

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A )

(11)特許出願公開番号

**特開2002 - 125666**

( P2002 - 125666A )

(43)公開日 平成14年5月8日 (2002.5.8)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト* ( 参考 )
C 1 2 N 15/02		C 0 7 K 14/52	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/52		16/24	4 B 0 6 4
16/24		G 0 1 N 33/53	D 4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10		33/574	A 4 H 0 4 5
15/09	ZNA	33/577	B

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L ( 全 11数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 330325(P2000 - 330325)

(22)出願日 平成12年10月30日(2000.10.30)

(71)出願人 591125371

デンカ生研株式会社

東京都中央区日本橋茅場町三丁目4番2号

(72)発明者 三本 朝広

新潟県見附市今町7 - 10 - 2

(72)発明者 篠沢 隆雄

埼玉県熊谷市久下2038 - 3

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 ( 外 1 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 短縮型ミッドカイン ( t M K ) タンパク質特異的モノクローナル抗体及びその用途

(57)【要約】

【解決手段】 短縮型ミッドカイン ( tMK ) タンパク質に特異的なモノクローナル抗体又はその断片、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、該モノクローナル抗体を用いた短縮型ミッドカイン ( tMK ) タンパク質の検出方法及び腫瘍細胞の検出方法ならびに該モノクローナル抗体を含む短縮型ミッドカイン ( tMK ) タンパク質検出キット。

【効果】 本発明によれば、腫瘍細胞に発現している短縮型ミッドカイン ( tMK ) タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体が提供される。本発明のモノクローナル抗体は、腫瘍細胞に特異的に発現している tMK とのみ反応し、正常細胞にも発現しているミッドカイン ( MK ) とは反応しないので、当該抗体を生体試料と反応させ、免疫学的手法にて検出することにより、特別な機器を用いることなく腫瘍診断を簡便かつ高精度に行うことができ、また、tMKは他の腫瘍マーカーと比べて多種の腫瘍で発現していることから、特定の癌種に限定されることなくその検出を行える点で臨床上非常に有効である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 短縮型ミッドカイン (tMK) タンパク質と反応するが、ミッドカイン (MK) タンパク質とは反応しない、モノクローナル抗体又はその断片。

【請求項2】 短縮型ミッドカイン (tMK) タンパク質が、ミッドカイン (MK) タンパク質の完全長アミノ酸配列から第3エキソン部分にコードされるアミノ酸配列を除いたアミノ酸配列からなることを特徴とする、請求項1に記載のモノクローナル抗体又はその断片。

【請求項3】 短縮型ミッドカイン (tMK) タンパク質で免疫化したマウス脾細胞とマウス骨髄腫細胞とを融合させて得られ、請求項1に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項4】 請求項1に記載のモノクローナル抗体又はその断片を用いて腫瘍細胞に特異的に発現している短縮型ミッドカイン (tMK) タンパク質を検出することを特徴とする、短縮型ミッドカイン (tMK) タンパク質の検出方法。

【請求項5】 請求項1に記載のモノクローナル抗体又はその断片を用いて腫瘍細胞に特異的に発現している短縮型ミッドカイン (tMK) タンパク質を検出することを特徴とする、腫瘍細胞の検出方法。

【請求項6】 請求項1に記載のモノクローナル抗体又はその断片を含む、短縮型ミッドカイン (tMK) タンパク質を検出するためのキット。

【請求項7】 請求項1に記載のモノクローナル抗体又はその断片により特異的に認識される、短縮型ミッドカイン (tMK) タンパク質及びその相同体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、短縮型ミッドカイン (tMK) タンパク質に特異的なモノクローナル抗体又はその断片、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、該モノクローナル抗体を用いた短縮型ミッドカイン (tMK) タンパク質の検出方法及び腫瘍細胞の検出方法ならびに該モノクローナル抗体を含む短縮型ミッドカイン (tMK) タンパク質検出キットに関する。

## 【0002】

【従来の技術】ミッドカイン (Midkine:MK) は、胚性腫瘍細胞の分化時のレチノイン酸応答遺伝子産物として発見された成長因子である。MKは、ヘパリン結合能を持ち、神経成長・分化作用、造血管作用、内皮細胞におけるプラスミノゲン活性増強等の作用が報告されており、これらの作用を介して発癌過程に関与していると推察されている。またウィルムス (Wilms') 腫瘍や胃ガン、結腸ガン等では正常組織と比較して発現が増強されており、MK遺伝子を導入したマウス繊維芽細胞NIH3T3でMKを過剰発現させることによって、細胞がガン化することが報告されている [K.Kadomatsu et al., Br. J. Cancer, 75, 354-359 (1997)]。MKは塩基性アミノ酸に富み、分子量

13,000のタンパク質で [M.Tomomura et al., J. Biol. Chem., 265, 10765-10770 (1990)]、二つのドメイン (N-ドメイン; 1-61アミノ酸, C-ドメイン; 62-121アミノ酸) から成り [L. Fabri et al., J. Chromatogr., 213-225 (1993)]、活性部位はC-ドメインに偏在する [H. Muramatsu et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 203, 1131-1139 (1994)]。

【0003】一方、1996年、MKに対するプライマーを用いたPCR法によって、そのプライマーによって増幅されるMKmRNAよりも全長の短い、280bpのmRNAが腫瘍細胞において発現していることが発見された [I.Miyashiro et al., Cancer Letters, 106,287-291 (1996); T.Kaname et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 219, 256-260 (1996)]。この短縮型 MK (Truncated Midkine:tMK) mRNA (tMKmRNA) は、5個のエキソンから成るMK遺伝子から第3エキソンが欠損した変異体である。mRNAの配列から予測されるそのタンパク質構造は、MKにおけるN-ドメインを持たず、N-末端の一部とMKの主要活性部位のC-ドメインを保持したものと考えられている。しかしながら、tMK タンパク質としての存在は明らかではなく、その検出法も確立されていない。

