

—最近における動物衛生研究情報 (XI)—

抗プリオンタンパク質モノクローナル抗体の開発と
単鎖型可変領域フラグメント抗体の作出

田川裕一[†] (動物衛生研究所細菌・寄生虫研究領域長)



プリオン病は伝達性海綿状脳症とも呼ばれ、牛海綿状脳症 (BSE)、鹿の慢性消耗病、羊や山羊のスクレイピーや人のクロイツフェルト・ヤコブ病といった神経変性疾患が含まれる。プリオン病の伝達に関わる因子、すなわちプリオン

は主として界面活性剤に不溶性で、プロテアーゼによる消化を受けにくい異常プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) から成るが、PrP^{Sc}は細胞が元より発現しているプリオンタンパク質 (PrP) の正常型 (PrP^C) が異常型に変換したものであり、このPrP^CからPrP^{Sc}への変換がプリオン病の発病機序の中心的な出来事と考えられている [1]。プリオン病に罹患すると、PrP^{Sc}が脳内に蓄積し、海綿状変化、神経細胞の変性・脱落と星膠細胞の増生を特徴とした神経変性病変が観察される。プリオン病の実験室内診断は脳に蓄積したPrP^{Sc}を免疫学的に検出することによるため、PrPと特異的に結合できる抗体は、プリオン病の診断技術を高度化させていく上できわめて有用である。また、細胞表面に分布するPrP^Cと特異的に結合できる抗体のなかには、PrP^CからPrP^{Sc}への変換に際して起きると考えられるPrP^CとPrP^{Sc}の相互作用を阻止することによりプリオン持続感染細胞におけるPrP^{Sc}の蓄積を抑制するものが確認されている [2, 3]。また、抗PrP抗体遺伝子導入マウスではプリオンを接種してもプリオン病の発病が阻止される [4]。一方で、抗体の投与がプリオン病発病阻止効果を示すのは、末梢からのプリオン感染と同時に、もしくはごく短期間の間に投与された場合に限られる [5]が、その理由として投与された抗体が血管から組織内、特に中枢神経系には到達しにくいことが挙げられる。さらに、PrP^Cと反応する抗体を脳内に投与すると、海馬や小脳の神経細胞がアポトーシスを起こすことが報告されている [6]が、このことは抗体の結合によってPrP^C分子間の架橋形成や分子の集積が起こって、異常なシグナル伝達が生じることが原因と考えられている。抗PrP

抗体を効率よく中枢神経系に到達させ、抗体投与の副作用を避けるための方法の一つとして、抗体を単鎖型可変領域フラグメント (scFv) 抗体化すること、すなわち抗原との結合部位である抗体可変領域をリンカー配列と呼ぶポリペプチド鎖で遺伝子工学的につなぐこと [7-9]が挙げられる。抗体は重鎖と軽鎖各2本のポリペプチド鎖から成る大きな分子であるため、そのままでは遺伝子導入ベクターを用いた遺伝子操作には適さない。しかし、抗体遺伝子をクローニングし、scFv抗体遺伝子として再構築してしまえば、scFvは分子量も小さく、構造もシンプルであるため、遺伝子操作そのものが容易になると同時に、細胞への遺伝子導入も容易となる。現在、ファージディスプレイシステムを用いて抗体のscFv化クローンを分離することは比較的簡単に実施可能である。本研究ではPrPに対する新規モノクローナル抗体 (mAb) を開発するとともに、抗体遺伝子をクローニングして、プリオン増殖抑制効果をもつscFv抗体を作出することを目的とした。

1 抗PrPモノクローナル抗体の作製

PrPは正常細胞が発現しているタンパク質であるため、マウスのPrPで、通常のマウスを免疫しても、異物とは認識されず、抗体応答が認められない。この問題点を解決するために、マウス組換えPrPでプリオン遺伝子ノックアウトマウスを免疫する手法を試み、20クローン以上の抗体産生ハイブリドームを作出することができた。そのなかから、T1とT2と名付けた抗体の性状について詳細に検討したので、以下に紹介したい。

