洗浄し、風乾させることで各々の細胞を固定化したプレートを作製した。

上記(3)で回収した血漿をTBS-T (25 mM Tris、150 mM NaCl、0.05% (v/v) Tween 20、pH 7.4) でそれぞれ2万倍希釈した。一次抗体として血漿の希釈液を固定化プレートへ1ウエルあたり100 μ L添加し、室温で1時間反応させた。各ウエルを200 μ LのTBS-Tで3回洗浄した。

二次抗体として、抗マウスIgGポリクローナル抗体-HRP標識（BETHYL社製）をTBS-Tで5千倍に希釈した。前記抗体の希釈液を1ウエルあたり100 μ L添加し、室温で30分反応させた。各ウエルを200 μ LのTBS-Tで3回洗浄した。

最終濃度0.5 mg/mLとなるようオルソフェニレンジアミン（Sigma社製）を50 mMの炭酸-クエン酸バッファー（pH 5.0）に希釈し、この溶液の1万分の1量の35% (w/w) 過酸化水素水（WAKO社製）を添加した混合液を基質溶液として各ウエルに100 μ L入れ、室温で10分間反応させた。25 μ Lの3N硫酸（WAKO社製）を添加することで反応を停止させた。492 nmの吸収をプレートリーダー（SpectraMax Pure 384、モレキュラーデバイス社製）で測定して、血漿中の力価を解析した。

図1に、MCF7またはMCF7-14を移植したマウス、および免疫していないマウスの血漿に含まれる抗体の力価を解析した結果を示す。

転移性を有するMCF7を移植したマウスでは、未免疫マウスに比べて抗体産生が確認され、さらに転移性が向上したMCF7-14を移植したマウスでは、明確な抗体産生が確認された。MDA-MB231を移植したマウスでも抗体産生が確認された（データ未掲載）。

【0048】

(5) 脾臓の大きさおよび脾臓に含まれる白血球細胞数

脾臓はB細胞の増殖と分化を担う臓器であり、異物が個体内に侵入して液性免疫応答が刺激された際、異物を認識する抗体を作るB細胞を特異的に増やす役割を持っている。このことから抗原に対する免疫応答のひとつの指標として、脾臓に含まれる白血球細胞の数が利用できる。

上記(2)で細胞を移植したマウスから脾臓組織を取り出し、脾臓の大きさを比較した。

免疫していない脾臓に比べ、MCF7-14を移植したマウスの脾臓は明確に肥大化していた（図2）。MDA-MB231を移植したマウスでもMCF7-14と同様な脾臓

10

20

30

40

50

の肥大化が確認された（データ未掲載）。

【0049】

それぞれの細胞数を算出するために脾臓内の細胞を注射針とピンセットを用いてRPMI 1640培地に取り出して、細胞懸濁液とした。細胞懸濁液100 μ Lとチュルク液（ナカライテスク社製）900 μ Lとを混合した。血球計算盤（アズワン社製）を用いて白血球細胞濃度を測定した。脾臓中の白血球細胞数に換算した結果、未免疫のマウスの脾臓では0.8~1 \times 10⁸細胞であるのに対し、MCF7-14を移植した場合には10 \times 10⁸細胞と約10倍細胞数が増加していた。図3に、免疫していないマウス2匹、一般的な免疫法であるアジュバント（フロイント完全アジュバント（PIERCE社製）、不完全アジュバント（PIERCE社製）、Ribiアジュバントシステム（フナコシ社製）、GERBUアジュバント（ナカライテスク社製）など）を用いたマウス100匹、MCF7-14を移植したマウス3匹より得た脾臓細胞数（脾臓中の白血球細胞数）を示す。アジュバントを用いた方法では、2~4 \times 10⁸細胞までしか細胞が得られないことと比較すると、本発明の方法では従来にない高い免疫応答が確認された。

