

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-2350

(P2004-2350A)

(43) 公開日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/06	G O 1 N 33/53 D	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10	G O 1 N 33/577 B	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/02	C 1 2 N 15/00 C	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 5/00 B	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-88021 (P2003-88021)	(71) 出願人	301021533 独立行政法人産業技術総合研究所 東京都千代田区霞が関1-3-1
(22) 出願日	平成15年3月27日 (2003.3.27)	(72) 発明者	原 正之 大阪府堺市学園町1-1 大阪府立大学内
(31) 優先権主張番号	特願2002-90863 (P2002-90863)	(72) 発明者	金村 米博 兵庫県尼崎市若王寺3-11-46 独立 行政法人産業技術総合研究所 関西センタ ー尼崎事業所内
(32) 優先日	平成14年3月28日 (2002.3.28)	(72) 発明者	三宅 淳 兵庫県尼崎市若王寺3-11-46 独立 行政法人産業技術総合研究所 関西センタ ー尼崎事業所内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

(出願人による申告) 国の委託研究の成果に係る特許出願 (平成13年度、経済産業省即効型地域新生コンソーシアム研究開発事業「ヒト神経幹細胞分離用モノクローナル抗体キットの開発」 委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】モノクローナル抗体、ハイブリドーマ、細胞の分離方法、分離された細胞、免疫学的診断法

(57) 【要約】

【課題】神経幹細胞や前駆細胞を選択的に認識することにより、神経幹細胞や前駆細胞を効率的に分離しうる新規モノクローナル抗体を提供する。

【解決手段】ヒト脳組織の上衣層および上衣下層領域に局在する細胞に発現する抗原を選択的に認識する特性を有することにより、ヒト脳組織切片を用いた免疫染色試験において上記上衣層および上衣下層領域を選択的に免疫染色しうるモノクローナル抗体である。脳神経細胞のうちの神経幹細胞や前駆細胞以外の細胞を選択的に認識することにより、ヒトの脳組織から神経幹細胞や前駆細胞を効率的に分離できる。神経幹細胞や前駆細胞以外の細胞を選択的に認識するため、目的とする幹細胞や前駆細胞に蛍光物質が沈着しないため、分離された幹細胞や前駆細胞の安全性が確保できる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脳組織の上衣層および上衣下層領域に局在する細胞に発現する抗原を選択的に認識することを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項 2】

脳組織切片を用いた免疫染色試験において上衣層および上衣下層領域を選択的に染色することが可能であることを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項 3】

脳組織の上衣層および上衣下層領域に局在する細胞に発現する抗原を選択的に認識せず、これ以外の部位に存在する細胞の抗原を選択的に認識することを特徴とするモノクローナル抗体。

10

【請求項 4】

脳組織切片を用いた免疫染色試験において上衣層および上衣下層領域以外の部位を選択的に染色することが可能であることを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項 5】

ヒストン H 1 抗原を選択的に認識する請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】

核内あるいは細胞質内に存在するヒストン H 1 を認識せず、細胞表面に存在するヒストン H 1 抗原を選択的に認識する請求項 5 記載のモノクローナル抗体。

20

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を産生することを特徴とするハイブリドーマ。

【請求項 8】

1 ~ 6 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体を用いてマーキングすることにより、上記抗体が認識した抗原を有する細胞を分離することを特徴とする神経系の細胞の分離方法。

【請求項 9】

請求項 8 記載の分離方法により分離された神経系の細胞。

【請求項 10】

請求項 8 記載の分離方法により分離された神経系以外の組織由来の細胞。

30

【請求項 11】

1 ~ 6 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体による抗原抗体反応を利用したことを特徴とする免疫学的診断法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、神経系もしくは他の組織由来の細胞を選別、分離、調整する際、ならびに脳神経組織における蛋白質の部位特異的発現を調べる際に有用なモノクローナル抗体、ハイブリドーマ、神経系もしくは他の組織由来の細胞の分離方法、分離された細胞、免疫学的診断法に関するものである。

40

【0002】

【従来技術】

疾病や外傷等で損傷したり失われたりした人体の組織を修復するため、従来から臓器移植と人工臓器を用いた治療が研究され、行なわれてきた。しかしながら、人工臓器は未だ開発段階であり、体内に埋め込んだ状態での永久使用に耐えるようなものは殆ど存在しない。また、臓器移植に関しては、臓器提供数が絶対的に不足している状況でその限界が指摘されているうえ、拒絶反応や倫理的問題等により未だ一般的な治療方法として定着していない。

【0003】

50

このような状況のもと、近年では、人口臓器や臓器移植による治療に代わるものとして、複数の前駆細胞および分化細胞に分化する多分化能を有し、その組織を作り出すことができる幹細胞を利用した再生医療の研究が盛んに行なわれている。幹細胞は、複数の前駆細胞および分化細胞に分化する多分化能を有し、その組織を作り出すことができる細胞であり、幹細胞を培養し増殖・分化させたのち組織に戻すことにより、組織の再生を目指す再生治療は、上述した人口臓器や臓器移植による治療に代わる方法としてその進歩に大きな期待が寄せられている。

【0004】

このような幹細胞には、大別して胚性幹細胞と体性幹細胞の2種類が存在し、いずれも再生治療への応用可能性があり、研究が進められている。これらのうち、胚性幹細胞は、培養による無限増殖が可能で、しかもどのような細胞にも分化しうる万能性を有することから注目を浴びている。ところが、ヒトの胚性幹細胞が、受精卵に由来するものでデザイナーベビーやクローンの作製につながる可能性もあり、倫理上の観点からヒトへの応用はその是非が議論されている。

10

【0005】

胚性幹細胞より分化が進んだ体性幹細胞は、分化される細胞系列が限定され、成人の組織中にも存在することが確認されており、受精卵を必要としないことから、目的に合った安全な細胞としてヒトの再生治療への応用が期待されている。

【0006】

脳や脊髄等の中枢神経系においては、生後まもなく分化を完了し、アルツハイマー病や脳出血等の病気や事故による損傷を受けても、成人では全く再生しないものと考えられてきた。ところが、近年、ヒトの成人の脳にも神経幹細胞が確認され、一定の条件下において増殖や分化をさせることが可能であることがわかってきた。これらの神経幹細胞の増殖・分化をコントロールすれば、脳神経系の疾患に対する有効な治療が可能になると考えられる。

