

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02006/104085

発行日 平成20年9月4日(2008.9.4)

(43) 国際公開日 平成18年10月5日(2006.10.5)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|---------------------|-------------|
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 B | 4 B O 2 4 |
| C O 7 K 16/18 (2006.01) | C O 7 K 16/18 Z N A | 4 B O 6 4 |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A | 4 B O 6 5 |
| C 1 2 N 15/02 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 C | 4 H O 4 5 |
| G O 1 N 33/53 (2006.01) | G O 1 N 33/53 D | |

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 26 頁) 最終頁に続く

| | |
|---|---|
| 出願番号 特願2007-510479 (P2007-510479) | (71) 出願人 503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP2006/306121 | |
| (22) 国際出願日 平成18年3月27日(2006.3.27) | |
| (31) 優先権主張番号 特願2005-94920 (P2005-94920) | (71) 出願人 502351224 佐藤 昇志 北海道札幌市豊平区福住2条9丁目13-3 |
| (32) 優先日 平成17年3月29日(2005.3.29) | |
| (33) 優先権主張国 日本国(JP) | (74) 代理人 100110249 弁理士 下田 昭 |
| | (74) 代理人 100113022 弁理士 赤尾 謙一郎 |
| | (72) 発明者 佐藤 昇志 北海道札幌市豊平区福住2条9丁目13-3 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変性ヒトclass I白血球抗原に特異的なモノクローナル抗体

(57) 【要約】

【課題】 ホルマリン等で固定した標本のような変性ヒト組織を材料としてヒトclass I白血球抗原(HLA class I)を構成するHLA-A、HLA-B、HLA-Cの3種類の重鎖蛋白質の発現をすべて同時に検出可能なモノクローナル抗体を提供する。

【解決手段】 変性させたりコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質をマウスに免疫することによって、変性HLA-A、B、Cのすべてに優先的に結合するHLA class I特異抗体を樹立できることを見出した。本発明は、変性ヒトclass I白血球抗原のHLA-A、HLA-B及びHLA-Cの各重鎖と特異的に結合するモノクローナル抗体であり、ハイブリドーマ(FERM AP-20454)により産生され、変性ヒトclass I白血球抗原のHLA-A、HLA-B及びHLA-Cの各重鎖と特異的に結合するモノクローナル抗体である。更に本発明は、このモノクローナル抗体を主成分とする変性ヒトclass I白血球抗原の検査薬である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

変性ヒトclass I白血球抗原のHLA-A、HLA-B及びHLA-Cの各重鎖と特異的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 3】

前記ハイブリドーマが寄託細胞 (FERM AP - 20454) である請求項 2 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 4】

ハイブリドーマ (FERM AP - 20454) により産生され、変性ヒトclass I白血球抗原のHLA-A、HLA-B及びHLA-Cの各重鎖と特異的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項 5】

前記変性ヒトclass I白血球抗原が、アルデヒド処理、アルコール処理又はアセトン処理したヒト組織から得られた請求項 1 又は 4 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】

請求項 1 又は 4 に記載のモノクローナル抗体を検体に反応させることから成る変性ヒトclass I白血球抗原の検査方法。

【請求項 7】

前記検体がヒト由来の細胞若しくは組織を変性させた検体である請求項 6 に記載の検査方法。

【請求項 8】

前記変性の方法がアルデヒド処理、アルコール処理又はアセトン処理である請求項 7 に記載の検査方法。

【請求項 9】

前記検体を前記モノクローナル抗体と反応させ、これに標識を付したプローブを反応させ、この標識を検出することから成る請求項 6 に記載の検査方法。

【請求項 10】

請求項 1 又は 4 に記載のモノクローナル抗体を主成分とする変性ヒトclass I白血球抗原の検査薬。

【請求項 11】

請求項 2 または 3 に記載のハイブリドーマの免疫グロブリン遺伝子情報。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の遺伝子情報を用いて作られたリコンビナント蛋白質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、変性ヒトclass I白血球抗原(HLA-A、B、C)重鎖と特異的に結合するモノクローナル抗体に関し、更に、この抗体を用いた変性ヒトclass I白血球抗原の検査方法やこの抗体を含む変性ヒトclass I白血球抗原の検査薬に関する。

【背景技術】

【0002】

過去数十年にわたり、世界中で大部分の臨床組織検体は10%~20%ホルマリン固定液等によって保存されてきたが、ホルマリンのような固定液は組織中の蛋白質を高度に変性させるため、固定された標本中の蛋白質を特異抗体によって検出するためには変性蛋白質を認識できる抗体が必要である。

一方、ヒトclass I白血球抗原(HLA class I)は、免疫担当細胞に抗原分子を提示している重要な分子である。例えば、ウイルス感染細胞ではウイルス蛋白質の分解産物抗原ペプチドが、癌細胞では癌抗原蛋白質の分解産物抗原ペプチドが、それぞれHLA class I分子と結合し、細胞表面に表出している。免疫担当細胞のなかでT細胞は、細胞表面に持つ

10

20

30

40

50

T細胞抗原受容体によって標的細胞表面の抗原ペプチド・HLA複合体を認識し、正常細胞とウイルス感染細胞・癌細胞とを識別する。そのためHLA class I分子の発現が抑制された状態では、T細胞の標的細胞識別機構が正常に働かないため、ウイルス感染細胞や癌細胞が免疫系の監視機構から逃れることになる。このように、HLA class I抗原分子は免疫系において重要な役割を果たしている分子であり、ヒトの組織や細胞においてこの分子の発現を検査することは、各種ヒト疾患の免疫病態を知るうえで重要な情報となる。

しかし、従来使用されているヒトclass I白血球抗原(HLA class I)抗体(例えば、W6/32抗体)は、変性したHLA class I蛋白質を認識できないため、ホルマリン等で固定した組織中の抗原蛋白質を免疫染色法によって検出することはできなかった。

【0003】

一方、変性したHLA class I蛋白質と優先的に結合するモノクローナル抗体としては、クローン名HC10とHCA2の2種類のマウスモノクローナル抗体が報告されている(非特許文献1)。しかし、HC10は、HLA-B、HLA-Cの2種類の遺伝子由来のHLA class I重鎖蛋白質とは結合するが、HLA-A遺伝子由来の重鎖蛋白質とは結合しない。また、HCA2は、HLA-A遺伝子由来のHLA class I重鎖蛋白質とは結合するが、HLA-B、HLA-C遺伝子由来の重鎖蛋白質とは結合しない。

このようにホルマリン等で固定した標本のような変性ヒト組織を材料としてHLA class Iを構成するHLA-A、HLA-B、HLA-Cの3種類の重鎖蛋白質の発現をすべて同時に検出可能なモノクローナル抗体は、これまでに報告されていなかった。

【0004】

【非特許文献1】Stam NJ, et al. Int Immunol. 1990;2(2):113-25.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

ホルマリン等によって固定され保存されているヒト病理組織検体は、HLA class I分子だけでなくすべての組織蛋白質が変性しているため、モノクローナル抗体によって固定組織中の蛋白質を検出しようとする場合、変性蛋白質を認識することのできる抗体を用いる必要があるが、これまでHLA-A、B、Cのすべてを認識するモノクローナル抗体は存在せず、HLA-A、B、Cのすべてを認識するモノクローナル抗体が求められていた。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者等は、変性させたりコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質をマウスに免疫することによって、変性HLA-A、B、Cのすべてに優先的に結合するHLA class I特異抗体を樹立できることを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、変性ヒトclass I白血球抗原のHLA-A、HLA-B及びHLA-Cの各重鎖と特異的に結合するモノクローナル抗体である。

また本発明はこのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマである。

更に、本発明は、ハイブリドーマ(FERM AP-20454)により産生され、変性ヒトclass I白血球抗原のHLA-A、HLA-B及びHLA-Cの各重鎖と特異的に結合するモノクローナル抗体である。

また本発明は、このハイブリドーマの免疫グロブリン遺伝子情報であり、この遺伝子情報を用いて作られたりコンビナント蛋白質である。

また本発明は、このモノクローナル抗体をヒト由来の細胞若しくは組織を変性させた検体に反応させることから成る変性ヒトclass I白血球抗原の検査方法である。

更に本発明は、このモノクローナル抗体を主成分とする変性ヒトclass I白血球抗原の検査薬である。

【発明の効果】

【0007】

本発明のモノクローナル抗体により、ホルマリン等で固定したパラフィン包埋切片におけるHLA-A、B、C遺伝子由来重鎖蛋白質の免疫組織染色が可能となった。これにより、日

