

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5828521号
(P5828521)

(45) 発行日 平成27年12月9日 (2015. 12. 9)

(24) 登録日 平成27年10月30日 (2015. 10. 30)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 16/18 (2006. 01)	C O 7 K 16/18 Z N A
C 1 2 N 15/02 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 C
C 1 2 P 21/08 (2006. 01)	C 1 2 P 21/08
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 N

請求項の数 10 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2012-514849 (P2012-514849)	(73) 特許権者	504137912
(86) (22) 出願日	平成23年5月13日 (2011. 5. 13)		国立大学法人 東京大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/061069		東京都文京区本郷七丁目3番1号
(87) 国際公開番号	W02011/142461	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開日	平成23年11月17日 (2011. 11. 17)		弁理士 小野 新次郎
審査請求日	平成26年5月7日 (2014. 5. 7)	(74) 代理人	100075270
(31) 優先権主張番号	特願2010-111375 (P2010-111375)		弁理士 小林 泰
(32) 優先日	平成22年5月13日 (2010. 5. 13)	(74) 代理人	100096013
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 富田 博行
(出願人による申告) 「平成21年度 独立行政法人医薬基盤研究所 「ALS治療薬開発のための一時評価系の構築」、産業技術力強化法第19条の適用を受けるもの」		(74) 代理人	100092967
			弁理士 星野 修
		(74) 代理人	100117813
			弁理士 深澤 憲広
微生物の受託番号	NPMD NITE P-941	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の診断のための抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Cys Val LeuLys Gly Asp Gly Pro Val Gln Gly (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、Lys Val Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu ThrGlu (SEQ ID NO: 5) のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、Arg Leu Ala Cys GlyVal Ile Gly Ile (SEQ ID NO: 6) のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含む変異型SOD1タンパク質と結合する抗体であって、

当該変異型SOD1タンパク質がSEQ ID NO: 4のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチド領域の立体構造変化を伴うものであるか否かを検出することができ、

当該立体構造変化は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と関連する、前記抗体。

【請求項2】

SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチドが、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号3、4、5、6、8、10、12、14、16、19、20、22、29、37、38、40、41、43、45、46

10

20

、47、48、49、57、59、65、66、72、76、80、84、85、86、87、89、90、93、95、97、99、100、101、104、105、106、108、111、112、113、114、115、116、117、118、124、125、126、127、132、133、134、139、140、141、144、145、146、147、148、149、および151からなる群から選択されるいずれか1つのアミノ酸残基に、1アミノ酸の置換、欠失または付加を有するものである、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチドが、筋萎縮性側索硬化症（ALS）と関連する、請求項1または2に記載の抗体。

10

【請求項4】

SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなるタンパク質には結合しない、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項5】

モノクローナル抗体である、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体。

【請求項6】

NITE P-941、NITE BP-942、NITE BP-943、およびNITE BP-1100のハイブリドーマのいずれかにより産生される、請求項5に記載の抗体。

【請求項7】

20

被検体から採取された細胞含有サンプルについて、請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体を用いてスクリーニングし、そしてその抗体に結合するタンパク質を検出することを含む、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなるタンパク質以外の、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチドの検出方法。

【請求項8】

SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなるタンパク質以外の、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチドが、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号3、4、5、6、8、10、12、14、16、19、20、22、29、37、38、40、41、43、45、46、47、48、49、57、59、65、66、72、76、80、84、85、86、87、89、90、93、95、97、99、100、101、104、105、106、108、111、112、113、114、115、116、117、118、124、125、126、127、132、133、134、139、140、141、144、145、146、147、148、149、および151からなる群から選択されるいずれか1つのアミノ酸残基に、1アミノ酸の置換、欠失または付加を有する物である、請求項7に記載の検出方法。

30

【請求項9】

40

SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなるタンパク質以外の、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチドの存在が、筋萎縮性側索硬化症（ALS）のリスクと関連する、請求項7または8に記載の検出方法。

【請求項10】

Cys Val LeuLys Gly Asp Gly Pro Val Gln Gly (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列、Lys Val Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu (SEQ ID NO: 5) のアミノ酸配列、またはArg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile (SEQ ID NO: 6) のアミノ酸配列からなるペプチドを

50

免疫原として使用することを特徴とする、野生型SOD1タンパク質には結合しないが変異型SOD1タンパク質には結合する抗体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の診断に使用することができる抗体に関するものである。本発明はまた、そのような抗体を使用して、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の発症リスクを検出する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

10

筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic lateral sclerosis；ALS）は、運動神経が選択的に障害される進行性の神経変性疾患であり、日本国内には約7000人、米国には4万人の患者がいる。この疾患は、主に壮年期に発症し、筋萎縮が徐々に全身に広がり、歩行困難、言語障害、嚥下障害、呼吸障害におよび、気管切開／人工呼吸器装着などを施さなければ発症後3～5年で死に至るきわめて重篤な疾患である。患者は意識が明瞭なまま病気が進行していくため、患者および介助家族の肉体的、精神的ダメージは極めて大きい。

【0003】

ALSは、「難病性疾患克服研究事業対象疾患」に指定されているにもかかわらず、治療薬開発への取り組みが遅れている。現在の治療法は、適度なリハビリテーションによる筋力低下予防と、唯一の保険適応薬剤であるリルゾール（グルタミン酸の神経終末放出を抑制）による一時的な病態進行遅延だけであり、ALS病態分子メカニズムに基づく根本的な治療法は皆無である。

20

【0004】

ALSの原因を解明する上でのブレイクスルーは、家族性ALSの原因遺伝子として1993年Rosenらによって同定されたCu/Zn superoxide dismutase 1（SOD1）の遺伝子変異である。全ALS患者のうち約10%が家族性であり、そのうちの約20%（すなわち、全ALS患者のうち約2%）がSOD1遺伝子変異による。そして、ALSでは変異型SOD1タンパク質が、異常蓄積することが知られている。

【0005】

家族性アルツハイマー病の場合、その原因としてのAPPやPS-1遺伝子変異の発見が、その後の孤発性アルツハイマー病分子メカニズム解明に大きく貢献していることから類推して、ALSの場合にも、原因遺伝子SOD1の発見は、家族性ALSのみならず孤発性ALSの病態解明にも飛躍的な進歩をもたらすものと期待された。しかしながら、未だALSに共通する病態を説明する分子メカニズムは明らかにされていない。

30

【0006】

SOD1遺伝子上には、これまで122種類もの点変異が報告されており、それらの変異のいずれかについて作出された幾つかのトランスジェニックマウスがALSと類似した症状を呈すること、ならびにSOD1タンパク質の機能喪失によっては病態を発症しないことなどが示されている。これらの知見から、SOD1タンパク質の変異によりALSが発症する原因は、遺伝子の変異に基づくSOD活性の低下（loss of function）ではなく、現在ではその病態発症機構は、変異型SOD1タンパク質が何らかの獲得性神経細胞毒性を発揮し、運動神経細胞死とそれに伴う個体の神経症状をもたらすものと考えられている。

40

【0007】

現在までに家族性ALSにおけるSOD1遺伝子の変異は100種類以上が報告されているが、それによって起こるALS発症のメカニズムは、変異型SOD1タンパク質が細胞内に発現し、細胞内に変異型SOD1タンパク質が蓄積した結果、何らかの細胞毒性を発揮し、運動神経が変性を来すことによるものと考えられている。

【0008】

しかし、その際に変異型SOD1タンパク質が細胞内でどのようなシグナルを発信し、どのようなメカニズムで細胞を傷害するかというALSの発病機序については未だに不明であり

50

、そのため適切な治療法も存在しなかった。

【0009】

我々はこれまでに、ALSにおける変異型SOD1タンパク質による神経細胞死の分子メカニズムとして、小胞体ストレスが深く関与していることを明らかにしてきた（特開2007-151478；Nishitoh et al. Genes Dev. 2008）。すなわち、変異型SOD1タンパク質が特異的に結合する標的タンパク質のひとつとして、小胞体の品質管理に重要な役割を担う小胞体膜タンパク質Derlin-1を同定し、変異型SOD1タンパク質とDerlin-1との結合が神経細胞の小胞体品質管理機構の破綻をきたし、小胞体ストレスを惹起することを見出した。

【0010】

しかしながら、ALSの患者の神経細胞内に変異型SOD1タンパク質が発現した結果、何故Derlin-1との結合を引き起こすのか、実際にどのような分子機構によって細胞が傷害され、変性していくのかという一連のメカニズムについては我々独自の発見であり、世界的にはまだまだ研究が進んでおらず、その全体像を明らかにするには至っていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】特開2007-151478

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Nishitoh et al. Genes Dev. 22, 1451-1464, 2008

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の発症の分子機構の一端を解明し、また、解明されたALS発症の分子機構を利用して、ALSのリスクを検出することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、変異型SOD1タンパク質を検出することにより、ALSのリスクを検出する方法を提供することにより、上記課題を解決した。すなわち、変異型SOD1タンパク質を検出するために、本発明においては、野生型（すなわち正常な）SOD1タンパク質は結合しないが、変異型SOD1タンパク質には結合する抗体を提供することにより、上記課題を解決した。

【0015】

本発明は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなるタンパク質と比較して、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチド領域の立体構造変化が、筋萎縮性側索硬化症（ALS）のリスクと関連することが示されたことに基づいて完成されるに至ったものである。従って、具体的には、本発明の一態様において、上記の事実に基づいて、被検体から採取された細胞含有サンプルについて、変異型SOD1タンパク質に対して結合する抗体を用いてスクリーニングし、そしてその抗体に結合するタンパク質を検出することにより、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなるタンパク質以外の、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチドを検出することを通じて、ALSのリスクを検出する方法を提供する。

【0016】

上記の態様において、変異型SOD1タンパク質の検出は、野生型（すなわち正常な）SOD1タンパク質には結合しないが、変異型SOD1タンパク質には結合する抗体を用いて、変異型SOD1タンパク質のみを検出することによって実現することができる。そのような抗体の例