【0050】

（6）細胞融合

MCF7-14由来のマウスの脾臓由来のリンパ球を、50%（v/w）ポリエチレングリコール4000（Sigma社製）を用いて、従来法でマウス骨髄腫株P3X63-Ag8（ATCC受託番号CRL-1580）と融合させた。

融合後の細胞をHAT培地（Invitrogen社製）に懸濁し、各ウエル100 μ Lとなるよう20枚の96ウエルプレートに散布した。途中、HAT培地を200 μ L添加し、11~16日間培養後に顕微鏡下で観察すると、1ウエルあたり3~6個のコロニーが形成された。

【0051】

（7）ハイブリドーマ細胞の解析

ハイブリドーマ細胞が成育した96ウエルプレートから200 μ Lの培養上清を回収し、上記（4）と同様の方法で細胞との反応性を解析して、MCF7-14に反応する抗体をスクリーニングした。

得られた抗体からランダムに5つのハイブリドーマ細胞を選び出し、モノクローン化した。これらの細胞をHT培地（Invitrogen社製）で培養し、上清に含まれる抗体、およびFITC標識したanti-mouse IgG（Becton Dickinson社製）を用いて、MCF7-14に対する免疫染色を行った。

図4に、位相差顕微鏡にて細胞の形態を観察した結果（1）、および蛍光顕微鏡にて染色された部分を検出した結果（2）を示す。

5種類のハイブリドーマ細胞から得られた抗体のうち3種類（クローンA、C、D）は細胞膜タンパク質を認識し、1種類は核（クローンB）、残りの1種類は細胞質（クローンE）にそれぞれ存在するタンパク質を認識した。無作為的に選んだ5つのクローンのうち、3種類（60%）が膜タンパク質に対する抗体であったことは、本発明の免疫方法が作製困難とされている膜タンパク質の抗体を容易に作製できる手法であることを強く示している。

【0052】

実施例2．膜タンパク質（F3）に対する抗体の作製

（1）抗原

膜結合型のタンパク質であるヒト組織因子（Tissue factor, coagulation factor III, F3）は、外因性の血液凝固反応を開始する因子である。この膜タンパク質に対する抗体作製を行った。

【0053】

（2）発現ベクターの作製

HeLa細胞からSV Total RNA Isolation System（Promega社製）を用いて抽出したRNAをSuperScript III RNAs

10

20

30

40

50

e H - Reverse Transcriptase (Invitrogen社製)を用いてcDNAとし、これを鋳型にPCR法によりF3を増幅した。増幅断片をpEF6/Myc-HisA (Invitrogen社製)にTag配列が欠除するようクローニングした。各操作はそれぞれのキットに添付された資料に基づいて行った。

【0054】

(3) 細胞上への遺伝子発現

実施例1(1)記載のMDA-MB231へ、上記(2)のプラスミドを、FUGENE6 (ロシュアプライドサイエンス社製)を用いて導入した。操作は当該キットに添付された資料に基づいて行った。プラスチジンS塩酸塩が10 μ g/mLとなるよう添加した実施例1(1)記載の培地で細胞を培養し、3~5日毎に培地を交換して薬剤耐性を持つ細胞を選択した。得られた耐性株の中からF3を強制発現している細胞を選び出すため、実施例1(4)記載の方法と同様に、細胞を用いた酵素免疫測定法(ELISA)によりF3の発現レベルを確認した。なお、一次抗体としては、抗F3ポリクローナル抗体であるAnti Coagulation Factor 3/Tissue Factor、(R&D systems社製)を1 μ g/mLに希釈したものをを用いた。また、二次抗体としては、Peroxidase AffiniPure Goat anti-bovine IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch社製)を用いた。さらに、TMB+(DAKO社製)を基質溶液として用い、450nmの吸収をプレートリーダーで測定して、抗体の力価を解析した。

図5に、F3遺伝子を導入した細胞(1~7)、および遺伝子を導入していない細胞(Negative control)に関して、抗F3ポリクローナル抗体を用いて発現解析した結果を示す。

