

(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2005-314397

(P2005-314397A)

(43) 公開日 平成17年11月10日(2005.11.10)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18	C07K 16/18 ZNA	4B024
C07K 14/435	C07K 14/435	4B064
C12N 5/10	C12P 21/08	4B065
C12P 21/08	GO1N 33/53 D	4H045
GO1N 33/53	GO1N 33/577 B	
審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 22 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-99047 (P2005-99047)	(71) 出願人	000005968 三菱化学株式会社 東京都港区芝五丁目33番8号
(22) 出願日	平成17年3月30日 (2005.3.30)	(74) 代理人	100103997 弁理士 長谷川 暁司
(31) 優先権主張番号	特願2004-107619 (P2004-107619)	(72) 発明者	鈴木 佳子 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター 一内
(32) 優先日	平成16年3月31日 (2004.3.31)	(72) 発明者	山岸 俊哉 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター 一内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗コンドロモジュリン-1 特異的抗体及びその利用

(57) 【要約】

【課題】 Chm-1 を特異的に認識する抗体、該抗体を用いて生体成分中の Chm-1 を測定する方法等を提供する。

【解決手段】 生体成分中のコンドロモジュリン-1 を特異的に認識する能力を有し、かつ生体成分中のコンドロモジュリン-1 の測定が可能であることを特徴とする抗コンドロモジュリン-1 特異的抗体、該抗体を用いる生体成分中の Chm-1 の測定方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体成分中のコンドロモジュリン - 1 を特異的に認識する能力を有し、かつ生体成分中のコンドロモジュリン - 1 の測定が可能であることを特徴とする抗コンドロモジュリン - 1 特異的抗体。

【請求項 2】

抗体が、配列番号 16 に示すアミノ酸配列を含むペプチドを認識することを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

抗体が、配列番号 16 に示すアミノ酸配列を含むペプチドを免疫原として得られたものであることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の抗体。 10

【請求項 4】

コンドロモジュリン - 1 に対する解離定数が 1×10^{-7} M 以下であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 5】

変性されたコンドロモジュリン - 1 を認識することを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体が認識するエピトープと同じアミノ酸配列を有するエピトープを認識し、かつコンドロモジュリン - 1 を特異的に認識する能力を有することを特徴とする抗コンドロモジュリン - 1 特異的抗体。 20

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体に含まれる抗コンドロモジュリン - 1 特異的モノクローナル抗体。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ。

【請求項 9】

ハイブリドーマ FERMP - 19549 株。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体の一種または複数種を用いて、試料中に含まれるコンドロモジュリン - 1 を免疫学的方法により検出又は定量することを特徴とするコンドロモジュリン - 1 の測定法。 30

【請求項 11】

試料が、疾患の疑いのある生体から採取された生体成分であることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

疾患が、自己免疫疾患、癌、又は、骨・軟骨・関節疾患であることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

疾患の疑いのある生体から採取された試料中のコンドロモジュリン - 1 を免疫学的方法により測定し、得られた測定データと、健常生体から採取された試料中のコンドロモジュリン - 1 の測定データとを比較することを特徴とする疾患の検出方法。 40

【請求項 14】

疾患が、自己免疫疾患、癌、又は、骨・軟骨・関節疾患であることを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

少なくとも請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体の 1 種又は複数種を含み、コンドロモジュリン - 1 の検出または定量を行うために用いることを特徴とするキット。

【請求項 16】

配列番号 16 に示すアミノ酸配列を含むペプチドであって、抗コンドロモジュリン - 1 特 50

異的抗体の調製に際して免疫原として用いることを特徴とする抗原ペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、コンドロモジュリン - 1 (以下これを「Chm - 1」と称することがある) を特異的に認識する能力を有する抗体 (モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体)、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体を用いるコンドロモジュリン - 1 の測定方法、該測定方法を用いる疾患の検出方法、該測定方法に用いるためのキット等に関する。

【背景技術】

【0002】

コンドロモジュリン - 1 は、血管新生阻害因子として知られており、ウシ軟骨から単離された Chm - 1 遺伝子 (非特許文献 1)、ヒトから単離された Chm - 1 遺伝子 (特許文献 1) が知られている。

【0003】

Chm - 1 の生体中での機能としては、軟骨細胞の増殖・分化の促進作用しか知られておらず、ヒトの病態における役割、機能および血中濃度等の生体成分中の濃度と病態との関連は判っていないかった。

【0004】

Chm - 1 の血中濃度等の生体成分中濃度と病態との関連を解析するには、ヒト組織、体液、尿または血液などの生体成分中に存在する Chm - 1 を定量的に測定する必要がある。従来知られている Chm - 1 に対するポリクローナル抗体は生体成分中の Chm - 1 を定量できなかった (非特許文献 2)。そして、Chm - 1 を定量的に測定するためには、Chm - 1 を認識する高親和性抗体、特に望ましくは高親和性モノクローナル抗体の取得が不可欠である。しかしながらこのような性質を有する抗体の存在は知られておらず、さらにはヒト血液などの生体成分中に存在する Chm - 1 を検出する方法、定量測定する方法やキットは存在しなかった。

【特許文献 1】特開平 7 - 138295 号

【非特許文献 1】Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.175, p.971-977, 1991

【非特許文献 2】Kusafuka et al., Acta Histochemica, Vo. 104, No.2, p.167-175, 2002

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、生体成分中の Chm - 1 を特異的に認識する能力を有し、かつ生体成分中の Chm - 1 を測定することができる抗体、該抗体を用いて Chm - 1 を免疫学的に測定する方法、該方法に用いるキット、並びに Chm - 1 が関与する疾病の検出方法等の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは上記課題を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、Chm - 1 に対するマウスモノクローナル抗体を得ることに成功した。また本発明者らは、この抗体は、抗原抗体反応の解離定数が $K_d = 1.18 \times 10^{-8} M$ でヒトの生体成分中の Chm - 1 濃度を測定するには十分な親和性を有しており、この抗体を用いれば生体成分中の Chm - 1 定量が可能であることを見出した。さらにこの抗体は、ヒト病態における Chm - 1 濃度と各種ヒト疾患との関連を解析するにたる十分な親和性を有していることも見出した。

【0007】

そこで本発明者らは、ヒト病態における Chm - 1 血中濃度と各種ヒト疾患との関連を解析するため、本モノクローナル抗体を用いてヒト血中における Chm - 1 の高感度定量系の構築を試みた。即ち、Chm - 1 に対するマウスモノクローナル抗体とウサギポリク

10

20

30

40

50

ローナル抗体を用い、2抗体サンドイッチ法を用いた酵素標識抗体測定系(enzyme-linked immunosorbent assay;以下「ELISA」と称することがある)を構築し、健常人や臓器疾患をはじめとする種々の患者血液(血漿または血清)中のChm-1濃度の測定をした。

【0008】

その結果、上記Chm-1の高感度測定系を使用することにより、Chm-1の健常人の血中濃度域を初めて明らかにすることができ、関節リウマチをはじめとする自己免疫疾患の患者や癌患者では、血液中に存在するChm-1量が著しく増加することを初めて見いだした。本発明はこれらの知見に基づいて成し遂げられたものである。

【0009】

即ち、本発明によれば、(1)生体成分中のChm-1を特異的に認識する能力を有し、かつ生体成分中のコンドロモジュリン-1の測定が可能であることを特徴とする抗コンドロモジュリン-1特異的抗体が提供される。

この発明の好ましい態様によれば、(2)抗体が、配列番号16に示すアミノ酸配列を含むペプチドを認識することを特徴とする上記(1)に記載の抗体;

(3)抗体が、配列番号16に示すアミノ酸配列を含むペプチドを免疫原として得られたものであることを特徴とする上記(1)又は(2)に記載の抗体;(4)Chm-1に対する解離定数が 1×10^{-7} M以下であることを特徴とする上記(1)~(3)のいずれかに記載の抗体;(5)変性されたChm-1を認識することを特徴とする上記(1)~(4)のいずれかに記載の抗体が提供される。

本発明の別の態様によれば、(6)上記(1)~(5)のいずれかに記載の抗体が認識するエピトープと同じアミノ酸配列を有するエピトープを認識し、かつコンドロモジュリン-1を特異的に認識する能力を有することを特徴とする抗コンドロモジュリン-1特異的抗体が提供される。

本発明の別の態様によれば、(7)上記(1)~(6)のいずれかに記載の抗体に含まれる抗コンドロモジュリン-1特異的モノクローナル抗体が提供される。

本発明の別の態様によれば(8)請求項(7)に記載のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ、及び(9)ハイブリドーマFERMP-19549株が提供される。

本発明の別の態様によれば、(10)上記(1)~(7)のいずれかに記載の抗体の一種または複数種を用いて、試料中のChm-1を免疫学的方法により検出又は定量することを特徴とするChm-1の測定法が提供される。

この発明の好ましい態様によれば、(11)試料が、疾患の疑いのある生体から採取された生体成分であることを特徴とする上記(10)に記載の方法;

