

高比重リポタンパク質が与えるアミロイドβ凝集への影響

日大生産工(院) ○吉濱恵亮 日大生産工 吉宗一晃

1. 緒言

現在、世界では高齢化が進み、それに伴い認知症を有する高齢者の割合が増加している。世界の認知症人口は2030年までに7,470万人に増加し、2050年までに1億3,150万人に増加すると予測され、医療や社会の大きな問題となっている⁽¹⁾。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 (Aβ)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。Aβにはアミノ酸残基が40のAβ₄₀とアミノ酸残基が42のAβ₄₂が存在する。Aβ₄₂は凝集性が高く、老人斑の主成分といわれている。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。Aβ₄₂は症状があらわれる15から20年も前から脳内に沈着していることから早期診断や治療が必要である⁽²⁾。血液中に存在する高比重リポタンパク質(HDL)やHDLを構成する主要なタンパク質であるアポタンパク質(ApoA-1)がAD発症リスクを抑制することが報告されている⁽³⁾。

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。Aβ₄₂の排出は脳内にAβ₄₂が蓄積することを防ぎADの抑制に繋がるため重要である。Aβ₄₂の排出は血液脳関門(BBB)と血管周囲リンパを介して行われる。通常、脳脊髄液中のAβ₄₂は単独でBBBを横断できないがHDLとの複合体を形成し通過している⁽⁴⁾。BBBから排出されたHDLとAβ₄₂との複合体を検出する事ができれば、ADの診断や治療に向けた研究に応用できる。

リポタンパク質(lipoprotein)は生体内で生成された水に不溶な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(apolipoprotein)、リン脂質(phospholipid)、トリグリセリド(triglyceride)、コレステロールエステル(cholesterol esters)、遊離コレステロール(unesterified cholesterol)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、超低比重リポタンパク質(VLDL)、低比重リポタンパク質(LDL)、高比重リポタンパク質(HDL)に分類することができる。

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タンパク質である。apolipoprotein A-1 (ApoA-1)は肝臓と小腸で合成され、HDLを構成する主要なタン

2、ApoE 3、ApoE 4 の3つのアイソフォームが存在する。ApoE 3は健常者に多く、ApoE 4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。

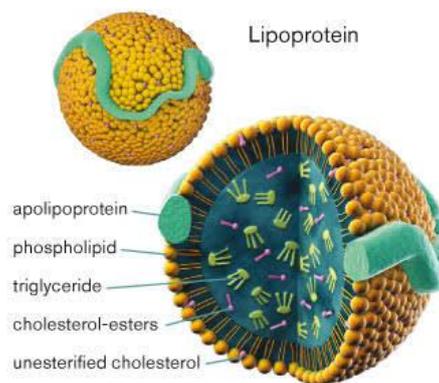


Fig.1 リポタンパク質の構造

アルブミン(Albumin)は主に肝臓で合成され血漿タンパクのうち約60%を占めており、血漿タンパクの中で最も量が多いタンパク質である。

本実験の目的はHDLがAβ₄₂凝集に与える影響を明らかにするために、HDLとAβ₄₂の複合体を形成し定量を試みた。同様の方法で、LDL、apoE 3、apoE 4、apoA-1、AlbuminとAβの複合体を形成し、HDL複合体との反応性を比較した。また、HDL複合体の凝集状態を明らかにするためにAFMによる観察を行った。

2. 実験操作

2-1 Aβ₄₂複合体の調製

本実験で使用したAβ₄₂は無水状態でモノマーであり中性水溶液中で自発的に天然のAβ₄₂となる26-O-acyl isoAβをAβ₄₂モノマーとした。Aβ₄₂凝集体は1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanolでの溶解と、凍結乾燥を2回行って作製した。複合体を形成させるためPBSで希釈したHDL(0.4 mg/ml)、LDL(0.4 mg/ml)、ApoE 3(0.1 mg/ml)、ApoE 4(0.1 mg/ml)、ApoA-1(0.1 mg/ml)、Albumin(0.1 mg/ml)にAβ₄₂を添加し4°Cで1晩静置した。その後、抗原として複合体を96 wellプレートに添加した。その後、HRP標識抗体を用いたELISAにより検出を行った。測定は492 nmで吸光度を測定した。

Effect of high density lipoprotein on amyloid β aggregation

Keisuke YOSHIHAMA and Kazuaki YOSHIMUNE

2-2 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。抗体は $A\beta$ 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、 $A\beta$ 凝集体表面の立体的なエピトープを認識する。本実験は $A\beta$ 凝集体の異なる部位を認識する抗体 77-3 を用いた。各複合体の検出下限は ELISA で測定した blank 値の標準偏差の 3 倍を加えたものとした。

2-3 原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope, AFM)

