

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4378520号
(P4378520)

(45) 発行日 平成21年12月9日(2009.12.9)

(24) 登録日 平成21年10月2日(2009.10.2)

(51) Int.Cl.		F I	
CO7K 16/18 (2006.01)		CO7K	16/18
GO1N 33/53 (2006.01)		GO1N	33/53 D
GO1N 33/577 (2006.01)		GO1N	33/577 B
C12P 21/08 (2006.01)		C12P	21/08
C12N 15/02 (2006.01)		C12N	15/00 C

請求項の数 5 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2008-147641 (P2008-147641)	(73) 特許権者	301021533
(22) 出願日	平成20年6月5日(2008.6.5)		独立行政法人産業技術総合研究所
(62) 分割の表示	特願2003-410942 (P2003-410942) の分割		東京都千代田区霞が関1-3-1
原出願日	平成15年12月9日(2003.12.9)	(72) 発明者	丹治 雅夫
(65) 公開番号	特開2008-273987 (P2008-273987A)		茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
(43) 公開日	平成20年11月13日(2008.11.13)	(72) 発明者	岡 修一
審査請求日	平成20年6月5日(2008.6.5)		茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
(出願人による申告)平成15年度経済産業省業務委託「特許微生物寄託等業務」、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願		審査官	柴原 直司
微生物の受託番号 FERM P-19610			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エストロゲン結合性タンパク質に対するモノクローナル抗体。

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト由来の免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体であって、免疫グロブリン様エストロゲン結合性蛋白質が、a) 樹立ハイブリドーマ細胞株 (FERM P-19619) の産生モノクローナル抗体により特異的に認識され、分子量52kDaのH鎖と30kDaのL鎖からなり、b) ステロイド結合能を有し、かつ、c) エストロゲン存在下で乳ガン細胞増殖抑制作用を有するものである、上記モノクローナル抗体。

【請求項2】

請求項1に記載のモノクローナル抗体を含有することを特徴とする、請求項1に記載の免疫グロブリン様エストロゲン結合タンパク質の検出試薬。

10

【請求項3】

請求項1に記載のモノクローナル抗体を含有することを特徴とする、請求項1に記載の免疫グロブリン様エストロゲン結合タンパク質の定量試薬。

【請求項4】

請求項1に記載のモノクローナル抗体を含有することを特徴とする、ヒトの体液、組織中に存在する請求項1に記載の免疫グロブリン様エストロゲン結合タンパク質の濃度を定量するために使用する検査薬。

【請求項5】

請求項1に記載のモノクローナル抗体を含有することを特徴とする診断薬。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトなどの哺乳動物血液または組織中に存在する、エストロゲン結合性タンパク質に対するモノクローナル抗体、その製法、該抗体産生細胞、および該抗体を用いた検査薬、診断薬に関する。

【背景技術】

【0002】

乳がんの発生や進行にはエストロゲンがカギとなっていることが知られている。研究者の間では、エストロゲンは標的細胞核内にある2種類のエストロゲンレセプターに結合することによって細胞に影響するとされている。

10

しかしながら、いずれのエストロゲンレセプターも乳がん細胞の増殖に直接かかわっていないということが明らかにされており、他にエストロゲンの働きを仲介する因子が見つかっていないので、乳がんの発生と進行に関する研究は進んでいない。本発明者の1人はこれまでに、細胞外にもエストロゲンの働きを仲介する因子が存在している可能性があるという仮説を手掛かりに、ヒト血液からエストロゲンの働きを仲介する未知の乳がん細胞増殖阻害因子を単離するとともに、この因子が、エストロゲンに結合性を有するタンパク質であることを明らかにし、さらに、エストロゲンの働きを仲介して細胞増殖を抑制する証拠として、血清もしくはこの因子を加えない培養液中ではエストロゲンが乳がん細胞の増殖に全く影響しないことを示した(非特許文献1)。

20

【0003】

【非特許文献1】Anticancer Res. 20, 2779-84(2000)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

