

(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2005-261244

(P2005-261244A)

(43) 公開日 平成17年9月29日(2005.9.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/02	C 1 2 N 15/00	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08	G O 1 N 33/53	4 H O 4 5
G O 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2004-75746 (P2004-75746)	(71) 出願人	000125369 学校法人東海大学 東京都渋谷区富ヶ谷2丁目28番4号
(22) 出願日	平成16年3月17日 (2004.3.17)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
		(72) 発明者	黒川 清 東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ4 01
		(72) 発明者	宮田 敏男 神奈川県伊勢原市桜台2丁目16-25 エクセル伊勢原102号
		Fターム(参考)	4B024 AA01 AA11 BA44 DA02 GA05 HA15
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腎系球体上皮細胞局在タンパク質特異性抗体

(57) 【要約】

【課題】本発明の課題は、腎系球体上皮細胞に発現するメグシンタンパク質と反応するモノクローナル抗体とその用途の提供である。

【解決手段】腎系球体上皮細胞に発現するメグシンタンパク質と反応するモノクローナル抗体およびその用途が提供された。このモノクローナル抗体を用いた免疫組織染色により、例えば、膜性腎症や微小変化型ネフローゼなどの系球体上皮細胞系の異常に起因する腎障害においては、腎系球体上皮細胞内に局在するメグシンタンパク質の発現が亢進していることが確認された。他方、IgA腎症などでは、系球体上皮内のメグシンタンパク質の発現は低下していることが判った。このように、腎系球体上皮細胞におけるメグシンタンパク質の染色パターンの比較による病型分類が可能となった。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

腎系球体上皮細胞に局在するメグシタンパク質と結合するモノクローナル抗体。

【請求項2】

配列番号：1に記載されたアミノ酸配列を有するペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体。

【請求項3】

請求項1または請求項2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細胞系。

【請求項4】

FERM P-19734として寄託されたハイブリドーマ4F3。

10

【請求項5】

FERM P-19734として寄託されたハイブリドーマ4F3が産生するモノクローナル抗体。

【請求項6】

FERM P-19734として寄託されたハイブリドーマ4F3を培養し、培養物に含まれるイムノグロブリンを回収する工程を含む、モノクローナル抗体の製造方法。

【請求項7】

腎系球体上皮細胞に局在するメグシタンパク質と結合するモノクローナル抗体を検出する工程を含む、腎障害の診断方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、特定のセルピン（セリンプロテアーゼインヒビター）、すなわちメグシン（Megsin）の特定のエピトープに対して選択的に結合するモノクローナル抗体とその製造法、および該モノクローナル抗体を用いる腎障害の診断方法、および/または診断のための組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

腎不全は、腎疾患患者が最終的に至る病態である。その原因や経歴は一様ではなく、薬物中毒、感染症、悪性腫瘍、糖尿病、全身性エリテマトーデス（SLE）などの本来腎臓以外の病変により、腎障害が発症し、腎不全に至る場合も数多くみられる。

30

【0003】

腎臓の血液濾過作用や解毒作用が全く機能しない末期腎不全においては、腎移植が唯一の治療手段であるが、我が国においては、移植腎の供給体制が十分に整備されているとは言い難い。また、移植療法自体に対する社会的認知も進んでいない。我が国の腎移植例は、年間700余症例に過ぎず、この数値はここ数年増加していない。ゆえに腎代用療法としては透析療法が唯一の治療法であるのが現状である。

【0004】

現在、我が国の末期腎不全透析患者は推定約21万人を数え、人口あたりの患者数では世界第一位である。一人あたりの平均的な治療費は年間約600万円を必要とし、医療保険制度を圧迫する大きな原因のひとつとされている。また、毎週2~3日、1日4~6時間を透析治療のために拘束されることから、患者本人の社会復帰も難しい。

40

【0005】

さらに、近年の人口の高齢化に伴い透析患者年齢も上昇しつつある。このため、腎疾患を早期に診断し、治療し、腎不全への進展を防ぐ診断薬や薬剤の必要性が認識されている。しかし、腎疾患領域は、創薬のための標的分子などの情報研究基盤に乏しく、有効な診断薬や医薬品が誕生しないのが現状である。

【0006】

本発明者らは、腎疾患の発症および進展等の機能に深く係わる組織として腎メサンギウム細胞に着目した。メサンギウム細胞は腎臓以外では見られない臓器特異的な細胞で、腎系球体の構造や機能保持に重要な役割を担っていることはよく知られている。

50

【0007】

また、糸球体障害時にはメサンギウム細胞自身の増殖やメサンギウム細胞から分泌される細胞外マトリックスの増加などが認められることから、疾患の発症および進展にも深く関与する細胞であると推測されている。これらのことから腎疾患の分子メカニズムを解明するには、まずメサンギウム細胞の生物学的特性を解明することが不可欠と考えられる。しかし、メサンギウム細胞に関する遺伝子レベルの特異性は明らかにされていなかった。

【0008】

ヒトの生体内には約60兆個もの細胞が存在し、これらは同一のゲノムDNAを有しているが、個々の細胞、ひいては臓器が異なった生物学的性質を有するのは各細胞や臓器に特異的に発現する遺伝子によるものと考えられている。

10

【0009】

本発明者らは、メサンギウム細胞に発現する遺伝子群のプロファイルを明らかにすれば、メサンギウム細胞に特異的な高発現遺伝子群を検出することが可能であると考えた。そして、その中から腎疾患の状態に関与する遺伝子群を決定することもでき、腎疾患の分子メカニズムを解明する糸口も見つかり、それに基づいた新しい腎疾患の診断法や治療法の開発も可能になると考えた。そこで、本発明者らは、メサンギウム細胞の遺伝子発現パターンを明らかにし、その細胞特性を遺伝子レベルで解析することを試みた。

【0010】

まず本発明者らは、メサンギウム細胞に発現する遺伝子を定量的に解析することを目的として、培養ヒトメサンギウム細胞からmRNAを抽出して、3'-directed cDNAライブラリーを作製した。そして、クローンに挿入された遺伝子断片の大規模DNA配列決定およびデータベース解析を施行した（非特許文献1）。

20

【0011】

その結果、メサンギウム細胞で特に強く発現する遺伝子として、メグシンと命名した全長2,249bpからなる遺伝子を単離した。そして、メグシンの全長cDNAクローンがコードする380個のアミノ酸からなる新規タンパク質であるメグシンタンパク質を単離、取得することに成功した。

【0012】

更に、SwissProtアミノ酸配列データベースを用いてFASTAプログラムによるアミノ酸ホモロジー検索を行った。そして、メグシンタンパク質のアミノ酸配列中にセリンプロテアーゼインヒビター（セルピン：SERPIN）スーパーファミリー（非特許文献2～6）の生理活性中心部位として重要な反応性ループ領域（reactive loop site）内のコンセンサス配列（EEGTEAAAAT / 配列番号：2）に類似の配列（EEGTEATAAT / 配列番号：3）が存在していることを見出した。

30

【0013】

すなわち、メグシンは、セルピンの構造的特徴を有し、他のセルピンと同様に活性部位である反応性ループ領域（P17-P5'：EEGTEATAATGSNIVEKQLPQS / 配列番号：4）が存在する（非特許文献7）。これらのことより、ヒトメグシンタンパク質が、セルピンに属するタンパク質であることを明らかにした（非特許文献7）。そしてこれらの知見を特許出願した（特許文献1）。

40

【0014】

また、IgA腎症患者や糖尿病性腎症患者と健常人とで腎臓組織中のメグシンの発現量を比較すると、IgA腎症患者や糖尿病性腎症患者においてメグシンの発現量が有意に多い（非特許文献7、8）。また、ラットを用いた実験的メサンギウム増殖性糸球体腎炎モデル（Thy-1腎炎モデル）において、同様なメグシン発現量の上昇が認められた（非特許文献9）。このことからメグシンの発現がメサンギウム細胞の機能異常に伴い変化し、疾患の発症および進展に深く関与していることが明らかになった。

【0015】

メサンギウムの機能におけるメグシンの役割をさらに理解するために、本発明者らはマウスゲノムでヒトメグシンのcDNAを過剰発現させた。2系統のメグシントランスジェニック

50

クマウスが得られ、それらは、進行性のメサンギウム基質の拡大、メサンギウム細胞の増殖、および免疫複合体沈着物の増加を示した（非特許文献10、特許文献2）。

【0016】

これらの知見は、メグシンが、メサンギウムの機能に生物学的に重要な影響を及ぼすことを示している。興味深いことに、メグシンの単一遺伝子操作は、実験的およびヒト糸球体腎炎に存在する初期的なメサンギウム病変を発生させることができる。このように、動物個体においても、メグシンはメサンギウム増殖性糸球体腎炎の発症に関与することが報告されている。

【0017】

一方、腎障害においては、末期即ち腎不全近くになるまで顕著な自覚症状が現れないことから、その発生が見過ごされ易く、発症した時点では既に腎臓は回復不可能なダメージを受けている場合が多い。従って、自覚症状の発現をみる前に、できる限り初期の段階で腎障害を発見することが、腎不全への移行を防ぐために、また、透析治療による保険財政負担を避けるためにも大切である。

10

【0018】

本発明者らは、腎疾患の確定診断および重症度を判定するためには、病態と密接に関連した特異的なタンパク質を測定する必要があると考えた。そこで、本発明者らは、前記メグシン遺伝子およびメグシンタンパク質に着目し、メグシンペプチド抗体を用いた生体試料中のメグシンタンパク質を測定することからなる腎機能評価方法を確立した（特許文献3）。

