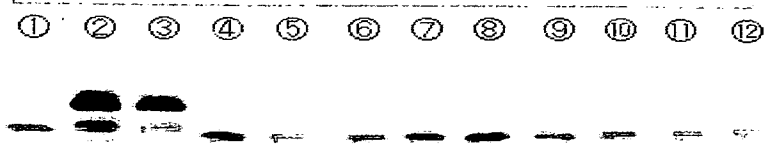
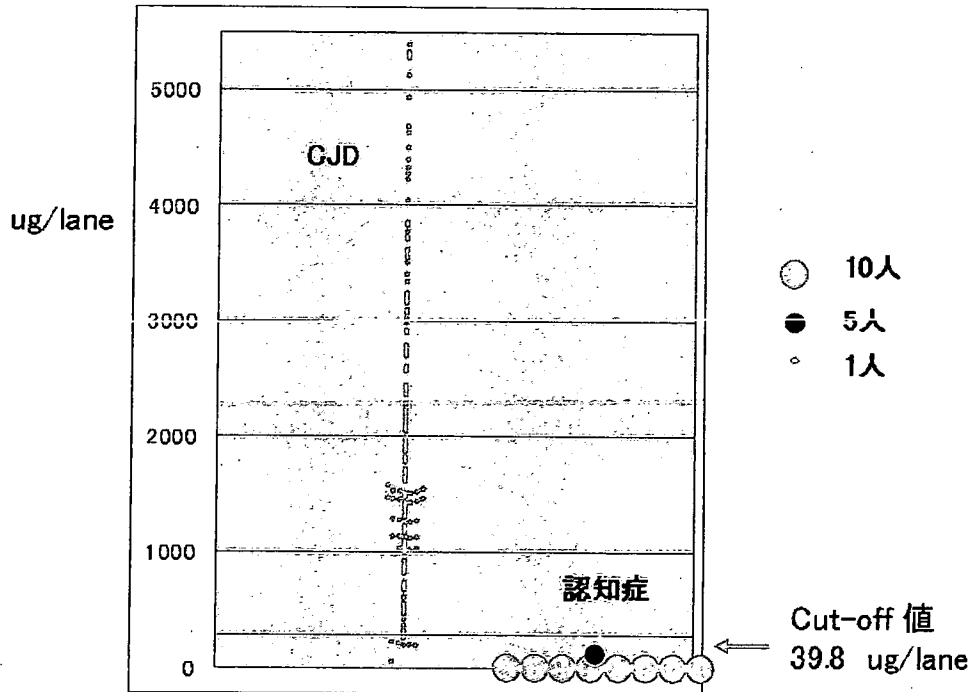


(図 1). CJD 患者の脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白  $\gamma$  アイソフォームの実際の結果 (半定量の結果)

- ①No.148 18.33 mg/lane    ②standard 25 mg/lane    ③standard 12.5 mg/lane  
 ④No.150 30.78 mg/lane    ⑤No.152 5.02 mg/lane    ⑥No.154 17.11 mg/lane  
 ⑦No.156 32.26 mg/lane    ⑨No.159 21.50 mg/lane    ⑩ No.163 17.76 mg/lane  
 ⑪No.164 6.74mg/lane    ⑫No.168 3.74 mg/lane



(図 2). CJD 患者とアルツハイマー型認知症 (ATD)患者での脳脊髄液中の 14-3-3 蛋白  $\gamma$  アイソフォームの半定量の結果 CJD 患者 112 症例 VS 認知症患者 93 症例



厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学 研究事業）  
分担研究報告書

抗プリオン蛋白抗体 single chain Fv による抗プリオン活性

分担研究者 坂口 未廣

研究協力者 藤田 浩司

研究要旨

抗プリオン蛋白抗体 Sh3.9 は、プリオン感染細胞の培養上清に混入すると、異常プリオン蛋白(PrP<sup>Sc</sup>)の産生を抑制し抗プリオン活性を示す。従って、Sh3.9 はプリオン病の治療に有用であると考えられる。しかし、抗体は巨大分子であるために血液脳関門を通過できず、また脳室内に直接持続注入しても生命維持に重要な深部領域まで浸透できない可能性が高い。つまりこれらのことは、Sh3.9 による治療効果が期待できないことを示唆している。本研究では、より分子量の小さい Sh3.9 single chain Fv (Sh3.9scFv) を 293T 細胞において作製することに成功した。Sh3.9scFv は、Sh3.9 と同様に、正常プリオン蛋白(PrP<sup>C</sup>)に結合し、22L 及び Chandler プリオン株の感染細胞において、PrP<sup>Sc</sup> の産生を抑制した。これらの結果は、Sh3.9scFv がプリオン病の治療に有用である可能性を示した。

A. 研究目的

我々は、抗プリオン蛋白抗体 Sh3.9 をプリオン感染マウスの脳室内に持続投与すると、脳内の異常プリオン蛋白(PrP<sup>Sc</sup>)は減少するが、潜伏期間や生存期間は有意に延長しないことを見出した（未発表）。おそらくこの理由は、抗体は分子量が大きいため生命維持等に重要な脳の深部領域まで効率よく浸透できなかったためと考えられた。そこで本研究では、より分子量の小さい Sh3.9 single chain Fv (Sh3.9scFv) を作製し、正常プリオン蛋白(PrP<sup>C</sup>)との結合能及び抗プリオン活性について検討した。

B. 研究方法

1. Sh3.9scFv の作製

Myc タグを付加した Sh3.9scFv cDNA をレンチウイルス発現ベクターに挿入した

construct を作製し、293T 細胞に transfection した。72 時間後に細胞溶解液と培養上清を回収し Western blotting に供し、Sh3.9scFv の発現を確認した。

2. ELISA 法

種々の量 (0、5、10、50、100 ng) の recombinant PrP をマイクロプレートに一晚固相化し、Sh3.9scFv 上清あるいは対照として empty vector を 293T 細胞に transfection した上清 (以下、Mock 上清) を各 100µl、1 時間反応させた。免疫複合体は、anti-myc Ab 及び anti-mouse IgG-HRP を用いて検出した。

