

(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2004-121212

(P2004-121212A)

(43) 公開日 平成16年4月22日(2004.4.22)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/02	G O 1 N 33/53 D	4 B O 6 5
C 1 2 P 21/08	G O 1 N 33/577 B	
G O 1 N 33/53	C 1 2 N 15/00 C	

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-39920 (P2003-39920)
 (22) 出願日 平成15年2月18日 (2003.2.18)
 (31) 優先権主張番号 特願2002-186975 (P2002-186975)
 (32) 優先日 平成14年6月26日 (2002.6.26)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

特許法第30条第1項適用申請有り

(71) 出願人 503360115
 独立行政法人 科学技術振興機構
 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (72) 発明者 平田 たつみ
 静岡県三島市谷田150遺伝研城の内宿舎
 4
 Fターム(参考) 4B024 AA11 BA43 BA63 CA04 DA02
 EA04 GA03 HA15
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
 4B065 AA90X AA90Y AA92X AB05 AC14
 BA02 BA08 BD40 CA24 CA25
 CA46

(54) 【発明の名称】 抗mGluR1モノクローナル抗体の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 mGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体やその製造方法、該モノクローナル抗体を含有するmGluR1の検出試薬、診断薬、治療薬を提供すること。

【解決手段】 モノクローナル抗体lot1の抗原物質を豊富に発現する領域からmRNAを調製して全長cDNAを合成し、これを哺乳類用発現ベクターに組み込んでライブラリーを作製し、このライブラリーをCOS細胞に導入し、タンパク質を強制発現させたCOS細胞を、モノクローナル抗体lot1を用いて免疫染色し、顕微鏡下で染色される細胞を検索し、上記の発現検索系を用いてcDNAクローンを検索し、モノクローナル抗体lot1で強く染色される細胞を生じるcDNAクローンを単離し、このクローンの塩基配列を決定し、代謝型グルタミン酸レセプター1(mGluR1)をコードしていることを明らかにする。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

嗅球で免疫した非ヒト動物の脾細胞と、前記非ヒト動物と異種のみエローム細胞とを融合することによって得られるハイブリドームを培養し、ハイブリドームの培養上澄液を前記非ヒト動物と異種の終脳の切片上で反応させる、免疫組織化学的方法によりスクリーニングすることを特徴とする mGluR1 の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 2】

mGluR1 の cDNA を哺乳類培養細胞に導入し、前記 mGluR1 を哺乳類培養細胞上に発現させ、かかる mGluR1 を発現した哺乳類培養細胞を、免疫組織化学的方法によりスクリーニングしたモノクローナル抗体で免疫染色することを特徴とする請求項 1 記載の mGluR1 の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法。

10

【請求項 3】

哺乳類培養細胞が、COS 細胞であることを特徴とする請求項 2 記載の mGluR1 の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 4】

嗅球で免疫したラットの脾細胞とマウスのみエローム細胞とを融合することを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか記載の mGluR1 の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 5】

モノクローナル抗体が、mGluR1 - a、mGluR1 - b、mGluR1 - c 及び mGluR1 - d の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の mGluR1 の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法。

20

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の製造方法により得られる mGluR1 の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の製造方法により得られる mGluR1 の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体を含有することを特徴とする mGluR1 の検出試薬。

30

【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の製造方法により得られる mGluR1 の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体を含有することを特徴とする mGluR1 の過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の製造方法により得られる mGluR1 の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体を含有することを特徴とする mGluR1 の過剰発現に起因する疾病の診断薬。

【請求項 10】

mGluR1 の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体産生能を有することを特徴とするハイブリドーム。

40

【請求項 11】

ハイブリドームが、Rat - Mouse hybridoma lot 1 (FERMBP - 8264) であることを特徴とする請求項 10 記載のハイブリドーム。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、mGluR1 (メタボトロピックグルタメート受容体 1) の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法や、かかるモノクローナル抗体を含有する mGluR1 の検出試薬等に関する。

50

【0002】

【従来の技術】

目的とするタンパク質に対する抗体を入手することは、その同定・機能解析において重要な位置を占めるが、動物に目的とする抗原を投与して免疫する従来の方法は、多種・多量の抗原と長い時間、多大な労力を要することから、近年、ファージ抗体ライブラリーを用いて抗体を作製する方法が確立されている。かかる方法は、繊維状ファージのコートタンパク質に抗体を融合させることにより、ファージの表面上に抗体を提示（ディスプレイ）するシステムを応用したもので、抗体遺伝子をPCRで増幅して多種類の抗体遺伝子を含むライブラリーを作製し、これをファージ上に提示させることによってファージディスプレイライブラリーとするものであって、このファージシステム（例えば、非特許文献1参照。）によるとヒトの抗体の抗原を同定することが可能となる。このファージ抗体ライブラリーを用いるスクリーニング方法は、ファージディスプレイ法と呼ばれ、従来から種々の細胞表面レセプターと特異的に結合するリガンドや種々の抗原を同定するために使用されている。ファージ抗体ライブラリーの作製方法やそれを用いたイムノチューブ法、マグネティックビーズ法等のスクリーニング法についても既に数多く報告されている（例えば、非特許文献2、3参照。）。

