

(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2014-125487
(P2014-125487A)

(43) 公開日 平成26年7月7日(2014.7.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18 Z N A	4 B O 6 4
C12P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 H O 4 5
C12P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	
GO1N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2013-253994 (P2013-253994)
 (22) 出願日 平成25年12月9日 (2013.12.9)
 (31) 優先権主張番号 101149718
 (32) 優先日 平成24年12月25日 (2012.12.25)
 (33) 優先権主張国 台湾 (TW)

(71) 出願人 504004463
 国立陽明大學
 台湾台北市北投區立農街二段155號
 (74) 代理人 100093779
 弁理士 服部 雅紀
 (72) 発明者 陳 宜民
 台湾台北市北投區立農街二段155號
 (72) 発明者 ▲黄▼ 思惟
 台湾台北市北投區立農街二段155號
 (72) 発明者 林 盈▲ゆい▼
 台湾台北市北投區立農街二段155號
 Fターム(参考) 4B064 AG26 AG27 CA10 CA20 CC24
 CE12 DA01 DA13
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40
 DA75 DA76 EA20 EA50 FA72
 FA74

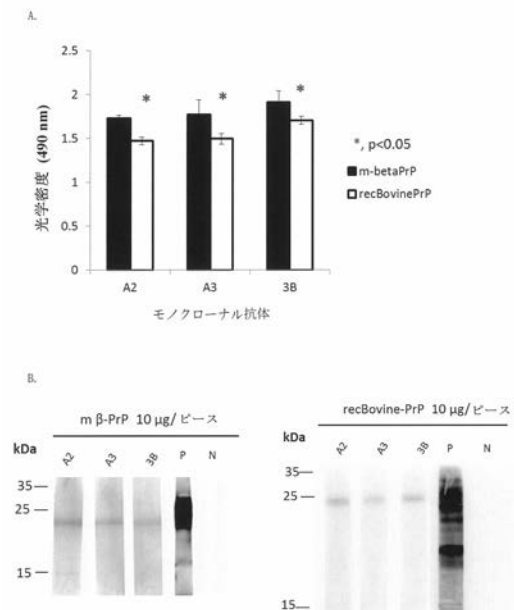
(54) 【発明の名称】 感染型プリオンタンパク質を識別可能なモノクローナル抗体およびそれを用いた診断キット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 感染型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を識別可能なモノクローナル抗体およびそれを用いた診断キットの提供。

【解決手段】 感染型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を識別可能なモノクローナル抗体は、特定の配列からなるアミノ酸配列を有するプリオンタンパク質のペプチドと結合する。また、感染型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を識別可能なモノクローナル抗体は、シート構造を有するプリオンタンパク質を識別することができる。プリオンタンパク質はオリゴマーを生成する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO. 1 に記載のアミノ酸配列を有するプリオンタンパク質のペプチドと結合することを特徴とする感染型プリオンタンパク質を識別可能なモノクローナル抗体。

【請求項 2】

シート構造を有するプリオンタンパク質を識別可能であることを特徴とする請求項 1 に記載の感染型プリオンタンパク質を識別可能なモノクローナル抗体。

【請求項 3】

オリゴマーを生成するプリオンタンパク質を識別可能であることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の感染型プリオンタンパク質を識別可能なモノクローナル抗体。

【請求項 4】

エピトープは、SEQ ID NO. 2 に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 1 に記載の感染型プリオンタンパク質を識別可能なモノクローナル抗体。

【請求項 5】

エピトープは、SEQ ID NO. 3 に記載のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 1 に記載の感染型プリオンタンパク質を識別可能なモノクローナル抗体。

【請求項 6】

シート構造を有する組み換えプリオンタンパク質を生成するステップ (a) と、
ステップ (a) で得られた組み換えプリオンタンパク質をマウスに投与し、マウスの免疫応答により抗体を生成するステップ (b) と、
抗体を分離および純化するステップ (c) と、
を含むことを特徴とする感染型プリオンタンパク質を識別可能な抗体の製造方法。

【請求項 7】

前記ステップ (b) で得られた抗体は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含むことを特徴とする請求項 6 に記載の感染型プリオンタンパク質を識別可能な抗体の製造方法。

【請求項 8】

前記組み換えプリオンタンパク質は、構造が シートから シートに変更し、オリゴマー形成することを特徴とする請求項 6 に記載の感染型プリオンタンパク質を識別可能な抗体の製造方法。

【請求項 9】

前記組み換えプリオンタンパク質は、Ser - 132、Asn - 181、Cys 179、および、Cys - 214 に対応する遺伝子の変異により得られることを特徴とする請求項 6 に記載の感染型プリオンタンパク質を識別可能な抗体の製造方法。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体を含むことを特徴とする感染型プリオンタンパク質に特異性を有する診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、感染型プリオンタンパク質 (scrapie prion protein, PrP^{Sc}) を識別可能なモノクローナル抗体に関し、詳しくは、プリオンタンパク質の C 末端の シート (sheet) 構造を有するペプチドと結合し、プリオン病の検査に適用することが可能なモノクローナル抗体、および、それを用いた診断キットに関するものである。

【背景技術】

【0002】

プリオン病 (prion diseases)、または別名の伝達性海綿状脳症 (Transmissible spongiform encephalopathy、略称

10

20

30

40

50

TSE)は、脳組織に海綿状態が現れ、神経細胞が死亡し、星状細胞が増殖し、組織染色体に澱粉状の物質 (amyloid plaque) が現れることが病理的特徴を有する。一方、臨床的特徴は、神経変性疾患、例えばアルツハイマー病 (Alzheimer disease)、パーキンソン病 (Parkinson disease) のように、長期の潜伏期を経て病状が徐々に進行し、運動失調、痴呆などを引き起こす (非特許文献1、非特許文献2) ほか、伝染性を持つことである。深刻な場合、動物に関わるスクレイピー (Scrapie) および狂牛病 (bovine spongiform encephalopathy、略称BSE) と、人間に関わるクロイツフェルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob disease、略称CJD)、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群 (Gerstmann-Straussler-Scheinker、略称GSS) および致死性家族性不眠症 (Fatal Familial Insomnia、略称FFI) とが発症する。人間に関わるプリオン病の場合、GSS、FFIおよびfCJDは、遺伝性であり、Kuru、iCJDおよびvCJDは後天性であり、sCJDは未知である。それに対し、動物の場合、同類の死体を食べる習慣があれば、伝達性ミンク脳症 (transmissible mink encephalopathy) が発症する。スクレイピー (Scrapie) に感染した羊由来の肉骨粉を牛の飼料に混入すれば狂牛病 (BSE) が牛に発症する。

