

(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2013-159596

(P2013-159596A)

(43) 公開日 平成25年8月19日(2013.8.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4B024
C12N 15/02 (2006.01)	C12N 15/00 C	4B064
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 1O2	4B065
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 D	4H045
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-25103 (P2012-25103)
 (22) 出願日 平成24年2月8日 (2012.2.8)

(71) 出願人 899000057
 学校法人日本大学
 東京都千代田区九段南四丁目8番24号
 (74) 代理人 110000084
 特許業務法人アルガ特許事務所
 (74) 代理人 100077562
 弁理士 高野 登志雄
 (74) 代理人 100096736
 弁理士 中嶋 俊夫
 (74) 代理人 100117156
 弁理士 村田 正樹
 (74) 代理人 100111028
 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 β-アミロイド前駆体タンパク質のマイクロ凝集体に特異的なモノクローナル抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 大きなサイズの非晶質の A 凝集体のみを特異的に検討するための材料を提供する。

【解決手段】 粒子径 0.22 μm 以上の非晶質のアミロイド タンパクの凝集体に特異的に結合し、アミロイド タンパク及び繊維状アミロイド タンパク凝集体に結合しない抗体。及び該非晶質のアミロイド タンパクの凝集体を免疫原とする細胞融合法により得られ抗体を産生するハイブリドーマ。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

粒子径 $0.22 \mu\text{m}$ 以上の非晶質のアミロイド タンパクの凝集体に特異的に結合し、単量体のアミロイド タンパク及び繊維状アミロイド タンパク凝集体に結合しない抗体。

【請求項 2】

粒子径 $0.22 \mu\text{m}$ 以上の非晶質のアミロイド タンパクの凝集体が、粒子径 $0.22 \mu\text{m} \sim 500 \mu\text{m}$ である請求項 1 記載の抗原に対する抗体。

【請求項 3】

モノクローナル抗体である請求項 1 又は 2 記載の抗体。

10

【請求項 4】

N I T E A P - 1 2 2 9 として寄託されたハイブリドーマが産生するものである請求項 3 記載の抗体。

【請求項 5】

検体に請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の抗体を反応させることを特徴とする、当該検体中の粒子径 $0.22 \mu\text{m}$ 以上の非晶質のアミロイド タンパク凝集体の検出法。

【請求項 6】

粒子径 $0.22 \mu\text{m}$ 以上の非晶質のアミロイド タンパクの凝集体を免疫原とする細胞融合法により得られ、粒子径 $0.22 \mu\text{m}$ 以上の非晶質のアミロイド タンパクの凝集体に特異的に結合し、アミロイド タンパク及び繊維状アミロイド タンパク凝集体に結合しない抗体を産生するハイブリドーマ。

20

【請求項 7】

N I T E A P - 1 2 2 9 として寄託されたものである請求項 6 記載のハイブリドーマ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アミロイド タンパク (A) の凝集体のうち粒子径が大きなマイクロ凝集体に特異的に結合する抗体及びその利用に関する。

【背景技術】

30

【0002】

アルツハイマー病の主要な病理変化には老人斑と神経原線維変化があるが、この老人斑は発症の早期から認められ、その主要構成成分がアミロイド タンパク (A) である。当該 A は、アルツハイマー病の発症と進展に深く関与していることから注目され広く研究されている。

A は、 β -アミロイド前駆体から β -セクレターゼ及び γ -セクレターゼが作用したときに切り出されて産生される。40 - 42 アミノ酸からなるペプチドであり、A₁₋₄₀ 及び A₁₋₄₂ との 2 種が同定されている (非特許文献 1) 。

【0003】

アルツハイマー病の発症は、A が凝集して脳組織に沈着することにより発症するとの説が有力であることから、その治療薬として A ワクチン療法や抗 A モノクローナル抗体療法が開発されている (特許文献 1、2) 。

40

【0004】

一方、脳内に沈着するのは、単量体の A ではなく、繊維状や非晶質の A 凝集体であり、32量体以下の小さな非晶質の A 凝集体については神経毒性が強いことなどから、研究が進められている (非特許文献 2、3) 。そしてこの小さな非晶質の A 凝集体 (非特許文献 3) や繊維状の A 凝集体 (非特許文献 4) に対する抗体も作製されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

50

【特許文献1】国際公開第2008/156622号パンフレット

【特許文献2】特開2010-215651号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Human Molecular Genetics, 13, 159-170(2004)

【非特許文献2】Neurol Sci. 2009 December; 30(6): 471-477

【非特許文献3】J. Biol. Chem. (2011) Vol. 286, No.13, pp11555-11562

【非特許文献4】J. Biol. Chem. (2009) Vol. 284, No.47, pp32895-32905

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0007】

しかしながら、A の凝集体のうち、大きなサイズ为非晶質の凝集体については脳組織内にあることは確認されているが、その作用はほとんど解明されていない。また当該大きなサイズの凝集体は抗A 抗体等を使用して検出されているのが実状であり、その検出方法及び機能解明については全く検討されていない。

