

(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2013-10723  
(P2013-10723A)

(43) 公開日 平成25年1月17日(2013.1.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C07K 16/18 ZNA	4B064
<b>C12P 21/02 (2006.01)</b>	C12P 21/02 C	4B065
<b>C12N 5/10 (2006.01)</b>	C12N 5/00 1O2	4H045
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C07K 19/00	
<b>G01N 33/53 (2006.01)</b>	G01N 33/53 D	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-145601 (P2011-145601)  
(22) 出願日 平成23年6月30日 (2011. 6. 30)

(71) 出願人 598041566  
学校法人北里研究所  
東京都港区白金5丁目9番1号  
(71) 出願人 593106918  
株式会社ファンケル  
神奈川県横浜市中区山下町89番地1  
(74) 代理人 110000774  
特許業務法人 もえぎ特許事務所  
(72) 発明者 藤村 響男  
神奈川県相模原市南区北里1丁目15番1号 学校法人北里研究所内  
(72) 発明者 吉野 崇  
神奈川県横浜市戸塚区上品濃12番13号  
株式会社ファンケル総合研究所内  
Fターム(参考) 4B064 AG27 CA20 CC24 DA13  
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗DCDモノクローナル抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ヒト汗中から単離された110個のアミノ酸からなる抗菌ペプチド、DCD(ダームシジン)を認識するIgGクラスモノクローナル抗体および当該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの提供。

【解決手段】 全長ヒトDCDのアミノ酸配列のうち63番目から81番目の配列をもつペプチドを合成し、それにキャリアプロテインとしてキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)を付加して得られるKLH付加DCDペプチドを抗原として、ヒトDCDを認識するIgGクラスモノクローナル抗体を製造した。当該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、該モノクローナル抗体を用いたDCDの検出方法。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列表配列番号 7 及び配列表配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるペプチドと反応する I g G クラスの抗 D C D モノクローナル抗体。

## 【請求項 2】

D C D のアミノ酸配列のうち、66 番目から 81 番目の領域を認識する請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 3】

配列表配列番号 7 に示すアミノ酸配列からなるペプチドに K L H を付加した K L H 付加 D C D ペプチドを抗原としてヒト以外の動物に免疫して得られる請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

10

## 【請求項 4】

ハイブリドーマである 6 B - 1 0 株 ( F E R M A P - 2 2 1 3 4 ) が産生する請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 5】

ハイブリドーマである 6 B - 1 0 株 ( F E R M A P - 2 2 1 3 4 ) 。

## 【請求項 6】

請求項 5 に記載のハイブリドーマを増殖させる工程を含む I g G クラスの抗 D C D モノクローナル抗体の製造方法。

## 【請求項 7】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体と試料を混合する工程を含む D C D の検出方法。

20

## 【請求項 8】

試料がヒト汗由来である請求項 7 に記載の検出方法。

## 【請求項 9】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のモノクローナル抗体または標識した前記モノクローナル抗体を含む D C D 検出キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ヒトダームシジン（ダームシジンを以下単に、D C D ということがある）を認識するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリッド細胞、前記モノクローナル抗体の製造方法および利用法に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

D C D は、B i r g i t S h i t t e k らによってヒト汗中から単離された 1 1 0 個のアミノ酸からなる抗菌ペプチドである（特許文献 1、非特許文献 1）。人間の汗と同じ pH、同じ塩濃度という条件下において、大腸菌、腸球菌、黄色ブドウ球菌、カンジダに対して抗菌作用を発揮することが確認されており、ヒト汗中に恒常的に分泌されていることから、炎症時に皮膚に発現する他の抗菌ペプチド（ - デフェンシンやカテリシジン等）に比べて、皮膚の微生物の感染をコントロールしている可能性が高く、微生物・ウイルスが関わる皮膚疾患の発症に強く関連していると推測されている。

40

## 【0003】

また、アトピー性皮膚炎患者の汗中 D C D 量が健常人に比べて少ないことが報告されており（非特許文献 2）、アトピー性皮膚炎における黄色ブドウ球菌による皮膚症状の悪化と関係がある可能性が示唆されている。さらに、汗中には D C D の分解型のペプチドが数種存在し、分解型 D C D の存在比に個人差があることが報告されており（非特許文献 3）、分解型 D C D の存在比が微生物の易感染性の個人差に影響を与えている可能性も考えられる。そこで、D C D の疾患への寄与度が明らかになれば、汗などの生体試料中のトータル D C D 量または分解型 D C D 量を測定することで皮膚への微生物の易感染性を評価し、

50

感染性疾患の予防や治療に生かすことができる可能性が考えられる。

【0004】

これまで生体試料中のDCDの測定には、SELDI-TOF-MS法が多く使われているが、この方法は正確な濃度を求めることが困難であった。生体試料中のDCD量を測定する方法としては、DCDに特異的なアミノ酸配列を認識する抗体を用いた免疫学的測定方法が簡便かつ正確である。免疫学的測定方法としては、酵素免疫測定法や、抗体を結合させたビーズを複数用いて一度に多くのパラメータを高感度に検査する方法(Bio-Plexサスペンションアレイシステム(BioRad社製)などを例示することができる)などを挙げることができる。特に、後者は、少量の検体量で多数のパラメータを検査することができる優れた方法であり、抗原認識性の異なった複数の抗体を用いて、分解型DCDの存在比を検査することも可能となる。