その後、この研究をさらに進め、乳がんは病気の進行とともにエストロゲン感受性を失ってゆくことに着目し、これが細胞の形質維持の良いモデルであるため、引き続き乳がん細胞を用いた研究を行った。上記乳がん細胞のエストロゲン感受性の喪失に対し、上記細胞増殖阻害因子に対する感受性が関与していると考えられるが、そのメカニズムを明らかにするためには、上記細胞増殖阻害因子の機能を阻害する手段が必要になる。このため、上記細胞増殖阻害因子に対し特異的に結合する抗体が求められる。しかし、上記細胞増殖阻害因子については、その分子構造等についての知見が未だ十分に得られていないため、該特異抗体を得るのは難しい。したがって、本発明の課題は、このような困難性を克服し、上記細胞増殖阻害因子に対し特異的に結合する抗体を新たに提供することにある。

30

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者等は、その後の研究の結果、上記細胞増殖阻害因子が、免疫グロブリンと非常に似た構造を有するとの知見を得た。このため、上記細胞増殖因子と生体内に多種多様に存在する免疫グロブリンとを識別しうる抗体を作製することは困難であると予想されたが、このような状況の下、上記細胞増殖阻害因子にのみ特異的に結合するモノクローナル抗体の作成を試み、種々の検討、実験を繰り返した後、上記増殖阻害因子に対し特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることに初めて成功するとともに、該抗体が、乳がんの発症、防御メカニズム解明あるいは乳がんの発症の可能性を探るための薬剤等として、極めて有用であると確信し、本発明を完成するに至ったものである。すなわち、本発明は以下(1)~(5)の構成を伴うものである。なお、以下においては、上記細胞増殖阻害因子を免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質という。

40

【0006】

(1) ヒト由来の免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体であって、免疫グロブリン様エストロゲン結合性蛋白質が、a)樹立ハイブリドーマ細胞株(FERM P-19619)の産生モノクローナル抗体により特異的に認識さ

50

れ、分子量52kDaのH鎖と30kDaのL鎖からなり、b)ステロイド結合能を有し、かつ、c)エストロゲン存在下で乳ガン細胞増殖抑制作用を有するものである、上記モノクローナル抗体。

(2) 請求項1に記載のモノクローナル抗体を含有することを特徴とする、上記(1)に記載の免疫グロブリン様エストロゲン結合タンパク質の検出試薬。

(3) 上記(1)に記載のモノクローナル抗体を含有することを特徴とする、上記(1)に記載の免疫グロブリン様エストロゲン結合タンパク質の定量試薬。

(4) 上記(1)に記載のモノクローナル抗体を含有することを特徴とする、ヒトの体液、組織中に存在する、上記(1)に記載の免疫グロブリン様エストロゲン結合タンパク質の濃度を定量するために使用する検査薬。

(5) 上記(1)に記載のモノクローナル抗体を含有することを特徴とする診断薬。

【発明の効果】

【0007】

本発明のモノクローナル抗体の抗原は、エストロゲン依存性乳がん細胞増殖阻害因子として単離された免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質であり、本発明のモノクローナル抗体は、該タンパク質の検出および定量に極めて有用なものである。また、上記モノクローナル抗体を用いて、その生体内の該エストロゲン結合性タンパク質を定量することにより、健全な女性が乳がんになる可能性を検査することも可能となる。

さらに、乳がんは進行が進むと次第にエストロゲンに反応しなくなり、それと同時により悪性化することが知られている。悪性化した乳がん細胞にも細胞内に機能的に問題ないエストロゲン受容体が存在することが多く、細胞の形質変化にエストロゲン受容体関係していないことが指摘されている。このような乳がん細胞の形質変化に対しては上記エストロゲン結合性タンパク質が関与している可能性が考えられ、本発明のモノクローナル抗体は、乳がんの進行を診断するために使用する診断薬としての使用が考えられる。また、基礎研究としては、エストロゲンの作用機序やホルモンがん発症の防御のメカニズムを調べるうえでも極めて重要な抗体である。

【0008】

本発明のモノクローナル抗体が認識する免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質の構造を70%決定したところ、リユーマチ因子やRh血液型を決定する抗原を認識する抗D免疫グロブリンと共通構造をもっていた。そこで本発明のモノクローナル抗体はエストロゲンが関係する乳がんなどのホルモンがん細胞の形質のモニター、内分泌かく乱物質の働き、骨粗鬆症、白内障の治療法の研究のほか、Rh血液型の研究、リユーマチなどの自己免疫疾患のメカニズムを探る際にも用いられる可能性がある。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明は、ヒトその他哺乳動物の血液中に存在する免疫グロブリンに類似する構造を有するエストロゲン結合性タンパク質に対するモノクローナル抗体に関するものであり、このエストロゲン結合性タンパク質は、エストロゲンの存在下、乳がん細胞の増殖を抑制する。本発明のモノクローナル抗体は、このような免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質の検出、分布、定量、単離、挙動のモニター、並びに該タンパク質のスクリーニングを可能とするものである。