従って、本発明の課題は、大きなサイズ的非晶質のA 凝集体のみを特異的に検出するための材料を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

そこで本発明者は、今まで注目されていなかった、大きなサイズ的非晶質のA 凝集体に着目し、これに特異的な抗体を作製することとし、種々検討したところ、粒子径0.22 μm以上の非晶質のA 凝集体を抗原として用いることにより、大きなサイズ的非晶質のA 凝集体に特異的に結合する抗体を得ることに成功した。

20

【0009】

すなわち、本発明は、以下の[1]～[8]に係るものである。

[1] 粒子径0.22 μm以上の非晶質のアミロイド タンパクの凝集体に特異的に結合し、単量体のアミロイド タンパク及び繊維状アミロイド タンパク凝集体に結合しない抗体。

[2] 粒子径0.22 μm以上の非晶質のアミロイド タンパクの凝集体が、粒子径0.22 μm～500 μmである[1]記載の抗体。

30

[3] モノクローナル抗体である[1]又は[2]記載の抗体。

[4] N I T E A P - 1 2 2 9として寄託されたハイブリドーマが産生するものである[3]記載の抗体。

[5] 検体に[1]～[4]のいずれか1項記載の抗体を反応させることを特徴とする、当該検体中の粒子径0.22 μm以上の非晶質のアミロイド タンパク凝集体の検出法。

[6] 粒子径0.22 μm以上の非晶質のアミロイド タンパクの凝集体を免疫原とする細胞融合法により得られ、粒子径0.22 μm以上のアミロイド タンパクの凝集体に特異的に結合し、アミロイド タンパク及び繊維状アミロイド タンパク凝集体に結合しない抗体を産生するハイブリドーマ。

[7] N I T E A P - 1 2 2 9として寄託されたものである[6]記載のハイブリドーマ。

40

【発明の効果】

【0010】

本発明の抗体は、従来着目されず、その機能も知られていなかった0.22 μm以上の大きなサイズ的非晶質のA 凝集体に特異的であり、単量体のA 及び繊維状A 凝集体に反応しない。従って、本発明の抗体を用いれば、脳内に沈着していることは知られていたが、その機能が解明されていなかった大きなサイズ的非晶質のA 凝集体を特異的に検出できるので、本発明の抗体は大きなサイズ的非晶質のA 凝集体の機能解明、アルツハイマー病の進展原因究明、臨床検査薬等として有用である。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 1 1 】

【 図 1 】本発明抗体を用いた E L I S A の結果を示す図である。

【 図 2 】市販の抗 A₁₋₄₂モノクローナル抗体を用いた E L I S A の結果を示す図である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 2 】

本発明の抗体は、粒子径 0 . 2 2 μ m 以上の非晶質の A₁ の凝集体 (マイクロ凝集体ともいう) に特異的に結合し、A₂ 及び繊維状 A₃ 凝集体には結合しない。ここで粒子径 0 . 2 2 μ m 以上の非晶質の A₁ 凝集体は、従来注目されている A₁、繊維状 A₃ 凝集体やナノサイズの A₁ 凝集体とも相違する。より好ましい大きな A₁ 凝集体としては、粒子径 0 . 2 2 μ m ~ 5 0 0 μ m 程度の非晶質の A₁ 凝集体である。

10

【 0 0 1 3 】

本発明の抗体は、前記の特性を有している限り、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよいが、特異性の高いものが得られやすい点でモノクローナル抗体が好ましい。

【 0 0 1 4 】

本発明のポリクローナル抗体は、粒子径 0 . 2 2 μ m 以上の非晶質の A₁ 凝集体を抗原として哺乳動物を免疫し、その抗血清を採取し、特異性を確認すればよい。

【 0 0 1 5 】

本発明のモノクローナル抗体は、通常細胞融合により得られるハイブリドーマを培養して作製することができる。ここでハイブリドーマは、0 . 2 2 μ m 以上の非晶質の A₁ 凝集体で免疫した哺乳動物の免疫細胞と、ミエローマ細胞とを融合させ、得られた融合細胞から、0 . 2 2 μ m 以上の非晶質の A₁ 凝集体と結合し、A₂ 及び繊維状 A₃ 凝集体と結合しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択することにより得られる。

20

【 0 0 1 6 】

ハイブリドーマを作製するための抗原としては、0 . 2 2 μ m 以上の非晶質の A₁ 凝集体を用いる。特に 0 . 2 2 μ m ~ 5 0 0 μ m のサイズの非晶質の A₁ 凝集体を用いるのが好ましい。