【0004】これまでtMKmRNAの発現が確認されている腫瘍細胞には、ウィルムス腫瘍、膵臓癌・胃癌・肺癌・直腸上皮癌等があるが、対応する正常細胞では、tMKmRNAの発現をしていないことが明らかとなっている [K.Aridome et al., British Journal of Cancer, 78, 472-477 (1998)等]。また、tMK発現の有無によって胃腸癌でのリンパ節転移の診断マーカーになるとの報告がある [K.Aridome et al., Cancer Research Campaign, 78(4), 472-477 (1998)]。

【0005】腫瘍の確認・特性づけは診断及び治療の最も重要な項目である。現在行われている腫瘍診断の一般的な方法は、細胞又は組織片を顕微鏡下で観察することによって行われる。しかし、このような形態学的診断法である顕微鏡下での細胞診は幾つかの問題が存在する。たとえば、検査に必要な量の試料が採取できず、その量が不十分である場合は診断が非常に困難であり、また、試料採取自体が不可能である場合がある。これらの理由によって、腫瘍であるか無いかの判断ができない例が50%以上となり、明らかに癌であるという証拠や、癌であるといった確信が持てない場合が多い。また、かかる診断では、剥離細胞等が得られない場合は穿刺による試料採取を行わねばならず患者への負担が大きいこと、判定には熟練した技術を要し誰もがわかるといった一般性に欠けていること、多数の検体を迅速に判定することが困難であること等の問題も存在する。

【0006】一方、予後の判定も、顕微鏡下で検視された場合の細胞の外観に依存する。一般に、原発腫瘍細胞が異様であるほど、転移の可能性が高くなるが、その関

連性はわかっていない。何が最も効果的な処置であるかを判断するには、転移が起こる可能性があるか否かを正確に予知することが有効である。

【0007】近年、特異性の高いモノクローナル抗体の製造が可能になったことにより、腫瘍診断の領域は著しく進歩した。ここで検出のターゲットとなる腫瘍マーカーの選定が特に重要である。腫瘍マーカーとは、腫瘍細胞の産生物で、腫瘍細胞のみで産生する物質、正常細胞でも産生するがとりわけ腫瘍細胞での産生が増加している物質、あるいは、悪性増殖に対しての生体反応として正常細胞で形成される物質を意味する。既知の腫瘍マーカーの例として、フェトプロテイン(AFP)、ガン胎児性抗原(CEA)等が知られており、腫瘍患者の治療と進行のモニタリングに利用される。しかしながら、現実には腫瘍マーカーは、正常時においても検出されるケースがあったり、腫瘍組織がある程度の大きさにならないと検出されない等の問題があり、また、特定の腫瘍でしか判定できないという欠点もある。これに対し、前述のようにtMKは他の腫瘍マーカーとは異なって、多種類の腫瘍で発現し、正常細胞では発現しないことから、これを特異的に検出することが可能となれば、広範囲にわたる腫瘍診断の優れた指標になると考えられる。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、腫瘍マーカーとして有効な短縮型ミッドカイン(tMK)タンパク質に特異的なモノクローナル抗体、及び当該モノクローナル抗体を利用した腫瘍細胞の検出方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、短縮型ミッドカイン(tMK)タンパク質で免疫化したマウス脾細胞とマウス骨髄腫細胞とを融合し、得られたハイブリドーマから短縮型ミッドカイン(tMK)タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を得ることに成功し、本発明を完成するに至った。

【0010】すなわち、本発明は以下の(1)～(7)の発明である。

(1) 短縮型ミッドカイン(tMK)タンパク質とは反応するが、ミッドカイン(MK)タンパク質とは反応しない、モノクローナル抗体又はその断片。

(2) 短縮型ミッドカイン(tMK)タンパク質が、ミッドカイン(MK)タンパク質の完全長アミノ酸配列から第3エキソン部分にコードされるアミノ酸配列を除いたアミノ酸配列からなることを特徴とする、上記(1)のモノクローナル抗体又はその断片。

【0011】(3) 短縮型ミッドカイン(tMK)タンパク質で免疫化したマウス脾細胞とマウス骨髄腫細胞とを融合させて得られ、上記(1)のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

(4) 上記(1)のモノクローナル抗体又はその断片を用いて腫瘍細胞に特異的に発現している短縮型ミッドカイン(tMK)タンパク質を検出することを特徴とする、短縮型ミッドカイン(tMK)タンパク質の検出方法。

【0012】(5) 上記(1)のモノクローナル抗体又はその断片を用いて腫瘍細胞に特異的に発現している短縮型ミッドカイン(tMK)タンパク質を検出することを特徴とする、腫瘍細胞の検出方法。

(6) 上記(1)のモノクローナル抗体又はその断片を含むことを特徴とする、短縮型ミッドカイン(tMK)タンパク質を検出するためのキット。

(7) 上記(1)のモノクローナル抗体又はその断片により特異的に認識される、短縮型ミッドカイン(tMK)タンパク質及びその相同体。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0013】

【発明の実施の形態】1. 組換え短縮型ミッドカインタンパク質の産生

組換え短縮型ミッドカインタンパク質は、ヒトMK遺伝子から第3エキソン部分を欠損させた遺伝子断片を大腸菌で発現させ、精製することによって得ることができる。

【0014】本発明において、「ミッドカインタンパク質」とは、図1に示すような121個の完全長のアミノ酸配列からなるタンパク質をいい、「短縮型ミッドカインタンパク質」とは、前記完全長のアミノ酸配列から、MK遺伝子の第3エキソン部分にコードされるアミノ酸配列を除いた、65個のアミノ酸配列からなるタンパク質をいう。以下、「ミッドカインタンパク質」を「MK」と、「短縮型ミッドカインタンパク質」を「tMK」と表記する。