遺伝子を導入した細胞では、導入していない細胞に比べ、F3の発現が有意に上昇していることが確認された。

【0055】

(4) F3発現細胞の移植

これらF3の発現が確認された細胞の中から増殖がほぼ均一な5種類の細胞(1~5)を選択して培養した。増殖した細胞を、トリプシンを用いて回収し、PBS(-)で2回洗浄した。5種類の細胞が均一になるよう混合した後、実施例1(2)記載の方法でマウスに移植を行った。本方法では、通常の免疫で行われるような追加免疫は行わなかった。

【0056】

(5) モノクローナル抗体の取得

移植7ヶ月後に脾臓細胞を取り出し、実施例1(6)記載の方法でハイブリドーマ細胞を作製した。F3を認識する抗体を選択するために、F3タンパク質を用いたELISAを以下のように行って、ハイブリドーマ細胞より産生された抗体の力価を解析した。

組換えタンパク質F3(Coagulation Factor III/Tissue Factor, human, Recombinant, Carrier-free, R&D systems社製)を2 μ g/mLとなるようPBS(-)に希釈し、100 μ Lずつ96穴プレートに分注した。1時間室温で吸着させた後、PBS(-)に1%(w/v) Bovine serum albuminとなるよう調製した溶液でブロッキングを30分間室温で行った。TBS-Tで洗浄後、一次抗体としてハイブリドーマ細胞の培養上清に含まれる抗体を、二次抗体として抗マウスIgGポリクローナル抗体-HRP標識(BETHYL社製)をTBS-Tで5千倍に希釈した溶液を用いて、実施例1(4)記載の方法と同様に操作を行った。

図6に、ハイブリドーマ細胞より産生された抗体(クローン番号にて表記)、および培地のみ(Negative control)の力価を解析した結果を示す。

細胞に発現させた膜タンパク質F3に対し、クローン13G5a、15B4a、18F3c、9C3aなどに代表されるような複数のモノクローナル抗体が得られた。

【0057】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2009年2月27日出願の日本特許出願（特願2009-46730号）に基づくものであり、その内容はここに参照として取り込まれる。