10

20

30

40

50

【0003】

イギリスでは、1986年に大量の牛を死亡させる前代未聞の疾病が出現した。後から検査した結果により、狂牛病が判明した (非特許文献3)。狂牛病は、イギリスの続き、ほかの国にも広がって大規模感染を発生させた。現今の研究結果により、BSEの原因は、牛用飼料に添加する肉骨粉がスクレイピー病原を大量含有したことに関係がある。つまり、BSEは、動物種別の差異に問われず、別の動物種に発症する疾病を誘発する可能性があることが考えられる。それに対し、1920年代初期に人間に発症したクロイツフェルト・ヤコブ病は、非常に珍しい疾病と診断され、発症率が百万人に0.5から1人であった。この疾病の病理および症状は狂牛病に似ていた。

【0004】

過去数年にわたって各国は、BSEが極めて深刻な問題と確信できるようになった。現今の病原鑑定法は死後摘出した脳組織を標本源として使用することが一般的であり、感染症状がひどかった牛から脳組織を摘出し、乳剤を製作し、続いてマウスを人工接種により感染させ、BSE病原の伝染性を検証する。しかしながら、伝染性があるか否かを検証するには、接種から150日間あまりの感染期を経ることが必要である。一方、WHOおよびOIEに承認された診断法は死後の臨床疾患、症状および顕微鏡的病理変化を検査し、免疫組織化学染色およびウェスタンブロット法を行うことをプリオン病の診断根拠とする (非特許文献4、非特許文献5)。一般的なBSE検査法は、次の通りである。

【0005】

1、ウェスタンブロット法は、プロテアーゼKによってPrP^{Sc}を加水分解し、27から30kDa (PrP^{res}) の信号を生じ、脳組織ホモジネートとプロテアーゼKを反応させ、続いて (DYEDRY YREエピトープに対して反応する) モノクローナル抗体6H4によって検査することであるため、PrP^Cフラグメントの全長が加水分解されず、PrP²⁷⁻³⁰信号に干渉するという現象が発生する酵素免疫分析法 (ELISA) と比べて、検査上のミスが少ないだけでなく、新たなPrP^{Sc}の種 (strain) を発現することができる。

【0006】

2、CEA/BioRad検査方法は、脳組織の活性を除去し (denaturation)、濃縮するステップを行った後、二種類のモノクローナル抗体によってサンドイッチ型酵素免疫測定を行う。別の方法に対し、この方法は検出感度が高く、0.5 - 2.0 pmolに達するが、脳組織液を純化し、濃縮するには相当な時間および人の手を費やすことが必要であるだけでなく、完全に加水分解されなかったPrP^Cフラグメントの妨害を受けるといった問題を抱える。

【0007】

3、構造依存性 (conformation dependent) 免疫システムは、本来および変性後の PrP に対する抗体の鎖結合能と変異後の PrP に対する抗体の鎖結合能とが異なることに基づいたサンドイッチ型酵素免疫分析法である。抗体はタンパク質分解酵素に頼ることなく、変性後の PrP^{Sc}に現れた構造エピトープ (conformational epitope) を識別できるため、プロテアーゼ (proteinase) K を反応させる PrP^{Sc} strain を検出できるが、別の迅速な検査方法と比べて処理ステップが多いことはその欠点である。

【0008】

上述した方式は、潜在的な問題を抱え、かつ検査限界が高過ぎる (それに対し検査限界が最も低い検査方法は CEA / BioRad 検査方法である。) ため、多くの牛を検査する際、PrP^{Sc} 潜伏期間中でも臨床症状が何も現れなければ、化学検査結果は偽陽性 (False positive) である。一方、人間にもこのような状態が発生する。生存している CJD 患者に対する発症前検査 (pre-symptom) の研究が進んでいる最中では、状態が不明確なまま vCJD 患者に手術、臓器移植、輸血などの医療行為を行う際、高温および殺菌剤に耐える PrP^{Sc} を一旦手術器具に付着させれば、完全に除去できないだけでなく、感染が広がって iatrogenic CJD を発症させるような問題がある。一方、PrP^{Sc} の特性により、標本を摘出した後、タンパク質分解酵素処理を行わなければならないため、もともとの存在量が少ない PrP^{Sc} を流失させ、検査限界に至らず、偽陽性反応を呈するという問題が発生する。上述した問題に対し、タンパク質分解酵素処理を行う必要なく、臨床病状の発症前に生体状態を維持したうえで摘出した標本から PrP^{Sc} を特異的に識別し、検査限界を向上させることができる検査方法を探ることが必要である。

【0009】

プリオン病研究は、PrP^{Sc} 構造を特異的に結合させる抗体の発展に重点が据えられる。プリオンタンパク質の特徴はウイルス、細菌など感染性物質のように激しい免疫反応を引き起こすことがない。PrP タンパク質が正常に出現する動物 (Prnp^{+/+}) にプリオン病が発症する過程において、正常な B 細胞、T 細胞の表面に PrP^C が広く分布し、PrP^{Sc} の初期構造が PrP^C に似ているため、B 細胞は免疫寛容性を持ち、免疫反応が起こらない (非特許文献 6、非特許文献 7、非特許文献 8)。

【0010】

しかしながら、ここ数年にわたって様々な策略を弄しても、PrP^{Sc} を識別できる特異性の高い抗体を発展させることができなかった。抗体は、牛、マウス、人間に沈殿した PrP^C に免疫を生じるが、実際に応用される際、プリオンタンパク質に対する結合能力が弱い場合、臨床診断を実現させることができない (非特許文献 9)。従って、改めて全長フラグメント (N 端除外) の免疫原を採用する策略を修正し、シートが主体となる組み換えタンパク質を製作し、チロシン (tyrosine) 残基を増加し、異なる動物種の tyrosine - tyrosine - arginine 序列に基づいて合成ペプチドフラグメント (非特許文献 10) を設計し、スクレイピー関連繊維 (scrapie-associated fibril、略称 SAF) を使用すること (非特許文献 11) によって PrP^{Sc} を識別可能な抗体を発現する。しかしながら、実験結果により、PrP^C は、依然として識別されたことが判明した。これまで発現された多くの抗 PrP 抗体は各種タイプの PrP を識別できるが、本来の状態を呈する PrP^{Sc} を識別する際、微弱な信号しか現れない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献 1】Ludlam, C. A., Lancet 351: 1289 - 1290, 1998。

【非特許文献 2】Soto, C., Nature reviews Microbi

10

20

30

40

50

ology 2:809-819, 2004。

【非特許文献3】Wells, G.A., et al., The Veterinary record 121:419-420, 1987。

【非特許文献4】Hardt, M., et al., Journal of comparative pathology 122:43-53, 2000。

【非特許文献5】Ingrosso, L., et al., Trends in molecular medicine 8, 273-280, 2002。

【非特許文献6】Bueler, H., et al., Cell 73, 1339-1347, 1993。

【非特許文献7】Kascsak, R.J., et al., Journal of virology 61:3688, 1987。 10

【非特許文献8】Prusiner, S.B., et al., The Journal of infectious diseases 167:602-613, 1993。