10

【0005】

抗DCD抗体としては、これまでの技術では、ポリクローナル抗体が多く市販されている。ポリクローナル抗体は抗原認識において特異性に問題が生じる場合があり、より正確なDCDの定量のためには、モノクローナル抗体の方が好ましい。市販のモノクローナル抗体としては、和歌山県立医科大学の佐川らが作製したIgMクラスの抗DCDモノクローナル抗体(G-81)が知られている(非特許文献4)。しかし、特異性については、IgMクラスよりもIgGクラスの抗体の方が、一般的に高いものが多く、また、抗原の凝集や補体活性化の強さは、IgGクラスよりもIgMクラスの抗体の方が強い等の理由から、DCDをより正確に検出するためには、IgGクラスの抗体の方が好ましい。特に、上述した複数種類の抗体とビーズを用いて多数のパラメータを一度に解析する方法には、IgGクラスの抗体の使用が適しており、IgMクラスの抗体では、この方法の性能、利点を全く活かすことができないという問題がある。ここで、IgGクラスのモノクローナル抗体としては、我々は既に、全長DCDのアミノ酸配列の92番目~108番目の範囲に認識エピトープをもつ抗DCDモノクローナル抗体(10C-3抗体)を産生するハイブリドーマ10C-3株(FERM P-21792)を作製している(特許文献2)。しかし、汗中に存在するDCDの分解型のペプチドの中には、10C-3抗体の認識するアミノ酸配列をもたないものがあるため、10C-3抗体のみでは全てのDCDの分解型ペプチドを検出することはできないという課題があった。

20

【先行技術文献】

30

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許第7348409号公報

【特許文献2】特開10-241731号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Birgit Shitttek et al. Nature Immunology, 2001, 2(12):1133-1137.

【非特許文献2】Siegbert Rieg et al. J. Invest. Dermatol., 2006, 126:354-365.

40

【非特許文献3】Siegbert Rieg et al. J. Immunol., 2005, 174:8003-8010.

【非特許文献4】Kazunori Sagawa et al. Int. J. Leg. Med., 2003, 117:90-95.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

DCDを認識するIgGクラスのモノクローナル抗体および当該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの提供を課題とする。また、この抗体を用いた生体試料中のDCDの検査方法の提供を課題とする。

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、全長ヒトDCDのアミノ酸配列のうち63番目から81番目の配列をもつペプチドを合成し、それにキャリアプロテインとしてキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)を付加して得られるKLH付加DCDペプチドを抗原とすることで本発明の抗体を得ることができた。すなわち、当該抗原を免疫された動物から得られた抗体産生細胞と、骨髄腫細胞を細胞融合法により融合し、スクリーニングによりヒトDCDを認識するIgGクラスのモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマを得た。そしてこのハイブリドーマを培養することにより、ヒトDCDを認識するIgGクラスのモノクローナル抗体が製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

10

## 【0010】

すなわち、本発明は次の(1)～(10)のモノクローナル抗体等に関する。

(1) 配列表配列番号7及び配列表配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるペプチドと反応するIgGクラスの抗DCDモノクローナル抗体。

(2) DCDのアミノ酸配列のうち、66番目から81番目の領域を認識する前記(1)に記載のモノクローナル抗体。

(3) 配列表配列番号7に示すアミノ酸配列からなるペプチドにKLHを付加したKLH付加DCDペプチドを抗原としてヒト以外の動物に免疫して得られる前記(1)に記載のモノクローナル抗体。

20

(4) ハイブリドーマである6B-10株(FERM AP-22134)が産生する前記(1)に記載のモノクローナル抗体。

(5) ハイブリドーマである6B-10株(FERM AP-22134)。

(6) 前記(5)に記載のハイブリドーマを増殖させる工程を含むIgGクラスの抗DCDモノクローナル抗体の製造方法。

(7) 前記(1)～(4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体と試料を混合する工程を含むDCDの検出方法。

(8) 試料がヒト汗由来である前記(7)に記載の検出方法。

(9) 前記(1)～(4)のいずれかに記載のモノクローナル抗体または標識した前記モノクローナル抗体を含むDCD検出キット。

30

## 【発明の効果】

## 【0011】

本発明により、DCDを高い感度で検出できるIgGクラスのモノクローナル抗体の提供が可能となった。本発明によって提供されるモノクローナル抗体は、汗等の生体試料に含まれるDCD量の測定等に利用できる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0012】

【図1】抗DCDモノクローナル抗体(6B-10抗体)の抗原認識特異性を確認した図である(実施例)。

【図2】抗DCDモノクローナル抗体(6B-10抗体)の汗中DCDへの反応性を確認示した図である(実施例)。

40

【図3】抗DCDモノクローナル抗体(6B-10抗体)を用いたDCDの定量方法における検量線を示した図である(実施例)。

【図4】汗に含まれるDCD定量における、6B-10抗体と10C-3抗体の、検出量の違いを示した図である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0013】

本発明のモノクローナル抗体は、DCDを認識するIgGクラスのモノクローナル抗体であって、配列表配列番号7及び配列表配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるペプチドと反応するモノクローナル抗体であればいずれであってもよい。

50

また、DCDのアミノ酸配列のうち、66番目から81番目の領域を認識する抗体であることが望ましい。

さらにまた、本発明のモノクローナル抗体には、抗体分子全体のほかに、DCDの前記特定領域を認識できる抗体のフラグメントも含まれるものとする。

ここで、DCDの特定領域を認識するとは、DCDの特定領域に結合したり、結合することによって何らかの作用をしたりすることをいう。

また、DCDは、ヒトDCD、チンパンジーのDCD、オランウータンのDCD様タンパク、アカゲザルのDCD様タンパク、コモンマーセットのDCD様タンパクが挙げられ、このうちでもヒトDCDであることが好ましい。

このようなモノクローナル抗体としては、配列表配列番号2、3、4、5および6に示されるアミノ酸配列からなる各ペプチドと反応するモノクローナル抗体や、6B-10株(FERM AP-22134)が産生するモノクローナル抗体等が挙げられる。このうちでも6B-10株(FERM AP-22134)が産生するモノクローナル抗体が好ましい。DCDは立体構造をとらず、抗原認識性が低く、モノクローナル抗体を得ることが困難であることから、本発明の「モノクローナル抗体」は非常に有用である。

#### 【0014】

本発明のハイブリドーマは、DCDを認識するIgGクラスのモノクローナル抗体であって、配列表配列番号7及び配列表配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるペプチドと反応するモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマであれば、いずれのハイブリドーマであってもよい。このようなハイブリドーマとしては、6B-10株(FERM AP-22134)等が挙げられる。

