

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年2月16日 (16.02.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/016644 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京オフィス内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKs & Co.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/014735

(22) 国際出願日: 2005年8月11日 (11.08.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-234857 2004年8月11日 (11.08.2004) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱化学株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) [JP/JP]; 〒1080014 東京都港区芝五丁目33番8号 Tokyo (JP). 三菱ウェルファーマ株式会社 (MITSUBISHI PHARMA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5410046 大阪府大阪市中央区平野町2丁目6番9号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 星 美奈子 (HOSHI, Minako) [JP/JP]; 〒1948511 東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化学生命科学研究室内 Tokyo (JP). 内藤 幸嗣 (NAITO, Koji) [JP/JP]; 〒1038405 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京オフィス内 Tokyo (JP). 井手野 祥次 (IDENO, Shouji) [JP/JP]; 〒1038405

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTIBODY AND UTILIZATION OF THE SAME

(54) 発明の名称: 抗体及びその利用

(57) Abstract: It is intended to provide antibodies having a higher reactivity with amylospheroid than a reactivity with amyloid β -fiber and so on. Some of these antibodies have an activity of inhibiting amylospheroid formation or an activity of inhibiting the induction of nerve cell death by amylospheroid. Such antibodies are usable in remedies/preventives for Alzheimer's disease, screening these drugs, detecting an individual suffering from Alzheimer's disease, reagents and so on.

(57) 要約: 本発明は、アミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド β 線維に対する反応性よりも高い抗体等を提供することを目的とする。また、上記抗体の中には、アミロスフェロイドの形成に対する阻害活性、あるいはアミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有するものがあり、該抗体は、アルツハイマー病の治療／及び予防薬、又はそのスクリーニング、アルツハイマー病個体検出方法及び試薬等に用いることができる。

WO 2006/016644 A1

明 細 書

抗体及びその利用

技術分野

[0001] 本発明は、アミロスフェロイドに対する高い反応性を有する新規な抗体及びその利用法に関するものである。

背景技術

[0002] アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、プリオン病等の加齢に伴って発症する複数の神経変性疾患において、現在「異常構造蛋白質」が共通の発症機構として注目され、その分子実体の探索が行われている。アルツハイマー病については、アミロイド β 蛋白質 ($A\beta$) を主成分とする老人斑 (Selkoe, D.J., Annu. Rev. Neurosci., 12, 463-490 (1989)、及び Glenner, G. G. and Wong, C. W., Biochem. Biophys. Res. Commun., 120(3), 885-890 (1984) を参照) と、リン酸化されたタウ蛋白質を主成分とする神経原線維変化 (Paired Helical Filament; PHF) (Ihara, Y. et al., J. Biochem., 99, 1807-1810 (1986)、及び Grundke-Iqbal, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83, 4913-4917 (1986) を参照) の2種の線維性凝集体が脳に沈着することが病理学的特徴として報告されている。また近年、複数の多様な病因により発症すると考えられてきたアルツハイマー病研究において、アミロイド β 蛋白質の沈着が全てに共通な発症経路であると考えられるようになってきた。アミロイド β 蛋白質は、その前駆体物質 (Amyloid Precursor Protein; APP) から主として40残基 ($A\beta_{1-40}$) ないしは42残基 ($A\beta_{1-42}$) の分子種として切り出されて生じるペプチドであり、正常人においても恒常性を維持した生成・分解過程が進んでいるが、アルツハイマー病におけるアミロイド β 蛋白質の過剰な沈着は、切り出しの過程、又は分解の過程での脱制御の結果であると考えられる。本明細書では、前者 ($A\beta_{1-40}$) を「アミロイド β 40」、「アミロイド β 40モノマー」または「アミロイド β 40モノマー蛋白質」と、また後者 ($A\beta_{1-42}$) を「アミロイド β 42」、「アミロイド β 42モノマー」または「アミロイド β 42モノマー蛋白質」と、称することがある。また、43残基 ($A\beta_{1-43}$) の分子種としても微量ながら切り出されて生じ、これを「アミロイド β 43」、「アミロイド β 43モノマー」または「アミロイド β 43モノマー蛋白質」と称することがある。

白質」と、称することがある。

[0003] 沈着したアミロイド β 蛋白質は神経細胞に対し神経毒として作用してシナプスの変性とそれに続く神経細胞死を引き起こし、これがアルツハイマー病の進行性痴呆の原因となる選択的な神経細胞脱落の機構であると考えられている。また、アミロイド β 蛋白質は水溶性のペプチドとして細胞外に放出された状態では神経細胞死活性(以下、本明細書中において神経細胞死活性を「毒性」と称することがある)を示さず、自己会合しアミロイド β 線維を形成して初めて毒性を獲得することが報告されている(Lorenzo, A. and Yankner, B. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91, 12243-12247 (1994)を参照)。このアミロイド β 線維を含む毒性アミロイド β 蛋白質含有液を神経系の培養細胞に高濃度で添加すると、これらの細胞を死に至らしめることが知られているため、アルツハイマー病においてはこのアミロイド β 線維が神経細胞死を誘発している本体であると考えられてきた。

[0004] 従って、このアミロイド β 線維を含む毒性アミロイド β 蛋白質の添加により神経系細胞等に細胞死を誘発する実験系は、アルツハイマー病における神経細胞死を反映していると見なされ、神経細胞死抑制剤のスクリーニング等に多く用いられてきた。しかし近年、(1)アミロイド β 線維を含む毒性アミロイド β 蛋白質含有液で神経細胞死を誘導するのに必要な濃度は数 $10 \mu\text{M}$ であり(Yankner, B. A., et. al., Science, 250, 279-282 (1990)を参照)、アルツハイマー病患者の脳に存在するアミロイド β 蛋白質濃度の1000倍以上高い濃度である、(2)アルツハイマー病患者の脳においてアミロイド β 線維の沈着量が、記憶や認知機能などの高次機能の障害程度と必ずしも相関せず、大量のアミロイド β 線維の沈着を持ちながら何の臨床症状を示さない場合もあること、(3)さらに、脳内のアミロイド β の沈着部位と神経細胞脱落部位が必ずしも一致していない、(4)APP過剰発現マウスの脳においてアミロイド β 線維の沈着以前、又は沈着なしに学習行動異常が生じる、(5)アルツハイマー病患者の脳における水溶性アミロイド β 蛋白質含量の増加は沈着よりも10年以上先行する等、アミロイド β 蛋白質の毒性の本体がアミロイド β 線維ではないことを示唆する事実が報告されるようになってきた。

[0005] 本発明者らは、先に、アルツハイマー病等の患者の生体内に存在する自己会合し

たアミロイド β 蛋白質と同等の濃度で神経系細胞に細胞死を誘導する、高い毒性を有する自己会合型アミロイド β 蛋白質含有液、及びその調製方法を提案した(特開2001-247600号公報)。さらに、上記自己会合型アミロイド β 蛋白質含有液に含まれる神経細胞毒性の本体を分離する方法を見だし、解析を行ったところ、粒径約10～約20nm程度の粒状の形態を有する自己会合型アミロイド β 蛋白質であることがわかり、これをアミロスフェロイドと命名した。本明細書では、この命名に従い、粒径約10～約20nm程度の粒状の形態を有する自己会合型アミロイド β 蛋白質を「アミロスフェロイド」と称することがある。

[0006] アミロスフェロイドは、アルツハイマー病患者の脳内に存在するアミロイド β 蛋白質と同等の濃度で神経細胞死を誘導し、またアミロスフェロイドによって神経が死に至る過程でもう一つの病理学的マーカーであるタウ蛋白質のリン酸化を引き起こすなど、アルツハイマー病で起きている病態と合致するため、脳内におけるアミロイド β 蛋白質の毒性の本体であると考えられた。したがって、(1)アミロスフェロイドの形成を阻害する抗体、あるいは(2)アミロスフェロイドの神経系細胞に対する毒性を阻害する抗体を取得すれば、アルツハイマー病の治療または予防薬として用いることができる。また、(3)アミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド β モノマーやアミロイド β 線維等に対する反応性よりも高い抗体を取得すればアルツハイマー病の診断のための測定への応用も可能である。

アミロスフェロイドを抗原とした抗体の作製方法は、既に公知の方法ではある。しかし、以下の理由により、上記(1)～(3)に記載した性質を持つ抗体は取得されていなかった;(a)アミロスフェロイドはアミロイド β 蛋白質の会合体であり、一般的に会合体蛋白質に対する抗体の取得は困難である、(b)アミロスフェロイドの会合機構や構造と機能との関連が不明であることや、(1)や(2)の機能を抗体が有するために必須の抗原部分も不明であることなどから、特にアミロスフェロイドに特異的に反応し、該蛋白質の神経系細胞に対する毒性を阻害する抗体の取得は困難である。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、アミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド β 線維に対する反

応性よりも高い抗体、アミロスフェロイドに対する高い反応性を有し、かつアミロスフェロイドの神経系細胞に対する毒性の阻害活性やアミロスフェロイドの形成阻害活性を有する抗体、及びアミロイド β モノマー蛋白質に対する高い反応性を有し、アミロスフェロイドの形成阻害活性を有する抗体を取得することを解決すべき課題とする。さらに本発明は、上記抗体を産生するハイブリドーマを提供することを解決すべき課題とする。さらに本発明は、上記抗体を用いたアルツハイマー病の治療及び／又は予防薬のスクリーニング方法、及びアルツハイマー病個体の検出方法を提供することを解決すべき課題とする。さらに本発明は、上記抗体を用いた神経細胞保護剤、アミロスフェロイド形成阻害剤、アルツハイマー病の検出のための試薬、及びアルツハイマー病の治療及び／又は予防薬などの医薬を提供することを解決すべき課題とする。さらに本発明は、上記抗体を検出するための固相担体を提供することを解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、ニュージーランド白色種家兎1羽に対し、アミロスフェロイドを皮下に免疫し、これをアジュバンドの種類を変えて9回繰り返した。この動物から取得した血清についてドットブロット解析や電子顕微鏡観察によりアミロスフェロイドとの結合性を解析してポリクローナル抗体を取得したところ、該抗体はアミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド β 線維に対する反応性よりも高いこと、さらにアミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有し、又アミロスフェロイドの形成を阻害する活性を有するものであることを見出した。また、アミロスフェロイド及び／またはアミロイド β モノマー蛋白質に対する高い反応性を有する抗体は、アミロスフェロイドの形成を阻害する活性を有することを見出した。さらに、アミロスフェロイドを免疫されたBALB/cマウス脾細胞より、上記ポリクローナル抗体と同様なエピトープを認識するモノクローナル抗体の樹立にも成功した。本発明はこれらの知見に基づいて行われたものである。

[0009] すなわち本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) 以下の何れか1以上の特徴を有する抗体:

(i) アミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド β 線維に対する反応性よりも

高い;

(ii) アミロスフェロイドに対する高い反応性を有し、アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有する;

(iii) アミロスフェロイドに対する高い反応性を有し、アミロスフェロイドの形成に対する阻害活性を有する;

(iv) アミロイド β モノマー蛋白質に対する高い反応性を有し、アミロスフェロイドの形成に対する阻害活性を有する。

[0010] (2) 抗体のアミロスフェロイド及びアミロイド β 線維に対する反応性を同一の抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイド β 線維に対する反応性の2倍以上である、(1)に記載の抗体。

[0011] (3) 抗体のアミロスフェロイド及びアミロイド β 線維に対する反応性を同一の抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイド β 線維に対する反応性の10倍以上である、(1)又は(2)に記載の抗体。

[0012] (4) 抗体のアミロスフェロイド及びアミロイド β モノマー蛋白質に対する反応性を同一の抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイド β モノマー蛋白質に対する反応性の2倍以上である、(1)から(3)の何れかに記載の抗体。

[0013] (5) 抗体のアミロスフェロイド及びアミロイド β モノマー蛋白質に対する反応性を同一の抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイド β モノマー蛋白質に対する反応性の5倍以上である、(1)から(4)の何れかに記載の抗体。

[0014] (6) アミロスフェロイドを抗原として得られる、(1)から(5)の何れかに記載の抗体。

(7) ポリクローナル抗体である、(1)から(6)の何れかに記載の抗体。

(8) モノクローナル抗体である、(1)から(7)の何れかに記載の抗体。

(9) アミロスフェロイドに対する解離定数が 10^{-9} 以下である、(8)に記載のモノクローナル抗体。

(10) アミロイド β モノマー蛋白質のN末端をエピトープとして認識する、(1)から(9)の何れかに記載の抗体。

[0015] (11) 受託番号(受領番号)FERM ABP-10392、FERM ABP-10393、又はFERM ABP-10394の何れかを有するハイブリドーマによって生産されるモノクローナル抗体。

(12) 受託番号(受領番号)FERM ABP-10392、FERM ABP-10393、又はFERM ABP-10394の何れかを有するハイブリドーマ。

[0016] (13) 被験物質と(1)から(11)の何れかに記載の抗体とをアミロスフェロイドに接触させ、被験物質のアミロスフェロイドへの結合性を指標として候補物質を選択することを含む、アルツハイマー病の治療及び／又は予防薬のスクリーニング方法。

(14) アルツハイマー病の疑いのある個体から取得した生体試料を(1)から(11)の何れかに記載の抗体と接触させ、該サンプル中の該抗体と反応する物質の有無を測定することを含む、アルツハイマー病個体の検出方法。

[0017] (15) (1)から(11)の何れかに記載の抗体を含む、神経細胞保護剤。

(16) (1)から(11)の何れかに記載の抗体を含む、アミロスフェロイド形成阻害剤。

(17) (1)から(11)の何れかに記載の抗体を含む、アルツハイマー病の検出のための試薬。

[0018] (18) (1)から(11)の何れかに記載の抗体を含む、医薬。

(19) (1)から(11)の何れかに記載の抗体を含む、アルツハイマー病の治療及び／または予防薬。

(20) アミロスフェロイドを被覆してなることを特徴とする、(1)から(11)の何れかに記載の抗体を検出するための固相担体。

発明を実施するための最良の形態

[0019] 本発明の抗体は、以下の(i)～(iv)の何れか1以上の特徴を有する抗体である(以下、これらを「抗アミロスフェロイド抗体」と称することがある)。

(i) アミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド β 線維に対する反応性よりも高い；

(ii) アミロスフェロイドに対する高い反応性を有し、アミロスフェロイドによる神経細胞

死誘導に対する阻害活性を有する；

(iii) アミロスフェロイドに対する高い反応性を有し、アミロスフェロイドの形成に対する阻害活性を有する；

(iv) アミロイド β モノマー蛋白質に対する高い反応性を有し、アミロスフェロイドの形成に対する阻害活性を有する。

[0020] 本発明はさらに、上記抗体を用いたアルツハイマー病の治療及び／又は予防薬のスクリーニング方法、アルツハイマー病個体の検出方法、並びにアルツハイマー病の治療及び／又は予防薬などの医薬に関する。これらを以下に詳細に説明するが、以下に記載する構成要件の説明は、本発明の実施態様の一例（代表例）であり、これらの内容には特定されない。

