

(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2001-299343

(P2001-299343A)

(43)公開日 平成13年10月30日(2001.10.30)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード ⁸ (参考)
C 1 2 N 15/02		C 0 7 K 16/28	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/28		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/53	K 4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08		33/577	B 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53		(C 1 2 P 21/08	

審査請求 未請求 請求項の数 70 L (全 7 数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-120112(P2000-120112)

(71)出願人 000134970

株式会社ニチレイ

東京都中央区築地6丁目19番20号

(22)出願日 平成12年4月20日(2000.4.20)

(72)発明者 若杉 尋

東京都中央区築地5-1-1

(74)代理人 100075775

弁理士 戸田 親男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 CD57抗体

(57)【要約】

【解決手段】 ヒトCD57抗原と特異的に結合するクラスがIgGであるモノクローナル抗体、及び該抗体を產生するハイブリドーマが提供される。

【効果】 本抗体によればCD57の正確なアッセイができるので、CD57を產生するNK細胞のアッセイが可能となり、そのうえ本抗体はクラスがIgGであるため、取り扱い易いほか、免疫沈降等も可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒトCD57抗原と特異的に結合し、クラスがIgGであることを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項2】サブクラスがIgG1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】請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体を産生することができるハイブリドーマ。

【請求項4】ハイブリドーマJNK-1。

【請求項5】請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体を使用することを特徴とするヒトCD57の測定方法。

【請求項6】請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体を使用することを特徴とするNK細胞由来のヒトCD57の測定方法。

【請求項7】請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体を含有することを特徴とするヒトCD57測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、CD57と特異的に結合し、且つクラスがIgGである新規モノクローナル抗体及びその利用に関するものである。

【0002】

【従来の技術】NK細胞(Natural killer Cell)は、T細胞・B細胞などと同じくリンパ球のサブセットである。NK細胞は主に骨髄中で造血幹細胞から成熟・分化すると考えられている。NK細胞は抗原特異的受容体を発現してはいないが、防御的免疫機能において重要な役割を担っている。例えば、NK細胞は免疫的な刺激を受けると、ある種のサイトカインを分泌して細胞障害活性を示す。特に、特定のウイルス、細胞内細菌類、寄生虫、種々の腫瘍細胞に対してこのような活性を有している。

【0003】一方、CD57抗原は、NK細胞およびT細胞の一部に発現する分子量110kDaの分子として発見された。CD57陽性(CD57抗原を発現する)細胞は、ヒト正常末梢リンパ球の約15%であり、その割合は加齢とともに増すといわれている。またCD57陽性細胞は骨髄や肝臓にも存在しているが、胸腺には存在しない。最近の研究によれば、大腸菌、慢性リンパ性白血病、 AIDS、リウマチ性関節炎あるいは、腎臓・心臓・骨髄移植後の患者では、CD57陽性T細胞が増加することが報告されている。

【0004】これまで、NK細胞のマーカーとしては、CD16、CD56、CD57などが、単独あるいは組み合わせて用いられてきた。CD57抗体は1981年に安保らによって初めて作製されて以来、数種類のモノクローナル抗体が報告されている。しかしながら、そのいずれも、イムノグロブリンのサブクラスが、IgMで

あり、免疫沈降やウエスタンプロットなどには使用することが不適であって、わずかにフローサイトメトリーなど限られた用途にしか使用できないものであった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】IgMは、サブユニット(IgMs)が5個結合したマクログロブリンであって、分子量が大きく、一般的に取扱いにくいものであり、また、プロテインAとの結合性も低いため、精製しにくいという欠点を本質的に有しているが、IgGの場合はこのようなことはない。

【0006】また、モノクローナル抗体を用いる各種の解析手法においても、イムノグロブリンのクラスがIgMよりもIgGであることが有利な場合が多く、例えば、免疫沈降やウエスタンプロットなどにおいてはIgGの方が有利である。また、フローサイトメトリーに用いる際に必要となるモノクローナル抗体の各種蛍光物質による標識操作においてもIgGクラスのものの方が有利な点が多い。そこで、本発明者は、CD57抗原を認識するイムノグロブリンのクラスがIgGであるモノクローナル抗体を創製することにより、NK細胞の研究及びNK細胞が関与すると考えられる各種疾患の診断・治療の発展に多大な寄与ができるものと考えるに至った。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記目的を達成するためになされたものであって、鋭意研究の結果、イムノグロブリンのクラスがIgGである新規のCD57抗体を創製するに至り、本発明の完成に至ったものである。以下、本発明について詳述する。

