

アルツハイマー病における線維状 A β ₁₋₄₂ タンパクの毒性発現と抗体作製

日大生産工（院）○青木正樹

日大生産工 小森谷友絵 神野英毅

1. 緒言

現在、日本は男女の平均年齢が 82.1 歳という世界的に長寿先進国であり、平均寿命が増加している。これに伴いアルツハイマー病患者も年々増加しており、迅速な対応が求められている。アルツハイマー病において主原因とされる β -amyloid タンパク(A β)は、40～42 個のアミノ酸残基から構成されており、脳内に蓄積し、脳神経細胞が死滅し、毒性を発現する。その結果、脳の萎縮や老人斑などの形として現れる。このようなメカニズムによりアルツハイマー病が発症するが、これに対し、決定的な治療薬は開発されておらず、診断においても大掛かりな検査を行う必要があり、早期発見へのひとつの障害となっている。これらを請け、本研究では、迅速かつ簡易な診断薬の確立を目的とし、A β ₁₋₄₂ の毒性試験およびモノクローナル抗体の作製を目指した。

2. 実験方法

2-1, SDS-PAGE による分子量確認

本研究において使用する線維状 A β ₁₋₄₂ は、*In Vitro* において、比較的凝集反応を起こしやすい。しかし、実験 2-3 及び 2-4 において凝集していることは適切ではない。そのため、SDS-Page を用いて、分子量及び凝集していないことを確認した。

2-2, ラット細胞褐色種細胞培養及び分化

まず、凍結保存されたラット細胞褐色種細胞(PC-12)細胞を再培養するにあたり、37℃の

恒温槽で振とうしながら解凍し、コーニングチューブへ培地(10 ml)とともに加え、遠心分離(1000 rpm, 3 min)を行った。その後、上清を捨て、培地 5 ml を加え、90 mm 接着細胞用シャーレへ播き、70%コンフルエントの状態に至るまで培養した。次に、培地へ NGF(50 ng/ml)を添加し、2 日間インキュベートし、神経細胞への分化を促した¹⁾。

2-3, 毒性試験

毒性試験において、ラット胎児海馬神経細胞と PC-12 細胞を用いた。まず、Poly-L-Lysine コートをした 96 Well Plate へ各細胞を 200 μ l/well(5000～7500 個/ml)で播き、各 well へ線維状 A β ₁₋₄₂ を 50 μ l 加え、2 日間インキュベートした。次に、蛍光色素を吸着させ、Cellomics Array Scan(Thermo Scientific 社)にて生細胞の蛍光強度を計測し、毒性の強さ及び有無の確認を行った²⁾。

2-4, 免疫及び抗体産生確認

抗原(線維状 A β ₁₋₄₂)をアジュバント溶液と混合し、メスの Bald/c マウスに対して、2 週間間隔で計 5 回皮下免疫を施した。その際、抗原とアジュバントの混合比率は 1:1 となるように混合した。免疫したマウス血清の抗体価を ELISA 法にて測定する際、抗原には線維状 A β ₁₋₄₂、一次抗体はマウス尻尾採血、二次抗体は抗マウス IgG ヒツジ HRP 標識を用いて、波長 492 nm における吸光度を測定した。

Study on preparing antibody for toxicity of phibril A β ₁₋₄₂ protein on Alzheimer's disease

Masaki AOKI, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

3. 結果及び考察

3-1, SDS-PAGE による分子量確認

単量体 $A\beta_{1-42}$ の分子量は約 4500 であり、それを基に SDS-PAGE を用いて分子量の確認を行った結果、3.5 kDa と 6.5 kDa の間にバンドが現れた。(Fig. 1)このことから、分子量は 3500~6500 の間で存在しており、凝集していないことがわかる。

3-2, ラット細胞褐色種細胞培養及び分化

ラット細胞褐色種細胞(PC-12)を起こし、培養を行ったところ約 3 日間で 70%コンフルエントの状態となった。次に、培地へ NGF(50ng/ml)を添加し、3 日間インキュベートした結果、神経細胞へ分化したことが確認された。(Fig. 2-a)

3-4, 毒性試験

Cellomics Array Scan(Thermo Scientific 社)を用いて、生細胞の蛍光強度を測定し、毒性の強さを推測した。この結果、何も添加していないものに対して、低い値を示している。これは、死滅した細胞が各濃度ともに多く存在しており、線維状 $A\beta_{1-42}$ による毒性によるものであると示唆される。(Fig. 3)

また、今回の結果より、100 μ g/ml~10 μ g/ml において濃度と毒性の強さに関係性がみられたが、それ以下の濃度においては毒性の強さと $A\beta_{1-42}$ の濃度の間には依存性が確認されなかった。加えて、12.5 μ g/ml においては測定に失敗したものと考えられる。

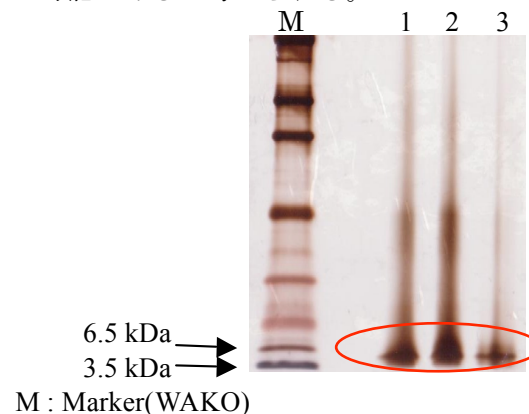
3-5, 免疫及び抗体産生確認

毒性を発現する $A\beta_{1-42}$ に対し、特異的に反応する抗体作製するため免疫を行い、ELISA 法にて抗体産生の確認を行った。その結果、サンプルは抗体価 0.109、ネガティブコントロールにおいては 0.56 となった。このことより、抗体が産生されていると推測できた。

4. 結論

線維状 $A\beta_{1-42}$ による神経細胞への毒性が確認でき、抗体の作製の有用性が確立された。

これにより、 $A\beta_{1-42}$ 抗体の作製を確立することで、迅速な臨床診断などのさまざまな応用が可能であると考えられる。



M : Marker(WAKO)
1 : 線維状 $A\beta_{1-42}$
2 : 線維状 $A\beta_{1-42}$ (調製 7 日後)
3 : 線維状 $A\beta_{1-42}$ (調製 1 カ月後)

Fig. 1 線維状 $A\beta_{1-42}$ の分子量確認



Fig. 2-a 神経細胞へ 分化した PC-12
Fig. 2-b ラット 胎児海馬神経細胞

Cellomics Array Scanによる 毒性試験

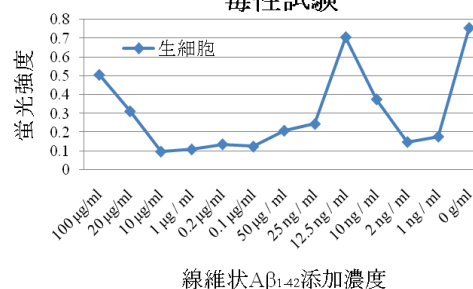


Fig. 3 死細胞及び生細胞の蛍光強度

5. 参考文献

- 1) Ko Fujita. et al Regulation of the Differentiation of PC12 Pheochromocytoma Cell, 80. 1989.127-142
- 2) Huafeng Wei et al β -Amyloid peptide-induced death of PC 12 cells and cerebellar granule cell neurons is inhibited by long-term lithium treatment, 392.2000.117-123