20

【特許文献1】国際公開公報99/15652号公報

【特許文献2】国際公開公報01/24628号公報

【特許文献3】国際公開公報00/57189号公報

【非特許文献1】Yasuda, Y. et al., *Kidney Int.*, 53: 154-158 (1998)

【非特許文献2】Carrell, R.W. et al., *Trends Biochem. Sci.*, 10: 20 (1985)

【非特許文献3】Carrell, R. W. et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 52: 527 (1987)

【非特許文献4】Kruithof, E. K. O. et al., *Blood*, 86: 4007 (1995)

【非特許文献5】Potempa, J. et al., *J. Biol. Chem.*, 269: 15957 (1994)

【非特許文献6】Remold-O'Donnell, E., *FEBS Lett.*, 315: 105 (1993)

30

【非特許文献7】Miyata, T. et al., *J. Clin. Invest.*, 102: 828-836 (1998)

【非特許文献8】Suzuki, D. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10: 2606 (1999)

【非特許文献9】Nangaku, M. et al., *Kidney Int.*, 60: 641 (2001)

【非特許文献10】Miyata, T. et al., *J. Clin. Invest.*, 109: 585 (2002)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

以上述べたように、メグシンタンパク質抗体を用いた腎障害の診断方法は、腎障害の早期診断および病態の進展度の判定に極めて有用な手段である。本発明の目的は、該メグシンタンパク質抗体の結合エピトープを明らかにし、病態特異的な診断剤を提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明者らは、様々な組織および細胞をノーザンブロットおよび逆転写ポリメラーゼ連鎖反応で分析したところ、メグシンは、ヒト繊維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、ケラチノサイトでは発現が弱く、メサンギウム細胞で特に強く発現していることが判った。これらの知見はさらに *in situ* ハイブリダイゼーション (Miyata, T. et al., *J. Clin. Invest.*, 102: 828 (1998)、Suzuki, D. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10: 2606 (1999)) およびメグシン抗体を用いた免疫組織化学法 (Inagi, R. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286: 1098 (2001)) により確認された。

50

【0021】

従って、メグシタンパク質に対し、特異性に優れた抗体（モノクローナル抗体）を見出し、特定することは、腎障害の生物学的性質の解明、腎疾患の原因の究明、ひいては、腎疾患の治療、診断等に有効である。

【0022】

本発明者らは、組換えメグシタンパク質を免疫原に用いてメグシタンパク質を認識する多くの抗体を得た。更にその腎組織に対する特異性と結合エピトープとの関係を精査した。そして、本発明者らは、糸球体上皮細胞系の異常に起因する腎障害時の腎糸球体上皮細胞に局在するメグシタンパク質と反応するモノクローナル抗体4F3を見出し、そのエピトープ（246-260：LSEIENKLTFFQNLME / 配列番号：1）を決定した。さらに、糸球体上皮細胞に局在するメグシタンパク質の局在パターンが病型によって異なることを明らかにし、本発明を完成した。

10

【0023】

すなわち、本発明のモノクローナル抗体4F3を用いて染色パターンを比較したところ、IgA腎症や糖尿病性腎症などのようなメサンギウム細胞の障害に由来する腎障害では、糸球体上皮細胞に局在するメグシタンパク質の局在は低下し、他方、膜性腎症や微小変化型ネフローゼなどの糸球体上皮細胞系の異常に起因する腎障害の場合は、腎糸球体上皮細胞内のメグシタンパク質の局在が亢進していることを見出した。従って、例えば本発明のモノクローナル抗体を用いた免疫組織染色などの手段を用いて糸球体上皮細胞に局在しているメグシタンパク質の染色強度を測定することにより、腎障害の病型診断が可能となる。

20

【0024】

メグシタンパク質に対するモノクローナル抗体（WO 00/57189）や、メグシタンパク質の反応性ループ領域（P17-P5'：EEGTEATAATGSNIVEKQLPQS / 配列番号：4）内のエピトープと特異的に結合する抗体（WO 03/084998）は公知である。しかし、いずれも病型との関連性は知られていない。更に、糸球体上皮細胞系の異常に起因する腎障害時に腎糸球体上皮細胞に局在するメグシタンパク質に対する反応性についての知見は確認されていなかった。本発明によるモノクローナル抗体は、糸球体上皮細胞系の異常に起因する腎障害において腎糸球体上皮細胞に局在するメグシタンパク質と反応することができる。すなわち、本発明は以下のモノクローナル抗体、ならびにその用途に関する。

30

- (1) 腎糸球体上皮細胞に局在するメグシタンパク質と結合するモノクローナル抗体。
- (2) 配列番号：1に記載されたアミノ酸配列を有するペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体。
- (3) (1)または(2)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細胞系。
- (4) FERM P-19734として寄託されたハイブリドーマ4F3。
- (5) FERM P-19734として寄託されたハイブリドーマ4F3が産生するモノクローナル抗体。
- (6) FERM P-19734として寄託されたハイブリドーマ4F3を培養し、培養物に含まれるイムノグロブリンを回収する工程を含む、モノクローナル抗体の製造方法。
- (7) 腎糸球体上皮細胞に局在するメグシタンパク質と結合するモノクローナル抗体を検出する工程を含む、腎障害の診断方法。

40

【発明の効果】

【0025】

本発明のモノクローナル抗体4F3は、糸球体上皮細胞系の異常に起因する腎障害時の腎糸球体上皮細胞に局在するメグシタンパク質と反応する。よって、例えば免疫組織染色などの手段により、該抗体を用いた腎組織の染色パターンを比較することにより、腎疾患の病型診断が可能となる。即ち、IgA腎症や糖尿病性腎症などのようなメサンギウム細胞の障害に由来する腎障害では、糸球体上皮細胞のメグシタンパク質の局在は低下し、他

50

方、膜性腎症や微小変化型ネフローゼなどの糸球体上皮細胞系の異常に起因する腎障害の場合は、腎糸球体上皮細胞内のメグシタンパク質の局在が亢進する。このように、腎糸球体上皮細胞におけるメグシタンパク質の染色パターンの比較による病型分類が可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

本発明者らは、メグシタンパク質の特定の領域を認識するモノクローナル抗体が、腎糸球体上皮細胞に局在するメグシタンパク質と反応することを見出した。すなわち本発明は、メグシタンパク質の特定の領域を認識するモノクローナル抗体に関する。本発明のモノクローナル抗体が認識する領域は、メグシタンパク質のアミノ酸配列中、特に配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる領域をいう。従って本発明のモノクローナル抗体は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体である。

10

【0027】

モノクローナル抗体が、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるペプチドによって構成されるエピトープを認識することは、エピトープマッピングによって確認することができる。たとえば実施例3および4においては、様々なアミノ酸配列からなるペプチドを用いて、モノクローナル抗体が認識するエピトープを特定している。

【0028】

メグシンに対するモノクローナル抗体は、ヒトのメグシンまたはそのドメインペプチドを免疫原として、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の取得方法は、後に具体的に述べる。得られたモノクローナル抗体を、上記のような評価方法に基づいて選択することによって、本発明のモノクローナル抗体を得ることができる。

20

【0029】

本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとして、たとえばハイブリドーマ4F3細胞を示すことができる。ハイブリドーマ4F3は、メグシタンパク質を構成するアミノ酸配列中、246-260(LSEIENKLTFFQNLME/配列番号：1)を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である。ハイブリドーマ4F3が産生するモノクローナル抗体4F3は、腎糸球体上皮細胞に局在するメグシタンパク質と反応する。

【0030】

ハイブリドーマ4F3は、2004年3月16日付けで日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号中央第6に所在の独立行政法人産業技術総合研究所内特許生物寄託センターに対して、受託番号FERM P-19734として寄託されている。

30

以下に、寄託を特定する内容を記載する。

(a)寄託機関の名称・あて名

名称：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

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号中央第6（郵便番号305-8566）

(b)寄託日：平成16年3月16日

(c)受託番号：FERM P-19734

【0031】

このハイブリドーマ4F3細胞株が産生するモノクローナル抗体のアイソタイプは、H鎖はIgG1、L鎖は であつた。本発明はまた、上記抗体のクラススイッチ変異体、例えば、アイソタイプIgG3、IgG1、IgG2b、IgG2aおよびその他の免疫グロブリンサブクラスに属する変異体等を包含し、その様な変異体は、Martinらの方法により作成することができる(Martin, C. et al.: J. Immunol. Methods., 145:1118, 1991)。

40

【0032】

メグシタンパク質に対するモノクローナル抗体の作製には、免疫原性抗原として使用できるメグシタンパク質が必要である。抗原としてのメグシタンパク質は、培養細胞、例えばメグシタンパク質産生細胞を用いて得ることができる。メグシタンパク質産生細胞としては、例えばヒト腎由来細胞等が挙げられる。このメグシタンパク質産生細胞

50

胞は、当該分野で知られた、あるいはそれらと実質的に同様な培地や培養方法を用いて培養し、培養上清中に産生されるメグシタンパク質を例えばイオン交換クロマトグラフィーおよび/またはポリクローナル抗体を使用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

【0033】

また、組換えメグシタンパク質も用いることができる。具体的には、メグシタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子断片を含む組換えベクターにより宿主細胞を形質転換した後、この形質転換宿主を培養して、メグシタンパク質のアミノ酸配列を含むポリペプチドを製造し、該ポリペプチドを免疫原として使用するものである。メグシンのcDNAを含む組換えベクターは、通常の遺伝子組換え手法により、例えばプラスミドベクターに挿入することによって作製される。ベクターとしては、プラスミドやファージの他に、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス等のウイルスも使用できる。

