

生命・生物工学に基づく健康と疾患の研究グループ

アルツハイマー病における Immunoassay による $A\beta_{1-42}$ の検出法の研究

神野 英毅 (応用分子化学科)

1. はじめに

本研究は、第一グループの生命・生物工学に基づく健康と疾患の研究グループの 1-1. 生命体の構成における重要プロセスである DNA-RNA 情報による発現タンパク質の健常時あるいは疾患時の差の究明を目的とした研究である。昨年度までは、アルツハイマー病因子 ApoE4 の検出を目的とし、DNA の定量方法の検討を行った。本年度は、アルツハイマー病における Amyloid beta protein₁₋₄₂ をターゲットとし、その定量を行うため、検出方法の検討を行ったので報告する。

2. 緒言

現在、わが国の 65 歳以上の老年人口が全人口に占める割合は 16 %であるが、西暦 2050 年には先進国の中では、イタリアとともに 30 %を超えると見込まれている。このように平均寿命が延びたことによる認知症患者の増加が懸念され始めている。「認知性老人」は厚生省の調査によると、1990 年で約 100 万人、2002 年で 150 万人となっており、2050 年には、400 万人を超える可能性があると予測されている。また、認知症では、介護の問題が挙げられ、認知症患者本人だけでなく、家族や親戚などの負担が大きな問題となる。さらに肉体的、精神的な負担だけでなく、介護にかかる費用など経済的負担の問題も生じることが予想され、認知症患者を持つ家庭は、今後ますます苦痛を強いられることが考えられる。このような状況の中で、認知症の早期発見、早期治療が求められており、全世界で認知症に関する研究が行われている。

アルツハイマー病とは、1906 年にドイツの

神経病理学者 A. Alzheimer によって最初に学会発表され、1907 年にその抄録が刊行された疾患である。その主な病理変化として老人斑と神経原線維変化があげられる。老人斑は、発症の早期から認められ、その主要構成成分は Amyloid beta protein($A\beta$)₁₋₄₂ である。 $A\beta$ は、脳内で産生されるタンパクであり、 $A\beta$ 前駆体(APP)から産生される。通常、脳内で産生される $A\beta_{1-42}$ は、線維状であり、アミノ酸 42 残基で 1 つの構造をなしている。健常人でも $A\beta_{1-42}$ は産生されるが、蓄積されない。アルツハイマー病患者ではこの蓄積された $A\beta_{1-42}$ が脳内で何らかの作用により、いくつかの $A\beta_{1-42}$ が集合して、凝集することが考えられている。凝集した $A\beta_{1-42}$ タンパクは、脳内で蓄積し、老人斑となる。脳内で蓄積した $A\beta_{1-42}$ タンパクは、毒性を惹起し、神経細胞を死滅させると考えられている。神経細胞は、脳内の海馬の中に存在し、記憶などの働きをつかさどる。神経細胞が死滅した結果、シナプスからシナプスへの情報伝達が困難となり、情報が伝達されず、記憶障害などの認知症を引き起こすと考えられている。また、AD 患者における $A\beta_{1-42}$ の構造は、毒性の低い線維状のものが集合した凝集体であると考えられている。

本研究では、血液中の凝集した $A\beta_{1-42}$ を検出することを目指し、早期発見による診断薬の開発および治療への応用を目的とした。そのため、ポリクローナル抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体を用いて、感作磁性試薬を作製し、その反応性をルミパルス法を用いて検討した。

3. 実験方法

3-1. 凝集 A β_{1-42} の作製

使用した A β_{1-42} は、ペプチドを修飾することにより合成した。2.0 mg/ml~2 ng/ml の A β_{1-42} 溶液 250 μ l を調製し、277 K で 30 分間インキュベートした。その後、それぞれの溶液を 2 倍希釈して 1.0 mg/ml~1 ng/ml に調製し、反応促進性を持つ A β_{16-20} をそれぞれ 10 モル過剰に加え、約 9 時間攪拌させた(277 K)²⁾。凝集前と凝集後の分子量を比較するためにそれぞれの A β_{1-42} を超遠心分析装置 (分子管相互作用解析システム ProteomeLab XL-1) を用いて測定した³⁾。また、凝集 A β_{1-42} の形状を調べるために原子間力顕微鏡(AFM)を用いて観察を行った。