【0010】

本発明の上記モノクローナル抗体を得るため、抗原として使用するエストロゲン結合性タンパク質は、例えば、ヒト等の哺乳動物の血液から、以前報告した方法(Anticancer Res. 20, 2785-90(2000))もしくはその改良法である下記の実施例1の方法にしたがって単離することができる。また、得られるエストロゲン結合性タンパク質は、H鎖とL鎖からなるが、免疫グロブリンと非常に似た構造を有する。そして、血液中には多種多様の免疫グロブリンが存在するが、本発明のモノクローナル抗体はこれら免疫グロブリンと反応してはならず、かつそれと構造上80%以上の類似性をもつエストロゲン結合性タンパク質を確実に検出しなければならない。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 1 】

以下に、ヒトの細胞増殖阻害因子であるエストロゲン結合性タンパク質を抗原とする場合を例にとり、本発明のモノクローナル抗体を得る方法についてさらに具体的に説明する。

まず、還元条件下のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にて免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質をH鎖とL鎖に分離し、H鎖を含むゲルをかみそりで切り出してから電氣的に溶出回収して生理食塩水に、一定時間、例えば一昼夜透析し、得られたエストロゲン結合性タンパク質のH鎖を抗原としてマウス、ラットその他の動物に注射する。免疫した動物から脾臓を取り出し、得られる脾細胞と骨髓腫細胞（ミエローマ細胞）とをポリエチレングリコール等の周知の手段により融合させる。

10

次に、融合細胞にHAT培地による選択を行ってモノクローナル抗体を産生する融合細胞を得る。この段階では多種多様な融合細胞が存在し、免疫グロブリンとエストロゲン結合性タンパク質で共通の部分構造を認識するモノクローナル抗体を産生する融合細胞も含まれるため、得られる抗体では免疫グロブリンと抗原である上記エストロゲン結合性タンパク質とを識別できない。

【 0 0 1 2 】

そこで、これらの融合細胞を希釈して多数の培養器に分散させ、各々の培養器中に生じるモノクローナル抗体と、抗原となる上記エストロゲン結合性タンパク質のみを除いたヒト免疫グロブリンの画分、及び上記エストロゲン結合性タンパク質とをそれぞれ反応させ、上記エストロゲン結合性タンパク質のみを除いたヒト免疫グロブリンの画分とは反応せず、エストロゲン結合性タンパク質とのみ反応する融合細胞を選択し、該融合細胞からモノクローナル抗体を得る。得られるモノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリンとは反応せず、免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質にのみ特異的に結合する抗体である。

20

【 0 0 1 3 】

上記エストロゲン結合性タンパク質のみを除いたヒト免疫グロブリンの画分は、以下のように調製することができる。

例えば、新鮮な血液を一晩4℃で放置した後に遠心分離により血球を除いて上清を得、活性炭処理によりステロイド成分を除去してから、ステロイド、例えばヒドロコルチゾン（コルチゾール）をリガンドとしたアフィニティカラムを通過させる。

30

免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質は、ステロイドと結合するので、この操作により、アフィニティカラムに補足され、上記血液中の抗原となるエストロゲン結合性タンパク質を除去することができる。得られた素通り画分をプールし、免疫グロブリン画分をプロテインA-アフィニティカラムを用いて精製する。こうして抗原となるエストロゲン結合性タンパク質のみを除いたヒト免疫グロブリンの画分を得る。

【 0 0 1 4 】

次いで、このヒト免疫グロブリン画分と、免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質との反応性（結合性）を指標として、上記の融合細胞を分散させた多数の各培養器のなかから、抗原となる免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質にのみ強く反応する抗体が産生されている培養器を選択し、さらにそれに含まれる融合細胞を希釈した多数の培養器で同じように選択を繰り返すというスクリーニング作業を行い、抗原となるエストロゲン結合性タンパク質とのみ特異的に反応する抗体を産生する融合細胞を単離する。この融合細胞が培養液中に放出する抗体分子が、本発明のモノクローナル抗体である。融合細胞は保存が可能であり、培養により、またはマウスの腹水中に産生させることにより、いつでも本発明のモノクローナル抗体を得ることができる。本発明においては、上記操作により、免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質に対するモノクローナル抗体を産生する融合細胞として、樹立ハイブリドーマ細胞株「1G6-3E-10D」を得ている。該融合細胞は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに2003年12月8日付けで受託番号FERM P-19610号として寄託されている。