【非特許文献9】Korth, C., et al., Nature 390:74, 1999。

【非特許文献10】Paramithiotis, et al. 2003。

【非特許文献11】Morel, N., et al., The Journal of biological chemistry 279:30143-30149, 2004。 20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、感染型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を識別可能なモノクローナル抗体を提供することを目的とする。

【0013】

また、本発明は、感染型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を識別可能なモノクローナル抗体を含む感染型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) に特異性を有する診断キットを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】 30

【0014】

本発明による感染型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を識別可能なモノクローナル抗体は、SEQ ID NO. 1に記載されているアミノ酸配列を有するプリオンタンパク質のペプチドと結合する。

【0015】

また、感染型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を識別可能なモノクローナル抗体は、シート構造を有するプリオンタンパク質を識別することができる。プリオンタンパク質はオリゴマーを生成する。

【0016】

また、感染型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を識別可能なモノクローナル抗体は、SEQ ID NO. 2に記載されているプリオンタンパク質ペプチドと結合する。感染型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を識別可能なモノクローナル抗体は、SEQ ID NO. 3に記載のプリオンタンパク質ペプチドと結合する。 40

【0017】

本発明による感染型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を識別可能なモノクローナル抗体の製造方法は、シート構造を有する組み換えプリオンタンパク質を生成するステップ (a) と、ステップ (a) で得られた組み換えプリオンタンパク質をマウスに投与し、マウスの免疫応答により抗体を生成するステップ (b) と、抗体を分離および純化するステップ (c) と、を含む。抗体はモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体である。

組み換えプリオンタンパク質は、構造が シートから シートに変更し、 オリゴマー 50

形成する。

前記組み換えプリオンタンパク質は、Ser - 132、Asn - 181、Cys 179、および、Cys - 214に対応する遺伝子の変異により得られる。

【0018】

これにより、上述の抗体を含む診断キットを用いて、プリオン病を検査することができる。検査方法は、脳の組織標本を作るステップと、本発明により揭示されるモノクローナル抗体によって免疫分析を行い、感染型プリオンタンパク質(PrP^{Sc})が標本に存在するか否かを検査するステップとを含む。脳の組織標本は脳組織ホモジネートである。脳の組織標本は脳組織切片である。

【0019】

感染型プリオンタンパク質(PrP^{Sc})は、シート構造を有するプリオンタンパク質である。感染型プリオンタンパク質はオリゴマーを生成する。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】ELISA分析(A)およびStrip western blot分析(B)に基づいて、A2、A3、3Bと腫瘍細胞とを結合させたHAT培地から選び出した抗体の分泌状態を確認した結果を示す特性図である。

【図2】抗-m PrPモノクローナル抗体(mAb)とA2、A3、3Bのアイソフォーム抗体とを比較した結果を示す特性図である。

【図3】モノクローナル抗体A、A2、B、A3、C、3Bによって量が異なるmouse PrPおよび組み換え型bovine PrPを識別する差異を、dot plot方式で比較した結果を示す特性図である。

【図4】A2(A)、A3(B)、3B(C)によってmouse PrPおよびPrPを識別する差異を、ELISA方法で比較した結果を示す特性図である。

【図5】ペプチドスキャン(peptide scan)によってモノクローナル抗体のエピトープ配列を分析した結果を示す特性図である。A-Cは、93から230のmouse PrP配列を22段に分割し、96穴を有する免疫酵素分析トレーにペプチドフラグメントを付着させて、ELISA分析を行う結果である。Dは、ペプチドスキャンによって得たエピトープ配列と抗体との対照である。

【図6】mAb 即ちA2、A3、3Bによってそれぞれ正常なマウスの脳組織ホモジネートおよび感染したマウスの脳組織ホモジネートを識別する差異を、ウェスタンブロット法で分析した結果を示す特性図である。(+)は50μg/mlのプロテアーゼKの処理を受けたことを示す。(-)は50μg/mlのプロテアーゼKの処理を受けていないことを示す。標本は、正常なマウスの脳組織ホモジネートNBH(lane 3, 4, 7, 8, 11, 12, 14, 15)および感染型PrP^{Sc}(10% 22L)を含有したマウスの脳組織ホモジネート(lane 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13)である。

【図7】実験室で作った三つのPrPを識別可能なモノクローナル抗体A、A2、A3、3Bにより、22L PrP^{Sc}に感染して病変したマウスの脳組織切片および正常なマウスの脳組織切片(normal control)に免疫組織化学的染色を行い、検査した結果を示す特性図である。写真に示した部位は小脳である。免疫前(Pre-immune)実験組はBALB/cマウス免疫前血清を陰性対照組(Negative control)として採用する。左側に示したのは、使用した抗体、即ち免疫前、A2、3B、A3である。下側に示したのは、顕微鏡の拡大倍数である。前の二列は、感染したマウスの脳組織切片である。第三列は、正常なマウスの脳組織切片である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明の特徴および長所を実施形態に基づいて詳細に説明する。実施形態は説明に用いるため、本発明の請求範囲を限定することができない。

【0022】

10

20

30

40

50

なお、本発明により提示された実施形態において、以下の実験器具、装置、方法およびそれに関連する結果と、内容を明確にするために提示された標題または補助標題とは本発明の請求範囲を限定するものではない。

【0023】

(一実施形態)

(モノクローナル抗体の製造)

まずマウス・プリオンタンパク質上の Ser - 132、Asn - 181、Cys 179、Cys - 214 四つの位置に変異を導入する。続いて電子スピン共鳴 (Electron paramagnetic resonance、略称 EPR)、Circular dichroism によって分析を行う。分析結果により、組み換えマウス・プリオンタンパク質は低塩 pH = 7 かつ常温下で主体が から シートに自動的に変わり、かつオリゴマーを自動的に合成することが判明した。続いて、作った構造が自発的变化するマウス prion protein 即ち mouse PrP (構造が PrP^{Sc} に近いと認められる) をマウスの免疫原として独特のモノクローナル抗体を作る。

10

【0024】

続いて、大腸菌によって発現された、シートが構造上の主体となる 50 μg の組み換えマウス・プリオンタンパク質 (mouse PrP、略称 m PrP) に 1X PBS を加え、体積を 250 μl まで増大させ、そして 250 μl の完全フロイントアジュバント (Complete Freund's adjuvant) を加え、それらを注射筒内に混ぜ合わせ、そののち BALB/c マウスに腹腔内注射を行い、抗原を導入する。続いて、2週間後 BALB/c マウスに追加注射を行う。まず 50 μg の m PrP に 1X PBS を加え、体積を 250 μl まで増大させ、そして 250 μl の不完全フロイントアジュバント (Incomplete Freund's adjuvate) を加え、それらを注射筒内に混ぜ合わせ、そののち BALB/c マウスに腹腔内注射を行い、抗原を導入する。続いて追加注射を行うごとに一週間後採血および血清分離を行い、酵素免疫分析を進める。5回の追加注射が完了した後、採血した血から分離した血清に酵素免疫分析を行うことによってマウスを決め、続いて細胞結合を行う。