3-2. ラット胎児海馬初代培養による A β_{1-42} の毒性試験

毒性試験では、はじめに、ラットの胎児脳より海馬部分を摘出し、10 % FCS を含んだ MEM 培地に入れ、メッシュ上で単細胞化し、96 ウェルプレート上で初代培養を行った⁴⁾。3-1 で作製した各濃度の凝集 A β_{1-42} および線維状 A β_{1-42} の毒性を調べるために、それぞれの A β_{1-42} 溶液を 50 μ l ずつ添加し、FACLS 法、および蛍光顕微鏡 (ハイコンテンツスクリーニングシステム Arrayscan VTI HCS Reader) を用いて死細胞数をカウントした。

3-3. Immunoassay 法による A β_{1-42} の測定

3-3-1. 抗 A β_{1-42} ポリクローナル抗体作製

抗 A β_{1-42} ポリクローナル抗体は、ウサギに A β_{1-42} を免疫し、得られた抗血清から Protein A アフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。その後、ELISA 法により抗体力価の確認を行った。

3-3-2. 感作ラテックス試薬の作製

濃度 10 (w/v) % で保存されているカルボキシル化ポリスチレンラテックスを容量 10 ml のポリプロピレン共重合体遠沈管に 0.1 ml 分取し、pH 5.6、0.05 M MES 緩衝液を 1.9 ml 加え、濃度 0.5 % とし、粒子洗浄のため遠心

分離(16,000 rpm, 277 K, 20 min)した。洗浄後粒子は同じ MES 緩衝液で調製した 20 mg/ml の WSC 溶液に懸濁し、MES 緩衝液で調製した 50 mg/ml の NHS 緩衝液を 0.23 ml 加え、298 K で 30 min 攪拌しラテックス表面のカルボキシル基を活性化させた。活性化後 MES 緩衝液で洗浄し、同じ MES 緩衝液 1.0 ml に懸濁した。これに 23.2 mg/ml に調製したアルギニン溶液 2.0 ml をスパーサーとして加え、310 K で 30 min 攪拌し結合させた。その後、2 回遠心分離(16,000 rpm, 277 K, 20 min)し、再び WSC 溶液および NHS 緩衝液によりカルボキシル基を活性化させた。これに濃度調製した抗 A β_{1-42} 抗体溶液を加え、310 K で 30 min 攪拌し結合させた。結合後遠心分離(16,000 rpm, 277 K, 20 min)し、上清と沈殿に分けた。沈殿は、同じ MES 緩衝液 2.0 ml に懸濁し、粒子洗浄のため 1 回遠心分離(16,000 rpm, 277 K, 20 min)を行った。遠心分離後同じ MES 緩衝液 1.0 ml に懸濁し、1% dn BSA を 1.0 ml 加え 298 K で 30 min 攪拌し、ラテックス粒子表面の抗 A β_{1-42} 抗体未結合部位のブロッキングを行った。ブロッキング後、pH 8.2、0.1 M Tris-HCl 緩衝液に懸濁し、未反応活性化カルボキシル基を加水分解した。加水分解後粒子洗浄のため同じ Tris-HCl 緩衝液に懸濁して 2 回遠心分離(16,000 rpm, 277 K, 20 min)を行った。最終的に Tris-HCl 緩衝液 2 ml に懸濁し 0.5%(w/v)にしたものをポリクローナル抗 A β_{1-42} 抗体化学結合ラテックス試薬とした。抗原との反応性を調べるために LP1A-S500 を用いて測定を行った。

3-3-3. 感作磁性試薬の作製

0.34 (w/w) %カルボキシ修飾磁性粒子に WSC 溶液と NHS 緩衝液を加え、298 K で 30 min 攪拌し、表面粒子のカルボキシル基を活性化させた。活性化後、MES 緩衝液で洗浄し、同じ MES 緩衝液 1.0 ml に懸濁した。これに濃度調整した抗 A β_{1-42} 抗体溶液を加え、310 K で 30 min 攪拌し、結合させた。結合後 2 回遠

心分離 (13,000 rpm, 277 K, 7 min) し、上清と沈殿に分けた。遠心分離後、MES 緩衝液 1.0 ml に懸濁しブロッキング溶液である 0.5% BSA 1.0 ml を加え、310 K で 30 min 攪拌し、磁性粒子表面の抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体未結合部位のブロッキングを行った。ブロッキング後、pH 8.2、0.1 M Tris-HCl 緩衝液に懸濁し、未反応活性化カルボキシル基を加水分解した。加水分解後粒子洗浄のため同じ Tris-HCl 緩衝液に懸濁して 2 回遠心分離(16,000 rpm, 277 K, 20 min)を行った。

