

＜シンポジウム 32—4＞神経疾患に対する抗体療法

筋萎縮性側索硬化症に対する抗体療法

漆谷 真

要旨：筋萎縮性側索硬化症 amyotrophic lateral sclerosis ; ALS) は他の神経変性疾患同様、病態関連タンパクの構造異常に基づくコンフォメーション病であり、多彩な病態の分子基盤と考えられている。われわれは家族性 ALS の主な原因タンパク質である変異 SOD1 に対する特異認識抗体の作製に成功した。それらの一部は脳室内、髄腔内の持続注入療法によって進行抑制効果をもとめている。しかし変異 SOD1 特異認識抗体もクローンによって無効なものもあり、作用機序は複雑である。今後は分子内の病原構造の同定と抗体の可変領域の一本鎖抗体などをもちいた改変抗体によって、細胞内タンパク質をふくむ治療応用の拡大が期待される。

(臨床神経 2011;51:1162-1164)

Key words：筋萎縮性側索硬化症、抗体療法、変異SOD1、タンパク質ミスフォールディング

とをみいだした²⁾。

はじめに

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の運動ニューロン変性の機序は不明であるが、1993年に家族性ALSの20%でsuperoxide dismutase 1 (SOD1)の突然変異が発見され、2006年に孤発性ALSの病態関連タンパク質としてTAR DNA binding protein 43 (TDP-43)が同定され、ALSにおいてもアルツハイマー病やパーキンソン病のβアミロイドやαシヌクレインに該当する病原タンパク質が明らかとなった。神経免疫疾患に対する免疫療法は、病原タンパク質を生体にとって異物ととらえ生体反応を利用して除去しようとする試みであり、アルツハイマー病では臨床治験の段階を迎えている。本稿では、われわれが進めているALSの抗体療法研究の現状について、関連する病態を述べ、内外の研究成果と今後の展望について紹介する。

ALS に対する免疫療法の病態背景

家族性ALSの20%でSOD1の突然変異が存在することが明らかとなり、変異SOD1トランスジェニック(Tg)マウスが、致死性麻痺症状と病理所見がALSに類似することが明らかとなり、多くのすぐれた研究成果によって変異SOD1がミトコンドリア機能障害、小胞体ストレス、プロテアソーム分解機能障害、軸索輸送異常など、細胞内の異常事象の数々をひきおこすことが明らかとなった¹⁾。しかしその後変異SOD1による運動ニューロン変性は、非細胞自律性であることが明らかとなった。われわれは、変異SOD1タンパク質との結合タンパク質としてクロモグラニンを同定した。さらに細胞外の変異SOD1がミクログリアを活性化し、運動ニューロン死をおこすことを発見し、細胞質タンパク質が病原性を獲得したばあいに細胞外で“danger molecule”として働くこ

ALS モデル動物をもちいた抗体療法

われわれは変異SOD1 Tgマウスに対するワクチン療法に成功したが、抗血清由来のポリクローナル抗体の脳室内投与が有効であることを確認したため、われわれは同様のワクチンプロトコルによってハイブリドマをえ、ELISA法をもちいて変異SOD1、あるいはミスフォールド状態のSOD1のみと反応するモノクローナル抗体を選抜した³⁾。C4F6クローンは変性、天然状態においてG93A型変異SOD1にもっとも反応するが、他の変異型やミスフォールドSOD1に対する反応性も、天然の野生型SOD1にくらべて高い(Fig. 1)³⁾。近年酸化状態にある野生型SOD1に対しても反応し、孤発性ALSの前角組織で染色性が高いことが報告された²⁾。本抗体をもちいてわれわれは、変異SOD1 Tgマウスにおいて、変異SOD1と多くの神経変性疾患の病態がうたがわれている14-3-3タンパクが共局在することを明らかにしている⁴⁾。D3H5抗体はアポ状態の野生型と変異型を同様に認識する抗体であったが、免疫沈降法をもちいた詳細な解析によりミスフォールドした野生型SOD1や他種類の変異SOD1を認識することが明らかとなり、Gros-Louisらは、発症時期の高発現型G93A SOD1 Tgマウスの脳室内にD3H5抗体を持続注入したところ、進行を7日間有意に延長した。さらに免疫担当細胞膜に結合する定常領域(Fc)を除去したFab抗体も全長抗体同様の効果をもとめ、免疫組織化学的解析によって細胞内のSOD1凝集体に投与したD3H5抗体が存在した。このことは、D3H5抗体が細胞内に取り込まれ、変異SOD1の病原構造と競合する形で作用していることを示唆する⁵⁾。一方われわれはことなるクローンをもちいた他動免疫療法によって変異SOD1 Tgマウスの進行を有意に抑制することを確認しているが、この効果はFc依存性でありD3H5とはことなる作用機序を有するこ