3. Flow cytometry

PrP<sup>C</sup> 発現細胞 (HpL3-4TR)、PrP<sup>C</sup> 非発現細胞 (HpL3-4) を 10 cm dish で培養し、回収した。HpL3-4TR または HpL3-4 に、Sh3.9scFv 上清または Mock 上清 (各者 10

倍希釈または2倍希釈)を反応させた。シグナルは、anti-myc Ab 及び anti-mouse IgG (Alexa 546) を用い検出した。

#### 4. Sh3.9scFv の抗プリオン活性の検証

22L または Chandler プリオン株を感染させた N2a58 細胞を 6 well dish で培養し、その培養上清に Sh3.9scFv 上清 (10 $\mu$ l、100 $\mu$ l、または 1 ml)、Mock 上清 1 ml 及び Sh3.9 を 10 $\mu$ g 添加した。48~72 時間反応させた後細胞溶解液を回収し、Proteinase K (PK) 処理後、Western blotting (一次抗体 M-20、二次抗体 anti-goat IgG) に供し、PrP<sup>Sc</sup> の検出を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 293T 培養上清には Sh3.9scFv が大量に産生される

myc タグを付加した Sh3.9scFv cDNA を挿入した lentivirus 発現 vector を 293T 細胞に transfection し、その細胞溶解液と培養上清を Western blotting に供した。その結果、Sh3.9scFv が培養上清中に大量に産生されていることが分かった (図 1)。

#### 2. Sh3.9scFv は recombinant PrP と結合する

ELISA 法により、培養上清中の Sh3.9scFv の recombinant PrP に対する結合能について調べた。その結果、Mock 上清は、recombinant PrP の量に関わらず、低い OD 値を示した (図 2)。しかし、Sh3.9scFv は recombinant PrP の量に比例して、高い OD 値を示した。これらの結果は、Sh3.9scFv が recombinant PrP に特異的に結合することを示した (図 2)。

#### 3. Sh3.9scFv は細胞膜上の PrP<sup>C</sup> と結合する

Sh3.9scFv が細胞膜上に発現する native form の PrP<sup>C</sup> と結合するのか、Flow cytometry を用いて検討した。PrP<sup>C</sup> を発現する HpL3-4TR に、10 倍希釈と 2 倍希釈の Sh3.9scFv 上清を反応させた場合、シグナルの shift が認められた (図 3A)。しかし、Mock 上清を反応させた場合、シグナルの shift は観察されなかった (図 3B)。また、PrP<sup>C</sup> を発現しない HpL3-4 に反応させた場合、いずれの上清でもシグナルの shift はみられなかった (図 3C, D)。これらの結果は、Sh3.9scFv が細胞表面に発現する PrP<sup>C</sup> に特異的に結合することを示した。

#### 4. Sh3.9scFv はプリオン感染細胞の PrP<sup>Sc</sup> 産生を抑制する

Sh3.9scFv の抗プリオン活性について、22L プリオン株及び Chandler プリオン株に持続感染した N2a58 細胞を用いて検討した。Sh3.9scFv 上清及び Mock 上清を両方の感染細胞と 3 日間反応させ、細胞溶解液を PK にて処理した後 Western blotting を行った。Mock 上清を感染細胞に反応させても、感染細胞内の PrP<sup>Sc</sup> は減少しなかった (図 4)。しかし、Sh3.9scFv 上清を反応させると、Sh3.9scFv の量に比例して、PrP<sup>Sc</sup> の減少が認められた (図 4)。これらの結果は、Sh3.9scFv がプリオン株種には依存せず抗プリオン活性を発揮し、プリオン感染細胞の PrP<sup>Sc</sup> の産生を抑制することを示した。

### D. 考察

Single chain Fv 抗体は、分子量が全長抗体に比し小さく、局所へのデリバリーに適する。今回作製した Sh3.9scFv は、Sh3.9 全長抗体と同様に、PrP との特異的に結合

し、プリオン感染細胞の PrP<sup>Sc</sup> を減少させる効果を有していた。従って、プリオン病の治療において、Sh3.9scFv は Sh3.9 より高い有用性があると考えられる。現在我々は、Sh3.9scFv を発現させるためのレンチウイルスベクターを作製している。

#### E. 結論

抗プリオン活性を有する Sh3.9 抗体の scFv (Sh3.9scFv) を作製するのに成功した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sakaguchi S: Molecular biology of prion protein and its first homologous protein. *J. Med. Invest.* 2007; 54; 211-223.
2. Kim CK, Hirose Y, Sakudo A, Takeyama N, Kang CB, Taniuchi Y, Matsumoto Y, Itohara S, Sakaguchi S, Onodera T: Reduced response of splenocytes after mitogen-stimulation in the prion protein (PrP) gene-deficient mouse: PrPLP/Doppel production and cerebral degeneration. *BBRC* 2007; 358; 469-474.
3. Dong J, Li A, Yamaguchi N, Sakaguchi S, Harris DA: Doppel induces degeneration of cerebellar Purkinje cells independently of Bax. *Am J Pathol* 2007; 171; 599-607.
4. Nishimura T, Sakudo A, Hashiyama Y, Yachi A, Saeki K, Matsumoto Y, Ogawa M, Sakaguchi S, Itohara S, Onodera T: Serum withdrawal-induced apoptosis in Zrch I prion protein (PrP) gene-deficient neuronal cell line is suppressed by PrP, independent of Doppel. *Microbiol Immunol* 2007; 51; 457-66.
5. Miyazawa K, Kanaya T, Tanaka S, Takakura I, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Rose MT, Sakaguchi S, Katamine S, Yamaguchi T, Aso H: Immunohistochemical characterization of cell types expressing the cellular prion protein in the small intestine of cattle and mice. *Histochem Cell Biol* 2007; 127; 291-301.
6. Sakaguchi S, Arakawa T: Recent developments in mucosal vaccines against prion diseases. *Expert Rev Vaccines* 2007; 6; 75-85.
7. Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Yamaguchi Y, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S: Immunization with recombinant bovine but not mouse prion protein delays the onset of disease in mice inoculated with a mouse-adapted prion. *Vaccine* 2007; 25; 985-992.
8. Yoshikawa D, Kopacek J, Yamaguchi N, Ishibashi D,

Yamanaka H, Yamaguchi Y, Katamine S, Sakaguchi S: Newly established *in vitro* system with fluorescent proteins shows that abnormal expression of downstream prion protein-like protein in mice is probably due to functional disconnection between splicing and 3' formation of prion protein pre-mRNA. *Gene* 2007; 386; 139-146.