(12)疾患が、自己免疫疾患、癌、又は骨・軟骨・関節疾患である上記(10)又は(11)に記載の方法が提供される。

本発明の別の態様によれば、(13)疾患の疑いのある生体から採取された試料中のコンドロモジュリン-1を免疫学的方法により測定し、得られた測定データと、健常生体から採取された試料中のコンドロモジュリン-1の測定データとを比較することを特徴とする疾患の検出方法が提供される。

この発明の好ましい態様によれば、(14)疾患が、自己免疫疾患、癌、又は、骨・軟骨・関節疾患であることを特徴とする上記(13)に記載の方法が提供される。

本発明の別の態様によれば、(15)少なくとも上記(1)~(7)のいずれかに記載の抗体の1種又は複数種を含み、コンドロモジュリン-1の検出または定量を行うために用いることを特徴とするキットが提供される。

更に、本発明の別の態様によれば、(16)配列番号16に示すアミノ酸配列を含むペプチドであって、抗コンドロモジュリン-1特異的抗体の調製に際して免疫原として用いることを特徴とする抗原ペプチドが提供される。

【発明の効果】

【0010】

10

20

30

40

50

本発明により、Chm-1を特異的に認識する能力を有する抗体が提供される。また、本発明の抗体を用いることにより、生体成分中のChm-1を特異的かつ高感度に測定、検出することができる。

本発明のChm-1の測定法は、Chm-1の血中濃度に反映される各種疾患の診断に利用することができる。さらに、本発明の抗体は、Chm-1によって引き起こされる疾患の治療薬等への利用も期待できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

以下に本発明の実施態様の代表例を示し、本発明を更に詳細に説明する。

なお、本明細書において、Chm-1を特異的に認識する能力を有するモノクローナル抗体を、「Chm-1特異的モノクローナル抗体」、Chm-1を特異的に認識する能力を有するポリクローナル抗体を、「Chm-1特異的ポリクローナル抗体」と称することがある。さらに、これらを総称して、「Chm-1特異的抗体」と称することがある。また、「Chm-1を特異的に認識する」とは、抗原抗体反応によりChm-1と特異的に結合することをいう。また、本明細書において、塩基の一字記号並びにアミノ酸の三字記号及び一字記号は、WIPO標準ST.25に定義された意味で用いる。

【0012】

<1> Chm-1に対する特異的抗体作製の免疫抗原およびスクリーニング抗原の調製
免疫抗原またはモノクローナル抗体のスクリーニング等に使用するChm-1は開らの方法(Eur. J. Biochem., Vol.260, p.869-878 (1999))に従い、培養上清を精製したものを使用することが可能である。また特開平7-138295に記載されているChm-1 cDNAを使用して大腸菌などの微生物、昆虫細胞、酵母、動物細胞および動物を使用した組換え蛋白質であるChm-1を使用したものも利用可能である。さらにはChm-1の部分配列を化学合成により作製したペプチド又はペプチドとキャリアーの融合体も利用することが可能である。

【0013】

特に、Chm-1特異的抗体を取得するためには、高純度のChm-1を調製することが必要である。このような目的から、ここで使用するChm-1としては、Chm-1 cDNAを使用した組換えタンパク質が望ましい。例えば、配列番号17に示すアミノ酸配列を有するChm-1又は特開平7-138295の配列番号2に記載されているChm-1をコードするChm-1 cDNAを使用し、その全長または一部を適当な発現ベクターに挿入し、これを大腸菌などの微生物、昆虫細胞、酵母、動物細胞または動物に導入し、さらにChm-1を発現しているこれらの遺伝子導入細胞の培養上清または細胞内、組織、体液より精製操作を実施して、組換えタンパク質であるChm-1を得ることが可能である。好ましくは、CHO細胞等の動物細胞に導入し発現させた組換えタンパク質を用いる。

また細胞系を使用することなく、Rapid Translation System RTS500 (Roche Diagnostics社製)などを使用した試験管内での転写・翻訳システムを用いて、目的とするChm-1を作製することも可能である。

【0014】

具体的な例としては、特開平7-138295に記載されているChm-1 cDNAを動物細胞発現ベクターのプロモーター下流に挿入した発現ベクターを用い、これらの発現ベクターを動物細胞に導入後、そのChm-1 cDNAを発現している細胞を選択して、その培養上清から精製することにより組換えタンパク質であるChm-1を得ることが可能である。あるいは、Chm-1のN末端あるいはC末端の一部を切断した遺伝子を挿入した発現ベクターを用いて組換えタンパク質を得ることも可能である。あるいは、Chm-1遺伝子のN末端あるいはC末端側に抗原精製時に使用するタグを挿入したベクターを用いて、Chm-1とタグとの融合タンパク質を発現させてもよい。ここで、タグはHis、FLAG、GSTあるいはIgGのFcフラグメントなどが用いられる。これらの中で、Fcフラグメントが特に好ましい。以下本明細書において特に明記しない限り、Chm-1のN末端および/

またはC末端の一部が切断されたものもChm-1に含まれる。ここで、Chm-1のN末端またはC末端の一部とは、切断をしても前記Chm-1の機能が実質的に損なわれない部分を意味する。

【0015】

また、Chm-1のN末端の一部を切断した遺伝子としては、少なくとも配列番号16に示すアミノ酸配列(RRSY)を有し、Chm-1のN末端のアミノ酸が欠失したタンパク質を発現し得るものであれば特に限定されないが、例えば配列番号17に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号37~120で示される配列(アミノ酸番号1~36が切断されている配列)をコードし得るものが特に好ましい。

また、Chm-1の部分配列を有するペプチドとしては、配列番号16に示すアミノ酸配列(RRSY)を含むペプチド(以下これらを「抗原ペプチド」と称することがある)、又は該ペプチドとキャリアーの融合体を利用することにより、本発明のモノクローナル抗体を取得することもできる。

【0016】

上記抗原ペプチドは、その一方又は両方の末端に、さらに適当な長さで配列のペプチドを付加したものであっても良い。付加するペプチドの長さは、付加後のアミノ酸残基数が通常20程度、好ましくは5~10程度であれば良い。また付加するアミノ酸の配列は、特に限定されず、上記抗原ペプチドの抗原としての機能の制約とならない配列であればいずれの配列であっても良い。これらのペプチドも、本発明の抗原ペプチドに含まれる。

【0017】

ここで、上記部分ペプチドとしては、例えば、配列番号6、14、15に示すアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられる。これら抗原ペプチドは、それ自体既知の通常用いられる方法、例えばペプチド固相合成法などにより調製することができる。

また、キャリアーとしては、例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)、甲状腺グロブリン、キーホールリンペットのヘモシアニン等が挙げられる。これらキャリアーと上記ペプチドとを適当な縮合剤、例えばマレイミド、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミド、カルボジイミド等を用いて結合させてペプチドとキャリアーとの融合体を調製し、これを免疫用抗原(免疫原)とすることもできる。

【0018】

精製純度の高いChm-1は、免疫原として重要であるだけでなく、Chm-1特異的ポリクローナル抗体をアフィニティー精製による選別や、Chm-1特異的モノクローナル抗体をスクリーニングする際に、極めて重要な材料となる。また、定量測定時の標準品Chm-1としても重要である。Chm-1やペプチドの精製は、それ自体既知の通常用いられる方法により行うことができる。

【0019】

<2> Chm-1を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製

Chm-1特異的モノクローナル抗体は、免疫用抗原として、前述したChm-1やN末端あるいはC末端が切断されたChm-1、配列番号16に示すアミノ酸配列を含むペプチド等を用い、通常行われる免疫学的方法により取得することができる。

【0020】

免疫に使用する動物は特に限定されないが、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラット、モルモット、ニワトリ、ハムスター、ラクダ等はいずれも使用できる。免疫用抗原の動物への接種は、皮下、筋肉内、腹腔内に完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントと免疫用抗原をよく混和して行う。接種は、2週間から5週間ごとに実施し、接種した抗原に対する免疫動物の抗体価が十分に上昇し、かつ一定期間以上続ける。この後、十分に抗体価が上昇した免疫動物に対して抗原のみの静脈注射を行い、その3日後に抗体産生細胞を含むと考えられる脾臓もしくはリンパ節を採取し、この脾臓細胞またはリンパ細胞を腫瘍細胞と細胞融合させる。この後、細胞融合して不死化した抗体産生細胞(ハイブリドーマ)を単離する。ここで使用する腫瘍細胞は、一般的に免疫を行った動物から調製される脾臓細胞もしくはリンパ細胞と同一種であることが望ましいが、異種動物間の