[0021] (1) 抗アミロスフェロイド抗体

第一の態様によれば、本発明の抗アミロスフェロイド抗体は、アミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド β 線維に対する反応性よりも高い抗体である。「アミロスフェロイドに対する反応性」とは、下述する方法で形成されたアミロスフェロイドに反応することを意味する。該抗体の反応性の測定は、それ自体通常用いられる方法により行うことができ、それらの方法で測定した場合に、アミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド β 線維に対する反応性よりも高ければ、その抗体は、本発明の抗体に含まれる。好ましい態様によれば、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性は、アミロイド β 線維に対する反応性の約2倍以上であり、さらに好ましくは約10倍以上である。また、アミロスフェロイドに特異的に反応し、アミロイド β 線維に反応しないことを特徴とする抗体も本発明の抗アミロスフェロイド抗体に含まれる。さらに、アミロイド β モノマー蛋白質と比較してもアミロスフェロイドに対する反応性が高い抗体も本発明の抗アミロスフェロイド抗体に含まれる。この場合の抗アミロスフェロイド抗体のアミロスフェロイドに対する反応性は、好ましくは、アミロイド β モノマー蛋白質に対する反応性の約2倍以上であり、さらに好ましくは約5倍以上である（これらの場合、同じ抗体濃度及び量、同じ抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いた時の反応性で比較する）。このようなアミロスフェロイドに対する抗体がアミロイド β モノマー蛋白質に対する反応性よりも高い抗体のうち、反応性が約5～約10倍程度の違いであるものは、

特に後述するアミロスフェロイドの形成に対する阻害活性が高い。

- [0022] 本発明の抗アミロスフェロイド抗体が高い反応性を示す「アミロスフェロイド」とは、アミロイド β モノマー蛋白質が自己会合し、粒状の形態を有するものである。「粒状の形態」とは粒状を呈していればいかなる形状でもよく、顆粒状、細粒状、結晶、凝集塊等をすべて含む。粒径は、通常約10～約20nm、好ましくは約10～約15nm、より好ましくは約10～約12nm、特に好ましくは約12nm付近である。また、アミロスフェロイドは蛋白質濃度約1 μ g/ml以下、好ましくは約0.45 μ g/ml以下で神経系細胞に細胞死を誘導する高い神経細胞死活性を有する。また、かかる物性を有するアミロスフェロイドは、グリセロール密度勾配遠心法により分画したときに、グリセロール濃度が約15%以上の画分に得られる。
- [0023] 本発明の抗アミロスフェロイド抗体の抗原に対する反応性の測定方法としては、例えば、ウェスタンブロットティング法、ドットブロットティング法、ELISA法などのそれ自体既知の免疫学的測定法や、電子顕微鏡観察による方法等が挙げられる。またこの場合の比較対照としてのアミロイド β 蛋白質モノマーとは、約40のアミノ酸残基からなる蛋白質であり、生体においてはアミロイド前駆体蛋白質 (APP) からプロテアーゼによるプロセッシングで産生される。このプロテアーゼの種類やその後の修飾によって様々な種類が存在することが知られているが、分泌直後にはC末端のアミノ酸残基の長さの違いによりアミロイド β 40 ($A\beta_{1-40}$:配列番号1)とアミロイド β 42 ($A\beta_{1-42}$:配列番号2)が主として存在し、またアミロイド β 43 ($A\beta_{1-43}$:配列番号3)が微量に存在し、アミロイド β 蛋白質モノマーは、これらのいずれをも含む。また、これらの部分ポリペプチドや誘導体も含まれる。さらに、アミロイド β 線維とは、アミロイド β 蛋白質が自己会合して線維状になったものを意味し、神経細胞死活性を有する。このようなアミロイド β 線維は、例えば、生体内から取得されるものや、Lorenzo, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91, 12243-12247(1994)に記載の方法で製造されるものも含む。
- [0024] 第二の態様によれば、本発明の抗アミロスフェロイド抗体は、アミロスフェロイドに対する高い反応性を有し、アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有する抗体である。「アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導」とは、上記のまたは後述の方法で調製されるアミロスフェロイドが、神経細胞に対して細胞死を誘導する

活性を意味し、誘導される細胞死は、アポトーシス又はネクローシスのいずれでもよい。また、神経細胞とは、神経系細胞であれば特に制限はなく、哺乳動物(ヒト、ラット、マウス、サル、ブタ等)由来の神経系細胞が用いられる。初代培養細胞としては、上記動物の海馬、及び前脳基底野・大脳皮質等から取得したものが挙げられる。また上記動物の海馬等の器官を培養した細胞も含まれる。このような活性を有する抗アミロスフェロイド抗体の特徴としては、例えば、アミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド β 線維やアミロイド β モノマー蛋白質に対する反応性よりも高いこと等が挙げられる。これらのうち、アミロスフェロイドへの反応性がアミロイド β モノマー蛋白質への反応性の約10～約20倍の抗アミロスフェロイド抗体が好ましく用いられる。

[0025] 本発明の抗アミロスフェロイド抗体が有する、神経細胞死誘導に対する阻害活性とは、上記のアミロスフェロイドによる神経細胞死誘導を完全に阻害する能力を有することを意味するが、抗体の投与量によっては部分的に阻害する場合も含む。阻害活性の具体的な測定方法については、後述のとおりである。

[0026] 第三の態様によれば、本発明の抗アミロスフェロイド抗体は、アミロスフェロイドに対する高い反応性を有し、アミロスフェロイドの形成に対する阻害活性を有する抗体である。「アミロスフェロイドの形成に対する阻害活性を有する」とは、上記アミロイド β モノマー蛋白質が自己会合してアミロスフェロイドが形成される条件下で、本発明の抗アミロスフェロイド抗体を適量存在させることによって、アミロスフェロイドが形成されないことを意味する。この場合の、抗アミロスフェロイド抗体の存在量は、アミロイド β モノマー蛋白質に対する各抗体の反応性に応じて変化するが、例としては、アミロイド β モノマー蛋白質に対して2～20倍量(モル比)程度が好ましい。このような抗アミロスフェロイド抗体としては、特にアミロイド β モノマー蛋白質に対する高い反応性を有するものも含まれる。また、アミロスフェロイドとともにアミロイド β モノマー蛋白質に対しても高い反応性を示すもので、アミロスフェロイドに対する反応性が、アミロイド β モノマー蛋白質に対する反応性の約5～約10倍程度であるもの等もアミロスフェロイドの形成を阻害する活性を有する抗体として挙げられる。

[0027] アミロスフェロイドが形成されないことは、上記のアミロスフェロイドの特徴が見られないことを観察できるものであれば如何なる方法によっても確認することができる。具体

的には、例えば、アミロスフェロイドの粒度分布及び粒径は、電子顕微鏡観察による方法、in situ 原子間力顕微鏡による方法、篩い分け法、クロマトグラフィー法、沈降法などが用いられるが、中でも電子顕微鏡観察による方法が好ましい。以下に、本発明の抗アミロスフェロイド抗体の具体的な製造方法、及び上記の特徴の解析方法について詳細に説明する。

[0028] 第四の態様によれば、本発明の抗体は、アミロイド β モノマー蛋白質に対する高い反応性を有し、アミロスフェロイドの形成に対する阻害活性を有する抗体である。

[0029] (2) アミロスフェロイド(抗原)の作製

本発明の抗体は、以下の性質を有するアミロスフェロイドを抗原として得ることができる。本発明においてアミロスフェロイドとは、アミロイド β 蛋白質が自己会合し、粒状の形態を有するものである。「粒状の形態」とは粒状を呈していればいかなる形状でもよく、顆粒状、細粒状、結晶、凝集塊等をすべて含む。粒径は、通常約10～約20 nm、好ましくは約10～約15nm、より好ましくは約10～約12nm、特に好ましくは約12nm付近である。また、アミロスフェロイドは蛋白質濃度約1 μ g/ml以下、好ましくは約0.45 μ g/ml以下で神経系細胞に細胞死を誘導する高い神経細胞死活性を有する。また、かかる物性を有するアミロスフェロイドは、グリセロール密度勾配遠心法により分画したときに、グリセロール濃度が約15%以上の画分に得られる。

[0030] このようなアミロスフェロイドは、まず、アミロイド β 蛋白質を含む水溶液を対流させ(第一の工程)ることにより調製することができる。さらに、アミロスフェロイドが、高効率に含有される溶液を調製するには、対流させた水溶液中のアミロスフェロイドを分画する(第二の工程)方法が用いられる。本発明の抗体の抗原には、上記のいずれのアミロスフェロイド含有液も用いることができる。

[0031] 上記で「アミロイド β 蛋白質」とは、約40のアミノ酸残基からなる蛋白質であり、生体においてはアミロイド前駆体蛋白質(APP)からプロテアーゼによるプロセッシングで産生される。このプロテアーゼの種類やその後の修飾によって様々な種類が存在することが知られているが、分泌直後にはC末端のアミノ酸残基の長さの違いによりアミロイド β 40(A β_{1-40} :配列番号1)とアミロイド β 42(A β_{1-42} :配列番号2)が主として存在し、アミロイド β 43(A β_{1-43} :配列番号3)が微量に存在する。アミロスフェロイドの調

製には、例えば、分泌直後のアミロイド β 蛋白質の全長分子種である $A\beta_{X-40}$ 、 $A\beta_{X-42}$ もしくは $A\beta_{X-43}$ 、又はそれらの変異体あるいは誘導体が好ましく用いられるが、その中でも特に $A\beta_{1-40}$ 又は $A\beta_{1-42}$ が好ましい。また、アミロイド β 蛋白質は、ペプチド合成機等を用いて合成したもの、市販のもの、又は生体試料から抽出精製したものなど、いかなるものを用いてもよい。アミロイド β 蛋白質として合成ペプチドを用いる場合、その合成、抽出精製方法は、それ自体公知の通常用いられている方法を用いることができる。また、合成ペプチドの精製度は高速液体クロマトグラフィーにおいて単一のピークが得られる程度行えば十分であるが、精製方法としては、例えば、ゲル濾過、高速液体クロマトグラフィー等が用いられる。本明細書では、「アミロイド β 蛋白質」を、「アミロイド β モノマー」、「アミロイド β モノマー蛋白質」と称することもある。このようにして得られたアミロイド β 蛋白質は、例えば滅菌精製水に溶解し、アミロスフェロイド含有液の調製に使用する。溶解に用いる滅菌精製水の量は、アミロイド β 蛋白質が溶解する範囲であればよいが、好ましくは水溶液中のアミロイド β 蛋白質の濃度が約50nM～約2mM、好ましくは約1 μ M～約1mM、さらに好ましくは約50～約700 μ Mとなる範囲である。この溶液を適当な塩濃度に調節することが望ましい。塩濃度は、アミロイド β 蛋白質が溶解される範囲であればいかなるものでもよいが、例えば、最終pHが約3～約11、好ましくは約5.5～約8.5、より好ましくは約7.5で、塩が約1M以下であることが好ましい。このような塩濃度に調節する方法として、例えば、PBS(－)をアミロイド β 蛋白質水溶液と等量加える方法が用いられる。溶解の方法はアミロイド β 蛋白質が適当な量の適当な塩濃度の溶液に完全に溶解する方法であれば特に制限はない。

- [0032] アミロスフェロイド含有液の調製方法の第一の工程は、例えば、特開2001-247600号公報に記載されているものが挙げられる。このようにして得られたアミロスフェロイド含有液は、このままでも神経細胞死を誘導する活性を有し、本発明の抗原として用いることは可能であるが、第二の工程として分画を行い、さらに高い神経細胞死活性を有する画分を得ることもできる。分画の方法としては、例えば、特開2002-105099号公報に記載の方法が用いられる。かくして得られるアミロスフェロイド含有液は必要に応じて濃縮等の処理を行った後、抗原として以下の免疫工程に用いられる。

[0033] アミロスフェロイドが形成されていることの確認方法としては、下述の神経細胞死活性を解析する方法や、電子顕微鏡により測定する方法等が挙げられる。電子顕微鏡の測定方法は、アミロスフェロイドの粒径が解析できる方法で、かつアミロスフェロイドの自己会合が損傷を受けずに観察できる方法であれば如何なる方法でもよい。具体的には、例えば、まず、直径18mm程度のシャーレ等に30～40℃の蒸留水を入れ、その水面にコロジオン1.5% (W/V) 酢酸イソアミル溶液等を約30 μ l程度滴下し、直ちに溶媒が揮発して生じる薄膜を得る。この支持膜をグリッドに張り付けて乾燥させた後、カーボンを真空蒸着してグロー放電による親水化处理装置を用いて表面を親水化する。次に、該支持膜を張り付けたグリッド面を下にして調製したアミロスフェロイドを含む溶液の小滴を触れさせ、直ちにろ紙で余分な水分をふき取ってから、酢酸ウラニウム溶液を添加して観察を行う。電子顕微鏡は、安定させた100～120kVの高圧加速で使用し、試料の電子線による破損を防ぐためにグリッドの端等を利用して非点収差補正を行ったのち、電子線損傷低減法を用いて観察する方法等が好ましい。

[0034] (3) アミロスフェロイドを抗原とする抗体の調製

上記(2)に記載のアミロスフェロイドを抗原とした抗体を取得する方法は、(a) アミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド β 線維に対する反応性よりも高い、(b) アミロスフェロイドに対する高い反応性を示し、かつアミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有する、(c) アミロイド β モノマー蛋白質及び／又はアミロスフェロイドに対する高い反応性を示し、かつアミロスフェロイドの形成阻害活性を有する抗体が得られる方法であれば特に制限はない。具体的には、以下に詳細に記載する方法が好ましく用いられる。

[0035] 抗原は、上記(2)に記載のアミロスフェロイドを、一般的にはキャリアーとしてKLH(スカシ貝ヘモシアニン)、BSA(ウシ血清アルブミン)、OVA(オバルブミン)などの蛋白質または高分子体に結合もしくは重合させたものを免疫用抗原として使用するが、必ずしもキャリアーは必要ではない。また、免疫用抗原は異なるキャリアーの結合法により調製されたもの複数種を混合して免疫用抗原としてもよい。

[0036] 免疫に使用する動物は特に限定されないが、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラット、

モルモット、ニワトリ等はいずれも使用できる。免疫用抗原の動物への接種は、皮下、筋肉内、腹腔内に完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントと免疫用抗原をよく混和して行う。接種は、2週間から5週間ごとに実施し、接種した抗原に対する免疫動物の抗体の反応性が十分に上昇するまで続ける。1回に免疫する抗原は、免疫動物の抗体の反応性が十分に上昇する量であれば、特に制限はないが、具体的には、約1～約100 μ gが好ましい。また、免疫の回数は、免疫した動物から採血を行って、該血中に含まれる抗体について後述する方法で抗原に対する反応性を測定し、アミロスフェロイドに対する反応性がアミロイド β モノマー蛋白質より上がるまで繰り返すことが好ましい。具体的には5～20回が好ましい。また、本発明の抗アミロスフェロイド抗体を取得するには、初回の免疫には完全フロイントアジュバントを用い、それ以降の免疫には不完全フロイントアジュバントを用いることが好ましい。

[0037] 最後の免疫から7～10日後に、該動物から血液、腹水などを採取する。好ましくは、例えば全採血を行い、遠心分離等の方法で血清を調製する。該血清中に含まれる本発明の抗アミロスフェロイド抗体の反応性の測定方法は、上記(2)で調製したアミロスフェロイドとの反応性が解析できる方法であればいずれのものでもよいが、例えば、上記アミロスフェロイドを蛍光物質等で標識し、これを上記血清と反応させた後、該抗体に結合した標識剤の活性を測定する方法等が挙げられる。具体的には、上記の電子顕微鏡観察による方法や、後述するELISA法などの酵素免疫測定法、ウェスタンブロットティング法、あるいはドットブロットティング法等が挙げられる。このうち、本発明の抗アミロスフェロイド抗体において、アミロイド β 線維との反応性を測定比較する場合には、電子顕微鏡観察による方法が好ましく用いられ、またアミロイド β モノマー蛋白質と、その自己会合体であるアミロスフェロイドとの反応性を測定比較する場合には、ドットブロットティング法やELISA法などの酵素免疫測定法が好ましく用いられる。また、アミロイド β 線維やアミロイド β モノマー蛋白質、あるいはその部分ポリペプチドと特異的に反応する抗体との反応性を比較して、本発明の抗アミロスフェロイド抗体を選択取得することができる。