AFM は試料表面の凹凸形状の評価を行う顕微鏡である。試料をプレパラートの雲母片に添加し乾燥させ観察を行った。

3. 結果

抗体 77-3 を用いて HDL、LDL、ApoE 3、ApoE 4、ApoA-1、Albumin 複合体 ($A\beta_{42}$ 終濃度 49 nM) の測定を行った (Fig. 2)。

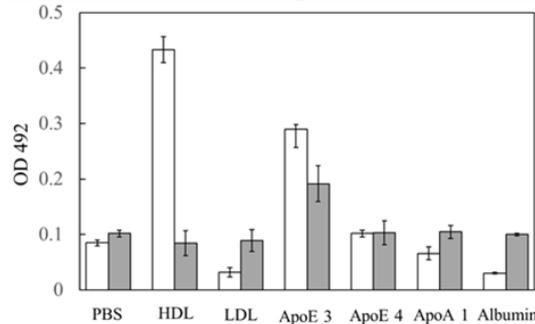


Fig. 2 抗体 77-3 を用いた各複合体における反応性の比較

(White bar: $A\beta_{42}$ モノマーを用いた複合体
Gray bar: $A\beta_{42}$ 凝集体を用いた複合体)

HDL 複合体に対して反応性を示すことが分かった LDL、ApoE 3、ApoE 4、ApoA-1、Albumin 複合体は抗体と反応性を示したが、検出限界は 49 nM であった。

次に $A\beta_{42}$ モノマーと HDL との複合体の検出限界を確かめるために $A\beta_{42}$ 濃度が 0 から 4.9 nM の範囲で測定を試みた (Fig. 3)。

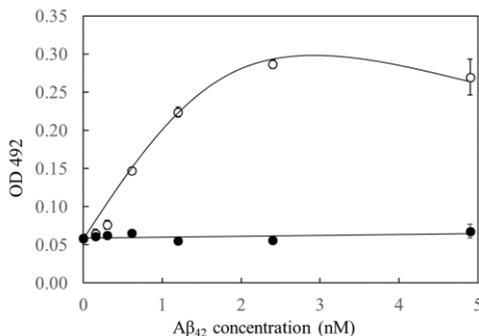


Fig. 3 $A\beta_{42}$ 複合体の抗体 77-3 を用いた検出
(Open sphere: HDL 複合体
Closed sphere: $A\beta_{42}$ モノマー)

HDL 複合体の検出限界は 380 pM であり、より低濃度の $A\beta_{42}$ と抗体が反応した。同じ測定系において $A\beta_{42}$ モノマーの検出には 49 nM 以上必要であった。 $A\beta_{42}$ 凝集体、LDL、ApoE 3、ApoE 4、ApoA-1、Albumin 複合体は抗体 77-3 が $A\beta_{42}$ と反応せず検出できなかった。

次に、HDL 複合体の形態を調べるために、AFM による観察を行った (Fig. 4)。

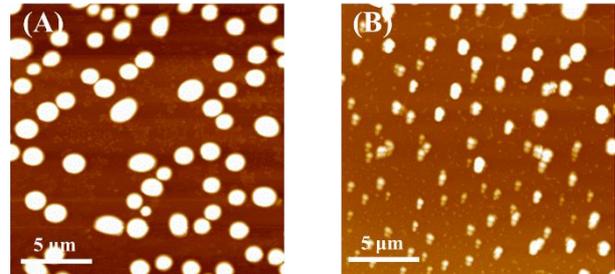


Fig. 4 AFM を用いた観察
(A) $A\beta_{42}$ モノマー (B) HDL 複合体

HDL 複合体は $A\beta_{42}$ モノマーと比較して粒子サイズが小さく、異なる凝集形態を示すことが判明した。HDL が $A\beta_{42}$ と結合し、 $A\beta_{42}$ の構造および凝集過程に影響を与えていると考えられる。用いた抗体が低濃度の $A\beta_{42}$ と反応を示した理由は $A\beta_{42}$ の構造が変化したことにより、抗体が認識できる部位が形成されたため検出できたと推測される。

4. まとめ

本研究室が作製したモノクローナル抗体は $A\beta_{42}$ と HDL の複合体に特異的に反応する抗体だと示唆された。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、低濃度の HDL 複合体を検出することができた。HDL 複合体に反応した理由は、 $A\beta_{42}$ が HDL に結合し、異なる凝集を起こし、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。また、AFM より HDL に結合した $A\beta_{42}$ の異なる凝集形態が確認できた。

今後は、HDL 複合体の生体内における存在を確かめる予定である。

5. 参考文献

- (1) P. Martin, et al., *Alzheimer's Disease International.*, 7, 2, (2015)
- (2) J. Bateman, et al., *Dominantly inherited Alzheimer network.*, 367, 795, (2012)
- (3) A. Mercheda, et al., *American Journal of Epidemiology.*, 21, 27, (2000)
- (4) R. Magro, et al., *Frontiers in neuroscience.*, 13, 419, (2019)