

(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2001 - 124778

(P2001 - 124778A)

(43)公開日 平成13年5月11日(2001.5.11)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト [*] (参考)
G 0 1 N 33/574		G 0 1 N 33/574	A 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/02	ZNA	33/53	L 4 B 0 6 4
G 0 1 N 33/53		C 0 7 K 16/18	4 H 0 4 5
// C 0 7 K 16/18		C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08		C 1 2 N 15/00	ZNA C
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 19数)			

(21)出願番号 特願2000 - 127207(P2000 - 127207)

(22)出願日 平成12年4月27日(2000.4.27)

(31)優先権主張番号 特願平11 - 229015

(32)優先日 平成11年8月13日(1999.8.13)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000004466

三菱瓦斯化学株式会社

東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

(72)発明者 立川 智一

新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱瓦

斯化学株式会社新潟研究所内

(72)発明者 中野 昌彦

新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱瓦

斯化学株式会社新潟研究所内

(72)発明者 山崎 雅俊

新潟県村上市飯野3丁目3番5号

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ガン特異タンパク質の測定方法およびガンの診断方法

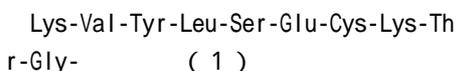
(57)【要約】

【課題】 簡便で有効なガンの免疫学的診断方法を提供する。

【解決手段】 ヒトガン患者尿中に存在し、血管内皮細胞増殖抑制活性を有し、還元条件下のドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定される分子量が38,000、42,000または45,000であり、アミノ基末端アミノ酸配列がLys-Val-Tyr-Leu-Ser-Glu-Cys-Lys-Thr-Gly-またはVal-Tyr-Leu-Ser-Glu-Cys-Lys-Thr-Gly-であるタンパク質に結合する抗体または該抗体フラグメントを使用してヒト尿中の該タンパク質を測定する。

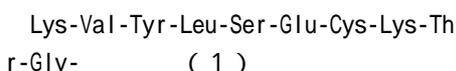
【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトガン患者尿中に存在し、血管内皮細胞増殖抑制活性を有し、還元条件下のドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定される分子量が38,000、42,000または45,000であり、アミノ



【請求項2】 使用する抗体がヒトセプティシン-Lys-Lys-Thr-Glyに結合可能な抗体である請求項1記載の測定方法。

【請求項3】 ヒトガン患者尿中に存在し、血管内皮細胞増殖抑制活性を有し、還元条件下のドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定さ



【請求項4】 使用する抗体がヒトセプティシン-Lys-Lys-Thr-Glyに結合可能な抗体である請求項3記載のガンを診断する方法。

【請求項5】 診断するガンが遠隔転移を有するガンである請求項3記載のガンを診断する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒトガン患者尿中に特異的に検出されるタンパク質の測定方法を提供するものである。さらにヒト生体内の該タンパク質の動態を測定することによって、ガンの診断、病態把握、予後の管理を行う方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】アンジオスタチンはM.S.O'Reillyらによって1994年に初めて報告された血管新生抑制因子である(O'Reillyら、Cell、79:315(1994))。彼らは、マウス皮下にルイス肺ガン細胞を移植し、皮下の原発巣が存在する間は肺転移巣は微小にとどまるが、原発巣を除去した場合に肺転移巣が急激に増大することを観察した。そして、この現象は皮下のガン組織が血管新生抑制因子を放出し、それが肺転移巣の血管新生を阻害して転移巣を微小の状態に保っており、皮下ガン組織を切除することによってこの因子の産生消失を介して血管新生抑制効果が消失し転移巣が増大することを明らかにした。そしてマウスから得られたこの因子を同定した結果、マウスプラスミノゲンの内部構造フラグメントと98%以上一致するタンパクであり、非還元下SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分子量38,000の単一の蛋白性因子であることを見だしアンジオスタチンと命名して報告した。マウスアンジオスタチンはマウスプラスミノゲンのアミノ酸の一次構造において、アミノ酸番号98番目からはじまるフラグメントで、そのアミノ基末端アミノ酸一次構造は、Val-Tyr-Leu-Ser-Glu-X-Lys-Thr-Gly-(Xは未決定)であり(O'Reillyら、Cell、79:315(1994))、プラスミノゲン中の5個のクリングル構造(K1、K2、K3、K4、K5)のうちK1~K4を含む領域と

*ノ基末端アミノ酸配列が下記式(1)または式(2)であるタンパク質に結合する抗体または該抗体フラグメントを使用することを特徴とするガン特異タンパク質の測定方法。

れる分子量が38,000、42,000または45,000であり、アミノ基末端アミノ酸配列が下記式(1)または式(2)であるタンパク質に結合する抗体または該抗体フラグメントを使用してヒト尿中の該タンパク質を測定することを特徴とするガンを診断する方法。

考えられている。また、O'Reillyらはヒトプラスミノゲンをエラスターゼで限定分解して得られるヒトプラスミノゲンフラグメント、すなわち、ヒトプラスミノゲンのアミノ酸一次構造においてアミノ酸番号97番目あるいは99番目からはじまるK1~K3を含むプラスミノゲンフラグメントを坦ガンマウスに有効量投与したところ、転移巣の成長が抑制されることを突き止めた(O'Reillyら、Cell、79:315(1994))。さらにこのフラグメントは、ヒトガン細胞の増殖を抑制することが報告された(O'Reilly M.S.ら、Nature med.、2:689(1996))。

【0003】その後、Cao Y.らによって、K1~K4のフラグメントよりK1~K3のフラグメントの方が血管新生抑制活性が高いこと、K1、K2、K3はそれぞれ単独でも弱いながら血管新生抑制活性を持つがK4にはその活性がないこと、ジスルフィド結合(S-S)によりK2とK3の間が結合しているK2~K3フラグメントを投与した場合は血管新生抑制活性は弱いものの、K2フラグメントとK3フラグメントとをそれぞれ同時投与した場合はそれぞれの相加的効果を発揮することから、K2とK3の間のジスルフィド結合の解離が血管新生抑制活性に重要な働きをしていることが示された(Cao Y.ら、J.Biol.Chem.、271:29461(1996))。さらに、K5も単独で強い血管内皮細胞増殖抑制活性を有することも報告されている(Cao Y.ら、J.Biol.Chem.、272:22924(1997))。

【0004】これまでに、ヒトガン患者生体内にプラスミノゲンフラグメントが存在することを示した報告として特開平9-178744がある。ここで検出されたヒト血液中に存在するプラスミノゲンフラグメントは分子量60,000~75,000の4種類の蛋白であり、O'Reillyらによってマウス尿中から検出されたアンジオスタチンとは異なる分子量を有するものであった。このタンパク質を測定するには、プラスミノゲンとプラスミノゲンフラグメントが同一の抗原性を有することから直接的に血液試料中のプラスミノゲンとプラスミノゲンフラグメントを区別して測定することは困難とされている。この

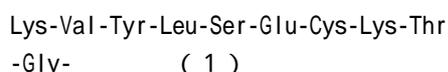
ため特開平9-178744では、目的とするプラスミノゲンフラグメントを除く他の夾雑物質を除去した後に、目的のプラスミノゲンフラグメントを測定するという技術的な特徴が記載されている。また、M.Sten-Linderらは、ヒトガン患者尿中に非還元下で分子量39,000、45,000、50,000のプラスミノゲンフラグメントが存在することを報告している(M.Sten-Linderら *Anticancer Res.*, 19: 3409 (1999))。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】このようにヒトガン患者生体内に、アンジオスタチンあるいは同様の活性を有する他のプラスミノゲンフラグメントが存在するかどうか、さらにこれらを予め前処理を施すことなく簡便に測定する具体的方法はこれまでに明らかとなっていない。ヒトガン患者生体内でこのような物質が存在して実際にガン細胞の増殖、転移に関与することが明らかとなり、このタンパクの簡便な検出方法が確立されれば、基礎医学、臨床医学において極めて重要な意味をもつ。

【0006】

【課題を解決するための手段】このような問題点を鑑み本願発明者は鋭意研究の結果、還元下SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定される分子量が38,000、42,000および45,000でありプラスミノゲンと免疫学的に区*



また、いずれの分子量のタンパク質も、式(1)で示されるタンパク質の方が式(2)で示されるタンパク質よりも多量に含まれていた。またこれらのタンパク質は、マウスから発見されたアンジオスタチン同様に、血管内皮細胞増殖抑制活性を有しており、これら新規タンパク質がヒトガン患者生体内で血管新生抑制活性を介して転移巣の成長抑制を担う物質としてアンジオスタチン以上に機能しているものと考えられた。

【0008】これらのヒトガン患者生体内に存在する血管内皮細胞増殖抑制活性を有し、還元条件下のドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定した分子量が38,000、42,000または45,000であり、アミノ基末端アミノ酸配列が式(1)または式(2)で示されるタンパク質は、プラスミノゲンと免疫学的に区別することができなかつた。このため、プラスミノゲンが多量に含まれる血液を試料とした場合の直接的測定は困難であった。しかし、ヒト尿中には免疫学的にプラスミノゲンと区別できないタンパク質は前記の6種類のタンパク質以外には存在しなかつた。したがって、尿を試料とすることによりこのプラスミノゲンの影響を受けることなくこのガン特異タンパク質を予め夾雑物質を除去する操作を行う必要なく直接的に測定が可能であることを見出し本発明に至った。さらに、本発明のガン特異タンパク質の測定用試料は尿には限定されず、前記のガン特異タンパク質以外にプラスミノゲ

*別できないタンパク質が、ヒトガン患者の尿中に特異的に存在することを発見した。即ちこれらのタンパク質は健康者の尿中には存在しなかつた。さらに、ヒト尿中にはこれらのガン特異タンパク質以外の免疫学的にプラスミノゲンに類似したタンパク質が存在しないことも見いだした。これらの発見により、尿を試料とすることによって予め夾雑物質を除く処理を行うことなく前記のタンパク質を直接的に測定することが可能となった。すなわち、プラスミノゲンと構造上極めて類似するタンパク質の測定に際して、血液を試料とした免疫学的測定法では予め前処理を行わなければならないものの、尿を試料とすることによって、前処理の必要なく直接的にこれらの免疫学的測定が可能であることを見だし本発明に到達した。

【0007】ガン患者尿中から特異的に検出された分子量38,000、42,000、45,000のタンパク質は、いずれも下記式(1)と式(2)で示されるアミノ基末端アミノ酸配列を有するものの混合物であり、計6種類のタンパク質からなる。このタンパク質のうちの一つはM.S.O'Reillyらによって坦ガンマウス尿中から発見されたアンジオスタチンと同一の分子量、同一のアミノ基末端配列を持つタンパク質ではあつたが、他の5種類は明らかに新規なタンパク質であつた。