20

【0007】

このような体性幹細胞を再生治療に応用するためには、幹細胞もしくは前駆細胞を治療に必要な量まで分化させ増殖する必要があり、そのため、まず、目的とする細胞や組織に分化しうる幹細胞をいずれかのソースから効率的に分離しなければならない。

【0008】

幹細胞を効率的に分離する方法としては、FACS (Fluorescence - Activated Cell Sorting) を用いた分離法等がある。この方法は、幹細胞に発現する選択的な表面マーカーの発現様式を、蛍光標識したモノクローナル抗体で認識し、その蛍光強度により幹細胞を分離する方法である。

30

【0009】

しかしながら、神経幹細胞に関する表面マーカーは、CD133抗体が認識する表面マーカーに関する報告があるに留まる。ところが、このCD133抗体は、神経幹細胞を直接認識して反応するものであることから、この抗体を用いて分離された神経幹細胞には、蛍光物質の沈着が避けられない。このように蛍光物質が沈着した神経幹細胞を増殖・分化させて医療に利用した場合、その長期的な安全性については全く確認されていないのが実情である。

40

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明らは、本発明者は、脳神経細胞のうち、神経系の幹細胞もしくは前駆細胞を選択的に認識する抗体、あるいは逆に神経系の幹細胞もしくは前駆細胞以外の細胞を選択的に認識するモノクローナル抗体があれば、効率的かつ安全な幹細胞の分離が可能となり、神経幹細胞の医療への応用が実現するのではないかとこの着想に基づき、鋭意研究を重ねた。

【0011】

それら一連の研究のなかで、ヒト脳神経組織に由来する細胞破碎標品を感作抗原として使

50

用してモノクローナル抗体を作製したところ、新規モノクローナル抗体が得られた。

【0012】

そして、この取得されたモノクローナル抗体のあるものは、ヒト脳組織の上衣層および上衣下層領域に局在する細胞に発現する抗原を認識し、また別の抗体はヒト脳組織の上衣層および上衣下層領域に局在する細胞に細胞に発現する抗原は認識せずにこれ以外の部位に存在する細胞に発現する抗原を認識する性質を有するものであることを見だし、これらの抗体を用いて細胞の選別が可能であることを示し、本発明を完成するに至った。

【0013】

すなわち、本発明は、神経系の幹細胞もしくは前駆細胞を選択的に認識・結合することによりこれらの細胞を効率的に分離しうる新規モノクローナル抗体、もしくは神経系の幹細胞もしくは前駆細胞以外の細胞を選択的に認識・結合することにより、逆にこれらの抗体が認識・結合しない神経幹細胞もしくは前駆細胞を効率的に分離しうる新規モノクローナル抗体を提供することを目的とするものであり、さらには、当該モノクローナル抗体を産生させるハイブリドマを提供することを目的とするものである。また、このようなモノクローナル抗体を用いた神経系の幹細胞もしくは前駆細胞の分離方法を提供することを目的とするものであり、さらには、上記方法で分離された神経系の幹細胞もしくは前駆細胞や神経系以外の組織由来の細胞を提供することを目的とするものである。さらに、このようなモノクローナル抗体を用いた免疫学的診断法を提供することを目的とするものである。

10

【0014】

20

【課題を解決するための手段】

本発明のモノクローナル抗体は、ヒト脳組織の断面における上衣層および上衣下層の領域に局在する神経系の幹細胞もしくは前駆細胞に発現する抗原を選択的に認識する新規なモノクローナル抗体、ならびに、ヒト脳組織切片を用いた免疫染色試験において上記上衣層および上衣下層の領域を選択的に免疫染色しうるモノクローナル抗体に係るものである。

【0015】

また、本発明のモノクローナル抗体は、ヒト脳組織の上衣層および上衣下層領域に局在する細胞に発現する抗原を認識せず、これ以外の部位に存在する細胞に発現する抗原を認識する新規なモノクローナル抗体、ならびに、ヒト脳組織切片を用いた免疫染色試験において上衣層および上衣下層領域以外の部位を選択的に染色可能なモノクローナル抗体、なら

30

【0016】

これらモノクローナル抗体は、神経幹細胞や前駆細胞以外の細胞の細胞に発現する抗原を選択的に認識・結合することにより、これらの細胞を除去して、神経幹細胞を効率的に分離しうる機能を有するとともに、分離された神経幹細胞や前駆細胞には蛍光物質の沈着がなく極めて安全な神経幹細胞を分離しうるものとして極めて有用なものである。

【0017】

【発明の実施の形態】

このような本発明のモノクローナル抗体は、基本的には、例えば、次のようにして作製することができる。

40

【0018】

すなわち、本発明のモノクローナル抗体は、例えば、ヒト胎児の脳細胞を感作抗原として使用して、基本的には、これを通常の免疫法を応用して免疫し、通常の細胞融合法を応用して細胞融合させ、通常のクローン化法を応用してクローン化したのち、スクリーニングすることによって作製することができる。

【0019】

本発明のモノクローナル抗体の作製方法は、より具体的には、例えば、前記感作抗原として、ヒト胎児の脳細胞を使用し、当該感作抗原で免疫した哺乳動物の形質細胞（免疫細胞）を、マウス等の哺乳動物のミエロマ細胞と融合させ、得られた融合細胞（ハイブリドマ）をクローン化し、その中から前記細胞株を認識する本発明の抗体を産生するクロー

50

ンを選別し、これを培養して目的とする抗体を回収する方法が好適なものとして例示される。

【0020】

このようなモノクローナル抗体の作製方法において、前記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ミエローマ細胞との適合性などを考慮して選択するのが好ましく、一般的には、マウス、ラット、ハムスター等が好適なものとして使用される。

【0021】

つぎに、免疫は、一般的方法により、例えば、前記ヒト胎児の脳細胞を哺乳動物に腹腔内注射等により投与することにより、行われる。より具体的には、PBSや生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを、動物に1ヶ月毎に数回投与することが好ましい。免疫細胞としては、前記細胞株の最終投与後に摘出した脾細胞を使用するのが好ましい。