10

【0034】

宿主としては、例えば大腸菌、枯草菌、放線菌等の原核生物、ならびに各種細胞、例えば動物細胞、CHO細胞等の市販の細胞株ならびに酵母、植物細胞、昆虫細胞等の真核生物を用いることができる。また、原核生物に使用できるプロモーターとしては、例えばトリプトファン合成酵素オペロン、ラクトースオペロン等を用いることができる。真核生物に使用できるプロモーターとしては、例えば、ウイルスプロモーター、アルコールデヒドロゲナーゼに対するプロモーター、解糖系酵素に対するプロモーター等がある。また、マルチクローニングサイト、プロモーター、耐性遺伝子、複製開始点、ターミネーター、リボソーム結合部位等を有する市販のベクターあるいはプラスミドも使用することができる。耐性遺伝子には、テトラサイクリン、アンピシリン、ネオマイシンに対するもの等がある。この様にして調製されたメグシタンパク質は、更に免疫原性コンジュゲートとしてもよいが、そのまま適当なアジュバントと混合して動物を免疫するのに使用できる。

20

【0035】

このように、抗原は、各種原料、例えば培養細胞、培養組織、形質転換細胞等の抗原産生原料から従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法等の塩析、セファデックス等によるゲル濾過クロマトグラフィー法、イオン交換クロマトグラフィー法、疎水性クロマトグラフィー法、色素ゲルクロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外濾過法、アフィニティークロマトグラフィー法および高速液体クロマトグラフィー法等により精製して

30

【0036】

さらに、メグシタンパク質は、それを断片化したもの、あるいはクローニングされ、配列決定されたcDNA配列から推定されるアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、ポリペプチドをデザインして化学合成し、得られたポリペプチド断片であってもよく、その断片を適当な縮合剤を介して種々の担体蛋白質類と結合させてハプテン-蛋白質の免疫コンジュゲートとし、これを用いて特定の配列のみを認識できるモノクローナル抗体をデザインすることもできる。デザインされるポリペプチドには予めシステイン残基等を付加し、免疫原性コンジュゲートの調製を容易にできるようにすることができる。

【0037】

本発明では腎系球体上皮細胞に局在するメグシタンパク質に特異的に結合する少なくとも1種のモノクローナル抗体を提供する。本発明にかかるモノクローナル抗体は、組換えメグシタンを免疫原として動物を免疫した後、ミエローマ細胞と抗体産生細胞との細胞融合、ハイブリドーマの選択およびモノクローン化、モノクローナル抗体の製造、必要に応じて腹水化といった工程で作製できる。

40

【0038】

動物の免疫は、例えば次のように行う。公知の方法(Miyata, T. et al., J. Clin. Invest., 120: 828 (1998))に従って精製したヒトメグシタンパク質をラット、マウスなどの哺乳類動物に免疫する。哺乳類動物は細胞融合する際の相手の永久増殖性細胞と同系統の動物を用いるのが好ましい。動物の週令は、例えばマウスでは8~10週令が好適であ

50

る。性は雌雄何れでも構わない。

【0039】

免疫動物として、イムノグロブリン遺伝子をヒトの遺伝子に組み換えたトランスジェニック動物を用いることにより、ヒトのイムノグロブリンを産生させることもできる。イムノグロブリン遺伝子をヒトの遺伝子に組み換えたトランスジェニック動物を用いて、目的とする反応性を有する抗体を得る方法は公知である。このようにして得ることができるイムノグロブリンは、動物から得られたものながら、完全にヒトのイムノグロブリン分子である。

【0040】

免疫の方法は、精製したヒトメグシタンパク質を適当なアジュバント（例えばフロイント完全アジュバントまたは水酸化アルミニウムゲル-百日咳菌ワクチンなど）と混合しエマルジョンとした後、動物の皮下、腹腔内、静脈内などに投与する。以後、この免疫操作を1~2週間間隔で2~5回行う。最終免疫は、0.5~2 μ gのヒトメグシタンパク質を動物の腹腔内に投与することにより行う。

【0041】

このようにして免疫した動物の体液からは、ポリクローナル抗体が得られる。各免疫操作後3~7日後に眼底静脈叢より採血し、その血清の抗体価を測定し、抗体価が充分上昇したとき、抗体または抗体産生細胞を採取する。メグシンに対する抗体価は、ELISA等の手法によって測定することができる。抗体価を測定するためのELISAは、メグシンをコートしたプレートに血清を加え、更に免疫動物のIgGに対する標識抗体を加えることにより実施することができる。

【0042】

抗原と共に用いられるアジュバントとしては、例えばフロイント完全アジュバント、リピアジュバント、百日咳ワクチン、BCG、リポソーム、水酸化アルミニウム、シリカゲル等が挙げられる。免疫は、例えばBalb/cマウス、F1マウス等のマウスをはじめとする動物を使用することができる。

【0043】

上記のようにヒトメグシタンパク質で免疫した動物から抗体産生細胞を採取する。抗体産生細胞は、脾臓、リンパ節、末梢血などから得ることができるが、特に脾臓が好ましい。例えば、最終免疫の3~4日後に脾臓を無菌的に摘出し、Minimal Essential Medium (MEM) 培地（日水製薬製）中で細断し、ピンセットで解し、1,200rpm \times 5分間の条件で遠心分離させた後、上清を除き、トリス-塩酸緩衝液（pH7.65）で1~2分間処理して赤血球を除去し、さらにMEM培地で3回洗浄して細胞融合用脾臓細胞を得る。

【0044】

細胞融合前には、まず使用される腫瘍細胞株の調製をしておく必要がある。細胞融合前に使用される腫瘍細胞株は、たとえば免疫グロブリンを産生しない細胞株から選択することができる。融合される相手方の永久増殖性細胞には、永久増殖性を有する任意の細胞を用いることができるが、一般的には骨髓腫細胞（ミエローマ）が用いられる。永久増殖性細胞は抗体産生細胞と同種の動物由来のものを用いるのが望ましい。

【0045】

例えばマウスの場合、8-アザグアニン耐性マウス（Balb/c）由来骨腫瘍細胞株として次のような細胞株が知られている。

P3-X63Ag8-U1 (P3-U1) (Current. Topics in Microbiol. Immunol., 81: 1, (1978))

P3/NS1/1-Ag4-1 (NS-1) (Eur. J. Immunol., 6: 511 (1976))

SP2/0-Ag14 (SP-2) (Nature, 276: 269 (1978))

P3-X63-Ag8653 (653) (J. Immunol., 123: 1548 (1979))

P3-X63-Ag8 (X63) (Nature, 256: 495 (1975))

これらの永久増殖性細胞株は、8-アザグアニン培地（RPMI-1640培地にグルタミン（1.5 mM）、2-メルカプトエタノール（ 5×10^{-5} M）、ゲンタマイシン（10 μ g/mL）およびウシ胎児血清（FCS、CLS製）（10%）を加えた正常培地に、さらに8-アザグアニン（15 μ g/mL）

10

20

30

40

50

を加えた培地)で継代培養し、細胞融合の3~4日前に正常培地に継代し、融合当日 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

【0046】

抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合は例えば次のように行う。上記で得られた抗体産生細胞および永久増殖性細胞をMEM培地またはPBSでよく洗浄し、細胞数が5~10:1の比になるように混合する。1,200rpm×5分間遠心分離した後、上清を除き、沈殿した細胞群をよく解した後、攪拌しながら37℃に保ちつつ、細胞融合剤としてポリエチレングリコール-1000(PEG-1000)1~4g、MEM培地1~4mLおよび細胞融合促進剤としてジメチルスルホキシド0.5~1.0mLの混液0.1~1.0mL/ 10^8 個細胞を加えて細胞融合を起こさせる。

【0047】

その後、10分毎にMEM培地3mLを数回添加し、MEM培地を全量が50mLになるように加えて希釈し、細胞融合を停止させる。次に、遠心分離(1,500rpm×5分間)して上清を除去し、緩やかに細胞を解した後、正常培地(RPMI-1640培地、10%FCS)100mLを加え、メスピペットによるピペティングで緩やかに細胞を懸濁する。

【0048】

この懸濁液を96ウエルの培養用プレートに100 μ L/wellずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で3~5日間培養する。培養プレートに100 μ L/wellのHAT培地(正常培地にヒポキサンチン(10^{-4} M)、チミジン(1.5×10^{-5} M)およびアミノプテリン(4×10^{-7} M)を添加した培地)を加え、さらに3日間培養する。以後3日間毎に培養上清の半容量を除去し、新たに同量のHAT培地を加え、5%CO₂インキュベーター中、37℃で約2週間培養する。

【0049】

融合細胞がコロニー状に生育しているのが認められるウエルについて、上清の半容量を除去し、HT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いたもの)を同量加え、4日間培養する。培養上清の一部を採取し、前述のELISAによりメグシタンパク質に対する抗体価を測定する。

【0050】

より具体的には、例えばメグシタンパク質抗原を直接又は担体と共に吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体を加え、標識を測定することによって抗体価を測定することができる。固相には、マイクロプレート等が用いられる。また抗免疫グロブリン抗体としては、細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる。その他、標識抗体に代えて、プロテインAを加え、固相に結合した抗メグシタンパク質モノクローナル抗体を検出することもできる。更に、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したメグシタンパク質を加えることによって、抗体価を測定することもできる。

【0051】

メグシタンパク質に反応する抗体の産生が観察されたウエルにつき、限界希釈法によりクローニングを4回繰り返し、安定したメグシタンパク質の抗体価を示すものを抗メグシタンパク質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