10

20

30

40

50

常臨床の場で手術摘出標本や生検標本として提出されるホルマリン等で固定した病理組織検体を用いたHLA class I抗原の検出を組織レベルで可能にするばかりでなく、過去に保存されたホルマリン固定パラフィン包埋標本に関しても、さかのぼってHLA class I抗原を検索することが可能になった。

また後述の実施例4で示すように、癌組織のHLA class I検査は癌の病理学的診断だけでなく患者の予後を予測する診断にも有用である。

また後述の実施例5で示すように、本抗体を用いた癌組織の免疫組織染色法はCTLに依存した免疫療法の適応決定診断法としても有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

ヒトclass I白血球抗原(HLA class I)は、主としてHLA-A、HLA-B、HLA-Cの3種類の遺伝子によってコードされる重鎖と、beta2-microglobulinという1種類の遺伝子によってコードされる軽鎖の2分子のヘテロ2量体から成り、重鎖遺伝子には遺伝子多型が存在する。例えば、日本人に最も頻度の高いHLA遺伝子はHLA-A*2402と命名された遺伝子(Genbank ACCESSION #M64740)であることが知られている。

【0009】

本発明の、変性したヒトclass I白血球抗原(HLA-A、B、C)重鎖と優先的に結合するマウスモノクローナル抗体は、クローン名EMR8のハイブリドーマ及びそのサブクローンが培養上清中に産生する抗体で、サブクラスIgG1、k鎖を有すマウスモノクローナル抗体である。この抗体をEMR8抗体と命名する。

ハイブリドーマEMR8は、平成17年3月9日に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に寄託され、受託番号FERM AP-20454が付与されたが、その後国際寄託に移管され、平成18年3月9日に同センターから受託番号FERM BP-10550が付与された。

変性手段としては、ホルマリン処理、パラホルムアルデヒド処理、グルタルアルデヒド処理等のアルデヒド処理、アセトン処理、アルコール処理、尿素処理、グアニジン塩酸処理、蟻酸処理、加熱処理等が挙げられ、好ましくはアルデヒド処理、アセトン処理又はアルコール処理が挙げられる。

【0010】

本発明の抗体は、ハイブリドーマEMR8とそのサブクローンの培養上清中に産生される。HLA class I抗原の検出には培養上清を使用してもよい。また、ハイブリドーマをマウスの腹腔内に移植し、EMR8抗体を含む腹水を使用してもよい。更に、ハイブリドーマEMR8細胞の免疫グロブリン遺伝子DNA又はRNAを抽出し、その可変領域遺伝子配列を含んだ遺伝子を組み替えて作成したりコンビナント蛋白質を使用してもよい。

本発明の抗体を使用して、ホルマリン等で固定したパラフィン包埋切片の組織中に発現している変性したヒトclass I白血球抗原(HLA-A、B、C)重鎖を免疫組織染色法やウエスタンブロッティング法によって検出することができる。したがって、本発明の抗体は、臨床検査試薬、組織染色試薬、HLA class I検出試薬として使用することができる。

例えば、ホルマリンやパラホルムアルデヒドなどの化学物質によって固定されたヒト癌組織やウイルス感染組織におけるHLA class I抗原蛋白質の発現検査や各種ヒト疾患の病理組織におけるHLA class I抗原蛋白質の発現レベル解析や細胞内局在部位の検出に応用される。

【0011】

本発明の抗体をHLA検出試薬として使用する場合、本発明の抗体はそれ自身で又は他の抗体と共に使用することができ、更に抗体を直接蛍光標識したり、酵素標識したりすることができる。

この抗原抗体反応を検知する方法に特に制限はないが、イムノプロット法、ドットプロット法、ELISA法等が挙げられ、ELISA法を用いることが好ましい。

検査方法の一例として、本発明の抗体を、検体中に存在するHLAと反応させ、更にこの抗体を認識するプローブを反応させる。このプローブとしては、抗ヒトIgG抗体、プロテ

10

20

30

40

50

インG、プロテインA、プロテインLなどが挙げられる。このプローブには通常標識を付す。この標識としては、放射性同位元素 (^{125}I)、酵素(ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ)、蛍光物質、発光物質等が挙げられる。酵素抗体を用いた場合には、基質を反応させてその変化(着色等)を観察すればよい。

以下、実施例にて本発明を例証するが本発明を限定することを意図するものではない。

【実施例1】

【0012】

大腸菌発現ベクターにHLA-A*2402重鎖蛋白質の細胞外ドメインをコードするcDNA(配列番号1)を挿入し、Histidineタグ融合リコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質を作成した。

このcDNA(配列番号1)はHLA-A2402 cDNA(Genbank ACCESSION #M64740)の73番から900番までの遺伝子の3'末端にBirA基質ペプチドとトロニン認識ペプチドとをそれぞれコードする遺伝子配列を結合した構造を有する。本遺伝子は、シグナル配列を含まないHLA-A2402重鎖蛋白質細胞外ドメインのC末端側にビオチン化部位とトロニン切断部位とが結合した融合蛋白質をコードする(Journal of Immunological Methods 271, 177-184, 2002)。

大腸菌を超音波によって破碎し、尿素HEPESバッファーに溶解。ニッケルNTAアガロースカラムにHisタグリコンビナント蛋白質を結合させた後、イミダゾール添加尿素HEPESバッファーで溶出させた。この溶液をPBSで一晩透析し、変性凝集したリコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質浮遊液を得た。

【0013】

この重鎖蛋白質浮遊液(約1mg相当のリコンビナント蛋白質)と完全フロイドアジュバントとをエマルジョンにし、BALB/c miceの皮下に免疫した。2回目以後は不完全フロイドアジュバントとのエマルジョンを1週間おきに全8回免疫した。最終免疫の5日後、マウスの脾臓を摘出し、脾細胞をマウスミエローマ細胞株NS-1と細胞融合させた。HAT選択培養液の中で約1ヶ月培養し、約100個のハイブリドーマコロニーを得た。これらの培養上清を回収し、1次スクリーニングを行った。

1次スクリーニングはELISA法によって、尿素変性リコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質に反応するハイブリドーマを選択した。具体的には、ELISAプレートに尿素変性リコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質を固相化し、ハイブリドーマ培養上清を添加。2時間後、洗浄した後に、ペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体を反応させ、洗浄した後にペルオキシダーゼ基質液で発色させた。得られた約15クローンの陽性ハイブリドーマについて、2次スクリーニングを行った。

【0014】

2次スクリーニングはホルマリン固定パラフィン包埋切片のヒト病理組織の免疫組織染色によって行った。HLA陽性のヒト癌組織薄切標本に15種類のハイブリドーマ培養上清をそれぞれ添加。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体を反応させ、洗浄した後にペルオキシダーゼ基質液で発色させた。陽性対照染色としては抗HLA-B、C抗体HC10を用いて染色。細胞膜がHC10と同様に染色されたものを陽性とした。その結果、1種類のハイブリドーマだけが陽性と判断された。

【0015】

3次スクリーニングはウエスタンブロッティングによって行った。HLA陽性のヒト癌細胞株OSC-20とHLA-A*2402遺伝子導入細胞株OSC-20A24、HLA class I陰性細胞株K562のそれぞれの細胞溶解液を作成。SDS電気泳動後、PVDF膜に転写した。この蛋白転写膜にハイブリドーマ培養上清を添加。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体を反応させ、洗浄した後にペルオキシダーゼ基質液ECLで発光させた。陽性対照抗体としては抗HLA-B、C抗体HC10を用いてイムノブロッティングを行った。陽性対照抗原としては、免疫原であるリコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質を泳動した。リコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質及びOSC-20細胞溶解液にHLA class I重鎖の特異的なバンドが検出されたも

