

コンフォメーション抗体を用いたアミロイド β 凝集抑制物質の経時的な評価

日大生産工(院) ○小堀光一, 柴崎友理, 中村桃佳, 金理英, 吉宗一晃

1. 緒論

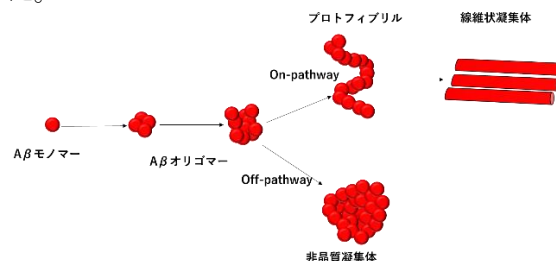
アルツハイマー病の原因とされているアミロイド β タンパク質(A β)の凝集の経時変化をA β の三次元的な構造を認識できる抗体であるコンフォメーション抗体で評価し、A β 凝集抑制物質の探索を行った。

世界的な高齢化により認知症患者の増加が予測されている。認知症患者は2019年で推定約5,700万人であると考えられている。この認知症患者数が2030年には約8,300万人、2040年には1億1,000万人になると考えられている。¹⁾認知症患者が増加することにより認知症の中でも最も割合の多いアルツハイマー病患者が増加していくことが予想される。現在はアルツハイマー病の根本的な治療法は確立されていない。そのため、アルツハイマー病の予防・治療法の確立は急務である。

アミロイド β 仮説において、アルツハイマー病の原因は脳内のA β 凝集と考えられている。A β は凝集性が高く、脳内の神経細胞に凝集・沈着し、脳内の神経細胞を死滅させる。最近ではA β モノマーが数個凝集した可溶性のA β オリゴマーが最も高い神経毒性を持つことが報告されている。可溶性のA β オリゴマーは高い凝集性を維持しており、生体内の様々なタンパク質と結合してそれらの機能を阻害することや、神経細胞を死滅させることで毒性を発揮する。また、凝集性が高いA β オリゴマーはさらに大きな非晶質A β 凝集体もしくは線維状アミロイド β 凝集体となるため、観察が非常に難しい。A β オリゴマーが大きな非晶質A β 凝集体となる経路をoff-pathwayと呼び、線維状凝集体となる経路をon-pathwayと呼ぶ(図1)。線維状凝集体は結晶性の高い凝集体であり、一度脳内に沈着してしまうと脳内での分解や脳内からの排出が困難になる。このことから、アミロイド β 仮説においてアルツハイマー病を予防・治療するには、A β をA β 凝集抑制物質で大きく凝集させないことやA β 凝集体を小型

化し、脳内から排出することが必要である。このため、A β の凝集抑制や凝集体の細分化に効果のあるつまりアルツハイマー病の予防・治療に適した物質を探索している。

A β は凝集性が高くすぐに凝集してしまうためA β の凝集を評価することは難しいが、A β 凝集体の三次元的な構造を認識できるモノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法(ELISA)によりA β 凝集体の大きさを評価した。また、ELISAでは短時間で多くの試料の測定を行えるため、多くの試料をスクリーニングする際に便利である。ELISAでの評価で効果を持つ物質による凝集予防・細分化効果は原子間力顕微鏡(AFM)で確認した。AFMでは一度に1つの試料しか測定できず、1つの試料の測定に時間がかかるものの、A β 凝集体の大きさを確実に確認できる。私の研究では、ELISAとAFMを用いてA β 凝集の経時変化を評価する方法を確立し、A β 凝集抑制物質として知られるホモタウリン²⁾を用いてこの方法を確認し、この方法を用いてA β 凝集抑制物質の探索を行った。

図1 A β の凝集経路

A β は凝集しon-pathwayに進むと線維状凝集体となり、off-pathwayに進むと非晶質凝集体となる。

2. 実験方法

2-1 A β イソペプチド

凝集性の高いA β モノマーの調製は難しいため26-O-アシルイソペプチドA β (A β イソペプチド)をA β モノマーとして用いた。このA β

Time-dependent effect of inhibitors on A β aggregation
evaluated by conformational monoclonal antibodies

Kouichi KOBORI, Yuri SHIBAZAKI, Momoka Nakamura, Riyeong KIM and
Kazuaki YOSHIMUNE