10

20

30

40

50

ものでも可能である。

【0021】

腫瘍細胞の例として、p3 (p3/x63-Ag8) , P3U1, NS-1, MPC-11, SP2/0, F0, x63.6.5.3 , S194, R210等の骨髓腫細胞が使用される。なお、これら骨髓腫細胞は、例えば大日本製薬等から市販されており容易に入手できる。細胞融合は、一般に行われている方法、例えば「単クローン抗体実験マニュアル」(講談社サイエンティフィック、1987年出版) に従って実施すればよい。細胞融合は、融合させる細胞を懸濁した融合培地に細胞融合促進剤を加えることに実施することができる。細胞融合促進剤としては、センダイウイルスや平均分子量1000-6000のポリエチレングリコールなどが挙げられる。この際、更に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やIL - 6等のサイトカインを融合培地に添加することも出来る。免疫を行った脾臓細胞もしくはリンパ細胞に対する腫瘍細胞の混合比は、例えば腫瘍細胞に対し、脾臓細胞もしくはリンパ細胞を約1倍から10倍程度用いればよい。

10

【0022】

上記の融合培地としてはERDF培地、RPMI-1640培地、MEM培地等の通常の各種培地を使用することが出来、融合時は通常、牛胎児血清 (F B S) 等の血清を培地から抜いておくのがよい。融合は、上記の免疫を行った脾臓細胞もしくはリンパ細胞と腫瘍細胞との所定量を上記の培地内でよく混合し、予め37 程度に加熱しておいたポリエチレングリコール溶液を20%から50%程度加え、好ましくは30 から37 で1分から10分程度反応させることによって実施する。以降、適当な培地を逐次添加して遠心し、上清を除去する操作を繰り返す。

20

【0023】

目的とするハイブリドーマは、通常の選択培地、例えばH A T培地 (ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地) で培養する。このH A T培地での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (未融合細胞等) が死滅するのに十分な時間、通常では数日から数週間行えばよい。C h m - 1 特異的モノクローナル抗体を取得する際、技術的に重要な点はそのスクリーニングである。C h m - 1 特異的モノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマのスクリーニングは、前述した方法により得たC h m - 1 などの材料を用い、種々の免疫化学的方法で解析することにより可能となる。例えばC h m - 1 をスクリーニング用抗原として用い、これらのスクリーニング用抗原とハイブリドーマ培養上清中に分泌されるモノクローナル抗体との結合を、E L I S A 法などの酵素免疫測定法、またはウエスタンブロッティング法などで解析して、目的とするハイブリドーマを選択することが出来る。

30

【0024】

具体的には、C h m - 1 をスクリーニングプレートなどに付着させ、B S A、スキムミルク等でブロッキングしたものに対して、上記ハイブリドーマの培養上清を添加して、C h m - 1 を認識する抗体を分泌しているハイブリドーマを選別する。例えば、選択するハイブリドーマの培養上清をC h m - 1 が付着したE L I S A 法用のプレートに添加して反応させ、十分な洗浄操作後、標識抗マウスI g G ポリクローナル抗体を添加してさらに反応させる。洗浄操作後に標識の検出を行い、C h m - 1 を付着したプレートに反応がある培養上清を有するハイブリドーマを選択する。標識としては、後述する各種酵素、蛍光物質、化学発光物質、ラジオアイソトープ、ビオチンまたはアビジン等が用いられる。

40

【0025】

上記のスクリーニングにより、C h m - 1 を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが得られる。

一方、この様なハイブリドーマをスクリーニングする際、例えば、配列番号6、14若しくは15に示すアミノ酸配列を有するC h m - 1 部分ペプチド、又は配列番号17に示すアミノ酸配列を有するC h m - 1 ペプチドと反応することを指標としても良い。この様な方法で選択されたハイブリドーマが産生する抗体に関しては、さらにC h m - 1 に反応することを確認すると良い。

50

また、Chm-1を特異的に認識するモノクローナル抗体の反応性（抗原に対する親和性）は、Chm-1に対する解離定数を測定することによって確認することができる。本発明の抗体のChm-1に対する解離定数は、生体成分中のChm-1の測定が可能な程度のものであれば特に限定されないが、好ましくは 1×10^{-7} 以下、より好ましくは 2×10^{-8} 以下である。

【0026】

さらに、Chm-1を特異的に認識するモノクローナル抗体の反応性として、変性されたChm-1を認識することを指標として選別することができる。Chm-1の変性方法としては、2-メルカプトエタノールやDTT等の還元剤を用いた変性方法、熱変性、界面活性剤を用いた方法が挙げられるが、好ましくは、変性剤としてSDSを用いた変性方法、さらに好ましくは、SDS-PAGEを用いた変性方法が用いられる。このようにして変性されたChm-1とモノクローナル抗体との反応性を指標として変性されたChm-1を特異的に認識するモノクローナル抗体を選別することができる。

10

【0027】

得られたハイブリドーマは、限界希釈法によりクローニングすることにより、単一のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選別することができる。このようにして選別されたハイブリドーマとしては、2003年10月8日付けで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受託番号 FERM P-19549として寄託されているものを挙げる

ことができる。

選別されたハイブリドーマは、あらかじめFBS中に含まれるウシ抗体（IgG）を除いたFBSを1～5%程度加えた培地または無血清用培地を用いて培養を行い、得られた培養上清を目的のモノクローナル抗体を精製する原料とする。一方、得られたハイブリドーマをあらかじめプリステンを投与したBalb/CマウスまたはBalb/c(nu/nu)マウスの腹腔内に移植し、10日から14日後にモノクローナル抗体を高濃度を含む腹水を採取し、目的のモノクローナル抗体を精製する原料としてもよい。モノクローナル抗体を精製する方法は、通常の免疫グロブリン精製法を用いれば良く、例えば、硫酸分画法、ポリエチレン分画法、エタノール分画法、陰イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAまたはプロテインGが結合したアフィニティークロマトグラフィー等により実施することができる。

20

【0028】

<3> Chm-1を特異的に認識するポリクローナル抗体の作製

30

Chm-1特異的ポリクローナル抗体は、Chm-1を免疫用抗原として用い、得られた免疫動物由来のポリクローナル抗体に対し、Chm-1を認識する抗体を精製する操作を実施すれば取得することが可能である。また、ポリクローナル抗体を取得する免疫用抗原として、前述したChm-1の部分配列ペプチドとキャリアーの融合体も使用可能である。

Chm-1の部分配列を有するペプチドとしては、上記<2>の通り、配列番号16に示すアミノ酸配列（RRSY）を有する抗原ペプチド、又は該ペプチドやタグ、キャリアーとの融合体などが挙げられる。これらを免疫用抗原として利用することにより、Chm-1特異的ポリクローナル抗体を取得することもできる。

【0029】

ここで、抗原ペプチド等は、上記<2>で挙げたものと同様のものが挙げられる。これら抗原ペプチドは、それ自体既知の通常用いられる方法、例えばペプチド固相合成法などにより調製することができる。また、Chm-1、N末端やC末端が切断されたChm-1、タグ、キャリアー等も上記<2>と同様のものが挙げられる。

40

【0030】

免疫に使用する動物は特に限定されないが、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラット、モルモット、ニワトリ、ハムスター等はいずれも使用できる。免疫用抗原の動物への接種は皮下、筋肉内、腹腔内に完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントとよく混和して行う。接種は2週間から5週間ごとに実施し、接種した抗原に対する免疫動物の抗体価が十分に上昇するまで続ける。この後、免疫動物に対して抗原のみの静脈注射

50

を行い、その3日後から5日後に抗血清を取得する。

【0031】

取得した抗血清からポリクローナル抗体を精製する方法は、通常の免疫グロブリン精製法を用いれば良く、例えば、硫酸分画法、ポリエチレン分画法、エタノール分画法、陰イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAまたはプロテインGが結合したアフィニティークロマトグラフィー等により実施することが出来る。

【0032】

Chm-1特異的ポリクローナル抗体を取得するための精製操作とは、Chm-1を認識するポリクローナル抗体を分画または精製可能な方法であればいずれでも良く、例えばイオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動法、免疫電気泳動法等が挙げられる。具体的な方法の一つとして、Chm-1を固定化した樹脂を用いたアフィニティークラムクロマトグラフィーが挙げられる。例えば、前述の方法で得られたポリクローナル抗体を材料にして、Chm-1を固定化した樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーを実施する。この方法により、Chm-1に結合した吸着画分に存在するポリクローナル抗体を回収する。

10

【0033】

これらの方法により、Chm-1特異的ポリクローナル抗体を得ることが出来る。また、このアフィニティークロマトグラフィーの方法として、Chm-1の部分配列ペプチドを利用することも可能である。ペプチドを固定化した樹脂は、Chm-1特異的ポリクローナル抗体を精製するアフィニティークロマトグラフィー用の固定化用担体として使用することが出来る。

20

【0034】

かくして得られるChm-1特異的ポリクローナル抗体について、さらにChm-1に特異的に反応することを確認することが好ましい。また、Chm-1特異的ポリクローナル抗体の反応性は、モノクローナル抗体の場合と同様に測定した、Chm-1に対する解離定数(各抗体の解離定数の平均値として求められる解離定数、以下これを「擬似解離定数」と称することがある)を測定することによって確認することができる。本発明のポリクローナル抗体のChm-1に対する擬似解離定数は、上記モノクローナル抗体と同様に生体成分中のChm-1の測定が可能な程度のものであれば特に制限はされないが、好ましくは 1×10^{-7} 以下、より好ましくは 2×10^{-8} 以下である。