20

【0025】

組み換え m PrP を注射した後、特定の抗体は脾臓内の B 細胞に発現する。特定の抗体とがん細胞とを結合させることによって体外培養できる細胞株を生成する。細胞株は特定の抗体を有する。本実験はまず抗原に対して免疫になるマウス (BALB/c mice) の脾臓と骨髄腫細胞株 NS - 1 とを結合させる。続いて HAT growth medium に細胞を培養するステップを進める。まず 90 個の穴を有する培養トレーを六つ用意する。六つの培養トレーに細胞を移し、7 から 14 日間培養し、細胞成長状態を観察する。続いて、三つの制限的な希釈法 (細胞を急速に希釈する方法、細胞を緩慢に希釈する方法および細胞計数法) に基づいて単一の親細胞からなるモノクローナル抗体を生成し、酵素免疫分析法およびウェスタンブロット法に基づいて特異性を確認する。確認結果により、三つの抗 m PrP モノクローナル抗体を有する細胞株 A2、A3、3B を選び出す (図 1 参照)。

30

【0026】

続いて、モノクローナル抗体を有する細胞株をマウスの腹腔内に注入し、成長させ、腹水から高濃度のモノクローナル抗体を得るステップを進める。モノクローナル抗体の細胞培養液において、HAT 培地はマウスに毒性反応を引き起こす。マウスの体内から高濃度のモノクローナル抗体を得るために、モノクローナル抗体を有する細胞株を選び出した後、マウスの体内に注入する前にそれらを一般の RPMI 培地に移さなければならない。続いて、腹水の中のモノクローナル抗体を純化するステップを進める。0.5 ml の protein G plus protein A agrose を試験管柱に入れ、そののち 1 ml の 1X PBS で agrose を洗浄し、続いて 1X PBS と同量で混合して合わせて 6 ml となる腹水を試験管柱に加え、試験管柱内に 3 から 5 回循環させ、そののち 5 ml の 1X PBS で agrose を洗浄する。続いて 10 ml の 0.5 M NaOAC

40

50

(pH = 3) + 0.01%アジ化ナトリウム(sodium azide)を試験管柱に加え、抗体を純化し、3から5回繰り返し、そのうち2.5 mlの2M Tris base + 0.01%アジ化ナトリウムを、純化を一回繰り返して得た抗体に加え、pHバランスを取る。続いて5 mlの10 mMグリシン(pH = 3) + 0.01%アジ化ナトリウムを試験管柱に加え、抗体を純化し、3から5回繰り返し、そのうち1.25 mlの2M Tris base + 0.01%アジ化ナトリウムを、純化を二回繰り返して得た抗体に加え、pHバランスを取る。続いて二回別々取った抗体を遠心濃縮チューブに混合させ、遠心濃縮チューブによって1 ml以下に濃縮し、定量し、そのうち、試験管に100 µgずつの量(ファージ発現技術に用いる)を入れ、残りを-20 / -80 で保管する。

10

【0027】

(抗m PrPモノクローナル抗体(mAb) A2、A3、3Bのアイソフォームの鑑定)

まず96個の穴を有する免疫酵素分析トレーに2.5 µg/mlの免疫グロブリンを付着させる。続いて、一つは培養中に腫瘍細胞と結合したA2、A3、3B培養液の上澄み液を使用する。一つは異なる免疫グロブリン(HRPと結合して重鎖のIgA、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3を識別する抗体およびHRPと結合して軽鎖の鎖および鎖を識別する抗体)を使用する。続いて490波長を読み取ることによってモノクローナル抗体の免疫グロブリンの重鎖および軽鎖を発現する。結果により、本発明により作られた三つの抗m PrPモノクローナル抗体A2、A3、3Bの免疫グロブリンは重鎖がIgM、軽鎖が鎖であることが判明した。(図2参照)

20

モノクローナル抗体A2、A3、3Bによって量が異なるm PrPおよび組み換え型ウシPrPを識別する差異を、dot plot方式で比較する。

【0028】

本来(native)の構造を維持したうえで異なる立体構造で存在する同じ動物種のPrPをドットプロット(Dot blot)法に基づいて分析する。m PrPはモノマー(monomer)で存在する。m PrPはオリゴマー(oligomer)で存在する。5 µg、1 µg、0.5 µg、0.1 µgのm PrPおよびm PrPをPVDF膜に点状に分布させ、そのうち5%の牛乳を加え(blocking)、異なる倍率で希釈したモノクローナル抗体(mAb) A2、A3、3Bを反応させ、一級抗体を生成し、そしてマウスの免疫前血清を負対照組として反応を進行させる。結果は図3に示したとおりである。

30

【0029】

図3Aに示すように、モノクローナル抗体A2の濃度が10 µg/mlから50 µg/mlの間である場合、m PrPを識別する限界が比較的よいだけでなく、0.1 µgのタンパク質を検出することができる。5 µgのm PrPを測定する際、1 µgのタンパク質を検出することができる。一方、濃度が1 µg/mlのモノクローナル抗体A2は10 µgのm PrPに反応し、微弱な信号を生じるが、m PrPには反応しない。図3Bに示すように、モノクローナル抗体A3の濃度が10 µg/mlから50 µg/mlの間である場合、m PrPを識別する信号はm PrPを識別する信号より比較的よく、特に星マークで示したところがさらに著しい。一方、抗体の濃度が1 µg/mlである場合、上述した二つのタンパク質を識別する差はあまりない。図3Cに示すように、モノクローナル抗体3Bの濃度が1 µg/mlから20 µg/mlの間である場合、5 µgのm PrPを識別する状態がm PrPを識別する状態より良好である。モノクローナル抗体3Bの濃度が50 µg/mlである場合、0.1 µgのm PrPを識別する状態がm PrPを識別する状態より良好である。それ以外の違いはあまりない。上述した内容をまとめてみると、三つのモノクローナル抗体A2、A3、3Bはm PrPまたはm PrPを識別でき、特に濃度が10 µg/mlから50 µg/mlの間である場合、m PrPより、m PrPに対する検査限界が比較的よい。