## 2. 学会発表

1. 坂口末廣 教育講演：プリオン病：その発症から治療、そして予防まで。第 18 回日本臨床微生物学会総会

長崎ブリックホール。2007・2/17-18.

2. 坂口末廣 特別講演：プリオン病におけるプリオン蛋白の役割。第 23 回中国四国ウイルス研究会 松山市道後 にぎたつ会館。2007・6/16-17.
3. 坂口末廣 プリオン病におけるプリオン蛋白の役割。第 4 回公開シンポジウム 蛋白質機能制御と疾患治療戦略 長井記念ホール(徳島大学蔵本キャンパス)。2007・11/22.

## G. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

細胞 培養上清

Sh3.9  
(-) Mock scFv (-) Mock scFv

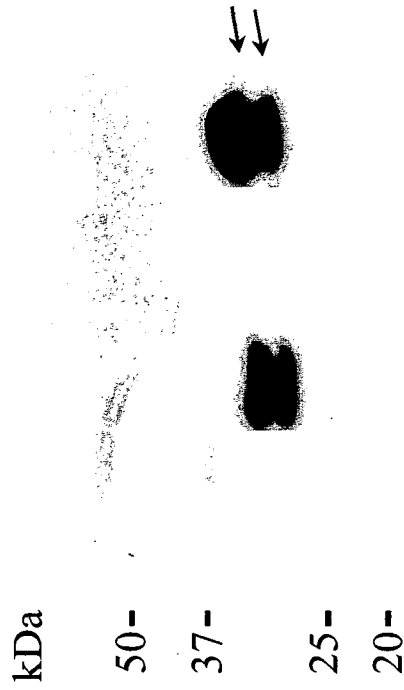


図1 Sh3.9scFv は培養上清中に大量に放出される。Sh3.9scFv cDNA をレンチウイルス発現vectorに挿入したconstructをtransfectionした293T細胞の細胞溶解液及び培養上清のWestern blottingを行った。細胞溶解液及び培養上清中にSh3.9scFvが大量に検出された(矢印)。(-)はtransfectionの操作を行っていない細胞溶解液及び培養上清を、Mockはempty vectorをtransfectionした細胞溶解液及び培養上清を示す。

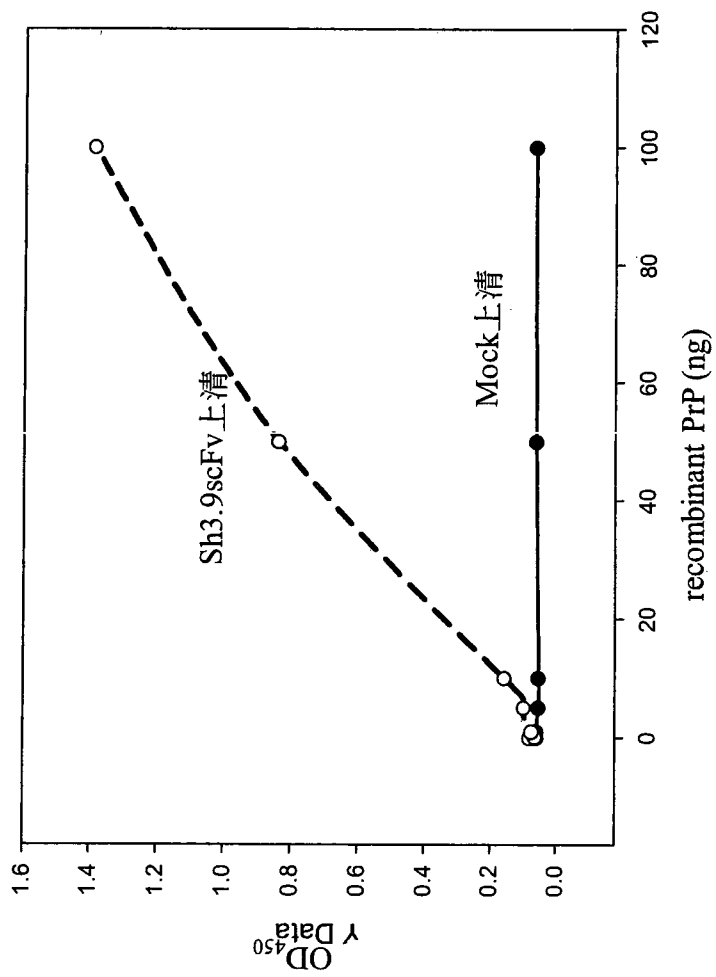


図2 Recombinant PrPに対するSh3.9scFvのELISA。Sh3.9scFv上清では、recombinant PrP量に比例してOD値の上昇を認めた。一方、Mock上清では、recombinant PrP量に関係なく低いOD値を示した。