として、Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln Gly (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、Lys Val Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu (SEQ ID NO: 5) のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、Arg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile (SEQ ID NO: 6) のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチドと結合する抗体を挙げることができる。この検出方法により、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなる野生型SOD1タンパク質は検出されないが、変異型SOD1タンパク質におけるSEQ ID NO: 4のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチド領域の立体構造変化が検出される場合、そのサンプルの起源である個体は、ALSの発病リスクを有していると判断される。

10

【0017】

本発明の別の態様において、Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln Gly (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、Lys Val Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu (SEQ ID NO: 5) のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、Arg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile (SEQ ID NO: 6) のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチドと結合する抗体自体を提供する。

20

【0018】

これらの態様において、上記抗体が結合する物質は、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチド領域の立体構造変化を伴う変異型SOD1タンパク質であり、すなわち、本願発明の抗体は、変異型SOD1タンパク質を検出することができる。具体的には本願発明の抗体は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号3、4、5、6、8、10、12、14、16、19、20、22、29、37、38、40、41、43、45、46、47、48、49、57、59、65、66、72、76、80、84、85、86、87、89、90、93、95、97、99、100、101、104、105、106、108、111、112、113、114、115、116、117、118、124、125、126、127、132、133、134、139、140、141、144、145、146、147、148、149、および151からなる群から選択されるいずれか1つのアミノ酸残基に、1アミノ酸の置換、欠失または付加を有するものを検出することができる。また、未だ発見されていないSOD1遺伝子変異についても、その変異により産生される変異型SOD1タンパク質が、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチド領域の立体構造変化を伴うものであるか否かを検出することが出来る。

30

【0019】

上記抗体が結合するSEQ ID NO: 4のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチド領域の立体構造変化は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と関連する、という特徴を有していることが示された。

40

【0020】

本発明において作製され、そして使用される抗体は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体であることが好ましく、本発明においては、#406、#659、または#785（それぞれ、寄託番号NITE P-941、NITE BP-942、およびNITE BP-943（受託日はいずれも2010年5月12日））または#27（寄託番号NITE BP-1100）（受託日は2011年5月12日）のハイブリドーマのいずれかにより産生される上記

50

抗体を提供することができる。

【0021】

本明細書において、特定の配列においてアミノ酸が「変異」されたという場合、アミノ酸が欠失されたもの、アミノ酸が置換されたもの、またはアミノ酸が付加されたもの、のいずれかであることを意味する。

【0022】

本発明において、「抗体」には、変異型SOD1タンパク質に対して結合性の抗体フラグメントまたは修飾抗体もまた含まれる。この様な抗体フラグメントには、例えば、上述したモノクローナル抗体のFab、F(ab')₂、Fv、または上述した抗体に由来する一本鎖Fv（H鎖FvおよびL鎖Fvがリンカーで結合したもの、scFv）、が含まれる。また、このような抗体フラグメントは、例えばパパイン、ペプシン等の酵素により処理することにより、または抗体フラグメントをコードする遺伝子を構築し、それを発現ベクター中に組み込み、そして適切な宿主細胞中でこのベクターを発現することにより組換え的に、調製することもできる。修飾抗体としては、ポリエチレングリコール（PEG）などの様々な分子に結合させた抗体などを使用することができる。

10

【発明の効果】

【0023】

本発明により、変異型SOD1タンパク質を検出することにより、ALSのリスクを検出する方法を新たに提供することができた。本発明においてはさらに、上記の方法において変異型SOD1タンパク質を検出するために使用することができる、野生型（すなわち正常な）SOD1タンパク質は結合しないが、変異型SOD1タンパク質に結合する抗体を提供することもできる。これらの効果により、これまでは臨床的に鑑別が難しかったALSまたはALSのリスクを、確実に検出することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、野生型SOD1タンパク質のアミノ酸配列（SEQ ID NO: 2と同一）およびその点変異のうち家族性筋萎縮性側索硬化症（ALS）に関与することが知られている具体的なSOD1タンパク質の変異を示す図である。

【図2】図2は、本発明の抗体のうち#242、#406、#659、#785、#1175のハイブリドーマに由来する5種類の抗体が、Flag-SOD1（G93A）を検出することができたことを示す図である。

30

【図3】図3は、本発明の抗体のうち#406、#659、#785のハイブリドーマに由来する3種類の抗体が、Flag-SOD1（G93A）に加えて、Flag-SOD1（G85R）も検出することができたことを示す図である。

【図4-1】図4-1は、本発明の抗体の一つとして選択された#785ハイブリドーマから得られた抗体により、様々な変異型SOD1タンパク質を沈降可能である（すなわち、検出可能である）ことを示す図である。

【図4-2】図4-2は、本発明の抗体の一つとして選択された#785ハイブリドーマから得られた抗体により、様々な変異型SOD1を沈降可能である（すなわち、検出可能である）ことを示す図である。

40

【図4-3】図4-3は、本発明の抗体の一つとして選択された#785ハイブリドーマから得られた抗体により、様々な変異型SOD1を沈降可能である（すなわち、検出可能である）ことを示す図である。

【図5】図5は、本発明の抗体のうち#27のハイブリドーマに由来する抗体が、Flag-SOD1（A4V）、Flag-SOD1（G93A）およびFlag-SOD1（G85R）を検出することができたこと（図5A）、そしてそれらに加えてSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列のうちSEQ ID NO: 4に対応する領域（6～16番目アミノ酸配列からなるペプチド領域）中に変異を有する様々な変異型SOD1タンパク質を免疫沈降可能であること（図5B）を示す図である。

【図6】図6は、本発明の抗体の一つとして選択された#406ハイブリドーマから得られた抗体が、SOD1タンパク質の変異に伴う立体構造変化（Derlin-1結合部位が露出する）を細

50

胞免疫染色においても検出することができることを示す図である。

【図7】図7は、本発明の抗体の一つとして選択された#785ハイブリドーマから得られた抗体が、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の個体の血液中B細胞の細胞質中の変異型SOD1タンパク質を免疫沈降可能であることを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0025】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、コンフォメーション病の一つとして知られており、この疾患のうち家族性ALSの原因タンパク質は、SOD1タンパク質である。野生型のヒトSOD1（スーパーオキシドジスムターゼ1）タンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードする遺伝子のヌクレオチド配列は、GenBank Accession No. NM_000454として、入手可能なものであり、本件明細書中においては、そのタンパク質のアミノ酸配列をSEQ ID NO: 2として、そしてそれをコードするヌクレオチド配列をSEQ ID NO: 1として、それぞれ記載する。このSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列に関して、当該技術分野においては、SOD1タンパク質のアミノ酸番号をカウントする際、野生型SOD1タンパク質の第1メチオニンを除くことが一般的であり、従って、本件明細書中のSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列は、GenBank Accession No. NM_000454において開示されるアミノ酸配列のうち第1メチオニンを除いたものとして記載している。

【0026】

SOD1タンパク質には、現在までに122種類もの点変異が報告されており、これらのうち、現段階において100種以上の変異型SOD1タンパク質が実際に家族性ALSに関与することが知られている（家族性ALSに関与することが知られている具体的なSOD1タンパク質の変異については、図1を参照）。図1において、「WT」で示した行が野生型SOD1タンパク質のアミノ酸配列を示し、その上側に記載したアミノ酸はそれぞれの変異型SOD1タンパク質の変異アミノ酸を示す。変異アミノ酸の表示のうち、Δは欠失を示し、+は挿入を示し、*は停止コドンを示す。

【0027】

これまでの研究より、これらの家族性ALSに関与することが知られている変異型SOD1タンパク質のうち4種類の変異型SOD1タンパク質（SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列の番号に基づいて、A4V、G85R、G93A、およびL126stop）に関して、Derlin-1のC末端12アミノ酸であるDerlin-1（CT4）（Phe Leu Tyr Arg Trp Leu Pro Ser Arg Arg Gly Gly（SEQ ID NO: 7））と特異的に結合することが明らかにされている（Nishitoh et al. Genes Dev. 2008）。

【0028】

家族性ALSに関与する様々な変異型SOD1タンパク質とDerlin-1（CT4）との結合から、変異型SOD1タンパク質のDerlin-1との結合様式は、それぞれの変異型SOD1タンパク質が、各変異アミノ酸部位近傍でDerlin-1結合部位を形成していることによるとは考えにくく、野生型SOD1タンパク質のアミノ酸配列中にDerlin-1結合領域がもともと存在すると考えられた。

【0029】

そこで、次に、SOD1タンパク質側のDerlin-1との相互作用部位を検討したところ、SEQ ID NO: 2（第1メチオニンを除いたアミノ酸配列から構成されるもの）により示されるアミノ酸配列で規定される野生型SOD1タンパク質のうち、N末端側5～18番アミノ酸からなるペプチド領域（Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln Gly Ile Ile（SEQ ID NO: 3））がDerlin-1との結合部位であることが明らかになった（図1の一重下線部分）。

【0030】

この結果から、野生型では、立体構造上隠されている5～18番目アミノ酸配列からなるペプチド領域（SEQ ID NO: 3）が、家族性ALSに関与する変異型SOD1タンパク質では立体構造的に露出し、その結果Derlin-1と結合することを通じて、家族性ALSの発症の原因となっていることが予想された。そこで、本発明においては、変異型SOD1タンパク質のアミノ酸配列（SEQ ID NO: 2）のうちの、5～18番目アミノ酸からなるペプチド領域（SEQ ID

10

20

30

40

50

NO: 3) と結合することができる抗体を作製することとした。

【0031】

SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列のうち、N末端のValとC末端の2つのIleが疎水性であり、免疫原の水溶性を低下させる可能性が考えられたため、実際には、6～16番目アミノ酸配列からなるペプチド領域 (Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln Gly (SEQ ID NO: 4)) を免疫原として使用した。

