

研究情報

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抗体の作出

TAGAWA Yuichi

研究管理監 田川 裕一

プリオン病に罹患すると、細胞が元より発現している正常なプリオンタンパク質(PrP^C)がプロテアーゼ抵抗性の異常プリオンタンパク質(PrP^{Sc})に変換され、脳内に蓄積します。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が必須であり、プリオンタンパク質(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す。また、PrPと特異的に結合できる抗体のなかには、PrP^CからPrP^{Sc}への変換を阻止する抗体もあることから、抗体のプリオン病治療への応用が検討され、実験モデルですが、抗体の投与によってプリオン病の発症遅延や治癒効果が確認されています。一方で、抗体をPrP^{Sc}蓄積・病変発現部位である脳内に効率的にデリバリーすることは必ずしも容易ではないこと、また抗体分子内の2つの抗原結合領域によって、細胞膜上のPrP^C分子の架橋や、クラスター形成が起きると、神経細胞のアポトーシスが誘導されることから、単一の抗原結合領域のみからなるように抗体を低分子化した抗体遺伝子の導入・発現などの利用が必要となります。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、低分子化した抗体を作出することを目的としました。

PrP^C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、抗体応答が認められません。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マを作出することができました。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、以下に紹介します。

作出したmAb T1およびT2はいずれも、マウスのPrPはもちろん、ハムスター、ヒツジ、ウシ、シカのPrPと反応し、さらに、ヒトのPrPとも反応しました。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す(図1)。なお、T2はわが国の牛海綿状脳症(BSE)の確定検査用の抗体の一つに採用されています。さらに、民間メーカーとの共同研究により、作出したmAbを利用したBSE診断用ELISAキットを開発することができました。現在、キットは実用化され、診断に活用されています。

次に、T1およびT2についてプリオン持続感染培養細胞(ScN2a)への抗体添加によるプリオン増殖抑制効果を検討したところ、T1には抑制効果が認められませんでした。T2には極めて高いプリオン増殖抑制効果が認められました。効果の程度の指標とされる50%阻止濃度は0.02 μg/mlであり、これまでに報告された抗体のうち、最も阻止効果の高いものに匹敵しました。

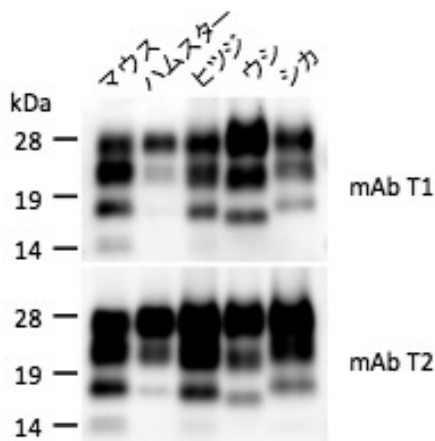


図1. モノクローナル抗体の各動物種由来 PrP^{Sc}との反応
PrP^{Sc}はウエスタンブロット法でサイズの異なる3本のバンドとして検出される。

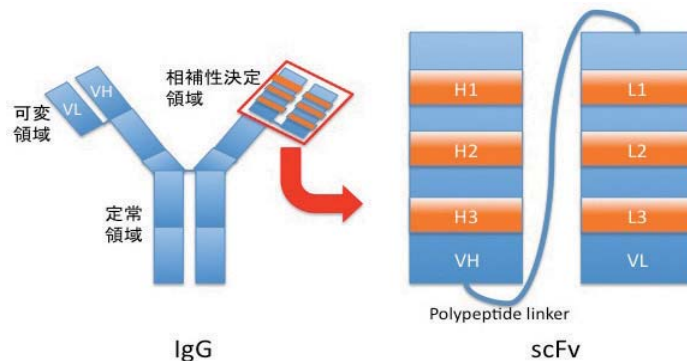


図2. 単鎖型抗体(scFv)の作出
mAb T2のIgG可変領域(VHおよびVL)をpolypeptide linker配列で結合して単鎖型抗体を作出する。

さらに、T2の低分子化と、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、T2産生ハイブリドーマから抗体遺伝子の可変部領域をクローニングし、図2に示したように、単鎖型可変領域フラグメント(scFv)抗体として発現できるように遺伝子を加工しました。scFv T2遺伝子を動物細胞に導入・発現させることにより、scFv T2を細胞外に安定的に分泌産生する細胞株を作出し、このscFv T2産生細胞とScN2a細胞

を同じ容器内で培養すると、ScN2a細胞のプリオン増殖を抑制できることを確認しました。

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るとともに、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材として有用と考えています。

TOPICS

プリオン病の市民講座

「食と医療の安全－BSE、ヤコブ病、鳥インフルエンザ、口蹄疫－」の開催

平成22年11月23日、東京大学弥生講堂において、プリオン病の市民講座「食と医療の安全－BSE、ヤコブ病、鳥インフルエンザ、口蹄疫－」が開催されました。この市民講座は、農林水産省、厚生労働省、ヤコブ病サポートネットワーク、東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センターの後援を得て、食と医療の安全に関わるプリオン病の市民講座実行委員会(代表 東北大

学大学院 堂浦克美教授、事務局 農研機構動物衛生研究所プリオン病研究センター)の主催で開催するもので、本年度で4回目となります。本年は食の安全の観点から、プリオン病だけでなく、鳥インフルエンザや宮崎県で発生した口蹄疫を含めて、病気の解説、研究の現状、また、食品・農産物に関わる行政などの講演が行われました。最後の総合討論では、口蹄疫・鳥インフルエンザも含

め、会場から活発な質問意見とともに、今後の研究の進展や、研究成果の実用化への期待が寄せられました。144名の参加者は、学生、畜産業、医療関係者、会社員、公務員など多岐にわたりますが、行政、研究、一般の方々が一堂に会し、科学的な知識を共有できるこの市民講座は、研究への期待を直接感じることもできる貴重な機会となりました。

(情報広報課)

