

## アルツハイマー病早期診断に向けたアミロイドβタンパク質凝集体の検出 —金属イオン添加による高感度化—

日大生産工(院) ○板倉 暁 日大生産工 吉宗 一晃

### 1 まえがき

アルツハイマー病(AD)は認知症の半数以上を占める代表的な脳疾患である。年齢の増加とともに発症率が高くなることから、高齢化社会の到来に伴って世界的に患者数が増加し続けている。ADに特有の変化として、老人斑と呼ばれるシミ状の構造物が脳内に形成される。老人斑はアミロイドβ(Aβ)と呼ばれるタンパク質が異常に蓄積し、凝集したものである。分子間会合により凝集体を形成したAβは分解されにくくなり、神経細胞に対して毒性を示す。脳に溜まったAβ凝集体が神経細胞死を引き起こすことで、ADを発症する原因となることが考えられる。

脳内でのAβ凝集と蓄積はADの症状が現れる20年以上も前からすでに始まっている。現在、ADの診断法として髄液中のAβを検出する髄液検査や、放射性化合物で老人斑を可視化するPET検査がある。前者は侵襲性の高さから、後者はコストの高さから広く利用されるには至っていないが、すでにAβがADのバイオマーカーとして有用であることがわかる。ADは発症初期であれば治療が容易であり、早期発見による予防と先制治療が効果的な対策である。

こうした背景から、特に期待されているのが血液中のAβをバイオマーカーとして検出する方法である。Aβは赤血球に含まれ、ADの進行度と赤血球中のAβ濃度には相関があることが示唆されている。血液検査によって患者への負担が小さく、簡便な診断法が可能になると期待できる。課題としては、血液中のAβ濃度は脊髄液中の10分の1程度であり、検出法の高感度化が必要であることがあげられる。

Aβは金属との親和性が高いアミノ酸残基を有していることから、2価の金属イオンとの結合能がある。老人斑には健常者の脳内の4倍以上の濃度の金属が含まれており、脳内の金属がAβと結合していることが考えられる。また、*in vitro*において、金属との結合は大きなAβ凝集体の形成に影響を及ぼす。特にCu<sup>2+</sup>との結合によって、Aβは球状の非晶質の凝集体を形成

しやすくなる<sup>1)</sup>。この性質は金属との結合によってAβどうしの規則正しい結合が起こりにくくなるために生じると考えられる<sup>2)</sup>。

これまでに我々は、抗原抗体反応によって非晶質のAβ凝集体を検出する研究を行ってきた。我々がこれまでに作製した複数のマウスモノクローナル抗体は、モノマーのAβとは反応せず、非晶質の凝集体を形成したAβと特異的に反応する。さらにこれらの抗体は凝集体のサイズごとに異なった特異性を示す<sup>3)</sup>。こうした特異性はAβ凝集体表面の特定の立体構造を認識しているために生じていると考えられる。

我々は、Aβが金属イオンと結合し、特に非晶質の凝集体を形成しやすくなる性質に着目した研究を行う。そしてCu<sup>2+</sup>の添加によってAβ凝集体をより高感度に検出することができたので報告する。抗体77-3と抗体37-11と名付けた2つの抗体を用いたELISA(サンドイッチ法および直接吸着法)によってAβ凝集体を検出する。抗体77-3は直径50nm以上の、抗体37-11は直径220nm以上の非晶質のAβ凝集体を特異的に検出できる。抗原であるAβ凝集体にはCu<sup>2+</sup>を添加し、検出感度の変化を比較した。

### 2 実験方法および測定方法

#### ・Aβ凝集体溶液の調製

1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールでAβを溶解し、減圧乾燥器で溶媒を蒸発させた。この操作を二度繰り返して、最後に蒸留水で希釈した。調製したAβ凝集体は蒸留水、もしくは50μM CuSO<sub>4</sub>によって希釈して使用した。

#### ・ELISA

サンドイッチ法では、初めに抗体77-3を96穴プレート上に結合させた。そこにAβ凝集体溶液を加えて抗原抗体反応をさせた。その後、検出抗体として酵素で標識化した抗体37-11を加え、2つの抗体でAβ凝集体を挟み込んだ。直接吸着法では、初めにAβ凝集体を96穴プレート上に結合させ、そこに酵素で標識化した抗体37-11を加えて抗原抗体反応させた。どちらの

Detection of amyloid beta aggregates for diagnosis of early stages of Alzheimer's disease

Akira ITAKURA, Ryouko SUZUKI and Kazuaki YOSHIMUNE

方法も最後に酵素と発色基質を反応させ、吸光度測定により抗原(A $\beta$ 凝集体)を検出した。直接吸着法と比べ、サンドイッチ法は2つの抗体による検出であることから、特異性の高さが利点である。

