

(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2003－212900

(P2003－212900A)

(43)公開日 平成15年7月30日(2003.7.30)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 0 7 K 16/28		C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 4
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	Y 4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/48	P 4 C 0 8 5
G 0 1 N 33/48		33/53	Y 4 H 0 4 5
33/53		33/577	Z
審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 7 数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2002－9910(P2002－9910)

(22)出願日 平成14年1月18日(2002.1.18)

(71)出願人 501362814

株式会社 エーティーラボ
秋田県秋田市卸町3丁目4番2号

(71)出願人 502020951

杉山 俊博
秋田県秋田市御所野元町6丁目8－1

(72)発明者 杉山 俊博

秋田県秋田市御所野元町6丁目8－1

(72)発明者 寺田 邦彦

秋田県秋田市柳田字糠塚42 糠塚宿舍4－5
03

(74)代理人 100110537

弁理士 熊谷 繁 (外1名)

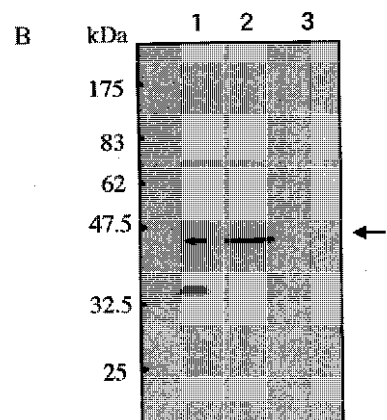
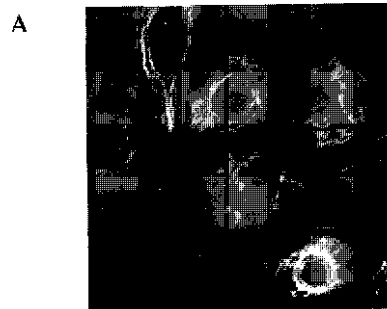
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 肝臓幹様細胞に対するモノクローナル抗体、ハイブリドーマ及びモノクローナル抗体を含む医薬並びに診断薬

(57)【要約】

【課題】 本発明の目的は、肝臓幹様細胞の抗原を認識する新規なモノクローナル抗体、肝臓幹様細胞の抗原を認識する新規なモノクローナル抗体を含む医薬、肝臓幹様細胞の抗原を認識するモノクローナル抗体と肝臓再生に関連した細胞移植治療や診断のための結合分子との結合体を含む、医薬または診断薬を提供することである。

【解決手段】 本発明のモノクローナル抗体は、肝臓幹様細胞の除核後画分（PNS）を用いたウエスタンブロッティング法により、肝臓幹様細胞に存在する分子量46 kD aの抗原を認識するものである。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 肝臓幹様細胞に存在する分子量46kDaの抗原を認識することを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項2】 ラットの肝臓の組織標本に対する反応性を免疫組織化学染色法で測定した場合、健常肝臓肝細胞に対する反応性よりも肝臓幹様細胞に対する反応性の方が同等もしくはそれ以上であ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。

【請求項3】 肝臓幹様細胞と同等な特徴を持つ脾臓・小腸に存在する幹様細胞を認識するモノクローナル抗体。

【請求項4】 SDラット健常肝臓から得た肝臓幹様細胞を動物に免疫し、前記動物から抗体産生細胞を単離し、これをミエロマ細胞と融合することによりハイブリドーマを作製し、次いで得られたハイブリドーマをスクリーニングすることにより得られる単一クローンのハイブリドーマにより産生されることを特徴とする請求項1から3の何れか1項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】 請求項1から3の何れか1項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6】 請求項1から3の何れか1項に記載のモノクローナル抗体を含む医薬。

【請求項7】 (a) 請求項1から3の何れか1項に記載のモノクローナル抗体；および(b) 抗癌化学療法剤、ラジオアイソトープ、蛋白性毒素、致死性蛋白、あるいはこれを発現する遺伝子を挿入した発現ベクター、酵素、ストレプトアビジンから成る群から選択される結合分子；の結合体を含む医薬または診断薬。