[0038] 抗体の分離精製は、それ自体既知の免疫グロブリンの分離精製法により精製することができる。具体的には、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法

、イオン交換体による吸着法、超遠心分離法、ゲルろ過法、抗原抗体結合物あるいは活性吸着剤により特異的抗体のみを吸着分離する方法等が挙げられる。

[0039] このようにして作製された抗体は、ポリクローナル抗体であり、IgGを主たる成分とし、IgM、IgA等の他の免疫グロブリンを含むものでもよい。

[0040] 一方、モノクローナル抗体を調製する場合、上記免疫動物に対して、通常抗原であるアミロスフェロイドのみの静脈注射を行い、その2～5日、好ましくは3日後に抗体産生細胞を含むと考えられる脾臓もしくはリンパ節を採取し、この脾臓細胞またはリンパ細胞を腫瘍細胞と細胞融合させる。この後、細胞融合して不死化した抗体産生細胞（ハイブリドーマ）を単離する。ここで使用する腫瘍細胞は、一般的に免疫を行った動物から調製される脾臓細胞もしくはリンパ細胞と同一種であることが望ましいが、異種動物間のものでも可能である。

[0041] 腫瘍細胞の例として、p3 (p3/x63-Ag8)、P3U1、NS-1、MPC-11、SP2/0-Ag14、FO、x63.6.5.3、S194、R210等の骨髓腫細胞が使用される。細胞融合は、一般に行われている方法、例えば「単クローン抗体実験マニュアル」（講談社サイエンティフィック 1987年出版）、G.KOHLER AND C.MILSTEIN, Nature, 256, 495(1975)に記載の方法等に従って実施すればよい。細胞融合は、融合させる細胞を懸濁した融合培地に細胞融合促進剤を加えることに実施することができる。細胞融合促進剤としては、センダイウイルスや平均分子量1000～6000のポリエチレングリコールなどが挙げられる。この際、更に融合効率を高めるために、ジメチルスルホキシド等の補助剤やIL-6等のサイトカインを融合培地に添加することもできる。免疫を行った脾臓細胞もしくはリンパ細胞に対する腫瘍細胞の混合比は、例えば腫瘍細胞に対し、脾臓細胞もしくはリンパ細胞を約1倍から約10倍程度用いればよい。

[0042] 上記の融合培地としてはERDF培地、RPMI-1640培地、MEM培地、GIT培地等の通常の各種培地を使用することができ、融合時は通常、牛胎児血清(FBS)等の血清を培地から抜いておくのがよい。融合は、上記の免疫を行った脾臓細胞もしくはリンパ細胞と腫瘍細胞との所定量を上記の培地内でよく混合し、予め37℃程度に加熱しておいたポリエチレングリコール溶液を約20～約50%程度加え、好ましくは30～37℃で1～10分程度反応させることによって実施する。以降、適当な培地を逐次添加

して遠心し、上清を除去する操作を繰り返す。

- [0043] 目的とするハイブリドーマは、通常の選択培地、例えばHAT培地(ヒポキチンサン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地)で培養する。このHAT培地での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞(未融合細胞等)が死滅するのに十分な時間、通常では数日から数週間行えばよい。
- [0044] 得られたハイブリドーマが産生する抗体は、上記ハイブリドーマの培養上清に含まれる。この抗体の反応性や反応特異性などは上記ポリクローナル抗体を測定する方法と同様にして測定し、本発明の抗アミロスフェロイド抗体を産生するハイブリドーマを選択取得することができる。
- [0045] 得られたハイブリドーマは、限界希釈法によりクローニングすることにより、単一のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを得ることができる。このハイブリドーマクローンは、あらかじめFBS中に含まれるウシ抗体(IgG)を除いたFBSを約1～約10%程度加えた培地または無血清用培地を用いて培養を行い、得られた培養上清を目的のモノクローナル抗体を精製する原料とする。一方、得られたハイブリドーマクローンをあらかじめプリステンを投与したBalb/cマウス、またはBalb/c(nu/nu)マウスの腹腔内に移植し、10～14日後にモノクローナル抗体を高濃度に含む腹水を採取し、目的のモノクローナル抗体を精製する原料としてもよい。モノクローナル抗体を精製する方法は、通常の免疫グロブリン精製法を用いれば良く、例えば、硫酸分画法、ポリエチレン分画法、エタノール分画法、陰イオン交換クロマトグラフィー、プロテインA、プロテインGまたは抗マウス免疫グロブリン抗体等が結合したアフィニティークロマトグラフィー等により実施することができる。
- [0046] このようにして得られる本発明の抗アミロスフェロイド抗体は、そのまま用いてもよいし、定法であるパパイン処理によって得られるFabもしくはペプシン処理によって得られるF(ab')₂またはF(ab')の形態として用いてもよい。また、該抗体のH鎖とL鎖の両可変ドメイン内の相補性決定領域(CDR)、または超可変領域などを含む断片や、これをコードする遺伝子をそれ自体既知の方法で取得し、さらにヒト型とした抗体も本発明の抗アミロスフェロイド抗体に含まれる。さらに、ファージディスプレイ法やヒト抗体産生マウスなどを用いて作成された完全ヒト抗体も本発明の抗アミロスフェロイド抗

体に含まれる。さらに、上述のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞系も本発明に含まれる。

[0047] (4) 抗アミロスフェロイド抗体の抗原に対する反応性の測定

本発明の抗アミロスフェロイド抗体の抗原に対する反応性を測定するためのELISA、ドットブロッキングの具体的方法の例を以下に説明する。ELISAとして、例えば、固相ELISA、液相ELISAなどが挙げられる。また、本発明の抗アミロスフェロイド抗体の抗原に対する解離定数を測定してもよい。抗体の解離定数の測定は、BIACore (BIA CORE社製) 等の機器を用いてまたはそれに準じた方法により行うことができる。

[0048] (a) アミロスフェロイドを被覆する固相担体及びアミロスフェロイド固相ELISA

アミロスフェロイドを被覆した固相担体を用いて、抗アミロスフェロイド抗体の抗原に対する反応性を測定することにより、抗アミロスフェロイド抗体を検出することができる。ここで固相担体としては、ポリスチレン、ポリプロピレン等のプラスチック製の球状、棒状、プレート状等の担体が挙げられるが、プラスチック製プレートが好ましい。固相担体にアミロスフェロイドを被覆させるには、常法例えば吸着法、架橋化剤を用いる方法等が挙げられるが、簡便性からアミロスフェロイドを物理的に吸着させる吸着法を用いるのが好ましい。

[0049] アミロスフェロイドを被覆する固相担体を用いた測定法として、具体的には、アミロスフェロイドELISAが挙げられる。まず、Nunc社製等のELISAプレートに上記(2)で調製したアミロスフェロイドをコートする。この場合、溶媒はアミロスフェロイドを脱会合させないものであれば如何なるものでもよいが、例えばPBS(－)が好ましく用いられる。このプレートを適当な溶液、例えば0.05% Tween20等の界面活性剤と含む生理的食塩水等により洗浄し、牛血清アルブミン／リン酸緩衝液 (Phosphate buffered saline: PBS) 等でブロッキングした後に、上記で得られた抗体と反応させる。その後、さらに洗浄した後に二次抗体として免疫動物の免疫グロブリンと反応する抗体を接触させる。同様に洗浄後、プレートに結合している該二次抗体を標識化物質の活性等を指標として検出する。このような標識化物質の活性は、例えばELISAプレートリーダー等を用いて測定することができる。また、アミロスフェロイドELISAを用いて、本発明の抗アミロスフェロイド抗体の抗原決定部位 (エピトープ) を決定することができる。具体的には

、アミロスフェロイドELISAにより、アミロイド β モノマー蛋白質の断片と抗アミロスフェロイド抗体の結合競合阻害を測定してエピトープを決定することができる。アミロイド β モノマー蛋白質の断片は、複数組み合わせてもよい。さらに、アミロスフェロイドELISAにより、エピトープが既知の抗体と抗アミロスフェロイド抗体の結合競合阻害を測定してエピトープを決定することができる。なお、エピトープの決定は、“Antibodies: A LABORATORY MANUAL”(Ed Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory(1988))等の実験書に記載の方法またはそれに準じた方法によっても行うことができる。

[0050] (b) アミロスフェロイド液相ELISA

アミロスフェロイドと、アミロスフェロイドに対する抗体を含む検体、たとえばハイブリドーマ培養上清を、室温1時間以上混和し反応させる。あらかじめ、適当量のウサギ抗アミロスフェロイドIgGをコートし、例えば、牛血清アルブミン/PBSでブロッキングしたELISAプレートに、一定量の上記混合液を添加して室温1時間以上反応させる。その後、さらに洗浄した後に二次抗体として検体中の免疫グロブリンと反応する抗体、例えば抗マウスIgG抗体、抗マウスIgM、抗マウス免疫グロブリン、を接触させる。同様に洗浄後、プレートに結合している該二次抗体を標識化物質の活性等を指標として検出する。このような標識化物質の活性は、例えばELISAプレートリーダー等を用いて測定することができる。

[0051] (c) アミロイド β モノマーELISA

N末端にビオチンが結合したアミロイド β モノマー蛋白質あるいはC末端にビオチンが結合したアミロイド β モノマー蛋白質と、抗体を含む検体、例えばハイブリドーマ培養上清を混合し室温1時間以上反応させる。この混合液をあらかじめ牛血清アルブミン/PBSでブロッキングしたstreptavidin ELISAプレートに添加し室温30分以上反応させる。その後、洗浄した後に二次抗体として検体中の免疫グロブリンと反応する抗体、例えば抗マウスIgG抗体、抗マウスIgM、抗マウス免疫グロブリン、を接触させる。同様に洗浄後、プレートに結合している該二次抗体を標識化物質の活性等を指標として検出する。このような標識化物質の活性は、例えばELISAプレートリーダー等を用いて測定することができる。

[0052] (d) ドットブロットティング

本発明の抗アミロスフェロイド抗体の抗原に対する反応性を測定するためのドットブロットティングの具体的方法の例を以下に説明する。まず、Bio Rad社製等の市販のブロッター等を用いて、上記(2)で調製したアミロスフェロイドをニトロセルロース膜等に適当量プロットする。この場合、溶媒はアミロスフェロイドを脱会合させないものであれば如何なるものでもよいが、例えばPBS(-)が好ましく用いられる。ブロットティングは、アミロスフェロイド以外にも、対照として、アミロイド β モノマー蛋白質またはその部分ペプチドや、溶媒のみについても行うことが好ましい。この膜を適当な緩衝液、例えばリン酸緩衝液(Phosphate buffered saline:PBS)等により洗浄し、スキムミルク/TTBS(Tween-Tris buffered saline)等でブロッキングした後に、上記で得られた抗体と膜を接触させ、その後、さらにTTBS等で洗浄した後に、二次抗体として免疫動物の免疫グロブリンと反応する抗体を接触させ、これも同様に洗浄した後、膜に結合している該二次抗体を標識化物質の活性等を指標として検出する。対照として、アミロイド β モノマー蛋白質に反応する抗体を用いることが好ましい。このような抗体としては、例えば、「6E10」(Senetek社製)等が上げられる。

[0053] (5) アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性の解析

本発明の抗アミロスフェロイド抗体が有する、アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導を阻害する活性(以下、これを「神経細胞毒性中和活性」または「神経細胞死誘導阻害活性」と称することがある)の解析方法の例を以下に説明する。

[0054] まず、アミロスフェロイドを用いた神経細胞死の誘導は、神経系の細胞等の培養液に上記アミロスフェロイドを添加し、通常の方法に従って培養することにより行うことができる。そこで、本発明の抗アミロスフェロイド抗体がこの神経細胞毒性中和活性を有するかどうかを解析する場合には、抗アミロスフェロイド抗体の存在下で上記の神経細胞とアミロスフェロイドとの培養を行い、神経細胞死が誘導されないことを確認することにより行うことができる。アミロスフェロイドにより誘導される細胞死は、アポトーシス又はネクローシスのいずれでもよい。また、用いられる細胞としては、神経系細胞であれば特に制限はなく、哺乳動物(ヒト、ラット、マウス、サル、ブタ等)由来の神経系細胞が好ましい。また、初代培養細胞が好ましい。初代培養細胞としては、上記した動物の海馬、及び前脳基底野・大脳皮質等から取得したものが好ましい。また上記動

物の海馬等の器官を培養したものをそのまま用いることも可能である。また、ES細胞から分化誘導させた神経細胞を用いることも可能である。

[0055] これらの細胞や器官は、通常の培養法に従って培養することができる。具体的には、神経系細胞の初代培養、及び神経系樹立細胞株の培養方法としては、Hoshi, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 2719-2723 (1996)、及びSchubert, D. et al., Nature, 249 (454), 224-227 (1974) に記載されている方法等を用いることができ、器官培養は、Gary Banker and Kimberly Goslin, Culturing nerve cells, 2nd Edition, MIT Press, Cambridge (1998) に記載されている方法等を用いることができる。このようにして培養された神経系の細胞、及び器官に細胞死を誘導するために添加するアミロスフェロイドの量は適宜選択可能であるが、アミロスフェロイドは、通常、アルツハイマー病等の患者の脳内に存在する毒性アミロイド β 蛋白質と実質的に同等の濃度で細胞死を誘導できる。例えば、上記(2)で得られるアミロスフェロイドは、前記のとおり、初代培養細胞に対して培養液中のアミロイド β 蛋白質濃度約 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、さらに好ましくは約 $0.45 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下等の量で細胞死を誘導することができる。もっとも、上記の濃度は例示のためのものであり、この量に限定されることはない。

[0056] この培養中に存在させる本発明の抗アミロスフェロイド抗体の量は用いられる抗体の抗原に対する反応性によって適宜選択されるが、具体的には、例えば、約 $0.0001 \sim 1 \text{mg}/\text{ml}$ を存在させることが好ましい。また、抗アミロスフェロイド抗体の該培養液への添加の時期は、神経細胞毒性中和活性が確認できるのであれば特に制限はないが、アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導は、培養後約6時間程度から誘導されるので、その前、好ましくは培養初期に添加しておく。また、対照として、アミロスフェロイドとは反応しない抗体又はアミロスフェロイドに対する反応性が低くその反応性が神経細胞死誘導に影響しない抗体を用いることが好ましい。このような抗体としては、例えば、アミロイド β モノマー蛋白質に対する抗体、具体的には、例えば「6E10」(Senetek社製)等が好ましく用いられる。

[0057] アミロスフェロイドによって誘導される神経細胞死は、通常、アミロスフェロイドの有効量を添加した後、約6時間程度から起こり、約48時間程度の後には顕著な細胞死の様子が観察できる。従って、この解析方法において、神経細胞死の誘導を測定す

る場合には培養を始めてから約20時間以降が好ましいが、用いるアミロスフェロイドの細胞死活性に応じて適宜選択される。

[0058] これらの神経細胞死活性を測定する方法としては、通常用いられる細胞死検出法を用いることができる。具体的には、MTT活性測定法(Mossman, T., J.Immunol. Methods, 65, 55 (1983))、プロピディウムイオダイド(Ankarcrona, M. et al., Neuron, 15, 961 (1995))等による染色法、又はトリパンブルーダイエクスクルージョン法(Woo, K. B., Funkhouser, W. K., Sullivan, C. and Alabaster, O., Cell Tissue Kinet., 13 (6), 591-604 (1980))、TUNELや断片化DNAを検出するELISA(Roche社製)等が用いられる。このうち、プロピディウムイオダイド等による染色法あるいは断片化DNAを検出するELISAが特に好ましい。プロピディウムイオダイド等による染色法は、死細胞を選択的に染色するプロピディウムイオダイドのみによる単一染色でもよいし、他の複数の染色色素と組み合わせて行ってもよい。組み合わせられる染色色素としては、具体的には、生細胞を選択的に染色するCalcein-AM(Molecular Probes社製)、全細胞を染色するHoechst33258(H33258; Bisbenzimidazole H33258)等が好ましい。