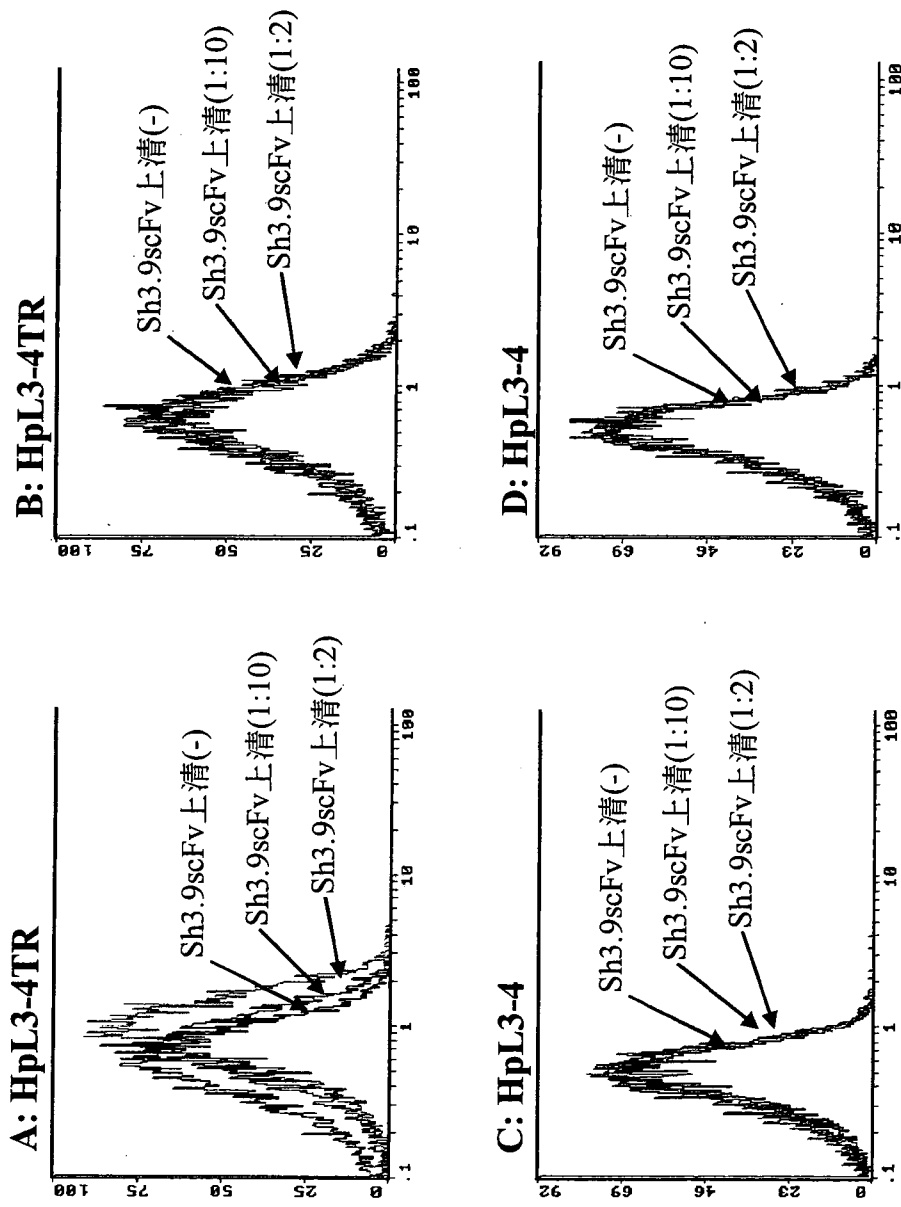


図3 PrP<sup>C</sup>発現(HpL3-4TR)および非発現細胞(HpL3-4)を用いたSh3.9scFvのFlow cytometry。A: PrP<sup>C</sup>を発現するHpL3-4 TRにSh3.9scFv上清を反応させると、シグナルのshiftが見られた。B: 同じくHpL3-4 TRにMock上清を反応させた場合、シグナルのshiftは観察されなかった。PrP<sup>C</sup>を発現しないHpL3-4を用いた場合、Sh3.9scFv上清(C)及びMock上清(D)のいずれもシグナルのshiftを示さなかった。



Chandler株 感染細胞

22L株 感染細胞

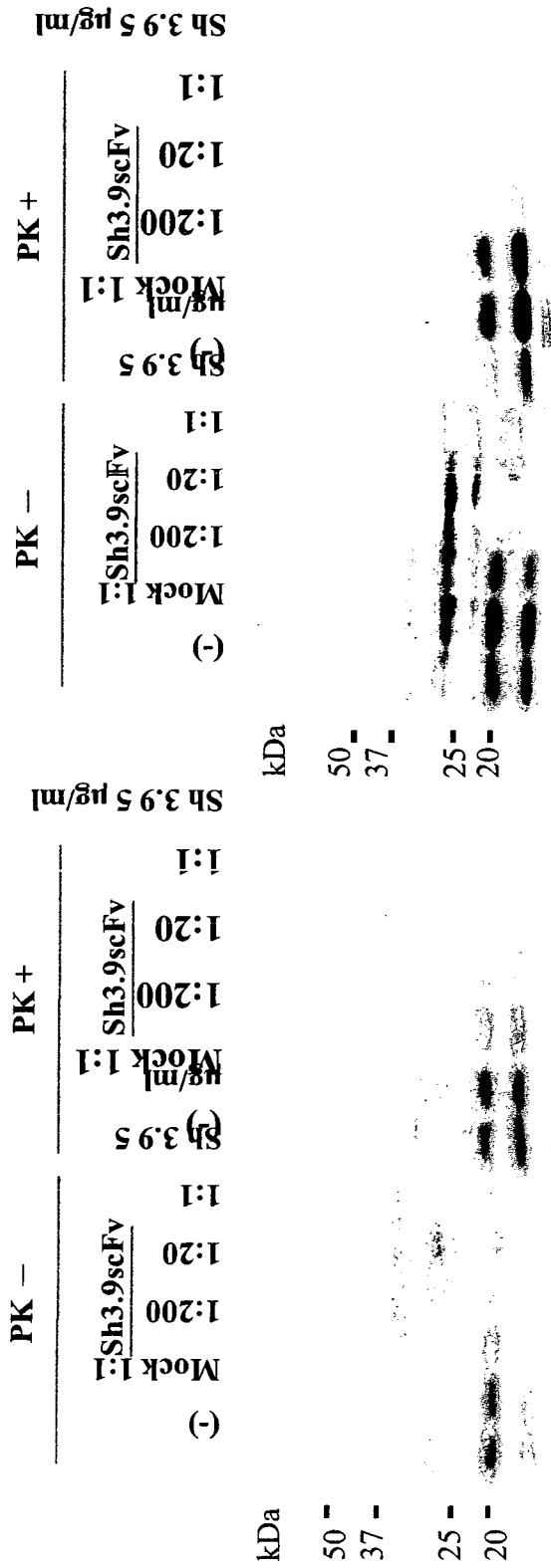


図4 Sh3.9scFvによる異常プリオン蛋白(PrP<sup>sc</sup>)の産生抑制。Sh3.9scFvを含む培養上清をそれぞれの感染細胞と3日間反応させ細胞を回収した後プロテアーゼK(PK)処理し、Western blottingを行った。Sh3.9scFvの上清量に応じて、両者の感染細胞におけるPrP<sup>sc</sup>が減少した。