【請求項8】 肝臓幹様細胞の細胞移植治療または肝臓再生の診断用であることを特徴とする請求項7に記載の医薬または診断薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、肝臓幹様細胞を認識する新規なモノクローナル抗体、前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、前記モノクローナル抗体を含む医薬、並びに前記モノクローナル抗体と他の結合分子との結合体を含む医薬または診断薬に関する。

【0002】

【従来の技術】健常ラット肝臓より分離、培養されたいくつかの肝臓幹様細胞株が知られており、これらは未分化な性格を持ち、その形態的あるいは免疫組織学的性質は卵形細胞と類似している。Fischerラットから分離、培養された肝臓幹様細胞株WB-F344をN-methyl-N'-nitro-nitroguanidineで処理すると形質転換し、肝細胞癌だけでなく肝芽細胞腫、胆管細胞癌の形態をも示すことが報告されている。また、別の肝臓幹様細胞株RLEに癌遺伝子v-rafなどを導入すると肝細胞癌、肝芽細胞腫だけでなく様々に分化した上皮性腫瘍を形成する。以上のこ

とから、肝臓幹様細胞は、卵形細胞と同様に肝細胞あるいは胆管上皮細胞への分化能を有する肝幹細胞あるいは前駆細胞の候補の1つとして議論されている。しかしながら、肝臓幹様細胞に特異的で有用なマーカータンパク質が知られていないことから、肝臓幹様細胞が健常ラット肝臓のどこに局在し、由来するのかは未だ明らかにされていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明の目的の一つは、肝臓幹様細胞の抗原を認識する新規なモノクローナル抗体を提供することである。本発明の別の目的は、肝臓幹様細胞の抗原を認識する新規なモノクローナル抗体を含む医薬を提供することである。本発明のさらに別の目的は、肝臓幹様細胞の抗原を認識するモノクローナル抗体と肝臓再生に関連した細胞移植治療や診断のための結合分子との結合体を含む、医薬または診断薬を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明のモノクローナル抗体は、肝臓幹様細胞の除核後画分(PNS)を用いたウエスタンブロッティング法により、肝臓幹様細胞に存在する分子量46kDaの抗原を認識するものである。本発明の医薬は、肝臓幹様細胞の抗原を認識する新規なモノクローナル抗体を含むものである。本発明の医薬または診断薬は、肝臓幹様細胞の抗原を認識するモノクローナル抗体と肝臓再生に関連した細胞移植治療や診断のための結合分子との結合体を含むものである。

【0005】

【発明の実施の形態】健常成体ラット肝臓より分離、培養した肝臓幹様細胞に特異的なモノクローナル抗体を作製し、得られた抗体の臓器分布、抗原蛋白質の解析を行った。本発明のモノクローナル抗体の製造方法について、以下に説明する。本発明のモノクローナル抗体を得るための免疫原としては、肝臓幹様細胞を用いる。かかる細胞の単離のための源および単離方法は、特に限定されず、健常成体動物肝臓から単離される。Sprague-Dawley (SD) ラット(日本クレア)1匹より、Percoll (Pharmacia, Sweden) 密度遠心分離法にて得られた約 2×10^6 個の細胞は、培養7～10日後には少数の細胞がコロニーを形成し、培養10～14日後にクローニングを行い均一な細胞集団を分離した。これを継代培養し、細胞株を得た。図1に示すように、細胞から分画した除核後画分(PNS)中の蛋白質10 μ gを電気泳動し、ウエスタンブロッティング法にて、得られた細胞株の発現タンパク質を調べた結果、 α -フェトプロテイン陽性であったが、アルブミン、サイトケラチン18及びサイトケラチン19は陰性であった。なお、レーン1は肝臓幹様細胞で、レーン2は肝実質細胞画分である。このレーン1の肝臓幹様細胞に対する特異抗体、すなわちモノクローナル抗体を作製する。抗原として用いた肝臓幹様細胞