40

【0030】

50

モノクローナル抗体 A 2、A 3、3 B によって m Pr P および Pr P を識別する差異を、E L I S A 方法によって分析する、即ち E L I S A 分析を進める。まず、それぞれのモノクローナル抗体の異なるタンパク質を識別する状態を数値化して表現する。続いて 2 0 0 n g / w e l l のマウスの m Pr P および Pr P を免疫酵素分析トレーの穴に別々に付着させ、続いて、異なる倍率で希釈したモノクローナル抗体 (m A b) A 2、A 3、3 B を第一抗体、抗マウスの I g M (1 : 4 0 0 0) 抗体を第二抗体にして反応を進行させる。続いて O P D によって着色を行う。結果により、モノクローナル抗体 A 2、A 3、3 B は濃度が 1 μ g / m l から 2 0 0 μ g / m l の間である際、m Pr P に対する識別能力が m Pr P に対する識別能力より高い (図 4 参照)。組み換えタンパク質を識別した結果は図 1 に示した結果を含み、タンパク質が本来の状態 (n a t i v e) を維持した上で存在することを表示する。一方、本発明によるモノクローナル抗体は別の動物種 (ウシ) 由来の Pr P を識別でき、かつモノマーおよびオリゴマーに対する親和性が異なる。

10

【 0 0 3 1 】

(モノクローナル抗体のエピトープ配列の分析)

(ペプチドスキャン (p e p t i d e s c a n) による分析)

9 3 から 2 3 0 の m Pr P 配列を 2 2 段に分割する。一つの段は 1 2 個のアミノ酸から組成され、かつ六つのアミノ酸リピートを有する。9 6 個の穴を有する免疫酵素分析トレーにこれらのペプチドフラグメントを付着させ、E L I S A 分析を進める。一つは純化されたモノクローナル抗体 A 2、A 3、3 B を使用し、かつ H R P と結合する抗マウス I g M ポリクローナル抗体を二次抗体として使用する。

20

【 0 0 3 2 】

・図 5 に示すように、ペプチドスキャン結果により、モノクローナル抗体 A 3 のペプチドのエピトープは 1 4 1 - 1 5 2 G N D W E D R Y Y R E N (S E Q I D N O . 2) であるのに対し、モノクローナル抗体 A 2、3 B のペプチドのエピトープは同じ位置 1 7 1 - 1 8 2 Q N N F V H D A V C I T (S E Q I D N O . 3) であることが判明した。

【 0 0 3 3 】

(ファージ発現技術)

四回繰り返して選び出したファージ群落を任意に選び、その D N A を抽出し、配列整理を行う。配列を整理した結果は下記の通りである。配列の後の括弧は即ち (発現の回数 / 選び出した全部の配列数) を示す。太字は交差試験に出現した配列である。表の一番下の欄は統合できる配列である。下線は比較後出現した配列である。

30

【 0 0 3 4 】

【表 1】

抗体 (m A b) A 2	
ファージ群落の配列	<u>P</u> VSAVRP (5 / 1 0)
	TAP <u>V</u> SPI / S (2 / 1 0)
	PGQD <u>A</u> VM (1 / 1 0)
	GPRDPRD (1 / 1 0)
	TAAG-S- (1 / 1 0)
エピトープ	1 6 4 - R <u>P</u> <u>V</u> <u>D</u> Q Y S N Q N N F V H D <u>A</u> <u>V</u> C I T - 1 8 2

40

【 0 0 3 5 】

【表 2】

抗体 (mAb) A 3	
ファージ群落の配列	RVNTK L/P I (11/20) LKTRVIS (5/20) TPARHIY (1/20) AYPSAHR (1/20) - RLVLF- (1/20)
エピトープ	NA

10

【0036】

【表 3】

抗体 (mAb) 3 B	
ファージ群落の配列	D I P Y Q Q F / S (10 / 20) R P K x x x x (1/20) A S N R P Y V (7/20) I T L S G G I (1/20) T P P R H I Y (1/20)
エピトープ	23-MKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGS P-45 P G Q G S P - 4 5

20

【0037】

上述した結果により、モノクローナル抗体 A 2 は 5 種のファージ配列が出現し、交差試験に繰り返して出現したマウス PrP に対応する配列が 163 - R P V D Q Y S N Q N N F V H D A V C I T - 182 (SEQ ID NO. 4) である。モノクローナル抗体 A 3 は 5 種の配列が出現するが、対応する配列が見付からない。モノクローナル抗体 3 B は 5 種の配列から統合され、N 端位置に近い 23 - M K K R P K P G G W N T G G S R Y P G Q G S P - 45 (SEQ ID NO. 5) の三つの抗体のエピトープが見付かった。

30

【0038】

上述により、モノクローナル抗体 A 3 のエピトープは G N D W E D R Y Y R E N (SEQ ID NO. 2) である。モノクローナル抗体 A 2、3 B のエピトープは同じ位置 171 - 182 Q N N F V H D A V C I T (SEQ ID NO. 3) である。三種のモノクローナル抗体のエピトープは異なる動物種のアミノ酸配列に対し、高度保留性を有する。

40

【0039】

(正常なマウスの脳組織および感染したマウスの脳組織の抗 PrP^{Sc}モノクローナル抗体による識別)

(ウェスタンブロット法に基づいた分析)

本実験は正常なマウスの脳組織ホモジネートおよび感染したマウスの脳組織ホモジネートをモノクローナル抗体 A 2、A 3、3 B によって識別する差異を、ウェスタンブロット法に基づいて分析する。標本は、正常なマウスの脳組織ホモジネート NBH (lane 3, 4, 7, 8, 11, 12, 14, 15) および感染型 PrP^{Sc} (10% 22L) を含有したマウスの脳組織ホモジネート (lane 1, 2, 5

50

、 6、9、10、13)である。標本において、50 μ g/mlのプロテアーゼK処理を37で1時間行うステップを受ければ(+)で表示し、受けなければ(-)で表示する。続いて5mMのPMSFを加え、処理を10分間行い、そののち反応を中止させる。続いて反応が起こったサンプルをSDS-PAGEによってPVDF膜に点状に分布させ、一級抗体即ちモノクローナル抗体A2、A3、3B、SAF32と、二級抗体即ちHRPと結合する抗マウスIgM、IgG抗体(1:10000)とを反応させ、続いてECLによって着色処理を行う。

【0040】

ウェスタンブロット法に基づいて分析した結果により、プロテアーゼK処理を受けなかった本発明によるモノクローナル抗体はPrP^{Sc}を識別でき、それぞれのグリコシル化を識別するパターンが異なり、識別信号の強さが正常なマウスの脳組織に対する識別信号より大きい(図6参照)。上述した結果により、本発明によるモノクローナル抗体は、タンパク質分解酵素処理を行う必要なく、臨床病状の発症前に生体状態を維持したうえで抽出した標本から直接PrP^{Sc}を特異的に識別する診断法および診断キットに適用できるため、標本処理および検出にかかる手間を効果的に省くことができることが判明した。