30

【0035】

さらに、Chm-1を特異的に認識するポリクローナル抗体の反応性として、上記<2>のモノクローナル抗体の場合と同様に、変性されたChm-1を認識することを指標として選別することができる。Chm-1の変性方法としては、2-メルカプトエタノールやDTT等の還元剤を用いた変性方法、熱変性、界面活性剤を用いた方法が挙げられるが、好ましくは、変性剤としてSDSを用いた変性方法、さらに好ましくは、SDS-PAGEを用いた変性方法が用いられる。このようにして変性されたChm-1とポリクローナル抗体との反応性を指標として、変性されたChm-1を特異的に認識するポリクローナル抗体を選別することができる。

40

【0036】

ここで本発明には、上記<2>及び<3>で詳述したChm-1特異的モノクローナル抗体やChm-1特異的ポリクローナル抗体が認識するエピトープと同じアミノ酸配列を有するエピトープを認識し、かつコンドロモジュリン-1を特異的に認識する能力を有するものも含まれる。ここで、エピトープとしては、例えば配列番号16に示すアミノ酸配列(RRSY)を挙げることができる。

【0037】

<4> Chm-1を免疫学的に測定する方法

本方法は、本発明のChm-1特異的抗体を使用して、生体試料中のChm-1を諸種

50

の測定方法・アッセイ方法を用いて免疫学的に測定、即ち検出又は定量する方法である。用いる方法としては、Chm-1を検出又は定量する目的であれば特に限定されない。例えば、Chm-1を特異的に検出する組織染色法や免疫沈降法、Chm-1を特異的に測定する競合的結合アッセイ方法、または直接的または間接的サンドイッチアッセイ法、2抗体サンドイッチアッセイ法などが挙げられる。また検出方法としては、酵素免疫アッセイ、ラジオ免疫アッセイ、蛍光免疫アッセイ、化学発光免疫アッセイ、免疫ブロッキング法、免疫クロマト法、ラテックス凝集法などが挙げられる。これら「検出方法」又は「定量方法」を、本明細書では単に「測定方法」と総称することがある。

【0038】

免疫ブロッキングの応用例としては、Chm-1特異的抗体をマイクロアレイやチップに添加もしくは固定したのも含まれる。またChm-1特異的抗体を蛍光ラベル化し、蛍光偏向解消法、蛍光相関分散法を用いてChm-1との相互作用を検出することも可能である。表面プラズモン共鳴装置を利用してChm-1特異的抗体と、Chm-1との相互作用を測定することも可能である。例えば、この抗体をセンサーチップ上に結合させた後、このチップをとりつけた表面プラズモン共鳴装置にChm-1を含む生体試料を流し、応答シグナルの時間変化を追跡することにより、生体成分中のChm-1を検出又は定量することが可能である。

【0039】

Chm-1を特異的に測定する方法で使用される抗体、例えばChm-1特異的抗体は、そのまま用いてもよいし、定法であるパパイン処理によって得られるFabもしくはペプシン処理によって得られるF(ab')₂またはF(ab')₃の形態を持った抗体を用いても良い。またChm-1を認識する抗体の断片も、本発明に含まれる。例えば、Chm-1特異的抗体のH鎖とL鎖の両可変ドメイン内の相補性決定領域(CDR)または超可変領域などを含む断片がこれに含まれる。

【0040】

生体成分中のChm-1を定量する2抗体サンドイッチアッセイ法とは、例えば、Chm-1を特異的に測定する方法であって、(1)Chm-1特異的抗体の一種または複数を含むものからなる試薬を、試料中のChm-1と反応させ、免疫反応物を生成させる工程、(2)免疫反応物を分離した後、免疫反応物中のChm-1を認識する標識抗体と反応させる工程、及び(3)免疫反応物に結合した標識抗体を測定する工程を含む方法等が

【0041】

または、Chm-1を特異的に測定する方法であって、(1)Chm-1とChm-1特異的抗体の一種または複数を含むものからなる試薬、試料中のChm-1と反応させ、免疫反応物を生成させる工程、(2)免疫反応物を分離した後、免疫反応物中のChm-1を認識する第二次抗体と反応させ、免疫反応物を生成させる工程、(3)免疫反応物を分離した後、免疫反応物中の第二次抗体を認識する標識抗体を反応させる工程、及び(4)免疫反応物に結合した標識抗体を測定する工程を含む方法等が挙げられる。

【0042】

具体的には、マイクロタイターウェルやマイクロ磁気ビーズなどの固相に対してChm-1特異的ポリクローナル抗体又はChm-1特異的モノクローナル抗体を、定法により一次抗体として固相化する。次に、この固相表面の過剰な蛋白質結合部位を、ウシ血清アルブミン、スキムミルクまたはゼラチン等でブロッキングする。この後、Chm-1を含む生体成分を添加して固相上で免疫反応物を形成させた後に洗浄する。次にChm-1を認識する標識ポリクローナル抗体または標識モノクローナル抗体を二次抗体として添加して反応させる。この際、一次抗体としてモノクローナル抗体を用いた場合は、一次抗体とエピトープが異なるChm-1特異的モノクローナル抗体を標識したものを二次抗体として使用しても良い。一次抗体、二次抗体の一方にポリクローナル抗体を用いた場合は、もう一方の一次抗体又は二次抗体にChm-1特異的モノクローナル抗体を使用することに

10

20

30

40

50

より感度のよい検出、定量測定が可能になる。さらに洗浄後、標識抗体量を測定することにより、生体成分中のChm-1量を測定することが出来る。

【0043】

ここで、使用するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の標識とは、アルカリホスファターゼ、西洋わさびペルオキシターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼなどの酵素でもよいし、フルオレセイン誘導體やローダミン誘導體などの蛍光物質でもよい。またユーロピウムもしくはユーロピウム錯体などの時間分解蛍光測定が可能な希土類もしくは希土類錯体であってもよい。さらに、アクリジニウムエステル等の化学発光物質であってもよいし、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P などのラジオアイソトープでもよい。すなわち、発色、蛍光、時間分解蛍光、化学発光、電気化学発光、放射活性を測定する方法を用いて生体成分中のChm-1量を定量することが本発明に含まれる。また、二次抗体をビオチン化標識し、アビジンと複合体を形成しているアルカリホスファターゼ、西洋わさびペルオキシターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ、フルオレセイン誘導體、ローダミン誘導體、希土類錯体、アクリジニウムエステル等の化学発光物質、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P などのラジオアイソトープを検出することも本発明に含まれる。

10

【0044】

<5> Chm-1の測定に用いるためのキット

本発明のキットは、少なくとも上記Chm-1特異的抗体を含み、試料中のChm-1を測定するために用いるものである。ここで、本発明におけるキットとは、本発明のChm-1の測定方法に用いる試薬や材料により構成される一連のセットを意味するが、パーツ毎に別々に構成され、また別々に用いられるものであっても、本発明の測定方法に用いるものであれば、本発明のキットに含まれる。

20

本発明の測定方法及びキットを用いることにより、生体成分中のChm-1の正確な定量測定ができ、これにより後述するChm-1が関連する疾患の検出が可能となる、

本発明のキットは、少なくとも本発明のChm-1特異的抗体を含み、Chm-1測定に用いられるものであれば、そのキットを構成する試薬や材料、測定方法・アッセイ方法には限定されない。本発明のキットは、さらに任意の要素として、例えば、試料希釈液、洗浄液、標識化抗体または標識化抗原、色素、陽性コントロール用のペプチド、容器などの測定に必要な材料、説明書などを含んでいても良い。

30

【0045】

具体的な測定方法・アッセイ方法としては、例えば、サンドイッチアッセイ、免疫染色法、電気泳動法、HPLC法、各種カラムクロマトグラフィー法、各種アレーやチップを用いる方法、表面プラズモン共鳴装置等を用いる方法などが挙げられる。本発明のキットは、これら測定方法・アッセイ方法により、Chm-1特異的抗体を用いて、免疫学的にChm-1を定量または検出するために使用するものである。ここで、Chm-1特異的抗体としては、前記Chm-1を特異的に認識する抗体の少なくとも一つ以上が用いられる。

【0046】

例えば、本発明のキットが2抗体サンドイッチアッセイ法によるものである場合には、Chm-1を特異的に測定するキットであって、(1)Chm-1とChm-1特異的抗体の一種または複数を含むものからなる試薬を試料中のChm-1と反応させ、免疫反応物を生成させる工程、(2)免疫反応物を分離した後、免疫反応物中のChm-1を認識する標識抗体と反応させる工程、及び(3)免疫反応物に結合した標識抗体を測定する工程を含んだキット等が挙げられる。

40

【0047】

または、Chm-1を特異的に測定するキットであって、(1)Chm-1とChm-1特異的抗体の一種または複数を含むものからなる試薬を試料中のChm-1と反応させ、免疫反応物を生成させる工程、(2)免疫反応物を分離した後、免疫反応物中のChm-1を認識する第二次抗体と反応させ、免疫反応物を生成させる工程、