40

【 0 0 1 5 】

50

本発明において、動物に免疫する際、抗原として用いる免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質は、哺乳類由来のものであれば特に限定されず、例えば、ヒト、サル、ウシ、ウマ、ヤギ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター、ラット、マウス由来の免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質を用いることができる。これら、哺乳動物から免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質は、以前発表した方法 (Anticancer Res. 20, 2785-90(2000))、もしくはその変法、もしくはモノクローナル抗体を用いた免疫沈降法により調整しうる。

この本発明の免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質は、免疫グロブリンと類似した構造を有し、H鎖とL鎖からなる。H鎖はヒトの場合52kDa、L鎖は30kDaである。動物種によって大きさが若干異なる。この免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質は、上記のように、以前、細胞増殖抑制因子として、ステロイド結合能を持ち、エストロゲン存在下で乳がん細胞の増殖を阻害することを報告している (Anticancer Res. 20, 2785-90(2000))。

【0016】

抗原として用いるのは、分子を形成するH鎖とL鎖のうちH鎖である。さらに、遺伝子組み換え体によって作成した細胞増殖抑制因子のH鎖を免疫用として用いることもできる。該H鎖を遺伝子組み換え体によって作成するには、H鎖の遺伝子を含むDNAの全部もしくは一部を適当な制限酵素によって切り出し、リンカー配列と発現タンパク質判別用タグ配列を接続して適当なプロモーターの下流につないだ後、これを形質転換可能な宿主に導入する。ここで使用されるベクターDNAとしては、プラスミドベクター、シャトルベクター、ファージベクター、ウィルスベクターなどが挙げられ、宿主としては大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞が挙げられる。形質転換体は培養増幅後、プロモーターの性質に応じた発現誘導処理をして菌体もしくは培養上清より、発現したタンパク質をタグ配列を利用してアフィニティカラムクロマトグラフィーで回収、精製する。

以下に、本発明の実施例を示すが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0017】

1. 抗原 (免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質) の調製
1.5リットルの冷凍ヒト血清を4℃で解凍したら、3g T-70デキストラン (ファルマシア社製) で処理した洗浄済み活性炭 (シグマ社製) 20gを加えて、34℃、2時間攪拌する。これを遠心分離機にかけて沈殿した活性炭を取り除き、新たにデキストラン処理済活性炭10gを加えて、34℃、1時間攪拌する。これを遠心分離機にかけて沈殿した活性炭を取り除き上精を得た。

上精に重量パーセントで25%になるように硫酸アンモニウム結晶 (ICN社製、タンパク精製グレード) を加えて、氷上で30分攪拌する。これを遠心分離機にかけて沈殿を取り除き、上精にさらに硫酸アンモニウム結晶を加えて重量パーセントで40%になるようにした。これを遠心分離機にかけて沈殿を回収し、200mlの0.2M食塩を含む0.05Mピペラジン緩衝溶液 (pH5) を加えて溶かした。

【0018】

溶液のpHを6N塩酸で5.0に合わせたら、100mlのコルチゾールゲル (コルチゾールをカルボジイミドカップリング法で付加したファルマシア社製のアミノヘキシル基付きアガロースゲルで、あらかじめ0.2M食塩を含む0.05Mピペラジン緩衝溶液 (pH5) で洗っておく) を加えて、一晚4℃で攪拌する。次の日にゲルをガラス管に詰め (ベッドサイズは直径2.5cm、高さ18cmになる)、500mlの4M尿素と0.2M食塩を含む0.05Mピペラジン緩衝溶液 (pH5)、続いて10リットルの0.2M食塩を含む0.05Mピペラジン緩衝溶液 (pH5) で洗った。ゲルについたタンパク質は1リットルの0.5mg/mlのコルチゾールを加えた0.2M食塩を含む0.05Mピペラジン緩衝溶液 (pH5) で溶出した。プールした溶出液 (約900ml) は、アミコン社製のPM-10膜を使って限外ろ過により約2ml (タンパク量約5mgを含む) に濃縮し

