

(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2014-122179

(P2014-122179A)

(43) 公開日 平成26年7月3日(2014.7.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4B065
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 102	4H045
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 D	
G01N 33/577 (2006.01)	G01N 33/577 B	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2012-278965 (P2012-278965)	(71) 出願人	899000057
(22) 出願日	平成24年12月21日 (2012.12.21)		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ナノ凝集体に特異的なモノクローナル抗体

(57) 【要約】

【課題】 ナノサイズの非晶質の 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ことにある。

【解決手段】 粒子径 50 nm 以上 220 nm 未満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せず、粒子径 220 nm 以上のアミロイド タンパク凝集体との反応性が相対的に低い抗体。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

粒子径 50 nm 以上 220 nm 未満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せず、粒子径 220 nm 以上のアミロイド タンパク凝集体との反応性が相対的に低い抗体。

【請求項 2】

モノクローナル抗体である請求項 1 記載の抗体。

【請求項 3】

N I T E P - 1 4 8 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 2 記載の抗体。

10

【請求項 4】

検体に請求項 1 ~ 3 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 50 nm 以上 220 nm 未満の非晶質のアミロイド タンパク凝集体の検出法。

【請求項 5】

アミロイド タンパクの凝集体の一つで水に溶解しやすい非晶質のナノ凝集体を免疫原とする細胞融合法により得られ、粒子径 50 nm 以上 220 nm 未満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せず、粒子径 220 nm 以上のアミロイド タンパク凝集体との反応性が相対的に低い抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 6】

N I T E P - 1 4 8 9 として寄託されたものである請求項 5 記載のハイブリドーマ。

20

【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ナノサイズの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】

【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。

30

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) 。

【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。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】国際公開第 2008 / 156622 号

【特許文献 2】特開 2010 - 215651 号公報

【非特許文献】

50

【 0 0 0 6 】

【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】

【 0 0 0 7 】

しかしながら、A の凝集体のうち、ナノサイズや大きなサイズ of 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。また当該ナノ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、ナノサイズの非晶質の 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】

【 0 0 0 8 】

そこで本発明者は、今まで注目されていなかった、ナノサイズの非晶質の 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、A 凝集体の一つで水に溶解しやすい非晶質のナノ凝集体を抗原として用いることにより、ナノサイズである粒子径 50 nm 以上 220 nm 未満の非晶質の 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。

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明は、以下の [1] ~ [6] に係るものである。

[1] 粒子径 50 nm 以上 220 nm 未満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に結合せず、粒子径 220 nm 以上のアミロイド タンパク凝集体との反応性が相対的に低い抗体。

[2] モノクローナル抗体である [1] 記載の抗体。

[3] N I T E P - 1 4 8 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 [2] 記載の抗体。

[4] 検体に [1] ~ [3] のいずれかに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 50 nm 以上 220 nm 未満の非晶質のアミロイド タンパク凝集体の検出法。

[5] アミロイド タンパクの水に溶解しやすい非晶質のナノ凝集体を免疫原とする細胞融合法により得られ、粒子径 50 nm 以上 220 nm 未満のアミロイド 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 タンパク凝集体と結合せず、粒子径 220 nm 以上のアミロイド タンパク凝集体との反応性が相対的に低い抗体を産生するハイブリドーマ。

[6] N I T E P - 1 4 8 9 として寄託されたものである [5] 記載のハイブリドーマ。

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

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 50 nm 以上 220 nm 未満のナノサイズの非晶質の A 凝集体に特異的であり、単量体の A 及び繊維状 A 凝集体と反応せず、粒子径 220 nm 以上のアミロイド タンパク凝集体との反応性が相対的に低い。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ナノサイズの非晶質の A 凝集体を特異的に検出できるので、本発明の抗体はナノサイズの非晶質の 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】

【 0 0 1 1 】

10

20

30

40

50

【図1】凝集体およびモノマーのAFM画像を示す図である。(A)ナノ凝集体；直径50nm程度の楕円形のナノ凝集体に混ざって直径200nm以上の大きな凝集体が見られる。

(B)マイクロ凝集体(LOA)(C)繊維状A₁₋₄₂(D)モノマー

【図2】各凝集体に対する各モノクローナル抗体の反応性を示す図である。

【図3】サイズ分画したナノ凝集体画分に対する各モノクローナル抗体の反応性を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の抗体は、粒子径50nm以上220nm未満の非晶質のA_βの凝集体(ナノ凝集体ともいう)に特異的に結合し、単量体A_β及び繊維状A_β凝集体と結合せず、粒子径220nm以上のアミロイドタンパク凝集体との反応性が相対的に低い。ここで粒子径50nm以上220nm未満の非晶質のA_β凝集体は、従来注目されている単量体A_β、繊維状A_β凝集体やマイクロサイズのA_β凝集体(LOA)とも相違する。また、反応性が相対的に低いとは、ELISAによる吸光度で1/2以下、好ましくは1/3以下であることをいう。