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

プリオン特異的ヒト抗体の作製とプリオン特異性判定に関する研究

分担研究者：杉村 和久（鹿児島大学工学部生体工学科）

研究協力者：橋口周平（鹿児島大学工学部生体工学科）

西田教行（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）

片峰 茂（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）

研究要旨：本研究では、PrPsc に特異的抗体を用いることで直接同定、検出、定量する方法を確立する目的で、遺伝子組み換えヒト全長プリオン蛋白質を用いて、 $\beta$ シート構造のプリオン蛋白オリゴマー、プリオン蛋白フィブリルを作製し、ヒト抗体をディスプレイしたファージライブラリを用いて、構造特異的抗体を選別した。また、Proteinase K 処理せず、かつ  $\alpha$ -PrP および  $\beta$ -PrP を変性させない条件で分離する電気泳動法を確立した。

A. 研究目的

本研究では、組み換えヒトプリオン蛋白質を試験管内でフォールディングさせ、正常型プリオン蛋白質（PrPc）と病原性構造異性体（PrPsc）の類似プリオン蛋白質を作製し、これらの分子にヒト抗体ファージライブラリを直接反応させ、1) 正常型プリオン蛋白質（PrPc）と病原性構造異性体（PrPsc）を識別するヒト抗体を確立すること、2) これらの抗体を用いて、PrPsc を

ELISA、イムノブロットング法により直接同定、検出、定量する方法を確立すること、3) ヒト抗体医薬としての可能性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 20名のヒト末梢血リンパ球を用いて構築したヒト一本鎖抗体（scFv）抗体ライブラリを用いた。  
(2) 大腸菌の発現系を用いて発現、精製し

た遺伝子組み換えヒトプリオン蛋白 (aa23-231) を、Jackson GS (Science 283: 1935-37, 1999) らの方法に準じて、 $\beta$ シート型プリオン蛋白を試験管内で作製した。

このタンパク分子の立体構造は、原子間力顕微鏡、CD スペクトルを用いて解析した。

(3) 作製したプリオン蛋白と抗体ファージディスプレイライブラリを直接反応後、結合したファージを溶出、回収し増幅するパンニングを実施した。

(4) タンパク質の分離法は HPLC、SDS-PAGE、Native-PAGE 法を用いた。

(倫理面への配慮)

リコンビナントプリオン蛋白を取り扱う全ての実験を、遺伝子組換えの P2 レベル実験室で行った。プリオン蛋白は「動物の伝達性海綿状脳症の実験指針について (案)」に基づいて処理した。

### C. 研究結果

ヒト抗体を提示したファージディスプレイライブラリを  $\beta$ シート型プリオン蛋白に直接反応させるバイオパンニング方法で単離されたヒト scFv 抗体 (#7 scFv 抗体および #30 scFv 抗体) の特異性を詳細に解析した。組み換えヒトプリオン蛋白 (rPrP: aa23-231) を、Jackson GS (Science 283:

1935-37, 1999) らの方法に準じて、リフォーリングを行った。CD で  $\beta$ シート型吸収を示す  $\beta$ -PrP に含まれるコンフォーマー解析を行うために、ゲルろ過カラム (TSK-Gel SWXL G3000, Tosoh) を用いた HPLC を行った。200 mM NaCl, 1 M urea, 20 mM sodium acetate, pH 4.0 をランニングバッファとして用いた。その結果  $\beta$ -PrP は、高分子量のオリゴマーと単量体の 2 つのピークが認められた。これらのフラクションを分取し、CD スペクトル解析を行ったところ、オリゴマーおよび単量体のフラクションはどちらも、215 nm において負のスペクトルが認められ、典型的な  $\beta$ シート型の構造を有していることが明らかとなった。一方、Baskakov IV ら (J. Mol. Biol. 346: 645-659, 2005) のプロトコールに準じて作製した  $\beta$ -PrP の HPLC 解析では、オリゴマーと単量体の 2 つのピークが認められたが、CD スペクトル解析の結果、オリゴマーのフラクションは  $\beta$ シート型の吸収を示したが、単量体のフラクションは、 $\alpha$ ヘリカルな構造の CD スペクトルを示し、この  $\beta$ -PrP は、 $\beta$ シート構造のオリゴマーと  $\alpha$ ヘリカルな構造の単量体が混在したコンフォーマーであることが明らかとなった。ゲルろ過カラムを用いて分取されたフラクショ

ンを分取直後にマイクロタイタープレートにコートし、#7scFv 抗体および#30 scFv 抗体との反応性を解析した結果、#7scFv 抗体、#30 scFv 抗体は、分子量に関係なく、 $\beta$ シート型の構造を有するフラクションに結合活性を示した。コントロールとして用いた市販の抗プリオン蛋白抗体 (SAF32) は、どのフラクションとも結合活性を有していたことから、#7scFv 抗体、#30 scFv 抗体は、プリオン蛋白の $\beta$ 構造を特異的に識別する抗体であることが示唆された。

また、Proteinase K 処理せず、かつ $\alpha$ -PrP および $\beta$ -PrP を変性させない条件で分離する電気泳動法の確立を試みた。泳動緩衝液の pH、泳動方向、ポリアクリルアミドゲル濃度の検討結果、酸性の酢酸緩衝液を用いて、陰極側に泳動することで $\alpha$ -PrP および $\beta$ -PrP が分離された。 $\alpha$ -PrP は単量体と考えられる一本のバンドが認められたのに対し、 $\beta$ -PrP は、移動度の低いオリゴマーと、 $\alpha$ -PrP のバンドと同等の移動度のところに、わずかながらバンドが存在した。6.5%のアクリルアミドゲルを用いた場合、 $\alpha$ -PrP および $\beta$ -PrP の分離度が良好であった。この条件で泳動したプリオン蛋白を、私どもが確立した Immuno-Plate 法 (Hamasaki T et al. 2007) により#7scFv 抗体および#30 scFv

抗体との反応性を調べ、特異的に結合することを示した。

#### D. 考察

作製された抗体は、コンフォメーションを認識するため、病原性を発揮しているプリオンに特異的に結合するかどうかは、蟻酸処理や、オートクレーブ処理後のタンパク質を変性させた標品を使用する病理組織を染色する手法では解析できない。組み換えプリオン蛋白を用いた Native Page による PrP 分子の分離条件の検討結果より、未変性のプリオン分子を proteinase K 処理なく、電気泳動し、PRB7 および PRB30 抗体を直接反応させる Immunoblotting 法で検出・定量できる可能性が示された。

