

(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2004-269392

(P2004-269392A)

(43) 公開日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int.Cl.⁷

C07K 16/18

A61K 39/395

A61P 35/00

G01N 33/531

F I

C07K 16/18

A61K 39/395

A61K 39/395

A61P 35/00

G01N 33/531

Z N A

D

N

A

テーマコード (参考)

4C085

4H045

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2003-60812 (P2003-60812)

(22) 出願日 平成15年3月7日(2003.3.7)

(71) 出願人 302055450

横尾 英明

群馬県前橋市下小出町一丁目4番地の1
401号 樺マンション

(72) 発明者 横尾 英明

群馬県前橋市下小出町1-4-1 樺マン
ション401 群馬大
学医学部医学科内

(72) 発明者 磯田 浩二

群馬県前橋市元総社町2572-1 グラ
ンシャリオB 102

群馬大学医学部医学科内

(72) 発明者 中里 洋一

前橋市荒牧町136-1 群馬大学医学部
医学科内

最終頁に続く

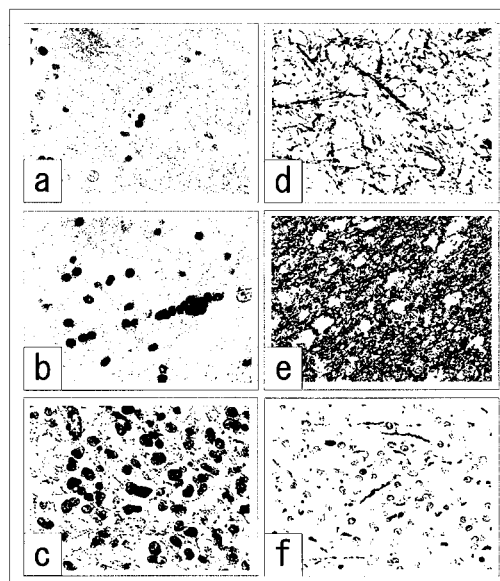
(54) 【発明の名称】 抗ヒトOlig2抗体

(57) 【要約】

【課題】 抗ヒトOlig2抗体を提供すること。およびそれを有効成分として含むことを特徴とする免疫組織染色試薬、免疫化学試薬、医薬ならびに診断薬を提供すること。

【解決手段】 ヒトOlig2またはその部分アミノ酸配列からなるフラグメントを免疫原とすることにより得られ、ヒトのオリゴデンドロサイトに特異的に結合する抗ヒトOlig2抗体、およびそれを有効成分として含むことを特徴とする免疫組織染色試薬、免疫化学試薬、医薬ならびに診断薬。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト O l i g 2、またはその部分アミノ酸配列からなるフラグメント、またはそれと同様な免疫原性を有するフラグメントを免疫原として得られ、ヒトオリゴデンドロサイトと特異的に結合し、神経細胞、アストロサイト、脳室上衣細胞、ミクログリア、シュワン細胞とは反応しない抗ヒト O l i g 2 抗体。

【請求項 2】

O l i g 2 のフラグメントが、O l i g 2 の C 末端の少なくとも 10 個のアミノ酸配列を含むフラグメントである請求項第 1 項記載の抗ヒト O l i g 2 抗体。

【請求項 3】

O l i g 2 のフラグメントが、次のペプチド配列

M G A G S L P R L T S D A K

である請求項第 1 項または第 2 項記載の抗ヒト O l i g 2 抗体。

【請求項 4】

請求項第 1 項から第 3 項のいずれかの項に記載の抗ヒト O l i g 2 抗体を有効成分として含有する免疫組織染色試薬および免疫化学試薬。

【請求項 5】

請求項第 1 項から第 3 項のいずれかの項に記載の抗ヒト O l i g 2 抗体を有効成分として含有する医薬および診断薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はヒト O l i g 2 と特異的に結合する抗体、およびこれを利用する免疫組織染色試薬、免疫化学試薬、医薬、および診断薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

オリゴデンドロサイトは中枢神経系組織実質内に存在する細胞の一種で、神経細胞の軸索を取り巻く髄鞘を形成して神経細胞の機能維持に極めて重要な役目を担うとともに、自己免疫疾患、神経変性疾患、脳腫瘍など、様々な疾患の標的にもなっている。

【0003】

中枢神経系細胞のほとんどは非常に長く複雑な突起網を有し、またそのことが神経機能を発揮する上で極めて重要であるために、組織をすりつぶして得られる抽出物を研究対象とする生化学的手法だけでは神経科学の探究には限界がある。

【0004】

その欠点を補うために、神経科学の分野では形態学的研究手法が頻用される。しかしヘマトキシリン - エオジン染色等の一般的な組織染色では複雑な突起網を十分に追跡することはできず、細胞の判別は主として核や細胞体の形態を頼りに行っていた。