10

【0013】

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。

【0014】

本発明のポリクローナル抗体は、粒子径50nm以上220nm未満の非晶質のA_β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。

20

【0015】

本発明のモノクローナル抗体は、通常の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、粒子径50nm以上220nm未満の非晶質のA_β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、50nm以上220nm未満の非晶質のA_β凝集体と結合し、単量体A_β及び繊維状A_β凝集体と結合せず、マイクロ凝集体との反応性が相対的に低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。

【0016】

ハイブリドーマを作製するための抗原としては、アミロイドタンパクの凝集体の一つで水に溶解しやすい非晶質のナノ凝集体、すなわち、粒子径50nm以上220nm未満の非晶質のA_β凝集体を用いる。

30

【0017】

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50nm以上220nm未満の非晶質のA_β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、P3U1との細胞融合を常法に従って行う。

40

【0018】

HAT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50nm以上220nm未満の非晶質のA_β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50nm以上220nm未満の非晶質のA_β凝集体、A_β₁₋₄₂、A_β₁₋₄₀、A_β₁₆₋₂₀、A_β繊維状凝集体、マイクロ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。

【0019】

この中に、50nm以上220nm未満の非晶質のA_β凝集体と結合し、単量体A_β及び繊維状A_β凝集体と結合せず、マイクロ凝集体との反応性が相互的に低い、モノクローナル抗体を産生する9個のクローンが見出された。このうち、1クローンをAnti-LFI

50

79-3と命名し、NITE P-1489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。

【0020】

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。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、50nm以上220nm未満の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

10

【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、50nm以上220nm未満の非晶質のA凝集体に結合し、単量体A及び繊維状A凝集体と結合せず、マイクロ凝集体との反応性が相対的に低いので、50nm以上220nm未満の非晶質の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50nm以上220nm未満の非晶質の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50nm以上220nm未満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。

20

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

30

[モノクローナル抗体の作成方法]

(1)抗原の作製

【0026】

(ナノ凝集体)

A₁₋₄₂ (AnyGen Co.Ltd, Korea)を0.22mMとなるように1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールに溶解し、4で16時間静置、37で3時間静置したのち、減圧乾燥させた。この溶解と減圧乾燥の操作を2回繰り返し、水に溶解しやすい非晶質のナノ凝集体を作製した。この画分には様々な大きさの凝集体が含まれているため、0.22μm、300kDa(約50nm)および、100kDaのフィルターでろ過することによりサイズ分画を行った。

40

【0027】

(マイクロ凝集体)

リン酸緩衝生理食塩水(Dulbecco's PBS)中に0.22mM A₁₋₄₂ (AnyGen Co.Ltd, Korea)と繊維状凝集体の形成を抑制する2.2mM A₁₆₋₂₀ (KL VFF)を加え37、3rpmで16時間攪拌した。この溶液を0.22μmのフィルターでろ過した残渣をマイクロ凝集体(LOA)とした。

【0028】

(繊維状A凝集体)

マイクロ凝集体の作成においてA₁₆₋₂₀を加えずに調整した後37 16時間静置して繊維状A凝集体を作製した。

50

【0029】

(モノマー)

A₁₋₄₂を50 μM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℃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。

【0030】

上記により作製したナノ凝集体、マイクロ凝集体(LOA)、繊維状A凝集体及び、モノマーの形状を原子間力顕微鏡(AFM、JSPM-5200, JEOL)を用いて観察した。A₁₋₄₂の各凝集体もしくはモノマーを1 μg/mlに調整し、10 μlを雲母片上に滴下し減圧乾燥させた。測定はACモードで、共振周波数190 kHzで行った。図1に、AFMの画像を示す。

10

【0031】

(2) 抗体の作製

上記により作製したナノ凝集体(0.1 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マ細胞(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)1 ml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FCSS 3 ml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10 ml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℃、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。

20

【0032】

この培養上清を用いてELISA法によりナノ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。

【0033】

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。

30

【0034】

各濃度のナノ凝集体、繊維状A₁₋₄₂、モノマーA₁₋₄₂及び、マイクロ凝集体を抗原として本発明抗体を用いてELISAを行った。

図2及び図3に、ELISAの結果を示す。

【0035】

図2に示す様に本発明のモノクローナル抗体はナノ凝集体画分に高い反応性を示した。弱いながらLOAにも反応性が見られ、繊維状及びモノマーA₁₋₄₂とはほとんど反応せずナノ凝集体にのみ高い反応性を示した。一方、LOAに対する抗体31-2(特許文献3)はナノ凝集体画分及びLOAに同等の反応性が見られた。