#### E. 結論

Collinge 法で作製した $\beta$ -PrP でパンニングを行ない $\beta$ -PrP に反応するが $\alpha$ -PrP には結合性を示さない scFv 抗体 (#7 および#30) を作製した。これらの抗体は Baskakov 法で作製した $\beta$ -PrP にも特異的に結合した。また、Proteinase K 処理せず、かつ $\alpha$ -PrP および $\beta$ -PrP を変性させない条件で分離する電気泳動法を確立した。

F. 健康危険情報

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

ヒト抗プリオン抗体及び該抗体フラグメント、PCT/JP2005/015121

G. 研究発表

論文発表

1. Hamasaki T, Uchida S, Yoshihara T, Hashiguchi S, Ito Y, Sugimura K  
Biopanning of antibody-phage clones using immunoplates coated with gel slices of electrophoresis: immunogel-biopanning.  
Biol. Pharm. Bull. 30: 1361-1364, 2007
2. 橋口周平、吉原智樹、杉村和久  
抗体医薬の現状と未来、低分子化抗体：ヒト抗体と小分子医薬品の間をつなぐ、細胞工学、26: 263-267, 2007

学会発表

1. In vitro selection and characterization of scFvs and Fab fragments specific for the conformational structure of Prion Proteins using phage libraries. 日本免疫学会、横浜、2007年11月
2. ヒト抗体ファージライブラリによる全長ヒトプリオンタンパクの $\beta$ オリゴマーのスナップショット、第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学大会合同大会、2007年12月、横浜
3. ファージディスプレイ法によるプリオン蛋白 $\beta$ オリゴマー中間体のスナップショット、プリオン研究会、新潟、2007

# 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
橋口周平、 吉原智樹、 杉村和久	抗体医薬の現状 と未来、低分子化 抗体：ヒト抗体と 小分子医薬品の 間をつなぐ		細胞工学	秀潤社	東京	2007	263-267

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Yamaguchi Y, Shigematsu K, Katamine S, Sakaguchi S	Immunization with recombinant bovine but not mouse prion protein delays the onset of disease in mice inoculated with a mouse-adapted prion.	Vaccine	25(6)	985-992	2007
Miyazawa K, Kanaya T, Tanaka S, Takakura I, Watanabe K, Ohwada S, Kitazawa H, Rose MT, Sakaguchi S, Katamine S, Yamaguchi T, Aso H	Immunohistochemical characterization of cell types expressing the cellular prion protein in the small intestine of cattle and mice.	Histochemis try Cell Biology	127(3)	291-301	2007
Yoshikawa D, Kopacek J, Yamaguchi N, Ishibashi D, Yamanaka H, Yamaguchi Y, Katamine S, Sakaguchi S	Newly established <i>in vitro</i> system with fluorescent proteins shows that abnormal expression of downstream prion protein-like protein in mice is probably due to functional disconnection between splicing and 3' formation of prion protein pre-mRNA.	Gene	386	139-146	2007

Yamada K, Moriuchi R, Mori T, Okazaki E, Kohno T, Nagayasu T, Matsuyama T, Katamine S	Tgat, a Rho-specific guanine nucleotide exchange factor, activates NF-kappaB via physical association with IkappaB kinase complexes.	Biochem Biophys Res Commun	355(1)	269-274	2007
Mori T, Moriuchi R, Okazaki E, Yamada K, Katamine S	Tgat oncoprotein functions as a inhibitor of RECK by association of the unique C-terminal region.	Biochem Biophys Res Commun.	355(4)	937-943	2007
Kuwata K, Nishida N, Matsumoto T, Kamatari YO, Hosokawa-Muto J, Kodama K, Nakamura HK, Kimura K, Kawasaki M, Takakura Y, Shirabe S, Takata J, Kataoka Y, Katamine S	Hot spots in prion protein for pathogenic conversion.	Proc Natl Acad Sci U S A	104(29)	11921-11926	2007
新竜一郎、片峰茂	プリオン病	杏林書院 保健の科学	10月号 vol.49		2007
Shiga Y, Satoh K, Kitamoto T, Kanno S, Nakashima I, Sato S, Fujihara K, Takata H, Nobukuni K, Kuroda S, Takano H, Umeda Y, Konno H, Nagasato K, Satoh A, Matsuda Y, Hidaka M, Takahashi H, Sano Y, Kim K, Konishi T, Doh-Ura K, Sato T, Sasaki K, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H, Itoyama Y	Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution.	J Neurol	Nov 2	1509-17	2007
Satoh K, Shirabe S, Tsujino A, Eguchi H, Motomura M, Honda H, Tomita I, Satoh A, Tsujihata M, Matsuo H, Nakagawa M, Eguchi K	Total tau protein in cerebrospinal fluid and diffusion-weighted MRI as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. Dement Geriatr Cogn Disord.	Dement Geriatr Cogn Disord	24	207-212	2007
Satoh K, Shirabe S, Eguchi H, Tsujino A, Motomura M, Satoh A, Tsujihata M, Eguchi K	Chronological Changes in MRI and CSF Biochemical Markers in Creutzfeldt-jakob Disease Patients.	Dement Geriatr Cogn Disord	23	372-381	2007
佐藤克也、調 漸、江口勝美	孤独性プリオン病 (孤発性古典型CJD, 視床型CJD, MM2皮質型CJD).	日本臨床	65(8)	1423-32	2007



