

血清成分とアミロイド β との複合体の測定

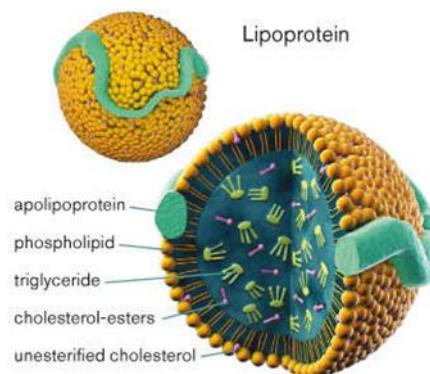
日大生産工(院) ○吉濱恵亮 日大生産工 吉宗一晃

1. 緒言

日本では高齢化が進み、それに伴い認知症を有する高齢者の割合が増加し、医療や社会の大きな問題となっている。認知症を引き起こす疾患の代表例として、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) があげられる。AD の病理学特徴は Amyloid β (A β) と呼ばれるタンパク質が脳内で凝集した老人斑の形成である。老人斑の形成によって、認知機能が低下し、記憶障害や言語障害などが引き起こされる。A β は症状があらわれる 15 から 20 年も前から脳内に沈着⁽¹⁾していることから A β をバイオマーカーとした早期診断への応用の標的となりうる。AD の診断法として髄液中の A β 濃度の測定や、脳に蓄積した A β を可視化する PET 診断が確立されているが、患者への負担が大きく検査料が高価であるという問題点がある。AD 早期発見のためには、血液中の A β をバイオマーカーとした低リスク低コストな診断方法の開発が求められる。

脳の周辺にある髄液と血液は血液脳関門で隔てられている。血液脳関門を通過できるのは脳細胞のエネルギー源である糖や脂質、特定の amino 酸である。通常、脳脊髄液中の A β は単独で血液脳関門を通過できない。しかし、髄液由来か不明だが A β は血液中に存在する。血液中に存在する A β の濃度は 100 pM 程度と非常に低濃度のため⁽²⁾、A β をバイオマーカーとした AD の血液診断を実用化するためには 100 pM の A β を検出しなくてはならない。また、血液中の A β は単独では存在せずリポタンパク質やアルブミンなどと結合し複合体を形成しているといわれている⁽³⁾。

リポタンパク質は生体内で生成された水に不溶性脂質を他の組織や器官に運搬する複合体粒子である。リポタンパク質の構造を Fig.1 に示す。リポタンパク質はアポタンパク質、リン脂質、トリグリセリド、コレステロールエステル、遊離コレステロールで構成されている。加えて、リポタンパク質は組成と大きさによりキロミクロン、超高密度リポタンパク質 (VLDL)、高密度リポタンパク質 (LDL)、低密度リポタンパク質 (HDL) に分類することができる。一般に HDL はリン脂質が約 50 %、コレステロールが約 3 %、トリグリセリドが約 3 % である。LDL はリン脂質が約 20 %、コレステロールが約 45 %、トリグリセリドが約 20 % で構成されている。粒子サイズはキロミクロ

Fig.1 リポタンパク質の構造⁽⁴⁾

ン、VLDL、LDL、HDL の順に小さい。

アポタンパク質はリポタンパク質と結合す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。アポタンパク質の 1 種である apolipoprotein E (ApoE) は ApoE2、ApoE3、ApoE4 の 3 つのアイソフォームが存在する。ApoE3 は健常者に多く、ApoE4 は AD の危険因子として知られ、AD の発症に大きく関係している。近年、ApoE は脳内で生産された A β と複合体を形成し血液脳関門の lipoprotein receptor related protein-1 (LRP-1) を介して血液中に輸送されていると報告がある⁽⁵⁾。

アルブミンは血液中に存在する脂質やホルモン、薬物などと結合して輸送するタンパク質である。リポタンパク質やアルブミンの複合体を検出する事ができれば血液診断に応用できる。そこで本実験ではリポタンパク質とアルブミンに特異的に結合する抗体を探索することを目的とした。実験試料として HDL、LDL、ApoE3、ApoE4、アルブミンの複合体を形成させ測定を行った。この抗体は A β 凝集体を抗原としてマウスに免疫させたモノクローナル抗体であり、A β 凝集体表面の立体的なエピトープを認識する。本実験は A β 凝集体の異なる部位を認識する抗体 37-11, 72-10, 73-1, 75-2, 77-3, 78-6, 79-3, 82-5, 83-3 を用いた。

2. 実験方法および測定方法

Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

ELISA はプレートに目的の抗原を固相化し酵素標識した抗体を反応させ、洗浄後プレートに残る酵素活性を検出する方法である。

Assay of complex of amyloid β and a blood serum component

Keisuke YOSHIHAMA and Kazuaki YOSHIMUNE

Aβ 複合体の調製

複合体を形成させるため PBS で希釈した HDL (0.4 mg/ml)、LDL (1.02 mg/ml)、ApoE3 (0.1 mg/ml)、ApoE4 (0.1 mg/ml)、アルブミン (45 mg/ml) に Aβ を添加し 4℃ で 20 時間静置した。その後、抗原として複合体を 96 well プレートに 100 μl/well 添加した。その後、HRP 標識抗体 37-11, 72-10, 73-1, 75-2, 77-3, 78-6, 79-3, 82-5, 83-3 を用いた ELISA により検出を行った。