10

20

30

40

50

のを陽性と判定した。

以上3段階のスクリーニングによって、ハイブリドーマEMR8(FERM AP-20454)を陽性として選択した。

【0016】

このハイブリドーマを限界希釈法によってクローニングし、20クローンのサブクローンを得た。サブクローン名にはEMR8-1、EMR8-2、～ EMR8-20のようにサブナンバーを付加した。これらサブクローンの培養上清については、上記の2次スクリーニングと3次スクリーニングを再検し、変性したHLA class Iの重鎖蛋白質を特異的に認識することを確認した。

さらに、種々の遺伝子多型のHLA-A、B、C遺伝子由来リコンビナント重鎖蛋白質を用いてウエスタンブロッティングを行い、EMR8サブクローンの反応特異性について解析した。その結果、陽性対照抗体HC10がHLA-B、C重鎖のみに反応するのに対し、EMR8サブクローンは検索したすべてのHLA-A、B、C重鎖と反応することが示された。EMR8抗体はサブクラスIgG1、k鎖を有すマウスモノクローナル抗体で、ホルマリン固定パラフィン包埋切片の病理組織の細胞膜に発現するHLA-A、B、Cを同時に検出することが可能であった。

なお用いた陽性対照抗体HC10は、Dr. Soldano Ferrone (Department of Immunology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York)から供与されたものを用いた。

【実施例2】

【0017】

本実施例では、実施例1で得た抗体を用いてホルマリン固定ヒト組織の免疫組織染色を行った。その手順を以下に示す。

(1) 20%ホルマリン固定液で固定されたヒト大腸癌組織のパラフィン包埋切片をエチルアルコールによって脱パラフィン処理した。

(2) 抗原賦活化処理として、切片を0.01 mol/Lクエン酸buffer (pH6.0)に浸して、マイクローエーブ処理(95℃、15分)した。

(3) 一次抗体としてハイブリドーマEMR8-5培養上清10倍希釈液を0.5 ml切片上に滴下し、室温で1時間インキュベーションした。

(4) 洗浄液PBS-T (0.05% Tween 20/PBS、pH 7.4)で3回洗浄した。

(5) 二次抗体ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(シンプルステインMAX-PO、NICHIREI)を切片上に滴下し、室温で30分間インキュベーションした。

(6) 洗浄液PBS-T (0.05% Tween 20/PBS、pH 7.4)で3回洗浄した。

(7) 切片を過酸化水素水とDAB基質の混合液(シンプルステインMAX-PO、NICHIREI)に浸し、1～2分間発色反応させた。

(8) 切片を流水で1分間洗浄した。

(9) Hematoxylin核染色(1～2分)を行った。

【0018】

図1に、ホルマリン固定された大腸癌組織標本パラフィン包埋切片の免疫染色例を示す。図(1)は腫瘍組織にHLA class Iが茶色に染色されているが、図(2)では腫瘍細胞にHLA class Iが陰性であり、腫瘍間質に浸潤しているリンパ球や血管内皮細胞が茶色に染色されている。すなわち、同じ大腸癌であってもHLA class I抗原陽性の癌と陰性の癌が存在し、実施例2に示したようなEMR8抗体を用いた免疫組織染色法によって、これら癌組織の判別が可能となることを実証している。

【実施例3】

【0019】

本実施例では、本発明の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。その手順を以下に示す。

(1) 1×10^6 の細胞を100 microLの細胞溶解液(RIPA buffer)に溶解し、可溶性分画をライゼートとして回収する。ライゼートにSDS sample bufferを加えた。

使用したリコンビナント蛋白質は、MBL医学生物学研究所から提供されたHLA重鎖リコンビナント蛋白質を用いた。但し、HLA-A2402*は、実施例1で得たHisタグ融合リコンビナ

10

20

30

40

50

ント蛋白質である。

(2) リコンビナント蛋白質の場合は6M UREA bufferに溶解した試料にSDS sample bufferを加えた。

(3) 蛋白試料を7.5% SDSポリアクリルアミドゲルにロードし、電気泳動した。

(4) ゲル中の蛋白質をPVDF膜に転写した。

(5) 転写膜を5%スキムミルク・PBSに浸し、約1時間ブロッキングした。

(6) 転写膜を一次抗体ハイブリードーマEMR8-5培養上清10倍希釈液に浸し、室温で1時間インキュベーションした。

(7) 転写膜を洗浄液PBS-T (0.05% Tween 20/PBS、pH 7.4)で3回洗浄した。

(8) 転写膜を二次抗体ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体に浸し、室温で1時間インキュベーションした。

(9) 転写膜を洗浄液PBS-T (0.05% Tween 20/PBS、pH 7.4)で3回洗浄した。

(10) 転写膜をECLキット(アマシャム社、USA)発光液に浸し、約1分間発色反応させた。

(11) 発光シグナルをX線フィルムで検出した。

【0020】

図2に、ウエスタンブロッティング法によるEMR8抗体と各種リコンビナントHLA class Iアリル蛋白質との反応性検査結果を示す。

EMR8抗体は図に示すすべてのHLA-A、HLA-B、HLA-Cアリル由来のリコンビナント蛋白質と反応するが、HC10抗体はHLA-Aアリル由来の蛋白質とは反応しない。すなわち、EMR8抗体はHC10抗体と異なり、HLA-A、B、Cの3つすべてのアリル由来HLA class I重鎖蛋白質をウエスタンブロッティングにおいて認識することを示している。

【0021】

図3に、ウエスタンブロッティング法によるEMR8抗体と各種ヒト腫瘍細胞株ライゼートとの反応例を示す。用いた細胞は、HLA-A24陰性のヒト口腔癌細胞株OSC20、OSC20細胞にHLA-A*2402遺伝子を導入して安定的にHLA-A24を発現させた細胞株OSC20-A2402、すべてのHLA class I遺伝子を発現していないヒト白血病細胞株K562の3種類の細胞である。

EMR8抗体は口腔癌細胞株OSC20とHLA-A*2402遺伝子を導入したOSC20-A2402細胞株の発現するHLA class I重鎖と反応する。HLA class I陰性の細胞株K562のライゼートとは反応しない。右レーンには陽性対照として免疫原であるリコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質に対する反応性を示す。すなわち、EMR8抗体はリコンビナントHLA class I重鎖蛋白質だけでなく、細胞内在性に発現しているHLA class I重鎖蛋白質をも、ウエスタンブロッティング法によって認識していることを示している。

【実施例4】

【0022】

過去に手術で摘出されたホルマリン固定腎癌組織標本45症例について、本発明のEMR8抗体を用いて実施例2と同様の方法で、免疫組織染色を行い、患者生存率との関係を調べた。

その結果、図4に示すように、64%の症例でHLA class I発現陽性であったが、他の36%の症例ではHLA class I発現の低下が認められ、陽性群と低下群との間で手術後の患者生存率を比較すると、HLA低下群の生存率は有意に低いことが判明した。

このように、癌組織のHLA class I検査は癌の病理学的診断だけでなく患者の予後を予測する診断にも有用である。

【実施例5】

【0023】

HLA class I分子によって提示される抗原ペプチドを用いた癌ワクチン療法や樹状細胞療法、遺伝子免疫療法など、癌細胞特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導を目指した免疫療法の開発が世界中で行われているが、その適応条件として標的癌細胞がHLA class I抗原を細胞表面に発現していることは重要である。しかしこれまで、本抗体のようなホルマリン固定標本を免疫染色可能な抗HLA-A、B、C反応性抗体がなかったため、患者の癌

組織にHLA class I抗原が陽性であるか陰性であるかチェックできないまま、免疫療法の試験が行われてきた。本発明者らは、癌抗原サバイピン由来の抗原ペプチドSurvivin2Bペプチド（特開2002-284797）を用いた癌ペプチドワクチン療法の臨床試験を2003年より行ってきた。

【0024】

大腸癌を対象とした臨床試験症例15例についてこの方法による臨床結果（腫瘍縮小もしくは増大抑制効果）と、本発明の抗体を用いたワクチン投与前の癌組織におけるHLA class I抗原免疫染色結果との相関を比較した。本発明の抗体を用いた試験においては、組織はホルマリン処理されたものを用い、試験方法は実施例2に記載と同様に行った。

その結果、臨床効果の認められた5例は全例でEMR8抗体によるHLA class I抗原免疫染色結果が強陽性であったのに対し、臨床効果の認められなかった10例中4例はHLA class I抗原の消失もしくは減弱が認められ、癌免疫療法の臨床効果とHLA class I抗原発現レベルとの間に相関関係が認められた。