【0015】2. 本発明モノクローナル抗体の製造

本発明のtMKタンパク質特異的なモノクローナル抗体は、次の各工程を経て製造される。

(1) 動物の免疫及び抗体産生細胞の採取

1. 得られた組換えtMKタンパク質を抗原として、3～10週齢、好ましくは4週齢のマウスに投与する。免疫は、既存の方法であれば何れの方法をも用いることができるが、主として静脈内、皮下、腹腔内に適当なアジュバンド、例えば市販のフロイント完全アジュバンド、フロイントの不完全アジュバンド、BCG、水酸化アルミニウムゲル、百日咳菌ワクチン等とともに注入するのが好ましい。免疫の間隔は特に限定されないが、例えば1～2週間おきに、2～5回免疫すればよい。抗原の免疫量は例えば1回にマウス1匹当たり、10～500μg用いればよい。

【0016】最終の免疫日から3～10日後に、抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、胸腺細胞、末梢血細胞が挙げられるが、脾臓細胞を用いるのが一般的である。かかる抗体産生細胞は、マウスから脾臓、リンパ節、胸腺、末梢血等を摘出

又は採取し、これら組織を破碎する。得られる破砕物を PBS、DMEM、RPMI1640、E-RDF 等の培地又は緩衝液に懸濁し、200~250 μm のステンレスメッシュ等で濾過後、遠心分離を行うこと等により目的とする抗体産生細胞を調製する。

#### 【0017】(2) 細胞融合

上記の抗体産生細胞と融合させる骨髓腫(ミエローマ)細胞としては、マウスから得られた当業者が一般に入手可能な株化細胞を使用する。使用する細胞株としては、薬剤抵抗性を有し、未融合の状態では選択培地(例えば HAT 培地)で生存できず、抗体産生細胞として融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが好ましい。一般的に 8 - アザグアニン耐性株が用いられ、この細胞株は、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を欠損し(HGPRT-)、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン(HAT)培地に生育できない。骨髓腫細胞の具体例としては、Sp2/0-Ag14 [ATCC CRL-1581; Nature, 276, 271 (1978)], P3X63Ag8 [ATCC TIB-9; Nature, 256, 495-497(1978)], P3 X63 Ag8U. 1(P3U1) [ATCC CRL-1580; Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7(1978)], P3X63Ag8.653 [ATCC TIB-18; European J. Immunology, 6, 511-519 (1976)], P2/NSI/1-Ag4-1 [ATCC CRL-1581; Nature, 276, 269-270(1978)] 等のマウス骨髓腫細胞株等が挙げられる。

【0018】(1) で免疫した抗体産生細胞と上記で得られた骨髓腫細胞とを細胞融合させる。細胞融合は MEM、DMEM、RPMI-1640、E-RDF 等の動物細胞培養用培地中で  $10^7 \sim 10^8$  細胞/mL の骨髓腫細胞と抗体産生細胞とを、混合比 1 : 1 ~ 1 : 10 で、例えば約 1 : 5 の割合で、融合促進剤存在下、30~37 で 1~3 分間細胞同士を接触させることによって効率的に融合反応を進めることができる。細胞融合を促進させるためには、平均分子量 1,000~6,000 のポリエチレングリコール、ポリビニールアルコール、又はセンダイウイルス等の融合促進剤や融合ウイルスを使用することができる。また、電気刺激(例えばエレクトロポレーション)を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを融合させてもよい。

【0019】(3) ハイブリドーマの選択及びクローニング  
細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、選択培地における細胞の選択的増殖を利用する方法を用いることができる。細胞懸濁液を例えば HAT サプリメント(Gibco BRL)及びインターロイキン - 6 (1unit/mL) を添加したイスコフ培地(IMDM)に  $10^3 \sim 10^7$  細胞/mL となるよう希釈後、96 ウェルの細胞培養用マイクロプレートに  $10^2 \sim 10^6$  細胞/ウェルまき、各ウェルに選択培地、例えば HAT 培地等を加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。

【0020】骨髓腫細胞として 8 - アザグアニン耐性株、選択培地として HAT 培地を用いた場合は、未融合の骨髓腫細胞は培養約 7~10 日目には死滅し、正常細胞である抗体産生細胞もインビトロでは長く生存できず、培養約 7~10 日目には死滅する。その結果、培養 6~10 日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得ることができる。

【0021】増殖してきた細胞の培養上清につき、目的とする tMK 抗体の産生があるか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは通常の方法によれば良く、特に限定はされない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採集し、固相化した tMK 抗原に該上清を添加した後、標識した第二抗体を加えてインキュベートし、その結合能を酵素免疫測定法(EIA, ELISA)、放射線免疫測定法(RIA)によって測定することができる。

【0022】具体的には、まず、免疫源として使用した tMK 抗原を吸着させた 96 ウェルマイクロプレートにモノクローナル抗体を含む培養上清を添加して抗原と反応させる。次いで、結合した特異的抗体に酵素標識抗免疫グロブリン抗体を反応させ、各ウェルに酵素基質を加えて発色させる。免疫源として使用した tMK 抗原を固相化したウェルでのみ発色する培養上清を選別することにより、tMK 抗原に対して結合性を有する抗体を産生するハイブリドーマを検索することができる。ハイブリドーマのクローニングは、限界希釈法、軟寒天法、フィブリンゲル法、蛍光励起セルソーター法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得できる。

【0023】(4) モノクローナル抗体の採取  
取得したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法としては、通常の細胞培養法や腹水形成法等を用いる。細胞培養法においては、ハイブリドーマを 10~20% 仔ウシ血清含有 IMDM、RPMI-1640、MEM、E-RDF 又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件(例えば 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 濃度)で 2~14 日間培養し、その培養上清から抗体を取得することができる。

