

凝集 $A\beta_{1-42}$ 特異的モノクローナル抗体のシーケンス解析に関する研究

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、日本の老年期認知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、老年期認知症のうち約 60%であり、脳内で Amyloid beta Protein($A\beta$)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。 $A\beta$ は、 $A\beta$ 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、切断位置より 40 残基の $A\beta_{1-40}$ と 42 残基の $A\beta_{1-42}$ がある。AD 患者の脳において $A\beta_{1-42}$ は、全 $A\beta$ のうち約 70%を占めている¹⁾。

現在、AD の治療薬は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。抗体医薬は抗体のヒト型化であり、抗体の一部をヒト型化したキメラ抗体と、抗体のほぼすべてをヒト型化したヒト化抗体とがある。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。

本研究では、凝集 $A\beta$ に特異性の高いモノクローナル抗体を作製し、ヒト型化による治療薬の検討を最終的な目的とした。

2. 実験方法

2.1 凝集 $A\beta_{1-42}$ ($A\beta_{1-42}+A\beta_{16-20}$)の作製

$A\beta_{1-42}$ 1 mg を超純水 500 μ l に溶解し、10 mol 過剰の $A\beta_{16-20}$ 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 時間攪拌し²⁾、凝集 $A\beta_{1-42}$ を作製した。また、比較として $A\beta_{16-20}$ を無添加で、同じ条件で線維状 $A\beta_{1-42}$ ($A\beta_{1-42}$ のみ)も作製した。作製した凝集 $A\beta_{1-42}$ は、原子間力顕微鏡(AFM)にて形状解析を行った。

2.2 モノクローナル抗体の作製

作製した凝集 $A\beta_{1-42}$ 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、スクリーニングとクローニングを繰り返し、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 ELISA 法にて特異性を検討した。固相抗原として 2.1 で作製した凝集 $A\beta_{1-42}$ と線維状 $A\beta_{1-42}$ 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 次抗体は、Peroxidase 標識抗体(SIGMA)を用いた。

抗原は 1 ng/ ml-1 μ g/ ml の濃度に調製し、1 次抗体は 2 μ g/ 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 RNA の抽出

上記より作製した樹立細胞 4 Clone(31-2、37-11、42-5、51-6)の培養を行い、RNA 抽出キット(QIAGEN)を用いて RNA の抽出を行った。RNA の確認のため 1%アガロースゲルで電気泳動を行った。

2.5 5'-RACE 法による可変領域遺伝子の増幅

2.4 により抽出した RNA を鋳型として、SMART-RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)を用いて逆転写反応することで、一本鎖 cDNA

Study on Sequencing of Specific Monoclonal Antibody to Aggregated Amyloid beta ($A\beta$)₁₋₄₂ Protein

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