3. 実験結果

抗体 77-3 を用いて HDL、LDL、ApoE3、ApoE4、アルブミン複合体 (終濃度 50 nM) の測定結果を Fig. 1 に示す。

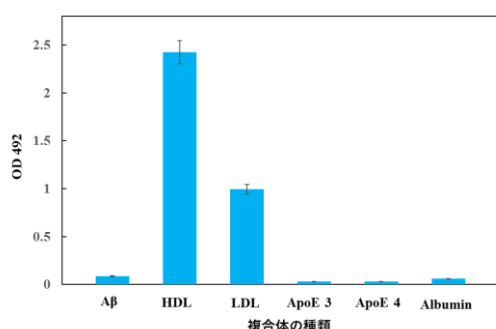


Fig.1 各複合体における吸光度の比較

Fig. 1 より HDL 複合体に対して反応性を示すことが分かった。LDL 複合体は反応性を示したが、HDL 複合体と比べると値は小さかった。ApoE3、Apo4、アルブミン複合体では抗体と Aβ が反応せず検出する事ができなかった。

次に HDL 複合体 (終濃度 1nM) における抗体の反応性を確かめるために抗体 37-11, 72-10, 73-1, 75-2, 77-3, 78-6, 79-3, 82-5, 83-3 を用いて測定を行った。測定結果を Fig.2 に示す。

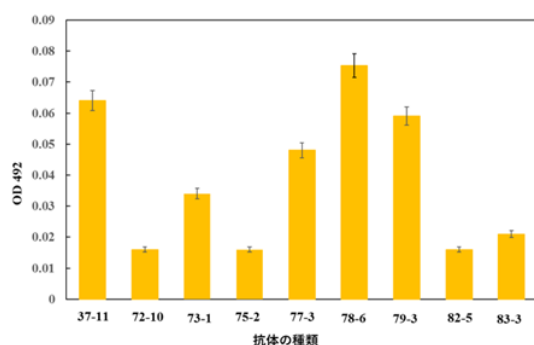


Fig. 2 HDL 複合体に対する各抗体における反応性の比較

Fig. 2 より HDL 複合体に対して抗体 78-6 が他の抗体と比べて高い反応性を示した。

上記の結果 Fig.1, 2 を通して本研究室が作製したモノクローナル抗体は Aβ とリポタンパク質の複合体に特異的に反応する抗体だと示唆された。

4. 考察

Fig.1 より本研究室が用いた抗体が HDL 複合体に反応した理由は抗体が認識する立体的エピトープが形成されたためであると考えられる。HDL 複合体の概略図を Fig. 3 に示す。HDL の共存により Aβ が凝集する過程で抗体が認識できるエピトープが形成されたと予想される。HDL 複合体と LDL 複合体において値に差が出た理由は HDL と LDL における組成と大きさの違いが影響していると考えられる。これらの違いが複合体のエピトープ形成に関係している可能性が考えられる。血液中で複合体を形成しているといわれている ApoE4、アルブミンが、検出できない理由は抗体が認識するエピトープが形成されていないことが考えられる。

Fig. 2 の結果より、抗体 78-6 を用いることで血液中濃度に近い複合体の検出に利用できる可能性があることがわかった。

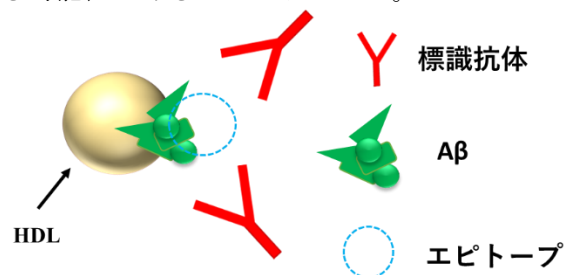


Fig. 3 HDL 複合体の概略図

5. まとめ

本研究室が開発したモノクローナル抗体を用いることにより、血液中濃度に近い複合体を検出できる可能性があることがわかった。今後はさらに低濃度の Aβ を検出できるように実験条件の検討を行っていく。

参考文献

- (1) Bateman, R. *et al. Dominantly Inherited Alzheimer Network.* **367**, 795-804 (2012).
- (2) Lei, J. *et al. Biomedical Research.* **28**, 6823-6828 (2017).
- (3) Cummings, J. *et al. Alzheimer Dement.* **7**, e13-e44 (2011).
- (4) コスモ・バイオ株式会社 HP より引用
- (5) Basak, J. *et al. Neuron.* **63**, 287-303 (2009).