

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

日大生産工 (院) ○清水 武則

日大生産工 吉宗 一晃 小森谷 友絵 神野 英毅

【緒言】

現在、わが国の 65 歳以上の老年人口は、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。認知症は厚労省の調査によると、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。

Alzheimer's disease (AD) の主要な特徴は老人斑と神経原線維変化である。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 ($A\beta$) である。脳内においては $A\beta$ の沈着、神経細胞の脱落、神経原線維変化の順で現れることから近年、 $A\beta$ を主原因としたアミロイドカスケード説に基づいてさまざまな研究が進められている。 $A\beta$ は、 $A\beta$ タンパク前駆体から β および γ セクレターゼが働くことにより脳内で生成され、主にアミノ酸 40 残基からなる $A\beta_{1-40}$ 、アミノ酸 42 残基からなる $A\beta_{1-42}$ が産生される。特に $A\beta_{1-42}$ は細胞障害性の高いタンパク質であり、毒性を惹起することが知られている。AD 患者における $A\beta_{1-42}$ の構造は、毒性の低い monomer が集合した凝集体であると考えられている。我々は $A\beta_{16-20}$ の添加により形成される $A\beta_{1-42}$ の凝集体を作製し、0.22 μm 以上の凝集体 large oval aggregate (LOA) および 0.22 μm 以下の凝集体 amorphous に分離した。 $A\beta_{16-20}$ は β シート構造と結合し、fibril 形成を阻害する作用があるため、 $A\beta_{16-20}$ 無添加において $A\beta_{1-42}$ は fibril 構造を形成する。本研究では LOA に対するモノクローナル抗体を作製し、その特異性を ELISA により確認した。

【実験方法】

1. 凝集体 $A\beta_{1-42}$ の作製¹⁾

使用した合成 $A\beta_{1-42}$ は、2.0 mg/ml の $A\beta_{1-42}$ 溶液 500 μl に調製され、4°C で 30 分間インキュベートされた。その溶液をダルベッコ PBS

により 1.0 mg/ml に調製し、fibril 凝集体の形成を阻害する $A\beta_{16-20}$ を 2.2 mM 加え、約 16 時間攪拌させることにより凝集 $A\beta_{1-42}$ を作製した (37°C、7 rpm)。その後、分子量により、0.22 μm 、1000 kDa、300 kDa、100 kDa、50 kDa、10 kDa フィルターを用いて濾過し、0.22 μm フィルター以上の凝集体を LOA とした²⁾。また、対象として $A\beta_{16-20}$ 無添加の条件で凝集 $A\beta_{1-42}$ と同様に fibril $A\beta_{1-42}$ を作製した。その凝集を確認するため thioflavin T (ThT) 法、原子間力顕微鏡 (AFM) により解析した。

2. ThT 法

$A\beta_{1-42}$ の凝集および fibril 形成の確認を行うため、ThT を用いて蛍光強度変化による構造解析を行った。 $A\beta_{16-20}$ 添加および無添加の $A\beta_{1-42}$ 溶液 1 mg/ml をそれぞれ 96 ウェルプレートに撒いた。ThT の終濃度を 10 μM とし、マイクロプレートリーダーで測定を行った (37°C、12 hour)。測定は 1 hour 毎に行い、励起波長 444 nm、吸収波長 485 nm の条件で行われた³⁾。

3. モノクローナル $A\beta_{1-42}$ 抗体の作製

上記により作製した凝集 LOA を抗原としてマウスに免疫を行い、細胞融合を行った。細胞融合後、スクリーニングを行い、限界希釈法を用いてクローニングを行った。精製した抗体を用いて ELISA によりモノクローナル抗体の確認を行った。

【結果および考察】

1. ThT 法による fibril の定量

ThT を用いて LOA、fibril $A\beta_{1-42}$ それぞれの構造解析を行った。その結果を Fig.1 に示す。 $A\beta_{16-20}$ 存在下では、LOA 構造が形成され表面の β シート構造が減少したことが考えられる。一方、 $A\beta_{16-20}$ 無添加では、蛍光強度の緩やかな増加が確認され、 β シート構造を持つ fibril

Study on Immunoassay of $A\beta_{1-42}$ in Alzheimer's disease

Takenori SHIMIZU, Kazuaki YOSHIMUNE, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