に対する抗体を産生していたクローンは最終的に26個であった。次に、健常ラット肝臓の免疫組織染色を行い、肝実質細胞を染色する抗体産生クローンを除いた。この結果、26個中5個のクローンが選択された。これらをマウス腹腔内に移植した。得られた腹水を用いて、肝臓幹様細胞から抽出したタンパク質をウエスタンブロッティング法で解析したところ、使用可能な抗体産生クローンは1個のみであることがわかり、このクローンをモノクローナル抗体、すなわちクローン#24抗体と名付けた。また、このクローン#24抗体のイムノグロブリンアイソタイプはIgMであることが明らかになった。図2Aに示すように、クローン#24抗体を用いて肝臓幹様細胞の蛍光免疫細胞染色を行うと、細胞質内が網状に染色され、抗原タンパク質は細胞質に局在することが、蛍光免疫細胞染色後の共焦点レーザー顕微鏡像から明らかになった。図2Bに示すように、20 μ gのタンパク質を12%ポリアクリルアミド電気泳動に供した後、肝臓幹様細胞の除核後画分(PNS)を用いたウエスタンブロッティング法では、約46kDaの位置にクローン#24抗体に反応するバンドを認めた。細胞分画を行うと、この抗原タンパク質は可溶性画分に分画され、細胞質タンパクであることがわかった。さらに上記のクローン#24抗体が、正常肝における肝臓幹様細胞の局在を明らかにした。健常ラット肝臓の凍結切片をクローン#24抗体を用いて免疫染色すると、この抗原タンパク質を発現している細胞は小葉間胆管近傍の細胆管様の小管腔に局在していた。また、クローン#24抗体は、肝臓幹細胞と同等な特徴を持つ脾臓・小腸に存在する幹様細胞をも認識した。クローン#24抗体は、ラットの肝臓の組織標本に対する反応性を免疫組織化学染色法で測定した場合、健常肝臓肝細胞に対する反応性よりも肝臓幹様細胞に対する反応性の方が同等もしくはそれ以上である。

【0006】また、ガラクトサミンを投与した急性障害肝モデルを作製し、これを用いて肝臓幹様細胞と卵形細胞との相違また急性障害肝における肝臓幹様細胞の機能、役割を明らかにした。クローン#24抗体による免疫組織染色において、ガラクトサミン投与後1日目から小葉間胆管を形成する胆管上皮細胞にクローン#24抗体の抗原タンパク質が発現していた。さらに、投与後2日目から3日目にかけては、増生した胆管と思われる管腔にもクローン#24抗体の抗原タンパク質が発現していた。ガラクトサミン投与後の広範な肝細胞壊死に引き続いて起こる胆管の増生は、既存する胆管上皮細胞の増殖によるものではないとされており、幹細胞の関与が示唆されている。本発明では、サイトケラチン7陰性でサイトケラチン18またはクローン#24抗体の抗原タンパク質を発現している胆管様管腔の増生が認められた。このような胆管様管腔は、肝臓幹様細胞が幹細胞として機能し、増生してきたものと考えられる。また、肝障害

が起こっている時期に一過性にクローン#24抗体の抗原タンパク質が発現し、回復とともにその発現が消失したことは、肝障害により肝臓幹様細胞が活性化され増殖し、胆管上皮細胞への分化とともに発現がなくなったものと考えられた。すなわち、クローン#24抗体の抗原タンパク質の発現が肝臓幹様細胞から胆管上皮細胞への分化、成熟過程を反映しているものと考えられた。

【0007】肝臓幹様細胞の肝臓内の局在については、肝臓幹様細胞に特異的なマーカータンパク質が同定されていないことから今まで明らかにされていない。そこで、株化した肝臓幹様細胞をそのままマウスに注射して、免疫し、肝臓幹様細胞に特異的なタンパク質に対するモノクローナル抗体、すなわちクローン#24抗体を作製することを試みた。本発明で得られたクローン#24抗体に対する抗原タンパク質は、細胞質画分に分画されるタンパク質であり、また細胞内に網状に分布していたことから、細胞骨格系のタンパク質であることが示唆された。クローン#24抗体と細胞骨格タンパクであるpan-cytokeratin抗体との二重染色の結果から、pan-cytokeratinの一部と局在が一致し、クローン#24抗体の抗原タンパク質はサイトケラチンの一種であると推察された。

【0008】

【実施例】以下の実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこの実施例によって限定されるものではない。