すなわち、EMR8抗体を用いた癌組織の免疫組織染色によって癌細胞の細胞膜にHLA class I抗原が陽性に染色される症例は、CTL誘導性免疫療法の効果が期待できると考えられ、癌免疫療法適応の決定手段として有用性がある。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】ホルマリン固定された大腸癌組織標本パラフィン包埋切片の免疫染色例を示す図である。（1）は腫瘍組織にHLA class I陽性例、（2）はHLA class I陰性例である。

【図2】ウエスタンブロッティング法によるEMR8-5抗体と各種リコンビナントHLA class Iアリル蛋白質との反応性検査結果を示す図である。EMR8-5抗体は図に示す全てのHLA-A、HLA-B、HLA-Cアリル由来のリコンビナント蛋白質と反応するが、HC10抗体はHLA-Aアリル由来の蛋白質とは反応しない。

【図3】ウエスタンブロッティング法によるEMR8-5抗体と各種ヒト腫瘍細胞株ライゼートとの反応例を示す図である。EMR8-5は口腔癌細胞株OSC20とHLA-A2402遺伝子を導入したOSC20-A2402細胞株の発現するHLA class I重鎖と反応する。HLA class I陰性の細胞株K562のライゼートとは反応しない。右レーンには陽性対照として免疫原であるリコンビナントHLA-A2402重鎖蛋白質に対する反応性を示す。

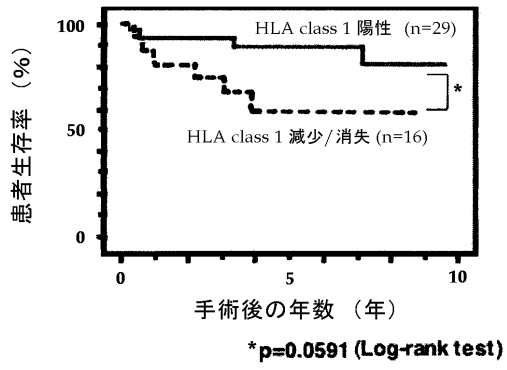
【図4】過去に手術で摘出されたホルマリン固定腎癌組織標本についての免疫組織染色結果と患者生存率の関係を示す図である。

10

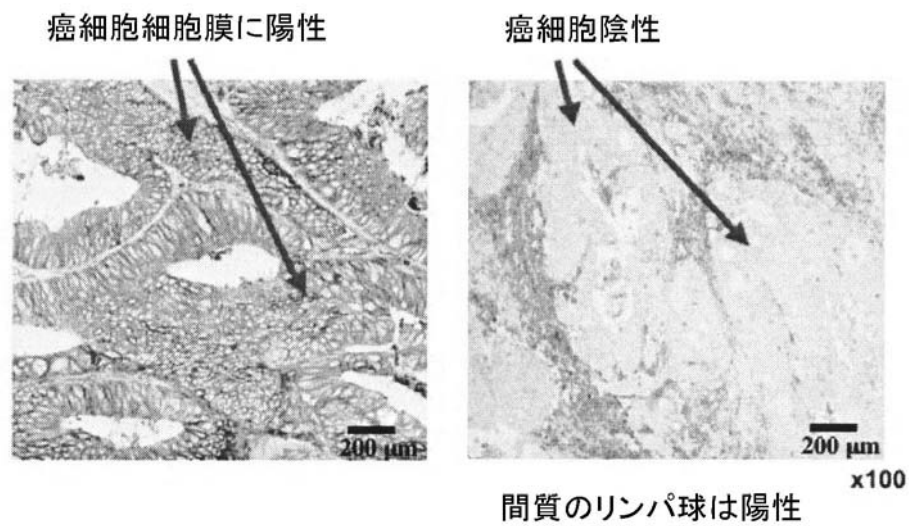
20

30

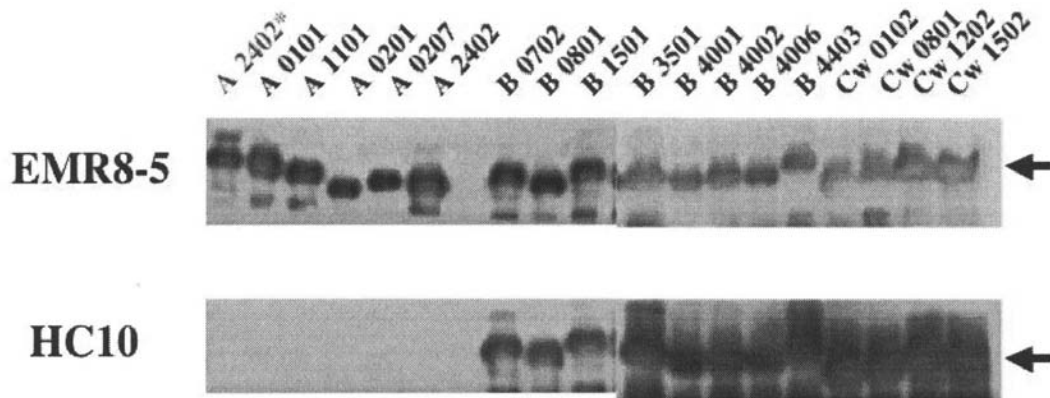
【 図 4 】



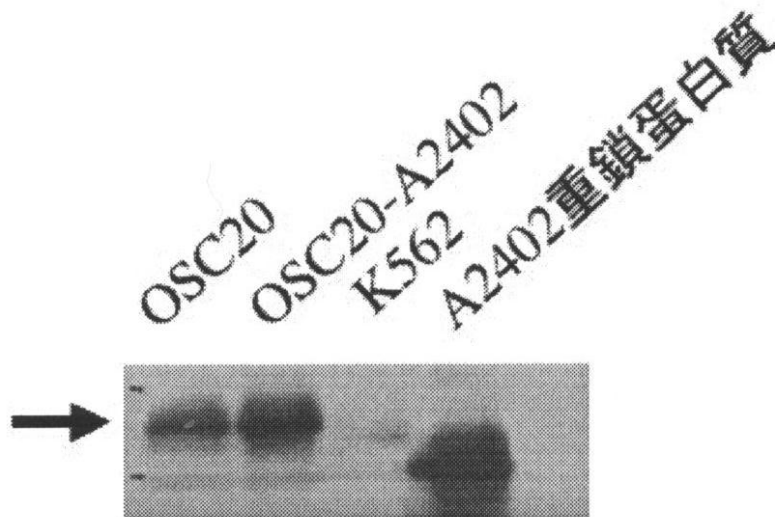
【 図 1 】



【図2】



【図3】



【配列表】

2006104085000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成18年6月28日(2006.6.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【書類名】請求の範囲

【請求項1】(削除)

【請求項2】(削除)

【請求項3】変性ヒトclass I白血球抗原のHLA-A、HLA-B及びHLA-Cの各重鎖と特異的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(FERM BP-10550)。

【請求項4】ハイブリドーマ(FERM BP-10550)により産生され、変性ヒトclass I白血球抗原のHLA-A、HLA-B及びHLA-Cの各重鎖と特異的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項5】前記変性ヒトclass I白血球抗原が、アルデヒド処理、アルコール処理又はアセトン処理したヒト組織から得られた請求項4に記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】請求項4に記載のモノクローナル抗体を検体に反応させることから成る変性ヒトclass I白血球抗原の検査方法。

【請求項 7】前記検体がヒト由来の細胞若しくは組織を変性させた検体である請求項 6 に記載の検査方法。

【請求項 8】前記変性の方法がアルデヒド処理、アルコール処理又はアセトン処理である請求項 7 に記載の検査方法。

【請求項 9】前記検体を前記モノクローナル抗体と反応させ、これに標識を付したプローブを反応させ、この標識を検出することから成る請求項 6 に記載の検査方法。

【請求項 10】請求項 4 に記載のモノクローナル抗体を主成分とする変性ヒト c l a s s I 白血球抗原の検査薬。

【手続補正書】

【提出日】平成 18 年 7 月 21 日 (2006.7.21)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0002