10

【0022】

つぎに、前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞としては、すでに公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3X63Ag8.653) [J. Immunol., 123, 1548 (1978)]、p3-U1 [Current Topics in Micro-biology and Immunology, 81, 1-7 (1978)]、NS-1 [Eur. J. Immunol., 6, 511-519 (1976)]、MPC-11 [Cell, 8, 405-415 (1976)]、Sp2/0-Ag14 [Nature, 276, 269-270 (1978)]、FO [J. Immunol. Meth., 35, 1-21 (1980)]、S194 [J. Exp. Med., 148, 313-323 (1978)]、およびR210 [Nature, 277, 131-133 (1979)]等が好適に使用される。

20

【0023】

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には通常の方法、例えば、ミルシュタインら (Milsteine et al.) の方法 [Methods Enzymol., 73, 3-46 (1981)]等に準じて行うことができる。

【0024】

より具体的には、前記細胞融合は、例えば、融合促進剤の存在下に通常の栄養培地中で実施される。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適宜添加使用することもできる。免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して、免疫細胞を1~10倍程度とするのが好ましい。また、前記細胞融合に用いる培地としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI-1640培地、MEM培地、その他、この種の細胞培養に使用される通常の培地が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FBS) 等の血清補液を併用することも可能である。

30

【0025】

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培地内でよく混合し、予め37程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1,000~6,000程度のPEGを、通常、培地に約30~60% (W/V) の濃度で添加し、混合することによって行われる。続いて、適当な培地を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことにより目的とするハイブリドーマが形成される。

40

【0026】

当該ハイブリドーマは、通常の見込培地、例えば、HAT培地 (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地) で培養することにより選択される。当該HAT培地による培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (未融合細胞) 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、通常の見込希釈法に従って、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クローン化が実施される。

【0027】

50

このようにして作製される本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地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。

【0028】

当該ハイブリドーマから本発明のモノクローナル抗体を採取するには、当該ハイブリドーマを常法に従って培養し、その培養上清から得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させその腹水から得る方法など適宜の方法が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適した方法であり、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適した方法である。

【0029】

さらに、前記した方法により得られる抗体は、塩析法、ゲル濾過法、アフィニティークロマトグラフィー等の通常の精製手段を応用して高純度に精製することができる。

【0030】

このようにして作製される本発明のモノクローナル抗体は、脳神経細胞のうちの神経幹細胞や前駆細胞以外の細胞を選択的に認識することにより、ヒトの脳組織から神経幹細胞を効率的に分離できる。しかも、神経幹細胞以外の細胞を選択的に認識するため、幹細胞に蛍光物質が沈着しないため、分離された幹細胞の安全性が確保できる。

【0031】

そして、本発明は、上記モノクローナル抗体を用いてマーキングすることにより、上記抗体が認識した抗原を発現する細胞を分離する神経系の幹細胞もしくは前駆細胞の分離方法に係るものであり、さらには、上記分離方法により分離された神経系の幹細胞もしくは前駆細胞に係るものである。

【0032】

上記細胞の分離方法としては、上記抗体を使用して表面マーキングすることにより細胞を分離する方法であれば各種の方法を適用することができる。例えば、蛍光標示式細胞分取(FACS)、磁性分離(磁性ビーズに複合体化した抗体を使用する)、および特定の細胞表面「マーカー」として知られるタンパク質に対する抗体の親和性による他の方法が包含されるがこれらに限定されない。

【0033】

このようにして、安全な神経幹細胞や前駆細胞を効率的に分離し、これらの神経幹細胞や前駆細胞の増殖・分化をコントロールすれば、脳神経系の疾患に対する医療診断や再生治療への応用が可能となる。

【0034】

また、本発明は、上記モノクローナル抗体による抗原抗体反応を利用した免疫学的診断法に関するものである。

【0035】

上記免疫学的診断法としては、上記モノクローナル抗体による抗原抗体反応を利用して免疫組織診断や生化学的診断を行う方法であれば、各種の方法を適用することができる。

【0036】

例えば、上記モノクローナル抗体に蛍光色素等の色素を結合させて標識抗体として、モノクローナル抗体の結合の有無等を観察する蛍光抗体法や化学染色法、蛍光色素の代わりに酵素を用いて上記モノクローナル抗体を標識抗体とする酵素抗体法、酵素で標識した二次抗体を用いて抗原量等を測定するエライザ法、上記モノクローナル抗体をアイソトープで標識して標識抗体とするラジオイノムアッセイ、抗原抗体反応による凝集反応を利用する免疫沈降法等をあげることができる。

【0037】

また、タンパク質をゲル電気泳動で分画し、これを上記モノクローナル抗体で検出するウェスタンブロット法をあげることができる。このようなウェスタンブロット法によれば、上記モノクローナル抗体に対する抗原タンパク質をコードするDNAを直接クローニング

10

20

30

40

50

するのに有用である。なお、上記ウェスタンブロット法としては、ウェスタン法、サウスウェスタン法、ノースウェスタン法、ウェストウェスタン法等のウェスタンブロット変法も含まれる趣旨である。

【0038】

【実施例】

つぎに、本発明の実施例について詳しく説明する。

【0039】

モノクローナル抗体作製法

【0040】

動物の免疫：

モノクローナル抗体の作製は、Orlik, O & Altaner, C (J. Immunol. Methods, 115: 55-59, 1998) による変法に従い、単径部リンパ節細胞を用いて行った。胎齢9, 14, 23週のヒト脳組織をすり潰した破砕物の懸濁液 (homogenates) を抗原として、生後6週齢のメスBalb/cマウス4-5匹に注射し免疫した。抗原は1回につき0.2mlずつRIBI Adjuvant (フナコシ) との混合液として、両足底より3-4日おきに3回接種した。更に5日後に最後の抗原注射 (Last booster) を単独で接種した。

【0041】

ハイブリドーマ細胞の作製：

株化Myeloma cell であるFO-1 cell を15%牛胎児血清 (FCS)、8azaguanine (20 μg/ml) を含むRPMI 1640培地 (GIBCO、Life Technology社製) で37、CO₂ インキュベーターを用いて培養。細胞融合の前2-3日は8azaguanineを除去した同上組成の培地にて培養した。