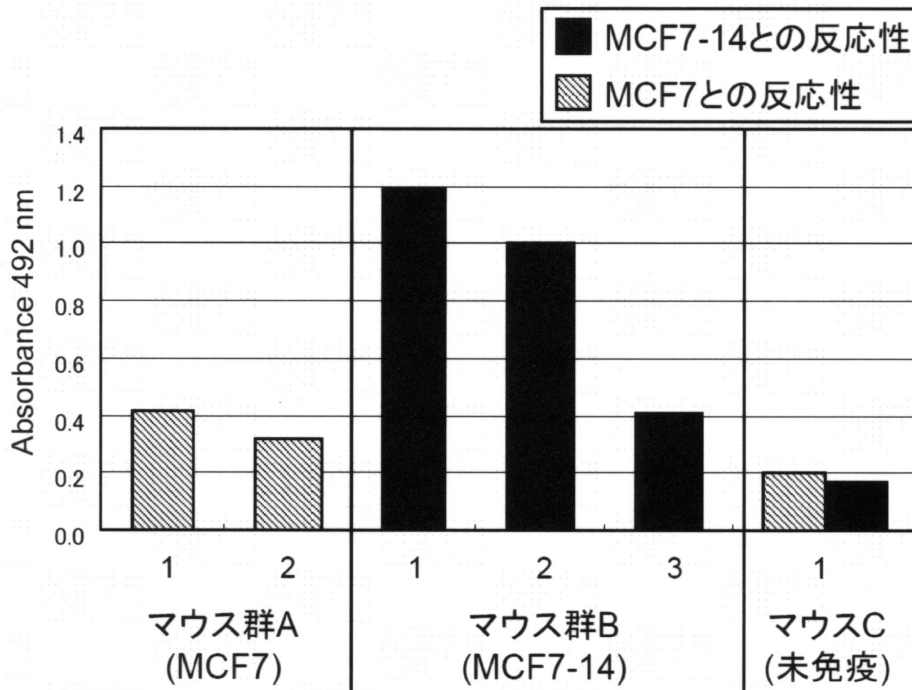
【産業上の利用可能性】

【0058】

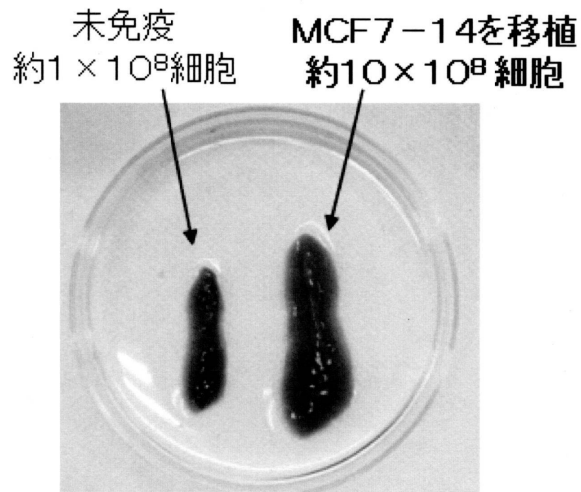
本発明によれば、従来の方法では取得が困難であった抗体を製造することができる。また、本発明によれば、抗原が本来有する立体構造に対する抗体を得ることができるため、抗原に対して十分な中和能力を持つ抗体を得ることができる。