【0008】目的とするモノクローナル抗体を産生するための融合細胞(以下、ハイブリドーマということもある)を創製するため、本発明においては、免疫原としてヒトの抹消血中のNK細胞分画を用いることとする。すなわち、自動細胞分離装置(FACS Vantageセルソーター)を用いてヒト末梢血より、CD3陽性CD56陽性細胞及びCD3陽性CD57陽性細胞を分離した後、それらを混合し免疫原とする。

【0009】免疫に使用する動物については、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ウサギ、ラット、マウス等の動物が挙げられるが、モノクローナル抗体を作成するためには融合に用いる骨髄腫細胞との相性の問題により、通常、マウスかラットが使用できる。免疫に際しては、免疫応答を促進するために免疫原を各種アジュバントと混合して使用してもよい。免疫はある間隔で、マウスの腹腔、皮下、あるいは静脈に、血清中の抗体価の上昇が明らかに認められるまで続け、最終免疫の数日後に、細胞融合のために脾臓を無菌的に摘出する。

【0010】モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製は、(Kohler, G. and Milstein, C., Nature 256, 495(1975))に準じて実施することができる。すなわち、免疫動物から摘出した脾臓細胞、リンパ節細胞

又はBリンパ球から選ばれる抗体産生細胞と骨髄腫細胞を混合し、細胞融合促進剤の存在下で融合する。細胞融合に用いる骨髄腫細胞はP3-Ag8-、p3-X63-Ag8、P3-X63-Ag8-U1、NS1-Ag4/1、X63-Ag8-6.5.3、SP2/0-Ag14、MPC11-45、6TG1.7、S194/5X0、BU.1等が用いられる。好ましい細胞融合促進剤としては、例えば平均分子量が1000~6000のポリエチレングリコールなどが挙げられる。また、電気パルスによる融合も可能である。

【0011】次いで、ハイブリドーマの選択を次のようにして行う。細胞融合に使用する骨髄腫細胞は、8-アザグアニン耐性株でヌクレオチド合成のサルベージ系路に必要なヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシリトランスフェラーゼを欠くため、HAT培地(ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジンを含む培地)中ではヌクレオチドの合成ができず、生き残れない。よって細胞融合を行った後、HAT培地にて10~14日間培養することにより、脾細胞と骨髄腫が融合したハイブリドーマのみを選択することができる。

【0012】このようにして得たハイブリドーマの中から、目的とする抗NK細胞抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングするため、ヒト末梢血中のCD3陽性細胞の約10~30%程度と特異的に結合する抗体を産生するクローンを選択する。このクローンを用いることによって、モノクローナル抗体を得る事ができる。さらに、これらのモノクローナル抗体のうち既存のCD57抗体と同様の細胞群と反応しあつ、イムノグロブリンのクラスがIgGであるものを選択する。

【0013】このようにしてヒトCD57抗原と特異的に反応することができ、イムノグロブリンのクラスがIgGであるCD57抗体を安定的に産生できるハイブリドーマを得た。このようにして得たハイブリドーマは、JNK-1と命名し、これを工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した(FERM P-17813)。

【0014】モノクローナル抗体の製造は、ハイブリドーマを血清添加培地ならびに無血清培地にて培養するイン・ビトロ法、あるいはハイブリドーマをマウス腹腔に移植して、腹水を採取する、イン・ビボ法にて行い、硫酸安塩析、アフィニティーコロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、分子篩カラムクロマトグラフィー、プロテインAカラムクロマトグラフィー、抗原固定化カラムクロマトグラフィー等によって精製できる。得られたモノクローナル抗体は、免疫沈降法等によって、目的とするCD57抗体であることが確認された。

【0015】このようにして作製した抗体は、ヒトCD57に対する特異性がきわめて高く、CD57を特異的、選択的に認識して反応し、これと結合する特質を有するため、本抗体を利用して各種方法によってヒトCD50

57のイムノアッセイを行うことができる。したがって、本抗体を利用することによって、CD57産生細胞、CD57含有細胞のイムノアッセイも可能となり、例えばNK細胞のイムノアッセイを迅速、正確に行うことが可能となる。

