

低濃度界面活性剤による非晶質アミロイドβ凝集体の細分化

日大生産工(院) ○青山 奨 吉宗 一晃

1. 概要

アルツハイマー型認知症 (Alzheimer's Disease: AD)は世界中で認知症の最も一般的な原因であり、世界的な高齢化に伴い認知症患者の増加が予測されている。¹⁾日本では2023年9月にADの新たな治療薬としてレカネマブが、今年9月にドナネマブが厚生労働省の承認を受けADの根本的な治療薬・抗体医薬品として期待されている。これら2つは抗体であり、アミロイドβ(Aβ)を取り除くことで神経細胞の死滅を防ぎ病気の進行を抑える薬である。

すでに壊れてしまった神経細胞を再生させることは難しいため、認知機能障害を発症する前の軽度認知障害などの早期に投与することが重要である。AD進行後の根本的な治療法が確立していない現在、ADの予防が重要となる。

ADの発症機関に関してはまだ明らかになっていないがアミロイド仮説が有力な原因の1説とされている。脳内で生産されたAβと呼ばれるタンパク質が異常凝集し蓄積することで、脳内部において老人斑と呼ばれる円形の沈着物が現れる。その後、タウタンパク質のリン酸化が神経原線維化を誘発する。この老人斑や神経原線維化が神経細胞を委縮させることで認知機能の低下を起こさせるという一連の流れが提唱されている。

Aβはアミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein : APP) からβセクレターゼ及びγセクレターゼの2種類の酵素によって切断されて生産される。アミノ酸残基数により分類され、Aβ₄₀やAβ₄₂などがある。その中で、Aβ₄₂は特に凝集性が高く神経毒性が高いとされている。Aβ₄₂のアミノ酸配列の特徴として、疎水性のアミノ酸が多いことがあげられる。この疎水性のアミノ酸が多いことが凝集性の高さに影響していると考えられている。

水系の体内においてAβ₄₂はモノマーからオリゴマーへと変化し、無秩序に凝集した非晶質の凝集体や、プロトフィブリルを経由し規則性のあるβシート構造を持つ線維状凝集体へと凝集が進む。この時に、非晶質凝集体へと進む凝集経路をoff-pathway、線維状凝集体へと進む凝集経路をon-pathwayという。線維状凝集体は規則正しいβシート構造を持つことから、一度凝

集をしてしまうと脳内での溶解や排出が困難となる。²⁾そのため、ADの予防・治療法にはAβを大きく凝集させないことやAβ凝集体を小型化・細分化させ脳内から排出することが必要である。本研究では、可溶化した非晶質Aβ₄₂凝集体の細分化に寄与する物質の探索を行っている。

当研究室の先行研究より、界面活性剤が非晶質Aβ₄₂凝集体の表面形状に影響を与えることが明らかになった。また、界面活性剤がAβ₄₂凝集体をon-pathwayに導くことが考えられている。界面活性剤は、添加により界面に作用して性質を変化させる物質であり、1つの分子の中に親水性と親油性(疎水性)の2つの性質を持つ。

本研究では、非イオン界面活性剤であるポリソルベート20(tween20)、ポリソルベート40(Tween40)、ポリソルベート60(Tween60)、ポリソルベート80(Tween80)の4つを用いる。ポリソルベート類は、ソルビタン脂肪酸エステルにエチレンオキシドが約20分子縮合した構造を持つ。Tween20は炭素数が12のラウリン酸、Tween40は炭素数が16のパルミチン酸、Tween60は炭素数が18のステアリン酸、Tween80は炭素数が18の二重結合を1つ持つオレイン酸の構造を含む。一般的に炭素数が多い脂肪酸ほど疎水領域が長くなるため強い疎水性を示す。このことから、Tween80の方がTween20と比べて疎水性が高いとされる。

酵素免疫測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay : ELISA)は抗原抗体反応を利用し、試料溶液に含まれる目的物質を酵素反応により検出する方法である。本研究ではAβ₄₂と特異的に反応する抗体83-3を用いて検出する。抗体83-3は、直径50 nmから220 nmの非晶質Aβ₄₂凝集体と特異的に反応する抗体である。³⁾

原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope : AFM)は走査顕微鏡の一種であり、レーザー光を探針先端に照射し、その反射光を読み取る。そうすることで、探針先端と試料に作用する原子の間に働く原子間力により生じる斥力を探知し、試料表面の凹凸を測定できる。本研究では、Aβ₄₂凝集体の形状を観察する。

Disaggregation of Amorphous Amyloid β Aggregates by Low Concentrations of Surfactants