3-3-1 で作製したポリクローナル抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体をペプシンで処理することにより $F(ab')_2$ 抗体を作製した。その後、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を行い、アルカリホスファターゼを結合させ、標識抗体とした。再びゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を行い、上記で作製した磁性試薬との反応性を検討するためルミパルス f により凝集 $A\beta_{1-42}$ の測定を行った。

4. 結果および考察

4-1. 超遠心解析結果および AFM 測定結果

実験 1 で凝集させた $A\beta_{1-42}$ を超遠心分析装置で解析したところ分子量が約 130,000 Da となった。この解析結果を Fig. 1 に示す。このことから実験 1 で行った反応により凝集 $A\beta_{1-42}$ が生成されたと考えられる。また、AFM 測定結果では、凝集前の粒径が約 100 nm であり、凝集後の粒径が約 300 nm であることが確認された。これらの結果から、凝集反応が行われたことにより粒径が増加したと考えられる。

4-2. ラット胎児海馬初代培養による $A\beta_{1-42}$ 毒性試験

蛍光顕微鏡 Arrayscan を用いて死細胞率を算出した結果、凝集 $A\beta_{1-42}$ の濃度の上昇とともに死細胞率も上昇していることが確認された。また、低濃度側の一部において死細胞数の割合の上昇が見られた。このことから、濃度による毒性の特異性があるということ

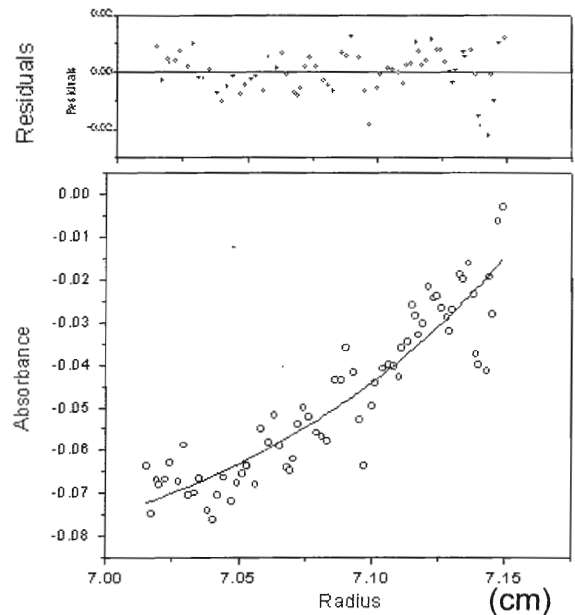


Fig.1 Relation between Cell radius and Absorbance in Ultra centrifugal analytical

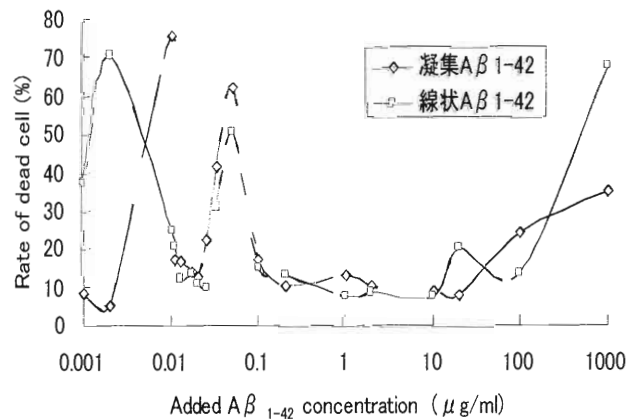


Fig. 2 Relation between Added $A\beta_{1-42}$ and Rate of death cell in Arrayscan

が考えられる。

4-3. ELISA による $A\beta_{1-42}$ の検出

ポリクローナル抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体をアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。その結果を Fig. 3 に示す。グラフから 350 min 付近にピークが現れた。この部分を回収し、ELISA によりポリクローナル抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体の確認を行った。その結果、吸光度は 1.0531 となり、抗原との反応が確認された。よってこのピークを抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体溶液として次の操作を行った。

4-4. LPIA-S500 による $A\beta_{1-42}$ 測定結果

ポリクローナル抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体化学結合ラテックス試薬を作製し、LPIA-S500 により測定を行った。抗体量、スペーサーの有無、ラテックス濃度を検討し、ラテックス試薬の反応性を評価した。そのグラフを Fig. 4 に示す。この結果より、わずかではあるが抗原濃度との相関性が見られた。しかし、血中レベルの濃度には達していないと考えられ、ルミパルス f などの CLEIA 法による Immunoassay を行う必要があると考えられる。