【0016】イムノアッセイとしては、既述したように、放射免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(EIA)、蛍光免疫測定法、化学発光免疫測定法、免疫組織化染色法、免疫沈降法その他が例示され、本抗体を第一抗体及び/又は酵素標識した第二抗体として使用すればよい。

【0017】標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質などがあげられる。また、本発明に係るイムノアッセイにおいて、酵素標識抗体を使用するほか、アビジン-ビオチン系を利用して、酵素標識抗体にかえてビオチン標識した抗体を用い、そして酵素としてアビジン標識酵素を用いてアッセイ系を組み立ててもよい。アビジンとしては、卵白由来のアビジン、微生物由来のアビジン(例えばストレプトアビジン)等がいずれも使用可能である。

【0018】標識酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、ウシ小腸アルカリフオスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ等の酵素免疫分析法(EIA)に常用される酵素が適宜使用され、これらの酵素に適合したEIAで常用される発色基質が適宜使用される。発色基質としては、例えばHRPの場合は、3,3,5,5-テトラメチルベンジジン(TMBZ)、TMBZ·HCl、TMBZ·PS、ABTS、o-フェニレンジアミン、p-ヒドロキシフェニル酢酸等が使用され、アルカリフオスファターゼの場合は、p-ニトロフェニルフオスフェート、4-メチルウンベリフェリルフオスフェート等が使用され、-ガラクトシダーゼの場合は、o-ニトロフェニル- -D-ガラクトピラノシド、4-メチルウンベリフェリル- -D-ガラクトピラノシド等が使用される。

【0019】蛍光物質としては、フロオレッセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートなど、発光物質としては、ルミナール、アクリジニウムエステル、ルシフェリンなど、また、放射性物質としては、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁴C、³H、³⁵Sなどを使用することができるが、これら例示したものに限らず、免疫測定法に使用しうるものであれば、他の物質も使用することができる。

【0020】また本発明は、ヒトCD57抗原と特異的に結合するクラスがIgGである新規モノクローナル抗体、それを利用するヒトCD57の検出、測定方法、ひいてはそれを発現生成している細胞(例えばNK細胞)の染色、検出、測定方法を新たに提供するだけでなく、抗ヒトCD57抗体、標識化抗ヒトCD57抗体、抗N

K細胞抗体、標識化抗NK細胞抗体、酵素基質、発色試薬、緩衝液、その他必要な物質を含有するヒトCD57（又はその産生ないし含有細胞）測定用キットも提供するものである。

【0021】以下、本発明の実施例について述べる。

【0022】

【実施例1；モノクローナル抗体の作製】ヒトCD57と特異的に結合するサブクラスがIgGであるモノクローナル抗体を以下により作製した。

【0023】(1)免疫原の作製

自動細胞分離装置(FACS Vantageセルソーター)を用いてヒト末梢血より、CD3陽性CD56陽性細胞及びCD3陽性CD57陽性細胞を分離した後、それらを混合し免疫原とした。

【0024】(2)ハイブリドーマの作製

ハイブリドーマ(融合細胞)の作製は次のようにして行った。

【0025】a)免疫および細胞融合

Balb/cマウスに上記の細胞を数回投与した後、免疫されたマウスの脾細胞とマウス骨髄腫由来細胞株(P3-X63-Ag8-U1; P3U1)を細胞融合促進剤としてポリエチレンギリコールを用い、常法にしたがって細胞融合した。次いでHAT培地(1×10^{-4} Mヒポキサンチン、 4×10^{-7} Mアミノブテリン、 1.6×10^{-3} Mチミジン含有)にて培養し、生育したクローンを脾細胞と骨髄腫細胞が融合したハイブリドーマとして選択した。

【0026】b)CD57抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

上記で得たハイブリドーマの中から、抗NK細胞抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングとして、ヒト末梢血中のCD3陽性細胞の約10~30%程度と特異的に結合する抗体を産生するクローンを選択した。さらに既存のCD57抗体と同様の反応性を示しかつイムノグロブリンのクラスがIgGであるものを選択した。その結果、クローンJNK-1を得た。このようにして得た抗NK細胞抗体産生ハイブリドーマのクローンJNK-1を工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM-P-17813として寄託した。

【0027】JNK-1を少量培養した後、マウス腹腔中にこれを投与し、14日後に腹水を採取した。このマウスの腹水液からアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。