【0032】

得られた抗体について、実際に細胞内で産生された変異型SOD1タンパク質 (例えば、G85RおよびG93A) に対して結合するが、野生型SOD1タンパク質 (SEQ ID NO: 2) に対しては結合しないことを指標にして、スクリーニングを行い、候補抗体を選択した。その際、上述したように、Derlin-1と変異型SOD1タンパク質との結合が、SOD1タンパク質での変異に基づく立体構造の変化の結果生じる可能性があることが示唆されたことから、非変性条件下において (すなわち、SOD1タンパク質の立体構造を破壊することなく) スクリーニングを行った。その結果、目的とする特徴を有する抗体を産生する3種類のハイブリドーマ細胞株、#406、#659、および#785 (それぞれ、千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (National Institute of Technology and Evaluation: NITE)、特許微生物寄託センター (NITE Patent Microorganisms Depository: NPMD) において、NITE P-941、NITE BP-942、およびNITE BP-943として寄託; 受託日はいずれも2010年5月12日) を得ることができた。

【0033】

このような知見に基づいて、本発明の一態様において、Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln Gly (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列またはSEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチドと結合する抗体を提供する。

【0034】

本発明の一態様においてさらに、変異型SOD1タンパク質 (例えば、G85RおよびG93A) に対して結合するが、野生型SOD1タンパク質 (SEQ ID NO: 2) に対しては結合しないという特徴を有する抗体を検索した。

【0035】

野生型SOD1タンパク質の立体構造を解析したところ、野生型SOD1タンパク質 (SEQ ID NO: 2) の5～18番目アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 3) はβストランド構造を形成しており、このβストランド構造に対して、N末端側30～40番アミノ酸からなるペプチド領域 (Lys Val Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu (SEQ ID NO: 5)) により形成されるβストランド構造またはC末端側143～151番アミノ酸からなるペプチド領域 (Arg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile (SEQ ID NO: 6)) により形成されるβストランド構造とが、相対するように近接して配置されていることが明らかになった。そして、その様な構造を有することにより、上述する3つのβストランド構造は、いずれも、野生型SOD1タンパク質では立体構造上隠されているが、変異型SOD1タンパク質では立体構造的に露出されて、抗体により検出可能になることが予想された。

【0036】

そこで、野生型SOD1タンパク質では立体構造上隠されているが、変異型SOD1タンパク質では立体構造的に露出されているポリペプチド領域の候補として、野生型SOD1タンパク質 (SEQ ID NO: 2) のうち、変異によって構造変化する5～18番目アミノ酸配列部分に立体構造的に近接した2つのペプチド領域、N末端側30～40番アミノ酸からなるペプチド領域 (Lys Val Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu (SEQ ID NO: 5)) またはC末端側143～151番アミノ酸からなるペプチド領域 (Arg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile (SEQ ID NO: 6)) を選択し、免疫原として使用することとした (図1の二重下線部分)。

【0037】

得られた抗体について、実際に細胞内で産生された変異型SOD1タンパク質 (例えば、G85RおよびG93A) に対して結合するが、野生型SOD1タンパク質 (SEQ ID NO: 2) に対しては結合しないことを指標にして、非変性条件下において (すなわち、SOD1タンパク質の立体

構造を破壊することなく)スクリーニングを行い、候補抗体を選択した。その結果、目的とする特徴を有する抗体を産生する1種類のハイブリドーマ細胞株、#27(NITE BP-1100; 受託日は2011年5月12日)を得ることができた。

【0038】

このような知見に基づいて、本発明の一態様において、Lys Val Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu (SEQ ID NO: 5) のアミノ酸配列またはArg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile (SEQ ID NO: 6) を含むポリペプチドと結合する抗体を提供する。

【0039】

実際に家族性ALSとの関連性が知られている上述した122種の変異型SOD1タンパク質の一部を選択し、これらの抗体と結合することができるか否かを検出したところ、これらの抗体はいずれも、非変性条件下にて、試験した全ての変異型SOD1タンパク質と結合することが示された。従って、本発明の抗体は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなるタンパク質(すなわち、野生型SOD1タンパク質)には結合しないが、それ以外のSEQ ID NO: 4のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチドに対しては結合することができる。

【0040】

ここで、これらの抗体が結合する対象であるSEQ ID NO: 4のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチドには、変異型SOD1タンパク質が含まれ、より具体的にはSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列のうち、例えばアミノ酸番号3、4、5、6、8、10、12、14、16、19、20、22、29、37、38、40、41、43、45、46、47、48、49、57、59、65、66、72、76、80、84、85、86、87、89、90、93、95、97、99、100、101、104、105、106、108、111、112、113、114、115、116、117、118、124、125、126、127、132、133、134、139、140、141、144、145、146、147、148、149、または151のいずれか1つのアミノ酸残基に、1アミノ酸の置換、欠失または付加を有するものなどが含まれる。

【0041】

これらの結果から、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなるタンパク質以外の、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチド領域の立体構造変化の存在が、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の発症と関連するリスク因子であることが示された。

【0042】

このような知見に基づいて、本発明の別の態様においてはさらに、変異型SOD1タンパク質(限定的ではない例として、例えば、G85RおよびG93A)に対しては結合するが、野生型SOD1タンパク質(SEQ ID NO: 2)に対しては結合しない抗体を使用して、被検体から採取された細胞含有サンプルについてスクリーニングし、そしてその抗体に結合するタンパク質を検出することにより、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなるタンパク質以外の、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 4において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列、SEQ ID NO: 5において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6において1アミノ酸が変異されたアミノ酸配列を含むポリペプチドを検出する方法、そしてその方法を通じて、家族性ALSの発症に関連するリスクを検出する方法を提供する。

【実施例】

【0043】

実施例1: 変異型SOD1タンパク質に対する抗体の作製 (1)

この実施例においては、野生型SOD1タンパク質に対しては結合しないが、変異型SOD1タンパク質に対して結合することができる抗体を産生することを目的に行った。

【0044】

(1) ラットの免疫

SOD1 (5~18 a.a.) (Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln Gly Ile Ile (SEQ ID NO: 3)) のうち、N末端およびC末端に存在する疎水性アミノ酸 (VおよびI) が水溶性を低下させる可能性が考えられたため、SOD1タンパク質の6~16番アミノ酸からなるペプチド (Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln Gly (SEQ ID NO: 4)) のペプチドを免疫原として作製した。

【0045】

このSOD1タンパク質の6~16番アミノ酸からなるペプチドを、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH; Operon社) と複合化した後、1 mg/mLに調製した。SOD1タンパク質の6~16番アミノ酸からなるペプチドのペプチド溶液400 μ LとFreundの完全アジュバント (Sigma) 800 μ Lとを、ルアー式注射筒で攪拌してエマルジョン化し、抗原とした。調製した抗原は一匹当たり200 μ Lをラット (WKY/Izmメス、免疫時8週齢; 日本クレア) 3匹に後肢肉球より片足100 μ Lずつ皮内注射した。

【0046】

(2) ミエローマ細胞の調製、リンパ節細胞の調製、細胞融合

マウスミエローマ細胞株SP2/0-Ag14 (SP2) (DSファーマメディカル) を、10%ウシ胎児血清 (biowest) を含むGIT培地 (和光純薬) 中で37°C、5%CO₂の条件下で培養した。

【0047】

このマウスミエローマ細胞株は、免疫したマウスから採取する細胞との融合予定日から数えて4日前にストックより起こし、細胞融合の当日にはラット1匹当たり10 cmディッシュ6枚がミエローマ細胞によりコンフルエントになるように播いた。細胞融合の当日、GIT培地を吸引除去し、ディッシュ一枚あたりDMEM高グルコース (この培養液を以下において単に「DMEM」という; シグマアルドリッチ) 4 mLを加えてSP2を剥がした。

【0048】

浮遊液を50 mLファルコンチューブに集め、1000 rpm、3分間遠心して上清を吸引除去した。さらにDMEM 20 mLで細胞を浮遊させ、再度1000 rpm、3分間遠心し上清を吸引除去した。最後に5 mL DMEMで細胞を浮遊させ融合に用いるSP2細胞液とした。

【0049】

(1) において免疫されたラットを、エーテルで深麻酔し、心臓より採血を行った。その後、頸椎脱臼させて確実に致死させた後、開腹し腸骨リンパ節を摘出した。セルストレイナー (Becton, Dickinson and Company) を用いて、リンパ節から抗体産生B細胞を含むリンパ節組織細胞をDMEM 2 mL中に回収した。

【0050】

リンパ節細胞液をSP2細胞液中に加え、DMEMで全量40 mLとして懸濁後、1200 rpm、10分間遠心した。上清を吸引除去し沈殿をタッピングでほぐした後、手で握って体温にて2分間インキュベートした。そこに予め調製しておいたポリエチレングリコール (PEG) 1 mLを、ファルコンチューブを振りながら1分間かけてゆっくり滴下した。ファルコンチューブを震盪、回転させ2分間細胞融合反応を行った。

【0051】

反応終了後、まずファルコンチューブを震盪させながら、DMEM 4.5 mLを3分間かけて滴下した。続けてDMEM 4.5 mLを同様に2分間かけて滴下し、900rpm、5分間遠心した。上清を吸引除去し、BM-Condimed H1 (Roche) 4 mLとHAT培地36 mLを加えて細胞を浮遊させた。HAT培地は、チミジン (和光純薬)、ヒポキサンチン (和光純薬) 溶液6 mLを60°Cで溶解し、アミノプテリン (和光純薬) 0.6 mLと攪拌し、0.22 μ mのフィルター (ミリポア) で濾過し、このうち6 mLを10%FBS含有GIT培地 (和光純薬) 555 mLに溶解することにより調製する。

【0052】

10

20

30

40

50

上述したリンパ節組織細胞の細胞液を96ウェルプレート4枚に100 μ L/wellで播き、HAT培地中で約7～10日間培養を行い、ハイブリドーマ細胞を得た。

【0053】

(3) ELISAによる一次スクリーニング

一次スクリーニングとしてSOD1タンパク質の6～16番アミノ酸からなるペプチド (SEQ ID NO: 4) によるELISAを行った。

【0054】

96ウェルMaxisorp ELISAプレート (Nunc) に、3 μ g/mLのKLH複合化されたSOD1タンパク質の6～16番アミノ酸からなるペプチドもしくはKLHを含むPBSを100 μ L/ウェルで分注し、4℃で一晩インキュベートして、プレートウェル表面に対して抗原を吸着させた。抗原液を捨て、1%ウシ血清アルブミンを含むPBSを100 μ L/ウェルで分注して37℃で1時間インキュベートしてブロッキングした後、ハイブリドーマ培養上清を40 μ L/ウェルで分注し37℃で1時間インキュベートした。