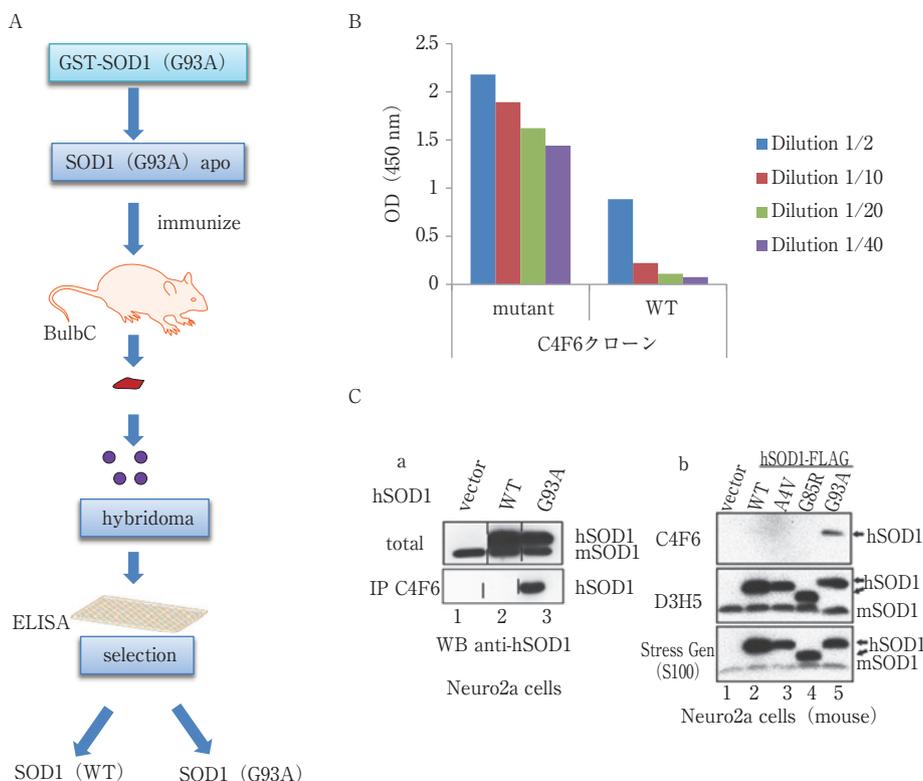


Fig. 1 変異 SOD1 特異認識抗体の作製手順と評価.

- A. 変異型 (G93A) のアポ型 SOD1 を精製し, BulbC マウスに接種して脾臓組織からハイブリドマをえる. ハイブリドマ上清をアポ型 SOD1 とアポ型 G93A タンパク質に対する反応性を ELISA 法をもちいて評価する.
- B. 変異型 SOD1 特異認識抗体 C4F6 クローンの ELISA 結果.
- C. C4F6 クローンの特異性の検定. 野生型 (WT), 数種類の変異 SOD1 (A4V, G85R, G93A) を遺伝子導入したマウス神経芽細胞腫 (Neuro2a 細胞) のライセートを a. C4F6 クローン抗体で免疫沈降し, あるいは b. そのまま変性させてヒト SOD1 に対するポリクローナル抗体でウェスタンブロットをおこなった. C4F6 クローンは変性条件, 天然条件の両者において G93A 型 SOD1 を認識し, 野生型や他の変異型を認識しない.