ンと免疫学的に区別できないタンパク質を含まない試料であれば測定可能であり、例えばある種の細胞培養上清等を試料とすることもできる。

【0009】本発明は、これらのガン特異タンパク質に結合する抗体を用いたガン特異タンパク質の測定方法に関するものである。さらに、この測定法を用いて、ヒト尿中に含まれるこのガン特異タンパク質を測定、検出することによるガンの診断またはその予後を診断する方法に関するものである。ここでいうガン特異タンパク質とは、ヒトガン患者生体内に存在し、血管内皮細胞増殖抑制活性を有し、還元条件下のドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定した分子量が38,000、42,000または45,000であり、アミノ基末端アミノ酸配列が式(1)または式(2)で示されるタンパク質の意である。

【0010】本発明に使用するヒトガン患者尿中に存在し、血管内皮細胞増殖抑制活性を有し、還元条件下のドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定される分子量が38,000、42,000または45,000であり、アミノ基末端アミノ酸配列が式(1)または式(2)であるタンパク質に結合する抗体は、ヒトガン患者尿中から得られる前記ガン特異タンパク質を抗原として用いる以外に、組織、細胞、体液などの生体試料より精製した前記のガン特異タンパク質、あるいはそれを含む構成物、あるいはその一部を含む組成物を抗原とし

て、以下に示した従来より行われている方法により得ることができることは言うまでもないが、このタンパク質の構造の一部を持つペプチドあるいはそれを含む構成物、あるいはその一部を含む組成物を抗原として同様に得ることができる。たとえば、ヒトプラスミノゲン、ヒトプラスミン、ヒトプラスミノゲンリジン結合部位-1、あるいはその一部を含む組成物を抗原として得ることができる。この場合、調製された抗体について、ヒトプラスミノゲン、ヒトプラスミノゲンリジン結合部位-1、ガン患者尿、健常者尿との反応性を確認し、健常者尿中には反応物を持たない抗体を選択することによって本発明の測定方法に使用する抗体が選択できる。このような抗体は、プラスミノゲンやプラスミンに結合する抗体、結合しない抗体いずれも使用することができる。ここでいう抗体には、モノクローナル抗体やポリクローナル抗体が含まれる。

【0011】抗原にペプチドを用いる場合は、化学合成や遺伝子工学的手法によっても得られるが、その由来は問わない。このペプチドをそれ自身抗原として用いる方法、ポリビニルピロリドン、ラテックス、ポリメチルメタクリレートなどの大分子の物質に吸着させて免疫する方法、キャリアー蛋白に結合して用いる方法等があるがペプチドをキャリアー蛋白に結合して用いる方法が好ましく、結合方法は公知の方法が用いられる（「続医薬品の開発、14：廣川書店、1991」）。

【0012】抗原から抗体を得る方法は、本技術分野においてそれ自体公知の方法によって得ることができる。モノクローナル抗体を取得するためには、免疫に使用する動物としては各種の哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ等を使用することができ、十分な量の抗原刺激を受けたリンパ球が形成されるよう抗原を投与する。抗原は、アジュバント等との懸濁液として数回投与し、最終免疫の数日後に免疫した動物から抗原産生細胞、例えばリンパ球、好ましくは脾臓細胞を取り出す。抗体産生細胞とミエローマ細胞の融合および融合細胞の選択的培養は、「エンザイムイムノアッセイ、生化学実験法11：東京化学同人、1989」等に記載された一般的な方法で行うことができる。目的の抗体を産生するハイブリドーマを探索及び単クローン化した後、栄養培地中あるいは哺乳動物の腹腔内で増殖させることにより抗体を産生させ、産生した抗体は培養上清あるいはその哺乳動物の腹水または血清から精製することができる。抗体の精製は、遠心分離、透析、硫酸アンモニウム等による塩析、DEAEカラム等によるイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティクロマトグラフィーなどの一般的な単離、精製方法を用いて行うことができる。

【0013】ポリクローナル抗体は通常行われている方法、例えば「日本生化学会編、新生化学実験講座12、東京化学同人、1992」記載の方法によって得られる。免疫

動物としては、特に限定されるものではないが、馬、山羊、羊、ウサギ、モルモット、マウス、ニワトリなどが挙げられる。免疫動物としてウサギを用いる場合には、抗原を適当な濃度に生理食塩水などで希釈し、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバントまたは水酸化アルミニウムアジュバントなどの懸濁液とし、10~1000 μ g / 回・匹を注射し、さらに2~4週間後に追加免疫注射を1~3回行い、抗血清を得る。注射は多数箇所の皮下に行うのが好ましい。抗血清からポリクローナル抗体の調製は、上記モノクローナル抗体の精製と同様の方法で行うことができる。

【0014】本発明に使用できるガン特異タンパク質に結合する抗体フラグメントとは、このガン特異タンパク質に結合する抗体と同程度にこのガン特異タンパク質に結合活性を有する抗体の断片の意であり、そのような抗体フラグメントとしては、例えばF(ab')₂、Fab'、Fabなどを挙げるることができる。かかる抗体フラグメントは、公知の方法（石川栄治著、酵素標識法、生物化学実験法27、学会出版センター、（1991）など）によって調製することができる。

【0015】得られた抗体の反応物の検討は、免疫沈降法やウェスタンブロット法として既に知られた方法により行うことができる。本発明の前記ガン特異タンパク質の測定方法に使用する抗体は、免疫沈降反応でガン特異タンパク質と結合できるが、いったん変性処理を加えて膜に転写された前記のガン特異タンパク質を用いたウェスタンブロット法においては、反応性を示さない抗体であった。

【0016】本発明は、このようにして得られた抗体を用いた前記のガン特異タンパク質を測定する方法、すなわち免疫測定法に関するものである。免疫測定法としては、前記のガン特異タンパク質に結合する抗体またはその抗体フラグメントを用いるものであればどのような方法によってもよいが、例えばイムノクロマト法、ラテックス凝集法、免疫比濁法、化学発光免疫測定法（CLIA）、電気化学発光免疫測定法（ECLIA）、酵素免疫測定法（EIA）、蛍光免疫測定法（FIA）、放射免疫測定法（RIA）、免疫放射定量法（IRMA）、ラテックス近赤外比濁法（LPIA）等、またサンドイッチ法（一段法、二段法）や競合法等の公知の方法を用いることができる。例えば、酵素免疫測定法としては、「エンザイムイムノアッセイ」生化学実験法11（石川栄治監訳、東京化学同人、1989年）等に記載されているそれ自体公知の方法を用いることができる。

【0017】そして本願発明者らは、本測定法を用いて、このガン特異タンパク質の存在を直接的に確認し、特にガンの転移と大きく関与してガン患者の生体内、尿中でこれらのタンパク質が出現していることを明らかにした。すなわち、本測定法を用いて尿に含まれる前記タンパク質量を測定した場合、転移の認められないガン

患者では健常者とほぼ同程度の測定値を示すのに対し、遠隔転移の認められるガン患者では全例が健常者より高値を示し、尿中の前記ガン特異タンパク質を測定することによって転移を有するガン患者の判別が可能であることを見出した。ここでいう転移を有するガン患者とは、TNM分類でM1に分類されるいわゆる遠隔転移ありと診断されるものは全て含まれ、さらに、同時性転移に限らず異時性転移を引き起こす症例においても、原発巣切除術前にすでに高値を示し、肉眼的所見、画像診断によって発見が困難な段階のものも検出が可能である。また、原発巣や転移巣の部位には特定されない。例えば大腸ガンの肝転移例、胃ガンの肝転移例、膵臓ガンの肝、肺転移例、肺ガンの脳転移例などが挙げられる。このように本発明の測定方法を用いることによって、生体内でのガン組織の存在、なかでも転移巣の存在を知ることができ極めて有用である。また、このガン特異タンパク質を定量することによって、その量の多少から患者の病態の把握をすることが可能となる。さらに、病巣摘出後の患者病態の管理にも用いることができる。

【0018】本発明の測定方法を使用して、ガンの診断および予後の診断を行うには、測定試料として尿を使用することが重要である。これは血液中にこのガン特異タンパク質と類似の構造を有するプラスミノゲンなどが多量に含まれているため、血液を試料とした場合にはこれらの夾雑物質を除去する操作が必要となるためである。このように本発明者らは、尿を試料として、本発明のガン特異タンパク質に結合する抗体またはその抗体フラグメントを用いた測定方法を用いることによって、測定用試料中から測定に影響を及ぼす夾雑物質を予め除く処理を施す必要なく、このガン特異タンパク質の測定が可能であることを見出し本発明に至った。以下、実施例により本発明を詳述するが、それらは例示のためのものであって、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0019】

【実施例】実施例1 抗ヒトプラスミノゲンリジン結合部位-1モノクローナル抗体の作製

(1) 免疫脾細胞の調製

6週令の雄Balb/cマウス3匹の腹腔内にヒトプラスミノゲンリジン結合部位-1(以下「hLBS-1」と記す)(シグマ社製)50 μ gを含む生理食塩液0.1mlと完全フロイントアジュバント0.1mlとのエマルジョンを投与した。さらに3週間後に、抗原50 μ gを含む生理食塩水溶液0.2mlを静脈に投与した。最終免疫の3日後にマウスを屠殺し、脾臓を摘出し細胞融合に用いた。

【0020】(2) 細胞融合

脾臓をピンセットでほぐして得られた細胞を、GIT培地(日本製薬社製)に懸濁後、ナイロンメッシュを通過させ単細胞浮遊液を得た。この単細胞浮遊液より遠心にて集めた細胞を、0.83%塩化アンモニウム溶液(9容量

部)と0.17Mトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸緩衝液、pH7.6(1容量部)との混液2mlで4で2分間処理し、赤血球を破壊し、遠心分離で取り除いた。GIT培地で培養した対数増殖期のマウスミエローマ細胞SP-2/0-Ag14をGIT培地で2回洗浄した。マウス脾臓細胞とミエローマ細胞の細胞数の比率が10:1になるように混合した後、遠心にて細胞を回収した。この細胞を37に加温した後、37に加温した2mlの50%ポリエチレングリコール1500(ベーリンガー社製)を1分間かけて徐々に加えた。1分間放置後、10mlのGIT培地を4~5分かけて滴下した。細胞を遠心して集めた後、GIT培地で 5×10^6 細胞/mlになるように細胞を懸濁した。これを細胞培養用96穴マイクロウェルプレート(コニング社製)の各ウェルに100 μ lずつ分注し、5%炭酸ガス培養装置中で37で培養した。1日培養後、プレートの各ウェルに 1×10^{-4} Mヒポキサンチン、 4×10^{-7} Mアミノプテリンおよび 1.6×10^{-5} Mチミジンを含むGIT培地(以下「HAT培地」と記す)を100 μ l添加した。さらに2日または4日ごとに半量の培地を新たなHAT培地に交換し、培養を続けた。細胞融合10日後にハイブリドーマ細胞の増殖が認められた。培養2~3週間後の培養上清を抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングに供した。