【0005】

このように形態情報のみでは十分な細胞の判別が困難なため、免疫組織化学的に中枢神経系細胞を区別する方法が開発されてきた。例として、神経細胞を認識する抗ニューロフィラメント抗体（例えば、非特許文献 1 参照。）やアストロサイトを認識する抗グリア線維酸性タンパク質抗体（例えば、非特許文献 2 参照。）などがあり、その有用性は広く認められている。

【0006】

一方でオリゴデンドロサイトを認識する抗体は、髄鞘を構成する分子、例えばガラクトセレブロシドやミエリン塩基性タンパク質（例えば、非特許文献 3 参照。）などを標的にしたものが開発されている。これらの抗体は主に細胞の突起の部分に反応するため（図 1 d、e 参照。図 1 d は抗ミエリン塩基性タンパク質で大脳皮質を染色したもの、図 1 e は抗ミエリン塩基性タンパク質で大脳白質を染色したもの。）、細胞の全体像を観察できる培養中のオリゴデンドロサイトの同定には使用可能であっても、組織切片上では細胞突起を

10

20

30

40

50

十分に追跡できないために、細胞の同定には役に立たない。さらに、オリゴデンドロサイトには、組織標本作製する過程で細胞質が脱落しやすい特徴があり、オリゴデンドロサイトを標的とした免疫組織染色は、結果が安定しない。

【0007】

一般に脳腫瘍の病理組織学的診断に抗体を用いた免疫組織化学は極めて有効であり、抗ニューロフィラメント抗体や抗グリア線維酸性タンパク質抗体以外にも多数の抗体が開発され、また応用されている（例えば、非特許文献2参照。）。

【0008】

しかし、オリゴデンドロサイトの腫瘍であるオリゴデンドログリオーマは、ガラクトセレブロシドやミエリン塩基性タンパク質などの髄鞘分子をほとんど発現しなくなるので、オリゴデンドログリオーマはこれらに対する抗体にはほとんど反応しない（図1f参照。図1fは抗ミエリン塩基性タンパク質でオリゴデンドログリオーマを染色したもの。）。 10

【0009】

しかるに、オリゴデンドログリオーマと特異的に反応する抗体は開発されていない（例えば、非特許文献4参照。）。そのためにオリゴデンドログリオーマの病理組織学的診断にはしばしば困難を伴う。

【0010】

最近、脳神経系細胞の分化制御に関与する転写因子のひとつであるOlig2が齧歯類や鳥類の脳においてオリゴデンドロサイトに特異的に発現していると報告された（例えば、非特許文献5参照。）。Olig2は、オリゴデンドロサイトの発生・分化を制御する転写因子で、齧歯類や鳥類ではオリゴデンドロサイト特異的に発生初期から成熟期に発現していることが分かっている。ヒトOlig2の配列は、米国NCBIデータベース上でタンパク質として、Accession No. NM005806に開示されている。 20

【0011】

ヒトのオリゴデンドロサイトとオリゴデンドログリオーマに対して、Olig2のmRNAを標的としたin situ hybridization (ISH)法を実施した研究で、Olig2のmRNAが両者に特異的に発現していることが報告された（例えば、非特許文献6、7参照。）。 30

【0012】

しかしISH法を実施する際には、一般に、使用する組織標本の固定法や包埋等の条件に制限があり、技術的に特殊で手法が煩雑であり、再現性に乏しい欠点がある。 30

【0013】

ヒトオリゴデンドロサイトおよびオリゴデンドログリオーマの、とりわけ核に反応する抗体を開発することができれば、正常状態あるいは病的状態のヒト脳におけるオリゴデンドロサイトを免疫組織化学的に把握し、病理診断や病態を解明することが可能となる。免疫組織染色法はISH法と比較して、一般に、組織標本作製上の制約が少なく、技術的に容易で、再現性が高い。

【0014】

転写因子は一般に核内で働く分子なので、これを標的とする抗体は核に反応することが期待される。ヒトにおいてOlig2を標的分子としてオリゴデンドロサイトを抗体で同定することができれば、医学生物学の研究において極めて有用である。 40

【0015】

【非特許文献1】「Y. Nakazatoら、Acta Neuropathol, 1984, 64: 30 - 36」

【非特許文献2】「栗坂昌宏、中里洋一編、脳腫瘍の免疫染色法、朝倉書店、1986」

【非特許文献3】「鈴木衣子、Glia細胞（生田房弘編）、クバプロ、1999, 155 - 178」

【非特許文献4】「G. Reifenbergerら、Pathology and Genetics. Tumours of the Nervous System. IARC Press, 2000, 55 - 69」