【0055】

培養上清を捨ててPBSでウェルを2回洗い、HRP標識抗ラットIgG抗体 (GE Healthcare) 原液を1000倍希釈した0.1%ウシ血清アルブミンを含むPBSを100 μ L/ウェルで分注し、37℃で1時間インキュベートした。二次抗体液を捨ててウェルをPBSで3回洗い、0.4 mg/mL o-フェニレンジアミン (OPD) を含むPBSに発色直前に30% H_2O_2 を0.4 μ L/mLの割合で加えて作った発色基質液を100 μ L/ウェルで分注して室温で1時間放置し発色させた。

【0056】

その結果、266個の陽性クローンを得た (データは示さず)。

【0057】

(4) 限界希釈

24ウェルプレートで培養していたハイブリドーマをピペッティングで浮遊させ、適当量の培養液 (HAT培地) に細胞を希釈して細胞数をカウントした。この細胞液を10%BM conditioned H1を加えたHAT培地30 mL中に0.5細胞/150 μ L/ウェルと1.5細胞/150 μ L/ウェルとなるように加え、96ウェルプレート2枚に200 μ L/ウェルで播いた。

【0058】

このようにして限界希釈を行った後、得られたハイブリドーマのそれぞれを、さらに培養液 (HAT培地) 中で増殖させ、コロニーが形成されたウェルの培養上清を用いて、さらにスクリーニングを行った。

【0059】

(5) 免疫沈降による二次スクリーニング

二次スクリーニングとして、非変性状態でSOD1タンパク質を認識するか否かを評価するため、免疫沈降法 (IP) によりハイブリドーマ上清を評価した。

【0060】

まず、10%ウシ胎児血清、100 unit/mLペニシリンGを含むDMEM高グルコース中で37℃、5% CO_2 の条件下で培養したHEK293A細胞に対して、変異型SOD1を過剰発現させるため、Flag-SOD1 (G93A) をコードする遺伝子を、pcDNA3-Flag-SOD1 (G93A) ベクターを用いて、導入した。Flag-SOD1 (G93A) をコードする遺伝子のヌクレオチド配列は、以下の様にしてpcDNA3-Flag-SOD1 (G93A) ベクター中に形成した。まず、Flag (Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys; SEQ ID NO: 9) をコードするヌクレオチド配列 (ggatccaccg ccatggacta caag gacgat gatgacaagg gcgaattc; SEQ ID NO: 8) を、BamHI-EcoRI制限酵素処理した環状ベクターpcDNA3.0ベクター (Invitrogen) のマルチクローニングサイトに導入した (pcDNA3-Flagベクター)。次に、プライマー (gaattcgcga cgaaggccg (SEQ ID NO: 14) およびgg atccttgg gcgatcccaa tt (SEQ ID NO: 15)) を用いてPCRを行うことにより、SOD1 (G93A) (SEQ ID NO: 11) をコードするヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 10) を、両端にEcoRI制限酵素部位およびXhoI制限酵素部位を導入しつつ増幅した。このPCR産物をEcoRI-XhoIで処理した後、EcoRI-XhoIで処理したpcDNA3-Flagベクターのクローニングサイトに導入することにより、Flagをコードするヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 8) とSOD1 (G93A) を

コードするヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 10) とを融合したFlag-SOD1 (G93A) を含む、pcDNA3-Flag-SOD1 (G93A) ベクターを調製した。このヌクレオチド配列を有するpcDNA3-Flag-SOD1 (G93A) ベクターを、FuGENE6 (Roche) を用いてHEK293A細胞に対して導入した。

【0061】

6ウェルプレートに播種したFlag-SOD1 (G93A) 遺伝子導入細胞を、10% FBS含有DMEM中で48時間培養した後、1ウェル当たり1 mLのIP溶解バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、10 mM EDTA pH 8.0、1%デオキシコール酸ナトリウム、1%Triton-X 100、1 mMフッ化フェニルメチルスルホニル、5 µg/mLロイペプチン) で4℃にて30分間細胞をインキュベートすることにより細胞を溶解し、4℃、15000 rpm、10分間遠心して上清を回収した。

10

【0062】

次いで、上述したように調製した細胞溶解液を、ハイブリドーマ培養上清により免疫沈降した。免疫沈降を行う (1) ~ (4) において調製した本発明の抗体を含む培養上清500 µL、そして対照抗体として野生型SOD1タンパク質を認識する抗SOD1抗体 (Stressgen) または抗Flag抗体 (Sigma; M2抗体) をそれぞれ1 µg/500 µLのIP溶解バッファー (上述したもの) を細胞溶解液500 µLに加え、4℃にて一晩転倒混和し反応させた。

【0063】

反応後、プロテインGセファロースおよびM2アフィニティーアガロースゲル (Sigma) を液量で20 µLに加え、さらに2時間4℃にて転倒混和し反応させた。反応後、上清を除去し1 mLのIP溶解バッファーで4回洗浄して、最後に20 mMのジチオスレイトールを含む50 µLの2×SDSサンプルバッファーを加えて98℃で3分間ボイルし、SDS-PAGEへと供した。

20

【0064】

電気泳動後、ゲルから2フッ化ポリビニリデンメンブレン (0.45 µm, Pall) にタンパク質を転写し、1%スキムミルクを含むTBS-T (150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH 8.0、0.05 %Tween 20) で室温にて2時間ブロッキングした後、5%ウシ血清アルブミンと0.1%NaN₃を含むTBS-Tで希釈した一次抗体で4℃にて一晩反応させた。TBS-Tで2回洗浄した後、1%スキムミルクを含むTBS-Tで希釈した二次抗体で室温にて1時間反応、TBS-Tで2時間洗浄した。

【0065】

検出は高感度ケミルミネッセンス法 (enhanced chemiluminescence; ECL) (GE Healthcare) にて行った。ウェスタンブロッティングにおいては、一次抗体として、抗Flag抗体 (M2; Sigma)、抗SOD1抗体 (SOD-100; Stressgen)、二次抗体として抗マウスIgG抗体 (GE Healthcare)、抗ラットIgG抗体 (Cell signaling)、抗ウサギIgG抗体 (Cell signaling)、いずれもHRP標識したものをを用いた。

30

【0066】

その結果、#242、#406、#659、#785、#1175のハイブリドーマ上清で、Flag-SOD1 (G93A) を検出することができた (図2)。

【0067】

(6) 抗体のさらなる検討

さらに、他の変異型SOD1タンパク質も検出可能か否かを評価するために、Flag-SOD1 (G85R) 遺伝子導入細胞も同様に培養して、Flag-SOD1 (G85R) を過剰発現させ、細胞溶解液を上記5種類のハイブリドーマ上清により免疫沈降し、免疫沈降したFlag-SOD1 (G85R) をウェスタンブロッティングよりさらに検討した。

40

【0068】

Flag-SOD1 (G85R) をコードする遺伝子のヌクレオチド配列は、(5) で調製したpcDNA3-Flagベクターに対して導入して、以下の様にしてpcDNA3-Flag-SOD1 (G85R) ベクター中に形成した。プライマー (gaattcgcca cgaaggccg (SEQ ID NO: 14) およびggatccttgg gcgatcccaa tt (SEQ ID NO: 15)) を用いてPCRを行うことにより、SOD1 (G85R) (SEQ ID NO: 13) をコードするヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 12) を、両端にEcoRI制限酵素部位

50

およびXhoI制限酵素部位を導入しつつ増幅した。このPCR産物をEcoRI-XhoIで処理した後、EcoRI-XhoIで処理したpcDNA3-Flagベクターのクローニングサイトにを導入することにより、Flagをコードするヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 8) とSOD1 (G85R) をコードするヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 12) とを融合したFlag-SOD1 (G85R) を含む、pcDNA3-Flag-SOD1 (G85R) ベクターを調製した。このヌクレオチド配列を有するpcDNA3-Flag-SOD1 (G85R) ベクターを、(5) の場合と同様にしてFuGENE6 (Roche) を用いてHEK293A細胞に対して導入した。また、検討のための免疫沈降およびウェスタンブロッティングも、(5) において上述したように行った。

【0069】

その結果、#406、#659、#785のハイブリドーマ上清でFlag-SOD1 (G85R) を検出することができた (図3)。

10

【0070】

これらの結果から、本発明において、SOD1 (G93A) およびSOD1 (G85R) の両方ともと結合することができた、#406、#659、#785の3種のハイブリドーマを好ましいものとして選択し、これらの細胞株を独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE)、特許微生物寄託センター (NPMD) に寄託した (#406、#659、および#785の寄託番号はそれぞれ、NITE P-941、NITE BP-942、およびNITE BP-943; 受託日はいずれも2010年5月12日)。

【0071】

実施例2: 抗体の抗原認識性の検討

実施例1において得られた#406、#659、#785の3種のハイブリドーマ細胞の培養上清が、野生型SOD1タンパク質を認識せず、SOD1 (G85R) とSOD1 (G93A) を認識したことから、本実施例においては、他の様々な変異型SOD1タンパク質をも共通に認識するか否かを検討した。

20

【0072】

実験は、#785ハイブリドーマから得られた細胞上清を用いて、実施例1 (5) および (6) と同様に様々な変異型SOD1タンパク質を発現する細胞を調製し、それぞれの細胞溶解液と#785ハイブリドーマから得られた細胞上清とを混合することにより免疫沈降を行い、さらに得られたそれぞれのFlag-変異SOD1タンパク質を、一次抗体として、抗Flag抗体 (M2; Sigma)、二次抗体としてはいずれもHRP標識した抗マウスIgG抗体 (GE Healthcare)、抗ラットIgG抗体 (Cell signaling)、抗ウサギIgG抗体 (Cell signaling) を用いた。