40

得られたハイブリドーマ9個のうち、相対的にナノ凝集体画分に反応性が高く、繊維状およびモノマーに対する反応性が低い1個をAnti-LFI 79-3と命名した。

【0036】

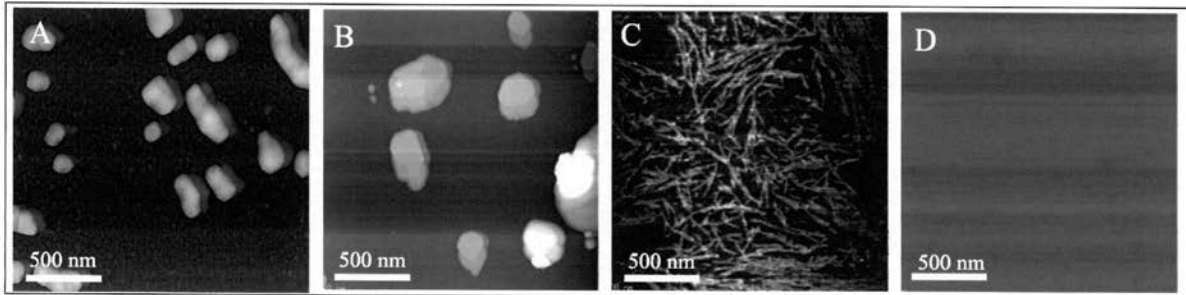
図3に示す様に本発明のモノクローナル抗体はナノ凝集体画分の中で、220 nmのフィルターを通過するが300 kDaのフィルターを通過しない凝集体と最も良く反応する。この凝集体よりも大きな220 nmのフィルターを通過しない凝集体とは若干反応するが、