本発明は、臨床検査や治療用の新規な抗体として、新たな材料を市場へ提供することができる。

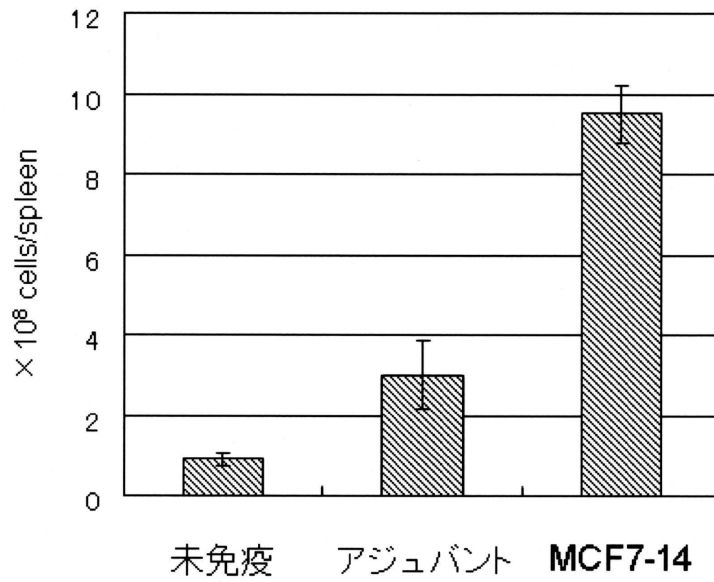
【図1】



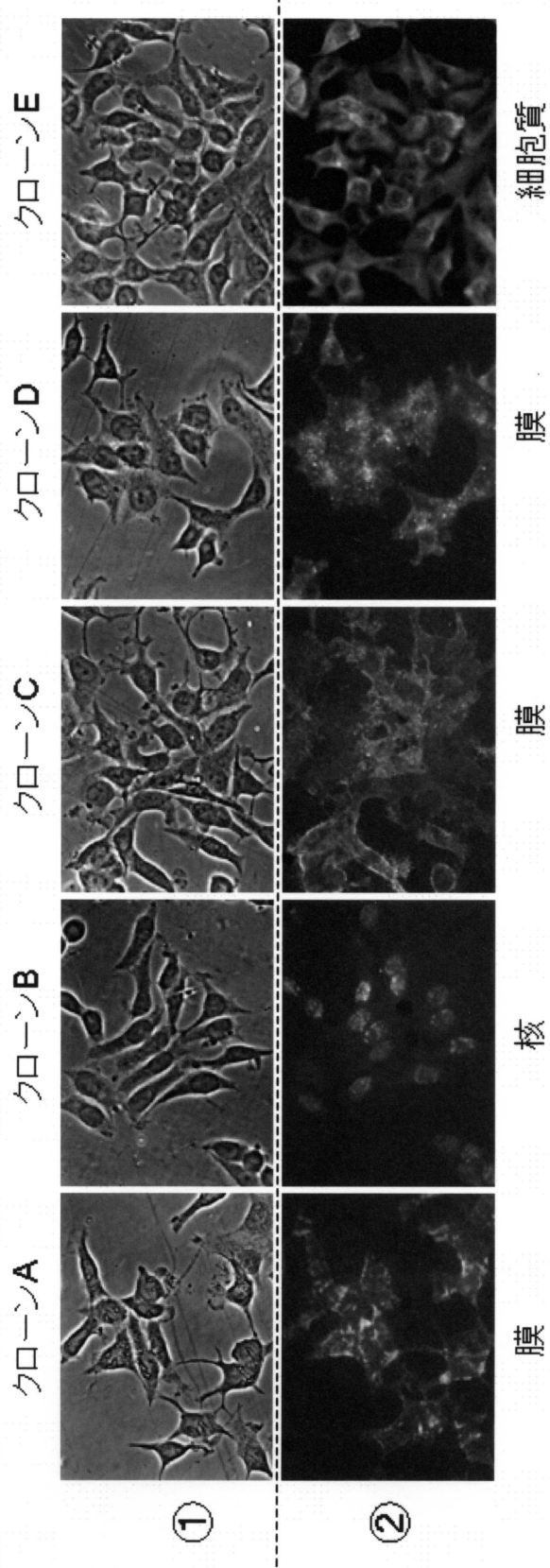
【図2】



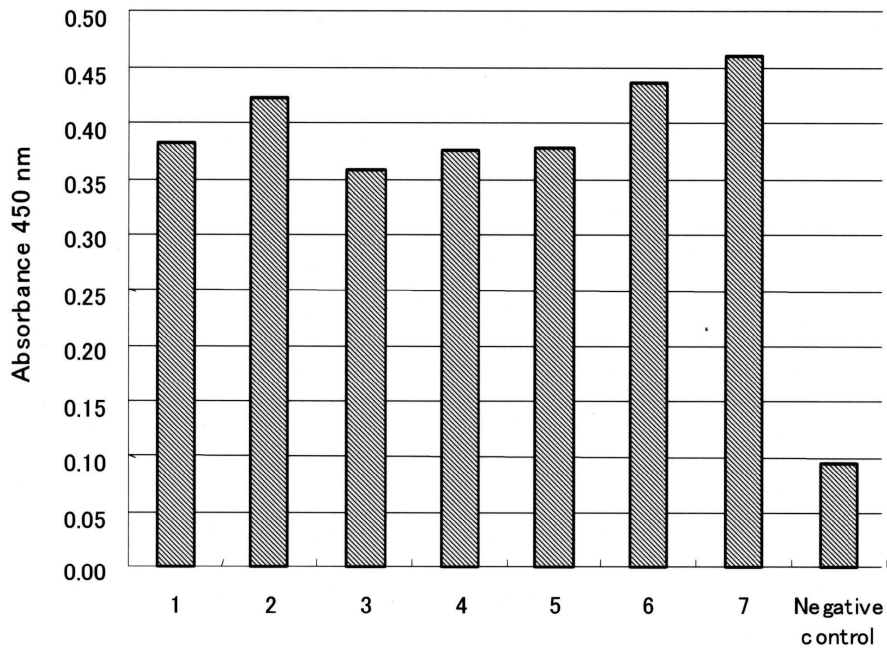
【図3】



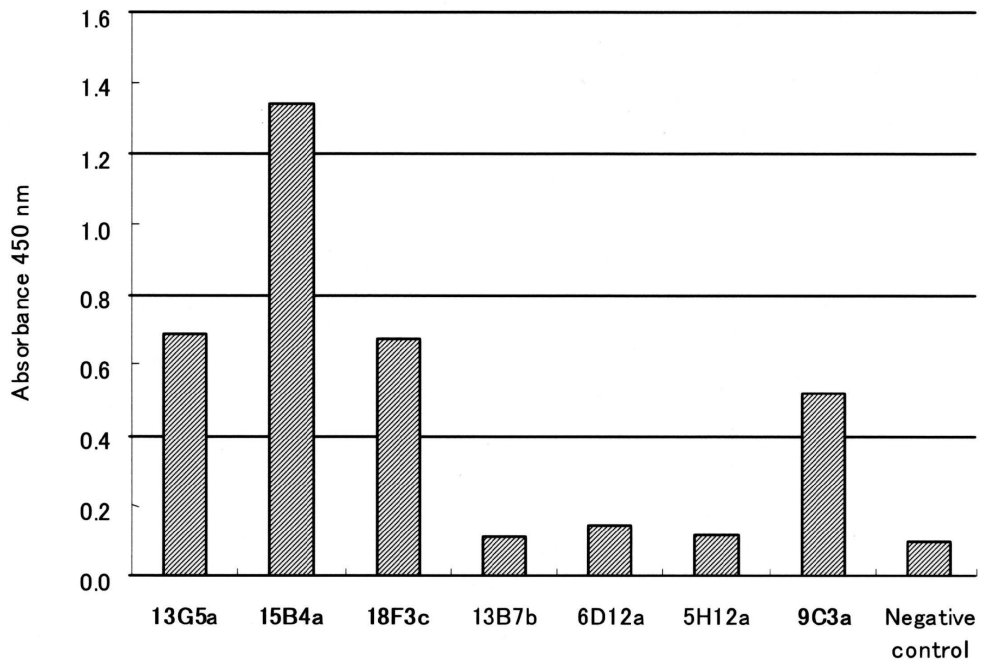
【 図 4 】



【 5 】



【 6 】



フロントページの続き

- (72)発明者 内野 雅浩
千葉県流山市東深井105番地 株式会社バイオマトリックス研究所内
- (72)発明者 小島 弘子
千葉県流山市東深井105番地 株式会社バイオマトリックス研究所内

審査官 小暮 道明

- (56)参考文献 特表2001-520011(JP,A)
特表2000-500653(JP,A)
国際公開第2005/111208(WO,A1)
特開昭64-029400(JP,A)
小島弘子他,高転移性細胞株MCF7-14樹立および解析-癌浸潤・癌転移関連因子の探索,
第80回日本生化学会大会 第30回日本分子生物学会年会 合同大会講演要旨集,2007年
,3T18-12

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N15/
C12N5/
C12P21/
C07K
CAplus/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	使用癌细胞的免疫方法		
公开(公告)号	JP5688699B2	公开(公告)日	2015-03-25
申请号	JP2011501684	申请日	2010-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	生物实验室矩阵		
申请(专利权)人(译)	有限公司生物矩阵实验室		
当前申请(专利权)人(译)	有限责任公司提出按顺序医学研究		
[标]发明人	里深博幸 内野雅浩 小島弘子		
发明人	里深 博幸 内野 雅浩 小島 弘子		
IPC分类号	C12N15/02 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	A61K2039/5152 A61K2039/5156 A61K2039/54 A61P37/04 C07K16/00 C07K16/36		
FI分类号	C12N15/00.C C12N5/00.102 C12P21/08 G01N33/577.A G01N33/531.A		
代理人(译)	小林 浩 铃木康仁		
优先权	2009046730 2009-02-27 JP		
其他公开文献	JPWO2010098471A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种能够有效产生靶抗体的免疫方法。本发明包括以下步骤：(1) 植入具有转移性质的癌细胞并将抗原表达达到实验动物中，和(2) 移植和免疫实验动物中的癌细胞。提供免疫实验动物的方法。

【図1】