30

【0073】

その結果、今回検討を行ったSOD1 (K3E)、SOD1 (A4S)、SOD1 (A4T)、SOD1 (A4V)、SOD1 (V5L)、SOD1 (C6F)、SOD1 (C6G)、SOD1 (C6Y)、SOD1 (G16A)、SOD1 (G16S)、SOD1 (F20C)、SOD1 (V29A)、SOD1 (G37R)、SOD1 (L38R)、SOD1 (L38V)、SOD1 (E40G)、SOD1 (G41D)、SOD1 (G41S)、SOD1 (H43R)、SOD1 (F45C)、SOD1 (H46R)、SOD1 (V47A)、SOD1 (V47F)、SOD1 (H48Q)、SOD1 (H48R)、SOD1 (C57R)、SOD1 (S59I)、SOD1 (N65S)、SOD1 (P66A)、SOD1 (G72C)、SOD1 (G72S)、SOD1 (D76V)、SOD1 (D76Y)、SOD1 (H80R)、SOD1 (L84F)、SOD1 (L84V)、SOD1 (G85R)、SOD1 (G85S)、SOD1 (N86D)、SOD1 (N86I)、SOD1 (N86K)、SOD1 (N86S)、SOD1 (V87A)、SOD1 (V87M)、SOD1 (T88Δ) (T88、A89およびD90の3アミノ酸の欠損を意味する)、SOD1 (A89T)、SOD1 (A89V)、SOD1 (D90A)、SOD1 (D90V)、SOD1 (G93A)、SOD1 (G93C)、SOD1 (G93D)、SOD1 (G93R)、SOD1 (G93S)、SOD1 (G93V)、SOD1 (A95T)、SOD1 (A95V)、SOD1 (V97L)、SOD1 (V97M)、SOD1 (I99V)、SOD1 (E100G)、SOD1 (E100K)、SOD1 (D101G)、SOD1 (D101H)、SOD1 (D101N)、SOD1 (D101Y)、SOD1 (I104F)、SOD1 (S105L)、SOD1 (S105Δ)、SOD1 (L106V)、SOD1 (G108V)、SOD1 (C111Y)、SOD1 (I112M)、SOD1 (I112T)、SOD1 (I113F)、SOD1 (I113T)、SOD1 (G114A)、SOD1 (R115G)、SOD1 (T116R)、SOD1 (L117V)、SOD1 (V118L)、SOD1 (V118+)、SOD1 (D124G)、SOD1 (D124V)、SOD1 (D125H)、SOD1 (L126S)、SOD1 (L126*)、SOD1 (L126Δ)、SOD1 (E132+)、SOD1 (E133V)、SOD1 (E133Δ)、SOD1 (S134N)、SOD1 (N139D)、SOD1 (N139H)、SOD1 (N139K)、SOD1 (A140G)、SOD1 (G141E)、SOD1 (G141*)、SOD1 (L144F1)、SOD1 (L144F2)、SOD

40

50

1 (L144S)、SOD1 (A145G)、SOD1 (A145T)、SOD1 (C146R)、SOD1 (C146*)、SOD1 (G147D)、SOD1 (G147R)、SOD1 (V148G)、SOD1 (I149T)、SOD1 (I151S)、およびSOD1 (I151T) の、107種類全てについて、本発明の抗体により免疫沈降可能であること、すなわち程度の差はあるものの、本発明の抗体が、変異型SOD1タンパク質の変異の部位に関わらず、変異型SOD1タンパク質を認識できることが明らかとなった(図4a)～i)。図4において、欠失を示すために図1における表記「Δ」に代えて「del」と記載され、挿入を示すために図1における表記「+」に代えて「ins」と記載され、そして停止コドンを示すために図1における表記「*」に代えて「Z」または「stop」と記載される場合がある。

【0074】

実施例3：変異型SOD1タンパク質に対する抗体の作製 (2)

この実施例においては、野生型SOD1タンパク質に対しては結合しないが、変異型SOD1タンパク質に対して結合することができるさらなる抗体を産生することを目的に行った。

【0075】

この様な特徴を有する抗体を作製することを目的として、野生型SOD1タンパク質の30～40番アミノ酸からなるペプチド (Lys Val Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu (SEQ ID NO: 5)) のペプチドを、免疫原として使用して、抗体を作製した。

【0076】

野生型SOD1タンパク質の30～40番アミノ酸からなるペプチドを、1 mg/mLに調製し、ペプチド溶液400 μLとFreundの完全アジュバント (Sigma) 800 μLとを、ルアー式注射筒で攪拌してエマルジョン化し、抗原とした。調製した抗原は一匹当たり200 μLをラット (WKY/Izmメス、免疫時8週齢；日本クレア) 3匹に後肢肉球より片足100 μLずつ皮内注射した。

【0077】

この後の抗体を産生する工程ならびに抗体をスクリーニングする工程は、いずれも実施例1に記載される様に行った。

【0078】

その結果、#27のハイブリドーマ上清により、野生型SOD1タンパク質は検出されなかったが、Flag-SOD1 (A4V)、Flag-SOD1 (G85R) およびFlag-SOD1 (G93A) の変異型SOD1タンパク質を検出することができた(図5A)。そして、得られた#27のハイブリドーマを好ましいものとして、この細胞株を独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE)、特許微生物寄託センター (NPMD) に寄託した (#27の寄託番号は、NITE BP-1100；受託日は2011年5月12日)。

【0079】

本実施例においてはさらに、得られた#27のハイブリドーマ細胞の培養上清が、SOD1 (A4V)、SOD1 (G85R)、およびSOD1 (G93A) 以外の他の様々な変異型SOD1タンパク質、特にSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列のうちSEQ ID NO: 4に対応する部分に変異を有する変異型SOD1タンパク質を認識するか否かを、#27のハイブリドーマから得られた抗体を使用して、実施例2に記載される様に検討した。

【0080】

その結果、#27のハイブリドーマから得られた抗体は、今回検討を行ったSOD1 (A4V)、SOD1 (L8Q)、SOD1 (L8V)、SOD1 (G10R)、SOD1 (G10V)、SOD1 (G12R)、SOD1 (V14G)、SOD1 (V14M)、SOD1 (G85R)、およびSOD1 (G93A) の10種類の変異SOD1タンパク質全てを免疫沈降可能であること、すなわち、#27のハイブリドーマから得られた抗体が、免疫源として使用した野生型SOD1タンパク質の30～40番アミノ酸からなるペプチド領域以外の変異型SOD1タンパク質の変異部位に関わらず、変異型SOD1タンパク質を認識できることが明らかとなった(図5B)。

【0081】

実施例4：変異型SOD1抗体による細胞免疫染色

本実施例においては、本発明の変異型SOD1抗体が、細胞免疫染色においても変異型SOD1

10

20

30

40

50

タンパク質を検出可能か否かを検討した。

【0082】

コラーゲンコートしたφ12 mmカバーグラスを1枚入れた24ウェルプレートにHEK293A細胞を 0.4×10^5 細胞/ウェルで播種12~16時間後に、Flag-SOD1 (WT) (Flagをコードするヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 8) と野生型SOD1タンパク質をコードするヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 1) とを連結させたもの) またはFlag-SOD1 (G93A) をコードするヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 10) を、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ウェル}$ で遺伝子導入し、Flag-SOD1 (WT) とFlag-SOD1 (G93A) を過剰発現させた。

【0083】

遺伝子導入後24時間後にカバーグラスをPBS 約5 mLに3回浸して洗い、4%パラフォルムアルデヒドにて細胞を固定した。固定後、カバーグラスをPBS 約5 mLで3回洗い、0.2% Triton X-100にて細胞膜透過処理を行った。Triton X-100処理後、カバーグラスをPBS約5 mLで3回洗い、水素化ホウ素ナトリウム $500 \mu\text{L}$ 上にカバーグラスをかぶせて1分間室温でインキュベートして退色防止処理を行った。その後、カバーグラスをPBS約5 mLで3回洗い、5%FBSにてブロッキング後、一次抗体として#406ハイブリドーマ培養上清を用いて細胞免疫染色を行った後、抗Flag抗体 (M2抗体) でFlagを認識した。二次抗体としてAlexa 488抗-ラットIgG、Alexa 633抗-マウスIgGでインキュベートした。

【0084】

抗Flag抗体の蛍光強度がほぼ同じ細胞で、変異型SOD1抗体の蛍光強度を比較したところ、Flag-SOD1 (G93A) においてFlag-SOD1 (WT) よりも蛍光強度が強かった (図5)。これより#406は、SOD1タンパク質の変異型特異的な立体構造変化 (Derlin-1結合部位が露出する) を細胞免疫染色においても検出できると考えられる。

【0085】

実施例5：変異型SOD1抗体によるヒト血液由来B細胞の細胞質中に存在する変異型SOD1タンパク質の検出

本実施例においては、本発明の抗体により、ヒト筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の個体の血液中B細胞の細胞質中に存在する変異型SOD1タンパク質を検出可能か否かを検討した。この実施例は、東京大学大学院医学系研究科の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会」、および東京大学大学院薬学系研究科・薬学部の「ヒトを対象とする研究倫理審査委員会」における承認に基づいて行った。

【0086】

ALSのヒトの患者から、静脈血10 mLを採血し、SRL社においてエプスタイン・バー・ウイルス感染により不死化されたB細胞を使用して、各サンプルB細胞を、1チューブ当たり 2×10^7 個ずつに分注し、そして1チューブ当たり $500 \mu\text{L}$ のIP溶解バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、10 mM EDTA pH 8.0、1%デオキシコール酸ナトリウム、1%Triton-X 100、1 mMフッ化フェニルメチルスルホニル、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ロイペプチン) で 4°C にて30分間、細胞をインキュベートすることにより細胞を溶解し、 4°C 、15000 rpm、10分間遠心して上清を回収した。

【0087】

次いで、上述したように調製した細胞溶解液を、#785のハイブリドーマから得られる培養上清により、下記のように免疫沈降した後、免疫沈降した抗体-SOD1複合体を、抗SOD1抗体を用いて免疫プロットングした。

【0088】

免疫沈降を行う#785のハイブリドーマから得られる抗体を含む培養上清 $500 \mu\text{L}$ を、 $1 \mu\text{g}/500 \mu\text{L}$ のIP溶解バッファー (上述したもの) を細胞溶解液 $500 \mu\text{L}$ に加え、 4°C にて一晩転倒混和し反応させた。