【0024】腹水形成法においては、骨髓腫細胞由来の哺乳動物と同種の動物の腹腔内にプリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン)等の鉱物油を投与し、その後ハイブリドーマ  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$  個、好ましくは  $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  個を腹腔内に投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1~4 週間、好適には 2~3 週間後に腹水又は血清を採集する。

【0025】上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、DEAE セルロース等の陰イオン交換体を利用するイオン交換クロマトグラフィー、プロテイン A セファロース等を用いるアフィニティークロマトグラフィー、分子量や構造によってふるい分ける分子ふるいクロマトグラフィー等の公知の方法を

適宜に選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することが可能である。かくして、本発明のtMK 特異的モノクローナル抗体を得ることができる。

【0026】3. 本発明のモノクローナル抗体によるtMKの検出

本発明におけるtMK 特異的モノクローナル抗体を用いたtMKの検出は、例えばイムノプロット法、酵素抗体法(EIA)、放射線免疫測定法(RIA)、蛍光抗体法、免疫細胞染色等より行うことが可能であるが、それらに限定されるものではない。試料としては、例えば、腫瘍が疑われる組織切片、血液、リンパ液、喀痰、肺洗浄液、尿、便、組織培養上清等があるが、これらに特に限定されるものではない。

【0027】また、上記tMK 特異的モノクローナル抗体は、その断片であってもよく、具体的には、当該抗体の一本鎖抗体断片(scFv)が挙げられる。具体的には、ELISA法による場合は、以下の通り行う。まず、希釈した血液等の試料を96ウェルマイクロプレートに吸着させた後、一次抗体として本発明のtMK 特異的モノクローナル抗体を反応させる。次いで、発色反応に必要なPOD(ペルオキシダーゼ)等の特異的酵素で標識した抗グロブリン抗体を反応させ、洗浄後、発色基質としてABTS(2,2'-アジノ-ジ-(3-エチル-ベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)等を添加して発色させ、比色法により測定することによって試料中のtMKを検出する。

【0028】あるいは、サンドイッチELISA法による場合は、以下の通り行う。まず、希釈した血液等の試料を、予め本発明のtMK 特異的モノクローナル抗体を吸着させた96ウェルマイクロプレートに添加して一定時間インキュベートする。その後、プレートを洗浄し、ビオチンで標識した精製抗体を各ウェルに添加して一定時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、酵素標識アビジンを添加してさらにインキュベートする。インキュベート後、プレートを洗浄し、発色基質としてオルトフェニレンジアミン等を添加して発色させ、比色法によって測定する。

【0029】4. 本発明のモノクローナル抗体を含むtMK検出用キット

本発明のtMK 検出用キットは、少なくとも本発明のtMK 特異的モノクローナル抗体を含むものであればよいが、固相に固定されるモノクローナル抗体、及び当該モノクローナル抗体とは抗原認識部位が異なり、二次抗体として用いられるモノクローナル抗体を含むものである。二次抗体として用いられるモノクローナル抗体は、例えば酵素等で標識されていてもよく、これら2つの抗体の他に、各種試薬(例えば、酵素基質、緩衝液、希釈液等)を含んでいてもよい。

【0030】以上のように、本発明のtMK 特異的モノクローナル抗体を用いて細胞や組織等の生体試料中のtMKを精度よく検出することができることから、当該モノク

ローナル抗体は、例えば、腫瘍診断やリスクグループのスクリーニング、癌転移の予知及び癌疾患のモニタリング等に利用することができる。また、当該抗体を投与することによって腫瘍形成を阻害したり、当該抗体に腫瘍成長阻害剤を付加することによって腫瘍細胞の選択的排除が行うことができ、腫瘍の治療・予防にも有効である。

【0031】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

〔実施例1〕(組み換えtMK タンパク質の調製)

tMKmRNA[T. Kaname et al., Biochemical and Biophysical Research Communications vol.219, pp.256-260 (1996)]の情報に基づき、ヒトMKの断片アミノ酸配列(60-121)のN-末端に4つの付加のアミノ酸(Met-Lys-Lys-Lys)を導入することによって、tMK 発現用プラスミドを構築した。まず、MK配列を含むプラスミドベクター(pUC118-MK vector)上で、センスプライマー; 5'-GCC CAT GGG GATGAA AAA GAA AGC CGA CTG-3' (配列番号1) (CCAT GGの部位はNcoI制限酵素部位)、アンチセンスプライマー; 5'-CCC AAG CTT AGT CCT TTC CCT TCC CTT TCT-3' (配列番号2) (AAG CTTの部位はHind III制限酵素部位)を用いたPCRを行うことによって、tMK タンパクをコードするDNA断片を調製した。PCRサイクルは、30サイクル行った(94、1分 55、1分 72、30秒)。PCR産物(217bp)の配列は、TA配列ベクター(Novagen, USA)を用いる自動DNA配列解析装置(DSQ-1000, Shimadzu, Japan)によって確認した。そのDNA配列を配列番号3に、またそれに対応するアミノ酸配列を配列番号4に示す。

【0032】tMK 遺伝子を含むプラスミドをNcoI及びHindIIIにて消化し、この制限酵素処理物をアガロース電気泳動にかけ、DNA断片をGene Clean Kit (Bio 101 Inc., USA)によって精製した。精製したDNA断片をT4 DNA リガーゼを用いて発現ベクターpET-25b(+ )内のT7プロモーターの下流に存在するpeIBリーダー配列にライゲーション(Ligation Kit, Takara, Japan)、pET-25b(+)-tMKプラスミドを作成した。このpET-25b(+)-tMKプラスミドをE.coli BL21に形質転換し、陽性クローンをアンピシリン(100 µg/mL)を含むLB寒天平板上で得た。