性状解析を進めたmAb T1及びT2はいずれも、マウスのPrPはもちろん、ハムスター、羊、牛、鹿のPrPと反応し、さらに、人のPrPとも反応することを確認した。T1、T2ともにプリオン病の診断技術の一つであるウエスタンブロット法でさまざまな動物種のPrP^{Sc}を検出することが可能であった (図1)。なお、T2はわが国のBSEの確定検査用の抗体の一つに採用されている。さらに、民間メーカーとの共同研究によって開発された

[†] 連絡責任者：田川裕一 (独農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所)

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5 ☎029-838-7743 FAX 029-838-7967 E-mail: ytagawa@affrc.go.jp

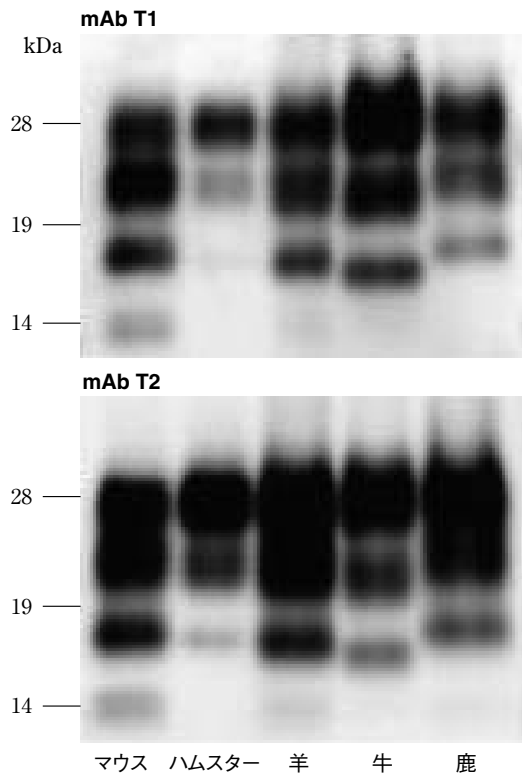


図1 モノクローナル抗体の各動物種由来のPrP^{Sc}との反応

プリオン感染動物（マウス、ハムスター、羊、牛及び鹿）の脳乳剤をプロテアーゼKで処理したものを抗原としてウェスタンブロット法に用いた。抗原を転写したメンブレンをmAb T1及びT2と反応させ、さらにHRP標識2次抗体と反応後、ケミルミネッセンス試薬を用いて抗原抗体反応シグナルを検出した。

BSE診断用ELISAキットには、作出したmAbが利用されている。現在、キットは実用化され、診断に活用されている。

mAbの抗原認識部位（エピトープ）を明らかにするために、マウスPrPのN末側及びC末側からさまざまな程度にアミノ酸配列を欠失させた組換えPrPを作製して、mAbとの反応を観察した結果、mAb T1はマウスのアミノ酸残基番号で132-146の領域内にエピトープが存在することが示された。一方、mAb T2の反応には少なくとも132-156の領域が含まれることが必要であるが、マウス免疫に用いた組換えPrP（121-231の領域）と同等の強さの抗体との反応を得るにはC末側の212-217の領域も必要であり、mAb T2はPrP分子内の不連続な領域で構成される抗原エピトープを認識していることが示された。さらに、PrPのアミノ酸配列情報を基にして配列を数残基ずつずらして設計した多数のペプチドをナイロン膜上に合成したエピトープ同定用のPepspot膜を作製し、これをmAbと反応させてエピトープマッピングを行った結果、mAb T1のエピトープはアミノ酸残基137-143（MIHFGND）であることが判

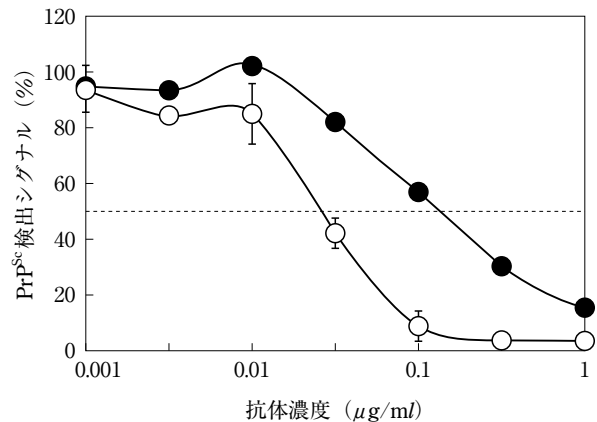


図2 モノクローナル抗体T2と6H4のプリオン増殖抑制効果

プリオン持続感染細胞株ScN2aを0.001-1 μg/mlの濃度の抗体存在下で4日間培養後、PrP^{Sc}量をSeprion-ligand [11]を用いたELISA法によって測定した。○はT2, ●は6H4存在下でのPrP^{Sc}量を示す。