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0002】

特許文献 1)。しかし、HC10 は、HLA - B、HLA - C の 2 種類の遺伝子由来の HLA c l a s s I 重鎖蛋白質とは結合するが、HLA - A 遺伝子由来の重鎖蛋白質とは結合しない。また、HCA2 は、HLA - A 遺伝子由来の HLA c l a s s I 重鎖蛋白質とは結合するが、HLA - B、HLA - C 遺伝子由来の重鎖蛋白質とは結合しない。

このようにホルマリン等で固定した標本のような変性ヒト組織を材料として HLA c l a s s I を構成する HLA - A、HLA - B、HLA - C の 3 種類の重鎖蛋白質の発現をすべて同時に検出可能なモノクローナル抗体は、これまでに報告されていなかった。

[0004] 【非特許文献 1】Stam N J, et al. Int Immunol. 1990; 2 (2): 113 - 25.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

[0005] ホルマリン等によって固定され保存されているヒト病理組織検体は、HLA c l a s s I 分子だけでなくすべての組織蛋白質が変性しているため、モノクローナル抗体によって固定組織中の蛋白質を検出しようとする場合、変性蛋白質を認識することのできる抗体を用いる必要があるが、これまで HLA - A、B、C のすべてを認識するモノクローナル抗体は存在せず、HLA - A、B、C のすべてを認識するモノクローナル抗体が求められていた。

【課題を解決するための手段】

[0006] 本発明者等は、変性させたりコンビナント HLA - A * 2402 重鎖蛋白質をマウスに免疫することによって、変性 HLA - A、B、C のすべてに優先的に結合する HLA c l a s s I 特異抗体を樹立できることを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、変性ヒト c l a s s I 白血球抗原の HLA - A、HLA - B 及び HLA - C の各重鎖と特異的に結合するモノクローナル抗体である。

また本発明はこのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマである。

更に、本発明は、ハイブリドーマ (FERM BP - 10550) により産生され、変性ヒト c l a s s I 白血球抗原の HLA - A、HLA - B 及び HLA - C の各重鎖と特異的に結合するモノクローナル抗体である。

また本発明は、このハイブリドーマの免疫グロブリン遺伝子情報であり、この遺伝子情報を用いて作られたリコンビナント蛋白質である。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0006】

加。2時間後、洗浄した後に、ペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体を反応させ、洗浄した後にペルオキシダーゼ基質液で発色させた。得られた約15クローンの陽性ハイブリドーマについて、2次スクリーニングを行った。

[0014] 2次スクリーニングはホルマリン固定パラフィン包埋切片のヒト病理組織の免疫組織染色によって行った。HLA陽性のヒト癌組織薄切標本に15種類のハイブリドーマ培養上清をそれぞれ添加。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体を反応させ、洗浄した後にペルオキシダーゼ基質液で発色させた。陽性対照染色としては抗HLA-B、C抗体HC10を用いて染色。細胞膜がHC10と同様に染色されたものを陽性とした。その結果、1種類のハイブリドーマだけが陽性と判断された。

[0015] 3次スクリーニングはウエスタンブロッティングによって行った。HLA陽性のヒト癌細胞株OSC-20とHLA-A*2402遺伝子導入細胞株OSC-20A24、HLA class I陰性細胞株K562のそれぞれの細胞溶解液を作成。SDS電気泳動後、PVDF膜に転写した。この蛋白転写膜にハイブリドーマ培養上清を添加。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体を反応させ、洗浄した後にペルオキシダーゼ基質液ECLで発光させた。陽性対照抗体としては抗HLA-B、C抗体HC10を用いてイムノブロッティングを行った。陽性対照抗原としては、免疫原であるリコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質を泳動した。リコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質及びOSC-20細胞溶解液にHLA class I重鎖の特異的なバンドが検出されたものを陽性と判定した。

以上3段階のスクリーニングによって、ハイブリドーマEMR8を陽性として選択した。

[0016] このハイブリドーマを限界希釈法によってクローニングし、20クローンのサブクローンを得た。サブクローン名にはEMR8-1、EMR8-2、～EMR8-20のようにサブナンバーを付加した。これらサブクローンの培養上清については、上記の2次スクリーニングと3次スクリーニングを再検し、変性したHLA class Iの重鎖蛋白質を特異的に認識することを確認した。

さらに、種々の遺伝子多型のHLA-A、B、C遺伝子由来リコンビナント重鎖蛋白質を用いてウエスタンブロッティングを行い、EMR8サブクローンの反応特異性について解析した。その結果、陽性対照抗体HC10がHLA-B、C重鎖のみに反応するのに対し、

6

【手続補正書】

【提出日】平成19年9月3日(2007.9.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

変性ヒトclass I白血球抗原のHLA-A、HLA-B及びHLA-Cの各重鎖と特異的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(FERM BP-10550)。

【請求項2】

ハイブリドーマ (FERM BP - 10550) により産生され、変性ヒトclass I白血球抗原のHLA-A、HLA-B及びHLA-Cの各重鎖と特異的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項3】

前記変性ヒトclass I白血球抗原が、アルデヒド処理、アルコール処理又はアセトン処理したヒト組織から得られた請求項2に記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】

請求項2に記載のモノクローナル抗体を検体に反応させることから成る変性ヒトclass I白血球抗原の検査方法。

【請求項5】

前記検体がヒト由来の細胞若しくは組織を変性させた検体である請求項4に記載の検査方法。

【請求項6】

前記変性の方法がアルデヒド処理、アルコール処理又はアセトン処理である請求項4又は5に記載の検査方法。

【請求項7】

前記検体を前記モノクローナル抗体と反応させ、これに標識を付したプローブを反応させ、この標識を検出することから成る請求項4～6のいずれか一項に記載の検査方法。

【請求項8】

請求項2に記載のモノクローナル抗体を主成分とする変性ヒトclass I白血球抗原の検査薬。

【手続補正2】

【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

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、変性ヒトclass I白血球抗原(HLA-A、B、C)重鎖と特異的に結合するモノクローナル抗体に関し、更に、この抗体を用いた変性ヒトclass I白血球抗原の検査方法やこの抗体を含む変性ヒトclass I白血球抗原の検査薬に関する。

【背景技術】

【0002】

過去数十年にわたり、世界中で大部分の臨床組織検体は10%～20%ホルマリン固定液等によって保存されてきたが、ホルマリンのような固定液は組織中の蛋白質を高度に変性させるため、固定された標本中の蛋白質を特異抗体によって検出するためには変性蛋白質を認識できる抗体が必要である。

一方、ヒトclass I白血球抗原(HLA class I)は、免疫担当細胞に抗原分子を提示している重要な分子である。例えば、ウイルス感染細胞ではウイルス蛋白質の分解産物抗原ペプチドが、癌細胞では癌抗原蛋白質の分解産物抗原ペプチドが、それぞれHLA class I分子と結合し、細胞表面に表出している。免疫担当細胞のなかでT細胞は、細胞表面に持つT細胞抗原受容体によって標的細胞表面の抗原ペプチド・HLA複合体を認識し、正常細胞とウイルス感染細胞・癌細胞とを識別する。そのためHLA class I分子の発現が抑制された状態では、T細胞の標的細胞識別機構が正常に働かないため、ウイルス感染細胞や癌細胞が免疫系の監視機構から逃れることになる。このように、HLA class I抗原分子は免疫系において重要な役割を果たしている分子であり、ヒトの組織や細胞においてこの分子の発現を検査することは、各種ヒト疾患の免疫病態を知るうえで重要な情報となる。

しかし、従来使用されているヒトclass I白血球抗原(HLA class I)抗体(例えば、W6/32抗体)は、変性したHLA class I蛋白質を認識できないため、ホルマリン等で固定した組織中の抗原蛋白質を免疫染色法によって検出することはできなかった。

【 0 0 0 3 】

一方、変性したHLA class I蛋白質と優先的に結合するモノクローナル抗体としては、クローン名HC10とHCA2の2種類のマウスモノクローナル抗体が報告されている（非特許文献1）。しかし、HC10は、HLA-B、HLA-Cの2種類の遺伝子由来のHLA class I重鎖蛋白質とは結合するが、HLA-A遺伝子由来の重鎖蛋白質とは結合しない。また、HCA2は、HLA-A遺伝子由来のHLA class I重鎖蛋白質とは結合するが、HLA-B、HLA-C遺伝子由来の重鎖蛋白質とは結合しない。