【0021】(3)モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

hLBS-1に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングは、hLBS-1を固定したマイクロプレートを用いてEIAにより行った。hLBS-1の固定は、96穴イムノマイクロプレート(ナルジェ・ヌンク社製)の各ウェルに0.2 μ g/mlになるように0.15M NaCl含有0.01Mリン酸緩衝液(pH7.4)(以下「PBS」と記す)に溶解したhLBS-1を100 μ l添加し、4で一晩放置させ行った。このプレートを0.05%Tween 20を含むPBS(以下「T-PBS」と記す)で5回洗浄後、0.2%BSAを含むT-PBS(以下「T-B-PBS」と記す)を加え、室温に1時間放置し蛋白の非特異的吸着が起こらぬように各ウェルをブロッキングした。各ウェルに上記(2)のハイブリドーマ培養上清のT-B-PBS希釈液を100 μ l添加し、室温で1時間インキュベートした。ウェルに固定したhLBS-1に結合した抗体の検出は、ベクタステインABCキット(ベクターラボラトリーズ社製)を用いて行った。プレートの各ウェルをT-PBSで5回洗浄後、各ウェルにビオチン化ヤギ抗マウスイムノグロブリン抗血清のT-B-PBS溶液を100 μ l添加して1時間反応させた。さらにT-PBSで洗浄後、100 μ lのアビジン化ペルオキシダーゼのT-B-PBS溶液を添加し、20分反応させた。各ウェルをT-PBSで5回洗浄後、各ウェルに0.015% H_2O_2 、0.5mg/mlオルトフェニレンジアミン二塩酸塩を含む100mMクエン酸リン酸緩衝液(pH5.0)を100 μ l加え室温で3~10分間インキュベートした。各ウェルに4N硫酸を

100 μl 加えて反応を停止させ、イムノリーダーNJ-2000 (インターメッド社製) を用いて発色液の490nm の吸光度を測定した。融合細胞を撒いたウェル数が3072ウェル、このうちハイブリドーマの増殖が認められたウェル数は1873ウェルであった。そしてhLBS-1に結合する抗体の産生が認められたウェル数は271 ウェルであった。

【0022】(4) hLBS-1に結合するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマのクローニング

(3) でhLBS-1に結合する抗体産生の認められた 271 ウェルのうち、120ウェルについて培養液を、5% プライ クローン (大日本製薬社製) を含むHAT 培地 (以下「HAT-HCF-GIT」培地と記す) を入れた24穴平底マイクロプレート (コーニング社製) に移した。増殖してきたハイブリドーマを、HAT-HCF-GIT 培地を入れた96穴マイクロプレートを用いて限界希釈法によりクローニングした。クローニング操作を2回行い、合計75個のクローンを得た。

【0023】(5) hLBS-1に結合するモノクローナル抗体の精製

10日前に各々0.5ml のプリスタン (2,6,10,14-テトラメ*20

*チルペンタデカン) を腹腔内に投与された7~8週令の Balb/cマウスの腹腔内に前記(4) で得られたhLBS-1に結合するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 2~5 x 10⁶ 個を移植した。約1週間後、マウスの腹腔より腹水を採取し、その腹水からモノクローナル抗体を25~50%飽和硫酸アンモニウム溶液により塩析した粗抗体を得た。この粗抗体を少量のPBS に溶解し、アフィゲルプロテイン A-MAPS キット (パイオラッド社製) を用いて分離し、さらに、抗体溶液をPBS に透析した後、4で保存した。腹水1ml あたり1.5~10mgの精製抗体を得た。

【0024】実施例2 hLBS-1 に結合するモノクローナル抗体の特性 (モノクローナル抗体の免疫グロブリンサブクラスの同定)

精製した抗体の免疫グロブリンのサブクラスをマウスモノクローナル抗体アイソタイプングキット (アマシャムファルマシア社製) を用いて同定した。結果を表1に示す。

【0025】

表1

抗体	Igサブクラス	抗体	Igサブクラス	抗体	Igサブクラス
KRImAb1	IgG1	KRImAb18	IgG2a		
KRImAb34	IgM				
KRImAb2	IgG1	KRImAb19	IgG2a		
KRImAb35	IgG1				
KRImAb3	IgG2a	KRImAb20	IgG2a		
KRImAb36	IgA				
KRImAb4	IgG1	KRImAb21	IgG2a		
KRImAb41	IgG1				
KRImAb5	IgG1	KRImAb22	IgG1		
KRImAb43	IgG2a				
KRImAb6	IgG1	KRImAb23	IgG1		
KRImAb46	IgM				
KRImAb7	IgG3	KRImAb24	IgG2a		
KRImAb47	IgG1				
KRImAb48	IgG2a				
KRImAb49	IgG2b				
KRImAb50	IgG1				
KRImAb51	IgG1				
KRImAb52	IgG1				
KRImAb53	IgG1				
KRImAb54	IgG1				
KRImAb55	IgG1				
KRImAb56	IgG1				
KRImAb57	IgG1				
KRImAb58	IgG1				
KRImAb59	IgG1				
KRImAb60	IgG1				
KRImAb61	IgG1				
KRImAb62	IgG1				
KRImAb63	IgG1				
KRImAb64	IgG1				
KRImAb65	IgG1				
KRImAb66	IgG1				
KRImAb67	IgG1				
KRImAb68	IgG1				
KRImAb69	IgG1				
KRImAb70	IgG1				
KRImAb71	IgG1				
KRImAb72	IgM				
KRImAb73	IgG1				
KRImAb74	IgG1				
KRImAb75	IgG1				
KRImAb76	IgG1				
KRImAb77	IgG1				
KRImAb78	IgG1				
KRImAb79	IgG1				
KRImAb80	IgG1				
KRImAb81	IgG1				
KRImAb82	IgG1				
KRImAb83	IgG1				
KRImAb84	IgG1				
KRImAb85	IgG1				
KRImAb86	IgG1				
KRImAb87	IgG1				
KRImAb88	IgG1				
KRImAb89	IgG1				
KRImAb90	IgG1				
KRImAb91	IgG1				
KRImAb92	IgG1				
KRImAb93	IgG1				
KRImAb94	IgG1				
KRImAb95	IgG1				
KRImAb96	IgG1				
KRImAb97	IgG1				
KRImAb98	IgG1				
KRImAb99	IgG1				
KRImAb100	IgG1				
KRImAb101	IgG1				
KRImAb102	IgG1				
KRImAb103	IgG1				
KRImAb104	IgG1				
KRImAb105	IgG1				
KRImAb106	IgG1				
KRImAb107	IgG1				
KRImAb108	IgG1				
KRImAb109	IgG1				
KRImAb110	IgG1				
KRImAb111	IgG1				
KRImAb112	IgG1				
KRImAb113	IgG1				
KRImAb114	IgG2a	KRImAb31	IgG1		
KRImAb115	IgG2a	KRImAb32	IgG1		

【0026】実施例3 hLBS-1モノクローナル抗体結合セファロースの作製

抗hLBS-1モノクローナル抗体結合セファロースを合成するためにあたっての担体には、KRImAb11 (アマシャムファルマシア社製) を用いた。4gのKRImAb11-活性化セファロース4Bを氷冷水中で懸濁させ、G3ガラスフィルタ (KRImAb11) で洗浄を繰り返した。実施例1(5)で精製したhLBS-1に結合するモノクローナル抗体 (KRImAb12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50) を0.5M NaCl (KRImAb11) で洗浄し、0.1M NaHCO₃ (pH8.3) (以下「カップリングバッファ」で記す) 中に溶解し (100mg/10ml)、そこに懸濁したKRImAb11-活性化セファロ

ース4Bゲル10mlを加えた。4で一晩良く混合後、ゲルを0.2Mグリシン (pH8.0) 中に移し、室温で3時間置いた。KRImAb11 カップリングバッファ - でゲルを洗浄後、0.5M NaCl-0.1M酢酸緩衝液 (pH4.0) でさらに洗浄し、最後に再びKRImAb11 カップリングバッファ - でゲルを良く洗浄した。カラムへの抗体の結合量は、3.5~8.4mg/mlゲルであった。

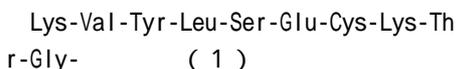
【0027】実施例4 hLBS-1モノクローナル抗体に結合するヒトガン患者尿中蛋白の精製

hLBS-1モノクローナル抗体に結合するヒトガン患者尿中蛋白の精製には、実施例3で作成した抗hLBS-1モノクローナル抗体結合セファロースを用いた。ヒト肺ガン患者尿あるいは健常者尿 10Lを濾過後、実施例3で作成した

抗hLBS-1モノクローナル抗体結合セファロース50mlに添加し、4 で一晩穏やかに振盪した。セファロースを回収し、PBS で良く洗浄した後、3Mチオシアン酸ナトリウムを含むPBS、または4%ジチオスレイトールを含む30mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸緩衝液(pH6.8)で抗体への結合物を遊離した。

【0028】実施例5 hLBS-1モノクローナル抗体に結合するヒトガン患者尿中タンパク質の分子量およびウェスタンブロット解析

実施例4で調製したhLBS-1モノクローナル抗体(KR1mAb 70)に結合するヒトガン患者および健常者尿中タンパク質を、常法に従い還元条件下で10%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動し、プレステインド分子量マーカー(アマシャムファルマシア社製)をもとに分子量を測定した。その結果、ヒトガン患者尿を材料として調製した場合でのみ分子量38,000、42,000、45,000の3本のバンドが検出され、ヒト健常者尿を材料として調製した場合にはこれらのバンドはいずれも検出されなかった。同様に電気泳動を行った後、ゲル内のタンパク質をポリビニリデンジフルオライドメンブレン(PVDF膜)にトランス