【非特許文献5】「Q. Zhouら、Neuron, 2000, 25: 331 - 343」

【非特許文献6】「Y. Marieら、Lancet, 2001, 358: 298 - 300」

【非特許文献7】「Q. R. Luら、Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 10851 - 10856」

【0016】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、ヒトOlig2を特異的に認識する抗体を提供することである。

【0017】

【課題を解決するための手段】

上記の目的を達成するための手段は、請求項2に記載のヒトOlig2 C末端の少なくとも10個のアミノ酸配列を含むフラグメントを免疫原とする抗ヒトOlig2抗体の作製である。より具体的には、請求項3に記載のペプチドを免疫原とする抗ヒトOlig2抗体の作製である。この配列は、公知のタンパク質解析手法によって抗原性、親水性、可動性を評価した結果、好ましい抗原候補として選択された部位である。

【0018】

【発明の実施の形態】

抗ヒトOlig2抗体は、ヒトOlig2、またはその部分アミノ酸配列からなるフラグメント、またはそれと同様な免疫原性を有するフラグメントを免疫原とし、当該分野で常用される適当な動物に投与することにより得られる。これにあたっては、公知の方法、例えば続生化学実験講座、免疫生化学研究法（日本生化学会編）等に記載の方法を適宜利用することができる。

【0019】

免疫原の調製方法に特に制限はなく、例えばOlig2を含む組織や細胞からOlig2を抽出したり、遺伝子工学的手法を用いて細胞にOlig2あるいはそのフラグメントを合成したものを使用したり、ペプチド合成機でOlig2の部分アミノ酸配列を合成すること等が考えられるが、本発明の抗ヒトOlig2抗体の製造に用いられる免疫原は、公知の方法に従って、Olig2遺伝子の塩基配列を基に予測されるアミノ酸配列から免疫原に適した部位を予測し、ペプチド合成機でそれを合成し、生体高分子化合物（キャリア分子とも言う）を付加することで得られる。

【0020】

具体的に抗ヒトOlig2抗体を得るには、以下に記した方法に限定されないが、例えば次のようにする。すなわち、C端から14個のアミノ酸配列を含むフラグメントに、システインをそのN端に導入したもの（以下、「合成ペプチド」という）に生体高分子化合物を結合させた結合物が免疫原として用いられる。

【0021】

上記の合成ペプチドと結合させる生体高分子化合物として、スカシ貝のヘモシアニンが用いられるが、特にこれに限定されるものではなく、サイログロブリン、卵白アルブミン、ウシ血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン等も用いることができる。

【0022】

上記合成ペプチドと生体高分子化合物との結合は、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒトドキシスクシニミドエステルを用いて実施したが（マレイミド法）、この他にもグルタルアルデヒド法、カルボジイミド法などの公知の技術を挙げることができる。

【0023】

上記の方法による合成ペプチドと生体高分子化合物との反応物を、透析、脱塩カラム等によって精製することにより、合成ペプチドと生体高分子化合物との結合物（以下、単に「結合物」ということがある）を得ることができる。

【0024】

次に、上のようにして得られた結合物をリン酸ナトリウム緩衝液（以下、「PBS」という。）に溶解し、これとアジュバント（例えば、フロイント完全アジュバントまたは不完

10

20

30

40

50

全アジュバント、T i t e r M a x G o l d (フナコシ社)などを混合したものを免疫原として、ウサギに免疫する。なお、免疫される動物はウサギに限定されることはなく、当該分野で常用されるものをいずれも使用でき、例えば、マウス、ラット、ヤギ、ウマ、ニワトリ等を挙げることができる。

【0025】

免疫する際の免疫原の投与法は皮下注射とするが、この方法に限定されることはなく、腹腔内注射、静脈内注射、筋肉内注射のいずれでもよい。免疫原の投与は1回または複数回を適当な間隔で、具体的には1週間ないし5週間の間隔で行うことができる。

【0026】

次いで、常法に従い、免疫した動物から血液を採取し、そこから抗血清を分離する。この抗血清を、更に、例えば抗原カラムを用いてアフィニティー精製し、ポリクローナル抗体として抗ヒトO l i g 2抗体を得ることができる。 10

【0027】

また、モノクローナル抗体を作製するための方法も特に限定されず、当業者が通常使用する方法を用いることができる。具体的には、免疫動物への抗原の注入はポリクローナル抗体の作製の場合と同様に行うことができ、かかる免疫感作の後、免疫した動物よりハイブリドーマ作製のための抗体産生細胞を単離する。なお、本発明のモノクローナル抗体を産生する抗体産生細胞はB細胞であり、B細胞は体内を循環しているが、脾臓などに蓄積されることも知られている。従って、免疫した動物の脾臓を摘出して、そこから抗体産生細胞を調製するのが好ましいが、必ずしも脾臓でなくてもよく、B細胞が多く存在する部分 20
を使用することもできる。次いで、このようにして得た抗体産生細胞をミエローマ細胞(パートナー細胞)と融合し、不死化する。