[0059] また、本発明の抗アミロスフェロイド抗体の神経細胞死誘導阻害活性は、本発明の抗アミロスフェロイド抗体を動物個体に直接投与することにより行うこともできる。アミロスフェロイドにより誘導される細胞死は、アポトーシス又はネクローシスのいずれでもよい。また、用いられる動物としては、哺乳動物(マウス、ラット、霊長類等)等の神経系細胞を有する動物であれば特に制限はないが、アルツハイマー病のモデル動物等の特に神経細胞死が起こっている動物が好ましく用いられる。また、投与方法は、脳等の神経系細胞の存在する部位に直接投与する方法の他、経口投与方法、静脈注射法、腹腔投与方法等の通常薬物の投与に用いられる方法を用いることができる。脳等の神経系細胞の存在する部位に直接投与する方法としては、具体的には、例えば、ラットあるいはマウス等の脳組織の場合、オスモティックポンプを用いて目標部位近傍の脳室内に投与する方法、マイクロピペット等を用いて目標部位の脳実質にマイクロフュージョンする方法等が用いられ、一定期間投与した後、脳機能の変異をPET・MRIを用いて計測した後に、投与部位周辺の組織を速やかに取り出し、組織切片を作製して、神経細胞死の有無を検証することができる。神経細胞死の有無の検証は

、組織染色法やウェスタンブロット法等によって行うことができ、組織染色法としては、TUNEL染色、又は抗Caspase抗体等による免疫染色等が挙げられる。

[0060] (6) アミロスフェロイド形成阻害活性の解析

本発明の抗アミロスフェロイド抗体のアミロスフェロイド形成に対する阻害活性の解析方法としては、上記(2)のアミロスフェロイドの調製方法の第一の工程において、水に溶解したアミロイド β モノマー蛋白質とともに、上記で得られた抗アミロスフェロイド抗体を混合してから、上記(2)と同様にしてアミロスフェロイドを調製する工程を行い、得られた溶液を上記(2)に記載した神経細胞死誘導活性や電子顕微鏡観察等によりアミロスフェロイドが形成されているかを観察する方法が挙げられる。ここで、本発明の抗アミロスフェロイド抗体の添加量は、アミロイド β 蛋白質に対して等倍量以上(モル比)が好ましい。また、対流を行う時間は、通常アミロスフェロイドが形成されるに十分な時間以上が好ましい。具体的には、約4時間以上である。アミロスフェロイドの形成は、例えば上記(2)に記載の方法等により解析することができる。

[0061] この測定で、アミロスフェロイドが形成されていなければ、該抗アミロスフェロイド抗体にはアミロスフェロイド形成を阻害する活性があると判断することができる。

[0062] (7) アルツハイマー病の治療／及び予防薬及びスクリーニング方法

アミロスフェロイドは、神経系の培養細胞に添加すると該細胞を死に至らしめることができることから、アルツハイマー病においては、同様にアミロイド β 蛋白質が自己会合したアミロスフェロイドが神経変性を誘導していると考えられている。

[0063] 本発明の抗アミロスフェロイド抗体は、このアミロスフェロイドに対する高い反応性を示し、アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有するので、被検物質を本発明の抗アミロスフェロイド抗体と競合させてアミロスフェロイドに結合させ、その反応性を指標として物質を選択することにより、アルツハイマー病の治療／及び予防薬のスクリーニングを行うことができる。また、本発明の抗アミロスフェロイド抗体そのものもアルツハイマー病の治療／及び予防薬の有効成分となりえる。

[0064] この物質のスクリーニング方法の具体例について以下に説明する。被検物質としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液等が挙げられ、これら化合物は新規な

化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。アミロスフェロイドとの反応性は、上記(4)の抗アミロスフェロイド抗体とアミロスフェロイドとの反応性を解析する方法において、反応液中に上記被検物質を添加して行う方法等が挙げられる。アミロスフェロイド、抗アミロスフェロイド抗体、及び被検物質の混合量はそれぞれ適当な濃度を選択して行うことができる。

- [0065] 被検物質は、標識物質等で標識化しておくことが好ましい。この解析により、アミロスフェロイドに結合した物質は、アルツハイマー病の治療／及び予防薬の有効成分として用いると判断することができる。さらに、選択された物質を上記(5)に記載の方法における抗アミロスフェロイド抗体の代わりに用いて、アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導を阻害するかを確認することが好ましい。
- [0066] かくして選択された物質及び本発明の抗アミロスフェロイド抗体は、それ自体アルツハイマー病の予防及び／又は治療のための医薬の有効成分として有用であるが、生理学的に許容されるそれらの塩、水和物並びに溶媒和物等であってもよい。また、FeやZn等の金属イオンや糖鎖、糖タンパク質が付加したものも好ましい。生理学的に許容される塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩などの鉱酸類の塩、クエン酸塩、シユウ酸塩、p-トルエンスルホン酸塩などの有機酸の塩、グリシンなどのアミノ酸の塩等を挙げることができる。また、抗アミロスフェロイド抗体は、上記の方法により、ヒト型に改変したものまたは完全ヒト抗体がより好ましく用いられる。抗体のヒトなどへの投与に適した改変は、それ自体公知の方法を適宜組み合わせで行うことができ、当業者によればそれらは容易に行うことができる。
- [0067] 本発明により提供される医薬は、本発明のスクリーニング方法により神経細胞死に対して抑制作用を有すると判定された物質を有効成分として含み、アルツハイマー病の予防及び／又は治療のための医薬として用いることができる。本発明のスクリーニング方法により神経細胞死に対して抑制作用を有すると判定された物質及び抗アミロスフェロイド抗体は、それ自体を医薬として患者に投与してもよいが、一般には、これらの有効成分の1種又は2種以上を含む医薬組成物を製造して患者に投与することが好適である。このような医薬組成物として、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、丸剤、トローチ、舌下剤、又は液剤などの経口投与の製剤、あるいは注射剤

、座剤、軟膏、貼付剤などの非経口投与用の製剤を例示することができる。

[0068] 経口投与用の錠剤又はカプセル剤は、通常は単位投与物として提供され、結合剤、充填剤、希釈剤、打錠剤、滑沢剤、崩壊剤、着色剤、香味剤及び湿潤剤のような通常の製剤用担体を添加して製造することができる。錠剤は、この当業界で周知の方法に従って、例えば、腸溶性コーティング剤等を用いてコーティングすることができ、例えば充填剤、崩壊剤、滑沢剤、湿潤剤等を用いて製造してもよい。

[0069] 経口投与用の液剤は、例えば水性又は油性懸濁液、溶液、エマルジョン、シロップ剤又はエリキシル剤等の他、使用前に水又は適当な媒体により再溶解されうる乾燥製剤として提供される。このような液剤には、通常の添加剤、例えば沈殿防止剤、乳化剤、保存剤及び必要に応じて通常の香味剤又は着色剤を配合することができる。

[0070] 経口投与剤の製剤は、混合、充填、又は打錠などの当業界で周知の方法により製造することができる。また、反復配合操作を用いて多量の充填剤等を使用した製剤中に有効成分を分布させてもよい。非経口投与用の製剤は、一般には有効成分である物質と滅菌媒体とを含有する液体担体投与量製剤として提供される。非経口投与用の溶剤は、通常、有効成分である物質を媒体に溶解させて滅菌濾過し、次に適当なバイアル又はアンプルに充填して密封することにより製造される。安定性を高めるために組成物を凍結させた後にバイアル中に充填し、水を真空下で除去してもよい。非経口懸濁液は実質的に非経口溶液の場合と同じ方法で製造されるが、有効成分を媒体に懸濁させてエチレンオキッド等により滅菌することにより好適に製造できる。また、有効成分が均一分布となるように必要に応じて界面活性剤、湿潤剤等を添加してもよい。

[0071] 有効成分である物質の投与量は、物質の活性の強度、治療や予防の目的、患者の症状、体重、年齢や性別等を考慮して適宜決定すればよい。また、1日あたり1～数回に分けて投与するのが望ましい。例えば、本発明の抗アミロスフェロイド抗体が有効成分である場合、その投与量は、1回の投与において1kg体重あたり一般的には約1 μ g～約100mg、好ましくは約10 μ g～約50mgの量で投与することができる。

[0072] (8) 抗アミロスフェロイド抗体を用いたアルツハイマー病個体の検出方法及び検出用

試薬

アミロスフェロイドは、神経系の培養細胞に添加すると該細胞を死に至らしめることができることから、アルツハイマー病においては、同様にアミロイド β モノマー蛋白質が自己会合したアミロスフェロイドが神経変性を誘導していると考えられている。本発明の抗アミロスフェロイド抗体は、このアミロスフェロイドに対する高い反応性を有するので、該抗体を用いて生体試料中にアミロスフェロイドを検出することによりアルツハイマー病個体の検出を行うことができる。

[0073] 生体試料としては、アルツハイマー病の疑いのある個体から得られる血液、脳脊髄液、尿等の体液等が挙げられるが、中でも特に血液が好ましい。該試料の取得は、例えば、血液の場合には、アルツハイマー病の疑いのある個体の肘静脈等から採血管等によって採血し、遠心分離等の方法により血漿又は血清を分離することによって得られる。また、脳脊髄液を試料とする場合は、アルツハイマー病の疑いのある個体から、例えば麻酔下の腰椎穿刺によって採取し、遠心分離することによって得られる。取得された生体試料は、試料中のアミロスフェロイドの変化や、血液の凝固等を防止するために、酵素阻害剤を試料採取時又はサンプル採取後に加えるのが好ましい。酵素阻害剤としては、蛋白質分解酵素阻害剤として、例えば、アプロチニン、アンチパイン、ペプスタチン、ロイペプチン、EGTA、PMSF(フェニルメタンスルフォニルフルオリド)、TLCK(トリシルリシンクロロメチルケトン)等が用いられる。取得された生体サンプルは、さらに必要に応じて濃縮などを行うことによって、アミロスフェロイドの検出感度を上げることができる。

[0074] この抗アミロスフェロイド抗体を用いた生体試料中のアミロスフェロイドの検出は、それ自体既知の免疫学的測定法を用いることができる。具体的には、例えば、サンドイッチ法、競合法、イムノメトリック法、ネフロメトリー等が用いられる。サンドイッチ法においては、固相化した本発明の抗アミロスフェロイド抗体に生体試料を接触させ、さらに標識化した抗アミロスフェロイド抗体を反応させた後に、固相に結合した標識物質の信号を測定することにより、生体試料中のアミロスフェロイド量を測定することができる。このような免疫学的測定方法により生体試料中のアミロスフェロイド量を測定する場合には、既知量のアミロスフェロイドを含む標準液を用いて作製した標準曲線により

算出することが好ましい。詳細は、生化学実験法11「エンザイムイムノアッセイ」(Tijssen P.著、東京化学同人)、“Antibodies: A LABORATORY MANUAL”(Ed Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory(1988))等の実験書に従って、適宜選択組み合わせで行うことができる。また、本発明には、これらの検出に用いられる、抗アミロスフェロイド抗体を含むアルツハイマー病個体検出のための試薬も含まれる。

実施例

[0075] 以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれの実施例より何ら限定されるものではない。なお、下記の実施例及び本明細書中において、「PBS」は「Phosphate Buffered Saline」、「TTBS」は「Tween- Tris Buffered Saline」、「HRP」は「Horseradish Peroxidase」を示す。

[0076] 実施例1 アミロスフェロイド含有液の調製

(1)アミロイド β 40(配列番号1)樹脂の製造

Fmoc-Val樹脂342mg(アミン含量0.73mmol/g樹脂)をパーキンエルマーアプライドバイオシステムズ社製A433型自動ペプチド合成機にセットし、これにFmoc-Val-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OHを供給し、HBTU[2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate]を縮合剤として順次縮合させて側鎖保護アミロイド β 40樹脂1.515gを得た。

[0077] (2)トリフルオロ酢酸処理

上記(1)で得た側鎖保護アミロイド β 40樹脂中の304mgを採取し、これにフェノール0.75mlとチオアニソール0.5mlとトリフルオロ酢酸8.25mlとエタンジチオール0.25mlと蒸留水0.5mlを加え、氷冷下5分、続いて室温で1.5時間反応させた。反応終了後、氷冷したジエチルエーテル200mlを加えてペプチドを沈殿させた。全内容物をガラスフィルターで濾取し、冷ジエチルエーテルで洗浄した後、35%のアセトニトリルを含む0.1%トリフルオロ酢酸(約200ml)で抽出処理してH-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-OHで表される粗ペプチド191mgを得た。

[0078] (3) ペプチドの精製

この粗ペプチドを35%のアセトニトリルを含む0.1%トリフルオロ酢酸(40ml)に溶解しODS(オクタデシルシラン)をシリカに結合した逆相系のカラム(内径2cm、長さ25cm)を用いたHPLCにより精製した。溶出は0.1%トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル濃度を22%から42%へ直線的に20分間で上昇させることにより行った。精製物の収量は35mgであった。本物質の構造はMALDI-TOF質量分析により確認された。測定値 $[M+H]^+$ 4330.99に対して、計算値は $(C_{194}H_{295}N_{53}O_{58}S_1+H)$ 4330.89であった。なお、アミロイド β 42については、上記の方法に準じて合成・生成を行ったものと、Bachem社より購入したものの双方を以降の実験に供した。

[0079] (4) アミロスフェロイド含有液の調製

上記(3)で精製を行った10nmolのアミロイド β 40を1.5ml容量のエッペンドルフチューブに入れ、これに500 μ lの超純水と500 μ lのダルベッコリン酸緩衝液(-)(ニッスイ社製;以下、PBS(-)と称する)を順次加え、アミロイド β 蛋白質を完全に溶解させた。このアミロイド β 蛋白質水溶液の入ったエッペンドルフチューブをダックローター(TAITEC社製、ローター:RT50)に取り付け、37°Cにおいて35rpmの速度で7日間回転させ、アミロスフェロイド40を調製した。アミロイド β 42(上記(3)で精製を行ったものまたはBachem社製)についても、上記の方法に準じ、約10時間回転させ、アミロスフェロイド42を調製した。

実施例2 抗アミロスフェロイド抗体の調製

[0080] (1) ウサギポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体の調製

実施例1で調製したアミロスフェロイド40及びアミロスフェロイド42を抗原として、ニュージーランドホワイト種ウサギ1羽につき上記アミロスフェロイドが60 μ gとなるように完全フロイントアジュバントに混合して皮下に投与した。この後2週間に1回の間隔で、同量のアミロイド β 蛋白質を不完全フロイントアジュバントに混合して合計8回投与した。最終免疫を行ってから10日後に全採血を行った。

[0081] 全採血後、これを37°Cで1時間放置し、できた血餅を遠心により除去し、血清を回収した。次にこの血清を30分間、57°Cにて非働化処理を行い、ProClin300(シグマアルドリッチ社製)を1ppmになるように添加して保存した。血清からのIgGの分離は以下のように行った。2mlのProtein-G セファロース(アマシャムバイオサイエンス社製)を適当なカラムに充填し、PBS(-)で平衡化した。これに2~3mlの血清を添加し、非吸着画分を20mlのPBS(-)で洗浄した。吸着画分を0.1M Glycine-HCl, 0.15M NaCl pH2.5を2 mlずつカラムに添加して溶出した。溶出した画分は10分の1量の0.1M Tris-HCl, pH8.5を加えた試験管に回収し直ちに中和した。この溶出液をPBS(-)に透析し、精製IgGとした。純度分析は0.1M酢酸ナトリウム, 0.3M NaClを展開緩衝液とするG3000S WsL(東ソー社製)によるゲルろ過HPLC等により実施した。