各バンド中の式(1)の構造を有するタンパク質に対する効果を以下に示す方法で測定した。すなわち10%ウシ胎児血清(FBS)、10ng/ml塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、50IU/mlペニシリンG、50μg/mlストレプトマイシンを加えたCHL-MCDB131培地(クロレラ工業社製)で培養したMP-HUV-EC-4を、コラーゲンコートした培養用96穴マイクロプレートの各ウェルに2×10³ cells/wellになるように分注した。このとき、終濃度として0、2、5、10μg/mlになるように実施例4で得られたhLBS-1モノクローナル抗体に結合するヒトガン患者尿中タンパク質、hLBS-1あるいはヒトプラスミノゲン(テクノクロン社製)を加え、5%炭酸ガス雰囲気下において37 で4日間培養した。培地100μlを新たな培地に交換し、さらに同条件下で1時間培養後、Cell Titer 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay(プロメガ社製)を用いて、生細胞を吸光度で測定した。結果を表2に示した。

【0030】実施例7 ヒト血管内皮細胞増殖抑制活性の測定

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(MP-HUV-EC-4)を用いて、実施例4で得られた抗hLBS-1モノクローナル抗体に結合するヒトガン患者尿中タンパク質の血管内皮細胞の増殖*

*社)を用いた。ガン患者尿を材料とした際に検出された前記の3本のバンドはPLGpAbにより染色されたが、抗hLBS-1モノクローナル抗体を用いた場合には染色されず、ここで使用した抗hLBS-1モノクローナル抗体は免疫沈降反応でガン特異タンパク質と結合できるが、いったん変性処理を加えて膜に転写されたガン特異タンパク質に対しては反応性を示さない抗体であった。この抗hLBS-1モノクローナル抗体はhLBS-1に対しても同様の挙動を示し、変性処理を加えて膜に転写されたhLBS-1に対しては反応性を示さなくなっていた。

【0029】実施例6 ヒトガン特異タンパク質のアミノ基末端アミノ酸配列の決定

実施例5と同様にしてhLBS-1モノクローナル抗体に結合するヒトガン患者尿中タンパク質を還元条件下で10%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動し、PVDF膜にトランスブロットした後、クマシーブリリアントブルーで染色した。分子量38,000、42,000、45,000の各バンド部分を切りだし、N末端アミノ酸配列分析装置HP G1005A Protein Sequencing System(ヒューレットパッカード社製)を用いてそれぞれのアミノ基末端アミノ酸残基を調べた。試料は予めS-還元ピリジルエチル処理を行った。その結果、いずれのバンドもアミノ基末端にLysを持つ式(1)で示されるタンパク質と、アミノ基末端にValを持つ式(2)で示されるタンパク質の混合物であることが判明した。

表2

被験物質	吸光度			
	濃度(μg/ml)			
	0	2	5	10

抗体結合タンパク質	0.401	0.347	0.263
0.210			
hLBS-1 13	0.443	0.397	0.14

実施例4で精製された抗hLBS-1を22クローナル抗体に結合するヒトガン患者尿中グリアタンパク質はhLBS-1同様ヒト血管内皮細胞増殖抑制活性を有していた。一方、ヒトプラスミノゲンには血管内皮細胞増殖抑制活性は認められなかった。

【0032】実施例8 抗プラスミノゲンポリクローナル抗体のガン患者尿および健常者尿中反応物の特定(ウェスタンブロット解析)

ヒト肺ガン患者尿75mlおよび健常者尿150mlを濾過後、分子量10,000カットの限外濾過装置(セントリカットU-10:クラボウ社製)にて300μlになるまで濃縮した。これに10mlの30mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸緩衝液(pH6.8)を加え、再び300μlになるまで濃縮した後、実施例5と同様にして、電気泳動および抗プラスミノゲンポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロットングを行った。結果を図3に示した。ヒト肺ガン患者尿を試料とした場合、分子量38,000、42,000、45,000の3本のバンドが検出されたのに対し、健常者尿を試料とした場合では反応物は認められなかった。このことから、ヒト尿中にはこれらのガン特異タンパク質以外の免疫学的にプラスミノゲンに類似したタンパク質が存在しないものと考えられた。

【0033】実施例9 ガン特異タンパク質に結合するモノクローナル抗体を用いたEIAの構築(一段法)

(1) HRP 標識Fab'の調製

KR1mAb12を2mg/ml含むPBS溶液50mlに1Mクエン酸緩衝液(pH3.2)を添加して、pH4.1に調整した。これに、12.5mgのブタ胃粘膜ペプシン(シグマ社製)を添加し、37で5時間インキュベートして抗体を消化させた。これに3Mトリス塩酸緩衝液(pH8.6)を加えてpH7.0とし、2mlに濃縮した後、この濃縮液を10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したスーパーローズ12HR16/50カラム(アマシャムファルマシア社製)に通し、F(ab')₂画分を得た。回収されたF(ab')₂の量は26.5mgであった。F(ab')₂画分を2mlに濃縮して、これに2-メルカプトエチルアミンおよびEDTAをそれぞれ10mMおよび0.5mMとなるように添加し、37で90分間インキュベートしてF(ab')₂を還元した。これを5mM EDTAを含有する10mMリン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したスーパーローズ12HR16/50カラムに通して、Fab'画分を得たところ、21.2mg*40

*のFab'が回収された。HRPへのマレイミド基の導入は、50mgのHRPを10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した後、これに10mgのN-(マレイミドカプロイルオキシ)-スクシンイミド(ジーベンケミカル社製)を1mlのN,N'-ジメチルホルムアミドに溶解した溶液750μlを添加して、30で60分間反応させることにより行った。この反応生成液を10mMリン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化してPD10カラム(アマシャムファルマシア社製)に通して、マレイミド基を導入したHRP画分を得た。前記によって調製された濃度9.2mg/mlのFab'溶液2.0mlに、濃度が8.0mg/mlのマレイミド基を導入したHRPを2.0ml加えて、4で16時間反応させた。この反応生成液を2mlに濃縮した後、10mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したスーパーローズ12HR16/50カラムに通して、10mlのHRP標識Fab'画分を得た。なお調製されたHRP標識Fab'においてHRPとFab'との結合モル比はほぼ1:1であった。回収された標識抗体量はFab'の量として15mgであった。

【0034】(2)一段法EIA

抗原の同一部位に対し互いに競合しない2種類のモノクローナル抗体、KR1mAb70およびKR1mAb12を用いて検討した。96穴のイムノマイクロプレートMaxisorp(ナルジェ・ヌンク社製)の各ウェルに50mM炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH9.6)で希釈した10μg/mlのKR1mAb70を250μl添加し4で一晩静置し、抗体を固相化した。次に、プレートを300μlのT-PBSで5回洗浄後、T-B-PBSを各ウェルに300μlずつ添加し、室温で1時間ブロッキングした。次にウェルに(1)で調製したKR1mAb12のHRP標識Fab'のT-B-PBS溶液(200ng/ml)を100μl、次いでT-B-PBSで希釈したガン特異タンパク質を100μl加え混合後、室温で90分間反応させた後、このプレートを300μlのT-PBSで5回洗浄した。次に、200μlのオルトフェニレンジアミン含有基質(0.5mg/mlオルトフェニレンジアミン、0.015%過酸化水素)を加え室温で30分間反応させた。このウェルに4N硫酸を100μl加えて反応を停止させ、イムノリーダーNJ-2000(インターメッド社製)を用いて、反応生成液の490nmの吸光度を測定した。結果を表3に示す。

【0035】

表3

ガン特異タンパク質濃度 ng/ml	波長490nmにおける吸光度
4	1.504
2	0.926
1	0.502
0.5	0.257

0.25	0.124
05	0.004
16	

【0036】実施例10 ガン特異タンパク質に結合するモノクローナル抗体を用いたEIAの構築(二段法)
 96穴のイムノマイクロプレートMaxisorp(ナルジェ・ヌンク社製)の各ウェルに50mM炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH 9.6)で希釈した10µg/mLのKR1mAb70を250µl添加し4で一晚静置し、抗体を固相化した。次に、プレートを300µlのT-PBSで5回洗浄後、T-B-PBSを各ウェルに300µlずつ添加し、室温で1時間ブロッキングした。次にウェルにT-B-PBSで希釈したガン特異タンパク質を200µl加え室温で60分間反応させた後、このプレ

ートを300µlのT-PBSで5回洗浄した。次に、各ウェルに、実施例9(1)で調製したKR1mAb12のHRP標識Fab'のT-B-PBS溶液(200ng/ml)を200µl加え、60分間反応させた。このプレートを300µlのT-PBSで5回洗浄した後、200µlのオルトフェニレンジアミン含有基質を加え室温で30分間反応させた。このウェルに4N硫酸を100µl加えて反応を停止させ、イムノリーダーNJ-2000(インターメッド社製)を用いて、反応生成液の490nmの吸光度を測定した。結果を表4に示す。

【0037】

表4

ガン特異タンパク質濃度 ng/ml	波長490nmにおける吸光度
4	2.097
2	1.281
1	0.725
0.5	0.378

【0038】実施例11 ガン患者血中および尿中ガン特異タンパク質量の測定
 実施例9(2)に示した抗hLBS-1モノクローナル抗体を用いた一段法EIA(測定法A)により、遠隔転移を有する各種ガン患者(肺ガン、胃ガン、膀胱ガン、前立腺ガン、大腸ガン)並びに健常者の血漿中および尿中のガン

特異タンパク質量を測定した。あわせて、実施例5の抗hLBS-1モノクローナル抗体を用いた一段法EIA(測定法B)により、ガン患者並びに健常者の尿中のガン特異タンパク質量を測定した。結果を表5に示した。

【0039】

表5

対象者	測定値 (ng/ml)	
	測定法A	測定法B

方法A(抗hLBS-1モノクローナル抗体を用いた血漿法EIA)を用いた場合は、血漿を試料とすると患者、健常者の測定値の分布に差は認められず、ガン特異タンパク質の測定はできなかったが、尿を試料とした場合では健常者と患者の測定値の分布は乖離した。また方法B(抗hLBS-1モノクローナル抗体を用いた一段法EIA)を用い、尿を試料とした場合でも、健常者と患者の一部に測定値の重なりは生じたが、おおそ健常者と患者の識別は可能

【0040】実施例12 転移の有無によるガン患者尿中ガン特異タンパク質量の測定値
 実施例9(2)に示した抗hLBS-1モノクローナル抗体を用いた一段法EIA(測定法A)により、健常者、転移の認められるガン患者及び転移の認められないガン患者尿中のガン特異タンパク質量を測定した(いずれも術前に採取した尿)。結果を表6に示した。