【0028】

細胞融合技術としては、公知の技術を用いることができる。細胞融合は、一般的には、抗体産生細胞とヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT)欠損無限増殖性細胞株であるミエローマ細胞とを、融合促進剤を含有する培地中で保温することにより行われる。また抗体産生細胞とミエローマ細胞を電氣的に融合することもできる。

【0029】

ミエローマ細胞の種類は特に限定されず、公知のものを使用することができ、例えばマウスのものとしては、A g 8 . 6 5 3、P 3 U 1などが挙げられる。ミエローマ細胞の選択の際には抗体産生細胞との適合性を考慮するのが好ましい。融合促進剤としては、ポリエチレングリコールなどの化学物質、センダイウイルスなどの細胞融合媒介ウイルスを用いることができ、さらに融合効率を高めるための補助剤を添加してもよい。 30

【0030】

上記の抗体産生細胞とミエローマ細胞とを適当な比率、一般的には抗体産生細胞：ミエローマ細胞が1：1から1：100、好ましくは2：1から10：1の比率で、細胞培養培地中で混合した後に、融合促進剤を添加することにより細胞融合を行う。次いで、適当な培地の添加、および上清の除去を繰り返すことによりハイブリドーマを形成する。次いで、ヒポキサンチン-アミノプリテン-チミジン(HAT)培養液中で培養し、融合細胞の 40
みを選択する。HAT培地での細胞の培養は、ハイブリドーマ以外の細胞が死滅するのに十分な期間行えばよく、通常は数日から数週間の期間行えばよい。

【0031】

なお、抗体産生細胞の不死化は、細胞融合(ハイブリドーマの作製)によるものに限定されるわけではなく、その他の公知の技術を用いることができる。例えば、抗体産生細胞としてのヒトのBリンパ球を用いる場合には、エプスタイン・バールウイルス(EBV)を用いて形質転換することにより不死化を行ってもよい。

【0032】

次いで、上記により得られたハイブリドーマについて、本発明のヒトO l i g 2を認識する抗体を産生する単一のクローンを得るためにスクリーニングを行う。単一のクローンを 50

得るためのクローニング法は公知の方法を用いればよく、例えば、限界希釈法、軟寒天法、単一細胞分離法などを用いることができる。また、目的とする抗体を産生するハイブリドーマを得るためのスクリーニング法も公知の方法を用いればよく、例えば、E L I S A 法、イムノプロット法、ブランク法、凝集反応法、R I A 法、免疫組織化学染色法などの抗体を検出するための各種方法により行うことができる。

【0033】

スクリーニングは、作業効率の向上などの観点から1次スクリーニングと2次スクリーニングなどのように段階的に行ってもよい。上記のようにして得られた所望の抗体を産生する細胞株は、通常の培地において継代培養が可能であり、また液体窒素中などで長期保存が可能である。

10

【0034】

本発明によるヒトO l i g 2を認識するモノクローナル抗体を、上記のようにして得たハイブリドーマから得るための方法の例としては、以下の2つの方法が挙げられる。第1の方法によれば、上記のハイブリドーマを一定の時間、適当な培地中で培養し、その培養上清から、例えばアフィニティークラムクロマトグラフィーなどを用いてそのハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を単離精製することができる。

【0035】

あるいは第2の方法によれば、上記のハイブリドーマをそれと適合性のある(即ち、同質遺伝子または半同質遺伝子を有する)哺乳動物、例えばマウスなどの腹腔内に注射し、一定時間後に、その動物の血清または腹水からそのハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を単離精製することができる。

20

【0036】

また、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマから得られるものだけでなく、抗体遺伝子をクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを公知の細胞株、例えば、C O S、C H O等に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させたモノクローナル抗体を用いることができる(例えば、V a n d a m m e ら、E u r . J . B i o c h e m . 1 9 2 , 7 6 7 - 7 7 5 , 1 9 9 0 を参照。)。