Susumu AOYAMA and Kazuaki YOSHIMUNE

2. 実験方法

2-1 可溶性非晶質A β ₄₂凝集体の作製

本実験では、ELISAおよびAFMに使用する可溶性非晶質A β ₄₂凝集体を以下のように作製した。A β ₄₂凝集体粉末0.500 mg に1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールを1000 μ L加え溶解後、1.5 mLチューブ2本に分注した。それぞれのチューブにパラフィルムをして4°Cで16時間放置した後、37°Cで3時間放置し完全に乾くまで減圧乾燥した。この操作をもう一度繰り返し、乾燥させた後、各チューブにそれぞれジメチルスルホキシドを500 μ L加え溶解して-80 °Cで冷凍保存した。

2-2 ELISAによる評価

各界面活性剤溶液に懸濁した非晶質A β ₄₂凝集体を抗原としてプレートに固定化し、小さな非晶質A β ₄₂凝集体と特異的に反応するモノクローナル抗体83-3との反応性を450 nmおよび492 nmの吸光度で測定した。抗体との反応性の変化から、A β ₄₂の表面の形状変化を評価した。

2-3 原子間力顕微鏡による観察

非晶質A β ₄₂凝集体を各界面活性剤溶液に懸濁し静置した後、雲母片上に塗布し、減圧乾燥機で乾燥させた試料を用いてA β ₄₂の形状変化を観察した。

3. 実験結果

3-1 ELISAによる評価

各濃度のそれぞれの界面活性剤溶液に非晶質A β ₄₂凝集体を懸濁し、懸濁後1日から3日までの抗体83-3との反応性をELISAにより測定した。(Fig. 1)

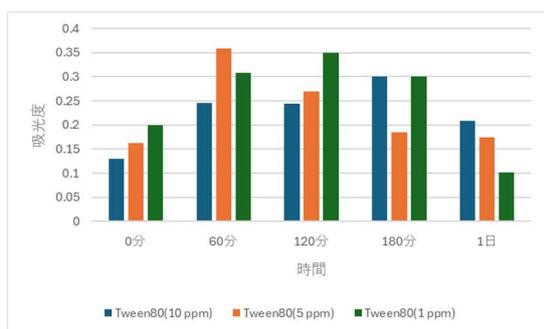


Fig. 1 ELISAの結果(Tween80)

各界面活性剤を比較した場合、有意な差は見られなかった。また、どの界面活性剤を用いた場合でも反応させて1時間から2時間の間までに吸光度が上昇し、その後低下する傾向が見られた。

3-2 AFMによる観察

各濃度のそれぞれの界面活性剤溶液に懸濁後1日から3日までのA β ₄₂凝集体の形状を、AFMを用いて観察した。(Fig. 2)

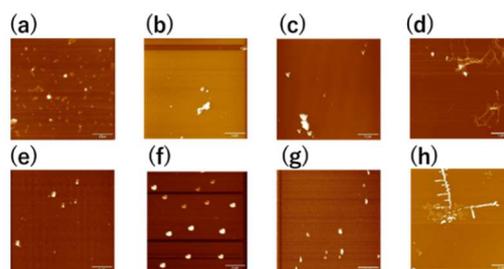


Fig. 2 A β ₄₂凝集体の形状観察

非晶質A β ₄₂凝集体を10 ppm Tween20、Tween40、Tween60、Tween80が含まれたリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で2日、3日それぞれ反応させた。(a),(b)はTween20の2日、3日、(c),(d)はTween40の2日、3日、(e),(f)はTween60の2日、3日、(g),(h)はTween80の2日、3日を示す。

界面活性剤10 ppmを加えた場合に、Tween40を加えたときに線維状の凝集体が見られた。また、他の濃度の界面活性剤を加えた場合、どの条件下においても形状に変化は見られなかった。

4. 考察・まとめ

ELISAより、低濃度の界面活性剤を加えた場合でも時間に対して吸光度に変化が見られた。このことから、低濃度の界面活性剤を加えても非晶質A β ₄₂凝集体の溶解性を高めることができ、表面上の形状変化に影響を与えることが示唆された。また、AFMより界面活性剤を加えた場合に一部の条件で線維状の構造が見られた。このことから、非晶質凝集体を細分化していることが示唆された。しかし、ELISAとAFMの結果の関連性については不透明である。今後も、界面活性剤が非晶質A β ₄₂凝集体に与える影響について探査を行っていきたい。

5. 参考文献

- 1) Weller, J., Budson, A., F1000Res. 2018, F1000Faculty Rev-1161.
- 2) Yu, X., Zheng, J., PLoS One 2011, 6, e20575.
- 3) Shimizu, T. *et al.*, Glob. J. Res. Anal. 2015, 4, 117-119.