10

【0003】

その他、膜分子のクローニング方法として、例えばCOS7細胞とSV40の複製起点を含んだ発現ベクターによる一過性発現を利用して、動物細胞発現ベクターで作製されたcDNAライブラリーをCOS7細胞に導入し、細胞表面上にcDNAライブラリー由来の膜蛋白質を発現させ、目的とする膜分子を発現している細胞をその膜分子に対する抗体やリガンドを用いてパニングあるいはFACSで濃縮し、プラスミドDNAを回収して再びCOS7細胞にトランスフェクションし、濃縮操作を繰り返す方法や、発現ベクターcDNAライブラリーをいくつかの小さなプールに分け、COS7細胞に導入し、アイソトープで標識した抗体やリガンドを用いて膜分子の発現を検出し、陽性プールをさらに少数のプラスミドからなるプールに分けてトランスフェクションを繰り返しクローン化する方法が知られている（例えば、非特許文献4参照。）。

20

【0004】

また、ヒト細胞からポリアデニル化RNAを単離し、単離されたポリアデニル化RNAを用いて2本鎖cDNAを作り、この2本鎖cDNAをクローニングベクターに挿入して組換え発現ベクターを作製し、この組換え発現ベクターで宿主をトランスフォームして前記抗原を発現させ、リウマチ性関節炎患者の血清からの抗体を用いて、前記抗体が前記発現抗原に結合することを、抗ヒトIgM抗体-アルカリホフファターゼ複合体とアルカリホフファターゼ顕色基質とによって検出することによりトランスフォームされた宿主を選択する、リウマチ性関節炎関連抗体に対して反応性を有するリウマチ性関節炎の診断用抗原をコードする組換えDNAの作製方法も知られている（例えば、特許文献1参照。）。

30

【0005】

他方、神経軸索の成長等に関して以下の知見が知られていた。

神経系の発達過程において軸策は、迷うことなく特定の経路を正確に選んで伸長することが知られている（例えば、特許文献5、6参照。）。軸策が正しく進むためには、成長中の軸策と、その経路に存在する特殊化細胞（specialized cell）との一時的な相互作用が重要である（例えば、非特許文献7参照。）。例えば、嗅球の神経細胞の軸索は、終脳の特定領域を選択的に伸長し（例えば、非特許文献8、9参照。）、この軸索の道標となる神経細胞（道標細胞）を特異的に標識するマーカー抗体としてモノクローナル抗体（mAb）10t1が知られている（例えば、非特許文献10参照。）。道標細胞は、軸索の伸長に先だって、将来の軸索伸長経路に並び、軸索をこの経路へと誘導するが、モノクローナル抗体10t1がどのような抗原分子を認識しているのかは不明であった。この抗原分子は、少なくとも発生期の終脳においては道標細胞のみで発現されており、道標細胞特有の何らかの機能と関係する可能性が考えられている。

40

50

【0006】

また、グルタミン酸は、神経終末より放出され、シナプス後膜あるいは神経終末に存在するグルタミン酸受容体を介して神経細胞活性あるいは神経伝達物質の放出を調節するなど、高等動物の中樞神経系における主要な興奮性神経伝達物質であると考えられており、グルタミン酸受容体は、中枢における興奮性シナプス伝達に中心的役割を担っている。グルタミン酸受容体は、シグナル伝達機構等から、イオンチャンネルを内蔵して速いシナプス伝達を担うイオンチャンネル型グルタミン酸受容体と、Gタンパク質と共役することにより間接的にシグナルを伝える代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)とに大別され、遺伝子のクローニングによりmGluRには異なる8種類のサブタイプmGluR1~mGluR8が存在することも知られている。mGluR1~mGluR8はそれぞれ異なる脳内分布を示し、mGluR1及びmGluR5はGタンパク質を介してホスホリパーゼ、イノシトール3リン酸、カルシウムと情報を伝える受容体とされ、mGluR1は長い細胞該ドメインをもつ7回膜貫通タンパク質で、神経伝達物質グルタミン酸のレセプターとして機能すると考えられている(例えば、非特許文献11、12参照。)

10

【0007】

さらに、mGluRのアゴニストである(1S,3R)-1-アミノシクロペンタン-1,3-ジカルボン酸の投与により、てんかんが誘発されることが報告されている(例えば、特許文献13、14参照。)(1S,3R)-1-アミノシクロペンタン-1,3-ジカルボン酸や(RS)3,5-ジヒドロキシフェニルグリシン(以下3,5-DHPGという)はマウスやラット脳実質に微量投与、又は全身投与すると痙攣を伴って、神経細胞死を引き起こすことが報告されている(例えば、非特許文献14、15参照。)。また、mGluR1のアンタゴニストで、かつmGluR2のアゴニストである(S)-4-カルボキシ-3-ヒドロキシフェニルグリシンの種々のてんかんモデルでの有効性が報告されている(例えば、非特許文献16参照。)