【0089】

反応後、プロテインGセファロースアガロースゲル (Sigma) を液量で $20 \mu\text{L}$ 加え、さらに2時間 4°C にて転倒混和し反応させた。反応後、上清を除去し1 mLのIP溶解バッファーで4回洗浄して、最後に20 mMのジチオスレイトールを含む $50 \mu\text{L}$ の2×SDSサンプルバッファ

10

20

30

40

50

ーを加えて98℃で3分間ボイルし、SDS-PAGEへと供した。

【0090】

電気泳動後、ゲルから2フッ化ポリビニリデンメンブレン (0.45 μm、Pall) にタンパク質を転写し、1%スキムミルクを含むTBS-T (150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl pH 8.0、0.05 %Tween 20) で室温にて2時間ブロッキングした後、5%ウシ血清アルブミンと0.1%NaN₃を含むTBS-Tで希釈した一次抗体で4℃にて一晚反応させた。TBS-Tで2回洗浄した後、1%スキムミルクを含むTBS-Tで希釈した二次抗体で室温にて1時間反応、TBS-Tで2時間洗浄した。

【0091】

検出は高感度ケミルミネッセンス法 (enhanced chemiluminescence ; ECL) (GE Health care) にて行った。ウェスタンブロットティングにおいては、一次抗体として、抗SOD1抗体 (SOD-100 ; Stressgen)、二次抗体としてHRP標識抗ウサギIgG抗体 (Cell signaling) を用いた。

【0092】

その結果、本発明の抗体 (例えば、#785) のハイブリドーマから得られた抗体を使用することにより、ヒトALS患者から採取された種々のSOD1変異を検出可能であることが示された (図7)。

【産業上の利用可能性】

【0093】

本発明により、変異型SOD1タンパク質を検出することにより、ALSのリスクを検出する方法を新たに提供することができる。本発明においてはさらに、上記の方法において変異型SOD1タンパク質を検出するために使用することができる、野生型 (すなわち正常な) SOD1タンパク質は結合しないが、変異型SOD1タンパク質には結合する抗体を提供することもできる。これらの効果により、これまでは臨床的に鑑別が難しかったALSまたはALSのリスクを、確実に検出することができる。

【配列表フリーテキスト】

【0094】

SEQ ID NO: 1 : ヒト野生型SOD1タンパク質をコードするDNAのヌクレオチド配列

SEQ ID NO: 2 : ヒト野生型SOD1タンパク質のアミノ酸配列

SEQ ID NO: 3 : SEQ ID NO: 2の5~18番アミノ酸からなるポリペプチドのアミノ酸配列

SEQ ID NO: 4 : SEQ ID NO: 2の6~16番アミノ酸からなるポリペプチドのアミノ酸配列

SEQ ID NO: 5 : SEQ ID NO: 2の30~40番アミノ酸からなるポリペプチドのアミノ酸配列

SEQ ID NO: 6 : SEQ ID NO: 2の143~151番アミノ酸からなるポリペプチドのアミノ酸配列

SEQ ID NO: 7 : Derlin-1 (CT4) のアミノ酸配列

SEQ ID NO: 8 : Flagタグをコードするヌクレオチド配列

SEQ ID NO: 9 : Flagタグのアミノ酸配列

SEQ ID NO: 10 : SOD1 (G93A) タンパク質をコードするヌクレオチド配列

SEQ ID NO: 11 : SOD1 (G93A) タンパク質のアミノ酸配列

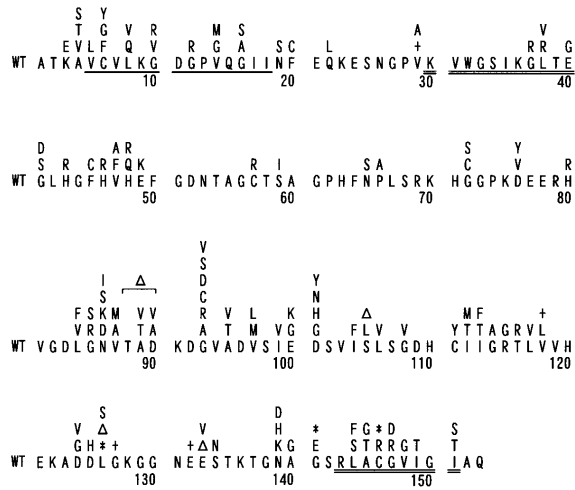
SEQ ID NO: 12 : SOD1 (G85R) タンパク質をコードするヌクレオチド配列