本発明のハイブリドーマは、ヒトDCDの63番目から81番目のアミノ酸配列をもつペプチドを免疫抗原として用いることで、血清中の抗体価が十分に上昇したマウス、ラット等の脾臓から摘出した脾臓細胞と骨髄腫細胞等を融合し、融合細胞をHAT培地等で培養することで得ることが好ましい。ヒトDCDを認識するIgGクラスのモノクローナル抗体を得るために、このマウス、ラット等への免疫は、血清中の抗体価を十分に上昇できる期間行うことが好ましい。

ハイブリドーマを得るための免疫抗原としては、ヒトDCD、His-tag融合ヒトDCD、ヒトDCDのアミノ酸配列の一部をもつペプチドやそのキャリアプロテイン付加タンパク等が挙げられる。このうちでも、ヒトDCDの63番目から81番目のアミノ酸配列をもつペプチドにKLHを付加したKLH付加DCDペプチドが免疫抗原として好ましい。

また、DCDの免疫原性(抗原性)は非常に弱いため、IgG抗体を産生するハイブリドーマは通常数のクローニングだけでは得ることができない。従って、DCD認識IgG抗体産生ハイブリドーマを得るためには、ハイブリドーマのスクリーニングにあたって、一般的に行われている1,000クローン程度の検査ではなく、少なくとも10,000クローン以上、好ましくは100,000クローン以上スクリーニングする必要がある。

#### 【0015】

本発明の「モノクローナル抗体の製造方法」は、DCDを認識するIgGクラスのモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマを用いる製造方法であればいずれの製造方法も含まれる。

例えば、DCDを認識するIgGクラスのモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマを液体培地の中またはヒト以外の動物の腹腔内で増殖させ、モノクローナル抗体を生成、蓄積せしめ、これを採取する方法等が挙げられる。ここでヒト以外の動物としては、ハイブリドーマを免疫的に排除しない動物種、例えば、ミエローマ細胞と同系のマウス、ヌードマウス、ヌードラット等が挙げられる。

#### 【0016】

本発明のDCDの検出方法は、DCDを認識するIgGクラスのモノクローナル抗体を用いる検出方法であれば、いずれの方法であってもよい。

例えば、本発明の検出方法において、DCDを認識するIgGクラスのモノクローナル

10

20

30

40

50

抗体を用いて酵素免疫測定法を行うことにより、汗等の試料に含まれるDCDの検出や定量等ができる。

また、本発明のDCDを認識するIgGクラスのモノクローナル抗体と、他の抗体とを組合せ、これらの抗体を結合させた複数のビーズを用いて一度に多くのパラメータを高感度に検査する方法（Bio-Plexサスペンションアレイシステム（BioRad社製）等）等を行うこともできる。この方法では、抗原認識性の異なった複数の抗体を用いることになるので、DCDの各切断型の存在比を検査することもでき、抗菌活性の個人差を調べることもできる。このような複数の抗体の組み合わせとしては、同じIgGクラス同士の組み合わせである、6B-10抗体と10C-3抗体との組み合わせが挙げられ、また、IgGクラスとIgMクラスの組み合わせとしては、6B-10抗体とG-81抗体との組み合わせ等が挙げられる。また6B-10抗体、10C-3抗体およびG-81抗体の3種類の抗体の組み合わせも挙げられる。

10

#### 【0017】

本発明の検出キットは、DCDを検査するためのキットのことをいい、DCDを認識するIgGクラスのモノクローナル抗体を使用したキットであれば、いずれのキットであってもよい。例えば、DCDを認識するIgGクラスのモノクローナル抗体と、標準試料である精製ヒトDCDとを組み合わせ使用したキット等が挙げられる。このキットに含まれるモノクローナル抗体は、DCDの検出や定量のために、標識されている抗体であることが好ましい。例えば、アルカリフォスファターゼ等で標識された抗体等が挙げられる。この抗体の標識物質は従来知られているものであればいずれのものを用いることもできる。

20

以下、実施例をあげて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0018】

##### DCDモノクローナル抗体の製造方法

##### 1. 抗原タンパクの作製

免疫抗原として、全長ヒトDCDのアミノ酸配列のうち63番目から81番目の配列（SSLEKGLDGAKKAVGGLGKLG：配列表配列番号7）をもつペプチド（以下、DCDペプチド）を合成により作製し、それにキャリアプロテインとしてキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）を付加したタンパクを用いた。

30

KLHの付加は、上記DCDペプチドのC末端にシステインを付加して、マレイミド法を用いて行った。以上のKLH付加DCDペプチドの合成は、Sigma Aldrich社に依頼して行った。

#### 【0019】

##### 2. ハイブリドーマの作製

##### (1) 免疫

上記1.で作製した抗原のPBS溶液（KLHを除くDCDペプチド濃度：3.0mg/ml）をアジュバンドであるTiterMax Gold（CytRx社製）とを等量混合し、W/Oミセルの状態 Maus（BALB/C、7週齢）の背部皮下に投与した（投与量：KLHを除くDCDペプチド量として150μg/Maus）。さらに同様にTiterMax Goldと混合した抗原を10～14日間隔で2回追加免疫した。最後の追加免疫から2週間後、抗原をPBS溶液に等量混合して腹腔内注射し最終免疫を行った。最終免疫の3日後に脾臓細胞を摘出した。

40

なお、抗体価は、追加免疫の7日後、Maus眼下静脈叢から血液を採取し、下記の酵素免疫測定法にて血清中の抗体価を測定し、抗原に対する抗体が産生されていることを確認した。