【0033】pET-25b(+)-tMKプラスミドを含むE.coli BL21を、アンピシリン(100 µg/mL)と0.1mM IPTG(Isopropyl-1-thio-D-galactopyranoside)を含む2 × YT培地中で培養し、遠心分離によって集菌し、ソニケーションによって菌を破砕した。遠心分離によって得られた沈殿に可溶性緩衝液[20mM Tris-HCl (pH7.6), 8.0M urea, 10mM DTT, 0.1mM PMSF(Phenylmethanesulfonyl fluoride)]を加え、室温で6時間置き、遠心上清を得た。これを緩衝液[20mM Tris-HCl (pH8.5), 0.1M NaCl, 0.1mM PM

SF, 1.0mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0mM MgCl<sub>2</sub>]中で透析を行った。更に遠心し、上清を緩衝液A (50mM sodium phosphate buffer, pH6.8, 0.1mM PMSF) で透析した。これをHi-Trap Heparin column(volume 5mL; Pharmacia Biotech, Uppsala)にかけ、1.5M NaClを含む緩衝液Aで溶出した。このようにして得られた組換えtMKタンパク質の純度はCBB染色によるSDS-PAGEと、抗MK抗体 [S.Kato et al., J.Neuropath. and Exp. Neurology, 58, 430-441 (1999)]を用いたウェスタンブロッティングによってtMKであることを確認した。

【0034】〔実施例2〕(抗tMK特異的抗体の調製)

(1) 抗tMK特異的抗体産生細胞の作製

実施例1で調製した組換えtMKタンパク質を抗原として用いて7週齢BALB/C系雌マウスに2週間おきに合計3回免疫した。初回免疫、追加免疫にはそれぞれFCA(フロイント完全アジュバンド)、FICA(フロイント不完全アジュバンド)を等量混合し、乳状化したものを皮下接種した。最終免疫には、同量の抗原を尾静脈より接種した。最終免疫3日後、脾細胞とマウスミエロマ細胞P3X63-AG8.653を5:1の比率でPEGを用いて融合し、HAT選択培地中で培養しハイブリドーマのみを選択培養した。得られたハイブリドーマを限界希釈法によって0.5 cell/ウェルで、96ウェルプレートに播き、ウェル中に単一コロニーとして発育したハイブリドーマのみクローニングを行った。クローン化されたハイブリドーマの培養\*

10  
20

\*上清を下記の抗tMK特異的抗体の検出法を用いて試験し、抗tMK特異的抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。

【0035】(2) 抗tMK特異的抗体の検出

96ウェルプレートに実施例1で調製したtMKタンパク質溶液(抗原溶液)100ng/ウェルとなるよう分注し、一晚4又は室温で2時間、静置して固相化した。対照として他のウェルにMKタンパク質溶液を同様に固相化した。抗原溶液の除去後、1%BSA/PBS溶液を用いてブロッキングを行い、抗tMK特異的抗体の検出用及び対照プレートとした。該プレートの各ウェルに上記(1)で作製したハイブリドーマ培養上清液を滴下し、室温で、60分間インキュベートした。インキュベート後、ハイブリドーマ培養上清液を廃棄し、PBSを用いてウェル内の残留ハイブリドーマ培養上清液を洗浄し、続いて二次抗体としてPOD標識抗マウスIgG抗体液(和光純薬社製 1:200希釈液)を50uL/ウェルずつ滴下し、室温で60分間インキュベートした。インキュベート後、POD標識抗マウスIgG抗体液を廃棄し、PBSを用いてウェル内の洗浄を行った。洗浄後、POD用基質液としてABTS(2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)溶液(市販品)を100uL/ウェルずつ滴下し、室温で10~20分間インキュベートし、マイクロプレートリーダーを用いて415nmの吸光度を測定した。結果を表1に示す。

【0036】

【表1】

クローン	抗 tMK 活性	抗 MK 活性 (対照)
MiStMK-V1	0.906	0.187
MiStMK-V3	1.406	0.186
MiS-N	1.660	1.696
MiS-0	1.683	1.48
MiS-D	1.866	0.794

【0037】tMKタンパク質を固相化したウェルで0.3以上の吸光度を示し、MKタンパク質を固相化したウェル(対照)で0.3以下の吸光度を示すハイブリドーマ培養上清液を陽性としたところ、2クローンが陽性であった。そのうち、クローン番号MiStMK-V3ハイブリドーマが産生する抗tMK特異的抗体を抗tMK-MiStMK-V3抗体と命名した。なお、抗tMK-MiStMK-V3抗体を産生するハイブリドーマ株MiStMK-V3は、平成12年10月3日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P-18069として寄託されている。

【0038】〔実施例3〕(腫瘍細胞中のtMKのウェスタンブロッティングによる検出)

(1) G401細胞上清の調製

40  
50

ウィルムス腫瘍由来G401細胞をMcCoy's5A培地に10% FBSを添加した培地を用いて90mmシャーレ上でコンフルエントまで培養し、その培養上清をHeparin-Sepharose columnで精製したものをを用いた。

【0039】(2) G401細胞培養上清からのtMK検出(ELISA)

上記(1)の培養上清を抗原として、ELISA用96ウェルプレートに固相化した。プレートのウェルに一次抗体として抗tMK-MiStMK-V3抗体を、対照として抗MK抗体を分注してインキュベートし、洗浄後、二次抗体としてPOD標識抗マウスIgG、POD標識抗ラットIgGを分注してインキュベートした。洗浄後、発色基質としてABTSを用い、415nmの吸光度を測定した。結果を表2に示す。表2より

明らかのように、G401細胞培養上清中にtMKの存在を確認できた。

【0040】

【表2】

精製 tMK 濃度 (ng/ウェル)	0	10	20	50	100	200
抗 tMK 抗体	0.05	0.16	0.23	0.58	0.98	1.56
抗 MK 抗体	0.04	0.05	0.05	0.06	0.06	0.08

【0041】(3) G401細胞培養上清からのtMK 検出 (ウェスタンブロッティング)

上記(1) 培養上清をSchaggerらの方法に準じてTricin SDS-PAGEを行い、泳動後Towbinらの方法に準じてPVDF膜に転写した。この時対照として、実施例1で作成したtMKタンパク質についても同様の処理を行った。