【0037】

かくして得られる抗ヒトO l i g 2抗体は、それを含むことを特徴とする免疫組織染色試薬、免疫化学試薬、医薬、診断薬として使用することができる。

30

【0038】

免疫組織染色試薬の具体的用途としては、例えば、ヒト由来の病理組織標本において、オリゴデンドロサイトやオリゴデンドログリオーマを免疫組織染色により簡便に、かつ特異的に同定するために使用することができる。例えば、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、エタノール等を用いる固定法により固定された組織標本のパラフィン切片、あるいは当該分野で常用されるその他の包埋材を用いて包埋された組織切片、または凍結組織切片等において、抗ヒトO l i g 2抗体を用いる免疫組織染色は、特に制約はなく、酵素抗体法、蛍光抗体法、金コロイド標識法等の公知の手段により実施される(改訂三版 酵素抗体法、渡辺慶一、中根一穂、学際企画出版等を参照)。

【0039】

免疫化学試薬の具体的用途としては、ウェスタンブロッティング、免疫沈降法等の公知の技術を挙げることができる。

40

【0040】

医薬および診断薬の具体的用途としてはオリゴデンドロサイトが関与する疾患の治療および診断が考えられ、例えば医薬としては抗腫瘍薬等、診断薬としては脳腫瘍、神経変性疾患等の診断薬としての用途が考えられる。有効成分の投与量は、患者の容態、性別、体重などに応じて適宜選択できるが、一般的には約1 μ g / k g / 日 ~ 約5 0 0 m g / k g / 日の範囲である。

【0041】

【実施例】

50

以下の実施例によって本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら制約されるものではない。

【0042】

[抗ヒトOlig2抗体の調製]

次の配列1で示されるOlig2のC端の14アミノ酸のN端側にキャリア蛋白導入のために必要なシステインを加えた計15アミノ酸の合成ペプチドを作製した。この合成ペプチドのN端側のシステインにキャリア蛋白としてスカシ貝のヘモシアニンをマレイミド法に従って導入した。このスカシ貝のヘモシアニン結合合成ペプチド1.25mgをアジュバント(商品名TiterMaxGold, フナコシ社)と良く混和し、ウサギ(日本白色腫; 2.5kg)に投与した。二週間後、追加免疫として、スカシ貝のヘモシアニン結合合成ペプチド1.25mgをフロイント不完全アジュバントと良く混和したものを投与した。以後は二週間隔で追加免疫を計4回行い、最終的にウサギから採血して抗血清を採取した。

10

【0043】

配列1: MGAGSLPRLTSDAK

【0044】

一方、CN-Br活性化セファロース(ファルマシア社製)に上記の合成ペプチドを結合させたものをカラムに充填し、このカラムを用いて、上記抗血清をアフィニティークロマトグラフィ法で精製し、合成ペプチドに特異性のある抗体、即ち、抗ヒトOlig2抗体を得た。

20

【0045】

実施例 1

ウェスタンブロッティングによる特異性の確認:

次に、得られたポリクローナル抗体がOlig2を認識することを確認するために、Laemmliの方法に従って、脳抽出物を電気泳動し、ウェスタンブロッティングを行った。

【0046】

ヒト脳組織を、5μg/mlのアプロチニンと5μg/mlのロイペプチンを含む50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.6)に入れて破碎し、4℃に保ちながら10000gで30分間遠心した。得られた上清の一部を5倍量の1%ドデシル硫酸ナトリウム、1%2-メルカプトエタノール、20%グリセロールを含む10mM Tris-HCl(pH6.8)に混和し、95℃で5分加熱した。

30

【0047】

ヒトOlig2タンパク質の調製に用いられる出発材料は、ヒト脳組織には限定されず、例えば、脳腫瘍、培養細胞等、Olig2タンパク質を含むものであれば何でもよい。またOlig2タンパク質の抽出に用いられる溶媒の組成は、上記に限定されることはなく、常用されるその他のプロテアーゼ阻害剤や緩衝液を使用できる。

【0048】

自家調製した10%のポリアクリルアミドゲル上でLaemmliの方法で電気泳動(SDS-PAGE法)を行った。電気泳動されたタンパク質は、セミドライ法によってPVDF膜へ電氣的に転写した。PVDF膜は1%スキムミルクを添加したPBSでブロッキングし、1%BSAを含むPBSで希釈した抗ヒトOlig2抗体と4℃で一晩反応させた。反応後、0.1%Tween20添加PBS溶液で洗浄し、HRP標識抗ウサギ免疫グロブリン抗体(商品名シンプルステイン、ニチレイ社製)を二次抗体として反応させ、0.1%Tween20添加PBS溶液で洗浄後、3,3'-ジアミノベンチジン溶液で発色させた。

40

【0049】

一方、比較のため、抗ヒトOlig2抗体の活性を、免疫原に使用した合成ペプチドを用いて吸収して、前項と同様にウェスタンブロッティングを実施した。即ち、抗ヒトOlig2抗体を作製するために使用した合成ペプチドと、適切に希釈された抗ヒトOlig2