50

(3) 免疫反応物を分離した後、免疫反応物中の第二次抗体を認識する標識抗体を反応させる工程、及び(4) 免疫反応物に結合した標識抗体を測定する工程を含んだキット等が挙げられる。

【0048】

このキットは、少なくとも一種のChm-1特異的モノクローナル抗体を含み、さらに、Chm-1特異的ポリクローナル抗体、Chm-1を検出または定量する操作に必要な構成要素が含まれていてもよい。その構成要素の例として、標準蛋白質としてのChm-1、標識用の酵素および基質等が挙げられる。キットに含まれるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体は、酵素などの標識物質が結合した状態でもよいし、これらの抗体を認識する標識抗体が含まれていてもよい。また適切な各種緩衝液、抗原希釈液、反応希釈液、基質溶液、反応停止液等が含まれていてもよい。本キットにはラベルが付き、Chm-1検出または定量に必要な材料が封入された容器が含まれていてもよい。適した容器としては、例えばガラス、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、ナイロン、テフロン(登録商標)などの各種プラスチックを材質とした容器が挙げられる。キットには、好ましくは、上述したChm-1を検出または定量するのに必要な材料、容器とともに、Chm-1を検出または定量する方法が記載された説明書が含まれる。

10

【0049】

<6> Chm-1が関連するヒト疾患の検出方法

本発明のChm-1測定方法、キットを用いることにより、疾患の疑いがある患者から採取された生体成分(試料)を検体として、生体成分中のChm-1を検出することができ、また定量することができる。Chm-1の測定対象となる生体成分としてはChm-1の免疫学的測定の対象となるものであれば特に限定されず、ヒトおよび動物の組織、血液、尿、漿液、髄液、関節液、眼房水、涙液、唾液、またはそれらの分画物若しくは処理物などのいずれの生体成分も適切な処理を行うことによって適応可能である。血液の分画物又は処理物としては、血清、血漿等を挙げることができる。また測定対象となる生体成分には、Chm-1遺伝子を発現させて得られたものも含まれる。

20

疾患状態にある患者の生体成分中に存在するChm-1を検出または定量することにより、その疾患の診断、予知、経過を判断することが可能である。疾患の例として、関節炎、リウマチ、シェーングレン症候群、レイノー症、SLE、橋本病を始めとする自己免疫疾患、膵癌、肝癌などの癌、糖尿病、網膜症などの眼科疾患、骨粗鬆症を始めとする骨疾患、変形関節症などの関節疾患、DICなどの血液疾患、心筋梗塞、脳梗塞などの血栓症疾患などが挙げられる。

30

【0050】

また本発明のChm-1特異的抗体は、Chm-1の活性を特異的に抑制する効果が期待できるため、Chm-1により引き起こされる疾患の治療薬として使用することが期待される。例えば、Chm-1は血管が新生し、組織中に侵入するのを阻害する性質を有している。この目的で使用する抗体は、遺伝子工学的手法を使用してヒト化しておくことが望ましい。抗体のヒト化は、例えば特表平11-506327などに記載されている当業者によく知られた方法によって実施することができる。

【0051】

以下に実施例を挙げて、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

40

【実施例1】

【0052】

<Chm-1特異的モノクローナル抗体の作製>

哺乳細胞発現用ベクターpME18S(Medical Immunology 20, p27 (1990))にFcフラグメントをコードする配列を定法により挿入し、pME-IgC1ベクターを作製した。このベクターをEcoRV(TAKARA社製)およびEco47III(TAKARA社製)で切断してFactorXa切断アミノ酸配列をコードする部分を除去し、その部位に、HGF(ヒト肝細胞増殖因子)に由来するHGFA(ヒト肝細胞増殖因子活性化因子)の切断認識アミノ酸配列をコードする部分を含む配列[

50

AAA GAT ATC AAG ACC AAG CAG CTA CGA GTT GTC AAC GGG CCA AAA (配列番号 20)] を EcoRV および HaeII (TAKARA社製) で切断した断片を挿入し、大腸菌へ形質転換し、プラスミド pMEHA1gC18 を得た。

【 0 0 5 3 】

次に、ヒト Chm-1 遺伝子 (配列番号 17 に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号 37 ~ 120 をコードする配列) を、2つのプライマー: aaaCTCGAGaccatggaggactcacaagcct (配列番号 21) および ttGATATCcaccatgcccgaagatagcg (配列番号 22) を用いて Pfu DNA ポリメラーゼにて Chm-1 遺伝子を増幅し、増幅断片を制限酵素 EcoRV および XhoI (TAKARA社製) で処理した。これを pMEHA1gC18 の EcoRV-XhoI サイトに導入し、プラスミド pMEHA1gC18-Chm1 を作製した。なお、上記 Chm-1 遺伝子の増幅は、鋳型として pCRII-hChM-1 (Eur. J. Biochem. 10 .260, 869-878(1999)) を用いて行った。

続いて発現する Chm-1 を培養液中に分泌させるため、Chm-1 配列の 5' 端に HAI2 由来の分泌シグナルペプチド配列 (1-81)、さらに開始コドン直前に Kozak 配列が挿入されるようプライマーを作製し、Taq DNA Polymerase を用い、pME-HAI-1 (特開平 9 - 95498) を鋳型として PCR を行い、DNA 断片を増幅した。増幅 DNA 断片の配列は次の通りである。
CAATTGACCatggcgcagctgtgcgggctgaggcggagccgggctttctcgccctgctgggatcgctgctcctctctgg
ggctcctggcggccGAATTC (配列番号 23)

【 0 0 5 4 】

得られた増幅断片について、5' 側は MunI (TAKARA社製)、3' 側は EcoRI (TAKARA社製) 処理を行い、EcoRI 処理した pMEHA1gC18-Chm1 とライゲーションを行い、大腸菌へ形質転換した。得られたプラスミドは配列の向きを DNA シーケンス法により確認し、DNA 断片が正しい向きで結合されているプラスミド pME-sigHA1gC18-Chm1 を取得した。 20

得られた pME-sigHA1gC18-Chm1 は、ピューロマイシン耐性遺伝子を含む pBSpac P (Gene 1988;62(1) 121-6) とともにトランスフェクタム (BIOSEPRAS社製) を用いて CHO 細胞にトランスフェクションした。出現したコロニーを 96 穴タイタープレートにピックアップし、その培養上清について、抗ヒト Fc 抗体を用いて目的組換えタンパク質 [Chm-1 と Fc との融合タンパク質 (以下これを「Chm-1-hFc」と称することがある)] の産生を次の通り確認した。

【 0 0 5 5 】

すなわち、ウサギ抗ヒト IgG 抗体を固相化し、BSA でブロッキングを行ったスクリーニング用 ELISA プレートに対して、培養上清を添加し、培養上清中に存在する Chm-1-hFc の存在量を解析した。スクリーニング用 ELISA プレートに対し、選択する CHO 細胞の培養上清を 50 μ l / ウェルにて添加した後、1 時間以上室温で反応させた。反応後、0.05% Tween20 を含む PBS 液 (0.1M リン酸緩衝液、150mM NaCl) (以下これを「PBST 液」と略称する) を用いて十分な洗浄を行い、HRP (西洋わさびペルオキシターゼ) 標識ヤギ抗ヒト IgG・Fc ポリクローナル抗体 (ICN 社製) 1 μ g/ml および 1% BSA を含む PBS を 100 μ l ずつウェルに添加し、さらに室温で 1 時間反応させた。PBST 液で十分に洗浄操作を行った後、0.4mg/ml オルトフェニレンジアミン (OPD、Sigma 社製 P-9029) および 0.015 ~ 0.03% 過酸化水素溶液を含むクエン酸 - リン酸緩衝液 (pH5.0) を添加して室温にて反応させ、発色を行った。発色反応後 1N H_2SO_4 溶液を添加して反応を止め、測定波長 490nm、リファレンス波長 650 40 nm にて測定を行った。このスクリーニングにより、Chm-1-hFc を分泌発現する CHO 細胞が得られた。

作製した形質転換 CHO 株は大量培養を行い、その培養液を回収し、プロテイン A カラムによるアフィニティー精製を行い Chm-1-hFc 融合タンパク質を得た。

【 0 0 5 6 】

また、開らの方法 (Eur. J. Biochem., Vol.260, p.869-878(1999)) に従い、配列番号 17 に示すアミノ酸配列を有する Chm-1 をコードする cDNA を CHO 細胞に導入した形質転換体を作成し、該形質転換体の培養上清を精製することにより作製した。以下これを「全長 Chm-1」と略称することがある。