【0028】

【実施例2：抗体の性質】ハイブリドーマJNK-1が産生するモノクローナル抗体であるJNK-1抗体のサブクラスを、オクタローニー法を用いて検定した結果、IgG1であり、L鎖の可変領域は鎖であった。またこの点は、ハイブリドーマJNK-1の培養上清を用い、マウスモノクローナルタイピングキット(The Bind

ing Site社製)にてマウス免疫グロブリンのクラス、サブクラスの同定を行った結果からも、IgG1であることが確認された。

【0029】

【実施例3：ヒト末梢血リンパ球との反応性(1)】JNK-1抗体がヒト末梢血リンパ球のどのような集団を認識しているのか詳細に調べるために、フローサイトメトリーにて2重染色の解析を行った(A)。試験は、既存のCD57抗体についても同様に行い(B)、CD3陽性細胞群及びCD3陰性細胞群において両者は同様の反応性を示した(図1)。また、既存のCD57抗体であるHNK-1抗体とJNK-1との2重染色を行ったところ(C)、両者は同じ細胞群を認識していることが明らかとなった(図2)。

【0030】

【実施例4：ヒト末梢血リンパ球との反応性(2)】さらに詳細にJNK-1抗体とCD57抗体との反応性の比較を行うため、ヒト末梢血リンパ球においてCD3、CD57、JNK-1の3重染色の解析をフローサイトメトリーにて行った。図3に示すとおり、CD3陰性CD57陽性細胞(A)、CD3陽性CD57陽性細胞(B)、CD3陽性CD57陰性細胞(C)、CD3陰性CD57陰性細胞(D)の4分画におけるJNK-1抗体の反応性は、陽性(A)、陰性(B)、陰性(C)、陽性(D)であり、CD57抗体の反応性と完全に一致した。

【0031】

【実施例5：結合阻害試験】さらにJNK-1抗体が既存のCD57抗体と同じエピトープを認識するのかを確認するためにヒト白血病細胞株SUP-T-1及びヒト末梢血リンパ球(PBL)を用いて結合阻害試験を行った。まず、各細胞を高濃度の未標識抗体と反応させた後、蛍光標識したJNK-1抗体あるいは既存のCD57抗体2クローン(DD57/HNK-1、CD57/NC1:いずれもサブクラスはIgMである。)を反応させた後、フローサイトメトリーにて解析を行った(図4)。

【0032】蛍光標識化は常法にしたがい次のようにして行った。抗体溶液を0.05M炭酸バッファー(pH9.5)に交換し、1mg/mlに調製後、FITC(ベクトンディッキンソン、Fluorescein Isothiocyanate Isomer)をDMSOに溶解(1~2mg/ml)し、抗体溶液をゆるやかに攪拌しながら添加した。4で1晩攪拌(遮光下)した後、反応液をSephadex G-25カラムにかけて未反応FITCを除去して、FITC標識抗体をそれぞれ得た。

【0033】得られた結果を図4に示したが、図4に示すとおり、SUP-T-1細胞(A)、末梢血リンパ球(B)においていずれも既存の2種類のCD57抗体はJNK-1抗体の反応を阻害した。この結果から、JN

K-1抗体はCD57抗体と同じ分子を認識することが明らかとなった。

【0034】

【実施例6：ウエスタンプロット】JNK-1抗体の認識する分子の分子量を測定するためにウエスタンプロットを行った。CD57陽性ヒト白血病細胞株SUP-T-1およびCD57陰性ヒト白血病細胞株SUP-T-13の細胞可溶化液を常法に従ってSDS-PAGE後、メンブレンに転写し、JNK-1抗体およびCD57抗体で検出した。図5に示すように、SUP-T-1細胞においてJNK-1抗体(3)、CD57抗体(4)とともに110kDaの位置にバンドを検出した。この結果からJNK-1抗体の認識する分子はCD57と同じ110kDaの分子であることが明らかとなった。図5(写真)から明らかなように、SUP-T-13細胞においては、JNK-1抗体(1)、CD57抗体(2)とともに110kDaの位置にバンドは検出されていない。

【0035】

【実施例7：免疫沈降】SUP-T-1細胞(陽性細胞)及びネガティブコントロールとしてのSUP-T-13細胞(陰性細胞)を、マウスIgG1抗体、JNK-1抗体で免疫沈降し、CD57/HNK-1抗体で検出した。