50

抗体を24時間37℃で反応させ、その後、4℃に保ちながら10000gで60分遠心し、上清を回収した。このようにして得られた抗体活性を吸収した抗ヒトOlig2抗体を前項に記載の抗ヒトOlig2抗体に置き換えて、同様にして発色を試みた。

【0050】

このウェスタンブロッティングの結果を図2に示す。抗ヒトOlig2抗体を使用した場合、32kD付近に単一の濃いバンドが出現した(図2左レーン)のに対し、抗体活性を免疫原で吸収した抗ヒトOlig2抗体ではバンドは認められなかった(図2右レーン)。ヒトOlig2の分子量は約32kDであることがOlig2遺伝子の構造から判明しており、これらの結果から抗ヒトOlig2抗体が特異的にヒトOlig2を認識することが確認できた。

10

【0051】

実施例 2

免疫組織染色に先立つ加熱処理の効果：

免疫組織染色における前処理として当該分野で常用される、オートクレーブ、マイクロウェーブ(家庭用電子レンジ)、または調理用鍋等による加熱処理は、しばしばその染色性を増強させることが知られている。ここではオートクレーブを用いて、抗ヒトOlig2抗体を用いた免疫組織染色における加熱処理の効果を検討した。試料としては、数日間ホルマリン固定されたのちにパラフィン包埋された神経疾患のないヒト脳の組織切片5例を用いた。

【0052】

パラフィン切片をキシレン濃度系列溶液とアルコール濃度系列溶液により脱パラフィン・親水化した後、0.3%過酸化水素を含むメタノール溶液中に30分切片を浸し、内因性パーオキシダーゼのブロッキング操作を行った。切片を水洗した後にPBSに浸した。その後オートクレーブで120℃に加熱し、この温度を約10分保った後、室温に放置して冷却した。

20

【0053】

比較対照として、加熱処理を省略したこと以外は全く同様に処理したパラフィン切片を用意した。

【0054】

加熱処理を加えた切片と加えなかった切片を用いて同時に免疫組織染色を行った。具体的な各工程は以下の通りである。PBS中に浸してある切片を取り出して10%正常ヤギ血清で30分組織上を覆い、非特異反応部位のブロッキング操作を行った。次にPBSで良く洗浄した後、抗ヒトOlig2抗体を1%BSAを含むPBSにて適宜希釈して組織上を覆い、4℃で一夜反応させた。PBSで良く洗浄した後、調整済みのビオチン標識ヤギ抗ウサギIgG二次抗体(商品名ヒストファイン、ニチレイ社製)にて組織上を覆い、室温で30分反応させた。PBSで良く洗浄した後、調整済みのHRP標識ストレプトアビジンにて組織上を覆い、室温で30分反応させた。最後に十分にPBSで洗浄した後、調整した3,3'-ジアミノベンチジン溶液中で5分間反応させた。核の対比染色としてヘマトキシリン溶液中に数秒浸し、良く水洗した。その後・脱水・透徹・封入操作を行い、光学顕微鏡下で観察した。本反応に特有の褐色の発色が認められた場合に、Olig2陽性とした。

30

40

【0055】

その結果を図3に示した。加熱処理を実施した場合(図3a)では、加熱処理を実施しなかった場合(図3b)と比較して、染色性が著しく向上した。

【0056】

実施例 3

免疫組織染色試験：

抗ヒトOlig2抗体を用いて免疫組織染色試験を行った。試料としては、特に神経疾患のないヒト脳5例、ヒトオリゴデンドログリオーマ10例、ヒト正常全身組織3例の切片を用いた。これらの切片は、ホルマリンまたは4%パラホルムアルデヒドで1日から数日

50

間固定したパラフィン包埋切片である。

【0057】

比較対照として、抗体活性を吸収した抗ヒトOlig2抗体、オリゴデンドロサイトの髄鞘を認識する抗ミエリン塩基性タンパク質抗体（ダコ社製）、アストロサイトを認識する抗グリア線維酸性タンパク質抗体（Nakazatoら、Lab Invest, 46: 621-626を参照）、ミクログリアを認識するKi-M1P抗体（生化学工業社製）を用いた免疫組織染色を実施した。これらの抗体による染色には、ヒト脳組織、ならびにヒトオリゴデンドログリオーマを用いた。

【0058】

抗ヒトOlig2抗体、および抗体活性を吸収した抗ヒトOlig2抗体による免疫組織染色は実施例3に記載した通りである。また、抗体活性を吸収した抗ヒトOlig2抗体の作成方法は実施例1に記載した通りである。

【0059】

抗ミエリン塩基性タンパク質抗体および抗グリア線維酸性タンパク質抗体による免疫組織染色は、オートクレーブ加熱処理を省略したこと以外は、実施例2に記載した通りである。