100 μ g の Chm-1-hFc あるいは全長 Chm-1 を含む溶液を、それぞれ同容量のフロイント完全 50

アジュバントもしくはフロイント不完全アジュバントとともに、Balb/cマウスの皮内および皮下に4週間間隔で3回投与した。マウスの血清中にChm-1特異的抗体が産生していることを確認後、30 μ gのChm-1-hFcあるいは全長Chm-1を含む溶液を尾静脈内に投与した。3日後に脾臓を取り出し、「単クローン抗体実験マニュアル」(講談社サイエンティフィック1987年出版)に従い、ポリエチエングリコール1500を使用して、脾臓細胞をミエローマ細胞P3U1と細胞融合させ、96ウェルプレートに注入後HAT培地を添加して14日間の培養を行った。

【0057】

次に、Chm-1に対して特異的なモノクローナル抗体を培地中に産生するハイブリドーマの選別をそれぞれ行った。すなわち、Chm-1-hFcを固相化し、BSAでブロッキングをおこなったChm-1-hFcスクリーニング用ELISAプレート(Chm-1-hFc固相化プレート)に対して、選択するハイブリドーマの培養上清を添加し、培養上清に存在するモノクローナル抗体の反応性を解析した。同様にヒトIgGを固相化したプレートに対する反応性も解析した。2種類のプレートに対する反応性の差を解析し、Chm-1-hFc固相化プレートにのみ反応した株のみを選択した。スクリーニング用ELISAプレートに対し、選択するハイブリドーマの培養上清を50 μ l/ウェルにて添加した後1時間以上反応させた。

10

【0058】

反応後、0.05% Tween20を含むPBS液(0.1Mリン酸緩衝液、150mM NaCl)(以下「PBST液」と略す)を用いて十分な洗浄を行い、HRP(西洋わさびペルオキシターゼ)標識ヤギ抗マウスIgG・Fcポリクローナル抗体(ICN社製)1 μ g/mlおよび1% BSAを含むPBSを100 μ lずつウェルに添加し、さらに室温で1時間反応させた。PBST液で十分に洗浄操作を行った後、0.4mg/mlオルトフェニレンジアミン(OPD、Sigma社製 P-9029)および0.015~0.03%過酸化水素溶液を含むクエン酸-リン酸緩衝液(pH5.0)を添加して室温にて反応させ、発色を行った。発色反応後1N H₂SO₄溶液を添加して反応を止め、測定波長490nm、リファレンス波長650nmにて測定を行った。

20

【0059】

このスクリーニングにより、抗Chm-1モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが得られた。得られたChm-1に対して反応する各ハイブリドーマは、限界希釈法による4回のクローニング操作後、選別されたハイブリドーマの培養上清を回収して、プロテインAが結合したアフィニティークロマトグラフィー(アマシャムファルマシアバイオテク社製)により、モノクローナル抗体の精製を行った。この選別過程を表1に示す。

30

【0060】

【表 1】

表1

融合後	7680	Well
1st Screening	119	個 Pickup
2nd Screening	19	個 Pickup
1st Cloning	11	株
3rd Screening	9	個 Pickup
2nd Cloning	7	株
4th Screening	7	個 Pickup
3rd Cloning	7	株
5th Screening	6	個 Pickup
4th Cloning	6	株
6th Screening	5	個 Pickup
大量培養	5	株

10

【0061】

20

最終的に得られた5株の中からハイブリドーマの成長速度やIgG分泌量を検討し、1株を選択した。かくして、抗Chm-1特異的モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが選択された。このハイブリドーマは、2003年10月8日付けで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（〒305-8566日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に受託番号FERM P-19549として寄託されている。尚、本ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体は、IgGのクラスに属し、サブクラスはIgG2bであった。

また、全長Chm-1を免疫原としたハイブリドーマは、上記と同様に、全長Chm-1を固相化し、BSAでブロッキングをおこなったChm-1スクリーニング用ELISAプレート（全長Chm-1固相化プレート）に対して、選択するハイブリドーマの培養上清を添加し、培養上清に存在するモノクローナル抗体の反応性を解析することにより選択した。

30

Chm-1-hFcを免疫原としたモノクローナル抗体（寄託ハイブリドーマFERM P-19549が産生する抗体）（抗Chm-1-hFcモノクローナル抗体）と全長Chm-1を免疫原として得られたモノクローナル抗体（抗全長Chm-1モノクローナル抗体）の反応性を、Chm-1-hFc固相化プレート又は全長Chm-1固相化プレートを用いて次の通り解析した。

すなわち、Chm-1-hFc又は全長Chm-1を固相化し、BSAでブロッキングをおこなったChm-1-hFc固相化プレート又は全長Chm-1固相化プレート（解析用ELISAプレート）に対して、それぞれのモノクローナル抗体を添加し、それぞれのモノクローナル抗体の反応性を解析した。各プレートに対し、各モノクローナル抗体を1μg/ウェルにて添加した後1時間以上反応させた。

【0062】

40

反応後、0.05% Tween20を含むPBST液を用いて十分な洗浄を行い、HRP（西洋わさびペルオキシターゼ）標識ヤギ抗マウスIgG・Fcポリクローナル抗体（ICN社製）1μg/mlおよび1% BSAを含むPBSを100μlずつウェルに添加し、さらに室温で1時間反応させた。PBST液で十分に洗浄操作を行った後、0.4mg/mlオルトフェニレンジアミン（OPD、Sigma社製 P-9029）および0.015~0.03%過酸化水素溶液を含むクエン酸-リン酸緩衝液（pH5.0）を添加して室温にて反応させ、発色を行った。発色反応後1N H₂SO₄溶液を添加して反応を止め、測定波長490nm、リファレンス波長650nmにて測定を行った。その結果を図1及び図2に示す。なお、図1及び図2において、「抗Chm-1-hFcモノクローナル抗体」及び「抗全長Chm-1モノクローナル抗体」を、それぞれ「抗Chm-1-hFc抗体」及び「抗全長Chm-1抗体」と略記した。

50

図1及び図2の通り、N末端を切断し、C末端にFcを導入したもの(Chm-1-hFc)を免疫原に用いると、より親和性の高いモノクローナル抗体が得られることが分かった。

【実施例2】

【0063】

<Chm-1に対するポリクローナル抗体の作製>

実施例1で調製した100 μ gの全長Chm-1を含む溶液を、同容量のフロイント完全アジュバントもしくはフロイント不完全アジュバントを等量ずつ混合したものを抗原として、ウサギ皮下へ2週間間隔で7回投与した。血清中に抗体が産生していることを確認後、さらに10 μ gの抗原を静脈内に投与し、5日後に抗血清を取得した。さらにプロテインAカラムを使用した精製操作により、抗Chm-1特異的ポリクローナル抗体を取得した。

10

【実施例3】

【0064】

<Chm-1特異的測定系の構築>

実施例1で作製したハイブリドーマ(寄託番号FERM P-19549)が産生するモノクローナル抗体を一次抗体として使用した。各モノクローナル抗体を20 μ g/mlの濃度になるようにPBSに溶解し、50 μ l/ウェルにて96ウェルプレートへ添加し、4 \times にて一昼夜(12時間程度以上)または37 \times にて1時間以上おいた。この一次抗体付着プレートより一次抗体溶液を除いた後、5%スキムミルクを含むPBSを250~300 μ l/ウェルずつ添加し、4 \times にて一昼夜(12時間程度)または37 \times にて1時間以上おいた。このプレートからブロッキング溶液を除き、500mM NaCl, 0.05% Tween 20, 20mM Tris-HCl pH7.5を組成とする洗浄液を使用して十分な洗浄を行った後に、5%スキムミルクを含むPBSに溶解された種々の濃度(0、50、100、200、400、800 ng/ml)の全長Chm-1を50 μ lずつ添加し、室温にて3時間反応させた。

20

【0065】

この後、上記の洗浄液を使用して十分な洗浄を行った後、実施例3で作製した抗Chm-1ポリクローナル抗体10 μ g/mlおよび5%スキムミルクを含むPBSを100 μ lずつウェルに添加し、室温にて1.5時間反応させた。

【0066】

次に上記の洗浄液を使用して十分な洗浄を行い、HRP標識抗ウサギIgG抗体(SBA)を8000倍希釈した5%スキムミルクを含むPBS(-)を100 μ lずつウェルに添加し、さらに室温で1時間反応させた。洗浄液で十分に洗浄操作を行った後、0.4mg/mlオルトフェニレンジアミン(OPD、Sigma社製 P-9029)および0.015~0.03%過酸化水素溶液を含むクエン酸-リン酸緩衝液(pH5.0)を100 μ l/ウェルずつ添加して室温にて反応させ、発色を行なった。

30

【0067】

この後1N H₂SO₄溶液を100 μ l/ウェルずつ添加して反応を止め、測定波長490nm、リファレンス波長650nmにて測定を行った。この結果を図3に示す。図3はChm-1の濃度0~800ng/mlの範囲で記載した。

この結果、実施例1で取得した抗Chm-1抗体を用いることにより、試料中のChm-1濃度に比例して発色を測定できることが明らかになった。以下、ここで用いた「全長Chm-1」を、Chm-1測定系における「標準Chm-1」として用いた。

