

血清中 A β 複合体の検出によるアルツハイマー病診断の試み

日大生産工(院) ○古山 裕亮 日大生産工 吉宗一晃
星葉大 神野 英毅

1 まえがき

近年, 社会の高齢化に伴い Alzheimer's disease (AD) 患者の数が増えてきている。AD とは認知症の一種であり, 記憶や思考能力が徐々に障害され日常生活に支障をきたすといわれている。ADの病理的特徴として脳内に現れる老人斑がある。この老人斑は Amyloid-beta protein (A β) と呼ばれるタンパク質によって形成され, 神経細胞に対して高い毒性を示す。A β は脳内で Amyloid precursor protein と呼ばれる前駆体から二種類の酵素によって切り出されて生産される。またA β には酵素切り出し位置の違いによりアミノ酸残基が40のA β 40とアミノ酸残基が42のA β 42が存在する。一般的にはA β 42の方が凝集性は高く神経細胞に対して高い毒性を示すが, 生体内ではA β 40の方がA β 42よりも10倍ほど多く存在しているといわれている。近年ではA β をバイオマーカーとしてADを診断する研究が注目されており¹⁾, 髄液中のA β を検出することで行うADの診断が有効とされている。しかし髄液は腰椎穿刺により採取されるため, AD患者が最も多いとされる高齢者にとっては高リスクであり, 現在では使用されていない。一方で血液を採取して行う診断方法は簡便ではあるが, 脳で生産されたA β は脳のホメオスタシスを維持している脳血液関門の影響により血液中には数100pM程度しか存在していないといわれているため²⁾血液診断は困難であるといわれている。生体内のA β は apolipo protein E (ApoE) と結合していることが報告されており, これは脳内で生産されたA β がApoEと複合体を形成することで脳血液関門のlipoprotein receptor related protein-1 (LRP-1) を介して血液中に輸送されるためといわれている³⁾。ApoE は apolipo protein の一つであり, 主な働きは脂質と結合しlipo protein となることで脂質を可溶化させ輸送することが知られている。ApoE は 299 のアミノ酸からなる 34KDa のタンパク質で ApoE2, ApoE3, ApoE4 の3つのアイソフォームが存在し, この

3つのアイソフォームはそれぞれの対立遺伝子 ϵ 2 ~ 4 の遺伝子産物である。ApoE は脳内でアストロサイトなどにより生産された後, ABCA1 により脂質化されリポタンパク質となり細胞外空間にてアイソフォーム依存性 (E2 > E3 > E4) でA β に結合する。

当研究室ではA β の凝集体と特異的に反応するモノクローナル抗体を作成し *in vitro* でA β 凝集体の検出を行ってきた。この作成したモノクローナル抗体を使用して死後確定診断された392検体のヒト血清中A β 凝集体を検出したところ, 患者間, 患者と健常者の間で有意な差を確認することができた。しかし, 当研究室の抗体は15nM以上のA β 凝集体しか検出できないことが確認されている。そこで我々はA β との結合が報告されている ApoE に注目し, A β -ApoE 複合体の形成を試みた。また, 作成したモノクローナル抗体を用いてA β 凝集体とA β -ApoE 複合体の検出を行い比較した。

2 実験方法および測定方法

A β 凝集体の調製

本実験で使用したA β 凝集体は市販の合成ペプチドA β を1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol で可溶化させ, 4°Cでインキュベートした後, 再度37°Cで3時間インキュベートし, その後凍結乾燥させた。この操作を2度繰り返した後リン酸緩衝生理食塩水 : PBS を加えて作成した。

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

本実験ではA β 凝集体の検出を ELISA によって行った。ELISA は目的の抗原を、特異抗体で捕捉するとともに、抗体に結合した酵素の反応を利用して検出・定量する方法である。本実験では抗原を作成した A β 凝集体とし, 抗体は作成したモノクローナル抗体 77-3 を使用した。測定は 492nmで吸光度を測定した。

Serum diagnosis of Alzheimer's disease by monoclonal antibody against A β aggregates

Hiroaki FURUYAMA, Kazuaki YOSHIMUNE and Hideki KOUNO

4 実験結果および検討

血清中の物質とA β の複合体の再構成を行うため、作成した A β 42 凝集体とA β 42凝集体に血清を加えたものの吸光度の値を比較した。実験の結果、血清を加えた場合、加えていないA β 42 凝集体よりも吸光度の値が低下したことが確認された (Fig.1)。