【0042】転写後のPVDF膜を1%スキムミルクPBSでブロッキングし、抗tMK-MiStMK-V3抗体を一次抗体としてインキュベートし、洗浄後POD標識抗マウスIgGを二次抗体としてインキュベートした。洗浄後、4クロロナフトールを発色基質としてPVDF膜をインキュベートし検出されるバンドの観察を行った。図2に示すように、G401細胞培養上清を泳動したレーン及びtMK抗原を泳動したレーンの分子量約8,000 の位置に各々単一のバンドが認められた。

【0043】〔実施例4〕(免疫細胞染色による腫瘍細胞中のtMKの観察)

(1) 固定サンプルの調製

カバーガラス上にG401細胞を培養し、PLP液(periodate-lysine-paraformaldehyde)にて固定した。

【0044】(2) 免疫細胞染色

上記(1) で作製したカバーガラスに3%ヤギ正常血清を50  $\mu$ L/glassで滴下して30分室温で静置後、抗tMK-MiStMK-V3抗体を50  $\mu$ L/glass滴下し、1時間室温で静置した。0.1%BSA/PBS溶液中で十分に洗浄後、ビオチン付加抗マウスIgGを50  $\mu$ L/glass滴下し、室温で30分間静置した。0.1%BSA/PBS溶液中にて洗浄後、1mL MeOH+8.6  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液を50  $\mu$ L/glassで滴下し、先ほどと同様に洗浄を行い、ABCkit添付のA、B液を50  $\mu$ L/glassずつ滴下し、室温で30分間静置した。PBS(-)にて、十分に洗浄後、DABを基質として100  $\mu$ L/glass滴下し、発色を行った。十分な発色が確認できたら大量のDW中にて洗浄を行い、50~100 %EtOH、EtOH/Xylen (1:1)溶液、100%Xyleneによって段階的に脱水を行い、カナダパルサムによってスライドガラス上に封入した。その結果、図3に示すように、細胞質中に強く染色された部位がみられ、G401細胞質中にtMKが発現されていることが示唆された。

【0045】(3) ヒト組織切片の染色

人腎腫瘍(Wilms' tumor)の組織切片を10% phosphate buffered formalin(pH7.6)で固定し、上記(2)と同様にして染色した。対照としてヘマトキシリン・エオジン染色を行った。その結果、図4に示すように管状に分化した

腫瘍細胞の細胞質(長矢印部分)及び芽体細胞(腫瘍細胞)(短矢印部分)の細胞質は強く発色し、正常細胞は染色されなかった。

【0046】〔実施例5〕(抗体断片の調製及びそれを用いたtMKの検出)

(1) 遺伝子組換えによる抗tMK抗体断片(抗tMK-scFV断片)の作製

前記の抗tMK-MiStMK-V3抗体を産生するハイブリドーマ株MiStMK-V3より市販のキットを用いてmRNAを分離し、cDNAライブラリーを作製した。次に、VH: 5'-CGG AAT TCG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GG-3' (5'末端; 配列番号5)、5'-CGGCTC GAG TGA GGA GAC GGT GAC TGA GG-3' (3'末端; 配列番号6)、VL: 5'-GCG GAT CCT GAT GTT TTG ATG ACC CAA-3' (5'末端; 配列番号7)、5'-CCC AAG CTT TTC CAA TTT GGT GCC CGC TCC G-3' (3'末端; 配列番号8)プライマーを用いてPCRを行い、VH、VL領域を複製し、間にliner:(GGC GGC GGT GGC TCG)3をVL-liner-VHとなるように結合させ、発現ベクターpET-22b(+)に組み込んだ。このベクターをE. coli BL21に形質転換し、0.1mM IPTGを含む2  $\times$ YT培地で培養することで、抗tMK-scFV断片の発現を誘導し、ニッケルキレートカラムを用いて精製した。

【0047】(2) ELISAによる組換えtMKとの反応

ELISAプレートにtMK(200ng/100  $\mu$ L)を固定化し、ブロッキングした後に、抗tMK-scFV断片を一次抗体として0、0.25、0.5、2、5  $\mu$ g/wellの濃度で加え室温で2時間でインキュベートした。反応後、プレートを洗浄し、二次抗体として抗His-Tag(マウスIgG)を加え室温で1.5時間インキュベートし、洗浄後、三次抗体POD標識抗マウスIgG抗体を加えて室温で1時間インキュベートした。反応後、プレートを洗浄し、酵素基質としてABTSを加えて室温で15分間インキュベートし、415nmの吸光度を測定した。図5に示すように、添加する抗tMK-scFV断片濃度の上昇とともに吸光度の上昇が見られ、抗tMK-scFV断片がtMKと結合することが確認された。

【0048】(3) MKタンパク質又はその部分タンパク質との反応

ELISAプレートに全長MK(fMK)、MKc-half(MKのアミノ酸配列62-121)又は組換えtMKを0、31.25、62.5、125、250、500  $\mu$ g/wellの濃度で固定化し、一次抗体に抗tMK-scFV断片を、二次抗体、三次抗体は前記抗体を加えて同様にELISAを行った。その結果、図6に示すよう

に、tMK との反応が最も高く、全長MKではわずかに反応し、MKc-halfでは見られなかった。これより、抗tMK-scFV断片は、tMK が持つ特異的配列を認識するタンパク質であることが示唆された。