40

【実施例4】

【0068】

<抗Chm-1特異的モノクローナル抗体の解離定数測定>

実施例1にて作製・精製された抗Chm-1モノクローナル抗体(抗Chm-1-hFcモノクローナル抗体)の解離定数を測定した。測定にあたっては、BIACORE X(ピアコア社製)を使用した。

【0069】

Chm-1-hFcの固定化はセンサーチップCM5(ピアコア社製)に対して行った。固定化方法は、CMデキストラン中のカルボキシル基をNHS/EDC混合液(0.1M N-Hydroxysuccinimide,

50

0.4M 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride 1:1) により活性化させ、Chm-1中のアミノ基と結合させるアミンカップリング法で行った。ここでChm-1-hFcのチップへの固定化量は約250RU = 0.25ng/mm²とした。

【0070】

次に、Chm-1-hFc固定化チップを用い、抗Chm-1-hFcモノクローナル抗体との相互作用測定を行った。

測定に使用するランニング緩衝液として、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% Tween20を含む10mM HEPES緩衝液(pH7.4)を使用した。このランニング緩衝液に抗Chm-1モノクローナル抗体を、それぞれ数~数十μg/ml程度の濃度になるように溶解し、流速30μl/分でChm-1-hFcと抗体の相互作用を測定した。結合相は100~280sec、解離相は280~520secである。そのようにして得られた相互作用曲線を、解析プログラムBIA Evaluation version 3.0(ピアコア社製)を用い、線形あるいは非線形解析を行った(図4)。算出された抗Chm-1モノクローナル抗体の解離定数は 1.18×10^{-8} Mであった。

【実施例5】

【0071】

<Chm-1特異的モノクローナル抗体のエピトープ解析>

実施例1で作製・精製した抗Chm-1モノクローナル抗体(抗Chm-1-hFcモノクローナル抗体)のエピトープ解析を下記表2に示す合成ペプチドを用いて行った。合成ペプチドは、Sigma Genosis社へ委託して調製した。

【0072】

【表2】

表2

配列番号	アミノ酸配列	Chm-1の位置対応
1	EVVRKIVPTTTTKRPHSGPRC	配列番号17のアミノ酸番号1~18
2	CHSGPRSNPGAGRLNNETRP	配列番号17のアミノ酸番号16~33
3	CTRPSVQEDSQAGNPDNPYH	配列番号17のアミノ酸番号30~47
4	CDNPYHQQEGESMTFDPRLD	配列番号17のアミノ酸番号45~62
5	CHQQEGESMTFDPRLDHEGI	配列番号17のアミノ酸番号49~66
6	CDHEGICCEICRRSYTHCQK	配列番号17のアミノ酸番号63~80
7	CTHCQKICEPLGGYYPWPYN	配列番号17のアミノ酸番号77~94
8	CKICEPLGGYYPWPYNYQGC	配列番号17のアミノ酸番号81~98
9	CYQGCRSACRVIMPCSWWVA	配列番号17のアミノ酸番号95~112
10	CACRVIMPCSWWVARILGMV	配列番号17のアミノ酸番号102~120
11	EGESMTFDPRLDHEGICC	配列番号17のアミノ酸番号52~69
12	SMTFDPRLDHEGICCEIC	配列番号17のアミノ酸番号55~72
13	FDPRLDHEGICCEICRRSGC	配列番号17のアミノ酸番号58~75
14	GICCEICRRSYTHCQKIC	配列番号17のアミノ酸番号66~83
15	CRRSYTHCQKICEPLGGY	配列番号17のアミノ酸番号72~89

【0073】

各ペプチドをPBSで希釈して固相化し、BSAでブロッキングをおこなったエピトープ解析用ELISAプレートに対して、本モノクローナル抗体を添加し、各ペプチドと本モノクローナル抗体との反応性を解析した。エピトープ解析用ELISAプレートに対し、本モノクローナル抗体を3μg/ウェルにて添加した後4℃で一晩反応させた。

【0074】

この後、0.05% Tween20を含むPBS液（以下「PBST液」と略す）を用いて十分な洗浄を行ない、HRP（西洋わさびペルオキシターゼ）標識ヤギ抗マウスIgG・Fcポリクローナル抗体（ICN社製）1 µg/mlおよび1% BSAを含むPBSを100 µlずつウェルに添加し、さらに室温で1時間反応させた。PBST液で十分に洗浄操作を行った後、0.4mg/mlオルトフェニレンジアミン（OPD、Sigma社製 P-9029）および0.015~0.03%過酸化水素溶液を含むクエン酸-リン酸緩衝液（pH5.0）を添加して室温にて反応させ、発色を行なった。この後1 N H₂SO₄溶液を添加して反応を止め、測定波長490nm、リファレンス波長650nmにて測定を行なった。

【0075】

その結果、配列番号6に示すアミノ酸配列を有するペプチド配列番号13、14、15に示すアミノ酸配列を有するペプチドを用いた反応においてのみ、発色が見られた。このことより、実施例1で作製・精製した抗Chm-1モノクローナル抗体（抗Chm-1-hFcモノクローナル抗体）はChm-1のうち、配列番号16に示すアミノ酸配列：RRSY（配列番号17に示すChm-1のアミノ酸配列中のアミノ酸番号73~76に相当）の部位を認識していることが分かった。また、Chm-1-hFcおよび全長Chm-1との反応性と比べてペプチドとの反応性が総じて低いことから、本モノクローナル抗体は、立体構造を保っている方が親和性が高いと考えられる。

【0076】

公知のChm-1を認識する抗体としては、開ら（Funaki et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science (2001) Vol.42, No.6, p.1193-1200）により、配列番号18に示すラットChm-1の部分アミノ酸配列：PSTTRRPHSE PRGNAGPGRLSNRTRP（配列番号17に示すヒトChm-1のアミノ酸配列中のアミノ酸番号8~34に対応）を有するペプチドを免疫して取得された抗ラットChm-1ポリクローナル抗体、及び、Neameら（Azizan et al., J. Biol. Chem. (2001) Vol.276, No.26, p.23632-638）により、配列番号19に示すウシChm-1の部分アミノ酸配列：DNPYHQEGE SMTFDPRLC（配列番号17に示すヒトChm-1のアミノ酸配列中のアミノ酸番号45~63に対応）を有するペプチドを免疫して取得された抗ウシChm-1ポリクローナル抗体が知られていた。これらの抗体は、いずれもサンドイッチアッセイが可能なものではなく、生体成分中のChm-1の免疫学的測定はできなかった。

【0077】

上記配列番号16に示すアミノ酸配列：RRSY（配列番号17に示すヒトChm-1のアミノ酸配列中のアミノ酸番号73~76に相当）の部位を認識する抗Chm-1抗体は知られておらず、今回の検討により本発明者らにより初めて取得されたものである。また上記実施例3で示した通り、この抗体はサンドイッチアッセイが可能であり、後述する実施例7及び8の通り、生体成分中のChm-1の測定が可能なるものである。かかる特徴を有する抗体は、本発明者らの知る限り、本発明により初めて提供されたものである。

【実施例6】

【0078】

<還元条件下で変性したChm-1に対する抗Chm-1モノクローナル抗体の反応性>
この方法は、タウビンらの方法に準じて行った（Towbinら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol.76, p.4350-4354 (1979)）。即ち、還元条件下で開らの方法に準じてChm-1（Chm-1-hFc、全長Chm-1）を発現させたCHO細胞（Eur. J. Biochem. Vol.260, p.869-878 (1999)）の培養上清をSDS-PAGE後、ゲルをPVDF膜と合わせ、ゲルのある側を-極、PVDF膜のある側を+極として電流を流し、ゲル上で泳動された蛋白質をPVDF膜にプロットした。プロットされたPVDF膜を5%スキムミルク含有PBS液に浸してブロッキングを行った後、一次抗体として上記で取得したモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を反応させた。膜をPBST液洗浄後、二次抗体としてHRP標識ヤギ抗マウスIgG・Fcポリクローナル抗体（DAKO社製）を添加して、5%スキムミルク含有PBS液中で反応させた。さらにPBST液で洗浄後、ワーキング溶液を加えて発色させ、その反応性を確認した。この試験により、実施例1で作製・精製した抗Chm-1モノクローナル抗体（抗Chm-1-hFcモノクローナル抗体）及び抗全長

Chm-1ポリクローナル抗体は、還元条件下で変性したChm-1 (Chm-1-hFc及び全長Chm-1) に結合することが明らかになった。

【実施例 7】

【0079】

< 健常人血液中における Chm - 1 の測定 >

実施例 3 で作製した Chm - 1 特異的高感度測定系を用いて、健常人 48 人の血清を測定した。健常人血清は採取後に凍結して保存され、本実験の直前に解凍して使用した。まず実施例 3 で作製した一次抗体付着後にブロッキング操作を行った 96 ウェルプレートに対し、あらかじめ 0.60M NaCl, 20mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.5 を 50 μ l ずつウェルに添加し、さらに健常人の血清または標準 Chm - 1 (0、50、100、200、400、800 ng/ml) を 50 μ l ずつ添加した。この後、室温にて 3 時間反応させ、500mM NaCl, 0.05% Tween 20, 20mM Tris-HCl pH7.5 を組成とする洗浄液を使用して十分な洗浄を行った後、実施例 3 で作製した抗 Chm - 1 ポリクローナル抗体 10 μ g/ml および 5% スキムミルクを含む PBS を 100 μ l ずつウェルに添加し、室温にて 1.5 時間反応させた。次に上記の洗浄液を使用して十分な洗浄を行い、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (SBA) を 8000 倍希釈した 5% スキムミルクを含む PBS を 100 μ l ずつウェルに添加し、さらに室温で 1 時間反応させた。