SEQ ID NO: 13 : SOD1 (G85R) タンパク質のアミノ酸配列

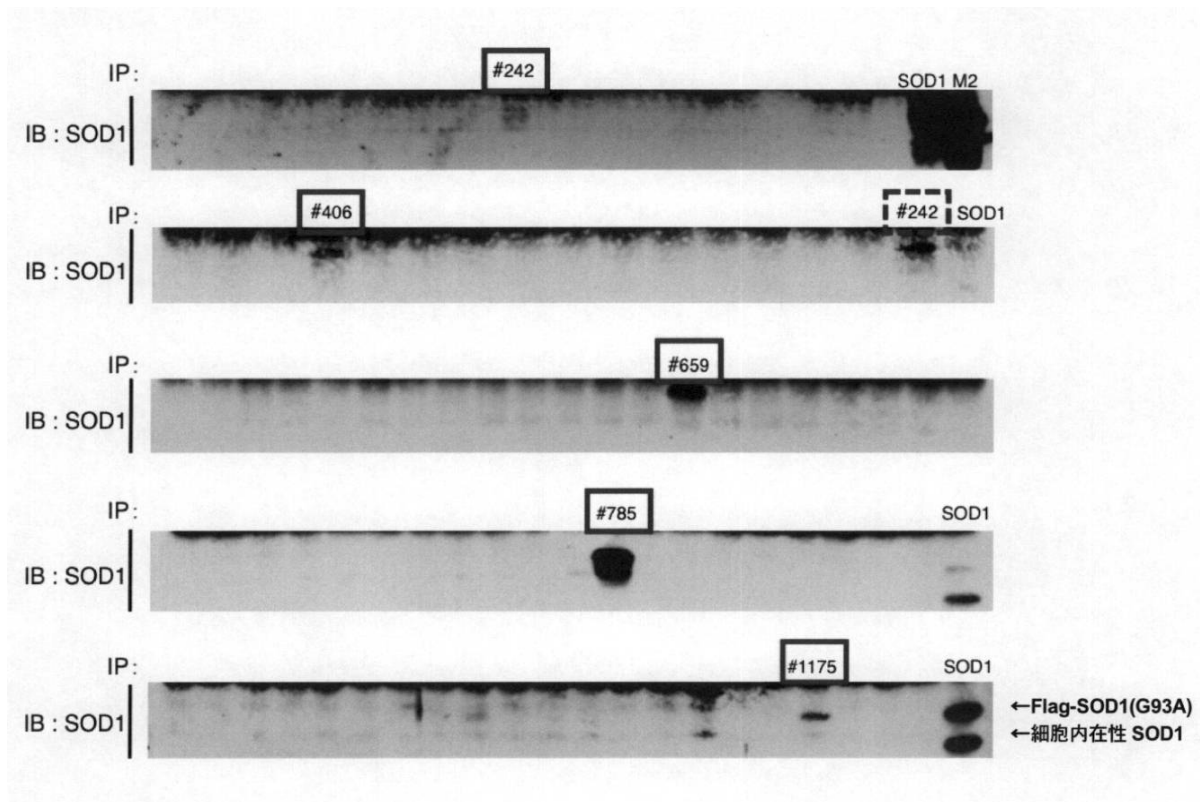
SEQ ID NO: 14 : SOD1増幅用プライマー

SEQ ID NO: 15 : SOD1増幅用プライマー

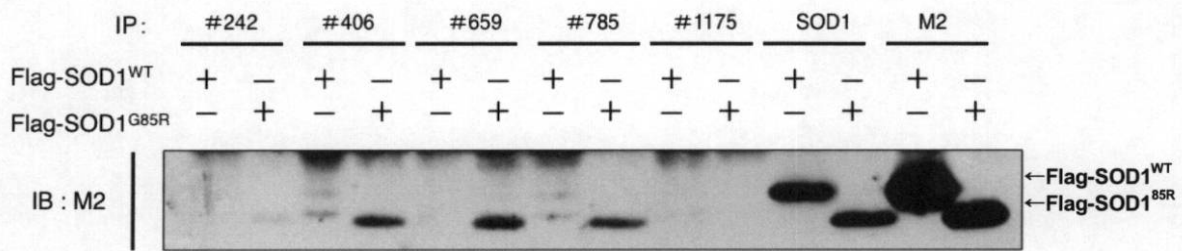
【図 1】



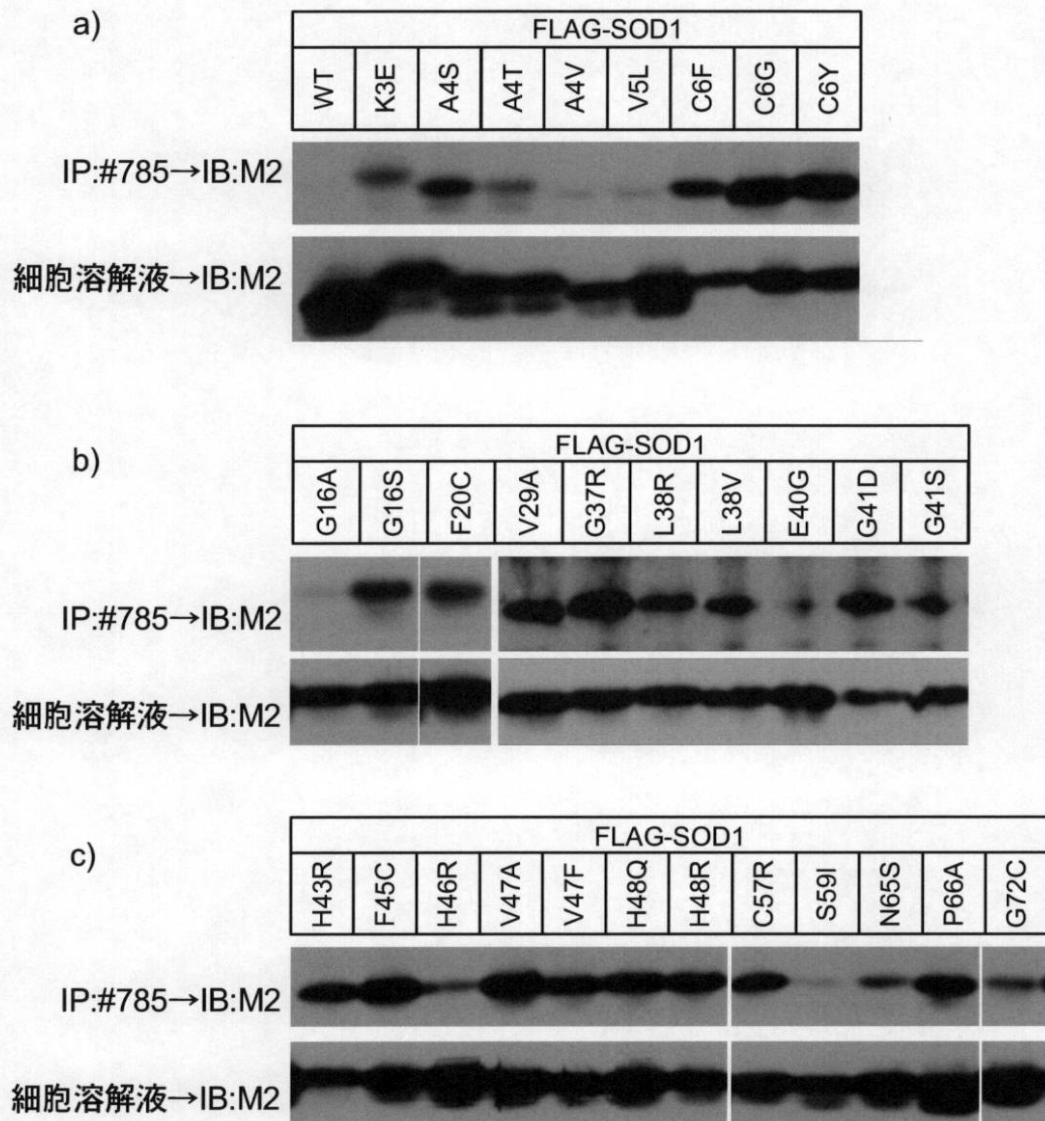
【図 2】



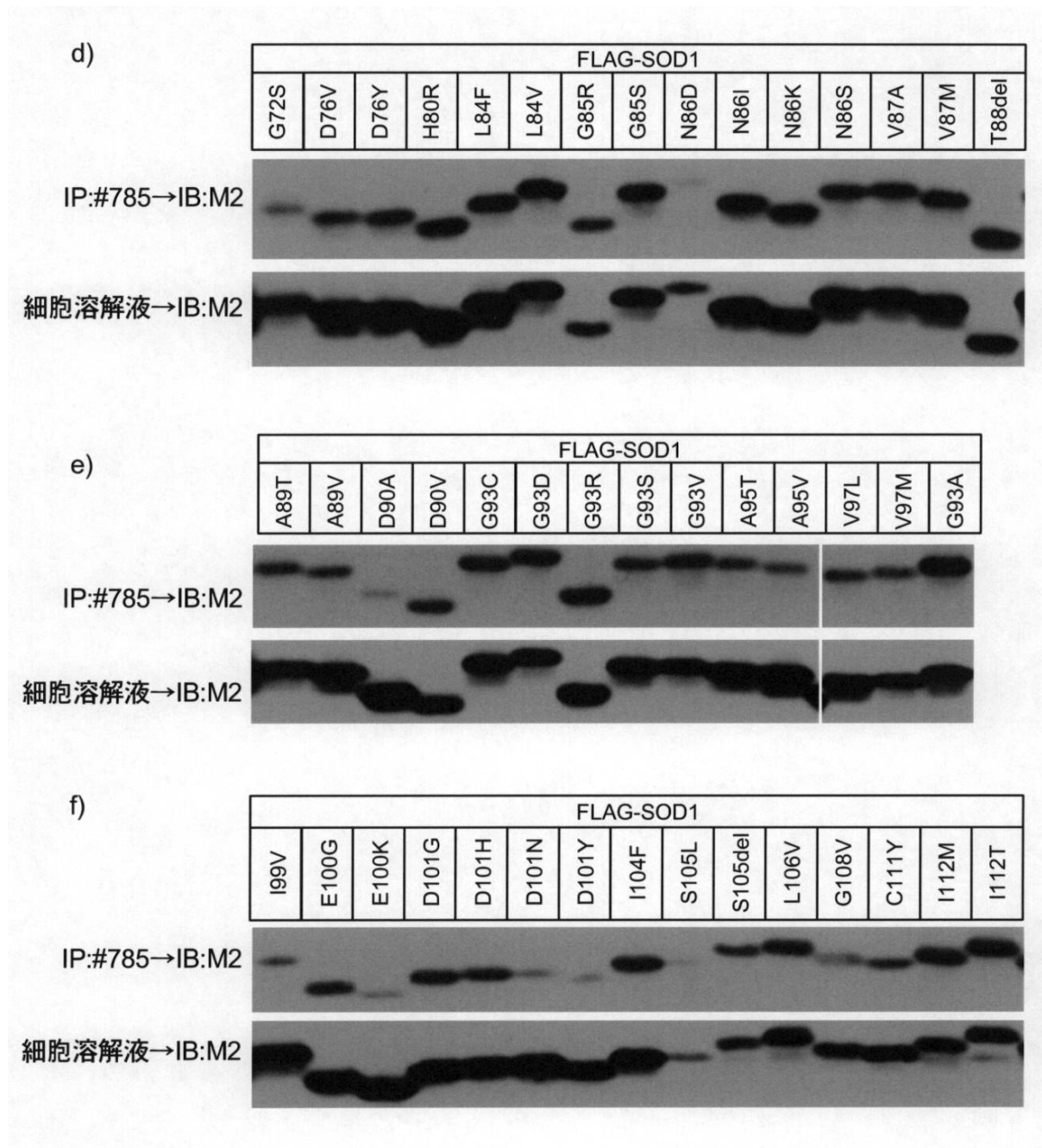
【図 3】



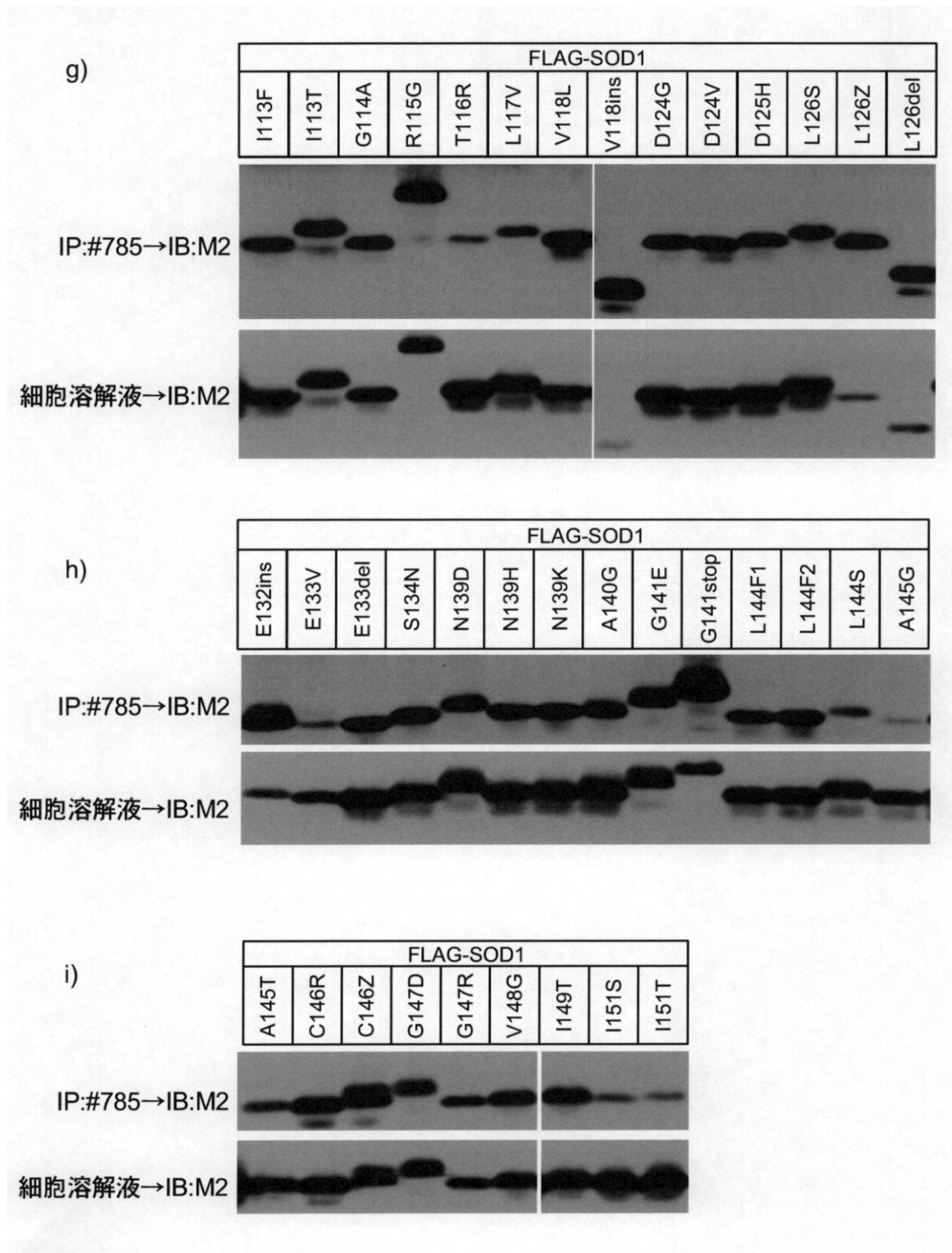
【図 4 - 1】



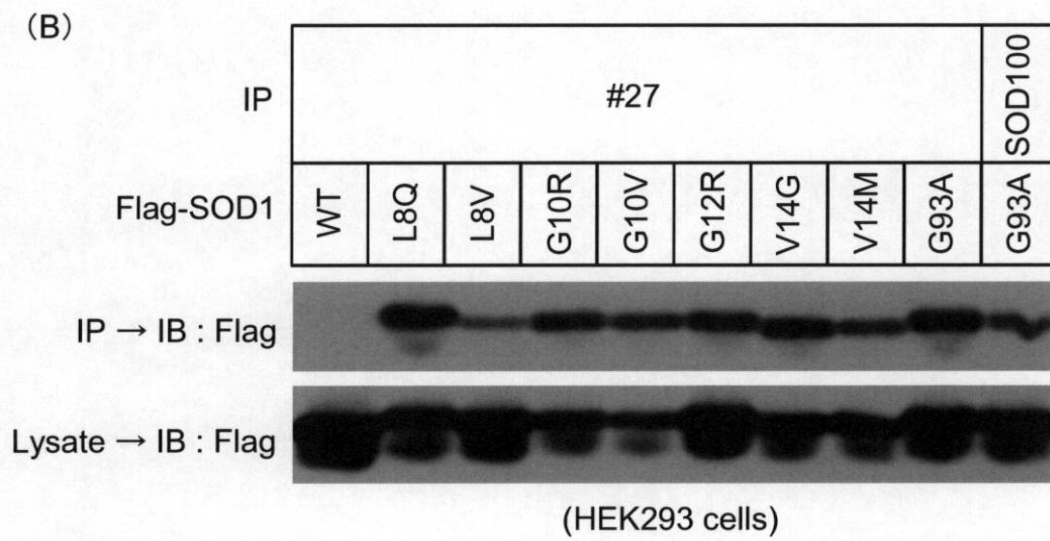
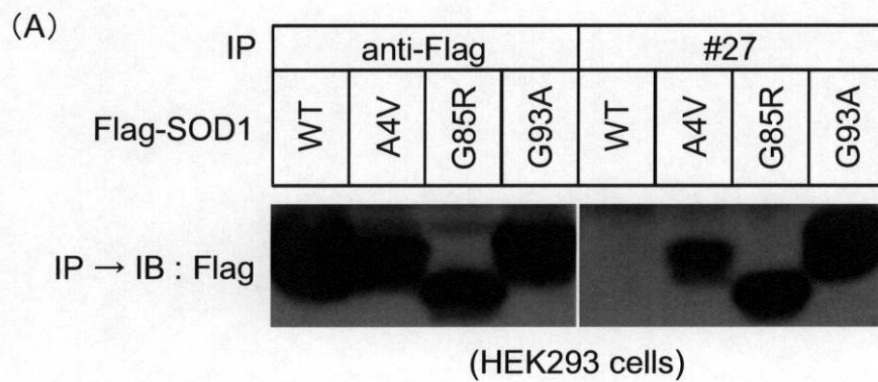
【図 4 - 2】



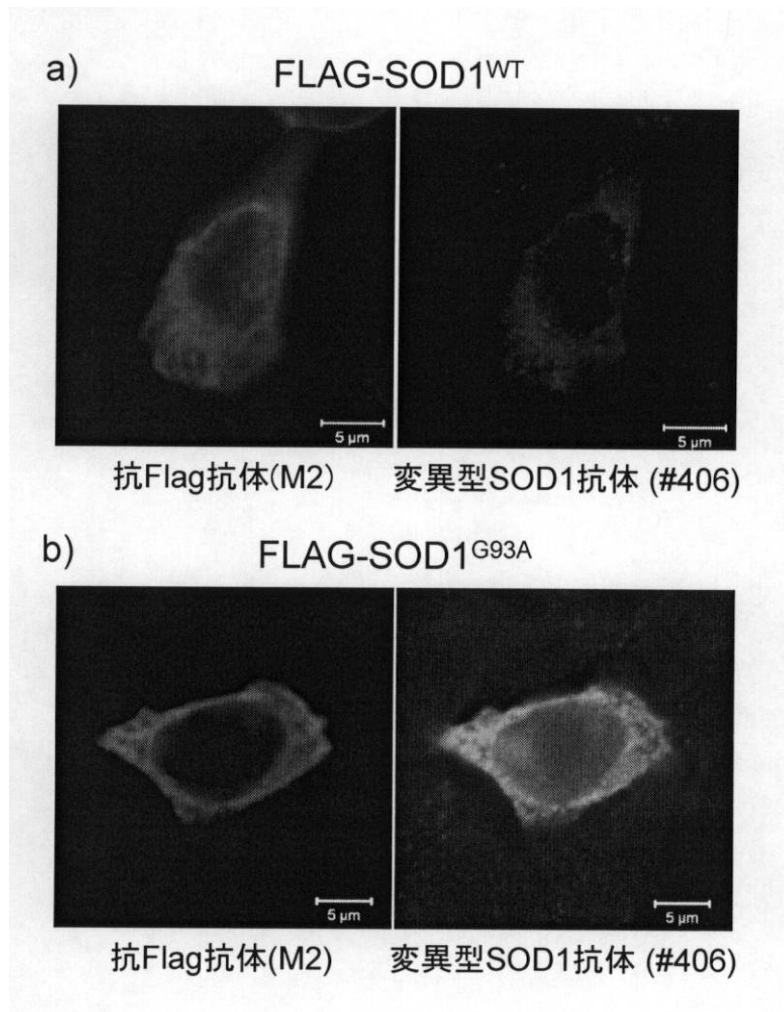
【図 4 - 3】



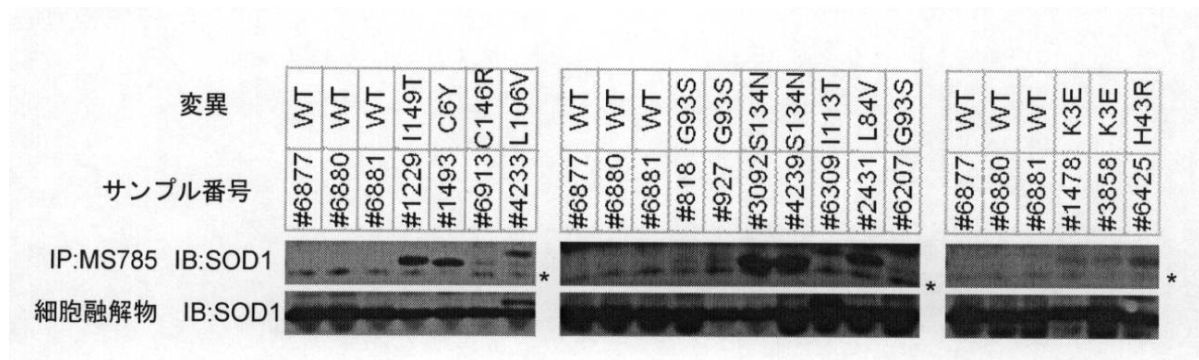
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【配列表】

[0005828521000001.app](#)

フロントページの続き

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-942

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-943

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-1100

(72)発明者 一條 秀憲

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 西頭 英起

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 国際公開第2007/025385 (WO, A1)

国際公開第2009/100141 (WO, A1)

URUSHITANI Makoto.et al., Therapeutic effects of immunization with mutant superoxide dismutase in mice models of amyotrophic lateral sclerosis, PNAS, 2007年, Vol.104, p.2495-2500

漆谷 真, 免疫療法によるALSの分子標的治療, 医学のあゆみ, 2010年10月16日, Vol.1235, p.255-260

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/18

C12N 15/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

CAPLUS/REGISTRY (STN)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