【0049】(4) 抗tMK-MiStMK-V3 抗体と抗tMK-scFV断片の拮抗反応

ELISAプレートに組換えtMK (200ng/μL) を固定化し、1 μg/wellの抗tMK-MiStMK-V3抗体と図7に示した濃度の抗tMK-scFV断片をそれぞれ添加し、室温で2時間インキュベートした。反応後、プレートを洗浄し、二次抗体としてPOD標識抗マウスIgG抗体を加えて室温で1時間インキュベートした。反応後、プレートを洗浄し、酵素基質としてABTSを加えて室温で15分間インキュベートし、415nmの吸光度を測定した。図7に示すように、抗tMK-scFV断片の添加量とともに吸光度の減少が認められた。抗tMK-scFV断片はPOD 標識抗マウスIgG 抗体と反応せず、吸光度はプレートに結合した抗tMK-MiStMK-V3 抗体量を反映しているため、tMKに対して抗tMK-MiStMK-V3 \*

\*抗体と抗tMK-scFV断片は拮抗的に結合する、即ちtMKの同一部分に結合することが示唆された。

【0050】

【発明の効果】本発明によれば、腫瘍細胞に発現している短縮型ミッドカイン (tMK)タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体が提供される。本発明のモノクローナル抗体は、腫瘍細胞に特異的に発現しているtMKとのみ反応し、正常細胞にも発現しているミッドカイン(MK)とは反応しないので、当該抗体を生体試料と反応させ、免疫学的手法にて検出することにより、特別な機器を用いることなく腫瘍診断を簡便かつ高精度に行うことができ、また、tMKは他の腫瘍マーカーと比べて多種の腫瘍で発現していることから、特定の癌種に限定されることなくその検出を行える点で臨床上非常に有効である。

【0051】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DENKA SENIKEN CO., LTD.  
 <120> Monoclonal antibody specific for truncated Midkine and its use  
 <130> P00-0680  
 <160> 8  
 <170> Patent in Ver. 2.0  
 <210> 1  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 1  
 gcccatgggg atgaaaaaga aagccgactg  
 30  
 <210> 2  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 2  
 cccaagctta gtcctttccc ttccctttct  
 30  
 <210> 3  
 <211> 198  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <221> CDS  
 <222> 1..66  
 <400> 3  
 ATG AAA AAG AAA GCC GAC TGC AAG TAC AAG  
 TTT GAG AAC TGG GGT GCG 48  
 Met Lys Lys Lys Ala Asp Cys Lys Tyr Lys  
 Phe Glu Asn Trp Gly ALa  
 5 10  
 TGT CAT GGG GGC ACA GGC ACC AAA GTC CGC

GCG CGC TAC AAT GCT CAG TGC CAG GAG TCC  
 ATC CGC GTC ACC AAG CCC 144  
 Ala Arg Tyr Asn Ala Gln Cys Gln Glu Thr  
 Ile Arg Val Thr Lys Pro  
 35 40 45  
 TGC ACC CCC AAG ACC AAA GCA AAG GCC AAA  
 GCC AAG AAA GGG AAG GGA 192  
 Cys Thr Pro Lys Thr Lys Ala Lys Ala Lys  
 Ala Lys Lys Gly Lys Gly  
 50 55 60  
 AAG GAC  
 198  
 Lys Asp  
 <210> 4  
 <211> 66  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<400> 4  
 Met Lys Lys Lys Ala Asp Cys Lys Tyr Lys  
 Phe Glu Asn Trp Gly Ala  
 5 10 15  
 Cys Asp Gly Gly Thr Gly Thr Lys Val Arg  
 Gln Gly Thr Leu Lys Lys  
 20 25 30  
 Ala Arg Tyr Asn Ala Gln Cys Gln Glu Thr  
 Ile Arg Val Thr Lys Pro  
 35 40 45  
 Cys Thr Pro Lys Thr Lys Ala Lys Ala Lys  
 Ala Lys Lys Gly Lys Gly  
 50 55 60  
 Lys Asp  
 <210> 5  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 5  
 cggaattcgg tgcagctgca gcagtctgg  
 29

<210> 6  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <400> 6  
 cggctcgagt gaggagacgg tgactgagg  
 29

<210> 7 15 16

【図面の簡単な説明】211> 27

【図1】ヒトミッドカインのDNAパク質のアミノ酸配列、  
 組換え短縮型ミッドカインのDNAパク質のアミノ酸配列を

<400> 7  
 gcggatcctg atgtttgat gacccaa

示す。

【図2】G401細胞培養上清中のtMK のウェスタンブロットによる検出を示す。

レーン1：精製組換えtMK(2.5 μg/レーン)  
 レーン2：G401細胞培養上清中の部分精製タンパク質  
 (8 μg/レーン)  
 標準タンパク質の相対分子量(kDa)を左に示す。

【図3】抗tMK-MiStMK-V3抗体を用いたG401細胞の免疫細胞染色を示す。

【図4】抗tMK-MiStMK-V3抗体を用いたヒトWilms'腫瘍組織切片の免疫組織染色を示す。

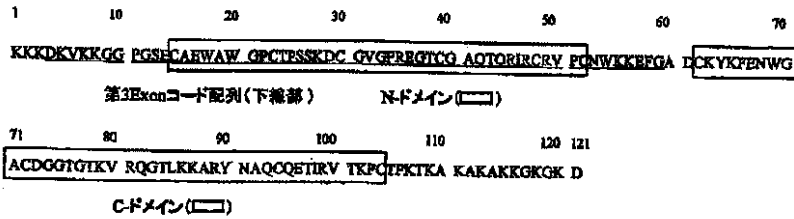
\*【図5】抗MK-scFv断片の、tMKへの結合をELISAにより測定した結果を示す。

【図6】抗tMK-scFv断片の、全長MK(fMK)、MK c-half (MKのアミノ酸配列62-121)、組換えtMKへの結合をELISAにより測定した結果を示す。

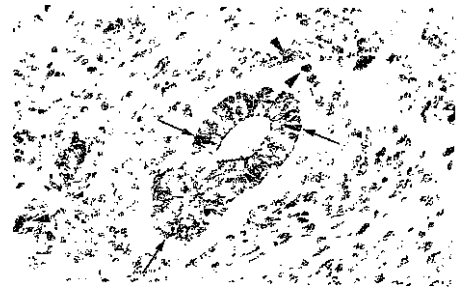
【図7】抗tMK-scFv断片による抗tMK-MiStMK-V3抗体のMKへの結合阻害を示す。

