ISSN 2186-5647

5-45

凝集 Amyloid Beta Protein(Aβ)$_{1-42}$ 特異的モノクローナル抗体のヒト型化に関する研究

日大生産工(院)　○新井　香子　清水　武則
日大生産工　小森谷　友絵　吉宗　一晃　神野　英毅

1. 緒言

近年、日本の老年期痴呆症患者が増加している。その主な症例として脳血管障害によるものや Alzheimer's Disease(AD)によるものがある。AD は、老年期痴呆症のうち約 60%であり、脳内で Aβ が凝集して神経細胞に付着することで老人斑となる。この老人斑が神経細胞に作用することにより神経細胞死を引き起こすといわれている。Aβ は、Aβ 前駆体タンパク質から β セクレターゼ、γ セクレターゼによって切断されることで産生され、γ セクレターゼの切断位置の違いから 40 残基の Aβ$_{1-40}$ と 42 残基の Aβ$_{1-42}$ がある。AD 患者の脳において Aβ$_{1-42}$ は、Aβ 存在率のうち約 70%を占めている [1)]。

現在、AD の治療薬として対症療法用のものがあるが、この治療薬では、AD の進行を遅らせるだけで根本的な治療は出来ない。そこで、原因物質に特異的に結合する抗体を用いた抗体医療が注目されており、実用化に向けた研究が行われている。マウスで作製したモノクローナル抗体を抗体医薬としてそのままヒトに投与した場合、抗マウス抗体はマウスの抗体であるため、ヒトの体内に入ると異物と認識されて効果が弱まる。また、動物種が異なるため、拒絶反応や炎症反応が起こる可能性があり人体に安全な医薬品とはいえない。さらに抗体が誘導されて不活化され除去されてしまうことがある。抗体医薬作製の一つの方法として抗体のヒト型化がある。ヒト型抗体には抗体の一部をヒト型化したキメラ抗体と、抗体の超可変領域以外ほぼすべてをヒト型にしたヒト化抗体がある。いずれの抗体も可変領域以外の遺伝子をヒト型遺伝子に変換することにより作製可能であるが、遺伝子を操作するため高い技術と知識が必要になる。

本研究では、抗体医薬の作製を目指しファージディスプレイ法を用いてアルツハイマー病のヒト化抗体を作製することを目的とする。

2. 実験方法

2.1 凝集 Aβ$_{1-42}$(Aβ$_{1-42}$+Aβ$_{16-20}$)の作製

Aβ$_{1-42}$ 1 mg を超純水 500 μl に溶解し、10 mol 過剰の Aβ$_{16-20}$ 加えた。さらに超純水と同量のダルベッコ PBS(-)を加え 37℃約 16 時間撹拌した [2)]。Aβ$_{16-20}$ を 10 mol 過剰加えていないものである線維状 Aβ$_{1-42}$ (Aβ$_{1-42}$ のみ)も作製した。作製した凝集 Aβ$_{1-42}$ の確認をするため SDS-PAGE と原子間力顕微鏡(AFM)の画像解析を行った。

2.2 モノクローナル抗体の作製

作製した凝集 Aβ$_{1-42}$ を抗原としてマウスに免疫を行い、脾臓細胞を摘出しミエローマ細胞と細胞融合させてハイブリドーマを作製した。その後、スクリーニングし培養することでモノクローナル抗体産生細胞を樹立した。

2.3 モノクローナル抗体の評価

作製した抗体確認のため ELISA 法を行った。固相抗原として 2.1 で作製した Aβ$_{16-20}$ 添加凝集 Aβ$_{1-42}$ と Aβ$_{16-20}$ 非添加 Aβ$_{1-42}$ を用いた。1 次抗体は作製したモノクローナル抗体を用い、2 次抗体として Peroxidase 標識抗体(SIGMA)を用いた。

Study on Humanization of Specific Monoclonal Antibody of Aggregation Amyloid Beta Protein(Aβ)$_{1-42}$

Kyoko ARAI, Takenori SHIMIZU, Tomoe KOMORIYA, Kazuaki YOSHIMUNE and Hideki KOHNO

抗原は 1 μg/ ml-1 ng/ ml の濃度に調製し、1 次抗体は 2 μg/ ml で行った。基質液を入れた後にマイクロプレートリーダーを用いて吸光度(492 nm)を測定した。