【 0 0 1 7 】

ハイブリドーマの作製に使用する動物としては、マウス、ウサギ等が挙げられるが、ハイブリドーマの作製のために最も広く使用されているマウスを用いるのが好ましい。マウスの免疫感作は、前記の 0 . 2 2 μ m 以上の非晶質の A₁ 凝集体を、必要に応じて Freund のアジュバントと共にマウスに注射することにより行う。次に免疫されたマウスから脾細胞を採取し、マウスミエローマセルライン例えば、P 3 U 1 との細胞融合を常法に従って行う。

30

【 0 0 1 8 】

H A T 培地に増殖したハイブリドーマの培養上清を常用のサンドイッチ法により 0 . 2 2 μ m 以上の非晶質の A₁ 凝集体と結合するモノクローナル抗体の存在について試験する。この検定においては、抗原として用いた 0 . 2 2 μ m 以上の非晶質の A₁ 凝集体、A₁₋₄₂、A₁₋₄₀、A₁₆₋₂₀、A₃ 繊維状凝集体をサンドイッチ法の抗原として使用して、特異性を確認できる。

40

【 0 0 1 9 】

この中に、0 . 2 2 μ m 以上の非晶質の A₁ 凝集体と結合し、繊維状 A₃ 凝集体と結合しないモノクローナル抗体を産生する 7 個のクローンが見出された。このうち、1 クローンを A n t i - L O A₃₁₋₂ と命名し、N I T E A P - 1 2 2 9 として独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物受託センターに寄託した。

【 0 0 2 0 】

本発明のモノクローナル抗体を製造するには、例えば上記のハイブリドーマのいずれかを常用の培地中で培養し、培養上清から目的とするモノクローナル抗体を採取すればよい

50

。あるいは、前記ハイブリドーマのいずれかをマウスの腹腔内に接種し、該マウスから腹水を採取し、そして該腹水から目的とするモノクローナル抗体を採取すればよい。培養上清又は腹水からのモノクローナル抗体の採取、すなわち単離・精製は、常法に従って行うことができる。例えば、硫酸アンモニウムにより塩析、 $0.22\ \mu\text{m}$ 以上のA凝集体を固定した支持体を用いるアフィニティークロマトグラフィー等を組合せて用いることができる。

【0021】

本発明の抗体は、その目的に応じてキメラ抗体、ヒト化抗体とすることができる。さらに、蛍光、発光、放射性同位元素、金属コロイド等の標識体とすることもできる。

【0022】

得られる本発明の抗体は、 $0.22\ \mu\text{m}$ 以上の非晶質のA凝集体に結合し、単量体A及び繊維状A凝集体に結合しないので、 $0.22\ \mu\text{m}$ 以上の非晶質のA凝集体を特異的に検出するのに有用である。

【0023】

本発明の抗体を用いて $0.22\ \mu\text{m}$ 以上の非晶質のA凝集体を検出するには、検体に本発明の抗体を反応させ、当該検体中の粒子径 $0.22\ \mu\text{m}$ 以上の非晶質のアミロイドタンパク凝集体を検出することができる。

検出手段としては、ELISA、免疫染色、ウエスタンブロッティング、免疫組織染色、蛍光免疫染色、免疫沈降等が挙げられる。

また検体としては、摘出組織、脳切片等の組織切片、培養細胞等が挙げられる。

【実施例】

【0024】

次に実施例を挙げて、本発明を詳細に説明する。

【0025】

実施例1

[モノクローナル抗体の作成方法]

(1)抗原の作製

(マイクロ凝集体)

リン酸緩衝生理食塩水(Dulbecco's PBS)中に $0.22\ \text{mM}$ A_{1-42} (AnyGen Co.Ltd, Korea)と繊維状凝集体の形成を抑制する $2.2\ \text{mM}$ A_{16-20} (KLVFF)を加え 37°C 、 $3\ \text{rpm}$ で16時間攪拌した。この溶液を $0.22\ \mu\text{m}$ のフィルターでろ過した残渣をマイクロ凝集体とした。

【0026】

(繊維状A凝集体)

マイクロ凝集体の作成において A_{16-20} を加えずに調整し、繊維状A凝集体を作製した。

【0027】

(モノマー)

A_{1-42} を $50\ \mu\text{M}$ になるように1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールに加え、超音波処理で懸濁後、 30°C で16時間放置し完全に溶解させた。減圧乾燥により溶媒を除いたものをモノマーとして用いた。

【0028】

(2)抗体の作製

上記により作製したマイクロ凝集体($0.1\ \text{mg}$)を完全もしくは非完全フロイントアジュバントと混合し、マウス(BALB/C、8週目、雌)に免疫した。免疫は、2週おきに3回行った。免疫したマウスの脾臓を摘出し、その細胞数の2割のマウスミエローム細胞(P3U1)を混合後、この混合細胞にPEG(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)1mlを1分間かけて攪拌しながらゆっくり加えた。1分間攪拌後、無血清培地FC53mlを3分間かけて攪拌しながらゆっくり加えた。続けて無血清培地10mlを3分間かけて攪拌しながらゆっくりと加えた。その後、5分間インキュベート(37°C 、