#### 【0020】

##### (2) 抗体価の確認

抗体価はKLH付加DCDペプチドを固相とした酵素免疫測定法により確認した。まず

50

、コーティングバッファー（炭酸 重炭酸緩衝液、pH 10）を用い、KLH付加DCDペプチドを10 µg/mlに希釈し、96穴EIA/RIAプレート（Costar社製、High Binding）に分注（50 µL/ウェル）して4 で一昼夜（約14時間）インキュベートすることにより物理吸着させた。プレートを0.1% Tween 20含有PBS（以下、PBSTと略記する）で3回洗浄後、ブロッキング液（0.5% BSAを含むPBS）を100 µL/ウェル加え、室温で2時間ブロッキングした。

#### 【0021】

ブロッキング液除去後、1次抗体としてマウスから得られた血清（50 µl/ウェル）のPBSによる段階希釈液を入れて、室温で2時間インキュベートした。プレートをPBSTで4回洗浄後、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIg（G+M）ヤギポリクローナル抗体（Tago Products社製）を室温で1時間反応させた後、オルトフェニレンジアミン（Sigma社製）を含むペルオキシダーゼ基質溶液を加え発色させた。10分後、1.5N硫酸を加え発色を停止した後、マイクロプレートリーダーで492 nmにおける吸光度を測定した。

本実施例において免疫したマウスでは、未感作のマウスから得た血清と比較して、吸光度の差が認められた。1000倍希釈した血清を用いて測定した吸光度は、未感作のマウスでは0.05以下であったが、免疫したマウスの血清は2.0であり、抗体価が上昇していることが確認された。この抗体価が十分上昇したマウスを抗体産生細胞の供給原として次の工程に用いた。

#### 【0022】

##### （3）細胞融合、ハイブリドーマのスクリーニング

抗体価の十分高くなったマウスの脾臓から摘出した脾臓細胞とマウス骨髓腫細胞（FO）（ATCC）とを5対1の割合で混合し、50%ポリエチレングリコール（分子量1400～1600、Sigma社製）存在下にて細胞融合させた。

融合細胞は脾臓細胞として $2 \times 10^6$ /mLになるようにHAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含むRPMI培地）に懸濁し、フィーダー細胞を播種しておいた96穴培養プレート（CORNING社製）に0.1 mLずつ分注した。これを5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で37 にて培養し、おおよそ2週間後に、ハイブリドーマの生育してきたウェルの培養上清について、上記抗体価の測定で示した酵素免疫測定法において固相をKLH付加DCDペプチドおよびKLH、1次抗体を培養上清に置き換えた実験により、KLH付加DCDペプチドに反応し、KLHに反応しない抗体の産生が有望な株を選択した。DCDは立体構造をとらず、抗原認識性が悪いため、1,000クローンのスクリーニングでは目的のモノクローナル抗体が得られず、10,000クローンでスクリーニングを実施し、抗DCDモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを8種樹立した。8種のうち、5種はIgMクラスであり、3種がIgGクラスであった。このIgGクラスのハイブリドーマのうち抗原に対して顕著に反応性の高い抗体を産生する1株は、出願人によって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（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に2011年6月23日に寄託手続がされ、受領番号（FERM AP-22134）が付与されている。以下、このハイブリドーマ6B-10株（FERM AP-22134）が産生する抗DCDモノクローナル抗体を6B-10抗体と示す。

#### 【0023】

##### 3. モノクローナル抗体の生産

ハイブリドーマ投与の2週間前にプリスタン0.5 mLを腹腔内に注射しておいた8週齢の雌BALB/Cマウスに、上記で得られたハイブリドーマを細胞数 $5 \times 10^6$ 個の量で腹腔内に投与した。ハイブリドーマ投与の約10日後に腹水を採取し、遠心処理して上清を得た。上清を等量の吸着用緩衝液（3 mol/L NaCl - 1.5 mol/L Glycine - NaOH、pH 8.5）と混和後、濾過した。この濾液を吸着用緩衝液で平衡化したプロテインAカラム（ファルマシア社製）に通して抗体をカラムに吸着させた後、0.1 mol/Lクエン酸緩衝液（pH 3.0）でカラムより溶出させ、抗DCDモ

10

20

30

40

50

ノクローナル抗体(6B-10抗体)を精製した。

【0024】

4. 抗DCDモノクローナル抗体(6B-10抗体)の免疫グロブリンクラスおよびサブクラスの同定

上記3.で調製された6B-10抗体の免疫グロブリンクラスを、Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Test Kit(Serotec社製)を用いて確認した。

0.1%BSA含有PBSを用いて6B-10抗体を1.0 $\mu$ g/mlに希釈し、キット付属のチューブに加え、チューブ内の試薬を溶解させた。ただちにキット付属のストリップをチューブ内の溶解液に浸し、10分後、ストリップ上に現れるバンドの位置を観察し、免疫グロブリンクラスを判定した。その結果、6B-10抗体の免疫グロブリンクラスは、本発明において望まれるIgG2a)、軽鎖であることを確認した。

【0025】

以下、本発明によって得られた6B-10抗体と、従来技術として得られているIgGクラスの抗DCDマウスモノクローナル抗体(10C-3抗体(FERM P-21792))またはIgMクラスの抗DCDマウスモノクローナル抗体(G-81抗体)とを比較し、6B-10抗体の抗原認識特異性の確認等を行った。

【0026】

5. 抗DCDモノクローナル抗体(6B-10抗体)の抗原認識特異性の確認

上記3.で調製された6B-10抗体の抗原認識の特異性を確認するため、ウェスタンブロット解析を行った。ウェスタンブロットの抗原として、大腸菌において組換え発現させた約16kDaのポリヒスチジン(以下、His-tagと略す)とDCDタンパク(Full-DCD;全長DCDのアミノ酸配列の20番目~110番目をもつ)の融合タンパクを用いた。

組換え発現の手法は一般的な手法を用いた。すなわち、ヒト皮膚組織から抽出したトータルRNAにランダムプライマー(GEヘルスケアサイエンス社製)を用いた逆転写酵素反応を行い、cDNAを作製した。