Last booster 後、3日で下記の方法にて細胞融合を行いハイブリドーマ細胞を作製した。

4-5匹のマウスの両単径部リンパ節を摘出。培養液に入れて、2枚のスリガラスに挟んでスリ合わせるようにしてリンパ球を取り出した (約 1×10^8 個)。

$2 - 4 \times 10^7$ 個のFO-1細胞を用意した。

【0042】

操作1および2の細胞を増殖培地 (RPMI 1640培地 + 15% FCS) の50ml中で混合。1000rpm (回転数/分)、5分間室温で遠心分離後、上清を捨て20mlの増殖培地に細胞を懸濁した。

50% Polyethylene glycol (PEG) 水溶液を100 μl 加えて、37のCO₂ インキュベーターに90分間入れて保温。1000rpm, 5分遠心分離後、上清を捨て、さらに数秒程度程度の回転数にて遠心分離して上清を出来るだけ吸いとった。

37の恒温水槽の水面に細胞試料の入った容器を軽く打ち付けるようにして温めながら上記遠心分離沈殿を、ほぐした。

37であらかじめ温めた50%ポリエチレングリコール (PEG) の水溶液1mlを1分間かけてゆっくり添加して振とうし、更に1mlを1分間かけてゆっくり添加して振とうする。さらに8mlを2-3分間かけて添加して混ぜてから1000rpmで遠心分離した。

【0043】

細胞からなる上記遠心分離の沈殿をHAT培地 (増殖培地100mlあたりに50x HAT 2mlを加える) の50mlに懸濁し、96穴培養プレート (96well plate) に0.1ml/wellで播種 (5plates) して培養。このとき胸腺細胞をFeeder cell (細胞の増殖を助けるため共存させる他の種類の細胞) として約 1×10^5 /wellの割合で加えた。

3日目にHAT培養液を50 μl/well加えた。以後HAT培地の添加、交換を行い

10

20

30

40

50

、ハイブリドーマ細胞の増殖コロニーが培養プレートの穴の1/4～1/3程度になるまで待った。

細胞増殖巣が適当な大きさになったら培養上清をとり、抗体産生の陽性・陰性試験を行った。試験は胎齢9～14週のヒト胎児脳パラフィン包埋切片で免疫組織染色を行うことで実施した(キット:ニチレイマルチステインを使用)。

【0044】

抗体産生の認められたハイブリドーマ細胞については、限界希釈法によりハイブリドーマ細胞のクローニングを行った。すなわち、約0.5個ハイブリドーマ細胞/wellになるように限界希釈したハイブリドーマ細胞を96穴培養プレートに植え、培養液をHT培養液+Briclone(増殖因子、大日本製薬)に替えて、ハイブリドーマ細胞のみが生存・増殖しやすい環境に置くことにより、ハイブリドーマ細胞1個由来の均質な細胞集団を得た。

10

【0045】

上記のハイブリドーマ細胞の増殖コロニー形成から限界希釈法によるクローニングまでの行程を3回繰り返した。ただし培養液はHT培養液+Bricloneを用い、ハイブリドーマ細胞中の抗体産生クローンの割合がほぼ100%になった時点で、増殖のよい、抗体分泌能の高い、しかも安定なクローンをとって増殖培地で増やした。

【0046】

ハイブリドーマ細胞の増殖:

2～3週間前からpristanを0.5mlずつ2～3回腹腔内に接種しておいたマウスの腹腔内に 1×10^7 のハイブリドーマ細胞を接種した。

20

7～10日後、腹水が多量に貯まってくるので、注射器等を用いて腹水を採取し、液体窒素にて急速凍結。-80にて凍結保存した。

【0047】

モノクローナル抗体の性質試験法

【0048】

HFB115抗体が認識する分子の同定

【0049】

115抗体の認識する抗原の精製:

Carpenter等の方法(MK Carpenter MK他、Experimental Neurology 158巻 265～278頁、1999年、Academic Press)により培養したヒト胎児由来の神経幹細胞もしくは神経系前駆細胞を含む細胞凝集塊(neurosphere)を、 $300 \times g$ 、5分間で遠心し、上清の培地を取り除いた。その後、沈殿した細胞凝集塊をPBS(137 mM NaCl 、 $8.1 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 2.68 mM KCl 、 $1.47 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$)で3回($300 \times g$ 、5分間)洗浄し、液体窒素で凍結後、-80下で保存した。

30

【0050】

マイナス80下で保存している細胞塊を氷上で融かし、プロテアーゼインヒビター(Sigma社製、protease inhibitor cocktail, p-8340)を加えたホモジェナイズバッファー(HB; 0.147 mM KCl 、 50 mM Tris-HCl [pH 7.5]、 1 mM EDTA)5mlを加え、ホモジェナイズ(500rpm、5回)した。これを、 $8,000 \times g$ 、15分間で遠心し、上清は新たな遠沈管に移した。沈殿は、再度、プロテアーゼインヒビターを加えたHBを5ml加え、ホモジェナイズ(1000rpm、5回)後、 $8,000 \times g$ 、15分間で遠心し、上清を先に分取したものと合わせた。合わせた上清画分を $100,000 \times g$ 、90分間で遠心し、沈殿を得た。この沈殿にHB、0.5% Triton X-100(以降HB'と呼ぶ)2mlを加え、ホモジェナイズ(5000rpm、20回)した。これを、 $30,000 \times g$ 、30分間で遠心し、上清を細胞膜画分とした。

40

【0051】

細胞膜画分のカラムクロマトグラフィーを、Hitrap Heparin HR1ml(A

50

mer sham Biosciences社製)を用いて下記の条件で行った。平衡化バッファにHB¹、溶出バッファにHB¹、1M NaClを用いた。ヘパリンカラムに細胞膜画分2mlをアプライし、平衡化バッファ2mlでカラムの洗いを行った。この後、50%溶出バッファ5mlで溶出を行い、この溶出画分を1mlずつ(No. A8 - A12)分取した。続いて50%溶出バッファから100%まで15mlのグラジエントの溶出を行い、溶出画分を0.5mlずつ(画分No. B12からD8)分取した。