50

300 kDa 以下の凝集体とはほとんど反応しない。

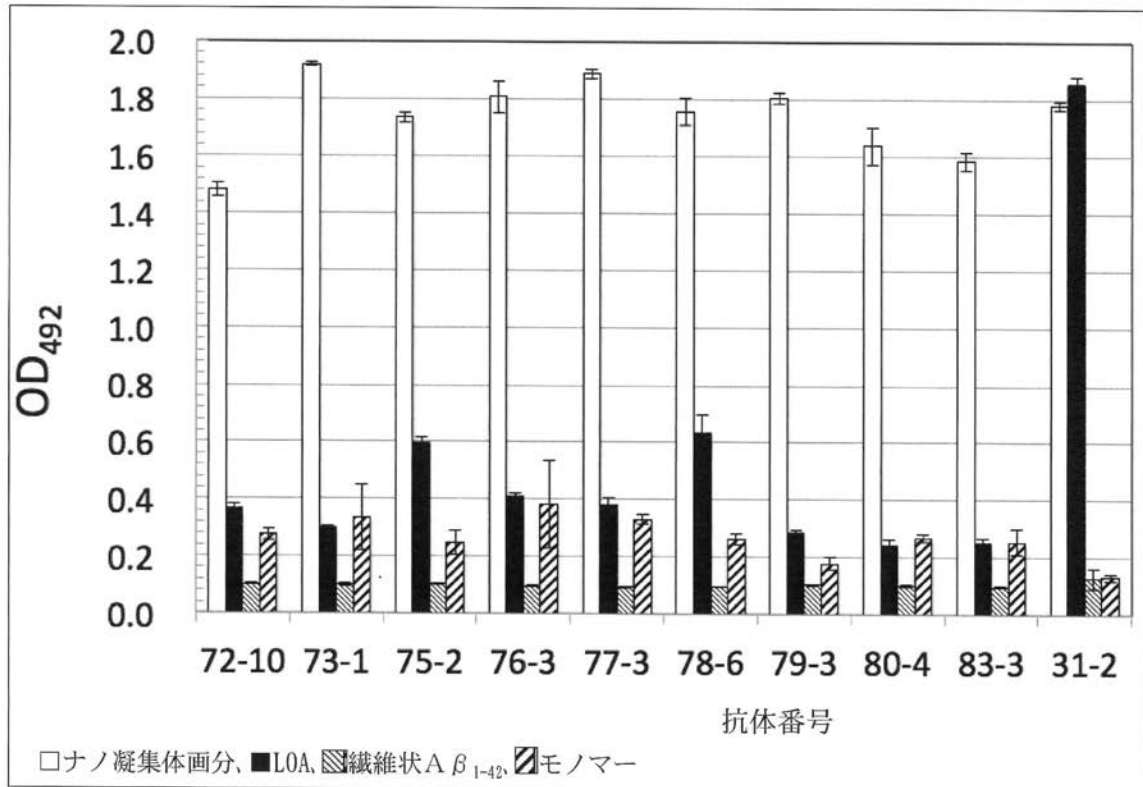
【図 1】

A F M 画像



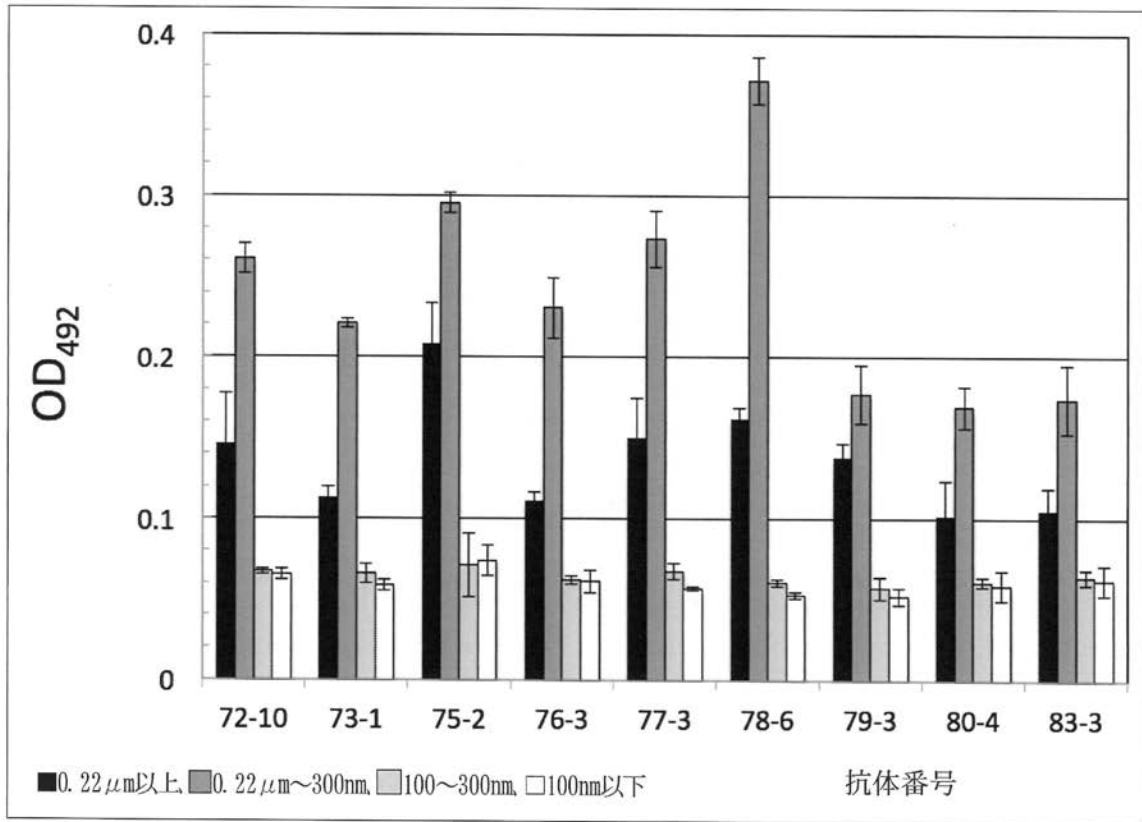
【図2】

各凝集体に対するモノクローナル抗体の反応性



【図3】

サイズ分画したナノ凝集体画分に対するモノクローナル抗体の反応性



フロントページの続き

(72)発明者 神野 英毅

東京都千代田区九段南四丁目8番24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24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24号 学校法人日本大学内

Fターム(参考) 4B065 AA90X AB05 AC14 BA08 CA24 CA44 CA46

4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72

专利名称(译)	一种特异于 β -淀粉样蛋白前体蛋白纳米聚集体的单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2014122179A	公开(公告)日	2014-07-03
申请号	JP2012278965	申请日	2012-12-21
[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 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/18 C12N5/00.102 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N5/20		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	村田正树		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种仅用于专门检查纳米级无定形A β 聚集体的材料。
 解决方案：与粒径不小于220 nm的淀粉样 β 蛋白聚集体具有相对较低反应性的抗体与聚集体特异性结合 非晶态淀粉状 β 蛋白的粒径为50nm以上且小于220nm，且不与单体淀粉状 β 蛋白和纤维状淀粉状 β 蛋白的聚集体结合。