【0036】すなわち、SUP-T-1細胞(陽性細胞)及びSUP-T-13細胞(陰性細胞)の細胞可溶化液をマウスIgG1抗体あるいは、JNK-1抗体と反応させた。Protein G-Sepharose(ファルマシア)にて添加した抗体及びそれと反応している分子を沈降させた。これを、SDS-PAGEに供した後、常法に従って、メンブレンに転写した。

【0037】メンブレンをCD57/HNK-1抗体と反応後、0.05%Tween-20を含むPBS溶液(食塩を含むリン酸緩衝液)にて数回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識したマウスIgM抗体及び発色系としてECL化学発光システム(ファルマシア)を用いて可視化し、得られた結果を図6(写真)に示した。

【0038】図中、各レーンはそれぞれ次のものを示す。レーン(1)：SUP-T-1細胞のCrude membrane protein。レーン(2)：SUP-T-13細胞のCrude membrane protein。レーン(3)、(4)：マウスIgG1抗体で免疫沈降したSUP-T-1細胞及びSUP-T-13細胞のmembrane protein。レーン(5)、(6)：JNK-1抗体で免疫沈降したSUP-T-1細胞及びSUP-T-13細胞のmembrane protein。図面から明らかなように、JNK-1抗体で免疫沈降したレーン(5)に、レーン(1)と同じ110kDaのバンドが検出された。

【0039】以上のように、JNK-1抗体が免疫沈降*

*法に使用できるかを調べた。図6に示すようにJNK-1抗体によってSUP-T-1細胞の可溶化液から免疫沈降された110kDaの分子は、ウエスタンプロットにより既存のCD57抗体によって検出することができた。この結果から、JNK-1抗体は免疫沈降が可能な新たなCD57抗体であることが明らかとなった。

【0040】

【実施例8：各種細胞との反応性】さらに、JNK-1抗体が既存のCD57抗体と同様にフローサイトメトリーにおいて各種の細胞におけるCD57分子の発現を検出できるかを調べた。図7に示すように各種の細胞においてJNK-1抗体(A)は既存のCD57抗体(B)と同様の反応性を示した。

【0041】

【発明の効果】本発明によってはじめて、イムノグロブリンのクラスがIgGであるCD57抗体が作製された。本抗体は既存のCD57抗体と同じ分子を認識して、フローサイトメトリーなどで同様に使用できるばかりでなく、イムノグロブリンのクラスがIgGである特徴から、ウエスタンプロットや免疫沈降を容易に行うことが可能である。その結果、細胞レベルでのCD57分子あるいはNK細胞の解析をより効果的に行うことができるようになった。本抗体は、既存のCD57抗体に替わってより広い分野の研究あるいは白血病その他の疾病的診断に使用することが可能であり、NK細胞を用いた新たな癌治療方法などの開発において有用なものであると期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒト末梢血とJNK-1抗体の反応性を示した30図面である。

【図2】ヒト末梢血をJNK-1抗体と既存のCD57抗体で2重染色した後、フローサイトメトリーを用いて解析した図面である。

【図3】ヒト末梢血をJNK-1抗体と既存のCD57抗体及びCD3抗体で3重染色した後、フローサイトメトリーを用いて解析した図面である。

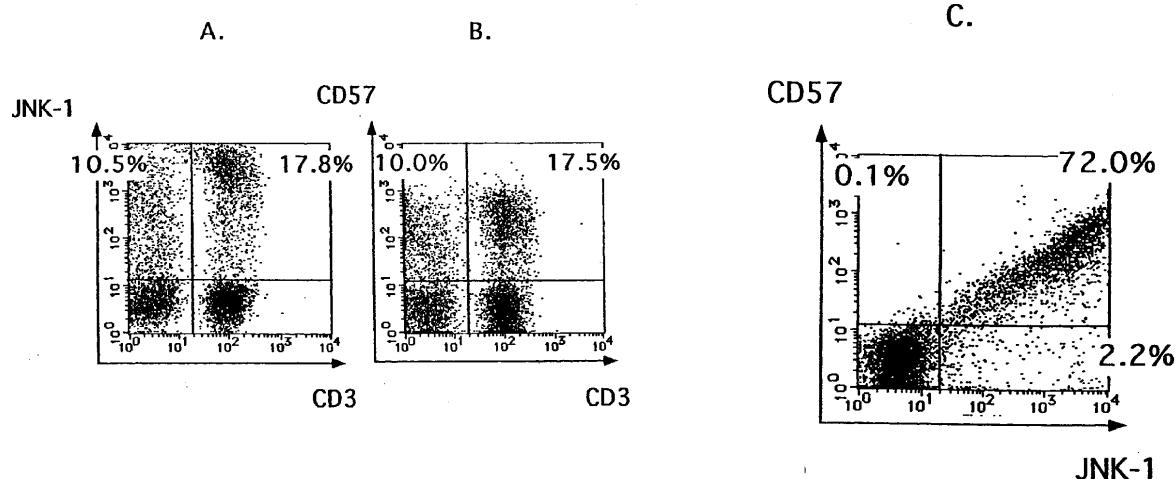
【図4】ヒト末梢血およびSUP-T-1細胞を用いて、既存のCD57抗体2クローニングとJNK-1抗体の間で結合阻害試験を行い、フローサイトメトリーを用いて解析した図面である。