【0009】6～9週齢のSprague-Dawley (SD) ラット(日本クレア)をジエチルエーテル麻酔下で開腹し、門脈より200mlの前灌流液(36.9 mM NaCl/ 5.4 mM KCl / 0.7 mM NaH₂PO₄/ 1.1 mM Na₂HPO₄/ 10.0 mM HEPES/ 0.5 mM EDTA/ 0.035% NaHCO₃/0.1% glucose/ 0.0006% phenol red [pH 7.2])を流した後に、80mlの0.1%コラゲナーゼ溶液(36.9 mM NaCl/ 5.4 mM KCl/ 0.7 mM NaH₂PO₄/ 1.1 mM Na₂HPO₄/ 10.0 mM HEPES/ 0.1% コラゲナーゼ[和光] / 0.05% トリプシンインヒビター[和光] / 50 mM CaCl₂/ 0.035% NaHCO₃/ 0.0006% phenol red [pH 7.5])で肝臓を灌流した。摘出した肝臓を0.1%コラゲナーゼ溶液中で細切した後、細胞懸濁液を調製し、細胞ろ過器に通した。ろ過されずに残った細胞成分を胆管上皮細胞の豊富な画分として回収した。

【0010】次に、ろ過した細胞懸濁液を50 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、1分間遠心し大部分の肝実質細胞を沈殿させ除去した。この遠心上清を再び150 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、5分遠心し非実質細胞を沈渣として回収し、さらにMinimum Essential Medium (Gibco BRL, USA)で洗浄し、肝非実質細胞画分とした。この画分を0.1%アクチナーゼ溶液(36.9 mM NaCl/ 5.4 mM KCl / 0.7 mM NaH₂PO₄/ 1.1 mM Na₂HPO₄ / 0.1% アクチナーゼE [科研製薬] / 0.25% トリプシン[ナカライ])で37 $^{\circ}$ C、60分間反応させ、残存した肝実質細胞を消化した後、1.035g/mlと1.070g/mlとなるよう

に調製したPercoll (Pharmacia, Sweden) 密度勾配に供し、ZS遠心機 (Edmund Buhler, Germany) で2,000回転、5分遠心し1.035g/mlと1.070g/mlの界面に分離された細胞画分を採取した。

【0011】得られた細胞は、10%牛胎児血清 (Sigma, USA)、10-8M インスリン (和光)、10-6M デキサメサゾン (和光) を含むWilliams' E培地 (Gibco) に懸濁し、直径60mmのコラーゲンコートプレート (岩城硝子) に5.0×105個播種した。培養10～14日後に、コロニーを形成した細胞をクローニングした後は、10%牛胎児血清を含むDMEM (Sigma) を培地とし、培養を続けた。

【0012】SDラット1匹より、Percoll密度1.035g/mlと1.070g/mlの界面に分離された細胞は約2×106個で、これらの細胞の生存率は約90%であった。培養直後は少数の肝実質細胞などが含まれていたが、培養過程で消失した。培養7～10日後には少数の細胞がコロニーを形成し、培養10～14日後にクローニングを行い均一な細胞集団を分離した。これを継代培養し、細胞株を得た。これらの細胞は、直径約10μmから15μmほどで疎な細胞質を持ち、高い核・細胞質比を示し、培養皿上で単層に増殖した。

【0013】免疫細胞染色法及びウエスタンブロッティング法にて、得られた細胞株の発現タンパク質を調べた結果、α-フェトリン陽性であったが、アルブミン、サイトケラチン18及びサイトケラチン19は陰性であった。(図1を参照)

【0014】この細胞に対する特異抗体、すなわちモノクローナル抗体の作製を試みた。本発明のモノクローナル抗体は、SDラット健常肝臓から得た肝臓幹様細胞を動物に免疫し、前記動物から抗体産生細胞を単離し、これをミエローマ細胞と融合することによりハイブリドーマを作製し、次いで得られたハイブリドーマをスクリーニングすることにより得られる単一クローンのハイブリドーマにより産生される。6週齢のBALB/cマウス (日本クレア) の腹腔内に、PBSに分散させた肝臓幹様細胞1.0×107個を2週間隔で計3回投与し免疫した。その後、常法 (Harlow E., Lane D., 1988) によりマウス脾細胞とマウス形質細胞腫株P3U1 (ヒューマンサイエンス研究資源バンクより供与) をポリエチレングリコール (Boehringer, Germany) を用いて細胞融合させハイブリドーマを作製した。