10

【0080】

洗浄液で十分に洗浄操作を行った後、0.4mg/ml オルトフェニレンジアミン (OPD、Sigma 社製 P-9029) および 0.015 ~ 0.03% 過酸化水素溶液を含むクエン酸 - リン酸緩衝液 (pH5.0) を 100 μ l /ウェルずつ添加して室温にて反応させ、発色を行った。この後 1 N H₂SO₄ 溶液を 100 μ l /ウェルずつ添加して反応を止め、測定波長 490nm、リファレンス波長 650nm にて測定を行った。この後、標準 Chm - 1 濃度とその発色量による検量線を作製し、健常人血清中の濃度を算出した。この結果を図 5 に示す。健常人血清 (検体数 45) においては、13.8 ng/ml から 99.8 ng/ml までの範囲を示し、平均は 51.6 ng/ml であった。

20

【実施例 8】

【0081】

< 各種ヒト疾患患者血液中における Chm - 1 の測定 >

実施例 3 で作製した Chm - 1 特異的測定系を用い、実施例 5 の方法に従って各種ヒト疾患 (関節リウマチ、自己免疫疾患、膵癌、及び肝癌) の患者血清を測定した。患者数は、各疾患で 5 例 (自己免疫疾患は 4 例) とした。各血清は採取後に凍結して保存され、本実験の直前に解凍して使用した。その結果を表 2 に示す。関節リウマチ、自己免疫疾患、膵癌、肝癌の患者血液中には、健常人 (検体数 45、平均値 51.62ng/ml) と比較して Chm - 1 の濃度が有意に高値であることが判った。

30

【0082】

【表 3】

表 3 各種ヒト疾患患者血液中における Chm - 1 量

症例	患者 1	患者 2	患者 3	患者 4	患者 5
関節リウマチ	231.4	225.9	128.7	125.6	129.5
自己免疫疾患	374.7	295.6	157.9	109.4	
膵癌	577.0	350.9	313.2	252.8	152.9
肝癌	318.8	216.9	203.7	462.7	182.3

40

数値は Chm - 1 濃度 [ng/mL]

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図 1】図 1 は、実施例 1 で得られたモノクローナル抗体の抗原 (Chm-1-hFc) に対する

50

親和性（反応性）を示した図である。横軸は抗体濃度（0～1000ng/ml）、縦軸はシグナル強度を示す。

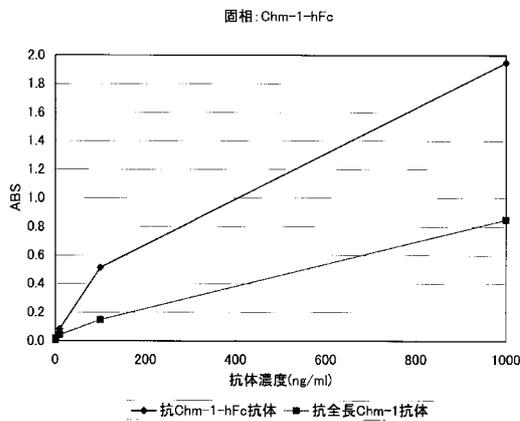
【図2】図2は、実施例1で得られたモノクローナル抗体の抗原（全長Chm-1）に対する親和性（反応性）を示した図である。横軸は抗体濃度（0～1000ng/ml）、縦軸はシグナル強度を示す。

【図3】図3は、Chm-1測定系における標準Chm-1とモノクローナル抗体との反応性を示した図である。横軸は試料中のChm-1の濃度（0～800ng/ml）、縦軸はシグナル強度を示す。

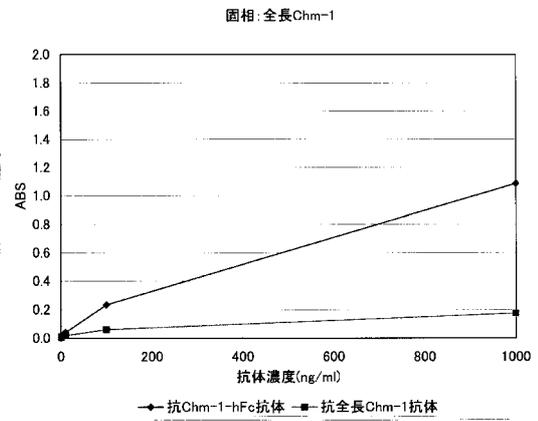
【図4】図4は、抗Chm-1特異的モノクローナル抗体の解離定数の測定結果である。横軸は、時間（秒）を示し、縦軸は、シグナル強度を示す。

【図5】図5は、健常人血清中におけるChm-1量のヒストグラムを示した図である。横軸は血清中のChm-1濃度を示し、縦軸は頻度を示す。

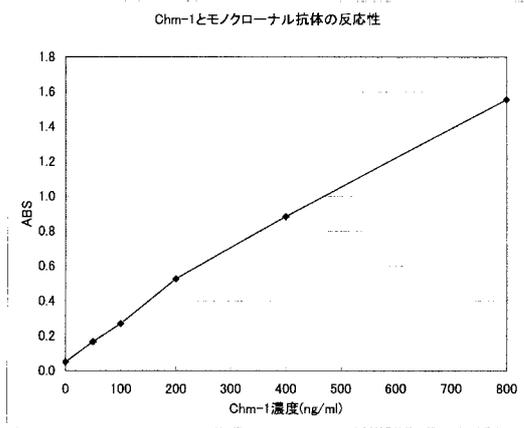
【図1】



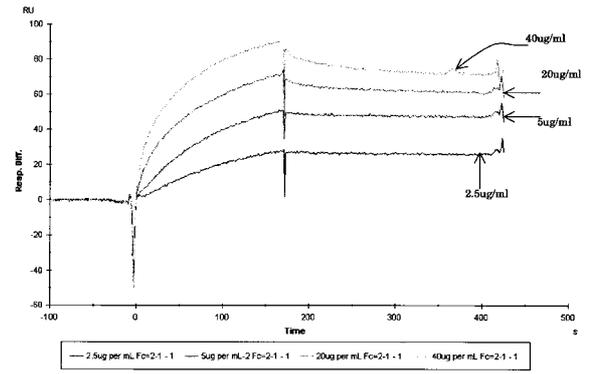
【図2】



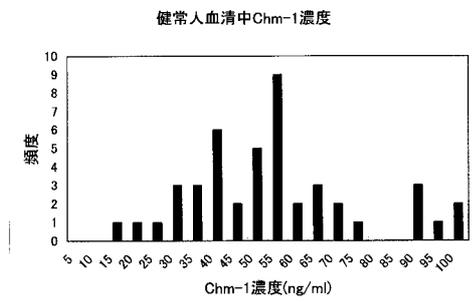
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

[2005314397000001.app](#)

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 33/577	C 1 2 N 5/00	B
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A

(72)発明者 長池 一博

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 株式会社三菱化学科学技術研究センター内

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA44 BA80 CA07 DA02 EA04 GA03 GA11 HA08 HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA90X AA90Y AB01 AB02 AC14 BA01 BA08 CA24 CA25 CA44
CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 BA09 BA41 CA40 DA76 DA86 EA20 EA50
FA74

专利名称(译)	抗放线菌素-1特异性抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2005314397A	公开(公告)日	2005-11-10
申请号	JP2005099047	申请日	2005-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	三菱化学株式会社		
申请(专利权)人(译)	三菱化学株式会社		
[标]发明人	鈴木佳子 山岸俊哉 長池一博		
发明人	鈴木佳子 山岸俊哉 長池一博		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/435 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C07K14/435 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N5/00.B C12N15/00.A C12N5/00.102 C12N5/12		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2004107619 2004-03-31 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供特异性识别Chm-1的抗体，以及使用该抗体测量生物样品中Chm-1水平的方法等。ŽSOLUTION：抗软骨素1特异性抗体能够特异性识别生物样品中的软骨调节素-1，并能够测量生物样品中的软骨调节素-1水平。该抗体用于测量生物样品中Chm-1水平的方法中。Ž

表1

融合後	7680	Well
1st Screening	119	個 Pickup
2nd Screening	19	個 Pickup
1st Cloning	11	株
3rd Screening	9	個 Pickup
2nd Cloning	7	株
4th Screening	7	個 Pickup
3rd Cloning	7	株
5th Screening	6	個 Pickup
4th Cloning	6	株
6th Screening	5	個 Pickup
大量培養	5	株