20

【0008】

【特許文献1】

特表平10-513257号公報

【非特許文献1】

Proc. Acad. Sci. USA 80, 1194-1198, 1983

【非特許文献2】

Science, 249, 386-390 1990

30

【非特許文献3】

Methods in Enzymology, 217, 228-257 1993

【非特許文献4】

Proc. Acad. Sci. USA 84:3365-3369 1987

【非特許文献5】

Science 242, 694-699, 1988

【非特許文献6】

Neuron 10, 77-98, 1993, Science 274, 1123-1131, 1996

40

【非特許文献7】

Nature 385, 23-24, 1997

【非特許文献8】

Neurol. 223, 177-202, 1984

【非特許文献9】

J. Neurobiol. 29, 127-137, 1996

【非特許文献10】

J. Neurosci. 18, 7800-7810, 1998

【非特許文献11】

Nature 349, 760-765, 1991

50

【非特許文献12】

Science 252, 1318-1321, 1991

【非特許文献13】

Neurosci. Lett., 162, 12-16, 1993

【非特許文献14】

J. Neurosci., 13, 4445-4455, 1993

【非特許文献15】

Neuropharmacology, 34, 1063-3067, 1995

【非特許文献16】

J. Pharmacol. Exp. Ther., 276, 516-522, 1996 10

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、mGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体やその製造方法、該モノクローナル抗体を含有するmGluR1の検出試薬、診断薬、治療薬を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

モノクローナル抗体lot1の認識する抗原は、免疫染色のパターンから膜タンパク質であると予想されたが、ウエスタンブロットでも免疫沈降でも、この抗原分子を検出することはできなかった。このことは、モノクローナル抗体lot1の抗原決定部位が、膜からの抽出や可溶性にともなって破壊されたためであると考えられていた。このような性質の抗原決定部位をもつモノクローナル抗体の場合、その抗原分子を同定することは極めて困難である。免疫沈降により抗原タンパク質を精製することはもちろん不可能であるし、ファージライブラリーを用いた発現検索系でも抗原を同定できる可能性は極めて低い。そこで発想を変えて、タンパク質をなるべく本来の立体構造に近い形で発現することにより、抗原分子を検索しようと考えた。具体的には、モノクローナル抗体lot1の抗原物質を豊富に発現する領域からmRNAを調製して全長cDNAを合成し、これを哺乳類用発現ベクターに組み込んでライブラリーを作製した。このcDNAライブラリーを哺乳類培養株細胞(COS細胞)に導入し、コードするタンパク質を強制発現させた。この方法であれば、たとえそのcDNAに膜タンパク質がコードされていたとしても、その産物は通常どおり細胞膜に組み込まれていて本来の立体構造を取りうるはずである。このように考えて、cDNAライブラリーを導入したCOS細胞を、モノクローナル抗体lot1を用いて免疫染色し、顕微鏡下で染色される細胞を検索した。上記の発現検索系を用いてcDNAクローンを検索したところ、モノクローナル抗体lot1で強く染色される細胞を生じるcDNAクローンを単離し、このクローンの塩基配列を決定したところ、代謝型グルタミン酸レセプター1(mGluR1)をコードしていることが明らかになった。本発明は上記知見に基づいて完成するに至ったものである。 20 30

【0011】

すなわち本発明は、嗅球で免疫した非ヒト動物の脾細胞と、前記非ヒト動物と異種のみエローム細胞とを融合することによって得られるハイブリドームを培養し、ハイブリドームの培養上澄液を前記非ヒト動物と異種の終脳の切片上で反応させる、免疫組織化学的方法によりスクリーニングすることを特徴とするmGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法(請求項1)や、mGluR1のcDNAを哺乳類培養細胞に導入し、前記mGluR1を哺乳類培養細胞上に発現させ、かかるmGluR1を発現した哺乳類培養細胞を、免疫組織化学的方法によりスクリーニングしたモノクローナル抗体で免疫染色することを特徴とする請求項1記載のmGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法(請求項2)や、哺乳類培養細胞が、COS細胞であることを特徴とする請求項2記載のmGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法(請求項3)や、嗅球で免疫したラットの脾細胞とマウスのみエロー 40 50

マ細胞とを融合することを特徴とする請求項1～3のいずれか記載のmGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法(請求項4)や、モノクローナル抗体が、mGluR1-a、mGluR1-b、mGluR1-c及びmGluR1-dの細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載のmGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法(請求項5)や、請求項1～5のいずれか記載の製造方法により得られるmGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体(請求項6)に関する。