【0060】

Ki-M1P抗体による免疫組織染色は、オートクレーブ加熱処理を行わない点と、二次抗体として調製済みビオチン標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体（ニチレイ社製）を用いる以外は実施例2に記載した通りである。

【0061】

この結果、抗ヒトOlig2抗体による染色ではオリゴデンドロサイト、即ち大脳皮質においては神経細胞や血管に寄り添う位置に存在して比較的小型の円形核を有するsatellite oligodendrocyte、また大脳白質においては髄鞘間に数珠状に並ぶ比較的小型の円形核を有するinterfascicular oligodendrocyteがよく染色された。その結果を図1a、bに示した。（図1aは大脳皮質、bは大脳白質における抗ヒトOlig2抗体による免疫組織染色の結果を示したものの。）

【0062】

オリゴデンドログリオーマにおける抗ヒトOlig2抗体の染色では、腫瘍細胞の核に一致して強い陽性所見を認めた。その結果を図1cに示した。（図1cはオリゴデンドログリオーマにおける抗ヒトOlig2抗体による免疫組織染色の結果を示したものの。）

【0063】

ヒト正常全身組織を用いた染色では、抗ヒトOlig2抗体と反応する細胞は認められなかった。

【0064】

抗体活性を吸収した抗ヒトOlig2抗体でヒト脳組織を染色したところ何も染色されなかった。

【0065】

公知のオリゴデンドロサイトマーカーである抗ミエリン塩基性タンパク質抗体では、ニューロピル（脳組織のうちで、核と細胞体以外の部分の総称）が染色された。オリゴデンドロサイトの突起（髄鞘）は、大脳白質に豊富で、大脳皮質には相対的に少ないため、抗ミエリン塩基性タンパク質抗体は大脳白質をびまん性に染色し、大脳皮質を線状に染色した。その結果を図1d、eに示した。（図1dは大脳皮質、eは大脳白質における抗ミエリン塩基性タンパク質抗体による免疫組織染色の結果を示したものの。）

【0066】

オリゴデンドログリオーマでは、抗ミエリン塩基性タンパク質抗体によって線状にわずかに染色されたが、陽性部分はオリゴデンドログリオーマ腫瘍細胞との連続性はなく、腫瘍と混在している既存の神経組織に対する反応と考えられた。その結果を図1fに示した。（図1fはオリゴデンドログリオーマにおける抗ミエリン塩基性タンパク質抗体による免

10

20

30

40

50

疫組織染色の結果を示したもの。)

【0067】

アストロサイトマーカーである抗グリア線維酸性タンパク質抗体でヒト脳組織の免疫組織染色を行ったところ、抗ヒトOlig2抗体で染色される細胞とは別の細胞、即ちアストロサイトの突起に染色像が得られた。

【0068】

Ki-M1P抗体でヒト脳組織の免疫組織染色を行ったところ、抗ヒトOlig2抗体で染色される細胞とは別の細胞、即ちミクログリアの突起に染色像が得られた。

【0069】

以上のことから、▲1▼抗ヒトOlig2抗体はヒトOlig2に対して特異的に反応すること、▲2▼抗ヒトOlig2抗体による免疫組織染色ではオリゴデンドロサイトの核が染色され、神経細胞、アストロサイト、脳室上衣細胞、ミクログリア、シュワン細胞は染色されず、この抗体がオリゴデンドロサイトに特異的に反応すること、▲3▼その染色像は、オリゴデンドロサイトの核に局在するので、従来技術である抗ミエリン塩基性タンパク質抗体を用いた免疫組織染色と比較して細胞の同定に優れていること、▲4▼ホルマリン固定、パラフィン組織標本で染色可能であり、汎用性があること、▲5▼抗ヒトOlig2抗体の免疫組織染色には、前処理として加熱処理が有効であることが明らかになった。

10

【0070】

また、オリゴデンドログリオーマにおいても正常のオリゴデンドロサイトと同様に核に染色されることが確認された。オリゴデンドログリオーマはパラフィン切片上では人工変化のために細胞質が脱落しやすい特徴があるが、核を染める抗ヒトOlig2抗体ではその点は問題にならないことが明らかとなった。

20

【0071】

【発明の効果】

本発明の抗ヒトOlig2抗体は、ヒトOlig2を特異的に認識し、ヒト由来の組織標本において、オリゴデンドロサイトおよびオリゴデンドログリオーマの核を特異的に認識する。更に本発明の抗ヒトOlig2抗体は、生体組織中およびin vitroにおけるOlig2の分布や発現量を検出するのに有効であり、免疫組織染色試薬、免疫化学試薬、医薬ならびに診断薬として有用である。