得られたcDNAをTAクローニングによって市販のプラスミドベクターであるpGEM MTEasy Vector(Promega社製)に挿入し安定化した。このDCD挿入pGEM MTEasy Vectorを鋳型にして、ヒトDCDのcDNA配列からシグナルシーケンス領域を除いた配列(配列表配列番号1)をPCR法により増幅し、市販のプラスミドベクターであるpET28(Novagen社製)のマルチクローニングサイトに挿入することで、DCD/pET28プラスミドベクターを作製した。

このDCD/pET28プラスミドベクターを大腸菌(BL21(DE3)株)にトランスフォーメーションし、カナマイシン含有寒天培地上にコロニー形成させた。1個のコロニーを採取しカナマイシン含有培地中にて振とう培養し、対数増殖期にイソプロピル- $\beta$ -チオガラクトピラノシドを添加することにより組換えタンパクの発現を誘導した。

遠沈した大腸菌をグアニジン塩酸塩含有トリス塩酸バッファーにより溶解した。溶解液を、Ni-NTAアガロース(QIAGEN社製)を用いて固定化金属アフィニティークロマトグラフィー法により精製した後、透析によりグアニジン濃度を徐々に下げて巻き戻しを行い、ポリヒスチジン融合タンパクを得た。ここで、目的物のHis-tag融合DCDに該当する約16kDaと異なる分子量のタンパクが少量混在していることが確認されたため、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、目的の分子量のバンドをゲルから切り出し、エレクトロエリユーター(BioRad製)を用いてゲルからタンパクを溶出した。

得られたHis-tag融合DCDタンパクを還元条件下でSDS-PAGE展開後、PVDF膜に転写し、0.1%BSAを含むTBST(0.05%Tween20を含むTBST、pH7.4)で4にて一昼夜ブロッキング後、一次抗体として6B-10抗体(3.3mg/ml)の4000倍希釈液または10C-3抗体(3.1mg/ml)の4000倍希釈液、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG抗体(

10

20

30

40

50

CAPPEL社製)を反応させた。PVD F膜をTBSTで洗浄後、NBT(ニトロブルーテトラゾリウムクロライド)およびBCIP(5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルフォスフェート)の混合液を基質として加え、発色させた。

その結果、6B-10抗体は、10C-3抗体と同様に、His-tag融合DCDタンパクと反応することが確認された(図1)。なお、図1において、レーンMは分子量マーカー、レーンAはHis-tag融合DCDタンパクのPVD F膜上におけるクーマシブルー(CBB)染色結果を表し、レーンBは6B-10抗体、レーンCは10C-3抗体によるウェスタンブロット解析の結果を表す。

#### 【0027】

6. 抗DCDモノクローナル抗体(6B-10抗体)の認識エピトープの同定

上記3.で調製された6B-10抗体の認識エピトープを確認するため、DCDの分解された型(切断型)として汗中に存在することが知られているペプチド(非特許文献3)から下記表1に示したアミノ酸配列(配列表配列番号2~6)からなる合成ペプチドを製し(AnyGen社製)、これらを抗原とした酵素免疫測定法により6B-10抗体の反応性を確認した。

#### 【0028】

##### 【表1】

配列番号	名称	ペプチド配列
2	DCD-1L	SSLLEKGLDGAKKAVGGGLGKLGKDAV EDLESVGKGAVHDVKDVLDSVL
3	SSL-46	SSLLEKGLDGAKKAVGGGLGKLGKDAV EDLESVGKGAVHDVKDVLDS
4	SSL-29	SSLLEKGLDGAKKAVGGGLGKLGKDAV EDL
5	SSL-25	SSLLEKGLDGAKKAVGGGLGKLGKDA
6	LEK-45	LEKGLDGAKKAVGGGLGKLGKDAVEDL ESVGKGAVHDVKDVLDSVL

#### 【0029】

酵素免疫測定法は、以下の方法により実施した。

まず、各合成ペプチドをPBS(-)を用い100pmol/mlに希釈し、96穴EIA/RIAプレート(Costar社製、High Binding)に分注(50μL/ウェル)して室温で約18時間インキュベートすることにより物理吸着させた。

プレートを滅菌蒸留水で10回洗浄後、ブロッキング液(1%BSAを含むPBS)を100μL/ウェル加え、37で1時間ブロッキングした。ブロッキング液除去し滅菌蒸留水で10回洗浄後、1次抗体として6B-10抗体(3.3mg/ml)の8000倍希釈液、10C-3抗体(3.1mg/ml)の8000倍希釈液またはG-81抗体(50μL/ウェル)を分注し、4で約18時間インキュベートした。

プレートを滅菌蒸留水で10回洗浄後、2次抗体として希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIg(G+M)ヤギポリクローナル抗体(Tago Products社製)を37で1時間反応させた後、オルトフェニレンジアミン(Sigma社製)を含むペルオキシダーゼ基質溶液を加え発色させた。10分後、1.5N硫酸を加え発色を停止した後、マイクロプレートリーダーで492nmにおける吸光度を測定した。

その結果、6B-10抗体、10C-3抗体およびG-81抗体の合成ペプチドに対する反応性は、表2に示す結果となった。すなわち、6B-10抗体の認識エピトープは10C-3抗体およびG-81抗体と異なること、および、6B-10抗体の認識エピトープとして必須の部位は、次に示すアミノ酸配列の範囲に存在することが明らかになった。認識エピトープ範囲:LEKGLDGAKKAVGGGLG(全長DCDのアミノ酸配列の

66番目～81番目)

また、6B-10抗体は、Full-DCCD、DCCD-1L(配列番号2)、SSL-46(配列番号3)、SSL-29(配列番号4)、SSL-25(配列番号5)、LEK-45(配列番号6)のペプチドと反応するモノクローナル抗体であった。

一方、10C-3抗体は、Full-DCCD、DCCD-1L(配列番号2)、SSL-46(配列番号3)、LEK-45(配列番号6)のペプチドと反応し、SSL-29(配列番号4)、SSL-25(配列番号5)のペプチドと反応しないモノクローナル抗体であった。