【0015】特異抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングは以下に行った。まず96穴プレート上に肝臓幹様細胞を播種し、ハイブリドーマ培養上清を1次抗体として用いて蛍光免疫細胞染色し、抗体産生ハイブリドーマを同定した。次に、限界希釈にて単一となったクローンを分離、培養し、培養上清を1次抗体として用いて抗体産生クローンを蛍光免疫細胞染色で確認した。さらに、健常ラット肝臓の凍結切片を作製し、ハイブリドーマ培養上清を1次抗体として用いて免疫組織化

学染色し、肝細胞を染色しない抗体を産生するクローンを選別した。選別されたハイブリドーマクローンを、あらかじめ腹腔内にプリスタン (Sigma) を投与したBALB/cマウスの腹腔内に移植し、産生された腹水を回収した。以後、この腹水を抗体として用い、Monoclonal Sub-Isotyping Kit (AmericanQualex, USA) で抗体のアイソタイプの同定を行った。

【0016】細胞融合にて得られたハイブリドーマクローンは計787個であった。これらのうち、抗原として用いた肝臓幹様細胞に対する抗体を産生していたクローンは82個であった。さらに、限界希釈を2回行い、確立されたモノクローナルなクローンは26個であった。

【0017】次に、肝臓幹様細胞に対して特異的な抗体を産生するクローンを選別するために、健常ラット肝臓の免疫組織染色を行い、肝実質細胞を染色する抗体産生クローンを除いた。この結果、26個中5個のクローンが選択された。

【0018】これらをマウス腹腔内に移植した。得られた腹水を用いて、肝臓幹様細胞から抽出したタンパク質をウエスタンブロッティング法で解析したところ、使用可能な抗体産生クローンは1個のみであることがわかり、このクローンをクローン#24抗体と名付けた。また、このクローン#24抗体のイムノグロブリンアイソタイプはIgMであることが明らかになった。

【0019】クローン#24抗体を用いて肝臓幹様細胞の蛍光免疫細胞染色を行うと、細胞質内が網状に染色され、抗原タンパク質は細胞質に局在することが明らかになった。(図2Aを参照)

【0020】肝臓幹様細胞の除核後画分 (PNS) を用いたウエスタンブロッティング法では、約46kDaの位置にクローン#24抗体に反応するバンドを認めた。(図2Bを参照)

細胞画分を行うと、この抗原タンパク質は可溶性画分に画分され、細胞質タンパクであることがわかった。

【0021】健常ラット肝臓の凍結切片をクローン#24抗体を用いて免疫染色すると、この抗原タンパク質を発現している細胞は小葉間胆管近傍の細胆管様の小管腔に局在していた。その他の肝実質細胞などは染色されなかった。ウエスタンブロッティング法でも、肝実質細胞画分および胆管上皮細胞画分から得られた細胞抽出液中には、クローン#24抗体に対する抗原タンパク質を認めなかった。

【0022】急性肝障害モデルを作製するため、ガラクトサミンを健常ラットの腹腔内に投与した。クローン#24抗体を用いての免疫組織染色では、ガラクトサミン投与後1日目から小葉間胆管を形成する胆管上皮細胞の一部で、クローン#24抗体の抗原タンパク質が発現し、発現している細胞は投与後3日にかけて増加した。投与後5日になると、小葉間胆管での発現は消失した。また、投与後1日から投与後3日にかけて小葉間胆管の

周囲の増生した細胆管様の管腔でクローン#24抗体の抗原タンパク質が発現していた。(図3を参照)

【0023】応用分野として、前記モノクローナル抗体と、抗癌化学療法剤、ラジオアイソトープ、蛋白性毒素、致死性蛋白、あるいはこれを発現する遺伝子を挿入した発現ベクター、酵素、ストレプトアビジンから成る群から選択される結合分子と、の結合体を含む医薬または診断薬がある。さらに、前記医薬または診断薬は、肝臓幹様細胞の細胞移植治療用または肝臓再生の診断用である。