表6

対象	尿中ガン特異タンパク質濃度 (ng/ml)
	平均値 ± 標準偏差値 (最低値最高値)
健常者 (n = 10)	4.4 ± 3.0 (0.6 10.7)
大腸ガン患者	
転移あり (n = 4)	29.7 ± 15.2 (18.6 52.2)
転移なし (n = 5)	3.6 ± 3.9 (0.6 9.3)
肺ガン患者	
転移あり (n = 5)	25.5 ± 6.2 (17.6 32.0)

転移なし (n = 2) 7.5 ± 1.5 (6.4 8.5)
 胃ガン患者
 転移あり (n = 2) 87.2 ± 68.2 (39.0 135.4)

転移なし (n = 1) 7.3 18

【0041】大腸ガン、肺ガン、胃ガンいずれにおいても、転移の認められないガン患者では健常者とほぼ同程度の測定値を示すのに対し、遠隔転移の認められるガン患者では全例が健常者より高値を示した。また原発巣除去手術時に転移は認められなかったものの、その後転移の認められた異時性転移例でも、手術前に高値を示していた。

【0042】

【手続補正書】

【提出日】平成12年11月2日(2000.11.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】ガン特異タンパク質の測定方法およびガンの診断方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒトガン患者尿中に存在し、血管内皮細胞増殖抑制活性を有し、還元条件下のドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定される分子量が38,000、42,000または45,000であり、アミノ基末端アミノ酸配列が配列番号1または配列番号2に記載のものであるタンパク質に結合する抗体または該抗体フラグメントを使用することを特徴とするガン特異タンパク質の測定方法。

【請求項2】使用する抗体が、ヒトプラスミノゲンに結合可能な抗体である請求項1記載の測定方法。

【請求項3】ヒトガン患者尿中に存在し、血管内皮細胞増殖抑制活性を有し、還元条件下のドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定される分子量が38,000、42,000または45,000であり、アミノ基末端アミノ酸配列が配列番号1または配列番号2に記載のものであるタンパク質に結合する抗体または該抗体フラグメントを使用してヒト尿中の該タンパク質を測定することを特徴とするガンを診断する方法。

【請求項4】使用する抗体が、ヒトプラスミノゲンに結合可能な抗体である請求項3記載のガンを診断する方法。

【請求項5】診断するガンが遠隔転移を有するガンである請求項3記載のガンを診断する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒトガン患者尿中に特異的に検出されるタンパク質の測定方法を提供するものである。さらにヒト生体内の該タンパク質の動態を測定することによって、ガンの診断、病態把握、予後の管理を行う方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】アンジオスタチンはM.S.O'Reillyらによって1994年に初めて報告された血管新生抑制因子である(O'Reillyら、Cell、79:315(1994))。彼らは、マウス皮下にルイス肺ガン細胞を移植し、皮下の原発巣が存在する間は肺転移巣は微小にとどまるが、原発巣を除去した場合に肺転移巣が急激に増大することを観察した。そして、この現象は皮下のガン組織が血管新生抑制因子を放出し、それが肺転移巣の血管新生を阻害して転移巣を微小の状態に保っており、皮下ガン組織を切除することによってこの因子の産生消失を介して血管新生抑制効果が消失し転移巣が増大することを明らかにした。そしてマウスから得られたこの因子を同定した結果、マウスプラスミノゲンの内部構造フラグメントと98%以上一致するタンパクであり、非還元下SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分子量38,000の単一の蛋白性因子であることを見だしアンジオスタチンと命名して報告した。マウスアンジオスタチンはマウスプラスミノゲンのアミノ酸の一次構造において、アミノ酸番号98番目からはじまるフラグメントで、そのアミノ基末端アミノ酸一次構造は、Val-Tyr-Leu-Ser-Glu-X-Lys-Thr-Gly-(Xは未決定)であり(O'Reillyら、Cell、79:315(1994))、プラスミノゲン中の5個のクリングル構造(K1、K2、K3、K4、K5)のうちK1~K4を含む領域と考えられている。また、O'Reillyらはヒトプラスミノゲンをエラスターゼで限定分解して得られるヒトプラスミノゲンフラグメント、すなわち、ヒトプラスミノ

ゲンのアミノ酸一次構造においてアミノ酸番号97番目あるいは99番目からはじまるK1~K3を含むプラスミノゲンフラグメントを坦ガンマウスに有効量投与したところ、転移巣の成長が抑制されることを突き止めた(O'Reillyら、Cell、79:315(1994))。さらにこのフラグメントは、ヒトガン細胞の増殖を抑制することが報告された(O'Reilly M.S. ら、Nature med.、2:689(1996))。

【0003】その後、Cao Y.らによって、K1~K4のフラグメントよりK1~K3のフラグメントの方が血管新生抑制活性が高いこと、K1、K2、K3はそれぞれ単独でも弱いながら血管新生抑制活性を持つがK4にはその活性がないこと、ジスルフィド結合(S-S)によりK2とK3の間が結合しているK2~K3フラグメントを投与した場合は血管新生抑制活性は弱いものの、K2フラグメントとK3フラグメントとをそれぞれ同時投与した場合はそれぞれの相加的効果を発揮することから、K2とK3の間のジスルフィド結合の解離が血管新生抑制活性に重要な働きをしていることが示された(Cao Y.ら、J.Biol.Chem.、271:29461(1996))。さらに、K5も単独で強い血管内皮細胞増殖抑制活性を有することも報告されている(Cao Y.ら、J. Biol.Chem.、272:22924(1997))。

【0004】これまでに、ヒトガン患者生体内にプラスミノゲンフラグメントが存在することを示した報告として特開平9-178744がある。ここで検出されたヒト血液中に存在するプラスミノゲンフラグメントは分子量60,000~75,000の4種類の蛋白であり、O'Reillyらによってマウス尿中から検出されたアンジオスタチンとは異なる分子量を有するものであった。このタンパク質を測定するには、プラスミノゲンとプラスミノゲンフラグメントが同一の抗原性を有することから直接的に血液試料中のプラスミノゲンとプラスミノゲンフラグメントを区別して測定することは困難とされている。このため特開平9-178744では、目的とするプラスミノゲンフラグメントを除く他の夾雑物質を除去した後に、目的のプラスミノゲンフラグメントを測定するという技術的な特徴が記載されている。また、M.Sten-Linderらは、ヒトガン患者尿中に非還元下で分子量39,000、45,000、50,000のプラスミノゲンフラグメントが存在することを報告している(M.Sten-Linderら Anticancer Res.、19:3409(1999))。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】このようにヒトガン患者生体内に、アンジオスタチンあるいは同様の活性を有する他のプラスミノゲンフラグメントが存在するかどうか、さらにこれらを予め前処理を施すことなく簡便に測定する具体的方法はこれまでに明らかとなっていない。ヒトガン患者生体内でこのような物質が存在して実際にガン細胞の増殖、転移に関与することが明らかとなり、このタンパクの簡便な検出方法が確立されれば、基

礎医学、臨床医学において極めて重要な意味をもつ。

【0006】

【課題を解決するための手段】このような問題点を鑑み本願発明者は鋭意研究の結果、還元下SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定される分子量が38,000、42,000および45,000でありプラスミノゲンと免疫学的に区別できないタンパク質が、ヒトガン患者の尿中に特異的に存在することを発見した。即ちこれらのタンパク質は健常者の尿中には存在しなかった。さらに、ヒト尿中にはこれらのガン特異タンパク質以外の免疫学的にプラスミノゲンに類似したタンパク質が存在しないことも見いだした。これらの発見により、尿を試料とすることによって予め夾雑物質を除く処理を行うことなく前記のタンパク質を直接的に測定することが可能となった。すなわち、プラスミノゲンと構造上極めて類似するタンパク質の測定に際して、血液を試料とした免疫学的測定法では予め前処理を行わなければならないものの、尿を試料とすることによって、前処理の必要なく直接的にこれらの免疫学的測定が可能であることを見いだし本発明に到達した。

【0007】ガン患者尿中から特異的に検出された分子量38,000、42,000、45,000のタンパク質は、いずれも配列番号1および配列番号2に記載のアミノ基末端アミノ酸配列を有するものの混合物であり、計6種類のタンパク質からなる。このタンパク質のうちのひとつはM.S.O'Reillyらによって坦ガンマウス尿中から発見されたアンジオスタチンと同一の分子量、同一のアミノ基末端配列を持つタンパク質ではあったが、他の5種類は明らかに新規なタンパク質であった。また、いずれの分子量のタンパク質も、配列番号1に記載のアミノ基末端アミノ酸配列を有するタンパク質の方が配列番号2に記載のアミノ基末端アミノ酸配列を有するタンパク質よりも多量に含まれていた。またこれらのタンパク質は、マウスから発見されたアンジオスタチン同様に、血管内皮細胞増殖抑制活性を有しており、これら新規タンパク質がヒトガン患者生体内で血管新生抑制活性を介して転移巣の成長抑制を担う物質としてアンジオスタチン以上に機能しているものと考えられた。

【0008】これらのヒトガン患者生体内に存在する血管内皮細胞増殖抑制活性を有し、還元条件下のドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定した分子量が38,000、42,000または45,000であり、アミノ基末端アミノ酸配列が配列番号1または配列番号2に記載のタンパク質は、プラスミノゲンと免疫学的に区別することができなかった。このため、プラスミノゲンが多量に含まれる血液を試料とした場合の直接的測定は困難であった。しかし、ヒト尿中には免疫学的にプラスミノゲンと区別できないタンパク質は前記の6種類のタンパク質以外には存在しなかった。したがって、尿を試料とすることによりこのプラスミノゲン

の影響を受けることなくこのガン特異タンパク質を予め夾雑物質を除去する操作を行う必要なく直接的に測定が可能であることを見出し本発明に至った。さらに、本発明のガン特異タンパク質の測定用試料は尿には限定されず、前記のガン特異タンパク質以外にプラスミノゲンと免疫学的に区別できないタンパク質を含まない試料であれば測定可能であり、例えばある種の細胞培養上清等を試料とすることもできる。

【0009】本発明は、これらのガン特異タンパク質に結合する抗体を用いたガン特異タンパク質の測定方法に関するものである。さらに、この測定法を用いて、ヒト尿中に含まれるこのガン特異タンパク質を測定、検出することによるガンの診断またはその予後を診断する方法に関するものである。ここでいうガン特異タンパク質とは、ヒトガン患者生体内に存在し、血管内皮細胞増殖抑制活性を有し、還元条件下のドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定した分子量が38,000、42,000または45,000であり、アミノ基末端アミノ酸配列が配列番号1または配列番号2に記載のタンパク質の意である。