が形成されたと考えられる。

2. ELISA 法によるモノクローナル抗体の評価

LOA に対するモノクローナル抗体作製では、4 種類の有効なクローン、31-2、37-11、42-5、51-6-2 が得られ、4 種類ともに IgG1 クラス (L 鎖: κ) であった。なお、陽性の基準としてブランクの 3 倍以上吸光度が高いものを陽性としクローニングを行った。得られたモノクローナル抗体が LOA に特異的であることを確認するために、固相化抗原として LOA、fibrilA β_{1-42} 、monomerA β_{1-42} 、A β_{16-20} を用い、ELISA 法により反応性の比較を行った。その結果を Fig.2 に示す。結果より、LOA に対する反応性は濃度との相関性が確認できた。一方、fibrilA β_{1-42} 、monomerA β_{1-42} 、A β_{16-20} に対する反応性は低く、その交差反応性はいずれも 10% 以下であった。

3. フィルター分画による分子量の確認

作製したモノクローナル抗体に対する LOA のサイズを確認するために実験方法 1 で示したようにフィルター濾過を行い、フィルター分画における反応性を ELISA により評価した。その結果を Fig.3 に示す。結果より、0.22 μm 以上の凝集体にのみ反応性がある事がわかり、非常に大きいサイズに特異性を持つことが確認できた。

【結論】

AFM による画像測定の結果および ThT 法による構造解析の結果から、A β_{16-20} を添加することにより非常に大きいサイズの凝集体である LOA が作製されたことが確認できた。また、今回得られたモノクローナル抗体は、LOA に特異性を持つ抗体であることがわかった。

【参考文献】

- 1) Minako Hoshi, et al. (2002) *PNAS*. 100, 6370-6375
- 2) Takenori Shimizu, et al. (2012) *J. Biosci. Bioeng.* in press.
- 3) Yuji Yoshiike, et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 23648-23655

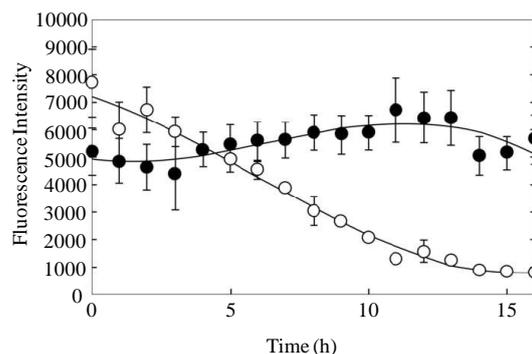


Fig. 1 Fluorescence intensities of ThT during LOA or fibril formation. A β_{1-42} (1 mg/ml) was incubated in PBS in the presence (○) and absence (●) of 2.2 mM A β_{16-20} , which resulted in the formation of LOA and fibrils, respectively.

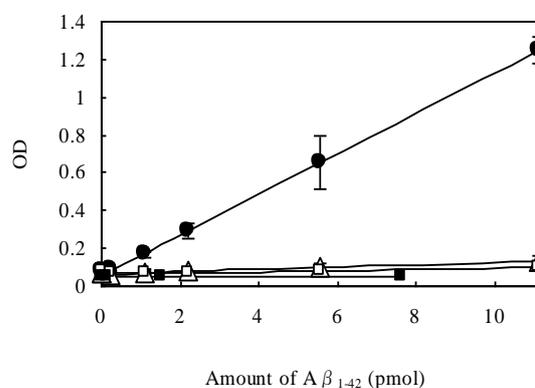


Fig. 2 Evaluation of monoclonal antibodies by ELISA. Antibodies 31-2 were used for ELISA to detect LOA (●), fibrils (△), A β_{16-20} (■), and monomer A β_{1-42} (□).

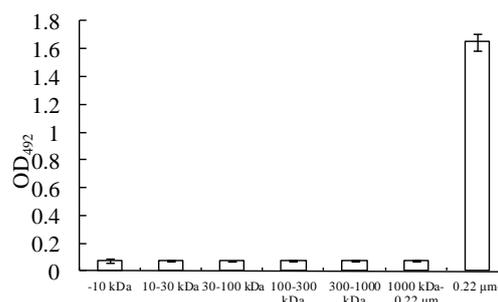


Fig. 3 Evaluation of monoclonal antibodies in the ELISA fractions. Aggregated oligomer A β_{1-42} was separated using 0.22- μm , 300-kDa, 100-kDa, 30-kDa, and 10-kDa filters. An antibody 31-2 was used for detection in the ELISA fractions. Concentration of A β_{1-42} in fraction was 22 pmol.