【0024】

【発明の効果】本発明は、肝臓幹様細胞のモノクローナ

ル抗体を用いると、肝臓再生に関連した細胞移植治療に必要な肝臓幹細胞を同定・分離することができる。また、肝障害時に出現する幹細胞を測定することにより、診断や予後を判定できる。

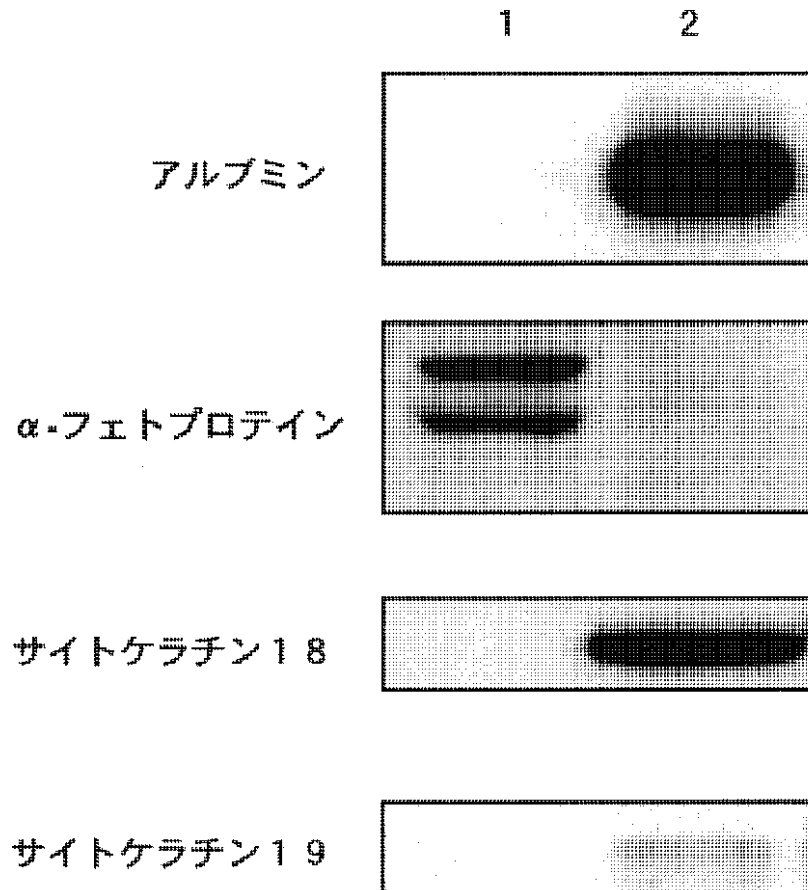
【図面の簡単な説明】

【図1】肝臓幹様細胞が発現するタンパク質のウエスタンブロッティング法による解析図である。

【図2】(A)モノクローナル抗体を用いた蛍光免疫細胞染色撮像と(B)ウエスタンブロッティング法による解析図である。

【図3】モノクローナル抗体を用いたガラクトサミン投与後のラット肝臓の免疫染色撮像である。

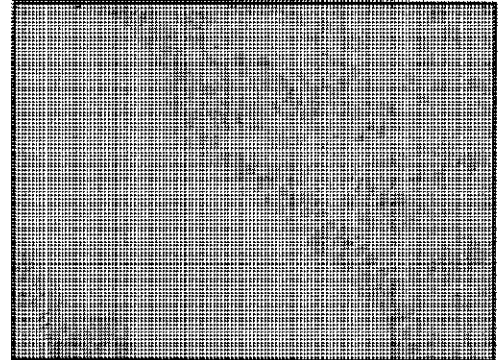
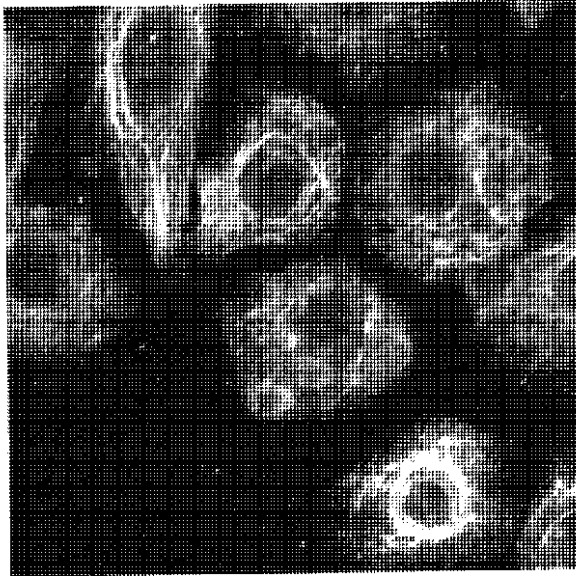
【図1】