2.4 樹立細胞からの cDNA の作製

上記より作製した樹立細胞 4 Clone(31-2、37-11、45-6、51-2)の培養を行い、RNA 抽出キット(QIAGEN)を用いてそれぞれの RNA の抽出を行った。

抽出した RNA を逆転写キット(TOYOBO)で逆転写を行い、DNA 量の測定を行った。

3. 結果・考察

凝集 $A\beta_{1-42}$ の SDS-PAGE の結果、凝集 $A\beta_{1-42}$ はバンドが 20 kDa と 6.5 kDa 付近に見られた。したがって、凝集 $A\beta_{1-42}$ のバンドが 20 kDa 付近のものであることが分かり、凝集体が確認できた。

また、AFM で凝集 $A\beta_{1-42}$ と線維状 $A\beta_{1-42}$ の画像解析の結果を Fig. 1 に示した。画像から、$A\beta_{1-42}$ のみでは、0 時間で多少丸い凝集体が見られるが、16 時間後には線維状を形成していることがわかる。一方、$A\beta_{16-20}$ を加えた凝集 $A\beta_{1-42}$ では 0 時間では線維状と比較して丸く凝集したものがあまり見られないが、16 時間後には多くの丸いオリゴマー状の凝集体が確認できた。

SDS-PAGE および AFM で確認した凝集 $A\beta_{1-42}$ を抗原として免疫しマウスモノクローナル抗体を作製して、ELISA によって抗体の反応性を抗原抗体反応を利用して測定した結果、反応性の見られた 4 Clone において、凝集 $A\beta_{1-42}$ と線維状 $A\beta_{1-42}$ での濃度との相関性が見られた。Fig. 2 は、Clone No. 37-11 の結果を示した。抗原濃度 500 ng/ ml において、凝集 $A\beta_{1-42}$ の吸光度が約 1.3 であり、線維状 $A\beta_{1-42}$ では約 0.1 であった。また、直前に調製した線維状 $A\beta_{1-42}$ では約 0.3 であった。したがって、凝集 $A\beta_{1-42}$ の吸光度を 100 としたとき、交差反応性が線維状 $A\beta_{1-42}$ において約 5%であった。

ELISA で反応性が高かった樹立細胞 4 Clone を培養し、細胞が 7 割程度コンフルエントになったところで RNA を抽出し、逆転写後に DNA 測定した結果を Table 1 に示した。4 Clone とも DNA 量が約 210 μg/ ml であることが検出できたため、樹立細胞から cDNA が作製できたことが確認できた。

4. 参考文献

1) Takashi Saito et al, *nature neuroscience*, **14**, 1023-1032 (2011)

2) Minako Hoshi et al, *PANS*, **100**, 6370-6375 (2003)

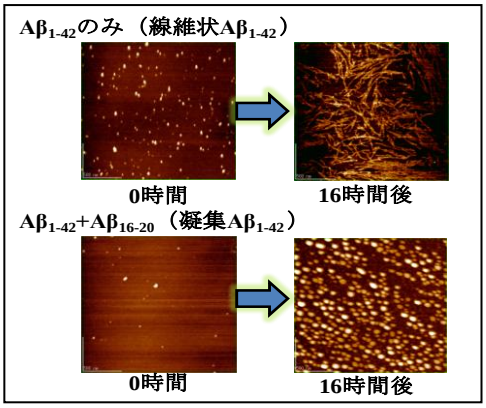

Fig. 1　AFM の結果

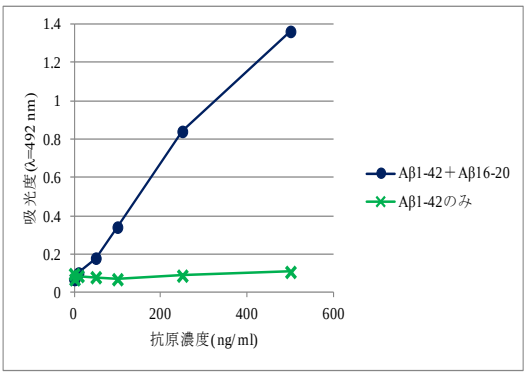

Fig. 2　Clone No. 37-11 の ELISA の結果

Table 1　DNA 濃度

	DNA濃度(μg/ ml)
Clone No.31-2	209.03
Clone No.37-11	209.79
Clone No.45-6	220.63
Clone No.51-2	214.77