[0082] (2) マウスモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体の調製

PBS中で調製したアミロスフェロイド42と等量の完全フロイントアジュバント(WAKO社製)を混合し乳化した。BALB/c雌性マウス背部皮下に、0.2 mlを免疫した(1~8 μ g/0.2 ml/mouse)。2週間おきに不完全フロイントアジュバント(Sigma-Aldrich社製)で乳化したアミロスフェロイドを同様に免疫した。眼底あるいは尾静脈から定期的に採血して、血清血漿を調製した。1%牛血清アルブミン(BSA, fraction V; Sigma-Aldrich社製)溶液(PBS中)で血清血漿を連続希釈し、下記のアミロスフェロイド固相ELISA法で抗アミロスフェロイド抗体のアミロスフェロイドに対する反応性を測定した。

[0083] 8~10回免疫して、十分に反応性が上昇した個体について、最終的にアミロスフェロイド 8 μ g(PBS 0.1 ml中)を静脈内に投与してブーストした。ブースト3日後に脾細胞を回収し、ポリエチレングリコール4000を用いた常法により、脾細胞数の1/2数のマウスミエローマ細胞(SP2/0-Ag14)と細胞融合した。融合した細胞を10%牛胎児血清

、10% BM conditioned H-1 (Roche Diagnostics社製)及びHAT (Sigma-Aldrich社製)を含むGIT培地(WAKO社製)中に懸濁し、各穴 5×10^4 ミエローマ細胞/0.1 ml培養液となるように96穴プレート(FALCON社製)中に播種した。3日後培養液を追加、7日後に培養液を交換し、さらに2～3日培養して上清を回収した。下記のELISA法にて上清中の抗アミロスフェロイド抗体を調べ、特異的な抗体を産生する細胞を24穴プレート(IWAKI社製)に拡大した。限界希釈法にてクローニングするさいには、96穴プレートに200 μ l培養液中で0.3/wellになるようハイブリドーマを播種し、1週間に一度培養液を半量交換しながら培養した。

[0084] このようにして樹立したマウスモノクローナル抗体3クローンを表1に示す。これら抗体のサブクラスはアマシャムバイオサイエンス社製のマウスモノクローナル抗体アイソタイプタイピングキットを用いて決定した。抗体MASD1、MASD2及びMASD3を産生するハイブリドーマをそれぞれMouse-Mouse hybridoma MASD1、Mouse-Mouse hybridoma MASD2、及びMouse-Mouse hybridoma MASD3と称する。Mouse-Mouse hybridoma MASD1、Mouse-Mouse hybridoma MASD2、及びMouse-Mouse hybridoma MASD3は、それぞれ、受託番号(受領番号)FERM ABP-10392、FERM ABP-10393、又はFERM ABP-10394として、平成17年8月3日付で、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566))に寄託されている。

[0085] ハイブリドーマMASD1、MASAD2、MASD3からの抗体の分離精製は以下のように行った。約1lのCD Hybridoma培地(インビトロジェン社製)で1週間ハイブリドーマを培養し、培養上清を遠心分離で回収した。これを0.45 μ mのフィルターでろ過し、これをPBS(-)で平衡化した2mlのProtein-Gセファロースに添加し、以下上記実施例2(1)と同様にIgG抗体を分離精製した。

[0086] [表1]

表1

マウスモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体

名称	サブクラス
MASD1	IgG2b (κ)
MASD2	IgG2a (κ)
MASD3	IgG2a (κ)

[0087] 実施例3 抗体の性状解析

(1) アミロスフェロイド固相ELISA法 (アミロスフェロイドとの反応性の確認)

96穴ELISAプレート(Nunc社製マキシソープ)にリン酸緩衝生理的食塩水(Ca, Mg 不含、pH 7.2; PBS)中で1 μg/mlに希釈したアミロスフェロイド40または42を50 μl 添加し、4℃一晩コートした。1%牛血清アルブミン(BSA, fraction V; Sigma-Aldrich社製)溶液(PBS中)を室温1時間以上添加して、非特異的結合部位をブロックしたのち、水でプレートを洗浄した。1%牛血清アルブミン溶液(PBS中)で希釈した抗血清あるいはハイブリドーマ培養上清50 μlを添加して室温1時間以上反応させた。プレートを0.05% Tween20を含む生理食塩液で5回洗浄したのち同様に1 μg/mlに希釈したペルオキシダーゼ標識2次抗体[抗マウスIgG抗体(Zymed社製)、抗マウスIgM(Bio source社製)、抗マウス免疫グロブリン(DAKO社製)]を添加して室温1時間反応させた。5回洗浄後、基質溶液を添加して一定時間発色させ、プレートリーダーにて吸光度を測定した。

[0088] 実施例2で樹立したマウスモノクローナル抗体と市販抗体を比較した結果を図1に示す。実施例2で樹立した抗体はいずれも、市販抗体「6E10」(Sigma-Aldrich社製)、「IBL10027」(免疫生物研究所社製)より1/100程度低い濃度で強い反応性を示した。

[0089] (2) ドットブロット解析 (アミロスフェロイド及びアミロイドβモノマーとの反応性の確認)

ブロッター(BioRad社製)を用い、溶媒である1, 1, 1, 3, 3, 3, -hexafluoro-2-propanol(Sigma-Aldrich社製)に溶かしたアミロイドβ40モノマー蛋白質と実施例1で調製したアミロスフェロイド40含有液と、コントロールとして溶媒をそれぞれ2

ngずつニトロセルロース膜(Schleicher&Schuell, 0.2μ)にブロットし、この膜をPBS(－)にて洗浄後、ブロッターよりはずした。

[0090] 上記蛋白質をブロットした膜を、5%スキムミルク/0.05%TTBSで1時間ブロッキングした後、 $0.1\mu\text{g/ml}$ となるように調製した実施例2で取得した抗体に浸し、湿潤箱中で一晩、 4°C で反応させた。その後、該膜を0.05%TTBSで洗浄し、二次抗体として $0.05\sim 1\mu\text{g/ml}$ の西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼが結合した抗ウサギIgGあるいは抗マウスIgG(Zymed社製)と1時間反応させた。その後、0.05%TTBSで洗浄して未反応の二次抗体を除去し、SuperSignal West-Femto(Pierce社製)に浸して5分間インキュベートした後、イメージアナライザー「LAS-1000 plus」(富士写真フイルム社製)で化学発光シグナルの検出及び画像データの取り込みを行った。上記抗体の反応性のコントロールとしては、1次抗体に $0.5\mu\text{g/ml}$ の抗アミロイド β 抗体「6E10」(Senetek社製)を用いた。

[0091] この結果を図2及び図3に示す。図2中、アミロスフェロイドは、実施例1で調製したアミロスフェロイド40含有液のドットを、溶媒はコントロールのドットを、また、 $A\beta$ は、アミロイド β 40モノマー蛋白質(Bachem社製)のドットを示す。図2から明らかなように、市販の抗アミロイド β 抗体「6E10」は、実施例1で調製したアミロスフェロイド40とアミロイド β 40モノマー蛋白質(Bachem社製)のいずれにも同程度反応するのに対し、上記で得られた抗体は、実施例1で調製したアミロスフェロイド40との反応性と、アミロイド β 40蛋白質(Bachem社製)との反応性を比較すると、アミロスフェロイド40との反応性が高いことが判った。すなわち、LAS-1000 plusを用いた定量的解析から、今回作製した抗体は、アミロスフェロイドに対する反応性が、未会合であるアミロイド β モノマーへの反応性の10倍以上あった。精製したアミロスフェロイド40を用いた場合にも同様の結果が得られた。また、アミロスフェロイド42を用いても同様の結果が得られた。これらの、アミロスフェロイドとの反応性が高いことが示されたポリクローナル抗体を、以後「抗アミロスフェロイド抗体」または「ポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体」の例としてそのように称することがある。

[0092] 図3Aおよび図3Bでは、40SRおよび42SRは、それぞれ、実施例1で調製したアミロスフェロイド40含有液およびアミロスフェロイド42含有液(42SR)のドットを、Bはコ

ントロール蛋白質として用いた牛血清アルブミンのドットを、また、Mはアミロイド β 40 蛋白質のドットを示す。市販の抗アミロイド β 抗体「6E10」「4G8」は実施例1で調製したアミロスフェロイド40、アミロスフェロイド42、アミロイド β 40蛋白質のいずれにも反応するのに対し、実施例2で樹立したマウスモノクローナル抗体はアミロスフェロイド40及びアミロスフェロイド42に選択的に高く反応することが判った。これらの、アミロスフェロイドとの反応性が高いことが示されたモノクローナル抗体を、以後「抗アミロスフェロイド抗体」または「モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体」の例としてそのように称することがある。

[0093] (3)免疫電子顕微鏡観察(アミロスフェロイド及びアミロイド β 線維との反応性の確認)

アミロイド β 40を高濃度(100 μ M以上)で会合させた後、沈降法ないしは遠心によって線維だけを回収した。このように調製したアミロイド β 線維1 μ gに対して、実施例2で取得したポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体並びに市販の抗アミロイド β 抗体「4G8」(Senetek社製)をそれぞれ5 μ l混ぜ、4°Cで一晩反応させた。その後、反応溶液にヤギ抗マウスIgG-6 nm-Gold(オリオン社製)を加え、4°Cで1時間反応させた。これを、酢酸ウラニウムを用いたネガティブ染色法により検出し、電子線損傷低減法を用いて観察及び写真撮影を行った。図4Aに示したとおり、アミロイド β モノマー蛋白質に対する市販抗体「4G8」はアミロイド β 線維をよく認識したが、実施例2で取得した抗アミロスフェロイド抗体はアミロイド β 線維を認識しなかった。同様の実験をモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体MASD3を用いて行ったところ、図4Bに示したとおり、アミロイド β 線維を認識しなかった。

[0094] (4)解離定数測定

BIACore3000(BIAcore社製)のCM5センサーチップに、50 mM酢酸緩衝液中で10 μ g/ml アミロスフェロイドをカップリングした。10 mM HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Durfactant P20中で、最高濃度100 nMから連続2倍希釈した抗体溶液を用いて、結合速定数及び解離速度定数を求めた。これら定数より次式により解離定数を計算した。

$$\text{解離定数} = \text{解離速度定数} / \text{結合速度定数}$$

[0095] 表2にマウスモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体及び市販抗体のアミロスフェロイドに対する解離定数を示す。

[0096] [表2]

表2

マウスモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体の解離定数

抗体	解離定数 (nM)	
	(アミロスフェロイド40)	(アミロスフェロイド42)
6E10	2.9	2.3
4G8	1.7	3.2
IBL10027	21	10
MASD1	0.5	0.21
MASD2	0.16	0.41
MASD3	0.34	0.047

[0097] 実施例4:抗アミロスフェロイド抗体の抗原決定部位(エピトープ)の決定

(1) 抗アミロスフェロイド抗体の抗原決定部位(エピトープ)

抗アミロスフェロイド抗体のエピトープを決定する目的で、アミロイドβモノマー蛋白質の部分配列をN端より5残基ずつ順次化学合成することで、38通りのアミロイドβ5残基部分配列ペプチド(今後、5PAと略し、N端側から5PA1, 5PA2・・・、5PA38と呼ぶことにする。表3参照)を得た。各5PAはHPLCによって単一ピークになるまで精製した後、一定量ごとに凍結乾燥を行い、使用直前まで-20℃にて保存した。

[0098] [表3]

(表3)	
ペプチド	配列番号2におけるアミノ酸番号
5PA1	1～5
5PA2	2～6
5PA3	3～7
5PA4	4～8
5PA5	5～9
5PA6	6～10
5PA7	7～11
5PA8	8～12
5PA9	9～13
5PA10	10～14
5PA11	11～15
5PA12	12～16
5PA13	13～17
5PA14	14～18
5PA15	15～19
5PA16	16～20
5PA17	17～21
5PA18	18～22
5PA19	19～23
5PA20	20～24
5PA21	21～25
5PA22	22～26
5PA23	23～27
5PA24	24～28
5PA25	25～29
5PA26	26～30
5PA27	27～31
5PA28	28～32
5PA29	29～33
5PA30	30～34
5PA31	31～35
5PA32	32～36
5PA33	33～37
5PA34	34～38
5PA35	35～39
5PA36	36～40
5PA37	37～41
5PA38	38～42

[0099] 上記の各5PAを滅菌済み超純水に溶かし、IgGに精製した各抗アミロスフェロイド抗体に対して各5PAペプチドがモル比で100～100万倍になるよう5PA-抗体混合溶液を調製した。実施例3(1)で調製したアミロスフェロイド40固相プレートに各5PA-希釈液を添加し、4℃にて一晩振とうし、0.01% Tween 20-PBS(－)溶液で洗浄後、1万分の1に希釈したペルオキシダーゼが結合した2次抗体(ポリクローナル抗体の場合抗ウサギ抗体、モノクローナル抗体の場合抗マウス抗体、共にJackson Laboratories社製)を添加し1時間振とうした。これを0.01% Tween 20-PBS(－)溶液にて洗浄し、TM B Substrate Kit (PIERCE社製)を用いて発色を行った。発色を停止後、450 nmの吸収をプレートリーダー (Benchmark; BioRad社製)で測定し結果を得た。その結果、今回得られたポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体はアミロイド β モノマー蛋白質のN末端のペプチド(5PA1)によって、また各モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体はN末端のペプチド(5PA2)によって、それぞれ最も強く競合阻害がかかることが明らかとなった。一方、アミロイド β モノマーに対する抗体である市販N末端抗体「6E10」はN末端ペプチド(5PA5)に、同じくアミロイド β モノマーに対する抗体であり、アミロスフェロイドよりもモノマーに対して約2倍以上強く反応するIBL社製市販N末端抗体「82E1」はN末端ペプチド(5PA1)によって、それぞれ最も強く阻害がかかっていた。

[0100] (2) 競合試験

各種モノクローナル抗体及びウサギポリクローナル抗体を0.1 M 炭酸水素ナトリウムに対して透析した。抗体1 mgに対してモル比で10倍量のNHS-LC-Biotin (Pierce Chemical社製)を添加し、4℃ 2時間反応させた。PBSに対して透析し、ビオチン標識抗体として使用した。

[0101] アミロスフェロイド固相ELISA法に従い競合試験を実施した。ビオチン化抗アミロスフェロイド抗体(終濃度0.1 μ g/ml)と連続希釈した各種非標識抗体(終濃度0.1～10 μ g/ml)の混合液50 μ lを、アミロスフェロイドを固相化したELISAプレートに添加して室温1時間反応させた。プレートを洗浄後、1 μ g/mlに希釈したペルオキシダーゼ標識Avidin Dを添加して室温1時間反応させた。プレートを洗浄し基質溶液(スミロン社製)を添加して一定時間発色させ、プレートリーダーにて吸光度を測定した。

[0102] 実施例2で作製したウサギポリクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体及び市販

抗体の競合試験結果を表4にまとめた。2種類のウサギポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体(ASD2、ASD3)と3種類のマウスモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体は互いに競合し、共通のエピトープを認識することが示唆された。またこれらの抗体は市販抗体「6E10」「4G8」「IBL10027」と競合せず、これらの抗体とは認識するエピトープが異なることが示された。