このようにホルマリン等で固定した標本のような変性ヒト組織を材料としてHLA class Iを構成するHLA-A、HLA-B、HLA-Cの3種類の重鎖蛋白質の発現をすべて同時に検出可能なモノクローナル抗体は、これまでに報告されていなかった。

【 0 0 0 4 】

【非特許文献1】Stam NJ, et al. Int Immunol. 1990;2(2):113-25.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 5 】

ホルマリン等によって固定され保存されているヒト病理組織検体は、HLA class I分子だけでなくすべての組織蛋白質が変性しているため、モノクローナル抗体によって固定組織中の蛋白質を検出しようとする場合、変性蛋白質を認識することのできる抗体を用いる必要があるが、これまでHLA-A、B、Cのすべてを認識するモノクローナル抗体は存在せず、HLA-A、B、Cのすべてを認識するモノクローナル抗体が求められていた。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

本発明者等は、変性させたりコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質をマウスに免疫することによって、変性HLA-A、B、Cのすべてに優先的に結合するHLA class I特異抗体を樹立できることを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、ハイブリドーマ（FERM BP - 10550）により産生され、変性ヒトclass I白血球抗原のHLA-A、HLA-B及びHLA-Cの各重鎖と特異的に結合するモノクローナル抗体である。

また本発明は、変性ヒトclass I白血球抗原のHLA-A、HLA-B及びHLA-Cの各重鎖と特異的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（FERM BP - 10550）である。

また本発明は、このモノクローナル抗体をヒト由来の細胞若しくは組織を変性させた検体に反応させることから成る変性ヒトclass I白血球抗原の検査方法である。

更に本発明は、このモノクローナル抗体を主成分とする変性ヒトclass I白血球抗原の検査薬である。

【発明の効果】

【 0 0 0 7 】

本発明のモノクローナル抗体により、ホルマリン等で固定したパラフィン包埋切片におけるHLA-A、B、C遺伝子由来重鎖蛋白質の免疫組織染色が可能となった。これにより、日常臨床の場で手術摘出標本や生検標本として提出されるホルマリン等で固定した病理組織検体を用いたHLA class I抗原の検出を組織レベルで可能にするばかりでなく、過去に保存されたホルマリン固定パラフィン包埋標本に関しても、さかのぼってHLA class I抗原を検索することが可能になった。

また後述の実施例4で示すように、癌組織のHLA class I検査は癌の病理学的診断だけでなく患者の予後を予測する診断にも有用である。

また後述の実施例5で示すように、本抗体を用いた癌組織の免疫組織染色法はCTLに依存した免疫療法の適応決定診断法としても有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 0 8 】

ヒトclass I白血球抗原（HLA class I）は、主としてHLA-A、HLA-B、HLA-Cの3種類の遺

伝子によってコードされる重鎖と、beta2-microglobulinという1種類の遺伝子によってコードされる軽鎖の2分子のヘテロ2量体から成り、重鎖遺伝子には遺伝子多型が存在する。例えば、日本人に最も頻度の高いHLA遺伝子はHLA-A*2402と命名された遺伝子(Genbank ACCESSION #M64740)であることが知られている。

【0009】

本発明の、変性したヒトclass I白血球抗原(HLA-A、B、C)重鎖と優先的に結合するマウスモノクローナル抗体は、クローン名EMR8のハイブリドーマ及びそのサブクローンが培養上清中に産生する抗体で、サブクラスIgG1、k鎖を有すマウスモノクローナル抗体である。この抗体をEMR8抗体と命名する。

ハイブリドーマEMR8は、平成17年3月9日に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に寄託され、受託番号FERM AP-20454が付与されたが、その後国際寄託に移管され、平成18年3月9日に同センターから受託番号FERM BP-10550が付与された。

変性手段としては、ホルマリン処理、パラホルムアルデヒド処理、グルタルアルデヒド処理等のアルデヒド処理、アセトン処理、アルコール処理、尿素処理、グアニジン塩酸処理、蟻酸処理、加熱処理等が挙げられ、好ましくはアルデヒド処理、アセトン処理又はアルコール処理が挙げられる。

【0010】

本発明の抗体は、ハイブリドーマEMR8とそのサブクロンの培養上清中に産生される。HLA class I抗原の検出には培養上清を使用してもよい。また、ハイブリドーマをマウスの腹腔内に移植し、EMR8抗体を含む腹水を使用してもよい。更に、ハイブリドーマEMR8細胞の免疫グロブリン遺伝子DNA又はRNAを抽出し、その可変領域遺伝子配列を含んだ遺伝子を組み替えて作成したリコンビナント蛋白質を使用してもよい。

本発明の抗体を使用して、ホルマリン等で固定したパラフィン包埋切片の組織中に発現している変性したヒトclass I白血球抗原(HLA-A、B、C)重鎖を免疫組織染色法やウエスタンブロッティング法によって検出することができる。したがって、本発明の抗体は、臨床検査試薬、組織染色試薬、HLA class I検出試薬として使用することができる。

例えば、ホルマリンやパラホルムアルデヒドなどの化学物質によって固定されたヒト癌組織やウイルス感染組織におけるHLA class I抗原蛋白質の発現検査や各種ヒト疾患の病理組織におけるHLA class I抗原蛋白質の発現レベル解析や細胞内局在部位の検出に応用される。

【0011】

本発明の抗体をHLA検出試薬として使用する場合、本発明の抗体はそれ自身で又は他の抗体と共に使用することができ、更に抗体を直接蛍光標識したり、酵素標識したりすることができる。

この抗原抗体反応を検知する方法に特に制限はないが、イムノプロット法、ドットプロット法、ELISA法等が挙げられ、ELISA法を用いることが好ましい。

検査方法の一例として、本発明の抗体を、検体中に存在するHLAと反応させ、更にこの抗体を認識するプローブを反応させる。このプローブとしては、抗ヒトIgG抗体、プロテインG、プロテインA、プロテインLなどが挙げられる。このプローブには通常標識を付す。この標識としては、放射性同位元素(^{125}I)、酵素(ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ)、蛍光物質、発光物質等が挙げられる。酵素抗体を用いた場合には、基質を反応させてその変化(着色等)を観察すればよい。

以下、実施例にて本発明を例証するが本発明を限定することを意図するものではない。

【実施例1】

【0012】

大腸菌発現ベクターにHLA-A*2402重鎖蛋白質の細胞外ドメインをコードするcDNA(配列番号1)を挿入し、Histidineタグ融合リコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質を作成した。

このcDNA(配列番号1)はHLA-A2402 cDNA(Genbank ACCESSION #M64740)の73番から900番までの遺伝子の3'末端にBirA基質ペプチドとトロニン認識ペプチドとをそれぞれコードする遺伝子配列を結合した構造を有する。本遺伝子は、シグナル配列を含まないHLA-A2402重鎖蛋白質細胞外ドメインのC末端側にビオチン化部位とトロニン切断部位とが結合した融合蛋白質をコードする(Journal of Immunological Methods 271, 177-184, 2002)。

大腸菌を超音波によって破碎し、尿素HEPESバッファーに溶解。ニッケルNTAアガロースカラムにHisタグリコンビナント蛋白質を結合させた後、イミダゾール添加尿素HEPESバッファーで溶出させた。この溶液をPBSで一晩透析し、変性凝集したリコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質浮遊液を得た。

【0013】

この重鎖蛋白質浮遊液(約1 mg相当のリコンビナント蛋白質)と完全フロイドアジュバントとをエマルジョンにし、BALB/c miceの皮下に免疫した。2回目以後は不完全フロイドアジュバントとのエマルジョンを1週間おきに全8回免疫した。最終免疫の5日後、マウスの脾臓を摘出し、脾細胞をマウスミエローマ細胞株NS-1と細胞融合させた。HAT選択培養液の中で約1ヶ月培養し、約100個のハイブリドーマコロニーを得た。これらの培養上清を回収し、1次スクリーニングを行った。