【0012】

また本発明は、請求項1～5のいずれか記載の製造方法により得られるmGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体を含有することを特徴とするmGluR1の検出試薬(請求項7)や、請求項1～5のいずれか記載の製造方法により得られるmGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体を含有することを特徴とするmGluR1の過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬(請求項8)や、請求項1～5のいずれか記載の製造方法により得られるmGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体を含有することを特徴とするmGluR1の過剰発現に起因する疾病の診断薬(請求項9)や、mGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体産生能を有することを特徴とするハイブリドーマ(請求項10)や、ハイブリドーマが、Rat-Mouse hybridoma lot1(FERM BP-8264)であることを特徴とする請求項10記載のハイブリドーマ(請求項11)に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明のmGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法としては、嗅球で免疫した非ヒト動物(例えばラット)の脾細胞と、前記非ヒト動物と異種(例えばマウス)のミエローマ細胞とを融合することによって得られるハイブリドーマを培養し、ハイブリドーマの培養上澄液を前記非ヒト動物と異種の終脳の切片上で反応させる、免疫組織化学的方法によりスクリーニングすることを特徴とする抗mGluR1モノクローナル抗体であれば特に制限されるものではないが、mGluR1のcDNAを哺乳類培養細胞に導入し、前記mGluR1を哺乳類培養細胞上に発現させ、かかるmGluR1を発現した哺乳類培養細胞を、免疫組織化学的方法によりスクリーニングしたモノクローナル抗体、すなわち、嗅球で免疫した非ヒト動物の脾細胞と、前記非ヒト動物と異種のミエローマ細胞とを融合することによって得られるハイブリドーマを培養し、ハイブリドーマの培養上澄液を前記非ヒト動物と異種の終脳の切片上で反応させる免疫組織化学的方法によりスクリーニングしたモノクローナル抗体で免疫染色することにより、mGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体を再現性よく製造することができる。また、本発明のハイブリドーマとしては、mGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体産生能を有するものであれば特に制限されないが、Rat-Mouse hybridoma lot1を具体的に例示することができる。このRat-Mouse hybridoma lot1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寄託番号FERM BP-8264として寄託されている。

【0014】

上記モノクローナル抗体での免疫染色方法としては、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、-ガラクトシダーゼ等で酵素標識されたモノクローナル抗体を、抗原抗体反応により細胞表面上に立体構造を形成した状態で発現している膜タンパク質に反応させた後、前記酵素の基質及び発色剤の添加によって色素を生成させ、呈色した色素を観察する酵素免疫染色方法や、FITC等で蛍光標識されたモノクローナル抗体を、抗原抗体反応により細胞表面上に立体構造を形成した状態で発現している膜タンパク質に反応させた後、蛍光顕微鏡で観察する蛍光免疫染色方法を挙げることができる。

【0015】

mGluR1のcDNAを哺乳類培養細胞に導入し、前記mGluR1を哺乳類培養細胞上に発現させるには、哺乳類培養細胞用発現ベクターを好適に用いることができる。かか

10

20

30

40

50

る哺乳類培養細胞用発現ベクターとしては、真核細胞中に蛋白質を効率的に発現可能とし、且つコンピテント細胞に形質転換することができるプラスミドベクターやトランスフェクションすることができるファージベクターであればどのようなものでもよく、発現ベクターの複製を可能とする複製オリジン、発現のためのプロモーター、スプライスシグナル、ポリA付加シグナル、薬剤選択マーカー、エンハンサー等を必要に応じて選択し、組み合わせることで構築することができる。発現ベクターの複製を可能とする複製オリジンとしては、SV40ウィルス、パピローマウィルス、EBウィルス等を挙げることででき、また発現のためのプロモーターとしては、 γ -アクリンプロモーター、チミジンキナーゼプロモーター、SV40プロモーター、アデノウィルス主要後期プロモーター、サイトメガロウィルスプロモーター等を挙げることでできる。さらに、スプライスシグナル、ポリA付加シグナル、クローン選択を効率化するための薬剤選択マーカー、細胞特異的に働くエンハンサーの他、導入遺伝子の発現を制御する転写制御遺伝子等を付加してもよい。具体的には、上記プラスミドベクターとしてpCAGGS (Gene; 108, 193-200, 1991)、pcDL-SR 296 (Molecular and Cellular Biology; 8, 466-472, 1988)、pEF-BOS (Nucleic Acid Research; 18, 5322, 1990)等を好適に例示することができるが、これらの中でも、サイトメガロウィルスのエンハンサー、チキン- γ アクリンプロモーター、ラビット-グロビン3'スプライスシグナル、ラビット-グロビン3'隣接領域、SV40複製オリジンを有し、哺乳動物細胞中で組込んだ遺伝子を高い効率で発現することができるpCAGGSが特に好ましい。

10

20

【0016】

また、上記哺乳類培養細胞としては、哺乳類培養細胞用発現ベクターにmGluR1のcDNAを組み込んだ、抗原タンパク質mGluR1をトランジェントに、あるいはステイブルに細胞表面上に立体構造を形成した状態で発現させることができる、哺乳類由来の培養細胞であれば特に制限されるものではなく、COS細胞、BHK21細胞、HeLa細胞、L細胞、NIH3T3細胞、neuro2a細胞等を例示することができるが、上記抗原タンパク質mGluR1を効率よくトランジェントに発現させうる点でCOS細胞が好ましい。

【0017】

本発明のmGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法により得られる抗mGluR1モノクローナル抗体としては、mGluR1-a、mGluR1-b、mGluR1-c及びmGluR1-dの細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体であるlot1を好適に例示することができる。そして、mGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法により得られる抗mGluR1モノクローナル抗体は、mGluR1の検出試薬として有利に用いることができる。