【0052】

ヘパリンカラムクロマトグラフィーの各溶出画分を、Laemmliの方法(Laemmli, U.K. Nature, 227, p680-685)の方法に従って、5%-20%ポリアクリルアミドゲル濃度勾配ゲル(BioRad社製)を用いたSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った後、セミドライトランスファー法によりニトロセルロース膜(Advantec社製)にゲル中の蛋白質を転写した。

10

【0053】

抗体の膜への非特異的吸着を抑止するためPBS, 0.5% tween 20(以下、PBS-T), 5%スキムミルクで室温で1時間処理した後、PBS-Tで希釈した一次抗体溶液(抗HFB115モノクローナル抗体; 1000倍)を加え、4℃で一晩抗原抗体反応を行った。この後PBS-Tで洗浄し、二次抗体との反応を行った。二次抗体には抗マウスIgG-HRPもしくはIgM-HRP(イムノグロブリンGと西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼの架橋物, Amersham Biosciences社製)を10000倍希釈したのを用い、室温で1時間反応させた。この後、PBS, 0.5% tween 20でよく洗い、ECL Plus kit(Amersham Biosciences社製)の方法に従い、化学発光を行った。この膜をX線フィルムと一緒にカセットに入れて暗室で露光し現像した。

20

【0054】

抗HFB115抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果、HFB115抗原タンパク質を含むB2からC2画分を分取した。

【0055】

図1にHFB115抗原タンパク質の精製後のSDS-PAGEならびにWestern Blottingの結果を例示する。HFB115抗原タンパク質は、分子量約33kDaの分子であることが分った。また、HFB115抗原タンパク質は、ヘパリンカラムを用いた精製法で精製されることも確認した。

30

【0056】

抗体27番および抗体16番の認識する抗原:

前述のCarpentaraの方法により培養したヒト胎児由来の神経幹細胞もしくは神経系前駆細胞を含む細胞凝集塊(neurosphere)を50mM Tris HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40(NP-40), protease inhibitor cocktail(Sigma社製)を含むLysis buffer中で破碎した試料(homogenates)を調製し、前項の方法で、5%-20%ポリアクリルアミドゲル濃度勾配ゲル(BioRad社製)を用いたSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った後、セミドライトランスファー法によりPVDF膜(BioRad社製)にゲル中の蛋白質を転写し、Western Blottingをおこなった。

40

【0057】

抗体27番は16kDaおよび34kDaのバンドを認識、抗体16番は34kDaのバンドを認識した。

【0058】

図2は、抗体115番の抗体によるWestern Blottingの結果の第2例である。IgG-HRPもしくはIgM-HRPを二次抗体として用いたこれらWestern Blottingの実験結果ならびに抗体サブクラス検定キットを用いた測定により、抗体115番、抗体27番はIgMに属し、抗体16番、抗体211番はIgGに属

50

すると考えられた。

【0059】

HFB115抗体の認識する抗原タンパク質の内部アミノ酸配列の解析

HFB115抗原タンパク質を含むB2, B1, C1, C2画分をアセトン沈殿法で濃縮した。各画分サンプル400ulにアセトン(-80)を1200ul加え、-80で3時間放置した。これを20,000×g, 15min遠心し、沈殿したHFB115抗原タンパク質を得た。この沈殿を乾かし、SDS-PAGEサンプルバッファー15ulでとこした。これを12%不連続ポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行い、クマシーG-250で染色・脱色後、HFB115抗原タンパク質のバンド(33kDa)を切りだし-20で保存した。このバンドの内部アミノ酸配列を解析した(株式会社アプロサイエンス)。

【0060】

図3にHFB115抗原蛋白質の内部アミノ酸配列の解析結果を例示する。3種のペプチド、最長13アミノ酸配列を解析した結果、HFB115抗原蛋白質はhuman histone H1.D(H1.2)と100%のホモロジーがあった。

【0061】

前述のCarpentariの方法により培養したヒト胎児由来の神経幹細胞もしくは神経系前駆細胞を含む細胞凝集塊(neurosphere)の凍結切片を作成した。切片をPBSで洗い、10%Goat Serum, 0.01%Triton X-100, PBSで室温、1時間ブロックした。一次抗体(抗HFB115抗体; 500倍、抗ヒストンH1モノクローナル抗体; 500倍、抗ヒストンH1ポリクローナル抗体; 500倍, santacruz社製)で4度、一晚反応した。反応後、PBSで洗い、二次抗体(Alexsaanti-mouse IgM antibody 647, Alexsaanti-mouse IgG antibody 488, Alexsaanti-rabbit IgG antibody 568, molecular probe社製)で室温、1時間反応した。PBS, ddH₂Oで洗った後、マウントした。共焦点レーザー顕微鏡(LSM510, Carl Zeiss社製)で観察を行った。

【0062】

抗HFB115抗体と抗ヒストンH1抗体(市販品)の認識部位の比較

図4に示すように、Neurosphere凍結切片で抗HFB115抗体と抗ヒストンH1抗体の認識部位の比較を行った結果、両者の認識部位が異なることがわかった。抗HFB115抗体は、細胞膜、もしくは細胞間を認識し、抗ヒストンH1抗体は核を(抗ヒストンH1モノクローナル抗体)、細胞質(抗ヒストンH1ポリクローナル抗体)を認識していた。

【0063】

抗体を用いたヒト胎児脳の免疫染色:

パラフィンブロックより切り出した切片を脱パラフィン処理の為、ヒストクリアにて10分間、3回処理した後、100%、95%、90%、80%、70%の各濃度のエタノール水溶液にて上記の順番に5分間ずつ処理した。PBSで5分間、3回洗浄後、ブロック溶液(10%正常ヤギ血清、0.01%Triton X-100を含むPBS)にて1時間洗浄し抗体の非特異的吸着を抑制する為のブロックを行った。10%正常ヤギ血清、0.01%Triton X-100を含むPBSに0.02%に希釈した抗体をこれらの組織切片試料に4、15時間反応させた。PBSにて5分間、5回洗浄した後、ブロック溶液に0.02%程度に希釈した抗マウスイムノグロブリン-FITC複合体を含む二次抗体溶液を室温で1時間反応させた。PBSにて5分間、5回洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察し、染色部位を確認した。4種のモノクローナル抗体は、図2に抗体115番の例をもって示したように、ウェスタンブロット法等の生化学的診断法に用いることが可能である。