また、G-81抗体は、Full-DCCD、DCCD-1L(配列番号2)、SSL-46(配列番号3)、SSL-29(配列番号4)、LEK-45(配列番号6)のペプチドと反応し、SSL-25(配列番号5)のペプチドと反応しないモノクローナル抗体であった。

従って、6B-10抗体と10C-3抗体、G-81抗体は抗原認識性が異なるので、それらを併用することにより、DCCDの各切断型の分布状況についての情報を得ることができる。すなわち、抗菌活性の個人差についての情報を得ることができる。

また、6B-10抗体と10C-3抗体、G-81抗体の認識エピトープが異なることから、いずれか2種以上を用いることにより、サンドイッチイムノアッセイ法に応用できる可能性がある。

【0030】

【表2】

名称	反応性		
	6B-10抗体	10C-3抗体	G-81抗体
DCCD-1L	+	+	+
SSL-46	+	+	+
SSL-29	+	-	+
SSL-25	+	-	-
LEK-45	+	+	+

【0031】

7. 抗DCCDモノクローナル抗体(6B-10抗体)の汗中DCCDに対する反応性

上記3.で調製された6B-10抗体の生体試料中のDCCDに対する反応性を、汗検体を用いたウェスタンブロット解析により確認した。

汗検体は、運動負荷によりヒト(n=6)の顔面および背中に発生した汗を回収して得られた。汗検体をスペクトラ/ポアCE透析用チューブ(MWCO:2000、フナコシ製)に入れ、超純水中で透析を行った後、その溶液の一部を、遠心乾燥機を用いて10倍濃縮した。濃縮および非濃縮サンプルを還元条件下でSDS-PAGE展開後、PVDF膜に転写し、0.1%BSAを含むTBST(0.05%Tween20を含むTBS、pH7.4)で4にで一昼夜ブロッキング後、一次抗体として6B-10抗体(3.3mg/ml)の4000倍希釈液、10C-3抗体(3.1mg/ml)の4000倍希釈液、G-81抗体の100倍希釈液または市販のヤギポリクローナル抗体であるA-20抗体の2000倍希釈液を用いて反応させ、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG抗体、マウスIgM抗体または抗ヤギIgG抗体(全てCAPPEL社製)をそれぞれ反応させた。

【0032】

PVDF膜をTBSTで洗浄後、NBT(ニトロブルーテトラゾリウムクロライド)およびBCIP(5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルフォスフェート)の混合液を基質として加え、発色させた。その結果、ポリクローナル抗体であるA-20抗体により示

されたように、検体 5 を除く全ての検体において、DCDとして検出されうるバンドが存在するところ、モノクローナル抗体である G - 8 1 抗体では全ての検体においてバンドが検出されず、6 B - 1 0 抗体では、検体 1、検体 2、検体 4、検体 6 において約 5 k D a のバンドを検出した ( 図 2 )。1 0 C - 3 抗体では、検体 1、検体 2、検体 4、検体 6 において約 5 k D a のバンドを検出し、6 B - 1 0 抗体と同様の結果を示した。

この結果から、6 B - 1 0 抗体は、G - 8 1 では検出できない D C D、D C D 複合体または D C D 結合タンパクを認識できることが明らかとなった。本実施例に用いた汗の検体においては、6 B - 1 0 抗体と 1 0 C - 3 抗体の反応性に違いがみられなかった。図 2 において、レーン M は分子量マーカーを表す。

#### 【 0 0 3 3 】

8 . 抗 D C D モノクローナル抗体 ( 6 B - 1 0 抗体 ) を用いた D C D の定量方法

6 B - 1 0 抗体を用いて D C D を定量的に検出できることを、合成ペプチドを抗原とした酵素免疫測定法により確認した。

酵素免疫測定法は、上記 2 . の抗体価の測定と同様の方法にて行った。

まず、純度 9 5 % 以上の合成 D C D - 1 L ( A n y G e n 社製 ) をコーティングバッファ ( 炭酸 重炭酸緩衝液、p H 1 0 ) を用いて 0 . 0 4 ~ 5 . 0  $\mu$  g / m l の濃度範囲において 2 段階希釈し、9 6 穴 E I A / R I A プレート ( C o s t a r 社製、H i g h B i n d i n g ) に分注 ( 5 0  $\mu$  L / ウェル ) して、4 で一昼夜 ( 約 1 4 時間 ) インキュベートすることにより合成 D C D - 1 L をプレートに物理吸着させた。

プレートを 0 . 1 % T w e e n 2 0 含有 P B S ( 以下、P B S T と略記する ) で 3 回洗浄後、ブロッキング液 ( 0 . 5 % B S A を含む P B S ) を 1 0 0  $\mu$  L / ウェル加え、室温で 2 時間ブロッキングした。ブロッキング液除去後、1 次抗体として 6 B - 1 0 抗体 ( 3 . 3 m g / m l ) の 8 0 0 0 倍希釈液 ( 5 0  $\mu$  l / ウェル ) を分注し、室温で 2 時間インキュベートした。

プレートを P B S T で 4 回洗浄後、2 次抗体として希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス I g ( G + M ) ヤギポリクローナル抗体 ( T a g o P r o d u c t s 社製 ) を室温で 1 時間反応させた後、オルトフェニレンジアミン ( S i g m a 社製 ) を含むペルオキシダーゼ基質溶液を加え発色させた。1 0 分後、1 . 5 N 硫酸を加え発色を停止した後、マイクロプレートリーダーで 4 9 2 n m における吸光度を測定した。

得られた吸光度を合成 D C D - 1 L 濃度に対してプロットした結果、0 . 0 4 ~ 1 . 2 5  $\mu$  g / m l の濃度範囲において、直線性が得られることを確認した ( 図 3 )。よって、酵素免疫測定法により、本発明の抗体を用いて D C D 含有検体中の D C D 量を定量できることが確認された。

#### 【 0 0 3 4 】

9 . 抗 D C D モノクローナル抗体 ( 6 B - 1 0 抗体 ) を用いた汗に含まれる D C D の定量 ( 1 0 C - 3 抗体との比較 )