30

【0018】

本発明のmGluR1の過剰発現に起因する疾病の予防・治療薬としては、mGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法により得られるmGluR1の細胞外ドメインに結合する抗mGluR1モノクローナル抗体を含有する薬剤であれば特に制限されるものではなく、また、本発明のmGluR1の過剰発現に起因する疾病の診断薬としては、mGluR1の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体の製造方法により得られるmGluR1の細胞外ドメインに結合する抗mGluR1モノクローナル抗体を含有する試薬であれば特に制限されるものではない。上記mGluR1の過剰発現に起因する疾病としては、脳虚血、脊髄外傷、頭部外傷、アルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、低血糖性ニューロン損傷、視力障害と網膜症、パーキンソン病等の神経変性疾患、精神分裂病、てんかん、過敏性腸症候群等のストレス性疾患、脳梗塞、痙攣、偏頭痛、尿失禁、慢性疼痛、小脳疾患、神経細胞死、自己免疫疾患などが考えられる。

40

【0019】

また、本発明の上記予防・治療薬を医薬品として用いる場合は、薬学的に許容される通常

50

の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。これら予防・治療薬を用いる予防・治療方法においては、患者の性別・体重・症状に見合った適切な投与量の上記予防・治療薬を、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。

【0020】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。 10

実施例1 [モノクローナル抗体lot1が認識する抗原分子の同定]

実施例1A (実験材料と方法)

(動物等)

中部科学資材社(日本国、名古屋)からICR系統マウス及びWistar系ラットを購入した。膣栓が検出された日をE0.5とした。エーテル深麻酔下で雌親の胚をHBSS中で解離した。次に、全ての胚の発達段階をTheilerの定義に従って決定した(THE HOUSE MOUSE: ATLAS OF EMBRYONIC DEVELOPMENT, springer, 1989)。また、抗mGluR1抗体は、フナコシ社から購入したラビットポリmGluR1の他、生理学研究所の重本隆一博士から 20 供与を受けた抗mGluR1抗体を用いた。

【0021】

(モノクローナル抗体の作製)

E14.5のマウス胚から得た約30個の嗅球を、0.1mlのHBSS中に懸濁し、27ゲージ針を用いて粉碎し、ラットの左後足に注入した。3週間おきに4回、ラットを免疫した。追加抗原を用いて最終免疫を行なってから3日間経過後に、既知の方法(SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY, 351-372, Freeman, 1981, Dev Biol 122, 90-100, 1996)を用いて、左鼠径リンパ節及び左膝窩リンパ節をミエローム細胞と融合させた(P3X63Ag8U1)。ハイブリドーマ培養物の上清をE14.5マウス 30 終脳の切片上で免疫組織化学的方法を用いてスクリーニングした。先端が尖ったガラス製キャピラリーを用いて細胞を1個ずつ回収し、10%のウシ血清(JRH Bioscience, Lenexa, KS)及び10%のハイブリドーマ細胞・クローニング因子(Igen社製)を加えたDMEM(日水社製、東京、日本国)を加えた96ウェル培養プレート(Becton Dickinson社製)の各ウェルに移して、クローニングした。

【0022】

(免疫組織化学法)

マウス胚の脳を、4%パラホルムアルデヒド(PFA)を含むPBSに4下で一晩固定し、20%スクロースを含むPBSに一晩浸し、OCTコンパウンド(Tissue-Tek, Sakura Finetechnical社製)で凍結した。クリオスタットで 40 冠状切片を14µm厚さに切り分け、ポリ-L-リシンでコーティングしたガラススライド(Sigma社製)上に置いた。かかる切片を、10mMのTris-HCl(pH7.4)、130mMのNaCl、0.1%のTween20(TBST)共存下で10分間インキュベートしてOCT化合物を除去し、その後さらにハイブリドーマ培養物上清共存下で1時間培養した。結合抗体をCy3で標識した抗ラットIg抗体(1:500、Amersham社製)を用い、視覚化した。

ホールマウント免疫染色は、文献(J Neurobiol 29, 127-137, 1996)記載の手法に従って行った。簡潔に説明すると、終脳及び培養物を、4%PFAを含むPBSに4下で12時間固定し、5%スキムミルクを含むTBSTにおいて 50

1時間インキュベートして抗体の非特異的結合を阻害した。プロテインAカラム(Affigel Protein A MAPs kit、Bio-Rad社製)を通過させることにより親和精製したモノクローナル抗体lot1(10 μ g/ml)共存下において上記標本をインキュベートした。結合抗体をCy3又はCy2で標識した抗ラットIg抗体(1:500、Amersham社製)を用いて視覚化した。

【0023】

免疫染色処理には以下の抗体も用いた。ウサギ抗ニューロピリン-1抗体(2 μ g/ml)、マウス抗MAP2抗体(1:500、Sigma社製)、マウス抗リリーリンモノクローナル抗体CR-50(2 μ g/ml; Neuron 14, 899-912, 1995、J Neurosci 17, 23-31, 1997)、マウス抗ニューロフィラメントモノクローナル抗体2H3(1:100ハイブリドーマ上清、Developmental Studies Hybridoma Bank)、ウサギ抗カルレチニン抗体(1:100、Chemicon International社製)、ウサギ抗ネスチン抗体(1:500、大阪大学吉川博士から供与)。二次抗体として、FITC標識化抗マウスIg抗体(1:100、Amersham社製)又はFITC標識化抗ウサギIg抗体(1:100、Amersham社製)を使用した。