明した。一方、mAb T2はPepspot膜上のいずれの合成ペプチドとも反応せず、この結果はmAb T2のエピトープが不連続エピトープであるという上記の結果と一致している。

mAb T1とT2が細胞膜上の存在するPrP^Cと反応するかどうかを知るために、株化神経芽腫細胞N2aを用いたフローサイトメトリー解析を行った結果、mAb T2は細胞膜上のPrP^Cと反応するが、mAb T1では反応が認められず、細胞膜に穴を開けて、抗体が細胞内に到達できるようにすると、反応が認められた。mAb T1が細胞内部のPrP^Cとのみ反応するという結果は、細胞膜上に局在化しているPrP^Cと細胞内部に存在するPrP^Cでは立体構造に違いがあるためか、あるいは細胞膜上ではPrP^Cと他の分子との間の相互作用によってmAb T1の結合が抑制されているためと考えられる。

次に、mAb T1及びT2についてプリオン持続感染株化細胞（ScN2a）への抗体添加によるプリオン増殖抑制効果の有無を検討したところ、T1には抑制効果が認められなかったが、T2には極めて高いプリオン増殖抑制効果が認められた。効果の程度の指標とされる50%阻止濃度を測定したところ、プリオン増殖抑制効果を持つことが確認されているmAb 6H4が0.13 μg/mlであったのに対し、mAb T2は0.02 μg/mlであり（図2）、これまでに報告されている抗体のうち、最も阻止効果の高いもの [3, 10] に匹敵することが確認できた。

2 抗体遺伝子のクローニングとscFv抗体遺伝子導入細胞の作出

低分子化した抗体や、遺伝子を利用した脳内への抗体のデリバリーを想定して、mAb T2産生ハイブリドーマから抗体遺伝子の可変領域をクローニングし、図3に示

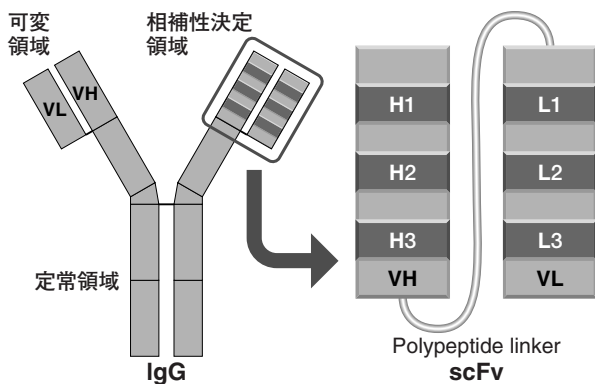


図3 単鎖型可変領域フラグメント (scFv) 抗体の作出

モノクローナル抗体の2つの可変領域 (VH 及び VL) をそれぞれRT-PCR後、ファージディスプレイベクターにクローニングすることにより、2つの可変領域をリンカー配列で結合した単鎖型可変領域フラグメント (scFv) 抗体として発現させることができる。

したように、scFv 抗体として発現できるように遺伝子を加工した。このように加工した scFv DNA 断片をファージディスプレイ用のベクターにクローニングして、scFv 抗体をファージ粒子表面タンパク質との融合タンパク質として発現させ、ファージ粒子と組換え PrP との結合反応を観察することによって、PrP との結合能をもつ mAb T2 の scFv 抗体すなわち、scFv T2 を産生するファージクローンを選別した。scFv 化した場合に抗原との結合能を消失してしまう抗体のあることが知られているが、mAb T2 は scFv 化しても PrP との高い結合能を保持していた。次に PrP との結合能をもつファージクローンから scFv T2 遺伝子領域に相当する DNA を切り出し、動物細胞分泌発現用プラスミドベクターへのサブクローニング操作を行った。このようにして作製した scFv T2 動物細胞分泌発現用プラスミドを神経芽腫細胞株ヘトランスフェクトさせ、選択剤添加条件下で細胞を継代培養したのち、scFv T2 を細胞外に安定的に分泌産生する細胞株を作出した。この scFv T2 産生細胞とプリオン持続感染 ScN2a 細胞を同じ培養器内で培養すると、ScN2a 細胞のプリオン増殖が抑制されることを確認した (図4)。T2 は scFv 化しても、mAb T2 と同様に PrP との結合能、さらにはプリオン増殖抑制能を保持していることが明らかとなった。