【図5】白血病細胞株を用いて、JNK-1抗体の認識する分子をウエスタンプロットにより解析した図面代用写真である。

【図6】JNK-1抗体を使った免疫沈降反応の後、ウエスタンプロットにより解析した図面代用写真である。

【図7】各種細胞とJNK-1抗体との反応性を既存のCD57抗体と比較して表わした図面である。

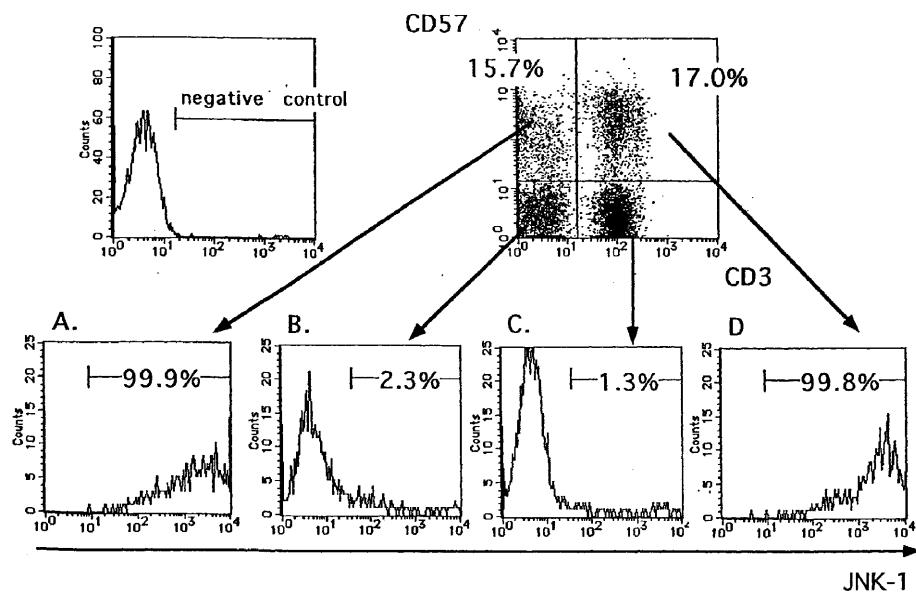
【図1】



【図2】

C.

【図3】



【図5】

(kDa) (1) (2) (3) (4)

210 —

110 —

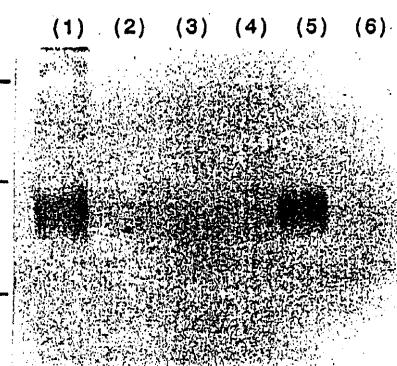
(kDa) (1) (2) (3) (4) (5) (6)