10

【0024】

(器官型培養)

既知の方法(J Neurobiol 29, 127-137)を用いて、器官型培養を行った。具体的には、E12.5マウスから得た終脳半球を切片に分け、軟膜を除去し、表面がコラーゲンで覆われている膜フィルター(Transwell-COL 3418、Costar社製)上に、心室側を下にして置いた。E13.5終脳から嗅球を分離し、E12.5終脳片のLOT部位と結合させて共培養を行った。10%のウシ血清を含むDMEM/Ham's F12メディアム(混合比1:1、日水社製)において、CO₂濃度5%の雰囲気下、37 $^{\circ}$ Cで2~3日間外植片を培養した。また、文献(Hirata and Fujisawa 1997)記載の方法で、嗅球を培養した(J Neurobiol 32, 415-425, 1997)。

20

【0025】

実施例1B(結果)

(モノクローナル抗体lot1の作製)

免疫処理したマウス3匹から得たリンパ球とマウスミエローマ細胞を融合させ、ハイブリドーマ細胞株を得た。E14.5マウス終脳の切片を免疫染色し、約2000個のハイブリドーマ細胞株を含有している培養上清をスクリーニングした。なお、LOT周辺にある細胞サブセットを特異的に染色するモノクローナル抗体lot1を単離した。他のハイブリドーマ細胞株では、同様の染色パターンはみられなかった。かかるモノクローナル抗体lot1を用いた免疫染色パターンを以下に示す。

30

【0026】

(道標細胞の起源)

嗅球の神経細胞の軸索は、終脳の特定領域を選択的に伸長する(図1A、J Comp Neurol 223, 177-202 1984、J Neurobiol 29, 127-137 1996)。この軸索の道標となるのが、モノクローナル抗体lot1が認識する神経細胞である(J Neurosci 18, 7800-7810, 1998)この道標細胞は、軸索の伸長に先立って、将来の軸索伸長経路に並び、軸索をこの経路へと誘導する。E12.5の終脳をモノクローナル抗体lot1でホルマウント免疫染色した結果、道標細胞のマーカーであるモノクローナル抗体lot1で赤く染色された道標細胞がつくる帯の上を嗅球の軸索が伸長していた(図1B)。そこで、道標細胞の起源を探索するため、道標細胞が分裂をしているE10.5の終脳新皮質から細胞を解離して、チミジン類似体のBrdU存在下で5日間培養し、モノクローナル抗体lot1で免疫染色したところ、モノクローナル抗体lot1で染色される細胞は、終脳新皮質と呼ばれる領域を培養したときに限って、分化してくることが示された(図2A

40

50

)。さらに、終脳新皮質領域の神経幹細胞を1つ1つ単離して、クローン増殖させても、その中から一定の確率で道標細胞が分化してくることがわかった(図2B)。したがって、道標細胞を生み出す能力は、終脳新皮質の幹細胞に自律的に備わっていると考えられた。新皮質と隣接する線状体原基の幹細胞を、同様にしてクローン培養しても、モノクローナル抗体10t1で染色される細胞は、決して現れてこなかった。

【0027】

(道標細胞の移動)

終脳新皮質は、将来道標細胞が並ぶ軸索経路に比較すると、はるかに背側に位置する、かなり広い領域であるが、この中ではどこの領域をとっても、道標細胞は同じように分化してくる(図2B)。もし実際の生体内でも、新皮質全体から道標細胞が発生してくるとすれば、これらの細胞は、将来の軸索経路に並ぶために、かなりの距離にわたって終脳半球を腹側方向に移動しなければならない。しかし、このような方向の細胞移動は、これまで報告されていなかった。そこで、この時期の終脳における実際の細胞移動の様子を、マウス胚全体を子宮外で培養する全胚培養法を用いて解析した。E10.5の胚の終脳新皮質の神経幹細胞を、蛍光色素で標識し、その胚を2日間全胚培養した。その結果、終脳新皮質で生まれた細胞が確かに腹側方向へと選択的に移動し、将来の軸索経路に並ぶことが確かめられた(図3A)。このようにして移動した細胞の少なくとも一部は、モノクローナル抗体10t1陽性の道標細胞へと分化することも示された(図3B、C)。以上の結果を総合すると、道標細胞は終脳新皮質全体で発生し、腹側方向に移動して、将来の軸索経路に並ぶという興味深い発生過程をたどると考えられる。

10

20

【0028】

(Xt突然変異マウスにおける道標細胞の分布異常)

道標細胞発生の分子機構の手がかりを得るために、終脳の発生に異常を示す様々な突然変異マウスを入手して、これらのマウス脳における道標細胞の動態を観察した。その結果、Extra-toes(Xt)と呼ばれる突然変異マウスにおいて、道標細胞が終脳新皮質全体に散在していることを見出した。すなわち、野生型マウス(+ / +)胚において、道標細胞は、終脳新皮質の広い領域から発生し、腹側方向に移動して、将来の軸索経路に配列するが、Xt突然変異マウス(Xt / Xt)においては、終脳の細胞が移動せず、道標細胞が新皮質全体に散在する(図4)。この突然変異マウスの終脳では、腹側方向に向かう細胞移動も観察されず、この細胞移動の異常が道標細胞の分布異常の直接の原因であると考えられた。なお、Xt突然変異の原因遺伝子は転写制御因子Gli3であることが明らかにされており(Development 116, 799-804, 1992、Nature Genet. 3, 241-245, 1993)、またこの変異により脳の背腹軸に乱れが生じるといわれている(Development, 125, 2315-2325, 1998、Development 126, 3561-3571, 1999)。