【0052】

上記のようにして得られたハイブリドーマをin vitroおよびin vivoで培養することによりモノクローナル抗体を産生させる。所望のモノクローナル抗体を、FCS含有MEM培地、RPMI-1640培地等の適当な培地中で培養し、その培養上清から得ることができる。ハイブリドーマのin vitroでの培養は、好ましくは無血清培地中で行われ、至適量の抗体をその上清に与える。

【0053】

in vivoで培養する場合、任意の動物にハイブリドーマを移植する。移植のための宿主動物は、細胞融合に用いた脾臓細胞を採取した動物と同種の動物を使用するのが好ましい。例えば、プリスタン処理をした8~10週令のBalb/c雌マウスに上記で得られた抗メグシ

10

20

30

40

50

ンタンパク質モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の $2 \sim 4 \times 10^6$ 個/匹腹腔内投与する。プリスタン処理は、たとえば2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン-プリスタン-0.5mLを腹腔内投与し、2週間飼育することにより行われる。2~3週間でマウスの腹腔内にモノクローナル抗体を高濃度に含んだ腹水が貯留し腹部が肥大してくる。このマウスから腹水を採取し、遠心分離(3,000rpm×5分間)して固形分を除去し、IgGを精製する。

【0054】

腹水や培養上清を50%硫酸アンモニウムを用いて塩析し、PBSで1~2週間透析する。この透析画分をプロテインAセファロースカラムに通し、IgG画分を集め、精製モノクローナル抗体を得る。このモノクローナル抗体は、腎系球体上皮細胞に局在するメグシンタンパク質と特異的に反応する。

10

【0055】

抗体のアイソタイプは、市販のキット(Gibco BRL製、Mouse Antibody Isotyping Kit等)を用いるか、またはオクタロニイ(二重免疫拡散)法(免疫学実験入門、生物化学実験法15、学会出版センター刊、74頁、1981年)により決定した。タンパク質量は、フォーリン法および280nmにおける吸光度(1.4(OD280)イムノグロブリン1mg/mL)により算出する。

【0056】

大量のモノクローナル抗体を得るにはハイブリドーマの腹水化を利用することができる。この場合、ミエローマ細胞由来の動物と同系の組織適合性のある動物の腹腔内に各ハイブリドーマを移植し、増殖させるか、あるいはヌードマウスなどに各ハイブリドーマを移植し、腹水中に産生されたモノクローナル抗体を得ることができる。

20

【0057】

動物は、ハイブリドーマを移植する前にプリスタンなどの鉱物油を腹腔内に投与しておくことができる。腹水液はそのままあるいは常法により精製することができる。例えば、硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックス等によるゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、電気泳動、透析、限外濾過法、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー法等により精製することができる。上記のようにして得られたモノクローナル抗体の特性は、例えば、酵素免疫測定法(ELISA法)等により明らかにすることができる。

【0058】

本発明のモノクローナル抗体は、腎系球体上皮細胞に局在するヒトメグシンタンパク質の246-260の部位と特異的に結合することができる。また、腎系球体上皮細胞に局在するメグシンタンパク質は、系球体上皮細胞系の障害に起因する腎障害において高局在となる。このため、本発明のモノクローナル抗体は、腎障害の診断における確定診断に有効であると考えられる。

30

【0059】

本発明において「メグシンタンパク質が局在する」とは、メグシンタンパク質が高濃度で存在している状態にあることを表している。また、「腎系球体上皮細胞に局在する」という場合は、腎系球体上皮細胞から直接発現されるメグシンタンパク質のみならず、メサングウム細胞などの系球体上皮細胞以外の細胞で発現したメグシンタンパク質が細胞外に分泌され、系球体上皮細胞中に蓄積される場合も含む。

40

【0060】

本発明のモノクローナル抗体は、免疫染色、例えば組織あるいは細胞染色、免疫沈降、イムノプロット、イムノアッセイ、例えば競合型または非競合型イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、ELISA、ラテックス凝集法、蛋白精製、アフィニティークラム等に使用することができる。ELISA法による場合は好ましくはサンドイッチ型アッセイがよい。なお、イムノアッセイには、免疫組織学的検討、イムノプロット、免疫沈降等の免疫反応を利用した方法全てを含有する。

【0061】

本発明のモノクローナル抗体は、イムノアッセイに用いるために標識抗体とすることが

50

できる。抗体を標識化するものとして、酵素、酵素基質、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質、色素物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、発色物質、磁気物質、金属粒子、放射性物質等を用いることができる。標識するには、チオール基とマレイミド基の反応、ピリジルジスルフィド基とチオール基の反応、アミノ基とアルデヒド基の反応等を利用することができる。

【0062】

本発明のモノクローナル抗体を使用するイムノアッセイは、あらゆる形態の溶液やコロイド溶液、非流体試料等を検体または試料とすることができる。たとえば生体由来の試料、具体的には、血液、血漿、関節液、脳脊髄液、唾液、羊水、尿、その他体液、細胞培養液、組織培養液、組織ホモジネート、生検試料、細胞、組織、脳組織、脳由来細胞系、神経細胞系、神経由来細胞系、乳腺由来細胞系、乳腺組織、卵巣由来細胞系、卵巣組織、癌細胞系、癌組織等が挙げられる。

10

【0063】

従って、本発明は、この様なハイブリドーマ細胞系、イムノアッセイおよび検査キットをも提供する。さらに、本発明は腎系球体上皮細胞に局在するメグシンタンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体、この抗体を用いることを特徴とするメグシンの検出ならびに定量のためのイムノアッセイ、およびこのイムノアッセイを実施するための検査キットを提供する。また、本発明により得られたモノクローナル抗体は、メグシンに対する特異性が高く、メグシンの検出ならびに定量において、非常に有用である。

【0064】

本発明に基づく腎障害の病型診断は、たとえば以下の工程により実施される。すなわち本発明は、以下の工程を含む腎障害の検査方法に関する。

20

(1)生体から採取された腎臓組織標本における系球体上皮細胞におけるメグシンタンパク質の発現強度を測定する工程、および

(2)正常腎組織と比較して、メグシンタンパク質の局在が亢進している場合に、系球体上皮細胞系の異常に起因する腎障害が検出される工程

本発明の検査方法において、系球体上皮細胞系の異常に起因する腎障害には、膜性腎症や微小変化型ネフローゼが含まれる。一方、IgA腎症や糖尿病性腎症などのようなメサンギウム細胞の障害に由来する腎障害患者の腎組織においては、健常者と同様に、系球体上皮細胞におけるメグシンタンパク質の発現強度の亢進は見られない。

30

【0065】

生体の腎組織は、腎生検によって採取することができる。一方、組織標本の系球体上皮細胞におけるメグシンタンパク質の発現強度は、上皮細胞に局在するメグシンタンパク質を認識する抗体によって検出することができる。本発明の検査方法において好ましい抗体は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列をエピトープとして認識する抗体である。このような抗体として、たとえばFERM P-19734として寄託されたハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を示すことができる。

本発明の検査方法に用いられる前記抗体は、腎障害の検査用試薬として有用である。抗体は、検出を容易にするために標識しておくことができる。たとえば、蛍光分子、発光分子、酵素分子、あるいは結合性リガンド等によって抗体を標識し、検出する方法が公知である。あるいは、組織に結合する抗体を認識して結合する第2抗体を組み合わせ、抗体の結合を検出することもできる。第2抗体を組み合わせる場合には、標識されるのは第2抗体である。

40

前記抗体は、標識の検出に必要な成分、組織標本のブロッキングに有用なブロッキング剤、陽性標本、あるいは陰性標本等と組み合わせ、腎障害の検査用キットとすることができる。

【実施例】

【0066】

以下、実施例に基づいて本発明を更に具体的に説明する。

〔実施例1〕モノクローナル抗体の作製

50

a. 免疫原の調製（組換えメグシタンパク質）

公知の方法（Inagi, R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 286: 1098-1106 (2001)）に準じ、ヒトのメグシンcDNAをトランスフェクトされたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞の培養上清から組換えヒトメグシタンパク質を得た。

【0067】

培養上清2Lに100mLの1M酢酸ナトリウムを加えてpH4.5に調整した後、50mM酢酸ナトリウムを加え、2倍に希釈した。希釈液をイオン交換クロマトグラフィー（HiPrep 16/10 SP XL: アマシャム・バイオサイエンス製）に供した（溶出条件：50mM酢酸ナトリウム（pH4.5）、NaCl 0~1Mリニアグラジエント；溶出容積：20×カラムベッドボリューム）。溶出液をゲル濾過によりバッファー交換を行い（HiPrep 26/10 Desalting、20mMリン酸カリウム（pH6.8））、続いてヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー（HT-1: Bio-Rad製）に供した（溶出条件：20mMリン酸カリウム（pH6.8）、リン酸カリウム20~400mMリニアグラジエント；溶出容積：30×カラムベッドボリューム）。溶出液を再度ゲル濾過によりバッファー交換を行い（HiPrep 26/10 Desalting、50mM MES（pH5.5）、50mM NaCl）、イオン交換クロマトグラフィー（Mono S HR 5/5: アマシャム・バイオサイエンス製）に供した（溶出条件：50mM MES（pH5.5）、50mM NaCl、NaCl 50~100mMリニアグラジエント；溶出容積：40×カラムベッドボリューム）。溶出液をCentricon 10（ミリポア製）を用いて遠心濃縮し（3,000g）、ダルベッコPBS(-)緩衝液（日水製薬製）にバッファー交換した。遠心濃縮とバッファー交換を3回繰り返し、精製組換えメグシタンパク質を得た。クロマトグラフィー装置は、AKTAexplorer 10s（アマシャム・バイオサイエンス製）を用い、操作は全て4で行った。こうして得られた精製ヒト組換えメグシタンパク質10μg（液量50μL）をマウスの1回あたりの免疫原として用いた。