【0064】

図5~図8は、ヒト胎児脳組織に対する抗体27番の免疫染色像を示す。これらのうち図

5はDNA染色色素TO-PRO-3を用いた核染色による染色像、細胞の所在を示すもの、図6は神経幹細胞または前駆細胞に発現することが既知のマーカー蛋白質ネスチン(nestin)に対する抗体による免疫染色像、図7は抗体27番による免疫染色像、図8は上記3つの染色像の重ね合わせた多重染色像である。抗体27番では、脳室近くの上衣層、上衣下層付近が選択的に染色されている。同様の順序にて図9～図12に抗体16番、図13～図16に抗体115番、図17～図20に抗体211番の免疫染色像を示す。抗体16番、211番では上衣層は脳室壁付近がごく一部染色されているものの、上衣下層は殆ど染色されておらず、上衣層、上衣下層以外の部分は染色されている。抗体115番では、上衣層、上衣下層は殆ど染色されておらず、これら以外の脳室から遠い部位が染色されている。

10

【0065】

以上の結果より、抗体27番はヒト脳組織切片を用いた免疫染色試験において上衣層および上衣下層領域を選択的に染色することの可能なモノクローナル抗体であり、抗体16番、抗体115番、抗体211番の3種類のモノクローナル抗体は、ヒト脳組織切片を用いた免疫染色試験において上衣層、上衣下層領域を選択的に染色せず、上衣層、上衣下層以外の部位を選択的に染色することの可能なモノクローナル抗体であることが明らかである。上記4種のモノクローナル抗体は、脳組織切片の免疫組織化学診断法に用いることが可能である。

【0066】

細胞の標識とFACS:

20

ヒト胎児由来の神経幹細胞もしくは神経系前駆細胞を含む細胞凝集塊(neurosphere)の構成細胞をパスツールピペットにて出し入れして、物理的にバラバラに分離し、300g、5分間程度の遠心分離で細胞を集めた。0.8%一次抗体、17%ヤギIgGを含む培地にて4、30分処理した後、一次抗体を含まない培地にて5分間、3回洗浄。二次抗体溶液(1%の抗マウスIgG-FITC複合体、もしくは抗マウスIgM-FITC複合体)を加えて4、25分間、遮光条件にて反応させ、二次抗体を含まない培地にて5分間、3回洗浄した後、1ug/mlの7-amino-actinomycin D(Becton Dickinson社製、VIA-PROBE)を含む培地に細胞を懸濁してFACS分析の試料とし、セルソーター(Becton Dickinson社製、FACS Vantage SE)を用いてソーティングを行った。Jurkatを用いた場合には、VIA-PROBEの代わりにPropidium Iodide(PI)を用いた。

30

【0067】

図21に抗体115番を用いたneurosphere構成細胞のソーティング結果の例を示す。横軸は二次抗体のFITCに由来する蛍光強度を示し、細胞表面に結合した抗体の量を反映している。縦軸は死細胞を選択的に染色する色素による蛍光強度を示し、この値が高い細胞は死細胞である可能性が高い。図21中の細胞の集団は2つのクラスターに分かれているが、縦軸の中央部、横軸で見るとやや左よりの水平方向に伸びた細胞集団は死細胞を多く含む可能性が考えられた。一方、図21の左下から右側中央部にのびる細胞集団は、細胞外に抗原を持つ生細胞である可能性が高い。以上のような検討より、抗体115番を用いたソーティングでは、R2の枠内に含まれる細胞が多く見られたので、細胞表面抗原を認識していると考えられた。抗体16番、211番についてもこれにほぼ類似したソーティング結果を得た。

40

【0068】

図22に抗体211を用いた、リンパ球系の細胞Jurkatのソーティング結果の例を示す。この例に示されるように、神経系以外の細胞でも、同じ抗原を発現していれば、モノクローナル抗体をソーティング等の方法により細胞分離に用いることができる。

【0069】

上述したように、4種類のモノクローナル抗体の一つの115番抗体(FERM P-18780)の抗原は、ヒストンH1であることが同定された。通常、ヒストンH1は細胞

50

核あるいは細胞質に存在し、市販されている抗ヒストンH1抗体は核（抗ヒストンH1モノクローナル抗体）、細胞質（抗ヒストンH1ポリクローナル抗体）に存在するヒストンH1を認識する。しかし今回開発した115番抗体は他の市販されている抗体とは異なり、核内あるいは細胞質内に存在するヒストンH1を認識せず、むしろ細胞表面に存在するヒストンH1を認識していると考えられる。このことは、115番抗体は細胞表面に存在するヒストンH1の特異的な抗原を認識しているためと考えられる。

【0070】

本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、新規な融合細胞であり、公的微生物寄託機関である特許微生物寄託センターに寄託されており、その受託番号は、下記のとおりである。

抗体 16番産生ハイブリドーマ：FERM P-18778

抗体 27番産生ハイブリドーマ：FERM P-18779

抗体 115番産生ハイブリドーマ：FERM P-18780

抗体 211番産生ハイブリドーマ：FERM P-18781

【0071】

【発明の効果】

以上のように、本発明によれば、脳神経細胞のうちの神経幹細胞や前駆細胞以外の細胞を選択的に認識することにより、ヒトの脳組織から神経幹細胞や前駆細胞を効率的に分離できる。しかも、神経幹細胞や前駆細胞以外の細胞を選択的に認識するため、目的とする幹細胞や前駆細胞に蛍光物質が沈着しないため、分離された幹細胞や前駆細胞の安全性が確保できる。そして、安全な神経幹細胞や前駆細胞を効率的に分離し、これらの神経幹細胞や前駆細胞の増殖・分化をコントロールすれば、脳神経系の疾患に対する医療診断や再生治療への応用が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】HFB115抗原タンパク質の精製後のSDS-PAGEならびにWestern Blottingの結果を示す。