30

【0029】

(モノクローナル抗体10t1が認識する抗原分子の同定)

モノクローナル抗体10t1の抗原物質を豊富に発現する発生期の終脳領域からmRNAを調製して全長cDNAを合成し、これを図6に示される哺乳類用発現ベクターpCAGGSに組み込んでライブラリーを作製した。このcDNAライブラリーをCOS細胞に導入し、コードするタンパク質を強制発現させた。cDNAライブラリーを導入したCOS細胞を、モノクローナル抗体10t1を用いて免疫染色し、顕微鏡下で染色される細胞を検索し、約200,000のcDNAクローンを検索したところ、モノクローナル抗体10t1で強く染色される細胞を生じるcDNAクローン6-2E10を単離することができた。このクローンの塩基配列を決定したところ、代謝型グルタミン酸レセプター1(mGluR1)をコードしていることが明らかになった。cDNAクローン#6-2E10を導入し、mGluR1タンパク質を発現するCOS細胞をモノクローナル抗体10t1と2種類の抗mGluR1抗体で免疫染色した。モノクローナル抗体10t1(図5A)と重本博士供与の抗mGluR1抗体(図5B)では免疫染色が認められたが、市販の

40

50

抗mGluR1抗体では免疫染色が認められなかった。また、細胞内ドメインを欠失させたmGluR1変異タンパク質を発現するCOS細胞をモノクローナル抗体lot1と2種類の抗mGluR1抗体で免疫染色した。モノクローナル抗体lot1(図5C)と重本博士供与の抗mGluR1抗体(図5D)では免疫染色が認められたが、市販の抗mGluR1抗体では免疫染色が認められなかった。これらの結果から、モノクローナル抗体lot1はmGluR1の細胞外ドメインに結合することが示された。また、市販の抗mGluR1抗体は、mGluR1の細胞内ドメインの一部を認識すると考えられた。さらに、このmGluR1が本当にモノクローナル抗体の抗原分子であるのかを確かめるために、mGluRI遺伝子欠損マウス(Cell 79, 365-375, 1994, Nature 372, 237-243, 1994)を入手して、モノクローナル抗体lot1で免疫染色した。その結果、ホモ欠損マウス胚の脳において染色性が完全に欠失していることが示された。その結果、ホモ欠損マウス胚の脳において、染色性が完全に欠失していることが示された。

【0030】

【発明の効果】

本発明により製造される抗mGluR1モノクローナル抗体は、神経機能の研究に広く利用できるのみならず、mGluR1の細胞外ドメインを認識するため、このレセプターのレセプターとしての活性を阻害できる可能性が高く、様々な神経疾患に応用できる可能性があり、またmGluR1-a、mGluR1-b、mGluR1-c及びmGluR1-dの全ての型に結合する点で汎用性が高い。これに対して、現在市販されているmGluR1抗体は細胞内ドメインの一部を認識する抗体で、このレセプターの機能を阻害することはできない。また市販の抗体はmGluR1のなかでも特定のスプライシング型mGluR1-aだけを認識するため、その他の型のmGluR1を検出することはできない。

【図面の簡単な説明】

【図1】嗅球軸索と道標細胞の様子を示す図である。

(A)：胎生12日目頃のマウス終脳の外側図。左が吻側、上が背側を示す。嗅球の軸索(緑)は、道標細胞(赤)がつくる帯の上を伸長する。

(B)：胎生12.5日目の終脳。嗅球から最初に伸び出す軸索を、緑の色素で標識した(矢印)。道標細胞はモノクローナル抗体lot1で赤く染色されている。

スケールバーは100µmを表す。

【図2】培養下における道標細胞の発生の様子を示す図である。

(A)：道標細胞が分裂をしている胎生10.5日目の終脳新皮質から細胞を解離して、チミジン類似体のBrdU存在下で5日間培養した。モノクローナル抗体lot1で染色される道標細胞が分化している(赤)。そのうち半数以上の細胞は、BrdU(緑)を核に取り込んでおり、培養下で分裂したことがわかる(矢頭)。

(B)：培養下で道標細胞を生み出す終脳領域。数字は、その領域を培養したときにモノクローナル抗体lot1陽性の道標細胞が分化した確率(%)を示す。赤字が終脳新皮質領域、黒字が線状体原基領域。赤の斜線は予想される将来の嗅球軸索経路の位置を示す。

【図3】道標細胞が終脳新皮質から腹側方向に移動する様子を示す図である。

(A)：胎生10.5日目胚の終脳新皮質の神経幹細胞を、蛍光色素で標識し(星印)、その胚を2日間全胚培養した。色素標識された細胞が、腹側方向に移動し(矢印)、逆T字を描いて将来の軸索経路に配列している(矢頭)。