【0010】本発明に使用するヒトガン患者尿中に存在し、血管内皮細胞増殖抑制活性を有し、還元条件下のドデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定される分子量が38,000、42,000または45,000であり、アミノ基末端アミノ酸配列が配列番号1または配列番号2に記載のタンパク質に結合する抗体は、ヒトガン患者尿中から得られる前記ガン特異タンパク質を抗原として用いる以外に、組織、細胞、体液などの生体試料より精製した前記のガン特異タンパク質、あるいはそれを含む構成物、あるいはその一部を含む組成物を抗原として、以下に示した従来より行われている方法により得ることができることは言うまでもないが、このタンパク質の構造の一部を持つペプチドあるいはそれを含む構成物、あるいはその一部を含む組成物を抗原として同様に得ることができる。たとえば、ヒトプラスミノゲン、ヒトプラスミン、ヒトプラスミノゲンリジン結合部位-1、あるいはその一部を含む組成物を抗原として得ることができる。この場合、調製された抗体について、ヒトプラスミノゲン、ヒトプラスミノゲンリジン結合部位-1、ガン患者尿、健常者尿との反応性を確認し、健常者尿中には反応物を持たない抗体を選択することによって本発明の測定方法に使用する抗体が選択できる。このような抗体は、プラスミノゲンやプラスミンに結合する抗体、結合しない抗体いずれも使用することができる。ここでいう抗体には、モノクローナル抗体やポリクローナル抗体が含まれる。

【0011】抗原にペプチドを用いる場合は、化学合成や遺伝子工学的手法によっても得られるが、その由来は問わない。このペプチドをそれ自身抗原として用いる方法、ポリビニルピロリドン、ラテックス、ポリメチルメ

タクリレートなどの大分子の物質に吸着させて免疫する方法、キャリアー蛋白に結合して用いる方法等があるがペプチドをキャリアー蛋白に結合して用いる方法が好ましく、結合方法は公知の方法が用いられる（「続医薬品の開発、14：廣川書店、1991」）。

【0012】抗原から抗体を得る方法は、本技術分野においてそれ自体公知の方法によって得ることができる。モノクローナル抗体を取得するためには、免疫に使用する動物としては各種の哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌ等を使用することができ、十分な量の抗原刺激を受けたリンパ球が形成されるよう抗原を投与する。抗原は、アジュバント等との懸濁液として数回投与し、最終免疫の数日後に免疫した動物から抗原産生細胞、例えばリンパ球、好ましくは脾臓細胞を取り出す。抗体産生細胞とミエローマ細胞の融合および融合細胞の選択的培養は、「エンザイムイムノアッセイ、生化学実験法11：東京化学同人、1989」等に記載された一般的な方法で行うことができる。目的の抗体を産生するハイブリドーマを検索及び単一クローン化した後、栄養培地中あるいは哺乳動物の腹腔内で増殖させることにより抗体を産生させ、産生した抗体は培養上清あるいはその哺乳動物の腹水または血清から精製することができる。抗体の精製は、遠心分離、透析、硫酸アンモニウム等による塩析、DEAEカラム等によるイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、アフィニティクロマトグラフィーなどの一般的な単離、精製方法を用いて行うことができる。

【0013】ポリクローナル抗体は通常行われている方法、例えば「日本生化学会編、新生化学実験講座12、東京化学同人、1992」記載の方法によって得られる。免疫動物としては、特に限定されるものではないが、馬、山羊、羊、ウサギ、モルモット、マウス、ニワトリなどが挙げられる。免疫動物としてウサギを用いる場合には、抗原を適当な濃度に生理食塩水などで希釈し、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバントまたは水酸化アルミニウムアジュバントなどの懸濁液とし、10~1000 μg / 回・匹を注射し、さらに2~4週間後に追加免疫注射を1~3回行い、抗血清を得る。注射は多数箇所の下に行うのが好ましい。抗血清からポリクローナル抗体の調製は、上記モノクローナル抗体の精製と同様の方法で行うことができる。

【0014】本発明に使用できるガン特異タンパク質に結合する抗体フラグメントとは、このガン特異タンパク質に結合する抗体と同程度にこのガン特異タンパク質に結合活性を有する抗体の断片の意であり、そのような抗体フラグメントとしては、例えば F(ab')_2 、 Fab' 、 Fab などを挙げることができる。かかる抗体フラグメントは、公知の方法（石川栄治著、酵素標識法、生物化学実験法27、学会出版センター、（1991）など）によって調製することができる。

【0015】得られた抗体の反応物の検討は、免疫沈降法やウェスタンブロット法として既に知られた方法により行うことができる。本発明の前記ガン特異タンパク質の測定方法に使用する抗体は、免疫沈降反応でガン特異タンパク質と結合できるが、いったん変性処理を加えて膜に転写された前記のガン特異タンパク質を用いたウェスタンブロット法においては、反応性を示さない抗体であった。

【0016】本発明は、このようにして得られた抗体を用いた前記のガン特異タンパク質を測定する方法、すなわち免疫測定法に関するものである。免疫測定法としては、前記のガン特異タンパク質に結合する抗体またはその抗体フラグメントを用いるものであればどのような方法によってもよいが、例えばイムノクロマト法、ラテックス凝集法、免疫比濁法、化学発光免疫測定法 (CLIA)、電気化学発光免疫測定法 (ECLIA)、酵素免疫測定法 (EIA)、蛍光免疫測定法 (FIA)、放射免疫測定法 (RIA)、免疫放射定量法 (IRMA)、ラテックス近赤外比濁法 (LPIA) 等、またサンドイッチ法 (一段法、二段法) や競合法等の公知の方法を用いることができる。例えば、酵素免疫測定法としては、「エンザイムイムノアッセイ」生化学実験法11 (石川榮治監訳、東京化学同人、1989年) 等に記載されているそれ自体公知の方法を用いることができる。

【0017】そして本願発明者らは、本測定法を用いて、このガン特異タンパク質の存在を直接的に確認し、特にガンの転移と大きく関与してガン患者の生体内、尿中でこれらのタンパク質が出現していることを明らかにした。すなわち、本測定法を用いて尿中に含まれる前記タンパク質量を測定した場合、転移の認められないガン患者では健常者とほぼ同程度の測定値を示すのに対し、遠隔転移の認められるガン患者では全例が健常者より高値を示し、尿中の前記ガン特異タンパク質量を測定することによって転移を有するガン患者の判別が可能であることを見出した。ここでいう転移を有するガン患者とは、TNM分類でM1に分類されるいわゆる遠隔転移ありと診断されるものは全て含まれ、さらに、同時性転移に限らず異時性転移を引き起こす症例においても、原発巣切除術前にすでに高値を示し、肉眼的所見、画像診断によって発見が困難な段階のものも検出が可能である。また、原発巣や転移巣の部位には特定されない。例えば大腸ガンの肝転移例、胃ガンの肝転移例、膵臓ガンの肝、肺転移例、肺ガンの脳転移例などが挙げられる。このように本発明の測定方法を用いることによって、生体内でのガン組織の存在、なかでも転移巣の存在を知ることができ極めて有用である。また、このガン特異タンパク質を定量することによって、その量の多少から患者の病態の把握をすることが可能となる。さらに、病巣摘出後の患者病態の管理にも用いることができる。

【0018】本発明の測定方法を使用して、ガンの診断

および予後の診断を行うには、測定試料として尿を使用することが重要である。これは血液中にこのガン特異タンパク質と類似の構造を有するプラスミノゲンなどが多量に含まれているため、血液を試料とした場合にはこれらの夾雑物質を除去する操作が必要となるためである。このように本発明者らは、尿を試料として、本発明のガン特異タンパク質に結合する抗体またはその抗体フラグメントを用いた測定方法を用いることによって、測定用試料中から測定に影響を及ぼす夾雑物質を予め除く処理を施す必要なく、このガン特異タンパク質の測定が可能であることを見出し本発明に至った。以下、実施例により本発明を詳述するが、それらは例示のためのものであって、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0019】

【実施例】実施例1 抗ヒトプラスミノゲンリジン結合部位-1モノクローナル抗体の作製

(1) 免疫脾細胞の調製

6週令の雄Balb/cマウス3匹の腹腔内にヒトプラスミノゲンリジン結合部位-1 (以下「hLBS-1」と記す) (シグマ社製) 50 μ g を含む生理食塩液0.1ml と完全フロイントアジュバント0.1ml とのエマルジョンを投与した。さらに3週間後に、抗原50 μ g を含む生理食塩水溶液0.2ml を静脈に投与した。最終免疫の3日後にマウスを屠殺し、脾臓を摘出し細胞融合に用いた。

【0020】(2) 細胞融合

脾臓をピンセットでほぐして得られた細胞を、GIT 培地 (日本製薬社製) に懸濁後、ナイロンメッシュを通過させ単細胞浮遊液を得た。この単細胞浮遊液より遠心にて集めた細胞を、0.83%塩化アンモニウム溶液 (9容量部) と0.17 M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン塩酸緩衝液、pH 7.6 (1容量部) との混液2ml で4分間処理し、赤血球を破壊し、遠心分離で取り除いた。GIT 培地で培養した対数増殖期のマウスミエローマ細胞SP-2/0-Ag14 をGIT 培地で2回洗浄した。マウス脾臓細胞とミエローマ細胞の細胞数の比率が10:1になるように混合した後、遠心にて細胞を回収した。この細胞を37 $^{\circ}$ Cに加熱した後、37 $^{\circ}$ Cに加熱した2ml の50%ポリエチレングリコール1500 (ベーリンガー社製) を1分間かけて徐々に加えた。1分間放置後、10ml のGIT 培地を4~5分かけて滴下した。細胞を遠心して集めた後、GIT 培地で5 $\times 10^6$ 細胞/mlになるように細胞を懸濁した。これを細胞培養用96穴マイクロウェルプレート (コーニング社製) の各ウェルに100 μ l ずつ分注し、5%炭酸ガス培養装置中で37 $^{\circ}$ Cで培養した。1日培養後、プレートの各ウェルに1 $\times 10^{-4}$ M ヒポキサンチン、4 $\times 10^{-7}$ M アミノプテリンおよび1.6 $\times 10^{-5}$ M チミジンを含むGIT 培地 (以下「HAT 培地」と記す) を100 μ l 添加した。さらに2日または4日ごとに半量の培地を新たなHAT培地に交換し、培養を続けた。細胞融合10日後にハイ

ブリドーマ細胞の増殖が認められた。培養2～3週間後の培養上清を抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングに供した。