10

20

【0068】

b. 免疫処置

1.5mLチューブで、50μLのフロイント完全アジュバント（SIGMA製）と精製メグシン蛋白溶液（10μg/50μL）を1mLシリンジ（テルモ社：SS-01T）と21ゲージ注射針（テルモ製：NN-2138S）を用いて、完全にエマルジョン化するまで混合し、免疫用抗原原液とした。マウス（Balb/c）に対し、腹腔に該免疫原液を26ゲージ注射針（テルモ製：NN-2613S）を使用して注射し、免疫を行った。免疫は1週間ごとに1回、合計4回行った。4回目の免疫の際、抗体力価をチェックするため、マウスの眼下静脈蒼より50~100μL採血し、ELISA法により抗体力価の確認を行った。

30

【0069】

c. 一次スクリーニング（ELISA法）

精製メグシタンパク質を0.1M炭酸緩衝液pH9.0にて2μg/mLの濃度とし、96穴マイクロタイタープレート（Nunc製）の1穴あたり50μLづつ分注し、25、3時間静置し、感作した。溶液を除去後、1% BSA（Bovine Serum Albumin）溶液（0.1M炭酸緩衝液pH9.0）、200μLを分注し、25、1時間静置し、ブロッキングした。ブロッキング溶液を除去後、スクリーニングに供するハイブリドーマ上清、あるいはマウス血清溶液を50μLを各穴に分注し、25、1時間静置する（一次反応）。溶液を除去後、0.13M NaCl添加50mMリン酸緩衝液pH7.2（以下：PBS）で洗浄する。各穴にホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（Horseradish Peroxidase: HRP）標識ヤギ抗マウスIgG（H+L）抗体（MBL製）溶液を50μLづつ分注し、25、1時間静置する（二次反応）。溶液を除去後、0.13M NaCl添加50mMリン酸緩衝液pH7.2で洗浄する。0.8mM TMB（テトラメチルベンジジン：3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine: 同仁化学研究所製）溶液を1ウェルあたり50μL添加し、30で5~20分間発色させる。1.5N H₃PO₄を1ウェルあたり50μLずつ加えて発色反応を停止させ、マイクロタイタープレートリーダー（ワラック製：ARVO-SX）を用いて、450nmにおける吸光度を測定した。

40

【0070】

d. モノクローナルハイブリドーマの作製

十分な抗体力価の確認後、摘出したマウス脾臓より調整したリンパ細胞をポリエチレン

50

グリコール（和光純薬製）を用い、マウスミエローマ細胞（P3U1）と細胞融合させた。ハイブリドーマの選別はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン：hypoxanthine、thymidine、SIGMA製H-0137 aminopterin、SIGMA製A-5159）選択で行った。ハイブリドーマの培養上清を用いたELISA法により、免疫抗原に対して反応性の高いクローンのスクリーニングを行った。メグシンタンパク質に対して結合する抗体を産生するハイブリドーマについて限界希釈法によるクローニングを3回繰り返し行い、メグシンタンパク質に対して特異的に結合する抗体を産生し、且つ安定した増殖能を有するハイブリドーマ4F3細胞株が得られた。ハイブリドーマ4F3細胞は、2004年3月16日付けで日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号中央第6に所在の行政独立法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに対して、受託番号FERM P-19734として寄託された。

10

以下に、寄託を特定する内容を記載する。

(a)寄託機関の名称・あて名

名称：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

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号中央第6（郵便番号305-8566）

(b)寄託日：平成16年3月16日

(c)受託番号：FERM P-19734

【0071】

e. モノクローナル抗体のタイピング

上記で得られたハイブリドーマ4F3細胞株の培養上清をPBSで150倍希釈した液0.5mLを用い、IsoStrip kit（Roche製）を用いてアイソタイプを調べた。ハイブリドーマ4F3細胞株が産生するモノクローナル抗体のアイソタイプは、IgG1であった（図1）。

20

【0072】

f. モノクローナル抗体（4F3）の調製と精製

8週齢の雌性Balb/cマウスに0.5ml/匹のプリスタンを腹腔内投与し、その10日後に上記dのクローニングで得られたハイブリドーマ4F3細胞株を1匹あたり約 1×10^7 細胞数/0.5mL/匹で腹腔内に注入した。10日後頃からマウスの腹部肥大を認めたため、開腹して腹水を採取した。採取した腹水は、1000rpm、4にて10分間遠心分離し、その上清を37、30分間放置した後、4で一晩静置した。12000rpm、4にて10分間遠心分離後、得られた上清をアフィニティーカラム（Sephrose Protein A：アマシャム・バイオサイエンス製）を用いてモノクローナル抗体（4F3）を精製した。この抗体溶液の260、280、320nmにおける吸光度を測定し、Werbultg-Christian法により抗体濃度を測定した。

30

【0073】

g. 免疫沈降

1.5mLEッペンチューブ中のrpm Protein A Sepharose Fast Flow（以下、ゲルと呼ぶ。アマシャム・バイオサイエンス製）25 μ Lに対して500 μ Lのハイブリドーマ培養上清を添加し、室温で1時間、緩やかに攪拌する。培養上清を除去後、PBSでゲルを洗浄し、10 μ g/mLのメグシンタンパク質PBS溶液を50 μ L/tube入れ、室温で1時間静置する。PBSでゲルを洗浄後、30 μ LのSDS-PAGE Sample Buffer（レムリ法）を入れ、3分間煮沸処理を行う。その内の20 μ Lを下記実施例2と同様にSDS-PAGEを行い、ウエスタンブロッティングを行う。タンパク質の検出には一次抗体として抗メグシンウサギポリクローナル抗体を用い、二次抗体にはホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（Horseradish Peroxidase：HRP）標識ヤギ抗マウスIgG（H+L）抗体（MBL製）を用いた。

40

【0074】

〔実施例2〕ウエスタンブロッティング法によるモノクローナル抗体の反応性の検討

免疫用抗原と同様の方法で調整したメグシンタンパク質のタンパク質溶液0.1 μ gを12.5% SDS-PAGEで定法に従い電気泳動を行う。セミドライトランスファー装置（バイオクラフト製）を用い、泳動された蛋白をImmobilon-Pトランスファーメンブレン（ミリポア製）に転写する。転写後のメンブレンをブロックエース（大日本製薬製）にてブロッキング（25、1時間）後、ハイブリドーマ培養上清と25、1時間反応させる。PBSでメンブレンを洗浄後、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（Horseradish Peroxidase：HRP）標

50

識ヤギ抗マウスIgG (H+L) 抗体 (MBL製) とメンブレンを25℃、1時間反応させる。PBSでメンブレンを洗浄後ECL Western Blotting kit (アマシャム・バイオサイエンス製) を用いて化学発光させ、それをHyperfilm ECL (アマシャム・バイオサイエンス製) に焼付け、検出を行った。

【0075】

ウエスタンブロットング法により、モノクローナル抗体4F3の抗原特異性を検証した。その結果、モノクローナル抗体4F3はCHO細胞で発現させたヒトメグシタンパク質と反応した (図2)。

【0076】

同じくウエスタンブロット分析を行い、種差の異なるメグシタンパク質に対するモノクローナル抗体4F3の反応性を検討した。大腸菌組換えマウスメグシンとモノクローナル抗体4F3は反応したが、大腸菌組換えラットメグシンとは反応しなかった (図3)。

【0077】

同様にウエスタンブロット分析を行い、メグシン以外のセルピンに対する交差反応性を検討した。その結果、モノクローナル抗体4F3は、2-アンチプラスミン、1-アンチトリプシン、アンチトロンピン、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1、および大腸菌由来MBP融合プラスミノゲンアクチベーターインヒビター2とは反応せず、これらセルピン類との交差性は認められなかった (図4)。

【0078】

さらにウエスタンブロット分析により、セリンプロテアーゼ・セルピン複合体に対する反応性を検証した。モノクローナル抗体4F3は、メグシンリガンドのひとつと考えられるプラスミンとの複合体を認識した (図5)。

【0079】

〔実施例3〕4F3抗体エピトープマッピング(1) (ウエスタンブロット法による検討)

a. トリプシン処理断片化メグシタンパク質

メグシタンパク質溶液にトリプシン溶液を加え (メグシン0.5 mg/mL、トリプシン780 U/mL) 反応させた後、等量の2X loading buffer (第一化学製) と混和し、沸騰浴中で5分間加熱したものをサンプル溶液とした。該サンプル溶液をSDS電気泳動装置 (第一化学製) およびトリス-グリシン緩衝液 (第一化学製) を用いて15~25%ポリアクリルアミドゲル (第一化学製) で電気泳動した。泳動中、ブロット用に3MM濾紙 (Whatman製) を緩衝液A (第一化学製) に2枚、緩衝液B (第一化学製) に1枚、緩衝液C (第一化学製) に3枚浸した。またポリビニリデンジフルオライド膜 (PVDF膜、Millipore製) をメタノールに浸した後、精製水に浸しなませた。