6 B - 1 0 抗体を用いることにより、汗に含まれる D C D 分解ペプチドを、1 0 C - 3 抗体よりも大きな検出量で検出できることを、酵素免疫測定法により確認した。

酵素免疫測定法は、上記 8 . の測定方法と同様の方法にて行った。

汗検体は、成人 4 0 人に対する運動負荷によりヒトの顔面および背中に発生した汗を回収して得られた。汗検体を P h o s p h a t e b u f f e r e d s a l i n e ( P B S ( - )、p H 7 . 0 ) を用いて 1 0 0 倍希釈し、9 6 穴 E I A / R I A プレート ( C o s t a r 社製、H i g h B i n d i n g ) に分注 ( 5 0  $\mu$  L / ウェル ) して、4 で一昼夜 ( 約 1 4 時間 ) インキュベートすることにより汗に含まれるタンパクおよびペプチドをプレートに物理吸着させた。

プレートを 0 . 1 % T w e e n 2 0 含有 P B S ( 以下、P B S T と略記する ) で 3 回洗浄後、ブロッキング液 ( 0 . 5 % B S A を含む P B S ) を 1 0 0  $\mu$  L / ウェル加え、室温で 2 時間ブロッキングした。ブロッキング液除去後、1 次抗体として 6 B - 1 0 抗体 ( 3 . 3 m g / m l ) の 8 0 0 0 倍希釈液または 1 0 C - 3 抗体 ( 3 . 1 m g / m l ) の 8 0 0 0 倍希釈液を 5 0  $\mu$  l / ウェル分注し、室温で 2 時間インキュベートした。

10

20

30

40

50

プレートに P B S T で 4 回洗浄後、2 次抗体として希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス I g ( G + M ) ヤギポリクローナル抗体 ( T a g o P r o d u c t s 社製 ) を室温で 1 時間反応させた後、オルトフェニレンジアミン ( S i g m a 社製 ) を含むペルオキシダーゼ基質溶液を加え発色させた。10 分後、1 . 5 N 硫酸を加え発色を停止した後、マイクロプレートリーダーで 492 nm における吸光度を測定した。適当な濃度に調製した純度 95 % 以上の合成 D C D - 1 L ( A n y G e n 社製 ) を用いて検量線を作成し、吸光度から汗に含まれる D C D 濃度を計算した。

その結果、検査を実施した汗検体 40 検体すべてにおいて、6 B - 10 抗体により定量した汗中 D C D の検出量が 10 C - 3 抗体による検出量よりも大きいことを確認した ( 図 4 )。本実施例により、6 B - 10 抗体は 10 C - 3 抗体よりも、汗に含まれる D C D 分解ペプチドの検出量が大きいことが示された。

本発明の 6 B - 10 抗体は全ての D C D 由来の分解ペプチドの共通配列を認識することから、全 D C D ペプチド量を正確に定量することができ、公知の 10 C - 3 抗体では検出できない分解ペプチドを検出することができるようになった。また、図 4 の両棒グラフの差から、10 C - 3 抗体よりも 6 B - 10 抗体の方が検出できる分解ペプチドの量ははるかに大きいことを示している。また、これらの 2 種類の抗体を用いて検出を行えば、6 B - 10 抗体により汗中の D C D 分解ペプチドの全量が測定され、10 C - 3 抗体により D C D ペプチドのうちのある群 ( 全長 D C D の 92 番目 ~ 108 番目のアミノ酸配列を持つペプチド群、例えば配列番号 2、3、6 ) が測定されることから、配列番号 2、3、6 のペプチド群とそれ以外のペプチド群 ( 例えば配列番号 4、5 ) の比率などを算出することも可能となる。

【産業上の利用可能性】

【0035】

本発明のモノクローナル抗体 ( 6 B - 10 抗体 ) は、ヒト D C D に対して特異的に反応し得ることから、ヒト D C D の検出に使用することができる。また、本発明のハイブリドーマにより、該抗体を細胞外に半永久的に継続して安定的に製造することができる。本発明のモノクローナル抗体 ( 6 B - 10 抗体 ) およびそれを産生するハイブリドーマは、ヒト生体試料中の D C D 解析や、微生物由来の感染症の予防、治療等並びにそれらの研究に有用である。

【受託番号】

【0036】

F E R M A P - 2 2 1 3 4

【0037】

[ 寄託生物材料への言及 ]

( 1 ) F E R M A P - 2 2 1 3 4 ( 6 B - 10 抗体産生ハイブリドーマ )

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

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

日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 ( 郵便番号 305-8566 )