【0021】(3)モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

hLBS-1に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングは、hLBS-1を固定したマイクロプレートを用いてEIAにより行った。hLBS-1の固定は、96穴イムノマイクロプレート(ナルジェ・ヌンク社製)の各ウェルに0.2 µg/mlになるように0.15M NaCl含有0.01M リン酸緩衝液(pH 7.4)(以下「PBS」と記す)に溶解したhLBS-1を100 µl添加し、4で一晩放置させ行った。このプレートを0.05%Tween 20を含むPBS(以下「T-PBS」と記す)で5回洗浄後、0.2%BSAを含むT-PBS(以下「T-B-PBS」と記す)を加え、室温に1時間放置し蛋白の非特異的吸着が起こらぬように各ウェルをブロッキングした。各ウェルに上記(2)のハイブリドーマ培養上清のT-B-PBS希釈液を100 µl添加し、室温で1時間インキュベートした。ウェルに固定したhLBS-1に結合した抗体の検出は、ベクタステインABCキット(ベクターラボラトリーズ社製)を用いて行った。プレートの各ウェルをT-PBSで5回洗浄後、各ウェルにビオチン化ヤギ抗マウスイムノグロブリン抗血清のT-B-PBS溶液を100 µl添加して1時間反応させた。さらにT-PBSで洗浄後、100 µlのアビジン化ペルオキシダーゼのT-B-PBS溶液を添加し、20分反応させた。各ウェルをT-PBSで5回洗浄後、各ウェルに0.015 %H₂O₂、0.5mg/mlオルトフェニレンジアミン二塩酸塩を含む100mMクエン酸リン酸緩衝液(pH 5.0)を100 µl加え室温で3～10分間インキュベートした。各ウェルに4N硫酸を100 µl加えて反応を停止させ、イムノリーダーNJ-2000(インターメッド社製)を用いて発色液の490nmの吸光度を測定した。融合細胞を撒いたウェル数が3072ウェル、このうちハイブリドーマの増殖が認められたウェル数は1873ウェルであった。そしてhLBS-1に結合する抗体*

*の産生が認められたウェル数は271 ウェルであった。

【0022】(4)hLBS-1に結合するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマのクローニング

(3)でhLBS-1に結合する抗体産生の認められた271ウェルのうち、120ウェルについて培養液を、5%ブライクローン(大日本製薬社製)を含むHAT培地(以下「HAT-HCF-GIT」培地と記す)を入れた24穴平底マイクロプレート(コーニング社製)に移した。増殖してきたハイブリドーマを、HAT-HCF-GIT培地を入れた96穴マイクロプレートを用いて限界希釈法によりクローニングした。クローニング操作を2回行い、合計75個のクローンを得た。

【0023】(5)hLBS-1に結合するモノクローナル抗体の精製

10日前に各々0.5mlのプリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン)を腹腔内に投与された7～8週令のBalb/cマウスの腹腔内に前記(4)で得られたhLBS-1に結合するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞2～5×10⁶個を移植した。約1週間後、マウスの腹腔より腹水を採取し、その腹水からモノクローナル抗体を25～50%飽和硫酸アンモニウム溶液により塩析した粗抗体を得た。この粗抗体を少量のPBSに溶解し、アフィゲルプロテインA-MAPSキット(バイオラッド社製)を用いて分離し、さらに、抗体溶液をPBSに透析した後、4で保存した。腹水1mlあたり1.5～10mgの精製抗体を得た。

【0024】実施例2 hLBS-1に結合するモノクローナル抗体の特性(モノクローナル抗体の免疫グロブリンサブクラスの同定)

精製した抗体の免疫グロブリンのサブクラスをマウスモノクローナル抗体アイソタイプキット(アマシャムファルマシア社製)を用いて同定した。結果を表1に示す。

【0025】

表1

抗体	Igサブクラス	抗体	Igサブクラス	抗体	Igサブクラス
KRIAb1	IgG1	KRIAb18	IgG2a		
KRIAb34	IgM				
KRIAb2	IgG1	KRIAb19	IgG2a		
KRIAb35	IgG1				
KRIAb3	IgG2a	KRIAb20	IgG2a		
KRIAb36	IgA				
KRIAb4	IgG1	KRIAb21	IgG2a		
KRIAb41	IgG1				
KRIAb5	IgG1	KRIAb22	IgG1		
KRIAb43	IgG2a				
KRIAb6	IgG1	KRIAb23	IgG1		
KRIAb46	IgM				
KRIAb7	IgG3	KRIAb24	IgG2a		
KRIAb47	IgG1				

KRIAb14	IgG2a	KRIAb31	IgG1
	KRIAb72		IgM
KRIAb15	IgG2a	KRIAb32	IgG1

【0026】実施例3 hLBS-1モノクローナル抗体結合セファロースの作製

hLBS-1モノクローナル抗体結合セファロースを作成するにあたっての担体には CNBr-活性化セファロース4B (アマシャムファルマシア社製)を用いた。4gのCNBr-活性化セファロース4Bを氷冷下1mM塩酸中で膨潤させ、G3グラスフィルター上で1mM塩酸で洗浄を繰り返した。実施例1(5)で精製したhLBS-1に結合するモノクローナル抗体(KRIAb1、12、14、15、32、35、37、41、47、70、75)を0.5M NaCl-0.1M NaHCO₃(pH8.3)(以下「カップリングバッファ」と記す)中に溶解し(100mg/10ml)、そこに膨潤したCNBr-活性化セファロース4Bゲル10mlを加えた。4で一晩良く混合後、ゲルを0.2Mグリシン(pH8.0)中に移し、室温で3時間置いた。カップリングバッファでゲルを洗浄後、0.5M NaCl-0.1M酢酸緩衝液(pH4.0)でさらに洗浄し、最後に再びカップリングバッファでゲルを良く洗浄した。カラムへの抗体の結合量は、3.5~8.4mg/mlゲルであった。

【0027】実施例4 hLBS-1モノクローナル抗体に結合するヒトガン患者尿中蛋白の精製

hLBS-1モノクローナル抗体に結合するヒトガン患者尿中蛋白の精製には、実施例3で作成した抗hLBS-1モノクローナル抗体結合セファロースを用いた。ヒト肺ガン患者尿あるいは健康者尿10Lを濾過後、実施例3で作成した抗hLBS-1モノクローナル抗体結合セファロース50mlに添加し、4で一晩穏やかに振盪した。セファロースを回収し、PBSで良く洗浄した後、3Mチオシアン酸ナトリウムを含むPBS、または4%ジチオスレイトールを含む30mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸緩衝液(pH6.8)で抗体への結合物を遊離した。

【0028】実施例5 hLBS-1モノクローナル抗体に結合するヒトガン患者尿中タンパク質の分子量およびウェスタンブロット解析

実施例4で調製したhLBS-1モノクローナル抗体(KRIAb70)に結合するヒトガン患者および健康者尿中タンパク質を、常法に従い還元条件下で10%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動し、プレステインド分子量マーカー(アマシャムファルマシア社製)をもとに分子量を測定した。その結果、ヒトガン患者尿を材料として調製した場合でのみ分子量38,000、42,000、45,000の3本のバンドが検出され、ヒト健康者尿を材料として調製した場合にはこれらのバンドはいずれも検出されなかった。同様に電気泳動を行った後、ゲル内のタンパク質をポリビニリデンジフルオライドメンブレン(PVDF膜)にトランスブロットし、常法に従い調製したウサギ抗人抗プラスミノーゲンポリクローナル抗体(PLGpAb)、抗hLBS-1モノクローナル抗体を一次抗体、HRP結合プロテインA(ア

マシャムファルマシア社)を二次抗体としてウェスタンブロットを行った。結合した二次抗体の検出は、ECL ウェスタンブロット試薬(アマシャムファルマシア社)を用いた。ガン患者尿を材料とした際に検出された前記の3本のバンドはPLGpAbにより染色されたが、抗hLBS-1モノクローナル抗体を用いた場合には染色されず、ここで使用した抗hLBS-1モノクローナル抗体は免疫沈降反応でガン特異タンパク質と結合できるが、いったん変性処理を加えて膜に転写されたガン特異タンパク質に対しては反応性を示さない抗体であった。この抗hLBS-1モノクローナル抗体はhLBS-1に対しても同様の挙動を示し、変性処理を加えて膜に転写されたhLBS-1に対しては反応性を示さなくなっていた。

【0029】実施例6 ヒトガン特異タンパク質のアミノ基末端アミノ酸配列の決定

実施例5と同様にしてhLBS-1モノクローナル抗体に結合するヒトガン患者尿中タンパク質を還元条件下で10%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動し、PVDF膜にトランスブロットした後、クマシーブリリアントブルーで染色した。分子量38,000、42,000、45,000の各バンド部分を切りだし、N末端アミノ酸配列分析装置HP G1005A Protein Sequencing System(ヒューレットパッカード社製)を用いてそれぞれのアミノ基末端アミノ酸残基を調べた。試料は予めS-還元ピリジリエチル処理を行った。その結果、いずれのバンドもアミノ基末端にLysを持ち配列番号1に記載の構造を有するタンパク質と、アミノ基末端にValを持ち配列番号2に記載の構造を有するタンパク質の混合物であることが判明した。各バンド中の配列番号1に記載の構造を有するタンパク質と配列番号2に記載の構造を有するタンパク質との比率は、いずれも1.4~2.8:1の範囲内であった。このタンパク質の混合物は次の6種類のタンパク質からなっていた。

分子量38,000でN末端アミノ酸配列として配列番号1に記載の構造を有するタンパク質、分子量38,000でN末端アミノ酸配列として配列番号2に記載の構造を有するタンパク質、分子量42,000でN末端アミノ酸配列として配列番号1に記載の構造を有するタンパク質、分子量42,000でN末端アミノ酸配列として配列番号2に記載の構造を有するタンパク質、分子量45,000でN末端アミノ酸配列として配列番号1に記載の構造を有するタンパク質、および分子量45,000でN末端アミノ酸配列として配列番号2に記載の構造を有するタンパク質。

【0030】実施例7 ヒト血管内皮細胞増殖抑制活性の測定

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(MP-HUV-EC-4)を用いて、実施例4で得られた抗hLBS-1モノクローナル抗体に結合するヒトガン患者尿中タンパク質の血管内皮細胞の増殖

に対する効果を以下に示す方法で測定した。すなわち10%ウシ胎児血清(FBS)、10ng/ml 塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、50IU/ml ペニシリンG、50μg/mlストレプトマイシンを加えたCHL-MCDB131 培地(クロレラ工業社製)で培養したMP-HUV-EC-4 を、コラーゲンコートした培養用96穴マイクロプレートの各ウェルに 2×10^3 cells/wellになるように分注した。このとき、終濃度として0、2、5、10μg/mlになるように実施例4で得られたhLBS-1モノクローナル抗体に結合するヒトガン患者