[0103] [表4]

表4

← 競合させる抗体 →

	MASD1	MASD2	MASD3	ASD2	ASD3	6E10	4G8	IBL
↑ ビオチン化抗体 ↓	MASD1	+++	±	+	+	-	-	-
	MASD2	+++	+++	+++	++	+	-	±
	MASD3	+++	++	+++	+	-	±	-
	ASD2	++	++	+++	++	+	±	±
	ASD3	++	+	+++	++	±	±	±

コントロール吸光度に対する減少割合(モノクロ 10 μ g/mL、ポリクロ 50 μ g/mL)

+++ : 75%以上

++ : 75~50%

++ : 50~25%

± : 25%以下で低下傾向有り

(ビオチン化抗体濃度:モノクロ 0.1 μ g/mL、ポリクロ 1 μ g/mL)

[0104] 実施例5 抗アミロスフェロイド抗体によるアミロスフェロイド形成阻害

(1) 抗アミロスフェロイド抗体存在下におけるアミロスフェロイドの調製

実施例1に記載した方法に従いアミロスフェロイド40含有液を調製した。その際、抗アミロスフェロイド抗体を0.1 mg/mlになるように添加し、7日間回転を行った。対照として、市販の抗単量体アミロイド β 抗体「6E10」(Senetek社製)を同濃度用い、同じ操作を行ったものを調製した。

[0105] (2) 抗アミロスフェロイド抗体によるアミロスフェロイドの形成阻害(電子顕微鏡による解析)

(1)に記載したとおり各種抗体存在下でアミロスフェロイド40含有液を調製した。各

含有液の小滴(数 μ l)を、酢酸ウラニウム溶液を用いたネガティブ染色法により電子線損傷低減法を用いて観察と写真撮影を行った。撮影した顕微鏡写真を用いて、各条件下における、球状のアミロスフェロイドの形成を解析し、粒子解析によって粒径及び粒度分布を求めた。その結果、ポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体存在下では、アミロスフェロイドすなわち10-15 nmの球状の蛋白質は形成されなかった。このような形成抑制効果は、「6E10」では認められず、会合していないアミロイド β モノマー蛋白質を認識する既存の抗体では形成阻害効果は得られないことが明らかになった。

[0106] (3) 三重染色による神経細胞死活性評価法を用いたアミロスフェロイド形成阻害の解析

ラット18日胎児の前脳基底野より分散培養によって初代培養細胞を調製した。調製した初代培養細胞は、ポリエチレンイミン(Sigma社製)によりコーティングした培養プレートに 2×10^5 cells/cm²となるように播種して培養した。3日間、5%牛胎児血清(ハイクローン社製)/5%馬血清(Equitech社製)/1mM Pyruvate/50 μ g/ml Gentamicin(インビトロジェン社製)/DMEM high glucose培地(インビトロジェン社製)で培養後、無血清培地(0.5mM L-Glutamine/50 μ g/ml Gentamicin(インビトロジェン社製)/B27 Supplement(インビトロジェン社製)/Neurobasal medium(インビトロジェン社製))に交換した。この培養細胞に対し、(1)で調製した各種抗体存在下で調製したアミロスフェロイド溶液を、それぞれ最終濃度1 μ M(アミロイド β モノマー蛋白質換算)になるよう、1ウェルずつに添加し、神経毒性を検証した。神経毒性は、何も添加しない状態で調製したアミロスフェロイド溶液の毒性と比較することで評価した。バックグラウンドとして溶媒を同容量ウェルに添加した。添加後、40時間培養を行った後に、PBS(-)で洗浄し、最終濃度が1 μ g/mlのCalcein-AMの、最終濃度が5 μ g/mlのプロピディウムイオダイド希釈液(20 mM HEPES pH7.3, 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.5 mM glucose, 2 mM CaCl)で30分間染色を行った。その後、10%中性ホルマリン中において4℃で30分間細胞を固定処理を行い、次にPBS(-)で洗浄後、1 μ g/ml Hoechst33258(Molecular Probes社製)と5分間反応させて三重染色を行った。

[0107] この試料に、蛍光顕微鏡 (Zeiss社製) 下で、励起レーザーを照射し、励起された蛍光を冷却CCDカメラ (CoolSNAP HQ: Roper社製) で検出して画像を取り込み、画像データとして保存した。各蛍光色素の励起波長はそれぞれ、Calcein-AMは460-490nm、プロピディウムイオダイドは510-550nm、H33258は364nmで行った。得られた画像データについて、Hoechst33258で染色された全細胞数、及びプロピディウムイオダイドで染色された死細胞数を計数した。1つの試料につき計数した全細胞数は平均でおよそ1000~1200個程度であった。得られた死細胞数を全細胞数で除して100を乗じた値を細胞死活性(%)として計算した。なお、「死細胞」はプロピディウムイオダイドで染色された細胞で核の分断や萎縮などのアポトーシス様変化を呈した細胞とした。

[0108] この結果、図5に示したとおり、ポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体の存在下で回転したアミロイド β 蛋白質には神経細胞死活性が認められなかった。一方、市販の抗アミロイド β 蛋白質抗体「6E10」の存在下で回転したアミロイド β 蛋白質は、抗体を添加せずに形成させた場合と同様の強い神経細胞死活性を示した。

[0109] 従って、実施例5(2)に記載した電子顕微鏡写真の結果と合わせると、実施例2で取得した抗アミロスフェロイド抗体は、アミロスフェロイドの形成を阻害する活性を有することが明らかになった。これに対し、市販の会合していないアミロイド β モノマーを認識する「6E10」にはアミロスフェロイド形成を阻害する活性がないことが判った。

[0110] 実施例6 アミロスフェロイドの細胞毒性の中和活性の評価

(1) ポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体によるアミロスフェロイド毒性の中和

実施例5に記載した方法により準備したラット前脳基底野由来初代培養神経細胞 1×10^6 cell/ml に対して、実施例2で得た各ポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体0.4 mgを予め添加し、そこに、実施例1に記載した方法に基づき調製したアミロスフェロイド含有液を10 ml添加した。その後、40時間後に、実施例4に記載した三重染色法を用いて神経細胞死活性の評価を実施した。コントロールとして、各抗アミロスフェロイド抗体のみを添加した場合の神経細胞死活性を評価し、溶媒を添加したバックグラウンドと比較した。対照として、市販アミロイド β 抗体「6E10」を予め投与する実験を同時に実施した。図6に示したとおり、抗アミロスフェロイド抗体並びに市販抗体「6E10」

のいずれも、単独の投与では神経毒性を発揮しない。それに対して、予め抗アミロスフェロイド抗体を投与した場合には、アミロスフェロイドによる神経毒性はバックグラウンドレベル近くに抑制された。一方、市販抗体「6E10」を事前に添加した場合には、アミロスフェロイドによる神経毒性は影響を受けなかった。すなわち、実施例2で得た抗アミロスフェロイド抗体には、アミロスフェロイドによる神経毒性を中和する活性が認められたが、会合していないアミロイド β 蛋白質モノマーを認識する市販抗体「6E10」には中和活性は認められなかった。前脳基底野と同様にアルツハイマー病において主病変が認められる海馬並びに大脳皮質からそれぞれ初代培養神経を調製し、同様の実験を行ったところ、図6の結果と同じ効果が得られた。即ち、抗アミロスフェロイド抗体のみアミロスフェロイドによる神経毒性をバックグラウンドレベルにまで抑制していた。従って、抗アミロスフェロイド抗体は、アルツハイマー病で傷害を主に受ける脳の部位いずれにおいても、アミロスフェロイドによる神経毒性から神経を保護する効果があることが示された。

[0111] (2) 市販N末端抗体によるアミロスフェロイド毒性の中和

実施例5に記載した方法により準備したラット前脳基底野由来初代培養神経細胞に対して、実施例6(1)に示したとおり、予め抗アミロスフェロイド抗体あるいは市販の抗N末端抗体を添加し、そこに、実施例1に記載した方法に基づき調製したアミロスフェロイド42含有液を一定量添加した。その後、40時間後に、実施例5に記載した三重染色法を用いて神経細胞死活性の評価を実施した。その後、神経細胞に添加した溶液中に含まれるアミロイド β 含量を定量的アミノ酸分析により決定し、神経細胞死比活性を求めた。図7に示したとおり、市販のIBL社製N末端抗体はアミロスフェロイドによる神経毒性を抑制しないことがわかった。cell signaling社製のN末端抗体もアミロスフェロイドによる神経毒性を中和しなかった。実施例3で示したとおり抗アミロスフェロイド抗体の最も強いエピトープはN末端にあるが、N末端部分ペプチドを用いて作られた市販のN末端抗体、Senetek社製6E10、IBL社製N末端抗体、cell signaling社製N末端抗体はいずれもアミロスフェロイドによる神経毒性を抑制することは出来ず、アミロスフェロイドを抗原に用いた抗アミロスフェロイド抗体のみが顕著な中和活性を示すことがわかった。さらに、抗アミロスフェロイド抗体は、アミロスフェロイド40及び

アミロスフェロイド42のいずれに対しても、保護効果を発揮することが明らかとなった。

[0112] (3) モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体によるアミロスフェロイド毒性の中和

実施例2(2)で得た各モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体を用いて、アミロスフェロイド毒性の中和活性を評価した。評価方法としては、(a)実施例5に示した方法に従い、ラット前脳基底野由来初代培養神経細胞及びラット大脳皮質由来初代培養細胞を用いて三重染色法による評価と、(b)ラット大脳皮質を用いて、アポトーシスの結果生じる断片化したヌクレオソーム(DNAとヒストンの混合体)を、抗ヒストン抗体と抗DNA抗体によるサンドイッチELISAによって検出する評価の2通りを用いて行った。サンドイッチELISAは細胞死 ELISAキット(Roche社製)を用い、キットのプロトコールに従って評価を行った。大脳皮質の初代培養は基本的に実施例4に記載した前脳基底野の場合と同様に調製を行ったが、培養密度は 1.5×10^5 cells/cm²に播種し、2時間後に無血清培地に交換した。アミロスフェロイドは、実施例2に記載した方法に従い調製したアミロスフェロイド40及びアミロスフェロイド42をそれぞれ用いた。

[0113] モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体MASD1、2、3はいずれも、前脳並びに大脳皮質いずれの初代培養神経細胞においても、アミロスフェロイドによる神経毒性を中和する効果を発揮していた。

[0114] また、図8にアミロスフェロイド42を用いた細胞死ELISAの結果を示すが、ポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体が大脳皮質由来初代培養神経細胞においては1.2 mg/mlでほぼ完全に神経毒性を抑制するのに対し、モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体MASD2は0.15 mg/mlで同等の抑制効果を発揮していた。モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体MASD1及びMASD3も、MASD2と同等の抑制効果を有していた。従って、モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体は、ポリクローナル抗体のおよそ10倍強い効果を持つことが示された。

[0115] (4) モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体によるアミロスフェロイドの除去による神経毒性の抑制

モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体を用いてアミロスフェロイドの免疫沈降実験を行った。免疫沈降はAntibodies-A laboratory manual (Ed Harlow & David Lane, C

old Springer Harbor Laboratory 1988) の記載に従って実施した。具体的には、1% BSA-PBS(-)中にてアミロスフェロイド42と各種モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体を混ぜ、室温にて1時間反応させた後に、1/4量のプロテインGセファロース(アマシャムバイオサイエンス社製)を添加し、さらに30分間室温で攪拌反応を行った。遠心にて抗体-プロテインGセファロースの会合物を除去した。対照として正常マウス血清を同量用いて、同様の実験を行った。

[0116] 上記のように調製した上清を用いて、アミロスフェロイド残存率と神経細胞死活性を解析した。アミロスフェロイド残存率はポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体と市販 β アミロイド抗体 (IBL10027) によるサンドイッチELISAにて解析した。即ち、回収した上清を1%BSA-PBS(-)にて適宜希釈を行い、予めポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体を吸着させた96穴ELISAプレート(Nunc社製マキシソープ)に添加し1時間室温で反応させた後、0.05%Tween20-PBS(-)により洗浄することで未反応物を除去し、市販 β アミロイド抗体 (IBL10027) を添加、室温でさらに1時間反応させた。定量は実施例3に記載したとおり、二次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を添加し、発色反応によって行った。図9は、免疫沈降前の溶液に含まれていたアミロスフェロイド42の量に対する%として示してある。上清に含まれる神経細胞死活性は、実施例6(1)に記載した方法に従い、アポトーシス活性を定量した。

[0117] 図9には抗体MASD3の結果を示したが、抗体MASD2によってもほぼ同様の結果を得た。図9に示したとおり、モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体を用いることで、95%以上のアミロスフェロイド42を除去することに成功した。正常マウス血清を用いた場合、プロテインGセファロースに対する非特異的吸着によりおよそ40%のアミロスフェロイド42が失われ、神経細胞死活性もそれに相関して低下はしたが、まだ強い神経毒性が検出された。それに対して、ほぼ完全に抗アミロスフェロイド抗体によってアミロスフェロイド42を除去した溶液には、神経毒性は全く認められなかった。以上から、確かにアミロスフェロイド42が神経毒性の本体であり、今回調製した抗アミロスフェロイド抗体はそれを有効にかつ特異的に除去することで神経毒性を阻止することが出来ることが示された。

[0118] 実施例7 抗アミロスフェロイド抗体によるカルシウム動態異常の抑制

実施例4に記載した方法を用い、ラット18日胎児の海馬より分散培養によって初代培養神経細胞を調製した。調製した初代培養細胞は、 1.0×10^5 cells/cm²になるように播種し、培養5-6日目の細胞を実験に用いた。神経細胞は、2 mM CaCl₂を含んだbalanced salt solution (130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5.5 mM glucose, 20 mM HEPES, pH7.3)(BSS(+))と略)中にてfura-PE3/AM(800 μ MTEF Labs社製)によって充分染色した後、倒立型蛍光顕微鏡(オリンパス社製)下にて、各細胞のカルシウム動態変化をリアルタイムに観測した。具体的には、励起フィルターを連続的に切り替えることでF340(340 nm励起時の480 nm付近の蛍光強度)とF380(380 nm励起時の480 nm付近の蛍光強度)を連続的に測定し、それを冷却CCDカメラによって取り込み、Aqua Cosmosを用いてF340/F380の比として求めることで細胞中のカルシウム濃度変化を追跡した。図10の結果が示すように、海馬初代培養神経細胞にアミロスフェロイド42含有液を投与した瞬間、細胞内カルシウム濃度の急激な増加が認められた。この際、予め神経細胞死を中和するのに十分な濃度のポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体を初代培養神経細胞に投与しておくことで、この急激な細胞内へのカルシウム流入を抑制出来ることが明らかとなった。抗アミロスフェロイド抗体による細胞内カルシウム流入の阻止は、アミロスフェロイドを含む自己会合型アミロイド β 蛋白質含有液に特異的であり、グルタミン酸投与によって引き起こされる急激な細胞内へのカルシウム流入には全く抑制効果を示さなかった。モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体MASD1、2、3のいずれも同様に細胞内カルシウム流入を抑制する傾向を示した。

産業上の利用の可能性

- [0119] 本発明の抗体は、アミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド β 線維に対する反応性よりも高く、さらにアミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性、及び／またはアミロスフェロイドの形成に対する阻害活性を有する。また、アミロイド β モノマー蛋白質に対する高い反応性を示し、アミロスフェロイドの形成に対する阻害活性を有する抗体も含む。アミロスフェロイドは、アルツハイマー病患者の脳内に存在するアミロイド β 蛋白質と同等の濃度で神経細胞死を誘導するため、(1)アミロスフェロイドの形成に対する阻害活性を有する抗体、あるいは(2)アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有する抗体を取得すれば、アルツハイマ