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

平成 23 年 6 月 23 日

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

F E R M A P - 2 2 1 3 4

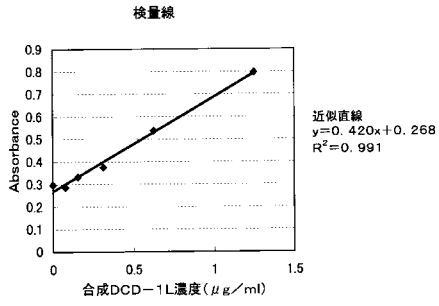
10

20

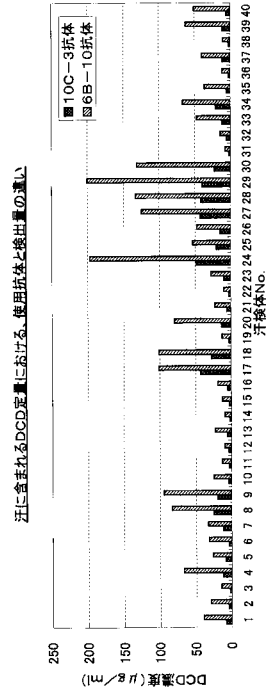
30

40

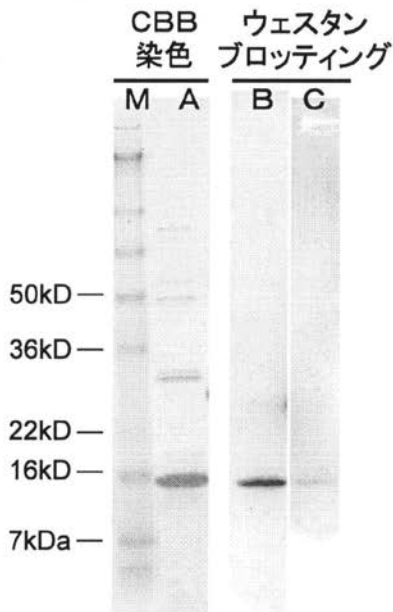
【 図 3 】



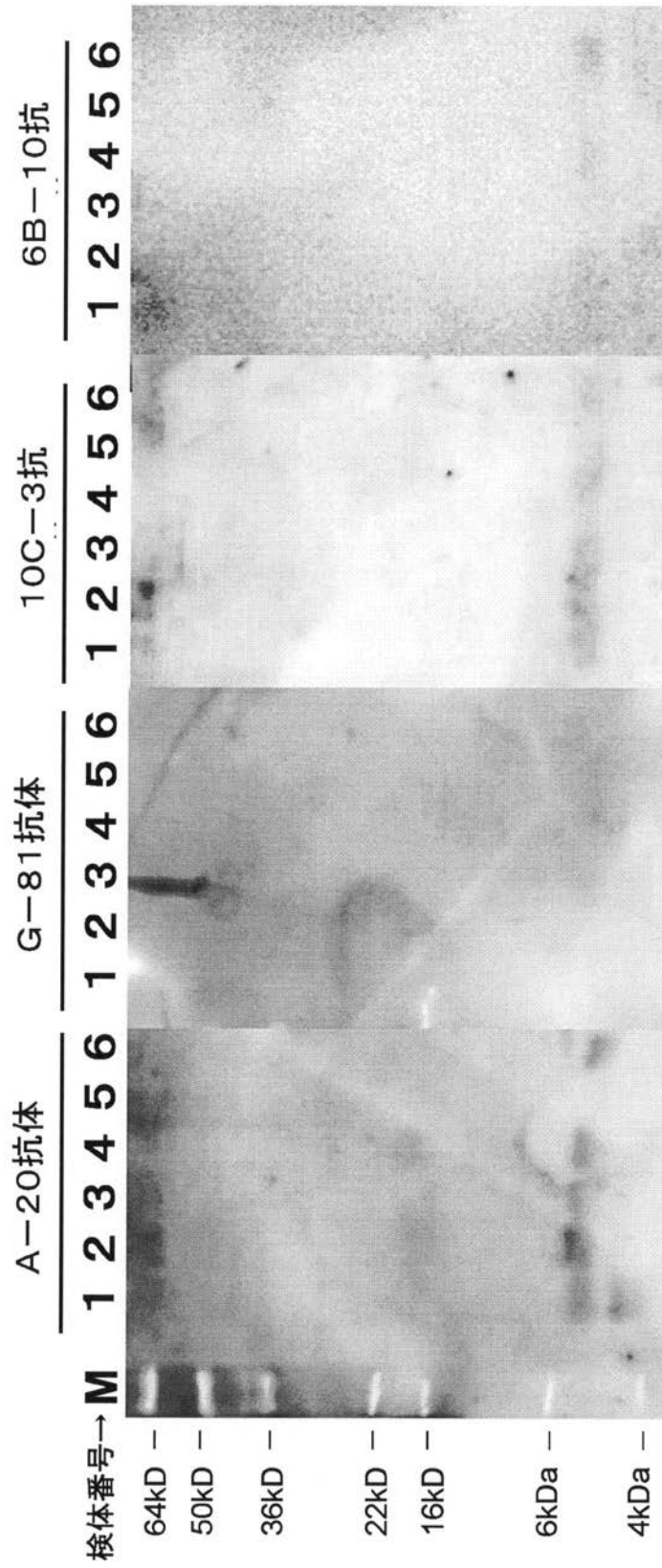
【 図 4 】



【 図 1 】



【 図 2 】



【 配列表 】

[2013010723000001.app](#)

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
G 0 1 N 33/577 (2006.01) G 0 1 N 33/577 B

Fターム(参考) 4B065 AA90Y AB07 AC14 BA08 CA25 CA46  
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	抗dcd单克隆抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013010723A</a>	公开(公告)日	2013-01-17
申请号	JP2011145601	申请日	2011-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人北里研究所 株式会社芳珂		
申请(专利权)人(译)	学校法人北里研究所 有限公司FANCL		
[标]发明人	藤村響男 吉野崇		
发明人	藤村 響男 吉野 崇		
IPC分类号	C07K16/18 C12P21/02 C12N5/10 C07K19/00 G01N33/53 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12P21/02.C C12N5/00.102 C07K19/00 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N5/16 C12N5/20 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90Y 4B065/AB07 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
其他公开文献	JP5920761B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：提供一种由人类汗液中分离的110个氨基酸组成的抗菌肽，一种可识别DCD（皮杀霉素）的IgG类单克隆抗体以及一种产生该单克隆抗体的杂交瘤。通过合成具有全长人DCD的氨基酸序列的第63至第81序列的肽并向其添加匙孔血蓝蛋白（KLH）作为载体蛋白而获得的添加KLH的DCD肽用作抗原。结果，产生了识别人DCD的IgG类单克隆抗体。产生单克隆抗体的杂交瘤，以及使用该单克隆抗体检测DCD的方法。[选择图]无

配列番号	名称	ペプチド配列
2	DCD-1L	SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAV EDLESVKGAVHDVKDVLDSVL
3	SSL-46	SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAV EDLESVKGAVHDVKDVLDS
4	SSL-29	SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAV EDL
5	SSL-25	SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDA
6	LEK-45	LEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDL ESVKGAVHDVKDVLDSVL