た。

【0019】

得られたサンプルは生理食塩水に対して一昼夜透析してベッド体積0.3mlのプロテインA・アガロースゲルカラム(米国KPL社製)にアプライし、製品の取り扱い説明書に従って免疫グロブリン画分を精製する。溶出用緩衝液を用いてカラムから回収されたサンプルは生理食塩水に対して一昼夜透析し、タンパク質濃度と純度を検定した上で、1mg/mlになるように調整した。

この精製法で、1.5リットルの血清から約2.5mgの免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質の完全精製標品が得られた。

精製表品をSDSポリアクリルアミド電気泳動後、還元アルキル化後、トリプシンでゲル内消化を行い、得られたペプチド断片をESI-QUAD-TOFでMS/MS解析し、決定したシーケンスタグをもとにMASCOT(www.matrixscience.com)で検索した。その結果免疫グロブリンによく似たタンパク質であることが分かった。

【0020】

2. 免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質に対するモノクローナル抗体の作製

ステロイド結合性タンパク質のみを除いたヒト免疫グロブリンの画分を、以下のように調製した。新鮮な血液を一晩4℃で放置した後に遠心分離により血球を除いて上清を得、活性炭処理によりステロイド成分を除去してから、ヒドロコルチゾンを取り除いたアフィニティカラムを通過させた。得られた素通り画分をプールし、免疫グロブリン画分をプロテインA・アフィニティカラムを用いて精製した。

【0021】

実施例1に従って免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質完全精製品10mgを調整した。調整したタンパクの一部(4mg)は還元条件下のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にてH鎖とL鎖に分離し、H鎖を含むゲルをかみそりで切り出してから電氣的に溶出回収してプールした後、生理食塩水に一昼夜透析した。こうして免疫用H鎖1.5mgを得た。

上で調整した免疫用H鎖を抗原としてマウスに3回に分けて注射した。免疫された動物から脾臓を取り出し、得られる脾細胞と骨髄腫細胞(ミエローマ細胞)とをポリエチレングリコールを用いて融合させた。

【0022】

次に、得られたハイブリドーマ(融合細胞)にHAT培地による選択を行って、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得る。得られたハイブリドーマを希釈して多数の培養器に分散させ、各々の培養器中に生じる抗体と、上で調整したステロイド結合性タンパク質のみを除いたヒト免疫グロブリンの画分、及び免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質とをそれぞれ反応させ、ELISA(免疫蛍光測定法)試験の結果、前者と後者の吸光度の差が有意に高いハイブリドーマグループを選択し、多種類の融合細胞から目的のモノクローナル抗体を産生するクローンを得た。詳述すると、1次スクリーニングの結果、拡大培養した336グループのうち吸光度の差が有意に高い5グループを選び、それぞれを88グループに拡大培養した。

【0023】

2次スクリーニングの結果、それぞれからひとグループずつ吸光度の差が有意に高いクローンが得られた。それぞれを88グループに拡大培養した。3次スクリーニングの結果、3クローンのうち1クローン由来の拡大培養には細胞が見られなかったため、バックアップ用の予備培養細胞を再び拡大培養した(1G6-3E)。もうひとつのクローン由来の拡大培養には抗体産生能がなかった。最後のクローン由来の拡大培養からは吸光度の差が有意に高く、かつ細胞観察から1クローン/ウエルになっているクローンが2つ得られた(2H6-4E-4Aと2H6-4E-9C)。これら3クローンを拡大培養した。4次スクリーニングの結果、1G6-3Eクローンより吸光度の差が有意に高いクローン1G6-3E-10Dが得られた。細胞観察から1G6-3E-10Dはこの時点で単一クローンとなっていた。2H6-4E-4Aと2H6-4E-9Cについては2