1次スクリーニングはELISA法によって、尿素変性リコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質に反応するハイブリドーマを選択した。具体的には、ELISAプレートに尿素変性リコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質を固相化し、ハイブリドーマ培養上清を添加。2時間後、洗浄した後に、ペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体を反応させ、洗浄した後にペルオキシダーゼ基質液で発色させた。得られた約15クローンの陽性ハイブリドーマについて、2次スクリーニングを行った。

【0014】

2次スクリーニングはホルマリン固定パラフィン包埋切片のヒト病理組織の免疫組織染色によって行った。HLA陽性のヒト癌組織薄切標本に15種類のハイブリドーマ培養上清をそれぞれ添加。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体を反応させ、洗浄した後にペルオキシダーゼ基質液で発色させた。陽性対照染色としては抗HLA-B、C抗体HC10を用いて染色。細胞膜がHC10と同様に染色されたものを陽性とした。その結果、1種類のハイブリドーマだけが陽性と判断された。

【0015】

3次スクリーニングはウエスタンブロッティングによって行った。HLA陽性のヒト癌細胞株OSC-20とHLA-A*2402遺伝子導入細胞株OSC-20A24、HLA class I陰性細胞株K562のそれぞれの細胞溶解液を作成。SDS電気泳動後、PVDF膜に転写した。この蛋白転写膜にハイブリドーマ培養上清を添加。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体を反応させ、洗浄した後にペルオキシダーゼ基質液ECLで発光させた。陽性対照抗体としては抗HLA-B、C抗体HC10を用いてイムノブロッティングを行った。陽性対照抗原としては、免疫原であるリコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質を泳動した。リコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質及びOSC-20細胞溶解液にHLA class I重鎖の特異的なバンドが検出されたものを陽性と判定した。

以上3段階のスクリーニングによって、ハイブリドーマEMR8を陽性として選択した。

【0016】

このハイブリドーマを限界希釈法によってクローニングし、20クローンのサブクローンを得た。サブクローン名にはEMR8-1、EMR8-2、～ EMR8-20のようにサブナンバーを付加した。これらサブクローンの培養上清については、上記の2次スクリーニングと3次スクリーニングを再検し、変性したHLA class Iの重鎖蛋白質を特異的に認識することを確認した。

さらに、種々の遺伝子多型のHLA-A、B、C遺伝子由来リコンビナント重鎖蛋白質を用いてウエスタンブロッティングを行い、EMR8サブクローンの反応特異性について解析した。その結果、陽性対照抗体HC10がHLA-B、C重鎖のみに反応するのに対し、EMR8サブクローン

は検索したすべてのHLA-A、B、C重鎖と反応することが示された。EMR8抗体はサブクラスIgG1、k鎖を有すマウスモノクローナル抗体で、ホルマリン固定パラフィン包埋切片の病理組織の細胞膜に発現するHLA-A、B、Cを同時に検出することが可能であった。

なお用いた陽性対照抗体HC10は、Dr. Soldano Ferrone (Department of Immunology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York)から供与されたものを用いた。

【実施例2】

【0017】

本実施例では、実施例1で得た抗体を用いてホルマリン固定ヒト組織の免疫組織染色を行った。その手順を以下に示す。

(1) 20%ホルマリン固定液で固定されたヒト大腸癌組織のパラフィン包埋切片をエチルアルコールによって脱パラフィン処理した。

(2) 抗原賦活化処理として、切片を0.01 mol/Lクエン酸buffer (pH6.0)に浸して、マイクドウエーブ処理(95、15分)した。

(3) 一次抗体としてハイブリドーマEMR8-5培養上清10倍希釈液を0.5 ml切片上に滴下し、室温で1時間インキュベーションした。

(4) 洗浄液PBS-T (0.05% Tween 20/PBS、pH 7.4)で3回洗浄した。

(5) 二次抗体ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(シンプルステインMAX-PO、NICHIREI)を切片上に滴下し、室温で30分間インキュベーションした。

(6) 洗浄液PBS-T (0.05% Tween 20/PBS、pH 7.4)で3回洗浄した。

(7) 切片を過酸化水素水とDAB基質の混合液(シンプルステインMAX-PO、NICHIREI)に浸し、1~2分間発色反応させた。

(8) 切片を流水で1分間洗浄した。

(9) Hematoxylin核染色(1~2分)を行った。

【0018】

図1に、ホルマリン固定された大腸癌組織標本パラフィン包埋切片の免疫染色例を示す。図(1)は腫瘍組織にHLA class Iが茶色に染色されているが、図(2)では腫瘍細胞にHLA class Iが陰性であり、腫瘍間質に浸潤しているリンパ球や血管内皮細胞が茶色に染色されている。すなわち、同じ大腸癌であってもHLA class I抗原陽性の癌と陰性の癌が存在し、実施例2に示したようなEMR8抗体を用いた免疫組織染色法によって、これら癌組織の判別が可能となることを実証している。

【実施例3】

【0019】

本実施例では、本発明の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。その手順を以下に示す。

(1) 1×10^6 の細胞を100 microLの細胞溶解液(RIPA buffer)に溶解し、可溶性分画をライゼートとして回収する。ライゼートにSDS sample bufferを加えた。

使用したリコンビナント蛋白質は、MBL医学生物学研究所から提供されたHLA重鎖リコンビナント蛋白質を用いた。但し、HLA-A2402*は、実施例1で得たHisタグ融合リコンビナント蛋白質である。

(2) リコンビナント蛋白質の場合は6M UREA bufferに溶解した試料にSDS sample bufferを加えた。

(3) 蛋白試料を7.5% SDSポリアクリルアミドゲルにロードし、電気泳動した。

(4) ゲル中の蛋白質をPVDF膜に転写した。

(5) 転写膜を5%スキムミルク・PBSに浸し、約1時間ブロッキングした。

(6) 転写膜を一次抗体ハイブリドーマEMR8-5培養上清10倍希釈液に浸し、室温で1時間インキュベーションした。

(7) 転写膜を洗浄液PBS-T (0.05% Tween 20/PBS、pH 7.4)で3回洗浄した。

(8) 転写膜を二次抗体ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体に浸し、室温で1時間インキュベーションした。

(9) 転写膜を洗浄液PBS-T (0.05% Tween 20/PBS、pH 7.4)で3回洗浄した。

(10) 転写膜をECLキット(アマシャム社、USA)発光液に浸し、約1分間発色反応させた。

(11) 発光シグナルをX線フィルムで検出した。

【0020】

図2に、ウエスタンブロッティング法によるEMR8抗体と各種リコンビナントHLA class Iアリル蛋白質との反応性検査結果を示す。

EMR8抗体は図に示すすべてのHLA-A、HLA-B、HLA-Cアリル由来のリコンビナント蛋白質と反応するが、HC10抗体はHLA-Aアリル由来の蛋白質とは反応しない。すなわち、EMR8抗体はHC10抗体と異なり、HLA-A、B、Cの3つすべてのアリル由来HLA class I重鎖蛋白質をウエスタンブロッティングにおいて認識することを示している。

【0021】

図3に、ウエスタンブロッティング法によるEMR8抗体と各種ヒト腫瘍細胞株ライゼートとの反応例を示す。用いた細胞は、HLA-A24陰性のヒト口腔癌細胞株OSC20、OSC20細胞にHLA-A*2402遺伝子を導入して安定的にHLA-A24を発現させた細胞株OSC20-A2402、すべてのHLA class I遺伝子を発現していないヒト白血病細胞株K562の3種類の細胞である。

EMR8抗体は口腔癌細胞株OSC20とHLA-A*2402遺伝子を導入したOSC20-A2402細胞株の発現するHLA class I重鎖と反応する。HLA class I陰性の細胞株K562のライゼートとは反応しない。右レーンには陽性対照として免疫原であるリコンビナントHLA-A*2402重鎖蛋白質に対する反応性を示す。すなわち、EMR8抗体はリコンビナントHLA class I重鎖蛋白質だけでなく、細胞内在性に発現しているHLA class I重鎖蛋白質をも、ウエスタンブロッティング法によって認識していることを示している。

【実施例4】

【0022】

過去に手術で摘出されたホルマリン固定腎癌組織標本45症例について、本発明のEMR8抗体を用いて実施例2と同様の方法で、免疫組織染色を行い、患者生存率との関係を調べた。