【図2】抗体115番の抗体によるWestern Blottingの結果の一例である。

【図3】HFB115抗原蛋白質の内部アミノ酸配列の解析結果を示す。

【図4】抗HFB115抗体と抗ヒストンH1抗体の認識部位の比較を行なった結果を示す。

【図5】ヒト胎児脳組織に対する抗体27番のDNA染色色素TO-PRO-3を用いた核染色による染色像である。

【図6】ヒト胎児脳組織に対する抗体27番のネスチン(nestin)に対する免疫染色像である。

【図7】ヒト胎児脳組織に対する抗体27番の免疫染色像である。

【図8】抗体27番による上記3つの染色像の重ね合わせた多重染色像である。

【図9】ヒト胎児脳組織に対する抗体16番のDNA染色色素TO-PRO-3を用いた核染色による染色像である。

【図10】ヒト胎児脳組織に対する抗体16番のネスチン(nestin)に対する免疫染色像である。

【図11】ヒト胎児脳組織に対する抗体16番の免疫染色像である。

【図12】抗体16番による上記3つの染色像の重ね合わせた多重染色像である。

【図13】ヒト胎児脳組織に対する抗体115番のDNA染色色素TO-PRO-3を用いた核染色による染色像である。

【図14】ヒト胎児脳組織に対する抗体115番のネスチン(nestin)に対する免疫染色像である。

【図15】ヒト胎児脳組織に対する抗体115番の免疫染色像である。

【図16】抗体115番による上記3つの染色像の重ね合わせた多重染色像である。

【図17】ヒト胎児脳組織に対する抗体211番のDNA染色色素TO-PRO-3を用

10

20

30

40

50

いた核染色による染色像である。

【図18】ヒト胎児脳組織に対する抗体211番のネスチン(nestin)に対する免疫染色像である。

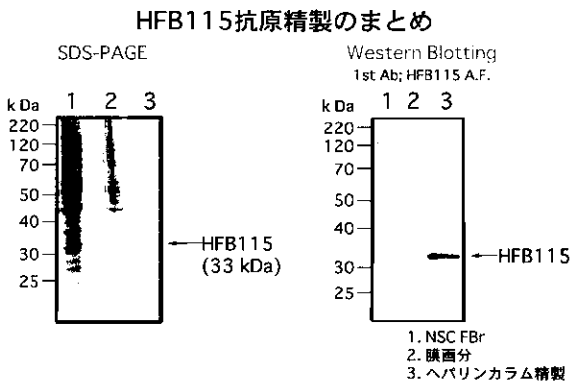
【図19】ヒト胎児脳組織に対する抗体211番の免疫染色像である。

【図20】抗体211番による上記3つの染色像の重ね合わせた多重染色像である。

【図21】抗体115番を用いたneurosphere構成細胞のソーティング結果の一例である。

【図22】抗体211を用いたリンパ球系の細胞Jurkatのソーティング結果の一例である。

【図1】

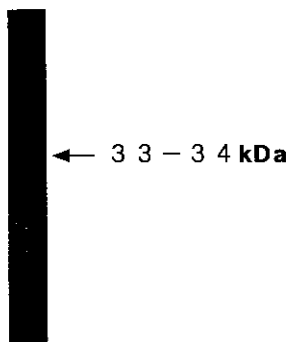


【図3】

run # : 852D
sample: HFB115-T53
cycles : 12

cycle no.	[no. 1]		[no. 2]		[no. 3]		[no. 4]		others (pmol)
	amino acid	pmol	amino acid	pmol	amino acid	pmol	amino acid	pmol	
1	S	13.2	K	12.7	A	2.3	L	2.9	E(0.6), Nr, T?, Q?
2	G	22.0	A	12.6	T	1.8	F	1.8	
3	V	23.7	T	8.3	g	2.2	N	1.5	I(0.5)
4	S	10.7	G	9.9	P	1.3	L	1.6	
5	L	19.3	P	(10.2)	p	(10.2)			F
6	A	18.8	P	7.7	V	1.4	K	1.4	
7	A	18.2	V	7.1	S	0.7			
8	L	14.5	S	3.2	E	0.6			
9	K	10.5	E	4.0	i	2.1			
10			L	5.2	I	0.6			
11			I	4.1	T	1.1			
12			T	3.2	f	0.8			
13									
14									

【図2】

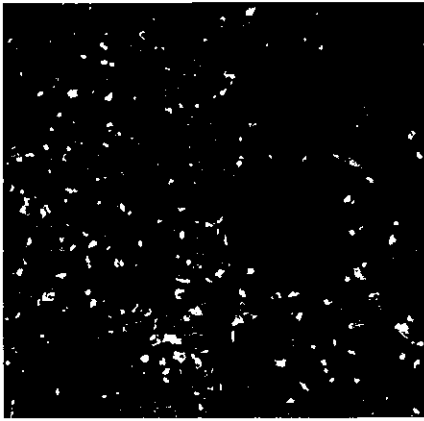


```
>>H1D_HUMAN HISTONE H1D (H1.2). (212 aa)
initn: 49 initl: 49 opt: 49 z-score: 156.0 E0: 0.054
Smith-Waterman score: 49: 100.000% identity in 9 aa overlap
```

```
H1852D          SCVSLAALK
                X:::.....X
H1D_HU AKKAGGTPRKAAGPPVSELIITRVAASKERSGVSLAALKKALAAAGYIVRRNSRIILGL
          30      40      50      60      70      80
H1D_HU KSLVSKGTLVQTEGTGASGSPKLNKKAASCRAPKPKVKKAGGTPKPKPVGAAKPKKAAAGG
          90     100     110     120     130     140
```

【 図 4 】

NSC 12 Forbrain derived Neurosphere



Blue; HFB115,
Green; Histone H1 (AE-4),
Red; Histone H1 (polyclonal)