【0041】

(免疫組織化学的染色(Immunohistochemistry))

本発明により作られた三つのPrPを識別できるモノクローナル抗体A2、A3、3Bにより、22L PrP^{Sc}に感染して病変したマウスの脳組織切片および正常なマウスの脳組織切片(normal control)に免疫組織化学的染色を行い、マウスの脳組織に出現したPrP^{Sc}の状態を検査する。まず正常なマウスの脳組織(normal control)および感染したマウスの脳組織を染色し、そののち顕微鏡(100倍および200倍)で小脳を観察し、写真を取ると同時に、マウスの免疫前(Pre-immune)血清からなる陰性対照組(Negative control)と比較する。結果は図7に示した通りである。

【0042】

切片を免疫組織化学的に染色した結果により、染色されたモノクローナル抗体A2は小脳皮質の顆粒層および分子層の神経細胞の近くに分布する斑点状(plaque)信号を呈示する。染色されたモノクローナル抗体3Bは小脳の顆粒層および分子層に斑点状に分布する信号を呈示する。それに対し、モノクローナル抗体A3の免疫組織化学的染色によって呈示された信号は小脳白質(white matter)に拡散(diffuse)する。一方、染色された正常なマウスの脳組織にはこれらの抗体が明確な信号を呈示しない。

【0043】

本発明によるモノクローナル抗体のエピトープは異なる動物種に対し、高度保留性を有するため、異なる動物種の感染型プリオンタンパク質の検出およびプリオン病の検査に適用することができる。プリオン病は動物に発症する狂牛病(BSE)およびスクレイピー(Scrapie)と、人間に発症するタイプが異なるクロイツフェルト・ヤコブ病CJD(散发性(sporadic)CJD、変異型(variant)CJD、医原性(atrogenic)CJD、遺伝性(familial)CJDなど)とを含む。一方、本発明によるモノクローナル抗体はPrP^{Sc}に対する臨床検査、例えば組織切片上の抗体染色およびCapture EIA法による血液検査、脳脊髄液検体に適用できるほかに、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance、略称SPR)技法に合わせることで検査限界および感度を向上させることができる。

【0044】

(ほかの実施形態)

本説明により提示されたあらゆる特徴は任意の方法によって組み合わせることができる。本発明により提示された特徴は目的が同じ特徴または目的に似ている特徴に取り替えられてもよい。したがって、特別に明確に表示しない限り、本発明により提示された特徴は系列が同等な実施形態または類似した実施形態である。

10

20

30

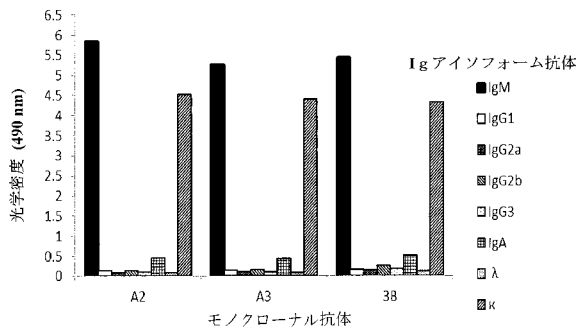
40

50

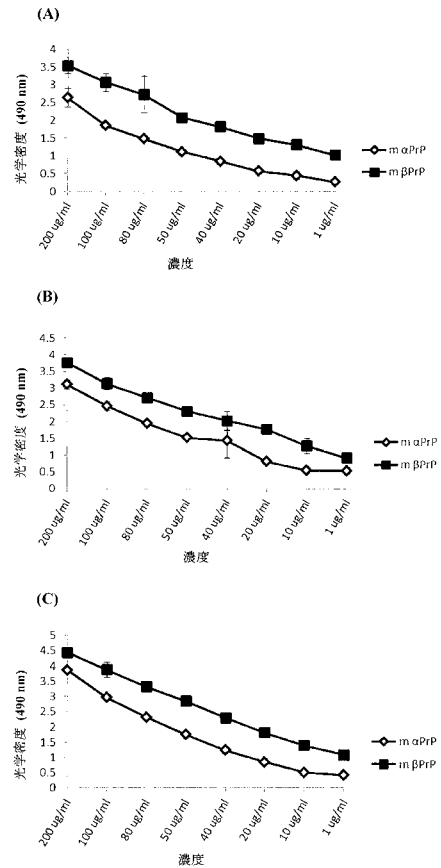
【 0 0 4 5 】

この技術を熟知している人ならば、上述した説明により本発明の基本特徴を容易に理解できる。発明の趣旨を逸脱しない範囲において変更、修正および別の用途に適用する状況は本発明の請求範囲に属すべきである。

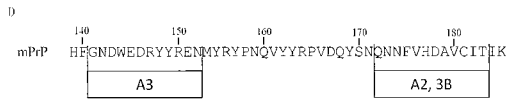
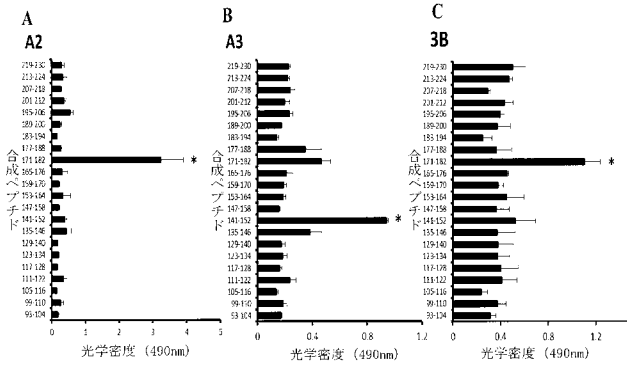
【 図 2 】