Sakaguchi S	Molecular biology of prion protein and its first homologous protein.	Journal of Medical Investigation	54(3-4)	211-223	2007
Kim CK, Hirose Y, Sakudo A, Takeyama N, Kang CB, Taniuchi Y, Matsumoto Y, Itohara S, Sakaguchi S, Onodera T	Reduced response of splenocytes after mitogen-stimulation in the prion protein (PrP) gene-deficient mouse: PrPLP/Doppel production and cerebral degeneration.	Biochemical and Biophysical Research Communications	358	469-474	2007
Dong J, Li A, Yamaguchi N, Sakaguchi S, Harris DA	Doppel induces degeneration of cerebellar Purkinje cells independently of Bax.	American Journal of Pathology	171(2)	599-607	2007
Nishimura T, Sakudo A, Hashiyama Y, Yachi A, Saeki K, Matsumoto Y, Ogawa M, Sakaguchi S, Itohara S, Onodera T	Serum withdrawal-induced apoptosis in Zrch I prion protein (PrP) gene-deficient neuronal cell line is suppressed by PrP, independent of Doppel.	Microbiology and Immunology	51(4)	457-66	2007
Sakaguchi S, Arakawa T	Recent developments in mucosal vaccines against prion diseases.	Expert Review of Vaccines	6(1)	75-85	2007
坂口末廣	プリオンタンパク質の正常機能とプリオン病における役割	生化学	79(9)	843-852	2007
坂口末廣	プリオン伝播(プリオン蛋白異常化)のメカニズム	日本臨床	65(8)	1391-95	2007
Hamasaki T, Uchida S, Yoshihara T, Hashiguchi S, Ito Y, Sugimura K	Biopanning of antibody-phage clones using immunoplates coated with gel slices of electrophoresis immunogel-biopanning	Biol. Pharm. Bull.	30	1361-64	2007

## 研究成果の刊行物・別刷

## 特集 抗体医薬の現状と未来

## 低分子化抗体：ヒト抗体と小分子医薬品の間をつなぐ

Targeting Small Molecules Designed from Immunoglobulin Scaffold

橋口周平 吉原智樹 杉村和久

Shuhei Hashiguchi, Tomoki Yoshihara, Kazuhisa Sugimura

ヒト抗体が医薬として華々しい成果を挙げつつある現在、ヒト抗体とこれまでの小分子の医薬品の間をつなぐ、いわゆる“低分子化抗体”のデザインが抗体エンジニアリングの新たな課題となっている。本稿では抗体のCDRを移植(グラフト)し、多様な標的化を達成した分子群の報告について紹介する。

## key words

抗体エンジニアリング, ドメイン抗体, 低分子化抗体

**i** 橋口周平 鹿児島大学工学部生体工学科

吉原智樹 鹿児島大学工学部生体工学科

杉村和久 鹿児島大学工学部生体工学科 E-mail: kazu@be.kagoshima-u.ac.jp URL: http://www.be.kagoshima-u.ac.jp/~sugimura-lab/  
1971年富山大学薬学部卒業, 1978年大阪大学医学系研究科博士課程修了, ハーバード大学メディカルスクールへ留学, 1992年鹿児島大学工学部教授。ファージディスプレイ法を用いて、アレルギー、アトピー、アルツハイマー、プリオン関連の疾病の診断と治療法の開発のため、ヒト抗体エンジニアリングの研究を推進。

## はじめに

成熟した分子生物学が、疾病の原因分子を解明し、その分子を標的として確実に攻略するヒト抗体が医薬として華々しい成果を挙げつつある。2006年6月、第20回国際生化学・分子生物学会のサテライトとして鹿児島で抗体エンジニアリング国際会議を開催した。G. WinterはAntibody Revolutionというタイトルで基調講演を行った。この講演を含むいくつもの講演から、抗体エンジニアリングのホットな課題の1つは、ヒト抗体とこれまでの小分子の医薬品の間をつなぐ、いわゆる“低分子化抗体”のデザインであることが浮き彫りになった。本稿では、現在模索されている低分子抗体として、抗体様分子骨格を持つ分子に、抗体の相補性決定領域 (complementarity determining region; CDR) を移植(グラフト)し、多様な標的化を達成した分子群の報告について紹介する。

## I. ドメイン抗体 (Domain Antibody: dAb)

ファージの構成タンパク質分子の1つであるg3p分子 (gene 3 protein) のN末端にランダムペプチドをディスプレイする方法が確立されると、Winterらは1991年に、抗体の抗原結合部位であるH鎖の可変部 ( $V_H$ ) とL鎖の可変部 ( $V_L$ ) 領域で構成されるFvを短いペプチドリンカーで直列につないだ一本鎖抗体 (single-chain Fv; scFv) (図1) をファージにディスプレイできることを報告した<sup>1)</sup>。ヒト抗体

隆盛の幕開けである。同時期には、抗体の可変部である  $V_H$  もしくは  $V_L$  のみで抗原特異性を示す分子 (11~15kDa) (図1) を作製するという試みで、ヒト抗体の小分子化も並行して進められていた。片方の鎖だけで抗体としての活性が維持できることは1960年代に報告されていたが、1989年にG. Winterらがマウスの  $V_H$  ドメインを提示するファージディスプレイ法を用いて単独のドメインだけで機能する抗体を選別し、ドメイン抗体 (dAb) と呼んで報告した<sup>2)</sup>。Winterらは結合力がKd (結合親和性の値である平衡解離定数) = 20nM のリゾチームに特異的なdAb抗体を単離したが、これらのdAb抗体は凝集しやすく低収量であった<sup>3)</sup>。1993年、ヒトコブラクダでは、二本鎖の抗体分子の他に進化の過程でL鎖を失い、 $V_{HH}$  ドメインと呼ばれる可変部を含むH鎖だけで構成される抗体分子を有することが発見されると<sup>4)</sup>、ラクダやラマのドメイン抗体の研究が進展した。ラクダ科の  $V_{HH}$  はCDR3ループが長いのが特徴である。この  $V_{HH}$  由来のドメイン抗体は溶解性が高く、高収量 (>10mg/l) で得られることが報告された<sup>5)</sup>。さらに、 $V_{HH}$  ドメインは可逆的にリフォールディングできるという性質を持っており、100  $\mu$ M の高濃度で80~92℃という高温で加熱後も活性が維持され、熱力学的に非常に安定であることが明らかになった<sup>6), 7)</sup>。通常の抗体では  $V_H$  と  $V_L$  の接触領域に疎水性の側鎖が露出しているが、ラクダ科の  $V_{HH}$  ではそれらのアミノ酸残基が親水性のアミノ酸残基になっているためと考えられている。そこで、熱力学的に安定なヒト由来の  $V_H$  ドメイン抗体を得るた