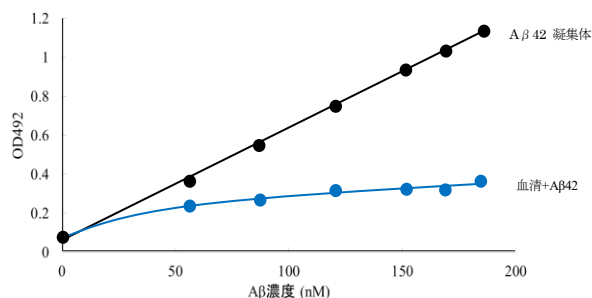


Fig.1 血清を加えた場合の影響

次に ApoE3, ApoE4, 脂質化ApoE3 (HDL)とA β 42凝集体との複合体形成を行い、吸光度の値を比較した。実験の結果、ApoE3や HDLを加えた方が吸光度の値が上昇している事が確認できた。またA β 42凝集体では 15nM以上の濃度で検出が行えたのに対し、ApoE3複合体、HDL複合体では 2nMの濃度を検出することができた (Fig.2)。

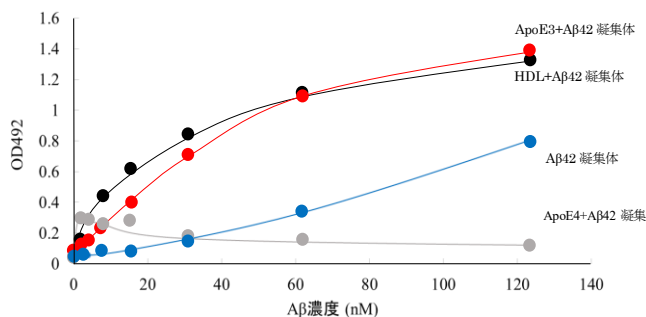


Fig.2 ApoEを加えた場合の影響

次にA β 42 凝集体と同じ方法で作成したA β 40 凝集体とHDLによる複合体の吸光度の値を比較した。実験の結果、A β 40 についてもHDLと複合体を形成した方が吸光度の値を上昇させたことが確認できた (Fig.3)。この実験で得た結果とA β 42凝集体を使用した際の結果を比較したが吸光度の上昇は同様に確認することができた。しかし、A β 42凝集体では15nM の濃度を検出することができたが、A β 40凝集体では 30nM 以下の濃度を検出することができなかった。また、HDLと複合体を形成した場合には 2nM の濃度を検出することができた。

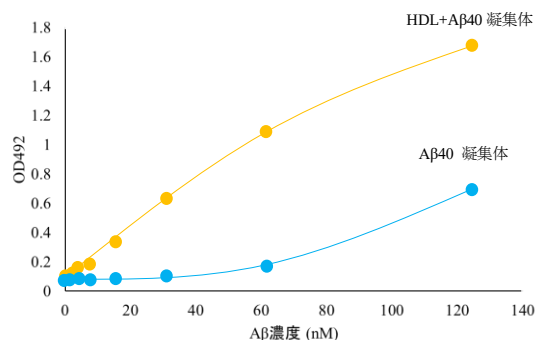


Fig.3 A β 40 凝集体と HDL の影響

次にA β 42モノマーと HDLの複合体形成を行うため、A β 42のアミノ酸26残基をアシル化したiso peptide A β 42 を使用して実験を行った。このA β は半減期約一分で自発的に天然型A β 42に変換される⁴⁾。実験の結果、この場合もHDLと複合体を形成した方が吸光度の値を上昇させた (Fig.4)。また、A β 42モノマーを使用した場合 4nMの濃度を検出することができた。

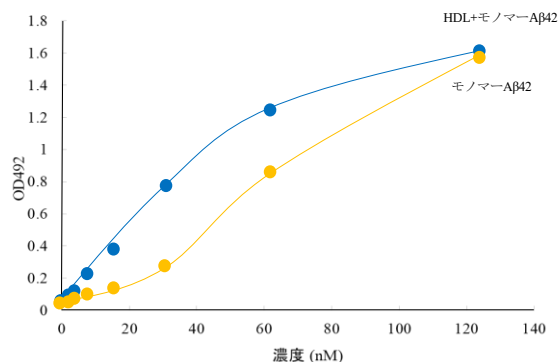


Fig.4 モノマーA β 42 と HDL の影響

5 まとめ

実験の結果、A β はApoE3, HDLと複合体を形成することで吸光度の値を上昇させることが確認された。これはA β のみで凝集体を形成するのではなく、凝集体の中心部をApoE3に置き換えることで検出されるA β を増やしたと考えられる。また、今回の結果では 2nMのA β を検出したが、血液中A β は数100pMであるといわれている。今後はさらに低濃度のA β を検出するべく複合体形成の再検討を行う必要がある。

「参考文献」

- 1) N. El, Kadmiri, et al., *Neuroscience*, (2017).
- 2) Lewczuk, P, et al., *Journal of Alzheimer's disease*, 43, 191, (2015).
- 3) J, M. Basak, et al., *Neuron*, 63, 303, (2009).
- 4) Y, Shoma, et al., *Tetrahedron letters*, 45, 5968, (2004).