10

20

30

40

50

5% CO₂) を行い、遠心分離 (1000 rpm、5 min) により上清を捨てた。HAT 培地で希釈することで細胞を解して培養した。

【0029】

この培養上清を用いて ELISA 法によりマイクロ凝集体に反応する抗体を生産する細胞のスクリーニングを行った。陽性が得られた細胞を限界希釈しハイブリドーマの単一化を行った。

【0030】

ELISA 法は Nunc イムノプレートマキシソープ (Thermo scientific Inc.) を用いて 4、16 時間インキュベートして各抗原を非共有結合で固定した。Dulbecco's PBS に 0.05% Tween 20 を加えた溶液 (PBS-T) により洗浄を行った後、ブロッキングバッファー (イムノブロック、DSファーマバイオメディカル株式会社) 添加し、37、2 時間インキュベートした。PBS-T で洗浄後、2 次抗体として HRP を標識した抗マウス IgG ヤギ由来 (Sigma-Aldrich) を加え、37、2 時間インキュベートした。PBS-T で洗浄後、SIGMAFAST OPD (Sigma-Aldrich) の説明に従って発色させ、492 nm で測定した。

10

【0031】

各濃度のマイクロ凝集体 (黒丸)、繊維状 A₁₋₄₂ (白丸)、モノマー A₁₋₄₂ (白四角) 及び、A₁₆₋₂₀ (黒四角) を抗原として本発明抗体 (図 1)、もしくは市販の抗 A₁₋₄₂ モノクローナル抗体 82E1 (図 2) を用いて ELISA を行った。

図 1 及び図 2 に、ELISA の結果を示す。

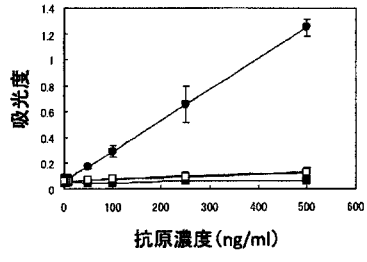
20

【0032】

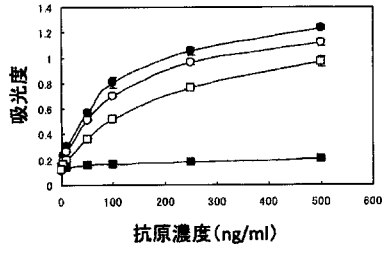
図 1 及び図 2 に示す様に本発明のモノクローナル抗体は繊維状及びモノマー A₁₋₄₂ 及び、A₁₆₋₂₀ とはほとんど反応せずマイクロ凝集体にのみ高い反応性を示した。一方、市販の抗 A₁₋₄₂ モノクローナル抗体 82E1 (Immuno-Biological Laboratories, Inc., Minneapolis, MN) は全ての状態の A₁₋₄₂ に反応した。なおどちらの抗体も繊維状態への形成を抑制する A₁₆₋₂₀ とはほとんど反応しなかった。

得られたハイブリドーマ 7 個のうち、1 個を Anti-LOA₃₁₋₂ と命名した。

【 図 1 】



【 図 2 】



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

(72)発明者 神野 英毅
東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学内

(72)発明者 吉宗 一晃
東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学内

(72)発明者 小森谷 友絵
東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本大学内

Fターム(参考) 4B024 AA11 HA15
4B064 AG27 BJ12 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA90X AC14 BA08 CA25 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	一种特异性针对β-淀粉样蛋白前体蛋白微团聚体的单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2013159596A	公开(公告)日	2013-08-19
申请号	JP2012025103	申请日	2012-02-08
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人日本大学		
申请(专利权)人(译)	学校法人日本大学		
[标]发明人	神野英毅 吉宗一晃 小森谷友絵		
发明人	神野 英毅 吉宗 一晃 小森谷 友絵		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/02 C12N5/10 G01N33/53 C07K14/47 C12P21/08		
FI分类号	C07K16/18 C12N15/00.C C12N5/00.102 G01N33/53.D C07K14/47 C12P21/08 C12N15/06.100 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	村田正树		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题提供专门研究大尺寸无定形Aβ聚集体的材料。一种抗体，其特异性结合粒径为0.22μm或更大的无定形淀粉样蛋白β蛋白聚集体，并且不结合淀粉样蛋白β蛋白和纤维状淀粉样蛋白β蛋白聚集体。和杂交瘤，其产生通过细胞融合方法获得的抗体，其使用无定形淀粉样β蛋白的聚集体作为免疫原。【选择图】无

【图 2】