10

20

30

40

50

回撒きなおしを行ったが、吸光度の差が有意に高いクローンは得られなかった。以上より、1G6-3E-10Dを樹立クローンとした。

【0024】

ELISA法により、1G6-3E-10Dハイブリドーマの培養上清の反応特異性を確認した。ステロイド結合性タンパク質のみを除いたヒト免疫グロブリンの画分と免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質完全精製品を4 µg/mlに希釈してELISA用96ウェルプレートに50 µlずつ入れ、室温で1時間静置してから、液を捨て、0.5%ゼラチンを加えたPBST (Tween20を添加した生理食塩水)を200 µl加えて室温で1時間静置した。ゼラチン溶液を捨て、1G6-3E-10Dクローンの培養上清の希釈系列(ゼラチン溶液で1~32768倍希釈)を50 µlずつ加えて室温で1時間静置した。ウェルをゼラチン溶液で3回洗い、同溶液で2500倍希釈したHRP結合抗マウスIgG()を50 µlずつ入れ、室温で1時間静置した。ウェルをゼラチン溶液で3回洗い、26mlの基質溶液100 µlを加えて室温で発色反応し(約10分)、100 µlの停止液を加えてから、プレートリーダーで490nmの吸光度を測定した。結果を図2に示す。1G6-3E-10Dクローンの培養上清に含まれるモノクローナル抗体が免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質完に有意に高い吸光度の差を示すことが確認された。

10

【0025】

3. 上記モノクローナル抗体の抗原特異性試験

免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質とアルブミンを含まないヒトの処理血清を次のようようにして調整した。新鮮な血液6mlを一晩4℃で放置した後に18,000rpm、1時間遠心分離により上清を血清として得た。得られた血清から34%、2時間と1時間の2回にわたる活性炭処理によりステロイドを除去してから、ステロイドをリガンドとしたアフィニティカラム(ベッドボリューム10ml)を通過させ、免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質を除去した。得られた素通り画分約10mlをプールし、17mlのバイオラッド社製ブルーゲルを加えてアルブミンを除去した。調整を終えた血清は生理食塩水で希釈してタンパク濃度を5mg/mlに調整した。

20

【0026】

こうして得られた処理済血清(タンパク量10 µg)をネガティブサンプル(抗原を含まない)とした。

ポジティブサンプル(抗原を含む)としては部分精製したエストロゲン結合性タンパク質(純度10%以下、夾雑物は主としてアルブミン)7 µgを用いた。ネガティブサンプル、及びポジティブサンプルの両方を還元条件下で変性させ、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。電気泳動後のゲルにpH11のトランスファー緩衝液に浸したブロッキング用メンブレンを密着させ、さらにこれと同じpH11のトランスファー緩衝液に浸したる紙で挟んで、ゲル側にマイナス、メンブレン側にプラスの電荷をかけてタンパク質をメンブレン上に移動、吸着させた。

30

【0027】

メンブレンを2枚作成し、一方は本発明のモノクローナル抗体(融合細胞株1G6-3E-10Dの培養上清を200倍希釈で用いた)と、もう一方は別途ウサギを用いて同じ抗原で免役することにより作成したポリクローナル抗体(2500倍希釈)と反応させた。次に前者に対しては、アルカリフォスファターゼ結合抗マウス免疫グロブリン(1000倍希釈)、後者に対しては、アルカリフォスファターゼ結合抗ウサギ免疫グロブリン(5000倍希釈)を反応させ、定法に従って発色反応を行った。

40

【0028】

結果を図2に示す。これによれば、ポリクローナル抗体を用いた実験では精製した調整済み血清、上記エストロゲン結合性タンパク質ともに濃いバンドが出ている。調製済み血清に比べて精製したエストロゲン結合性タンパク質のバンドの位置が低いのは、多量に含まれるアルブミンがバンドを下に押し下げているためである。これは細胞増殖抑制因子が免疫グロブリンと構造が良く似ており、ポリクローナル抗体は調整済み血清に含まれる様々な免疫グロブリンとも反応するからである。このようにポリクローナル抗体は精製した

50

細胞増殖抑制因子に含まれる免疫グロブリンと処理済血清に含まれる免疫グロブリンを区別できない。これに対してモノクローナル抗体は細胞増殖抑制因子のみにクロスしている。結論として本発明のモノクローナル抗体は、細胞増殖抑制因子のみを検出するという本発明の要求を満たしているとわかる。

【産業上の利用可能性】

【0029】

上記のように、本発明のモノクローナル抗体は、ヒトその他哺乳動物の血液にあるエストロゲン依存性の細胞増殖抑制因子、すなわち免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質を特異的に認識する。血液中では、このエストロゲン結合性タンパク質は混在する多種多様な免疫グロブリンと構造的に高い類似性を持つため、抗免疫グロブリンポリクローナル抗体で認識される。しかし、抗免疫グロブリンポリクローナル抗体では細胞増殖抑制因子と混在する免疫グロブリンを区別できない。これに対して本発明のモノクローナル抗体は両者を正確に区別する。このため、本発明のモノクローナル抗体を用いると、血液もしくは組織中の免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質を正確に検出、及び/又は定量できる。