209 —

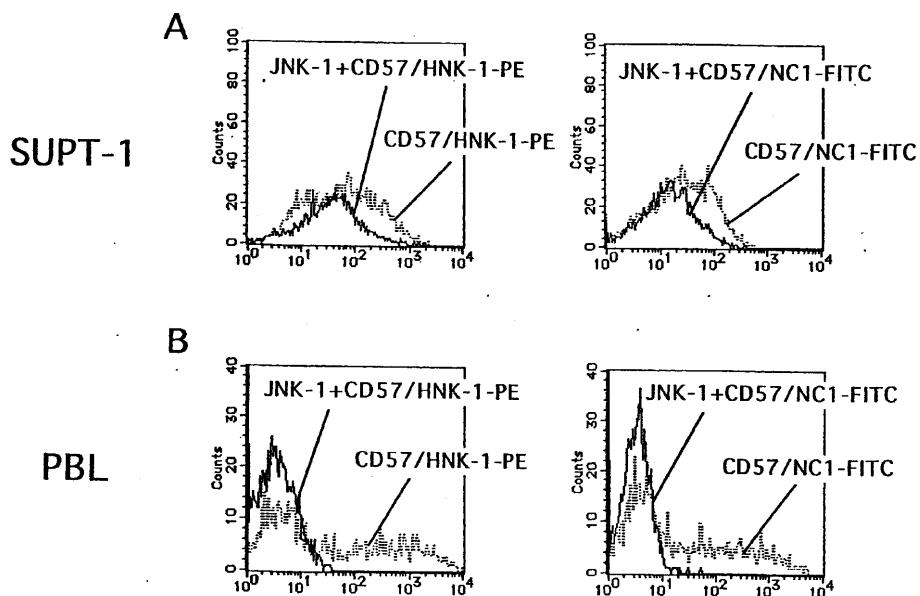
124 —

80 —

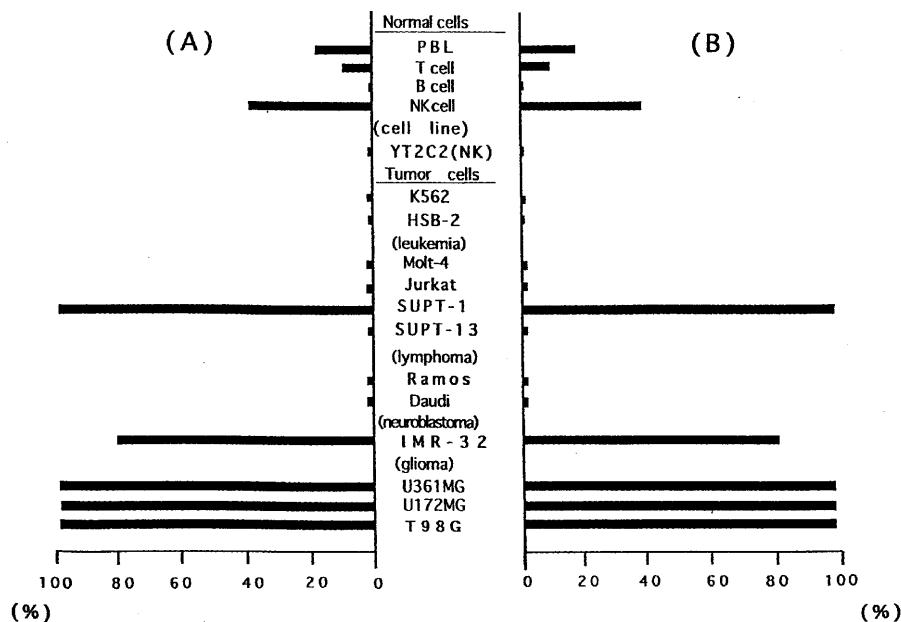
【図6】



【図4】



【図7】



フロントページの続き

(51) Int.CI.⁷
 G 0 1 N 33/577
 // (C 1 2 P 21/08
 C 1 2 R 1:91)

識別記号

F I
 C 1 2 R 1:91)
 C 1 2 N 15/00
 5/00

テ-マコ-ド (参考)
 C
 B

专利名称(译)	CD57抗体		
公开(公告)号	JP2001299343A	公开(公告)日	2001-10-30
申请号	JP2000120112	申请日	2000-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社日冷		
申请(专利权)人(译)	日冷公司		
[标]发明人	若杉尋		
发明人	若杉尋		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/28 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/28 C12P21/08 G01N33/53.K G01N33/577.B C12R1/91 C12N15/00.C C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/BA16 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA51 4H045/EA54 4H045/FA72		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供一种与人CD57抗原特异性结合的种类的单克隆抗体，以及产生该抗体的杂交瘤。[效果]该抗体可以正确地检测CD57，因此可以检测产生CD57的NK细胞，另外，由于该抗体的种类为IgG，因此容易操作，并且可以进行免疫沉淀。有。

【图3】