とを想定している. このようにモノクローナル抗体は抗原の除去のみで作用するのではない. 重要なことはミスフォールドタンパク質には異常現象を導く病原配列が存在するという点. 抗体の認識するエピトープによっては病態と無関係な部位を攻撃しても効果を示さない可能性があるという点である. 実際 Gros-Louis らの論文によれば, 変異 SOD1 を特異的に認識する別のクローンは他動免疫にもちいても無効であった. このようにモノクローナル抗体をデザインする際には抗原の決定とスクリーニング戦略が非常に重要である.

抗体をもちいた分子標的療法の展望

変異 SOD1 に対する抗体療法の作用機序について不明な点が多く, とくに天然の抗体分子が細胞外のいずれの変異タンパク質を標的としているのかについては議論の分かれるところである. しかし, 細胞外に加えた天然由来の抗体分子が, 細胞外の抗原をより効率よく攻撃することはうたがう余地がない. 近年変異 SOD1 のみならず, ハンチンチン, α シヌクレ

イン, リン酸化タウにおいてもミスフォールドタンパク質が, 変性神経細胞から放出され, 近隣の細胞に伝播することで病巣拡大がおこるというプリオノイド仮説が提唱されており⁶⁾, 細胞外の変性タンパク質を標的とした他動免疫や自動免疫は病態に基づく治療として認識されつつある. 一方, 抗体医療工学の発展はめざましく, イムグロブリンの抗原と結合する可変領域 (Fv) 配列が判明したばあい, 多くの応用が可能である. たとえば Fv の cDNA から低分子の一本鎖抗体 (single chain of Fv; scFv) の発現配列をえる. これをウイルスベクターなど哺乳細胞発現ベクターに組み込み細胞内発現抗体 (Intrabody) を作成することが可能であり, 細胞内タンパク質も治療対象となる. 自動免疫, 全長抗体や scFv をもちいた他動免疫を, 原因タンパクの化学性質や病態に応じて適切に治療戦略に取り入れ, 種差や異常タンパク質の発現レベルの問題を克服することが免疫療法の実現化には不可欠である.

文献

- 1) Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autono-

- mous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J Cell Biol* 2009;187:761-772.
- 2) Urushitani M, Sik A, Sakurai T, et al. Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2006;9:108-118.
 - 3) Urushitani M, Ezzi SA, Julien JP. Therapeutic effects of immunization with mutant superoxide dismutase in mice models of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:2495-2500.
 - 4) Okamoto Y, Shirakashi Y, Ihara M, et al. Colocalization of 14-3-3 Proteins with SOD1 in Lewy Body-Like Hyaline Inclusions in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Cases and the Animal Model. *PLoS One* 2011;6:e20427.
 - 5) Gros-Louis F, Soucy G, Larivière R, et al. Intracerebroventricular infusion of monoclonal antibody or its derived Fab fragment against misfolded forms of SOD1 mutant delays mortality in a mouse model of ALS. *J Neurochem* 2010;113:1188-1199.
 - 6) Aguzzi A, Rajendran L. The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* 2009;64:783-790.

Abstract

Antibody therapy targeting ALS-linked misfolded protein

Makoto Urushitani, M.D., Ph.D.

Molecular Neuroscience Research Center, Shiga University of Medical Science

Accumulating evidence indicates that the pathogenesis of Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is tightly linked to misfolding a key protein. Antibody therapy aims to eliminate or compete with the pathogenic proteins, through either passive or active immunization. We and others have generated several monoclonal antibodies (MAbs) which recognize only misfolded SOD1, but not the wild-type. Several MAbs are reported to delay the progression of mutant SOD1 Tg mice by the intraventricular application, which is mediated by different pathways. The determination of the pathogenic domain is crucial to acquire the effect of MAb therapy. Single chain of fragment of variance of IgG (scFv) is attracting emerging attention due to its broad application, in which intracellular proteins can be targeted by Intrabody or the modification of MAb with translocation signals.

(*Clin Neurol* 2011;51:1162-1164)

Key words: Amyotrophic lateral sclerosis, Antibody therapy, mutant SOD1, protein misfolding