10

【0030】

したがって本発明のモノクローナル抗体は疫学的調査に用いると、例えば血中の上記エストロゲン結合性タンパク質のレベルと乳がんなどのホルモンの発生率の相関を調べるのに用いることが出来る。さらに、細胞の微細構造に注目すれば、多種多様な免疫グロブリン存在下でもこのエストロゲン結合性タンパク質の作用サイトや作用に伴う細胞の表面もしくは内部の局在位置を決定することが可能である。細胞の微視的局在位置を決定すると、細胞増殖抑制因子の作用メカニズムに対する知見が得られる。さらに本発明のモノクローナル抗体は免疫沈降法と組み合わせることで、エストロゲン結合性タンパク質それ自身、該タンパク質が結合する分子、もしくは該タンパク質に結合する分子の単離にも利用できる。相互作用する分子を同定すれば、該タンパク質の作用メカニズムに対する知見が得られる。

20

【0031】

さらに、注目すべきは、上記エストロゲン結合性タンパク質は、ヒト血中に存在する唯一のエストロゲン依存性乳がん細胞増殖阻害因子として単離されたことである。乳がん細胞は血液が存在しないとエストロゲンに反応しないことが知られており、上記エストロゲン結合性タンパク質は、乳がんなどのホルモンの発生や増殖に関係していると考えられる。石油化学の発展とともに我が国あるいは欧米で乳がん患者は急速に増大しており、欧米では7人に1人の女性が乳がんを悩んでいる。しかしながら既知の細胞内エストロゲン受容体には乳がん発症や細胞の増殖促進作用がないとされており、乳がん発症と進展に対するエストロゲンの作用メカニズムは明らかにされていない。これに対して、本発明のモノクローナル抗体が認識する細胞増殖抑制因子にはエストロゲンの働きを仲介する能力があり (Anticancer Res. 20, 2779-84(2000))、それを認識するモノクローナル抗体は乳がんのリスク管理と治療に応用することができる。

30

【0032】

さらに乳がんは進行が進むと次第にエストロゲンに反応しなくなり、それと同時により悪性化することが知られている。悪性化した乳がん細胞にも細胞内に機能的に問題ないエストロゲン受容体が存在することが多く、細胞の形質変化にエストロゲン受容体に関係していないことが指摘されている。このような乳がん細胞の形質変化に対して上記エストロゲン結合性タンパク質が関与している可能性がある。この意味で、本発明の抗体は細胞の形質維持の研究に用いることができる。さらに、進行した乳がん患者の治療法開発にも本発明の抗体を用いることができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0033】

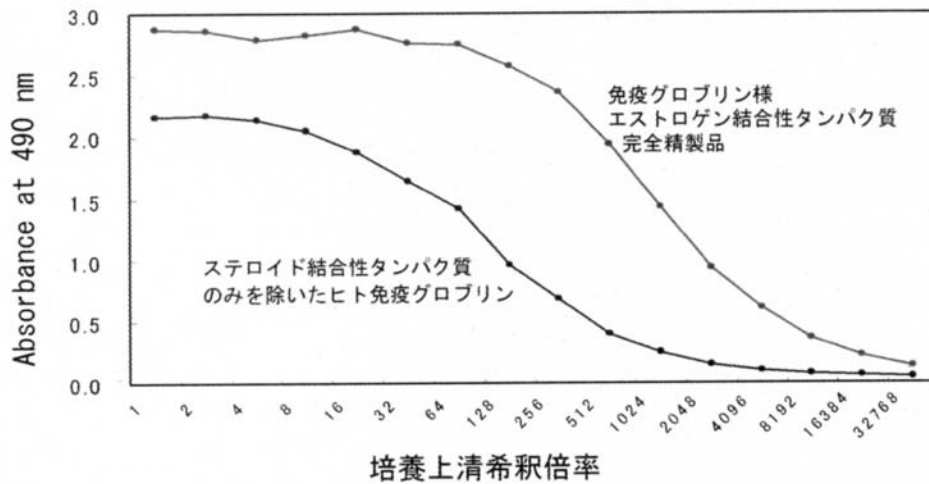
【図1】ELISA法により、免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質に対する、1G6-3E-10Dクローンの培養上清に含まれるモノクローナル抗体及び免疫グロブリンの反応特