3-4. ルミパルス f による磁性粒子の評価

$A\beta_{1-42}$ 測定の高感度化を行うためにルミパルス f による測定を行った。ポリクローナル抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体および実験方法 3.3 で作製した磁性粒子の濃度検討を行った。その結果、抗体の最終濃度 $67 \mu\text{g/ml}$ 、カルボキシ修飾磁性粒子 $0.034 (\text{w/w}) \%$ の条件で最適な反応を示すことが確認された。その測定結果を Fig. 5 に示す。これより、低濃度での発光との相関性が見られ、抗原抗体反応による反応性が示唆された。しかし、直線性に欠けることから、非特異的な反応が多少起こってしまったと考えられる。

5. 結論

超遠心分析および毒性試験の結果から凝集 $A\beta_{1-42}$ が生成されることが考えられる。また、LPIA-S500 およびルミパルス f による測定結果より、ポリクローナル抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体と抗原である凝集 $A\beta_{1-42}$ との反応性が示唆された。

【参考文献】

- 1) 涌谷 陽介ら：アルツハイマー病の疫学, 脳の科学(2000), 21-26.
- 2) Minako hoshi, *et al* : PNAS. 100 (2002), 6370-6375.
- 3) JACOB LEBOWITZ, *et al* : Protein Science. 11(2002), 2067-2079.
- 4) Bankar, G. A. Cowan, W. M. : Brain Res. 126(1977), 397-425.

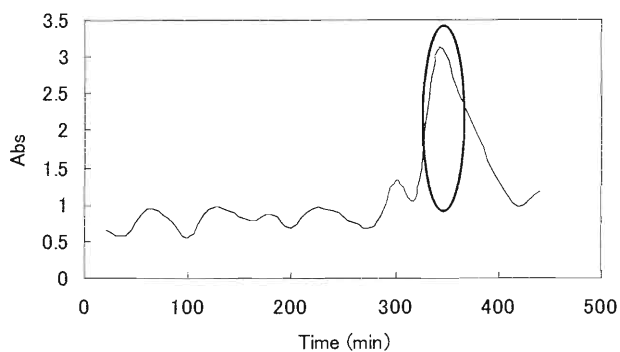


Fig. 3 Relation between Time and Absorbance in affinity chromatogram of antibody

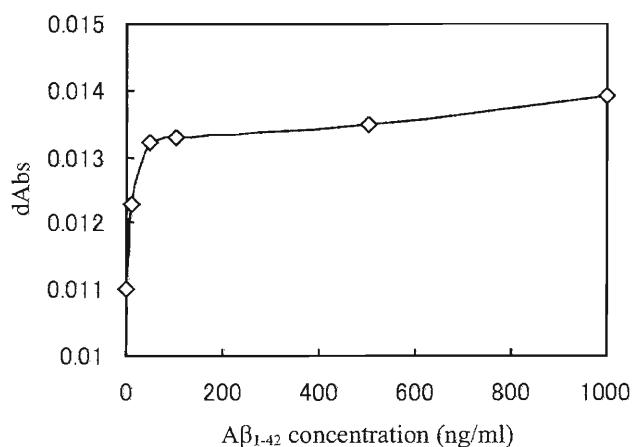


Fig. 4 Reactivity of reagent for $A\beta_{1-42}$ with LPIA-S500

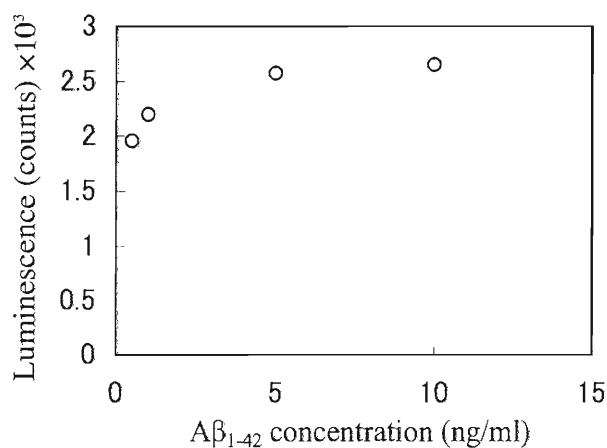


Fig. 5 Reactivity of reagent for $A\beta_{1-42}$ with Lumipulse f