以上のように、PrP と特異的に結合する mAb はプリオン病の診断技術の高度化に有用であり、また、scFv 化した T2 はプリオン増殖抑制効果を保持していることから、抗体遺伝子を活用したプリオン病の防除技術を開発していくための研究資料として有用と考えている。

引用文献

[1] Prusiner SB : Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie, *Science*, 216, 136-144 (1982)

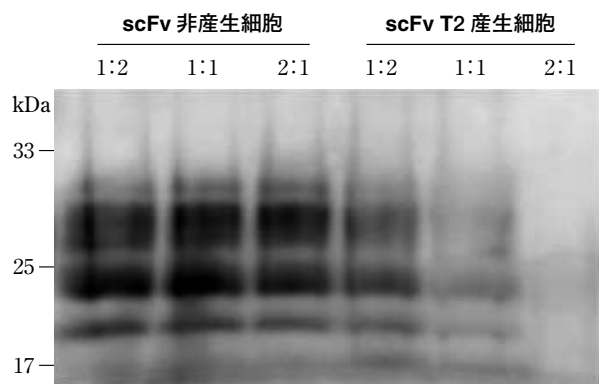


図4 分泌発現 scFv T2 抗体によるプリオン増殖抑制効果

scFv T2 抗体を安定に産生する N2a 58 細胞株 (scFv T2 抗体産生細胞) を作出し、この細胞とプリオン持続感染細胞株 ScN2a とを同じ培養器内で4日間培養した後、ウェスタンブロット法によって PrP^{Sc} を検出した。対照として N2a 58 細胞 (scFv 非産生細胞) を用いた。写真上の数字は共存させた2種類の細胞の細胞数の比 (scFv T2 産生または非産生細胞 : ScN2a) を示す。

[2] Enari M, Flechsig E, Weissmann C : Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody, *Proc Natl Acad Sci*, 98, 9295-9299 (2001)

[3] Peretz D, Williamson RA, Kaneko K, Vergara J, Leclerc E, Schmitt-Ulms G, Mehlhorn IR, Legname G, Wormald MR, Rudd PM, Dwek RA, Burton DR, Prusiner SB : Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity, *Nature*, 412, 739-743 (2001)

[4] Heppner FL, Musahl C, Arrighi I, Klein MA, Rulicke T, Oesch B, Zinkernagel RM, Kalinke U, Aguzzi A. : Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies, *Science*, 294, 178-182 (2001)

[5] White AR, Hawke SH : Immunotherapy as a therapeutic treatment for neurodegenerative disorders, *J Neurochem*, 87, 801-808 (2003)

[6] Solfrosi L, Criado JR, McGavern DB, Wirz S, Sanchez-Alavez M, Sugama S, DeGiorgio LA, Volpe BT, Wiseman E, Abalos G, Masliah E, Gilden D, Oldstone MB, Conti B, Williamson RA : Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis *in vivo*, *Science*, 303, 1514-1516 (2004)

[7] Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G : Making antibody fragments using phage display libraries, *Nature*, 352, 624-628 (1991)

[8] Marks JD, Hoogenboom HR, Bonner TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G : By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage, *J Mol Biol*, 222, 581-597 (1991)

[9] McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ : Phage antibodies : filamentous phage displaying antibody variable domains, *Nature*, 348, 552-554 (1990)

[10] Feraudet C, Morel N, Simon S, Volland H, Frobert Y,

Creminon C, Vilette D, Lehmann S, Grassi J : Screening of 145 antiPrP monoclonal antibodies for their capacity to inhibit PrP^{Sc} replication in infected cells, J Biol Chem, 280, 11247-11258(2005)

[11] Lane AC, Stanley S, Dealler S, Wilson SM : Polymeric ligands with specificity for aggregated prion proteins, Clin Chem, 49, 1774-1775(2003)