一病の治療または予防薬として用いることができる。また、(3)アミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド β モノマー蛋白質やアミロイド β 線維に対する反応性よりも高い抗体を取得すればアルツハイマー病個体の検出への応用も可能である。

図面の簡単な説明

[0120] [図1]図1は、本発明のモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体の反応性を解析したアミロスフェロイド固相ELISAの結果を示すグラフである。

[図2]図2は、本発明のポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体の反応性を解析したドットブロットの結果を示す図である。

[図3]図3Aは、本発明のモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体及びポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体の反応性を解析したドットブロットの結果を示す図である。図3Bは、Aの各ドットの強度を数値化した結果を示すグラフである。ASD2は、ポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体を示す。

[図4]図4Aは、本発明のポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体のアミロイド β 線維に対する反応性を示す免疫電子顕微鏡写真の図である。図中のバーは20nmを表す。図4Bは、モノクローナル抗アミロスフェロイド抗体MASD3のアミロイド β 線維に対する反応性を検証した免疫電子顕微鏡写真の図である。図中のバーは50nmを表す。

[図5]図5は、本発明のポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体のアミロスフェロイド形成阻害を解析した結果を示すグラフである。

[図6]図6は、本発明のポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体のアミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を解析した結果を示すグラフである。

[図7]図7は、市販N末端抗体のアミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を解析した結果を示すグラフである。

[図8]図8は、本発明のポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体とモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体の神経細胞死誘導阻害活性を比較した結果を示すグラフである。

[図9]図9は、本発明のモノクローナル抗アミロスフェロイド抗体による免疫沈降の結果を示すグラフである。上のグラフは、免疫沈降後に残存したアミロスフェロイド量を示し、下のグラフは、免疫沈降後の溶液に含まれる神経細胞死活性を示す。

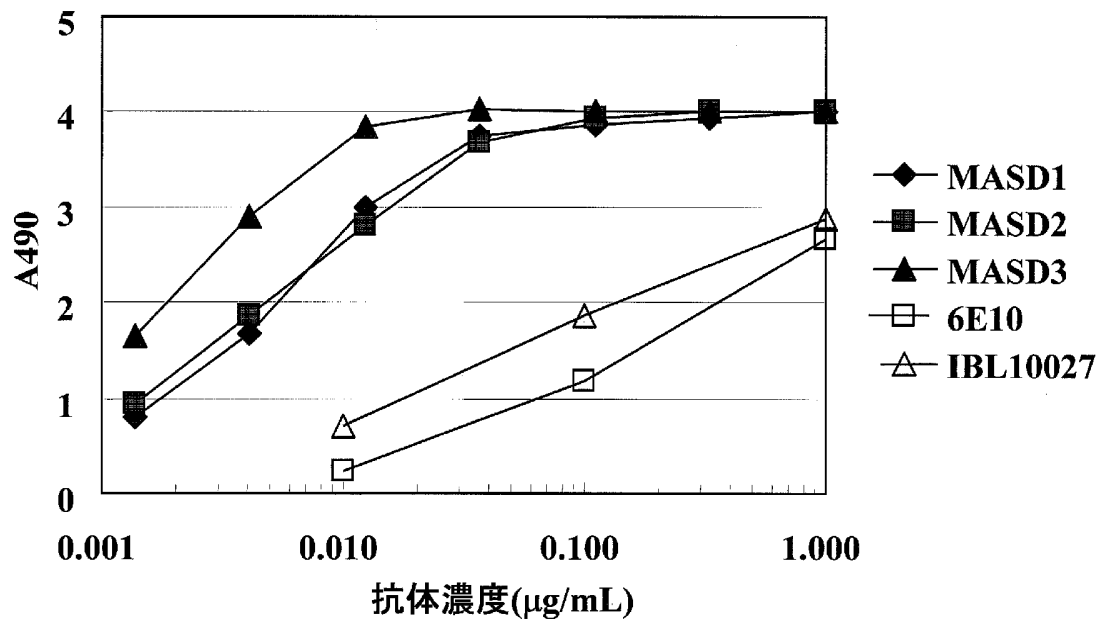
[図10]図10は、本発明のポリクローナル抗アミロスフェロイド抗体の、アミロスフェロイドによる異常な細胞内カルシウム流入抑制効果を示すグラフである。

請求の範囲

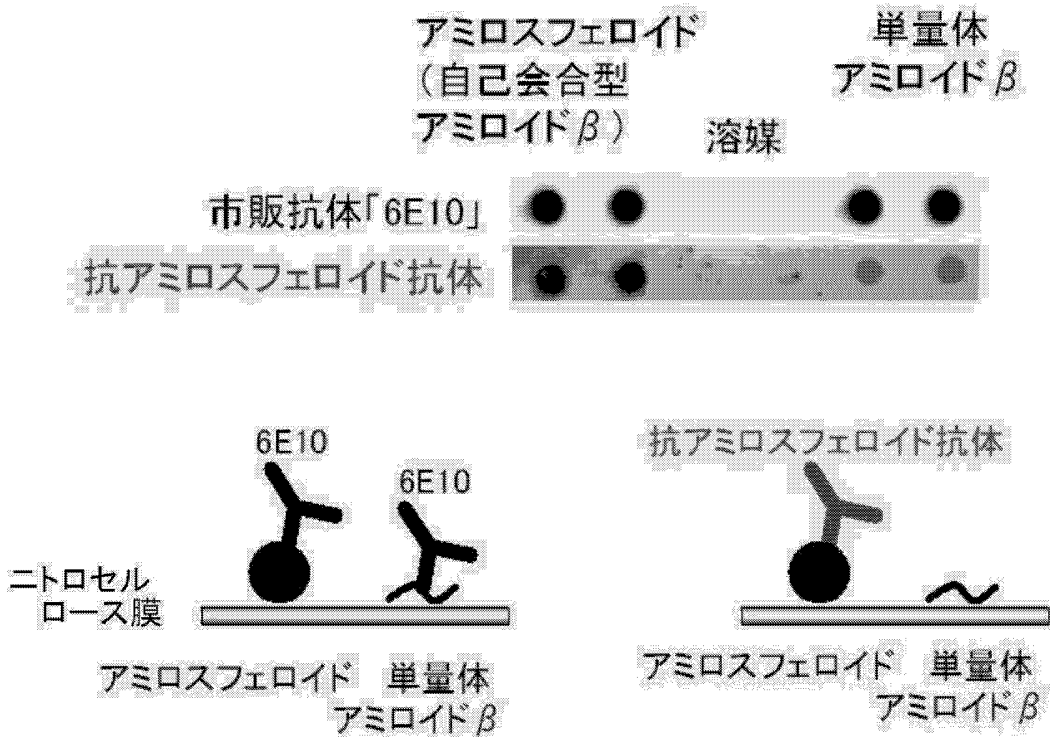
- [1] 以下の何れか1以上の特徴を有する抗体：
- (i) アミロスフェロイドに対する反応性の方が、アミロイド β 線維に対する反応性よりも高い；
 - (ii) アミロスフェロイドに対する高い反応性を有し、アミロスフェロイドによる神経細胞死誘導に対する阻害活性を有する；
 - (iii) アミロスフェロイドに対する高い反応性を有し、アミロスフェロイドの形成に対する阻害活性を有する；
 - (iv) アミロイド β モノマー蛋白質に対する高い反応性を有し、アミロスフェロイドの形成に対する阻害活性を有する。
- [2] 抗体のアミロスフェロイド及びアミロイド β 線維に対する反応性を同一の抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイド β 線維に対する反応性の2倍以上である、請求項1に記載の抗体。
- [3] 抗体のアミロスフェロイド及びアミロイド β 線維に対する反応性を同一の抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイド β 線維に対する反応性の10倍以上である、請求項1又は2に記載の抗体。
- [4] 抗体のアミロスフェロイド及びアミロイド β モノマー蛋白質に対する反応性を同一の抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイド β モノマー蛋白質に対する反応性の2倍以上である、請求項1から3の何れかに記載の抗体。
- [5] 抗体のアミロスフェロイド及びアミロイド β モノマー蛋白質に対する反応性を同一の抗体濃度及び抗体量並びに同一の抗原蛋白質濃度及び抗原蛋白質量を用いて比較する系において、抗体のアミロスフェロイドに対する反応性がアミロイド β モノマー蛋白質に対する反応性の5倍以上である、請求項1から4の何れかに記載の抗体。
- [6] アミロスフェロイドを抗原として得られる、請求項1から5の何れかに記載の抗体。
- [7] ポリクローナル抗体である、請求項1から6の何れかに記載の抗体。

- [8] モノクローナル抗体である、請求項1から7の何れかに記載の抗体。
- [9] アミロスフェロイドに対する解離定数が 10^{-9} 以下である、請求項8に記載のモノクローナル抗体。
- [10] アミロイド β モノマー蛋白質のN末端をエピトープとして認識する、請求項1から9の何れかに記載の抗体。
- [11] 受託番号(受領番号)FERM ABP-10392、FERM ABP-10393、又はFERM ABP-10394の何れかを有するハイブリドーマによって生産されるモノクローナル抗体。
- [12] 受託番号(受領番号)FERM ABP-10392、FERM ABP-10393、又はFERM ABP-10394の何れかを有するハイブリドーマ。
- [13] 被験物質と請求項1から11の何れかに記載の抗体とをアミロスフェロイドに接触させ、被験物質のアミロスフェロイドへの結合性を指標として候補物質を選択することを含み、アルツハイマー病の治療及び／又は予防薬のスクリーニング方法。
- [14] アルツハイマー病の疑いのある個体から取得した生体試料を請求項1から11の何れかに記載の抗体と接触させ、該サンプル中の該抗体と反応する物質の有無を測定することを含む、アルツハイマー病個体の検出方法。
- [15] 請求項1から11の何れかに記載の抗体を含む、神経細胞保護剤。
- [16] 請求項1から11の何れかに記載の抗体を含む、アミロスフェロイド形成阻害剤。
- [17] 請求項1から11の何れかに記載の抗体を含む、アルツハイマー病の検出のための試薬。
- [18] 請求項1から11の何れかに記載の抗体を含む、医薬。
- [19] 請求項1から11の何れかに記載の抗体を含む、アルツハイマー病の治療及び／または予防薬。
- [20] アミロスフェロイドを被覆してなることを特徴とする、請求項1から11の何れかに記載の抗体を検出するための固相担体。

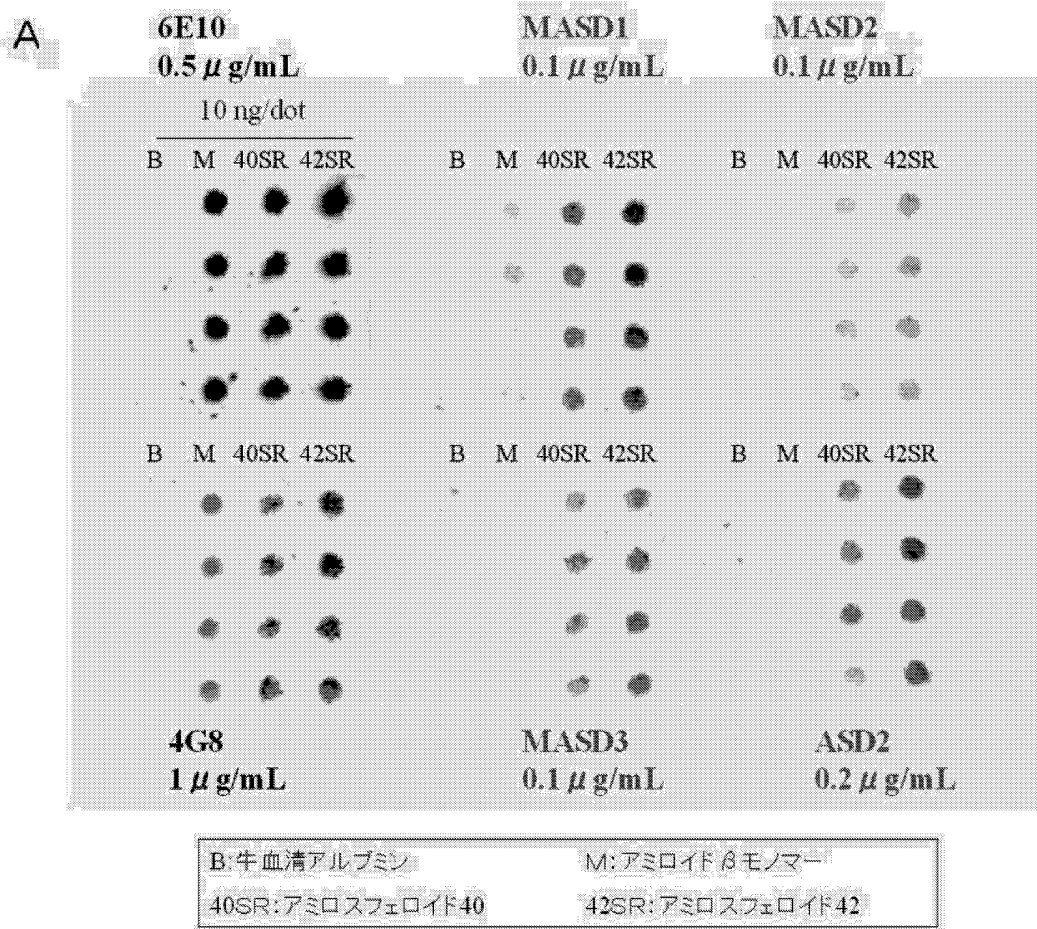
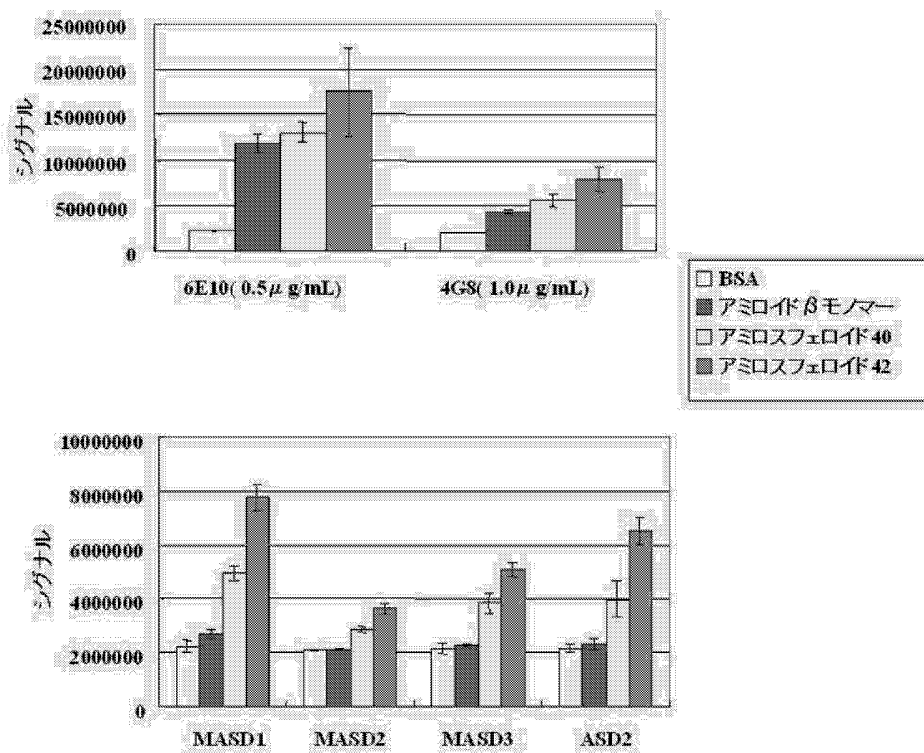
[図1]