【0080】

タンパク質のPVDF膜への転写は、電気泳動後装置からゲルを取り出し、プロッター (ファルマシア製) に陽極側から緩衝液Aに浸した2枚の濾紙、緩衝液Bに浸した1枚の濾紙、PVDF膜、ゲル、および、緩衝液Cに浸した3枚の濾紙を記載の順に置き、80mA/ゲルで1.5時間行った。転写後、PVDF膜の一部をCBB染色した。また、PVDF膜の一部をブロックエース (雪印乳業製) と室温で1時間浸透する事でブロッキングした。

【0081】

ブロッキング後、該膜を抗体希釈液で希釈したモノクローナル抗体4F3と4℃で一晩反応させた。その後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG抗体を加え、室温で1時間反応後、NBT-BGIP溶液で発色させた。この結果において、モノクローナル抗体4F3と反応したバンドでCBB染色でも確認できたバンドについてアミノ酸シーケンスを行った。その結果、このバンドはN末端がメグシタンパク質のアミノ酸配列204番目に当たるメグシタンパク質断片であることが確認できた。

【0082】

b. 大腸菌発現断片化メグシタンパク質

以下に示す大腸菌発現断片化メグシタンパク質を作製した。

全長：1~380

1 - 6 : 1 ~ 1 0 0
 2 - 7 : 1 0 1 ~ 1 6 8
 3 - 8 : 1 6 9 ~ 2 6 6
 4 - 9 : 2 6 7 ~ 3 2 1
 5 - 1 0 : 3 2 2 ~ 3 8 0
 2 - 1 0 : 1 0 1 ~ 3 8 0
 3 - 1 0 : 1 6 9 ~ 3 8 0
 4 - 1 0 : 2 6 7 ~ 3 8 0

これらの大腸菌発現断片化メグシンを用いて上記a.と同様にウエスタンブロッティング法を行い、モノクローナル抗体4F3と反応するバンドを確認した。結果を表1に示す。これらの結果より、モノクローナル抗体4F3と反応するメグシタンパク質の部位はアミノ酸配列204~266にあることが確認できた。

10

【0083】

[表1]

大腸菌発現メグシタンパク質ペプチド断片	4F3抗体との反応性
1 - 3 8 0	
1 0 1 - 3 8 0	
1 6 9 - 3 8 0	
2 6 7 - 3 8 0	x
1 - 1 0 0	x
1 6 9 - 2 6 6	
2 6 7 - 3 2 1	x
3 2 2 - 3 8 0	x
Vector	x

20

【0084】

〔実施例4〕4F3抗体エピトープマッピング(2)

30

a. コバリックプレートを用いたELISA法

実施例3で得られた断片化大腸菌発現メグシタンパク質の結果を元に、10~20残基のペプチドを常法により合成した。合成ペプチドをアミンカップリング法にてコバリックプレートに固相化し、洗浄液で2回洗浄後、PBSで4倍希釈したブロックエース(雪印乳業製)を加えブロッキングする。プレートに希釈したモノクローナル抗体4F3を100 μ L/wellに加え、室温で2時間反応させる。洗浄液で4回洗浄後、POD標識抗マウスIgG抗体を100 μ L/wellに加え、室温で2時間反応させる。洗浄液で4回洗浄後、TMBを100 μ L/wellに加え、室温で30分反応させ吸光度(OD450)を測定した(表2~4)。

【0085】

[表2]

40

メグシタンパク質ペプチド断片	OD450
None	0.097
2 0 4 - 2 2 3	0.102
2 1 6 - 2 3 1	0.099
2 2 4 - 2 4 3	0.104
2 3 6 - 2 5 3	0.099
2 4 5 - 2 6 0	0.276
2 5 3 - 2 6 9	0.099

50

【 0 0 8 6 】

[表 3]

メグシタンパク質ペプチド断片 OD450

None	0 . 0 3 6
2 4 5 - 2 5 9	0 . 0 3 2
2 4 5 - 2 5 8	0 . 0 3 3
2 4 5 - 2 5 6	0 . 0 3 3
2 4 5 - 2 5 5	0 . 0 3 1
2 4 5 - 2 5 4	0 . 0 3 3
2 4 5 - 2 6 0	0 . 6 0 2

10

【 0 0 8 7 】

[表 4]

メグシタンパク質ペプチド断片 OD450

None	0 . 0 2 4
2 5 1 - 2 6 0	0 . 0 3 2
2 5 0 - 2 6 0	0 . 0 3 0
2 4 9 - 2 6 0	0 . 0 3 2
2 4 8 - 2 6 0	0 . 0 3 3
2 4 7 - 2 6 0	0 . 0 3 0
2 4 6 - 2 6 0	0 . 6 8 4
2 4 5 - 2 6 0	0 . 6 3 9

20

【 0 0 8 8 】

b. biacore法による特異性の測定

センサーチップCM5(ピアコア製)にアミンカップリング法にて各メグシタンパク質ペプチドを固相化し、biacore法を用いてモノクローナル抗体4F3との反応性を測定した。結果を表5に示す。

[表 5]

メグシタンパク質ペプチド断片 レスポンス(RU)

2 3 6 - 2 5 3	8 . 2
2 4 6 - 2 6 0	2 0 7 . 7
2 5 3 - 2 6 9	1 . 9

40

【 0 0 8 9 】

以上、実施例3~4の結果から、モノクローナル抗体4F3が認識するエピトープは、246-260(LSEIENKLTFFQLME/配列番号:1)であることが判った。

【 0 0 9 0 】

〔実施例4〕二重染色・蛍光抗体法による各種抗体の局在の比較

腎組織OCT包埋凍結標本を4μmに切片化し、風乾後、エタノール/エーテル(1:1)で10分間、エタノールで10分間固定した。0.3%過酸化水素水を添加したメタノール中で室温において20分間インキュベーションし、内因性ペルオキシダーゼをブロッキングした。0.25%Tween20を含有するPBSで3回洗浄後、切片を室温において10%ヤギ血清含PBSと2時間

50

ブロッキング後、メグシンモノクローナル抗体4F3、Cy3標識抗ビメンチン抗体（SIGMA製）、抗von Willerbrand Factor抗体（DAKO製）、抗メグシンペプチドポリクローナル抗体（メグシタンパク質の72-86ペプチド断片に対する抗体：P2抗体）、2%ウシ血清アルブミン含有PBSと4 において一晩インキュベーションした。二次抗体として、FITC標識抗マウス抗体、Rhodamine抗ウサギ抗体を用いて、各種抗体の局在を比較した。

【0091】

結果を図6-1~3に示す。メグシンモノクローナル抗体4F3と糸球体上皮細胞マーカー（ビメンチン）の染色パターンはほぼ一致した（図6-1）。一方、内皮細胞マーカー（von Willerbrand Factor）の染色パターンとは一致しなかった（図6-2）。また、抗メグシンペプチドポリクローナル抗体（P2抗体）はメサンギウム細胞内のメグシタンパク質と反応することから、モノクローナル抗体4F3とは染色パターンが大きく異なっていた（図6-3）。以上のことから、モノクローナル抗体4F3が糸球体上皮細胞に局在するメグシタンパク質と反応することが確認された。

10

【0092】

〔実施例5〕モノクローナル抗体4F3を用いた免疫組織染色による各種疾患の染色像の比較検討

免疫組織化学分析を実施するために、腎臓を摘出し、メチルカルノア固定後、パラフィン包埋ブロックを作成した。このパラフィン包埋ブロックをミクロトームで4μmに薄切してパラフィン切片とした。キシレン中で5分3回脱パラフィン処理を行い、100%エタノールで5分3回、90%エタノールで1回、70%エタノールで1回処理した後PBSで水和した後0.05%Pronase（DAKO製）で15分処理し、抗原を賦活化した。PBSで洗浄後、Peroxidase blocking reagent（DAKO製）を用いて内因性ペルオキシダーゼをブロッキングし、さらにBiotin blocking system（DAKO製）を用いて内因性ビオチンをブロッキングした。PBSで洗浄後、切片を加湿チャンパー内（37 ）においてブロックエース（雪印乳業製）で1時間ブロッキングし、次に一次抗体としてモノクローナル抗体4F3を添加し、4 において一晩インキュベーションした。PBSで3回洗浄後、切片を400倍希釈したビオチン標識ウマ抗マウスIgG抗体（VECTOR製）を用いて加湿チャンパー内で37 において1時間インキュベートした。PBSで組織切片を3回洗浄し、1：1000に希釈したペルオキシダーゼアピジンD（VECTOR製）で加湿チャンパー内で室温において30分インキュベートし、PBSで組織切片を3回洗浄した。ペルオキシダーゼの検出には0.03%の過酸化水素水を含む3,3'-ジアミノベンジジン（DAB）溶液を用い、次にヘマトキシリンで核染色した。

20

30

【0093】

その結果、正常腎糸球体（図7-1）に比し、膜性腎症（図7-2）や微小変化型ネフローズ（図7-3）では糸球体上皮のメグシンの局在が亢進している傾向が認められた。それに対しIgA腎症（図7-4）では糸球体上皮内のメグシンの局在は低下していた。これらのことより、糸球体上皮細胞内のメグシタンパク質を優位に検出するモノクローナル抗体4F3を用いた免疫組織染色において、腎疾患の病型によって染色強度が異なることが示され、モノクローナル抗体4F3の病理診断用抗体としての有用性が確認された。

【産業上の利用可能性】

【0094】

本発明のモノクローナル抗体、並びにそれを用いる診断方法によって、腎上皮細胞の異常に起因する疾患（膜性腎症や微小変化型ネフローズ）と、メサンギウム細胞の異常に起因する疾患（IgA腎症や糖尿病性腎症）を鑑別することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図1】Roche社製IsoStrip kitを用いたモノクローナル抗体4F3のアイソタイプを示す写真である。