イソペプチドはジメチルスルホキシド (DMSO) 中では凝集せず、中性の水溶液中において半減期約 1 分で凝集性のあるペプチドとなり凝集を開始する。

2-2 ELISA による評価

A β モノマーを PBS もしくは試料溶液で希釈し、37°C の恒温槽に静置して凝集を開始し、30 分ごとに A β 凝集体の大きさを ELISA で確認した。恒温槽で静置した A β 凝集体試料を 96 well プレートに加え、A β 凝集体に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA で検出した。本研究では 50 nm から 220 nm の A β 凝集体と特異的に反応することがわかっている抗体 77-3 を使用した。³⁾ELISA では抗原を HRP 標識抗体で直接検出する直接 ELISA で行った。

2-3 AFM による評価

AFM の試料は 37°C で放置した A β 凝集体試料を雲母片に滴下し、減圧乾燥により短時間で乾燥させた。試料はシリカゲルを入れた密閉容器で乾燥させた。

3. 実験結果

A β 凝集の経時変化を抗体 77-3 を用いた ELISA で評価した結果、凝集開始から 90 分まで吸光度が上昇し、この時間を境に吸光度が低下した(図2)。AFM の結果、0 分での平均直径は 130 nm となり、60 分では、189 nm、180 分では、1046 nm となった(図3)。この ELISA の結果と AFM の結果から、抗体が最も反応する時間までは抗体の反応できる大きさのアミロイド β 凝集体が増えていて、抗体が最も反応する時間以降では、抗体の反応できる大きさよりも大きいアミロイド β 凝集体が増えて、抗体の反応性が低くなっていると考えられる。

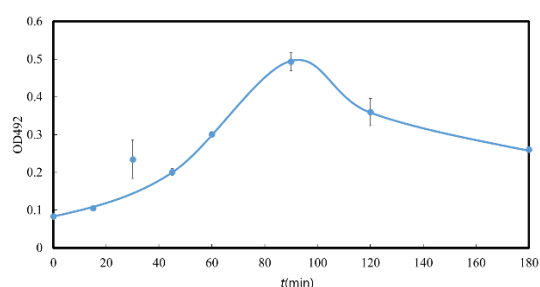


図2 抗体77-3で検出したA β 凝集の経時変化
37°CにおけるA β 凝集の経時変化を抗体77-3を用いたELISAで測定した。

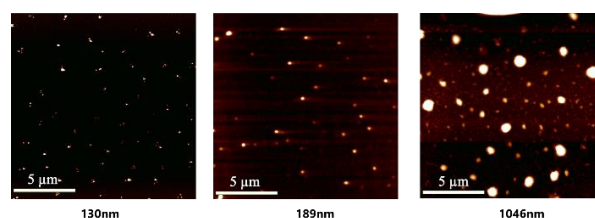


図3 AFMの結果

37°Cで放置したA β 凝集体をAFMで測定した。
左から0分、60分、180分である。

A β に10 mMホモタウリンを加えた結果、0 分の時点でA β のみの吸光度と比べ、吸光度が高く、90分で最も高くなったが、それ以降もA β のみの吸光度と比べ高い結果となった(図4)。AFMで観察した結果、ホモタウリン存在下で平均直径は0分では83.2 nm、60分では74.1 nm、180分では151 nmという結果となった。平均直径を比べると、経時的に平均直径が大きくなっていたが、A β のみのAFM像と比べて、0分、60分、180分すべてにおいて、ホモタウリンを加えた方が平均直径が小さくなっていた。この結果から、ホモタウリンはアミロイド β の凝集を抑制しており、この方法でA β 凝集抑制物質の探索を行えることが確認できた。

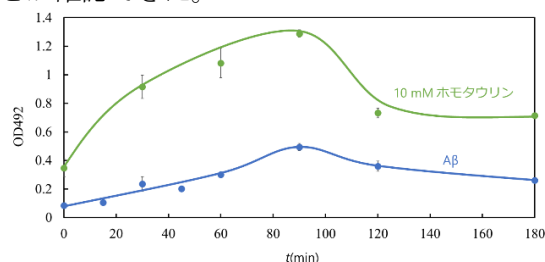


図4 ホモタウリンを加えた結果

37°Cにおける10 mMホモタウリンを加えた場合のA β 凝集の経時変化を抗体77-3を用いたELISAで測定し、A β のみの結果と比較した。

4. まとめ

アルツハイマー病の原因とされているA β の凝集をELISAにより評価することでA β 凝集抑制物質の探索を行った。今後も、ELISAを用いてA β 凝集を評価することでA β 凝集抑制物質の探索を行い、アルツハイマー病の予防・治療に貢献していきたい。

参考文献

- 1) Nichols, E. *et al.* , Lancet Public Health, **2022**, 7, e105-e125
- 2) Petr, K. *et al.* , CNS Drugs, **2017**, 31, 495-509
- 3) Shimizu, T. *et al.* , J. Biosci. Bioeng, **2012**, 115, 216-220