专利名称(译)	用于诊断肌萎缩侧索硬化症 (ALS) 的抗体		
公开(公告)号	JP5828521B2	公开(公告)日	2015-12-09
申请号	JP2012514849	申请日	2011-05-13
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人 东京大学		
申请(专利权)人(译)	东京大学		
当前申请(专利权)人(译)	东京大学		
[标]发明人	一條秀憲 西頭英起		
发明人	一條 秀憲 西頭 英起		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/40 C07K2317/33 G01N33/6896 G01N2333/90283 G01N2800/28		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12N15/00.C C12P21/08 G01N33/53.N		
代理人(译)	小林 泰 星野 修		
优先权	2010111375 2010-05-13 JP		
其他公开文献	JPWO2011142461A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明旨在阐明肌萎缩侧索硬化 (ALS) 发展的分子机制的一部分，并通过利用阐明的ALS发病的分子机制来研究ALS的风险。。本发明通过提供一种通过检测突变SOD1蛋白来检测ALS风险的方法解决了上述问题。即，为了检测突变SOD1蛋白，在本发明中，野生型 (即正常) SOD1蛋白不结合，通过提供结合至突变体SOD1蛋白的抗体，解决上述问题的这是。

(21) 出願番号	特願2012-514849 (P2012-514849)	(73) 特許権者	504137912
(86) (22) 出願日	平成23年5月13日 (2011. 5. 13)		国立大学法人 東京大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/061069		東京都文京区本郷七丁目3番1号
(87) 国際公開番号	W02011/142461	(74) 代理人	100140109
(87) 国際公開日	平成23年11月17日 (2011. 11. 17)		弁理士 小野 新次郎
審査請求日	平成26年5月7日 (2014. 5. 7)	(74) 代理人	100075270
(31) 優先権主張番号	特願2010-111375 (P2010-111375)		弁理士 小林 泰
(32) 優先日	平成22年5月13日 (2010. 5. 13)	(74) 代理人	100096013
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 富田 博行
		(74) 代理人	100092967
	(出願人による申告) 「平成21年度 独立行政法人医		弁理士 星野 修
	薬基盤研究所 「ALS治療薬開発のための一時的評価系	(74) 代理人	100117813
	の構築」、産業技術力強化法第19条の適用を受けるも		弁理士 深澤 憲広
	の」		
微生物の受託番号	NPMD NITE P-941		

最終頁に続く