【図2】本発明のモノクローナル抗体4F3とヒトメグシタンパク質との反応性を表す、ウエスタンブロット法の結果を示す写真である。

【図3】本発明のモノクローナル抗体4F3と種差の異なるメグシタンパク質との反応性

50

を表す、ウエスタンブロット法の結果を示す写真である。

【図4】本発明のモノクローナル抗体4F3とメグシンタンパク質以外のセルピンとの交差反応性を表す、ウエスタンブロット法の結果を示す写真である。

【図5】本発明のモノクローナル抗体4F3とセリンプロテアーゼ・セルピン複合体との反応性を表す、ウエスタンブロット法の結果を示す写真である。

【図6-1】二重染色・蛍光抗体法を用いた、本発明のモノクローナル抗体4F3および上皮細胞マーカー（ビメンチン）の局在を示す写真である。

【図6-2】二重染色・蛍光抗体法を用いた、本発明のモノクローナル抗体4F3および内皮細胞マーカー（von Willerbrand Factor）の局在を示す写真である。

【図6-3】二重染色・蛍光抗体法を用いた、本発明のモノクローナル抗体4F3および抗メグシンペプチドポリクローナル抗体の局在を示す写真である。

10

【図7-1】本発明のモノクローナル抗体4F3による、正常腎糸球体の免疫組織染色による染色像を示す写真である。

【図7-2】本発明のモノクローナル抗体4F3による、膜性腎症の糸球体の免疫組織染色による染色像を示す写真である。

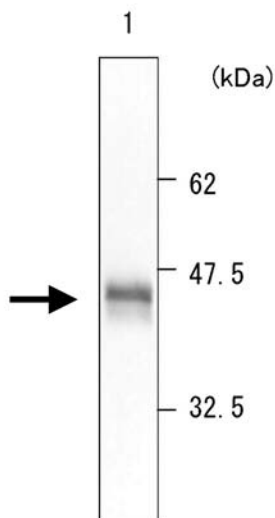
【図7-3】本発明のモノクローナル抗体4F3による、微小変化型ネフローゼの糸球体の免疫組織染色による染色像を示す写真である。

【図7-4】本発明のモノクローナル抗体4F3による、IgA腎症の糸球体の免疫組織染色による染色像を示す写真である。

【図1】

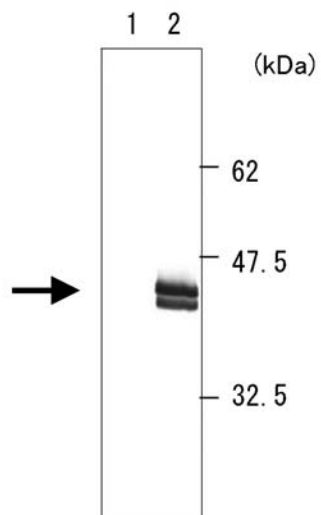


【図2】



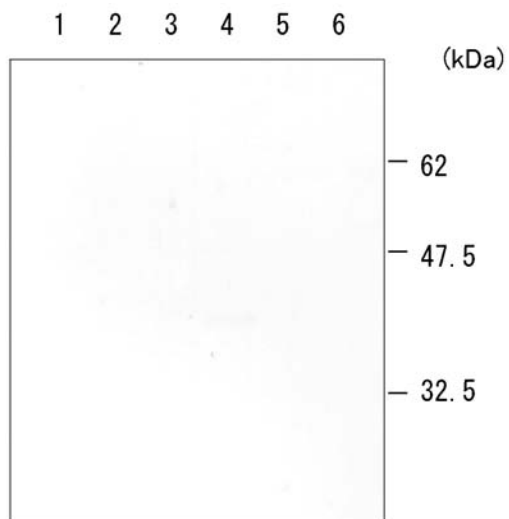
レーン1: CHO 細胞由来ヒトメグシンタンパク質

【 図 3 】



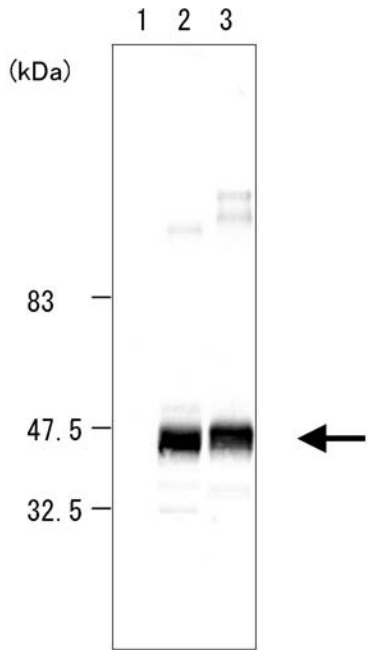
レーン1: ラットメグシタンパク質
レーン2: マウスメグシタンパク質

【 図 4 】



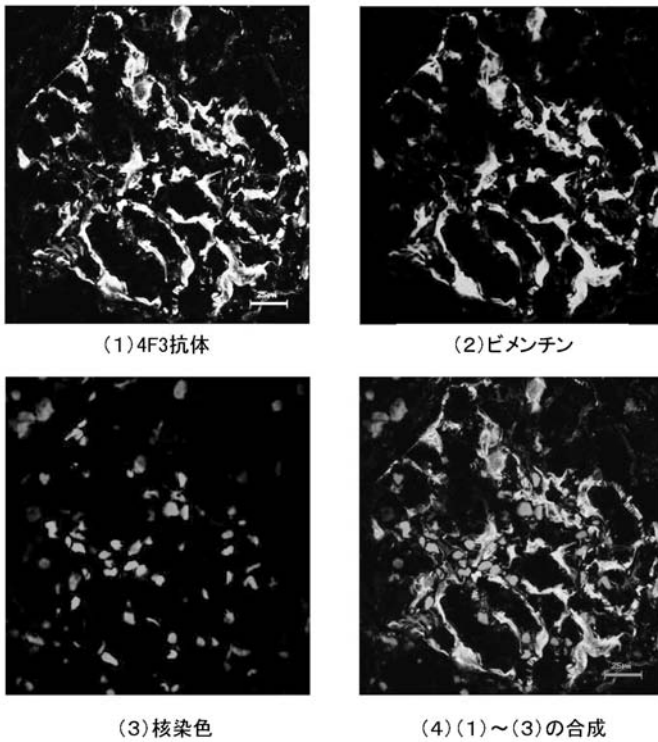
レーン1: α 2-アンチプラスミン
レーン2: α 1-アンチトリプシン
レーン3: アンチトロンビン
レーン4: プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1)
レーン5: 大腸菌由来MBP融合プラスミノゲンアクチベーターインヒビター2
レーン6: MBP