(B)：終脳新皮質から移動し、軸索領域に並んだ標識細胞(矢頭)。長い突起を将来の軸索経路の方向に伸長している。

(C)：(B)の標本をモノクローナル抗体lot1で免疫染色した写真。標識細胞は道標細胞と入り交じって、細胞の帯を形成している。

スケールバーは、(A)500µm、(B)(C)100µmを表す。

【図4】野生型およびXt突然変異マウスにおける道標細胞の誕生と移動の様子を示す図である。

10

20

30

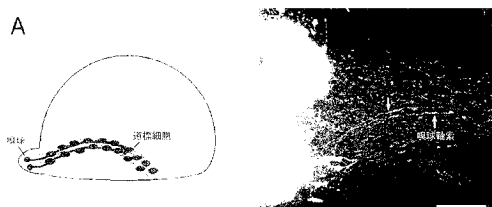
40

50

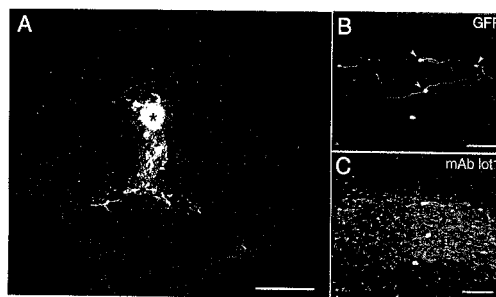
【図5】モノクローナル抗体lot1がmGluR1を認識する様子を示す図である。
 (A)(B) : cDNAクローン#6-2E10を導入したCOS細胞。モノクローナル抗体lot1(A)と抗mGluR1抗体(B)による二重免疫染色像。
 (C)(D) : 細胞内ドメインを欠失させたmGluR1変異タンパク質を発現するCOS細胞。モノクローナル抗体lot1(C)も抗mGluR1抗体(D)もよく似た染色を示す。

【図6】発現ベクターpCAGGSを示す図である。

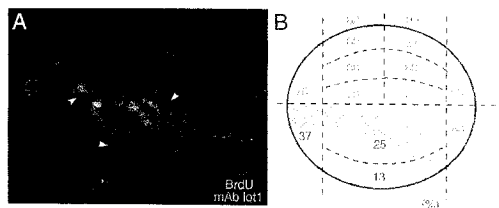
【図1】



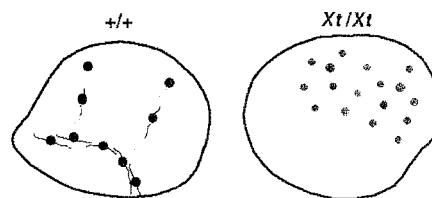
【図3】



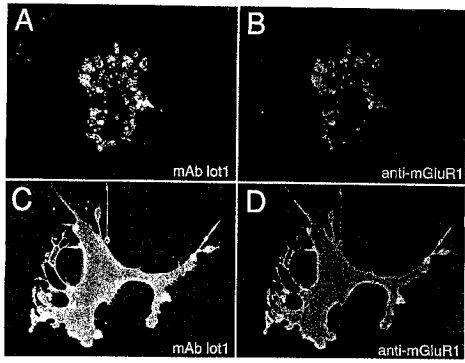
【図2】



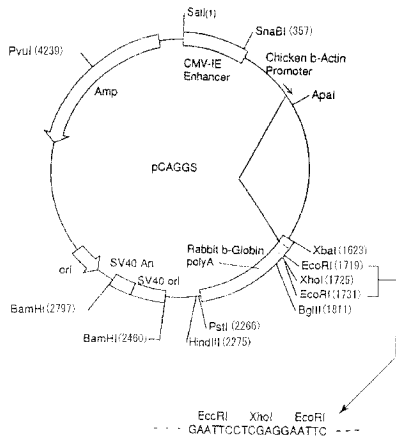
【図4】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/577

F I

C 1 2 N 5/00

B

テーマコード(参考)

专利名称(译)	产生抗mGluR1单克隆抗体的方法		
公开(公告)号	JP2004121212A	公开(公告)日	2004-04-22
申请号	JP2003039920	申请日	2003-02-18
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人 科学技术振兴机构		
[标]发明人	平田たつみ		
发明人	平田 たつみ		
IPC分类号	G01N33/53 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N15/00.C C12N5/00.B C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/BD40 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46		
优先权	2002186975 2002-06-26 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供与mGluR1的胞外域结合的单克隆抗体，其制备方法，含有该单克隆抗体的mGluR1的检测试剂，诊断剂和治疗剂。 解决方案：从单克隆抗体lot1富含抗原物质表达的区域制备mRNA，以合成全长cDNA，然后将其掺入哺乳动物表达载体中以制备文库，然后将其用于COS细胞。用单克隆抗体lot1对导入并强制表达该蛋白质的COS细胞进行免疫染色，以搜索在显微镜下染色的细胞，并使用上述表达搜索系统搜索cDNA克隆以检测单克隆抗体。我们分离了一个cDNA克隆，该克隆产生了用lot1强烈染色的细胞，确定了该克隆的核苷酸序列，并揭示了它编码代谢型谷氨酸受体1 (mGluR1)。

3]