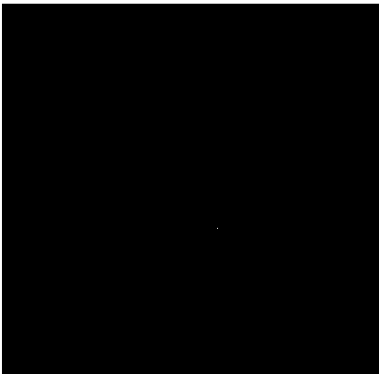
【 図 5 】

TO-PRO3



【 図 6 】

Nestin



【 図 7 】

27番



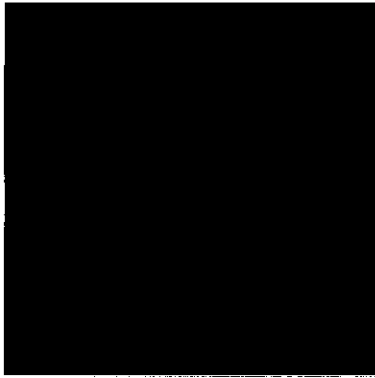
【 図 8 】



三重染色

【 図 9 】

TO-PRO3



【 図 1 0 】

Nestin

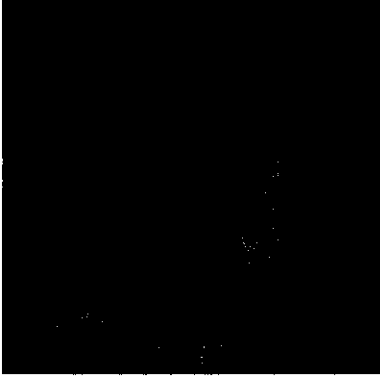


【 図 1 1 】

16番



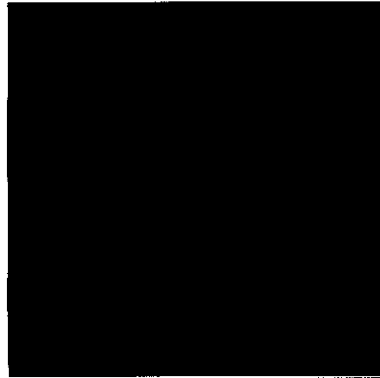
【図 1 2】



三重染色

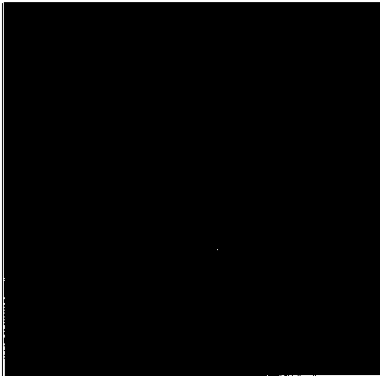
【図 1 3】

TO-PRO3



【図 1 4】

Nestin

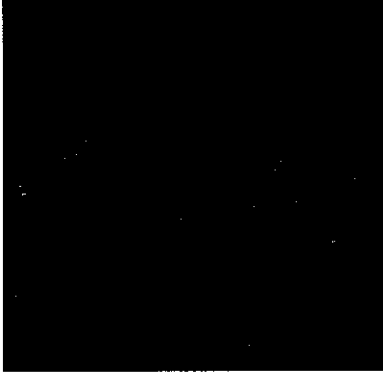


【図 1 5】

115番



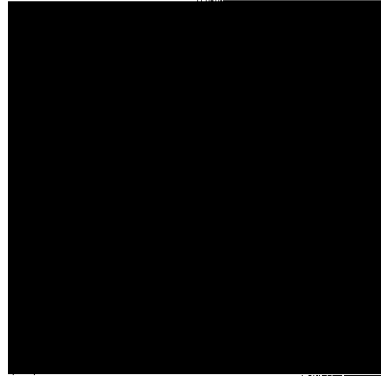
【図16】



三重染色

【図17】

TO-PRO3



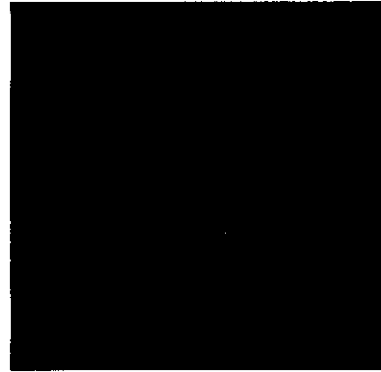
【図18】

Nestin



【図19】

211番



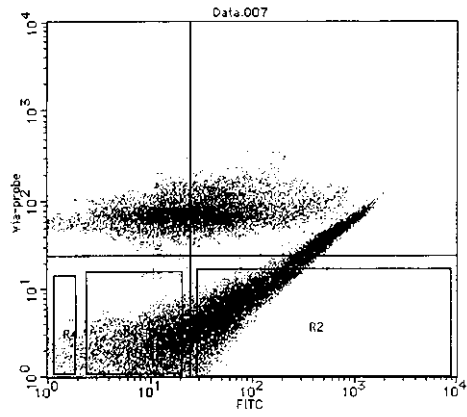
【 図 2 0 】



三重染色

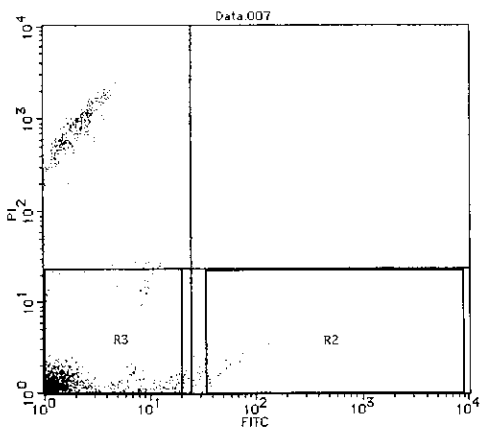
【 図 2 1 】

115番



【 図 2 2 】

Jurkat



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	E
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 15/00	A
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 岡野 栄之

東京都新宿区信濃町3-5 慶応大学医学部生理学内

(72)発明者 山崎 麻美

大阪市中央区法円坂2-1-14 国立大阪病院脳神経外科内

(72)発明者 中村 康寛

福岡県久留米市津福本町4-2-2 聖マリア病院病理部内

(72)発明者 山本 統彦

久留米市旭町6-7 久留米大学医学部 化学教室内

(72)発明者 小田 えり子

久留米市旭町6-7 久留米大学医学部化学教室内

(72)発明者 児玉 恵理

兵庫県尼崎市若王寺3-1-1-46 独立行政法人産業技術総合研究所 関西センター尼崎事業所内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 GA03 HA15

4B064 AG27 CA19 CA20 CC24

4B065 AA91X AA91Y AA93X AB05 BA08 CA25 CA46

4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA50 FA74