【 図 5 】



レーン1: プラスミン
レーン2: メグシタンパク質
レーン3: プラスミン-メグシタンパク質複合体

【 図 6 - 1 】



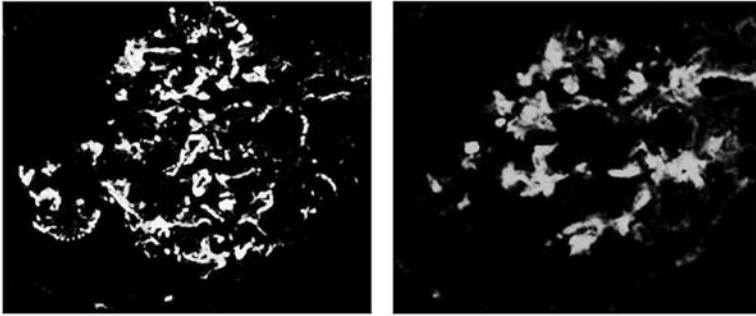
(1) 4F3抗体

(2) ビメンチン

(3) 核染色

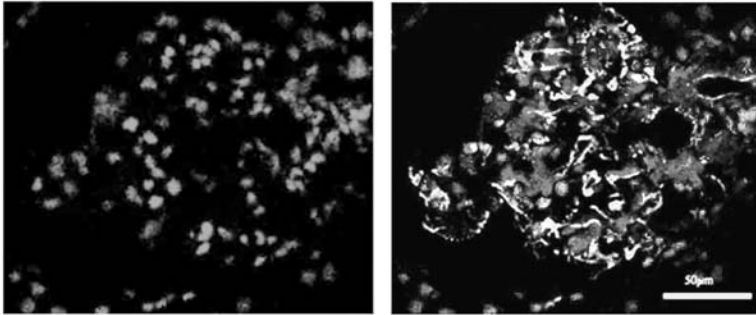
(4) (1)~(3)の合成

【 図 6 - 2 】



(1)4F3抗体

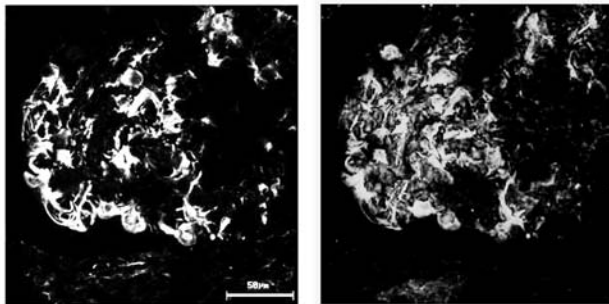
(2)von Willebrand Factor



(3)核染色

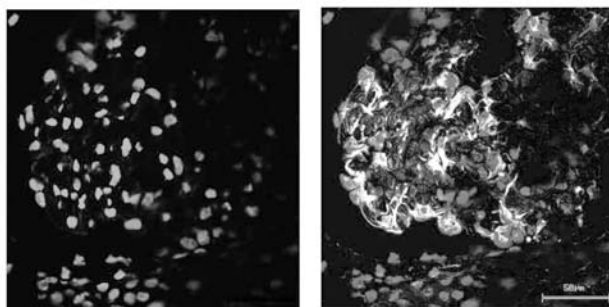
(4)(1)~(3)の合成

【 図 6 - 3 】



(1)4F3抗体

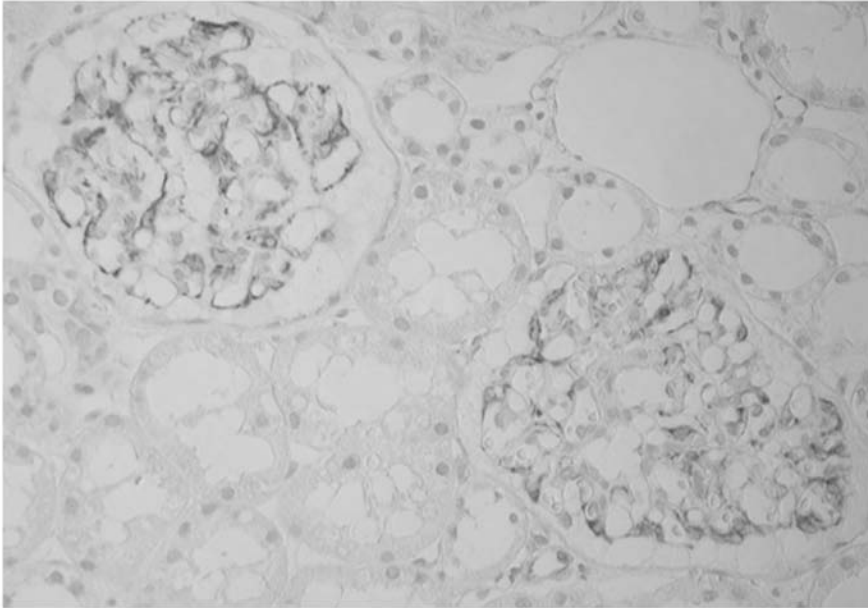
(2)メガシンペプチド抗体



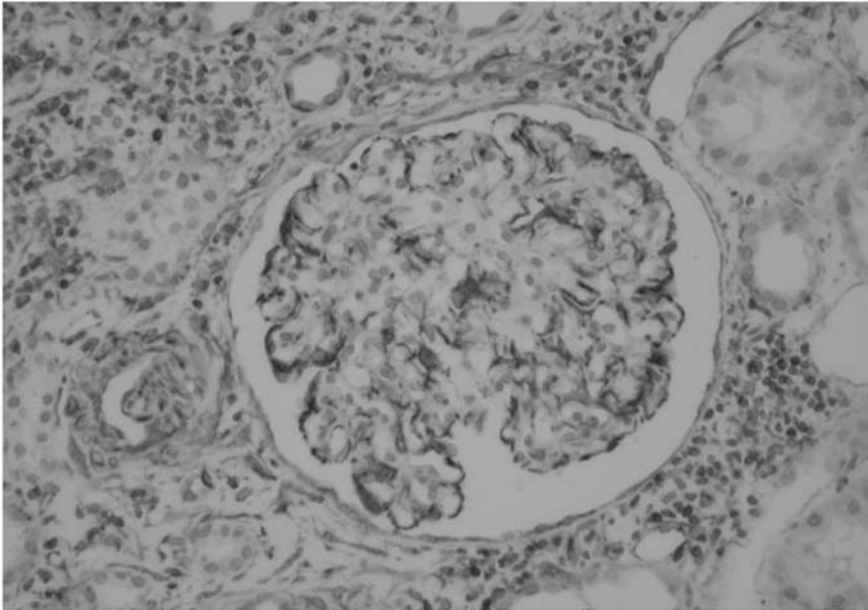
(3)核染色

(4)(1)~(3)の合成

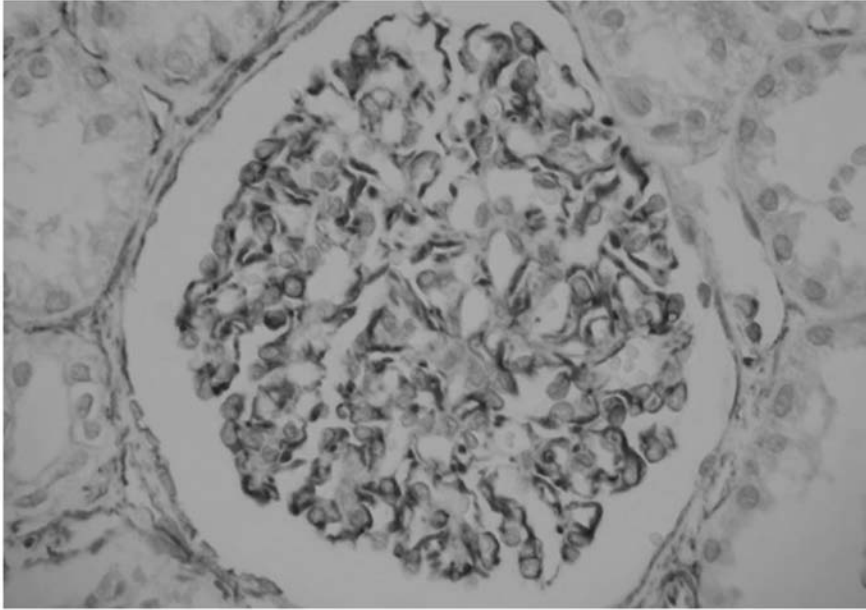
【 図 7 - 1 】



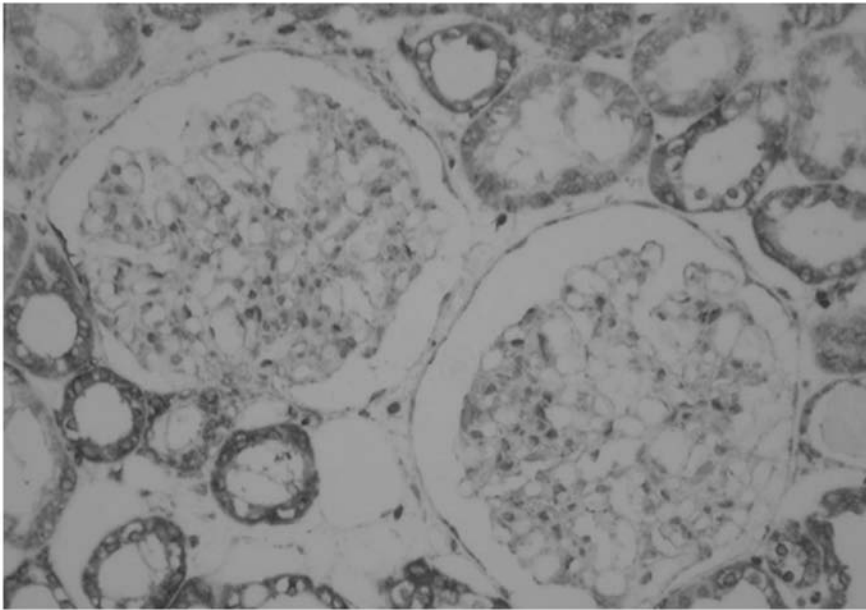
【 図 7 - 2 】



【 図 7 - 3 】



【 図 7 - 4 】



【 配列表 】

[200526124400001.app](#)

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA91X AA93Y AB05 BA08 CA25 CA44 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72

专利名称(译)	肾系球体上皮细胞局在タンパク质特异性抗体		
公开(公告)号	JP2005261244A	公开(公告)日	2005-09-29
申请号	JP2004075746	申请日	2004-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人东海大学		
申请(专利权)人(译)	学校法人东海大学		
[标]发明人	黒川清 宮田敏男		
发明人	黒川 清 宮田 敏男		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08		
FI分类号	C12N15/00.C C07K16/18.ZNA C12P21/08 G01N33/53.D C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	清水初衷		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供与在肾小球上皮细胞中表达的megsin蛋白反应的单克隆抗体，并提供其用途。解决方案：分别提供了与在肾小球上皮细胞中表达的megsin蛋白反应的单克隆抗体及其用途。已经证实，例如，通过免疫结构染色方法，在由肾小球上皮细胞系异常引起的肾病（例如膜性肾病和微小病变肾病）中，在肾小球上皮细胞中定位的megsin蛋白的表达被提高。使用单克隆抗体。另一方面，发现肾小球上皮细胞中megsin蛋白的表达在IgA肾病等中被抑制。因此，通过比较肾小球上皮细胞中megsin蛋白的染色模式来实现肾病的类型分类。。

特許庁
(P2005)

(43) 公開日 平成17年9月29日(2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テームコード (2)
C12N 15/02	C12N 15/00	4B024
C07K 16/18	C07K 16/18	4B064
C12N 5/10	C12P 21/08	4B065
C12P 21/08	G01N 33/53	4H045
G01N 33/53	C12N 5/00	B

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (2)

(21) 出願番号	特願2004-75746 (P2004-75746)	(71) 出願人	000125369 学校法人 東海大学 東京都渋谷区富ヶ谷2丁目2番8番
(22) 出願日	平成16年3月17日 (2004. 3. 17)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
		(72) 発明者	黒川 清 東京都新宿区市谷柳町4丁目市ヶ谷01
		(72) 発明者	宮田 敏男 神奈川県伊勢原市板台2丁目16 エクセル伊勢原102号

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 DA0 HA15