尿中タンパク質、hLBS-1あるいはヒトプラスミノゲン(テクノクロン社製)を加え、5%炭酸ガス雰囲気下において37°Cで4日間培養した。培地100μlを新たな培地に交換し、さらに同条件下で1時間培養後、Cell Titer 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay(プロメガ社製)を用いて、生細胞を吸光度で測定した。結果を表2に示した。

【0031】

表2

被験物質	吸光度			
	濃度(μg/ml)			
	0	2	5	10
実施例4で精製された抗hLBS-1モノクローナル抗体に結合するヒトガン患者尿中タンパク質はhLBS-1同様に血管内皮細胞増殖抑制活性を有していた。一方、ヒトプラスミノゲンには血管内皮細胞増殖抑制活性は認められなかった。	0.313	0.223		
【0032】実施例8 ヒトプラスミノゲンポリクローナル抗体のガン患者尿および健常者尿中反応物の特定(ウェスタンブロット解析)				
ヒト肺ガン患者尿75mlおよび健常者尿150mlを濾過後、分子量10,000カットの限外濾過装置(セントリカットU-10:クラボウ社製)にて300μlになるまで濃縮した。これに10mlの30mMトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸緩衝液(pH6.8)を加え、再び300μlになるまで濃縮した後、実施例5と同様にして、電気泳動および抗プラスミノゲンポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロットングを行った。結果を図3に示した。ヒト肺ガン患者尿を試料とした場合、分子量38,000、42,000、45,000の3本のバンドが検出されたのに対し、健常者尿を試料とした場合では反応物は認められなかった。このことから、ヒト尿中にはこれらのガン特異タンパク質以外の免疫学的にプラスミノゲンに類似したタンパク質が存在しないものと考えられた。				
【0033】実施例9 ガン特異タンパク質に結合するモノクローナル抗体を用いたEIAの構築(一段法)				
(1) HRP 標識Fab'の調製				
KRIAb12を2mg/ml含むPBS溶液50mlに1Mクエン酸緩衝液(pH3.2)を添加して、pH4.1に調整した。これに、12.5mgのブタ胃粘膜ペプシン(シグマ社製)を添加し、37°Cで5時間インキュベートして抗体を消化させた。これに3Mトリス塩酸緩衝液(pH8.6)を加えてpH7.0とし、2mlに濃縮した後、この濃縮液を10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したスーパーローズ12HR16/50カラム(アマシャムファルマシア社製)に通し、F(ab') ₂ 画分を得た。回収されたF(ab') ₂ の量は26.5mgであった。				
【0034】(2) 一段法EIA				
抗原の同一部位に対し互いに競合しない2種類のモノクローナル抗体、KRIAb70およびKRIAb12を用いて検討した。96穴のイムノマイクロプレートMaxisorp(ナルジェ・ヌンク社製)の各ウェルに50mM炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH9.6)で希釈した10μg/mlのKRIAb70を250μl添加し4°Cで一晩静置し、抗体を固相化した。次に、プレートを300μlのT-PBSで5回洗浄後、T-B-PBSを各ウェルに300μlずつ添加し、室温で1時間ブロッキングした。次にウェルに(1)で調製したKRIAb12のH				

RP標識Fab'のT-B-PBS 溶液 (200ng/ml) を 100 μ l、次いでT-B-PBS で希釈したガン特異タンパク質を 100 μ l 加え混合後、室温で90分間反応させた後、このプレートを 300 μ l のT-PBS で 5 回洗浄した。次に、200 μ l のオルトフェニレンジアミン含有基質 (0.5mg/mlオルトフェニレンジアミン、0.015 %過酸化水素) を加え室温で*

*30分間反応させた。このウェルに4N硫酸を100 μ l 加えて反応を停止させ、イムノリーダー NJ-2000 (インターメッド社製) を用いて、反応生成液の 490nmの吸光度を測定した。結果を表 3 に示す。

【0035】

表3

ガン特異タンパク質濃度 ng/ml	波長490nm における吸光度
4	1.504
2	0.926
1	0.502
0.5	0.257

【0036】実施例10 ガン特異タンパク質に結合するモノクローナル抗体を用いたEIAの構築 (二段法)

96穴のイムノマイクロプレートMaxisorp (ナルジェ・ヌンク社製) の各ウェルに50mM炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 9.6) で希釈した10 μ g/mLのKR1mAb70を250 μ l 添加し4 で一晩静置し、抗体を固相化した。次に、プレートを300 μ l のT-PBS で 5 回洗浄後、T-B-PBS を各ウェルに300 μ l ずつ添加し、室温で1時間ブロッキングした。次にウェルにT-B-PBS で希釈したガン特異タンパク質を200 μ l 加え室温で60分間反応させた後、このプレ

ートを 300 μ lのT-PBS で 5 回洗浄した。次に、各ウェルに、実施例9(1) で調製したKR1mAb12のHRP 標識Fab'のT-B-PBS 溶液 (200ng/ml) を 200 μ l 加え、60分間反応させた。このプレートを 300 μ l のT-PBS で 5 回洗浄した後、200 μ l のオルトフェニレンジアミン含有基質を加え室温で30分間反応させた。このウェルに4N硫酸を100 μ l 加えて反応を停止させ、イムノリーダー NJ-2000 (インターメッド社製) を用いて、反応生成液の490nm の吸光度を測定した。結果を表 4 に示す。

【0037】

表4

ガン特異タンパク質濃度 ng/ml	波長490nm における吸光度
4	2.097
2	1.281
1	0.725
0.5	0.378

【0038】実施例11 ガン患者血中および尿中ガン特異タンパク質量の測定

実施例9 (2) に示した抗hLBS-1モノクローナル抗体を用いた一段法EIA (測定法A) により、遠隔転移を有する各種ガン患者 (肺ガン、胃ガン、膀胱ガン、前立腺ガン、大腸ガン) 並びに健常者の血漿中および尿中のガン

特異タンパク質量を測定した。あわせて、実施例5の抗プラスミノ-0022モノクローナル抗体を用いた一段法EIA (測定法B) により、ガン患者並びに健常者の尿中のガン特異タンパク質量を測定した。結果を表 5 に示した。

【0039】

表5

対象者	測定値 (ng/ml)	
	測定法A	測定法B
方法A (抗hLBS-1モノクローナル抗体を用いた血漿法EIA) を用いた場合は、血漿を試料とすると患者、健常者の測定値の分布に差は認められず、ガン特異タンパク質の測定はできなかったが、尿を試料とした場合では健常	ガン患者 (n = 7) 11853 \pm 2715	77.8 \pm 86.0
	100.0 \pm 102.4	

者との測定値の分布は乖離した。また方法B (抗PLG ポリクローナル抗体を用いた一段法EIA) を用い、尿を試料とした場合でも、健常者と患者の一部に測定値の重なりは生じたが、おおよそ健常者と患者の識別は可能

であった。

【0040】実施例12 転移の有無によるガン患者尿中ガン特異タンパク質量の測定値

実施例9(2)に示した抗hLBS-1モノクローナル抗体を*

*用いた一段法EIA(測定法A)により、健常者、転移の認められるガン患者及び転移の認められないガン患者尿中のガン特異タンパク質量を測定した(いずれも術前に採取した尿)。結果を表6に示した。

表6

対象	尿中ガン特異タンパク質濃度 (ng/ml)
	平均値 ± 標準偏差値 (最低値最高値)
健常者 (n = 10)	4.4 ± 3.0 (0.6 10.7)
大腸ガン患者	
転移あり (n = 4)	29.7 ± 15.2 (18.6 52.2)
転移なし (n = 5)	3.6 ± 3.9 (0.6 9.3)
肺ガン患者	
転移あり (n = 5)	25.5 ± 6.2 (17.6 32.0)
転移なし (n = 2)	7.5 ± 1.5 (6.4 8.5)
胃ガン患者	

【0041】大腸ガン、肺ガン、胃ガン、転移の有無にかかわらず、存在するガン特異タンパク質の測定が可能となる。また、転移の認められないガン患者では健常者とほぼ同程度の測定値を示すのに対し、転移の認められるガン患者では全例が健常者より高値を示した。また原発巣除去手術時に転移は認められなかったものの、その後転移の認められた異時性転移例でも、手術前に高値を示していた。

【0041】

【発明の効果】本発明によれば、ヒトガン患者生体内に

SEQUENCE LISTING

```

<110> Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.
<120> ガン特異タンパク質の測定方法およびガンの診断方法

<130> P2000-115
<140> JP P2000-127207
<141> 2000-4-27
<160> 2
<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1
Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thy Gly

1 5 10
<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2
Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thy Gly
1 5

```

【0042】

【配列表】

フロントページの続き

(72)発明者 伊丸岡 智子
新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱
瓦斯化学株式会社新潟研究所内
(72)発明者 我山 眞與
新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱
瓦斯化学株式会社新潟研究所内

(72)発明者 田原 寅一
新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱
瓦斯化学株式会社新潟研究所内
Fターム(参考) 4B024 AA12 BA44 GA01
4B064 AG27 CA20 DA14
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA50
FA72 FA74

专利名称(译)	用于测量癌症特异性蛋白质的方法和用于诊断癌症的方法		
公开(公告)号	JP2001124778A	公开(公告)日	2001-05-11
申请号	JP2000127207	申请日	2000-04-27
[标]申请(专利权)人(译)	三菱瓦斯化学株式会社		
申请(专利权)人(译)	三菱瓦斯化学株式会社		
[标]发明人	立川智一 中野昌彦 山崎雅俊 伊丸岡智子 莪山真與 田原寅一		
发明人	立川 智一 中野 昌彦 山崎 雅俊 伊丸岡 智子 莪山 真與 田原 寅一		
IPC分类号	G01N33/574 C07K16/18 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.L C07K16/18 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.C C12N15/00.C C12N15/00.CZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/BA44 4B024/GA01 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/DA14 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	1999229015 1999-08-13 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种简单有效的癌症免疫学诊断方法。 解决方案：它存在于人类癌症患者的尿液中，具有血管内皮细胞生长抑制活性，在还原条件下，通过含有十二烷基硫酸钠的聚丙烯酰胺凝胶电泳测得的分子量为38,000、42,000或45,000，氨基末端氨基酸序列结合其Lys-Val-Tyr-Leu-Ser-Glu-Cys-Lys-Thr-Gly-或Val-Tyr-Leu-Ser-Glu-Cys-Lys-Thr-Gly-的蛋白质 该抗体或其抗体片段用于测量人尿中的蛋白质。

特異タンパク質濃度 ng/ml	波長490nmにおける吸光度
4	2.097
2	1.281
1	0.725
0.5	0.378