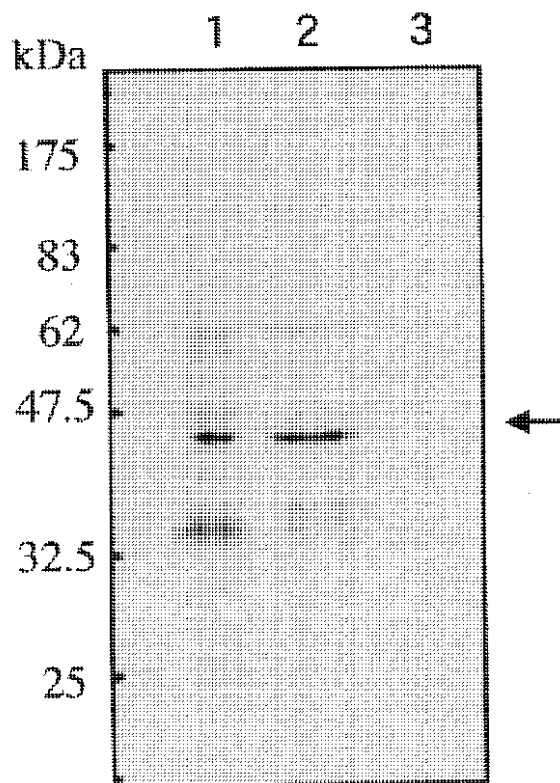
【図2】

【図3】

A



B



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/577

// C 1 2 P 21/08

識別記号

F I

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 5/00

テーマコード^{*} (参考)

B

(72)発明者	寺田 邦彦 秋田県秋田市柳田字糠塚42 糠塚宿舎 4-503	Fターム(参考)	4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13 4B065 AA90X AB05 BA02 CA25 CA44 CA46
(72)発明者	渡辺 剛 秋田県秋田市広面字谷地田46-2 ラステ ィック I I 203		4C085 AA14 AA25 AA26 AA27 BB01 CC03 EE01 EE03
(72)発明者	佐野 公彦 秋田県秋田市卸町 3 丁目 4 番 2 号 株式会 社エーティーラボ内		4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72

专利名称(译)	针对肝干样细胞的单克隆抗体，包括杂交瘤和单克隆抗体和诊断剂的药物		
公开(公告)号	JP2003212900A	公开(公告)日	2003-07-30
申请号	JP2002009910	申请日	2002-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	普洱茶实验室 杉山俊		
申请(专利权)人(译)	公司洱茶实验室 杉山俊		
[标]发明人	杉山俊博 寺田邦彦 渡辺剛 佐野公彦		
发明人	杉山 俊博 寺田 邦彦 渡辺 剛 佐野 公彦		
IPC分类号	G01N33/48 A61K39/395 C07K16/28 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/28 A61K39/395.Y G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/577.Z C12P21/08 C12N5/00.B C12N15/00.K C12N15/873.Z C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AB05 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA25 4C085/AA26 4C085/AA27 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/BB10 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/BB25 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB26 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FA12 2G045/FA16 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB07 2G045/FB11 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/GC22 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA53 4B024/GA01 4B024/HA11 4B024/HA15		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种识别肝干样细胞的抗原的新型单克隆抗体，包含识别肝干样细胞的抗原的新型单克隆抗体和识别肝干样细胞的抗原的单克隆药物。 本发明旨在提供包含抗体和结合分子的缀合物的药物或诊断剂，用于与肝再生有关的细胞移植治疗或诊断。 本发明的单克隆抗体通过使用肝干样细胞的去核后级分 (PNS) 通过蛋白质印迹法识别存在于肝干样细胞中的分子量为46kDa的抗原。