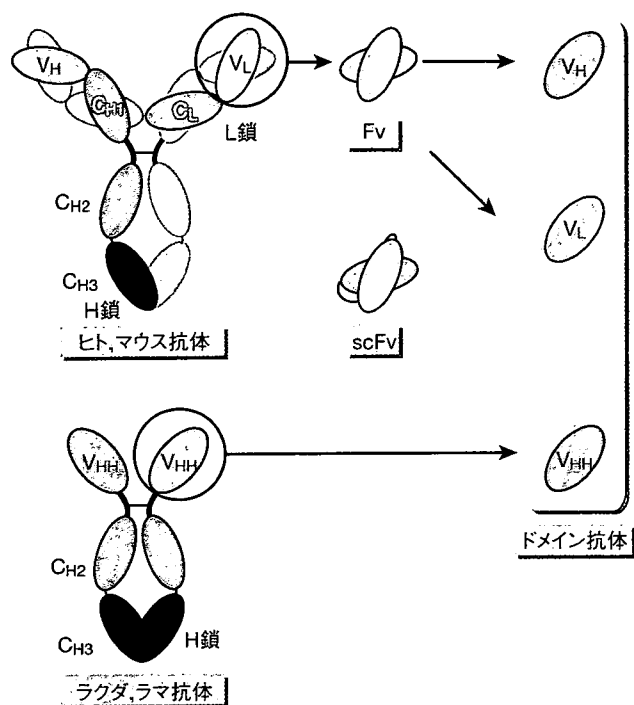


図1. ドメイン抗体の模式図

抗原との結合部位は、抗体可変部に相当する $V_H$ と $V_L$ によって構成され(Fv)、このFvを一本鎖につないだ分子が一本鎖(scFv)抗体である。Fvを $V_H$ もしくは $V_L$ だけにした抗体がドメイン抗体と呼ばれる。ラクダ科の動物(ラクダとラマ)は、通常の抗体に加え、H鎖のみで抗原と結合する抗体を産生する。この結合部位は $V_{HH}$ と呼ばれ、この $V_{HH}$ だけを取り出した抗体もドメイン抗体と呼ばれる。 $V_{HH}$ のCDR3は長いのが特徴である。サメ由来の抗体もH鎖のみの抗体であり、その抗体可変部はVNARと呼ばれる。

めに、ヒト $V_H$ のフレーム領域をラクダ科の抗体分子で高度に保存されている親水性のアミノ酸残基に置換しラクダ化したヒト $V_H$ dAb抗体ライブラリーが作製され、dAb抗体の溶解性と収率が改善されたと報告されている<sup>3)</sup>。また、ヒトdAb抗体のCDR3領域を長くすることで溶解性が改善されたという報告もある<sup>8)</sup>。ヒト由来のdAb抗体では、Winterらにより、ヒト $V_{H3}$ フレーム領域を用いて作製された $V_H$ dAb抗体ライブラリーから、熱変性に対し耐性であり、 $V_{HH}$ と類似した性質のヒトdAb抗体が単離されている<sup>9)</sup>。さらにWinterらは、ファージライブラリーから単離したdAb抗体の熱安定性を確実にするために、ファージライブラリーから抗体を選別する際に、ファージごと熱変性を行い熱力学的に安定なdAb抗体を作製する手法も報告している<sup>10)</sup>。

ラクダ科の動物に目的タンパク質を免疫後、ファージディスプレイ法を用いてアフィニティーマチュレーション<sup>注1)</sup>を行うという手法でもdAb抗体が作製されている。抗体エンジニアリング国際会議(鹿児島, 2006)において、H.

Hoogenboomは、ラマの $V_{HH}$ のdAb抗体をナノボディーと呼び、TNF- $\alpha$ 特異的ヒト化ナノボディーの機能解析の結果を報告した<sup>11)</sup>。TR2という名称のナノボディーは*in vitro*において、 $EC_{50}$ (50%有効濃度) = 1.5nMの値でTNF- $\alpha$ を中和できたが、TR2の二量体化により現在市販されている抗TNF- $\alpha$ モノクローナル抗体と同等の $EC_{50}$  = 0.012nMにまで活性を増強できることを示した<sup>11)</sup>。このTR2にアルブミン特異的ヒト化ナノボディーをつないだ二重特異性のナノボディー分子は、*in vivo*における関節炎症部位への浸透性が増強され、慢性関節リウマチのモデル動物への投与と実験で、症状を完全に抑えることができることを報告した<sup>11)</sup>。また、大腸炎モデルマウスを用いた実験では、経口投与したTNF- $\alpha$ 特異的ナノボディーが炎症を抑えたことから、ドメイン抗体の組織への透過性が非常に優れていることを示唆した。マウスにおける血中半減期( $t_{1/2}$ )は、ナノボディー単独では54分であったが、ポリエチレングリコール修飾もしくはナノボディー二量体化により最大で48時間に延長されたと報告<sup>11)</sup>しており、分子修飾により血中半減期を改善できることを示した。ヒト化したdAb抗体であるナノボディーで医薬としての有効性が示されたが、引き続き、医薬開発を狙った完全ヒトのドメイン抗体が作製されることが予想され、今後の展開が期待される。

## II. 人工的な低分子化抗体

抗体分子そのものを低分子化したドメイン抗体の他に、抗体の分子骨格に類似した構造を有するタンパク質分子に抗原特異性を賦与した小分子抗体をデザインする試みが行われている。

### 1. モノボディー (Monobody, AdNectins)

ヒトフィブロネクチン(fibronectin)は、3種類の小さなドメインが繰り返した巨大分子で、細胞外マトリックスの構成成分の1つである。その中のタイプ3ドメインは、15のユニットで構成され、その10番目のユニットである94残基(10kDa)から成る10Fn3ドメインを骨格として低分子化抗体が作製されている<sup>12), 13)</sup>。10Fn3ドメインは、システイン残基を含まないので、バクテリアを用いた発現系で正しく折り畳まれた分子の大量発現(>50mg/l)が容易であり、熱力学的に安定( $T_m$ (融解温度) = 90°C)で溶解性が高く(>15mg/ml)、様々なプロテアーゼに対しに抵抗

注1 ある抗原に対して初めて反応するときには産生される抗体のレパートリーは、B細胞初期分化において抗原非依存的に形成されている。これらの抗体の抗原に対する親和性は低い。同じ抗原が再度侵入してきたときには親和性の高い抗体が産生される。この現象をアフィニティーマチュレーションと呼ぶ。