### 3 実験結果

A $\beta$ 凝集体溶液に50 $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>を添加することで、サンドイッチELISA法では反応性が7倍程度増加した(図1)。一方、同じ抗原と標識抗体を用いている直接吸着法では反応性の増加は1.2倍程度しか認められなかった(図2)。さらに、CuSO<sub>4</sub>添加後のA $\beta$ 凝集体の形状を原子間力顕微鏡(AFM)によって観察したところ、50 $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>を加えたA $\beta$ はより大きな凝集体を形成していることが分かった(図3, 矢印)。

### 4 考察

A $\beta$ は金属と結合する際、金属との親和性が高いアミノ酸残基で配位するように結合する<sup>4)</sup>。CuSO<sub>4</sub>存在下でA $\beta$ 凝集体の抗原性が変化する原因として、A $\beta$ とCu<sup>2+</sup>が結合することで凝集体表面の構造が変化し、我々の抗体に認識されやすくなったと考えられる。また、AFMによる観察からは、Cu<sup>2+</sup>が凝集体どうしの結合にも寄与していることが予想できる。特にサンドイッチELISA法で反応性が大きく向上していることから、大きさの異なるA $\beta$ 凝集体どうしが結合して、抗体77-3と抗体37-11に同時に認識されやすくなったと考えられる。

サンドイッチELISA法は特異性の高さから、他のタンパク質が種々存在する血液中からごく少量のA $\beta$ を検出するために有効な検出法である。これまでの我々の検出系では定量性の低さが難点であったが、金属添加によってより高感度にA $\beta$ 凝集体を検出することが可能になったと考えている。

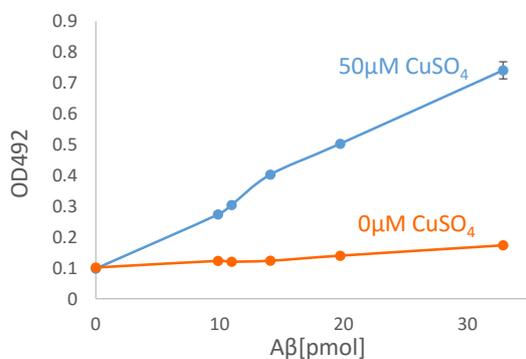


図1. Cu<sup>2+</sup>による検出感度の向上(サンドイッチELISA法)

### 5 まとめ

Cu<sup>2+</sup>の添加により、我々の検出系でA $\beta$ 凝集体をより高感度に検出することが可能となった。この新しい検出法を用いることで、これまで困難だった血中のA $\beta$ 凝集体を測定することが可能になり、ADの進行度を早期に発見できると期待できる。

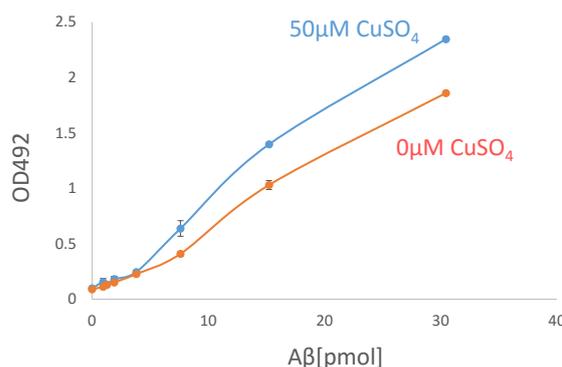


図2. Cu<sup>2+</sup>による検出感度の向上(直接吸着ELISA法)

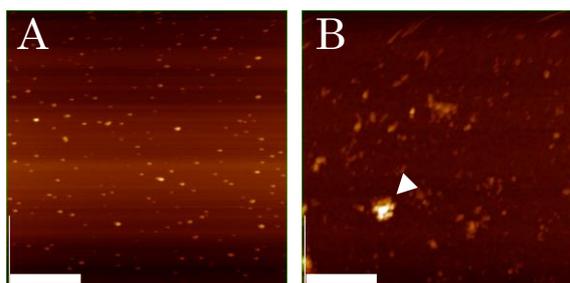


図3. Cu<sup>2+</sup>による大きなA $\beta$ 凝集体の形成 (A: 0 $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>, B: 50 $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>,スケールバーは500nm)

### 6 参考文献

- 1) Matthew Mold *et al.*, Sci Rep., 2013, 3, 1256
- 2) Francis Hane *et al.*, PLOS ONE, 2013, e59005
- 3) Shimizu T *et al.*, J. Biosci. Bioeng., 2012 115, 216-220
- 4) John H. Viles, Elsevier, 2012, 256, 2271-2284