[図2]



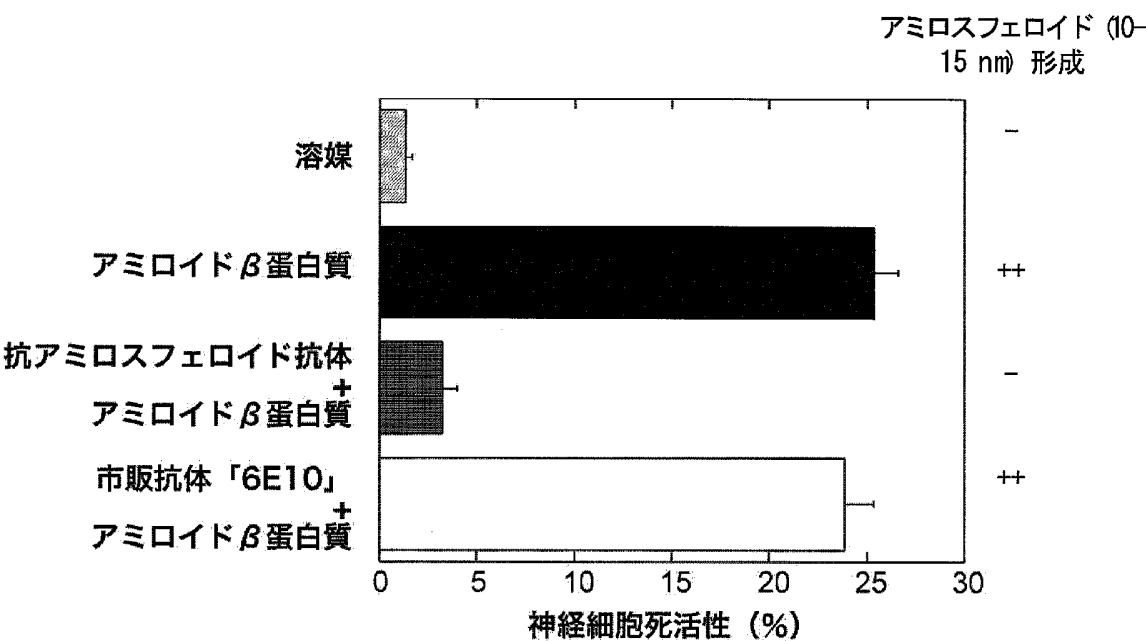
[図3]

**B**

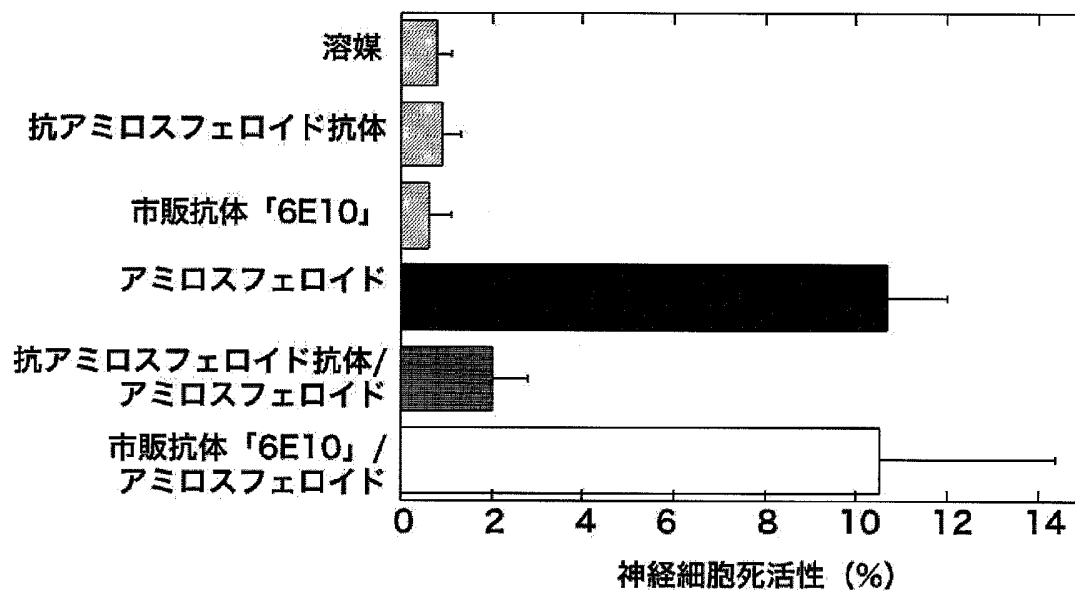
[図4]



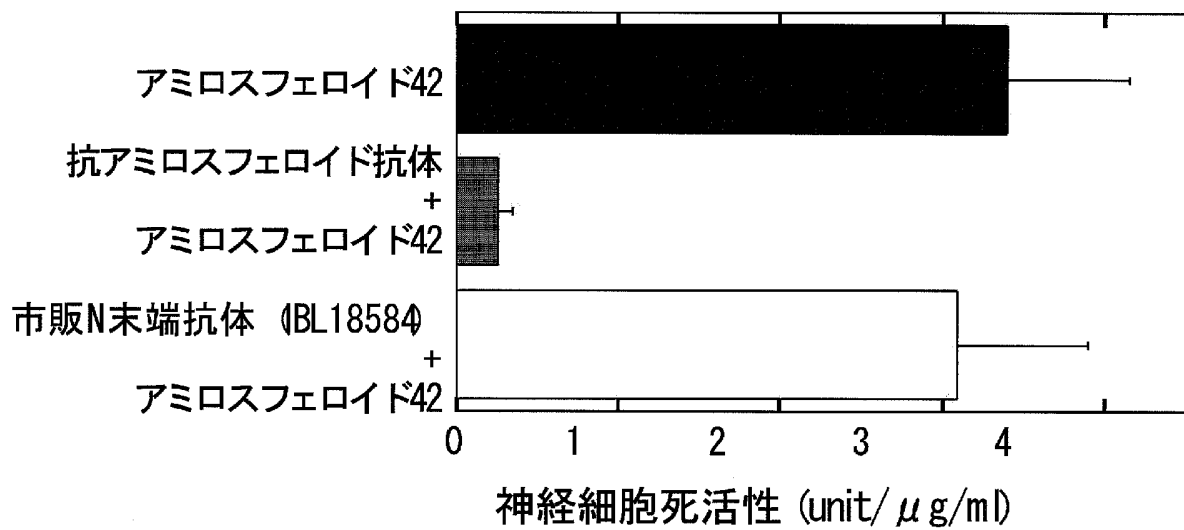
[図5]



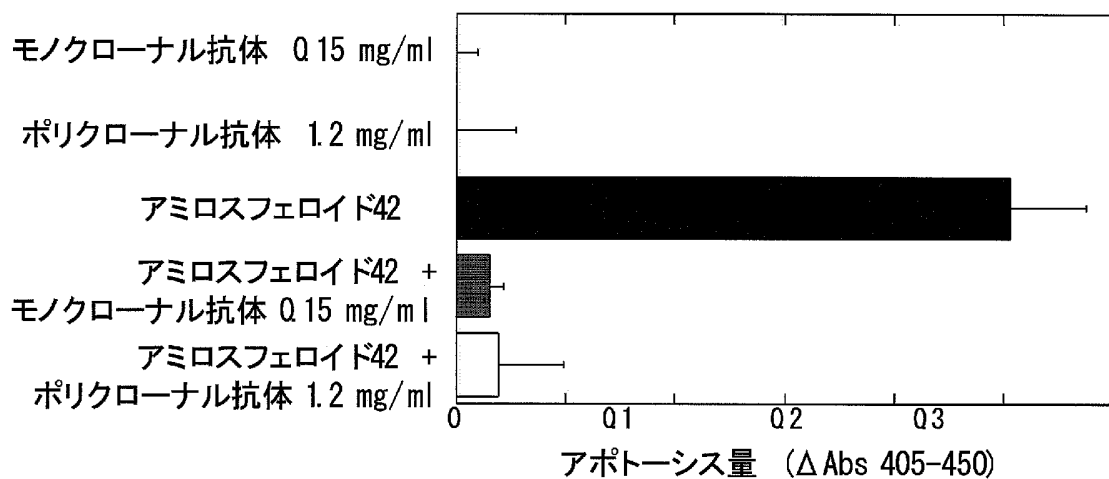
[図6]



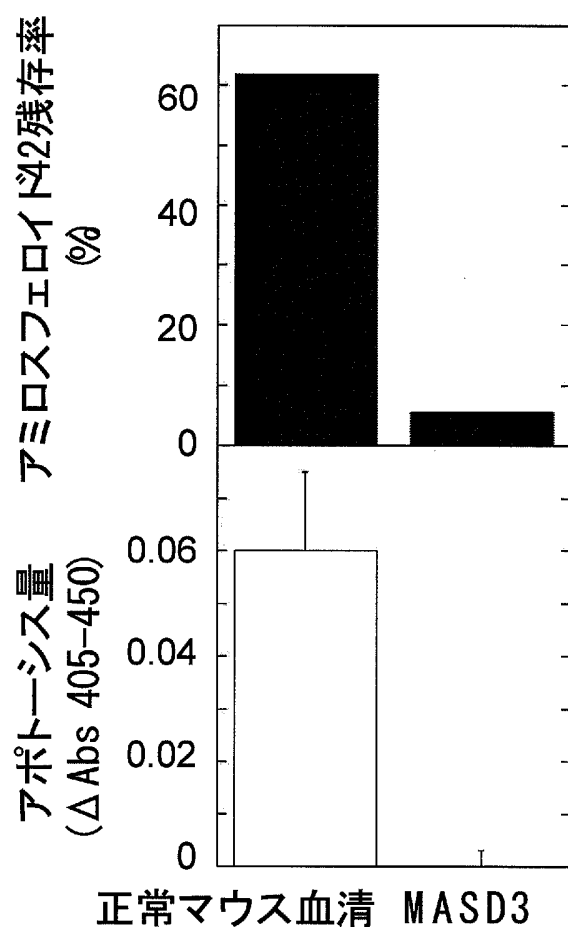
[図7]



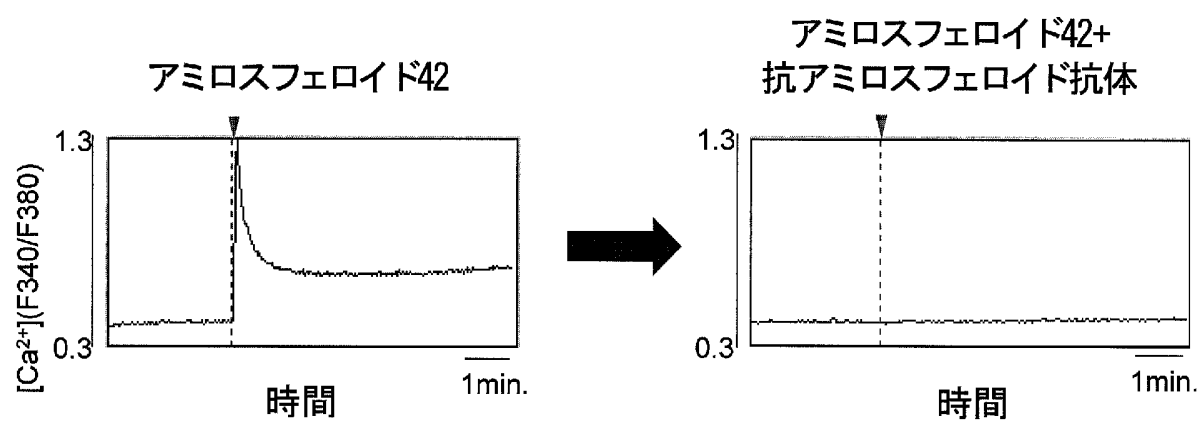
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/014735

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/18 (2006.01), **A61K39/395** (2006.01), **A61P25/28** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01), **G01N33/15** (2006.01), **G01N33/50** (2006.01), **G01N33/53** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K16/18 (2006.01), **A61K39/395** (2006.01), **A61P25/28** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01), **G01N33/15** (2006.01), **G01N33/50** (2006.01), **G01N33/53** (2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2003-509020 A (Ramotto Atto Teru Abibu Yunibashitei Ltd.), 11 March, 2003 (11.03.03) & WO 2001/018169 A2 & US 2002/0052311 A1	1-20
X	JP 2003-517461 A (NEURALAB LTD.), 27 May, 2003 (27.05.03) & WO 2000/072880 A2 & US 2004/0171815 A1	1-20
X	LOMBARDO, J.A. et al., Amyloid- β antibody treatment leads to rapid normalization of plaque-induced neuritic alterations., J.Neurosci., 2003, Vol.23, No.34, pages 10879 to 10883.	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 October, 2005 (13.10.05)

Date of mailing of the international search report
25 October, 2005 (25.10.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/014735

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Minako HOSHI, "'Katachi' ga Seigyo suru Shinkei no Shi", Protein, Nucleic acid and Enzyme, 2004 Nen, 5 Gatsu, Vol.49, No.7, pages 1098 to 1100	1-20
X	JP 2001-247600 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 11 September, 2001 (11.09.01) (Family: none)	1-20
X	JP 2002-105099 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 10 April, 2002 (10.04.02) (Family: none)	1-20
Y	HOSHI, M. et al., Spherical aggregates of β -amyloid (amylospheroid) show high neuro toxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β . Proc.Natl. Acad.Sci.USA., 2003, Vol.100, No.11, pages 6370 to 6375.	1-20
Y	Minako HOSHI, " β -amyloid Jiko Soshikika ni yoru Shinkei Dokusei no Hatsugen", Chemistry & chemical industry, 2004 Nen, 5 Gatsu, Vol.57, No.5, pages 519 to 521	1-20

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ **C07K16/18** (2006.01), **A61K39/395** (2006.01), **A61P25/28** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01), **G01N33/15** (2006.01), **G01N33/50** (2006.01), **G01N33/53** (2006.01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ **C07K16/18** (2006.01), **A61K39/395** (2006.01), **A61P25/28** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01), **G01N33/15** (2006.01), **G01N33/50** (2006.01), **G01N33/53** (2006.01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)
CA (STN)
REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2003-509020 A (ラモット・アット・テル・アビブ・ユニバーシ テイ・リミテッド) 2003.03.11 & WO 2001/018169 A2 & US 2002/0052311 A1	1-20
X	JP 2003-517461 A (ニューララブ・リミテッド) 2003.05.27 & WO 2000/072880 A2 & US 2004/0171815 A1	1-20
X	LOMBARDO, J.A. et al., Amyloid- β antibody treatment leads to rapid normalization of plaque-induced neuritic alterations.,	1-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 10. 2005

国際調査報告の発送日

25. 10. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B

3540

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	J. Neurosci., 2003, Vol. 23, No. 34, p.10879-10883.	
X	星美奈子, 「かたち」が制御する神経の死, 蛋白質 核酸 酵素, 2004 年, 5 月, Vol. 49, No. 7, p. 1098-1100	1-20
X	JP 2001-247600 A (三菱化学株式会社) 2001.09.11 (ファミリーなし)	1-20
X	JP 2002-105099 A (三菱化学株式会社) 2002.04.10 (ファミリーなし)	1-20
Y	HOSHI, M. et al., Spherical aggregates of β -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β . Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2003, Vol.100, No.11, p. 6370-6375.	1-20
Y	星美奈子, β アミロイド自己組織化による神経毒性の発現, 化学と工業, 2004 年, 5 月, Vol. 57, No. 5, p. 519-521	1-20