50

異性を比較した結果を示すグラフである。

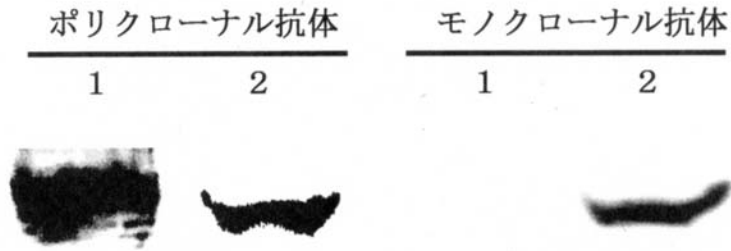
【図2】ウエスタンブロッティング法を使用して、免疫グロブリン様エストロゲン結合性タンパク質に対する、ポリクローナル抗体と本発明のモノクローナル抗体の特異性の比較した結果を表す電気泳動写真である。

【図1】



1G6-3E-10D の培養上清の検定

【図2】



1. 処理済血清
2. 増殖抑制因子部分精製品

免疫グロブリン(1)とそれに似た細胞増殖抑制因子(2)に対するポリクローナル抗体と本発明のモノクローナル抗体の反応性の比較。ウェスタンブロットティング法を用いた。

フロントページの続き

(56)参考文献 Anticancer Res., (2000), 20, [4], p.2785-2789

杉野幸夫編, 「バイオテクノロジーシリーズ モノクローナル抗体」, 初版, 株式会社講談社, (1986), p.1-16

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 2

C 0 7 K 1 6 / 1 8

C 1 2 N 5 / 1 0

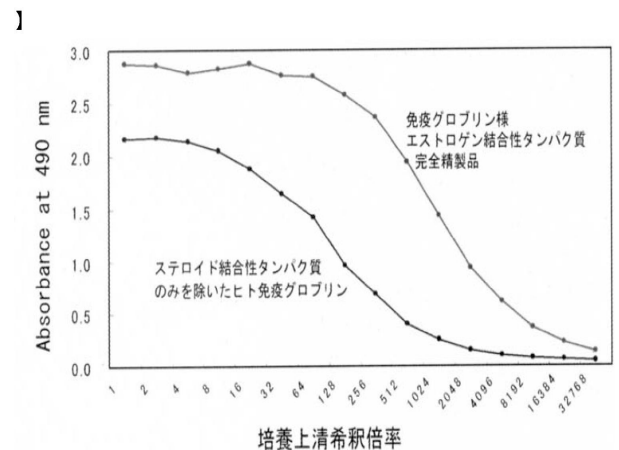
C 1 2 P 2 1 / 0 8

P u b M e d

专利名称(译)	抗雌激素结合蛋白的单克隆抗体。		
公开(公告)号	JP4378520B2	公开(公告)日	2009-12-09
申请号	JP2008147641	申请日	2008-06-05
申请(专利权)人(译)	先进工业科学和技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	先进工业科学和技术研究院		
[标]发明人	丹治雅夫 岡修一		
发明人	丹治 雅夫 岡 修一		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 G01N33/577 C12P21/08 C12N15/02		
FI分类号	C07K16/18 G01N33/53.D G01N33/577.B C12P21/08 C12N15/00.C		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/BA53 4B024/GA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA14 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA51 4H045/FA74 4H045/GA06 4H045/GA15 4H045/GA26		
其他公开文献	JP2008273987A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种特异性结合免疫球蛋白样雌激素结合蛋白的抗体，该蛋白与乳腺癌的发生和发展有关。解决方案：使动物对免疫球蛋白样雌激素结合蛋白免疫，将获得的抗体生成细胞与骨髓瘤细胞融合制备杂交瘤，然后通过考虑抗体的可结合性选择产生单克隆抗体的杂交瘤。以上述雌激素结合蛋白的免疫球蛋白为指标，从选择的杂交瘤中获得免疫球蛋白样雌激素结合蛋白的单克隆抗体。Z



1G6-3E-10Dの培養上清の検定