

アルツハイマー病における
 β -Amyloid タンパク ($A\beta$) の凝集機構およびその抗体に関する研究

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 Protein ($A\beta$) は、40~42 個のアミノ酸残基から構成されており、 $A\beta_{1-42}$ と残基数が表記されている。これらの $A\beta$ は脳内に蓄積することによって、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とされているが、現段階において、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、凝集 $A\beta_{1-42}$ のみ反応するモノクローナル抗体の作製を行い、毒性阻害を確認することを目的とする。

2. 実験方法

2-1. 凝集 $A\beta$ の調整と確認

$A\beta_{1-42}$ と $A\beta_{16-20}$ は、AnyGen より購入したものを使用した。ダルベッコ PBS へ $A\beta$ を溶解させ $A\beta_{1-42}$ 溶液と $A\beta_{16-20}$ 溶液を調製した。次に、 $A\beta_{1-42}$ に対して、 $A\beta_{16-20}$ が 10 mol 過剰となるように溶液を混合し、9 h 攪拌することによって凝集させた。作製した凝集 $A\beta$ を SDS-PAGE および Tht 法¹⁾を用いてそれらの分子量及び構造を確認した。

2-2. 細胞褐色種細胞(PC-12)の分化確認

毒性試験に使用する細胞褐色種細胞 (PC-12) は、NGF (Nerve Growth Factor) を添加することで神経細胞に似た性質をもつ、モデル神経細胞である。今回、培養した PC-12 へ NGF (1 μ g/ml) を添加し、2 日間インキュベート (37°C, 5 %CO₂) し、神経細胞へ分化を促した。分化を目視で確認した後、RT-PCR および Neurite Outgrowth Kits (Cellomics 社) を用いて細胞核、樹状突起へ免疫染色法を行い、神経細胞への分化を確認した。

2-3. 神経細胞における凝集 $A\beta$ の毒性試験

96 Well Plate (Poly-L-Lysine coated) へ PC-12 を 150 μ l/well (3000 個/ml) で播き、各 well へ NGF (1 μ g/ml) を添加し、2 日間インキュベート (37°C, 5 %CO₂) した。次に、各 well へ凝集 $A\beta$ (100~1 ng/ml) およびモノマー $A\beta_{16-20}$ を 50 μ l 加え、12 h インキュベートした²⁾。これに蛍光色素 (Vital Dye, Dead Dye) を吸着させ、Array Scan (Cellomics 社) にて蛍光強度を測定し、観察を行った。

2-4. 免疫及び抗体産生確認

マウスに対して抗原 (凝集 $A\beta_{1-42}$) をアジュバント溶液と混合し、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 にて測定する際、抗原には $A\beta_{1-42}$ 、一次抗体はマウス尾部採血、二次抗体は抗マウス IgG ヤギ 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 mechanism of aggregated β -Amyloid proteinin and it's preparation
of Anti-body to detect Alzheimer's disease

Masaki AOKI, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

3. 結果および考察

3-1. Aβ の分子量および凝集確認

単量体 Aβ₁₋₄₂ の分子量は約 4500 でそれを基に SDS-PAGE より、20~30 KDa の間にバンドを確認できたことから、凝集反応が起こり、分子量が約 24~25 KDa となった予測される。(Fig. 1) また、それらのサンプルに対し ThT 法を行った結果、Fig. 2 のようになり、100 μg/ml で凝集体とモノマー Aβ に顕著な蛍光強度の差が現れた。その他の濃度に関しても、微量ではあるが凝集体の蛍光強度が高い値を示した。これらを、踏まえると凝集していることが示唆された。

3-2. 細胞褐色種細胞(PC-12)の分化確認

PC-12 の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、2 日間インキュベートしたところ、神経細胞への分化を確認した。

3-3. 神経細胞における凝集 Aβ の毒性試験

凝集 Aβ を添加した PC-12 細胞 Array Scan(Cellomics 社)を用いての蛍光強度を測定した。この結果、各 Well で約 20%前後の細胞が死滅していた。このことより、凝集体 Aβ は神経細胞へ毒性を示していると考えられる。(Fig. 2)

3-4. 免疫及び抗体産生確認

毒性を発現する Aβ₁₋₄₂ に対し、特異的に反応する抗体作製するために免疫を行い、ELISA 法にて抗体価を測定した。これより、陽性反応が認められ、抗体価がネガティブコントロールと比較して 2 倍程度あり、抗体の産生を確認した。(Table . 1)

4. 結論

アルツハイマー病における主原因といわれている Aβ₁₋₄₂ は、Aβ₁₋₄₀ などと比較すると凝集しやすく、また毒性が強いとされている。今回の実験により凝集 Aβ による神経細胞への毒性が確認できた。これにより、Aβ の凝集

体は毒性を持つと考えられる。また、Aβ₁₋₄₂ を抗原とした抗体の作製を行った結果、抗体の産生が示唆された。これを作製することによって、迅速な診断薬にとどまらず治療薬にも広く応用のできるものと考えられる。

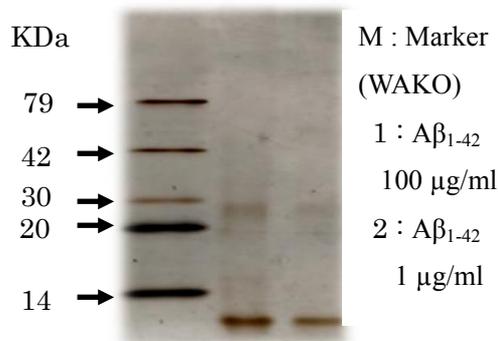


Fig. 1 SDS-PAGE による分子量確認

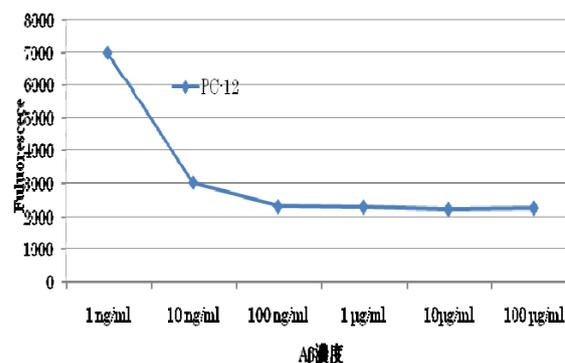


Fig. 2 Array Scan を用いた蛍光強度測定

Table . 1 Aβ の抗体価測定

	サンプル	ネガティブ
吸光度	0.56	0.109

5. 参考文献

- 1) Y Yoshiike, De-Hua chi, T Akagi, N Tanaka and A Takashima. Specific compositions of Amyloid-β peptides as the Determinant of Toxic β Aggregation. JBC 2003;278(26):23648-23655
- 2) Mercedes Balcelsa, Joseph S. Wallinsa, Elazer R, Edelmana. Amyloid beta toxicity dependent upon endothelial cell state. NEUROSCI LETTT 2008;441:319-322