【 図 4 】

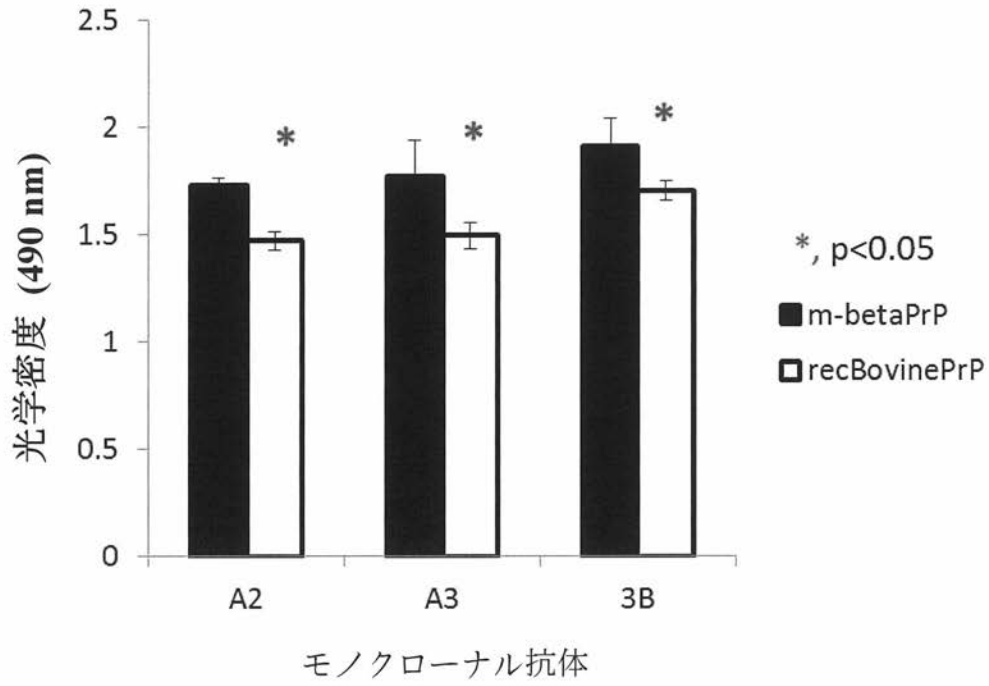


【 図 5 】

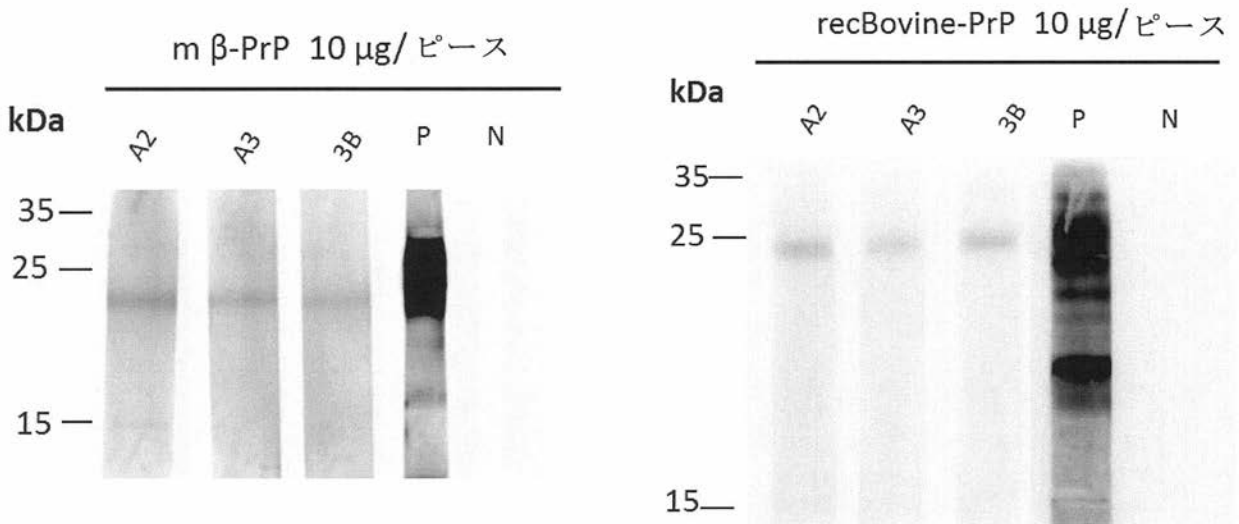


【 図 1 】

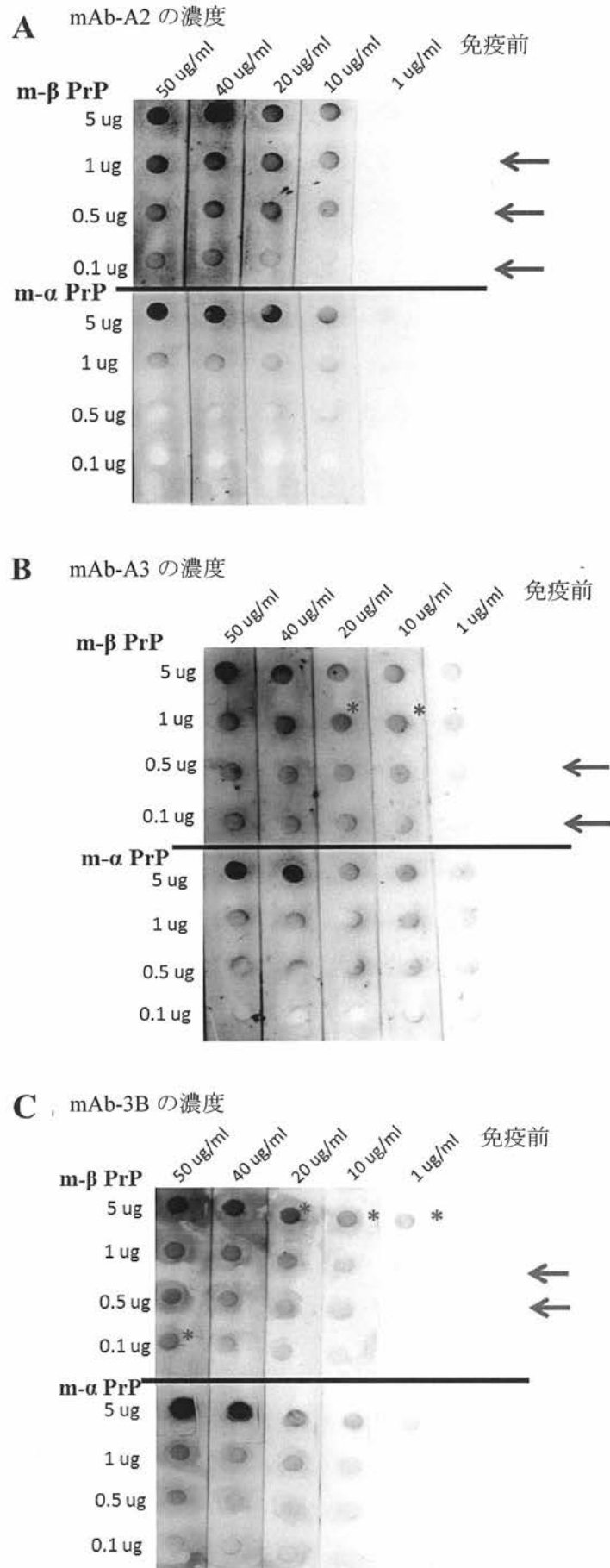
A.