その結果、図4に示すように、64%の症例でHLA class I発現陽性であったが、他の36%の症例ではHLA class I発現の低下が認められ、陽性群と低下群との間で手術後の患者生存率を比較すると、HLA低下群の生存率は有意に低いことが判明した。

このように、癌組織のHLA class I検査は癌の病理学的診断だけでなく患者の予後を予測する診断にも有用である。

【実施例5】

【0023】

HLA class I分子によって提示される抗原ペプチドを用いた癌ワクチン療法や樹状細胞療法、遺伝子免疫療法など、癌細胞特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導を目指した免疫療法の開発が世界中で行われているが、その適応条件として標的癌細胞がHLA class I抗原を細胞表面に発現していることは重要である。しかしこれまで、本抗体のようなホルマリン固定標本を免疫染色可能な抗HLA-A、B、C反応性抗体がなかったため、患者の癌組織にHLA class I抗原が陽性であるか陰性であるかチェックできないまま、免疫療法の試験が行われてきた。本発明者らは、癌抗原サバイピン由来の抗原ペプチドSurvivin2Bペプチド(特開2002-284797)を用いた癌ペプチドワクチン療法の臨床試験を2003年より行ってきた。

【0024】

大腸癌を対象とした臨床試験症例15例についてこの方法による臨床結果(腫瘍縮小もしくは増大抑制効果)と、本発明の抗体を用いたワクチン投与前の癌組織におけるHLA class I抗原免疫染色結果との相関を比較した。本発明の抗体を用いた試験においては、組織はホルマリン処理されたものを用い、試験方法は実施例2に記載と同様に行った。

その結果、臨床効果の認められた5例は全例でEMR8抗体によるHLA class I抗原免疫染色結果が強陽性であったのに対し、臨床効果の認められなかった10例中4例はHLA class I抗原の消失もしくは減弱が認められ、癌免疫療法の臨床効果とHLA class I抗原発現レ

ベルとの間に相関関係が認められた。

すなわち、EMR8抗体を用いた癌組織の免疫組織染色によって癌細胞の細胞膜にHLA class I抗原が陽性に染色される症例は、CTL誘導性免疫療法の効果が期待できると考えられ、癌免疫療法適応の決定手段として有用性がある。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】ホルマリン固定された大腸癌組織標本パラフィン包埋切片の免疫染色例を示す図である。(1)は腫瘍組織にHLA class I陽性例、(2)はHLA class I陰性例である。

【図2】ウエスタンブロッティング法によるEMR8-5抗体と各種リコンビナントHLA class Iアリル蛋白質との反応性検査結果を示す図である。EMR8-5抗体は図に示す全てのHLA-A、HLA-B、HLA-Cアリル由来のリコンビナント蛋白質と反応するが、HC10抗体はHLA-Aアリル由来の蛋白質とは反応しない。

【図3】ウエスタンブロッティング法によるEMR8-5抗体と各種ヒト腫瘍細胞株ライゼートとの反応例を示す図である。EMR8-5は口腔癌細胞株OSC20とHLA-A2402遺伝子を導入したOSC20-A2402細胞株の発現するHLA class I重鎖と反応する。HLA class I陰性の細胞株K562のライゼートとは反応しない。右レーンには陽性対照として免疫原であるリコンビナントHLA-A2402重鎖蛋白質に対する反応性を示す。

【図4】過去に手術で摘出されたホルマリン固定腎癌組織標本についての免疫組織染色結果と患者生存率の関係を示す図である。

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/JP2006/306121 |
|--|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/18(2006.01), G01N33/577(2006.01), G01N33/58(2006.01), C12N15/00(2006.01), C07K19/00(2006.01) | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K16/18, G01N33/577, G01N33/58, C12N15/00, C07K19/00 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/Geneseq, MEDLINE (STN), JSTPlus (JDream2) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | Toshihiko TORIGOE et al., "Men'eki Soshiki Senshoku ni yoru Seijo Soshiki to Gansoshiki ni okeru MHC class I Kogen no Hatsugen Kaiseki", Nippon Byori Gakkai Kaishi, 18 March, 2005 (18.03.05), Vol.94, No.1, page 223, 3-F-5; full text | 1-10,12 |
| A | STAM N.J. et al., 'HLA-A- and HLA-B-specific monoclonal antibodies reactive with free heavy chains in western blots, in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections and in cryo-immuno-electron microscopy' Int.Immunol., (1990), Vol.2, pages 113 to 125 | 1-10,12 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 02 May, 2006 (02.05.06) | | Date of mailing of the international search report 16 May, 2006 (16.05.06) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | | Authorized officer |
| Facsimile No. | | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306121

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | GIELEN V. et al., 'Reactivity of anti-HLA class I polymorphic monoclonal antibodies with normal human skin.' Hybridoma, (1987), Vol.6, pages 545 to 554 | 1-10,12 |
| A | BRODSKY F.M. et al., 'Characterization of a monoclonal anti-beta 2-microglobulin antibody and its use in the genetic and biochemical analysis of major histocompatibility antigens.' Eur.J.Immunol., (1979), Vol.9, pages 536 to 545 | 1-10,12 |
| A | BARNSTABLE C.J., 'Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis.' Cell, (1978), Vol.14, pages 9 to 20 | 1-10,12 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306121

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The "immunoglobulin gene information of hybridoma described in claim 2 or 3" described in the invention according to claim 11 is a mere presentation of information.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 0 6 1 2 1 | |
|--|--|--|----------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/18 (2006.01), G01N33/577 (2006.01), G01N33/58 (2006.01), C12N15/00 (2006.01), C07K19/00 (2006.01) | | | |
| B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/18, G01N33/577, G01N33/58, C12N15/00, C07K19/00 | | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの | | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/Geneseq, MEDLINE (STN), JSTPlus (JDream2) | | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 | |
| X | 鳥越俊彦, 他 12 名, 「免疫組織染色による正常組織と癌組織における MHC class I 抗原の発現解析」, 日本病理学会会誌, (2005. 03. 18) 第 94 巻, 第 1 号, p. 223、3-F-5 全文 | 1-10, 12 | |
| A | STAM N.J. et al., 'HLA-A- and HLA-B-specific monoclonal antibodies reactive with free heavy chains in western blots, in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections and in cryo-immuno-electron microscopy' Int. Immunol. (1990) vol. 2, pp. 113-125 | 1-10, 12 | |
| A | GIELEN V. et al., 'Reactivity of anti-HLA class I polymorphic monoclonal antibodies with normal human skin.' Hybridoma (1987) vol. 6, pp. 545-554 | 1-10, 12 | |
| ☞ C欄の続きにも文献が列挙されている。 | | ☞ パテントファミリーに関する別紙を参照。 | |
| * 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | | の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献 | |
| 国際調査を完了した日 02.05.2006 | | 国際調査報告の発送日 16.05.2006 | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号 | | 特許庁審査官 (権限のある職員) 齋藤 真由美 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 | 4 B 3777 |

| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/JP2006/306121 |
|-----------------------|--|--------------------------|
| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | BRODSKY F.M. et al., 'Characterization of a monoclonal anti-beta 2-microglobulin antibody and its use in the genetic and biochemical analysis of major histocompatibility antigens.' Eur. J. Immunol. (1979) vol. 9, pp. 536-545 | 1-10, 12 |
| A | BARNSTABLE C.J. 'Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis.' Cell (1978) vol. 14, pp. 9-20 | 1-10, 12 |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 0 6 1 2 1

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲11 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲11に係る発明に記載の「請求項2または3に記載のハイブリドーマの免疫グロブリン遺伝子情報」は、情報の単なる提示に過ぎない。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2005年4月)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 鳥越 俊彦
 北海道札幌市中央区北 1 条西 2 6 丁目 5 - 1 - 1 7 0 1

(72) 発明者 下澤 久美子
 北海道札幌市中央区南 7 条西 1 3 丁目 3 - 1 0 - 3 0 3

(72) 発明者 中澤 恵実理
 北海道札幌市厚別区厚別東 2 条 4 丁目 3 - 2 7

F ターム (参考) 4B024 AA11 BA31 BA44 CA04 DA06 EA04 GA03
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
 4B065 AA91X AA91Y AB05 AC14 BA08 CA25 CA46
 4H045 AA11 CA40 DA76 EA50 FA74

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。