【図1】

ヒトミッドカインタンパク質のアミノ酸配列



【図4】

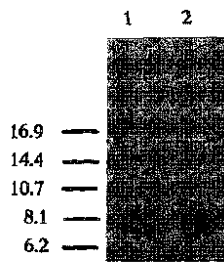


組換え短縮型ミッドカインタンパク質のアミノ酸配列



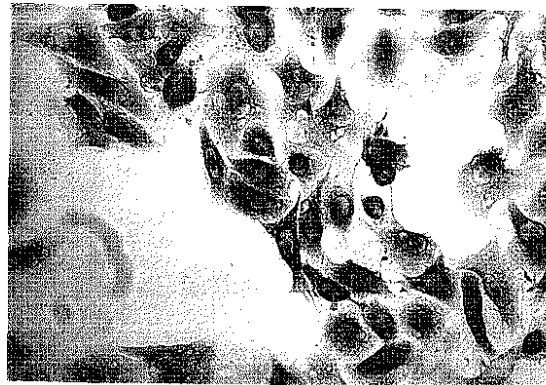
ヒト組織切片の染色

【図2】



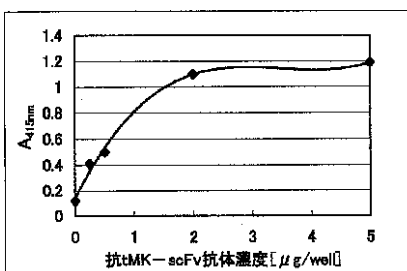
G401細胞培養上清中のtMKのウェスタンブロット

【図3】

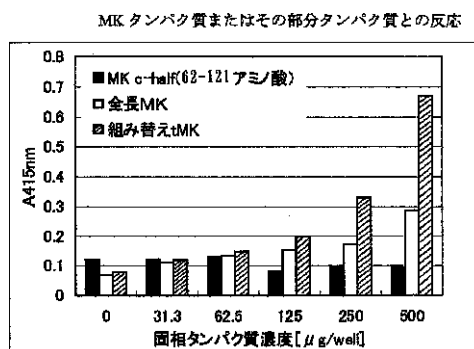


G401細胞の免疫染色

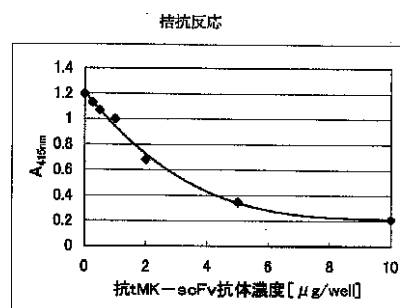
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テ-マ-コ-ト (参考)

G 0 1 N 33/53

33/574

33/577

// C 1 2 P 21/08

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 15/00

5/00

15/00

C

B

Z N A A

F タ-ム (参考) 4B024 AA11 AA12 BA31 BA53 CA06

DA06 EA04 GA03 GA11 HA01

HA15

4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13

4B065 AA26X AA92X AB05 AC14

BA02 BA08 CA24 CA25 CA46

4H045 AA11 CA40 DA76 DA86 EA51

FA72 FA73 FA74

专利名称(译)	截短的中期因子 ( tMK ) 蛋白质特异性单克隆抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002125666A</a>	公开(公告)日	2002-05-08
申请号	JP2000330325	申请日	2000-10-30
[标]申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
申请(专利权)人(译)	デンカ生研株式会社		
[标]发明人	三本朝広 篠沢隆雄		
发明人	三本 朝広 篠沢 隆雄		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/52 C07K16/22 C07K16/24 C07K16/32 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/574 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/22 C07K16/32 C07K2317/622 G01N33/57492		
FI分类号	C07K14/52 C07K16/24 G01N33/53.D G01N33/574.A G01N33/577.B C12P21/08 C12N15/00.C C12N5/00.B C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/20 C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA31 4B024/BA53 4B024/CA06 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR58 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX01		
其他公开文献	JP3920556B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决方案：截短的中期因子 ( tMK ) 蛋白特异性单克隆抗体或其片段，产生单克隆抗体的杂交瘤，使用单克隆抗体检测截短的中期因子 ( tMK ) 蛋白的方法以及肿瘤细胞 并截短了包含单克隆抗体的中期因子 ( tMK ) 蛋白检测试剂盒。[效果]本发明提供了特异性识别在肿瘤细胞中表达的截短的中期因子 ( tMK ) 蛋白的单克隆抗体。由于本发明的单克隆抗体仅与在肿瘤细胞中特异性表达的tMK反应而不与也在正常细胞中表达的中期因子 ( MK ) 反应，因此该抗体与生物学样品反应。通过免疫学方法进行检测，无需使用专用设备即可轻松，高精度地进行肿瘤诊断，与其他肿瘤标志物相比，tMK在各种肿瘤中表达。因此，它在临床上非常有效，因为它可以被检测到而不受特定癌症类型的限制。

1 10 20 30 40 50 60 70

KKKDKYKGG RSECARWAW QPCTSSKDC GYGFRRGICQ ACTORIRCHY PKNWKKKQDA DCKYKFNWG

第3Exonコード配列(下流部) Nドメイン(□)

71 80 90 100 110 120 121

ACDGGTQTEV RQGLKKARY NAQQQSTIRV TKPQPKTKA KAKAKKGGK D

Cドメイン(□)

組換え短縮型ミッドカインタンパク質のアミノ酸配列

1 10 20 30 40 50 60 65

EKKADCKYKF ENWGACDGGT GTKVROGLK KARYNAQQQS TIRVTKPDP RTKAKAKAKK GRGRD