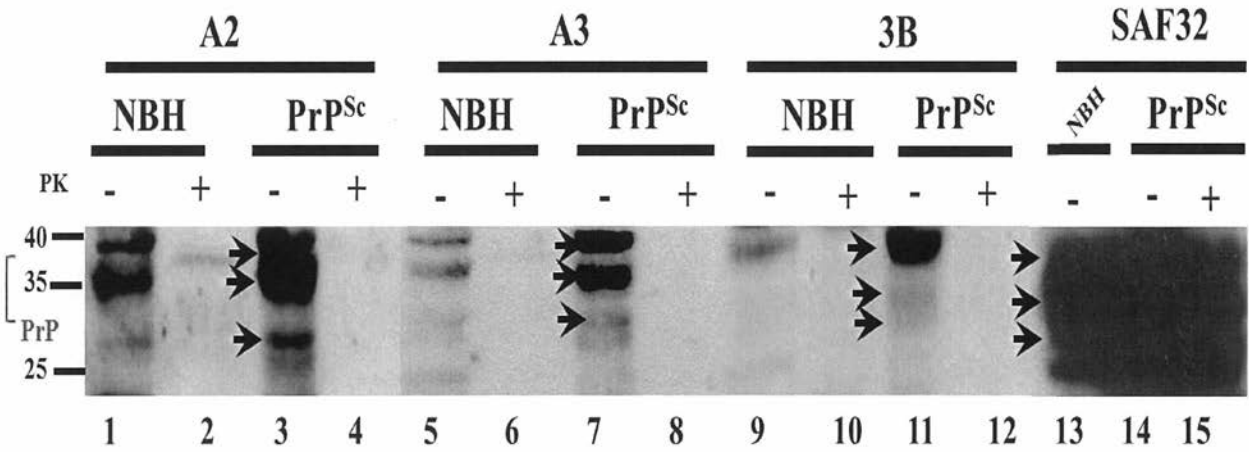
B.



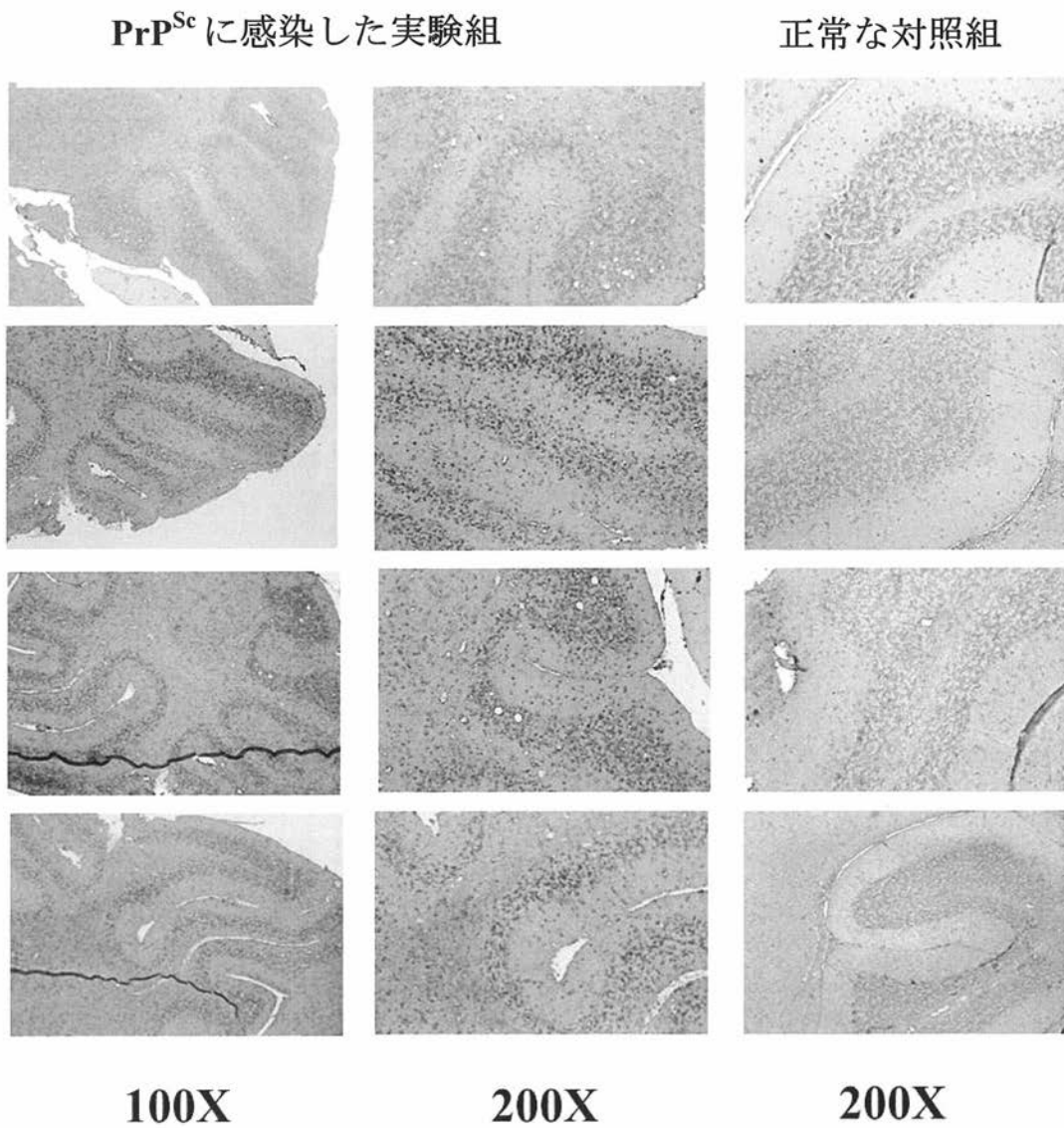
【 図 3 】



【 図 6 】



【 図 7 】



专利名称(译)	能够区分感染性朊病毒蛋白的单克隆抗体和使用其的诊断试剂盒		
公开(公告)号	JP2014125487A	公开(公告)日	2014-07-07
申请号	JP2013253994	申请日	2013-12-09
[标]申请(专利权)人(译)	国立阳明大学		
申请(专利权)人(译)	国立阳明大学		
[标]发明人	陳宜民 黄思惟 林盈ゆい		
发明人	陳宜民 ▲黄▼思惟 林盈▲ゆい▼		
IPC分类号	C07K16/18 C12P21/08 C12P21/02 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5308 C07K16/2872 C07K2317/33 C07K2317/34 G01N33/6896 G01N2800/2828		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12P21/08 C12P21/02.C G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	101149718 2012-12-25 TW		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种能够区分感染性朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 的单克隆抗体以及使用该单克隆抗体的诊断试剂盒。能够区分感染性朊病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 的单克隆抗体与具有由特定序列组成的氨基酸序列的pr病毒蛋白的肽结合。另外，能够鉴定感染性病毒蛋白 (PrP^{Sc}) 的单克隆抗体可以鉴定具有β-折叠结构的α病毒蛋白。朊病毒蛋白产生β寡聚体。[选型图]图1