30

【0072】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Gunma University

<120> Human anti-Olig2 antibody, and immunohistochemical and immunochemical reagent, therapeutic drug and diagnostic reagent utilizing it

<130> YOK00-01

<140>

<141>

<160> 1

<170> PatentIn Ver.2.1

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Inventor: Yokoo, Hideaki; Isoda, Koji; Nakazato, Yoichi

<220>

<230> Description of Artificial Sequence: human Olig2 synthetic peptide

<400> 1

Met Gly Ala Gly Ser Leu Pro Arg Leu Thr Ser Asp Ala Lys

1 5 10

10

20

30

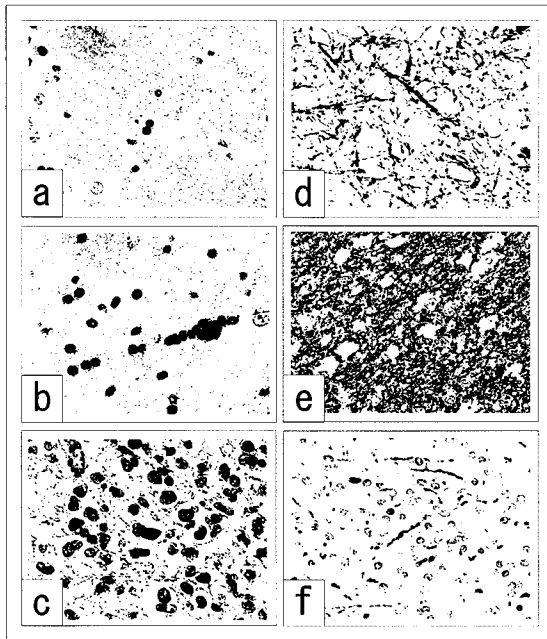
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の抗ヒトOlig2抗体、および公知の抗ミエリン塩基性タンパク質抗体を用いてヒト組織を免疫組織染色し、両者の染色結果を比較した図面。（写真）

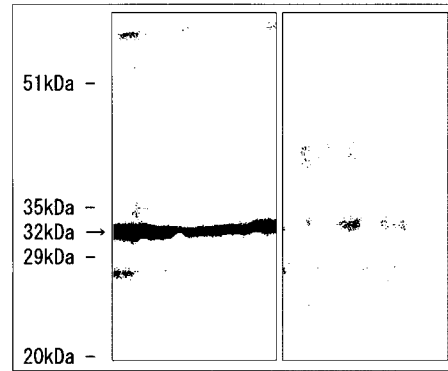
【図2】本発明の抗ヒトOlig2抗体の特異性を確認するウェスタンブロッティングの結果を示す図面。（写真）

【図3】オートクレーブ加熱処理による、抗ヒトOlig2抗体の染色性の向上を示す図面。（写真）

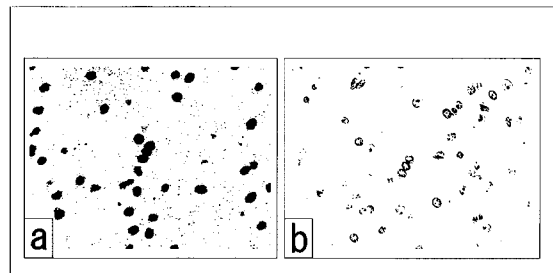
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

F ターム(参考) 4C085 AA13 BB11 CC13 DD86 FF03 FF20
4H045 AA11 AA30 BA10 CA45 DA75 EA20 EA50 EA54 FA71 GA26
HA05

专利名称(译)	抗人Olig2抗体		
公开(公告)号	JP2004269392A	公开(公告)日	2004-09-30
申请号	JP2003060812	申请日	2003-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	横尾英明		
申请(专利权)人(译)	横尾英明		
[标]发明人	横尾英明 磯田浩二 中里洋一		
发明人	横尾 英明 磯田 浩二 中里 洋一		
IPC分类号	G01N33/531 A61K39/395 A61P35/00 C07K16/18		
FI分类号	C07K16/18.ZNA A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/CC13 4C085/DD86 4C085/FF03 4C085/FF20 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA45 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/EA54 4H045/FA71 4H045/GA26 4H045/HA05		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供抗人Olig2抗体。和免疫组织化学染色试剂，免疫化学试剂，药物和诊断剂，其特征在于包含其作为活性成分。 解决方案：抗人Olig2抗体，其通过使用由人Olig2或其部分氨基酸序列组成的片段作为免疫原并且特异性结合人少突胶质细胞获得，并且其特征在于含有其作为活性成分。免疫组化染色试剂，免疫化学试剂，药物和诊断剂。 点域1

