

抗体との結合に影響を与えるアミロイド β の凝集

日大生産工(院) ○青山 奨 吉宗 一晃

1. 緒言

アルツハイマー型認知症 (Alzheimer's Disease: AD) は、世界で最も一般的な認知症の一種であり、高齢化の進行に伴って患者数のさらなる増加が懸念されている。¹⁾ 日本では2023年9月にレカネマブが、2024年9月にはドナネマブが厚生労働省により承認され、ADの根本的治療を目指す抗体医薬として大きな注目を集めている。これらの薬剤は、脳内に蓄積したアミロイド β (A β) プロトフィブリルや老人斑を除去し、神経細胞の障害を抑制することで疾患進行を遅延させることを目的としている。しかし、すでに失われた神経細胞の再生は困難であるため、軽度認知障害 (MCI) 期など、発症の早期段階で治療を開始することが極めて重要とされている。

ADの発症機構において、アミロイド仮説が広く支持されている。アミロイド前駆体タンパク質 (APP) が β セクレターゼおよび γ セクレターゼによって段階的に切断されることでA β が生成する。切断部位の違いにより、40残基からなるA β_{1-40} や42残基からなるA β_{1-42} が生成する。体内で生成されるA β はA β_{1-40} が約90%を占め、約10%がA β_{1-42} とされている。しかし、A β_{1-42} はA β_{1-40} よりも疎水性アミノ酸残基を2つ多く持つことから、疎水性がより強く凝集性および神経毒性が高い。そのため、A β_{1-42} はAD発症の原因とされているが、AD患者の脳において病的に生産されるものではなく、健康な人の脳内でも生産されている。通常は生産されてもすぐに分解され脳外へ排出されるが、生産と分解のバランスが崩れることで凝集が始まり脳内に蓄積していくことでAD発症の原因となる。

水溶液中のA β はモノマー (単量体) からオリゴマー、さらに線維状凝集体や非晶質凝集体へと構造変化を経ながら凝集が進行していく。この時、非晶質凝集体へと至る凝集経路をoff-pathway、線維状凝集体へと至る経路をon-pathwayと呼ぶ。

線維化が進むと規則的な β シート構造を形成し、脳内での分解や排出が困難となるため、凝集状態に応じた抗体の反応性を明らかにすることは、病態の理解と治療戦略の設計において極めて重要である。²⁾

本研究では、A β モノマーおよび静置条件下で形成された凝集体に対する複数の抗A β モノクローナル抗体の反応性を、酵素免疫測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) により解析した。

A β_{1-42} の凝集過程を再現する実験においては、凝集性の高いA β_{1-42} を脳内で生成直後のモノマー状態のまま維持することは困難である。O-acyl isoA β_{1-42} は非凝集性のA β_{1-42} であり、使用直前に緩衝液で中和することでA β モノマーへと変換される。このO-acyl isoA β_{1-42} を用いることでA β_{1-42} の凝集過程を再現した実験系を確立することが可能となる。

ELISAは抗原抗体反応を利用して目的分子を高感度に検出する方法であり、A β と抗体の結合特性を定量的に評価できる。本研究では、各抗体を固定化したELISAプレートに異なるA β ペプチドを添加し、抗体が認識するエピトープ領域や、モノマー・凝集体といった構造状態による結合性の差異を解析した。これにより、A β の構造変化に応じた抗体反応性の違いを明らかにすることを目的とした。

AD患者の脳において、細胞外空間に存在する大型の凝集体は、臨床診断上重要な指標である。A β の凝集形態を解析するために、これまでに様々な種類のA β を認識するモノクローナル抗体が使用されている。一部のモノクローナル抗体は、凝集体をサイズや線維形成の程度に基づいて識別することができる。これらの抗体は、集合したA β の表面に形成される特異的な抗原決定部位を認識する。本研究では、各A β を調製し、モノマーおよび凝集体に対する抗A β モノクローナル抗体を用いた。

抗原としては、A β_{1-42} 、A β_{1-16} 、A β_{25-35} の3種類のペプチドを用いた。A β_{1-42} は凝集性の高いC末端領域を含む完全長ペプチドであり、22~23番目付近のターン構造が凝集に深く関与するとされる。一方、A β_{1-16} は非凝集性のN末端領域のみからなり、抗体が結合しやすい線形構造を有する。さらにA β_{25-35} は中央の疎水性領域を含み、凝集や細胞毒性に影響を及ぼすと考えられている。これら3種類のペプチドを比較することで、抗体がA β のどの領域を特異的に認識するか、また構造変化が抗体結合に与える影響を検討した。

Amyloid β alters its epitopes by aggregation
Susumu AOYAMA and Kazuaki YOSHIMUNE

2. 実験方法

2-1 A β ₁₋₄₂モノマーの作製

本実験では、ELISAに用いるA β ₁₋₄₂モノマーとしてO-acyl isoA β ₁₋₄₂を使用した。O-acyl isoA β ₁₋₄₂をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、A β 濃度が886 μMとなるように調製した。その後、この溶液をリン酸緩衝液(PBS)などで希釈することにより、O-acyl isoA β ₁₋₄₂はA β ₁₋₄₂モノマー状態となり、その後凝集が開始する。

2-2 ELISAによる評価

各濃度に調製したA β モノマーおよび静置により形成された凝集体を抗原としてELISAプレートに固定化し、A β に特異的なモノクローナル抗体との反応性を450 nmにおける吸光度で測定した。得られた抗体反応性の変化に基づき、A β の表面構造変化を評価した。A β はそれぞれ100 nMから3 nMの間で濃度を調製し、懸濁直後、3時間、24時間の3条件において37°Cで静置し、反応の有無を確認した。

3. 実験結果

各濃度のA β モノマーを懸濁し、懸濁直後、3時間後、24時間後における各モノクローナル抗体との反応性を、ELISAを用いて時間経過および濃度依存性の観点から比較・評価した。

まず、A β ₁₋₄₂を用いた結果では、3時間静置後に多くの抗体で反応性の上昇が認められ、24時間静置後には多くの抗体で反応性が低下した。これらの結果は、凝集の進行により一時的に認識可能な抗原決定部位が増加し、その後さらに凝集が進行したことと、認識可能な部位が減少したことを示唆している。

A β ₁₋₁₆を用いた実験では、懸濁直後時点において多くの抗体でA β ₁₋₄₂よりも高い反応性が認められた。3時間および24時間静置後の結果では、反応性の変動はわずかであり、明確な変化は観察されなかった。

一方、A β ₂₅₋₃₅では、0時間から24時間の範囲において全体的に反応性が低く、濃度依存的または時間経過による明確な変化も認められなかった。

統いて、各結果を時間経過に沿ってまとめたグラフを作成した。縦軸は吸光度、横軸は各モノマーおよび時間経過を表しており、A β 濃度は100 nMとし、抗体79-3を用いて比較を行った。(Fig. 1)

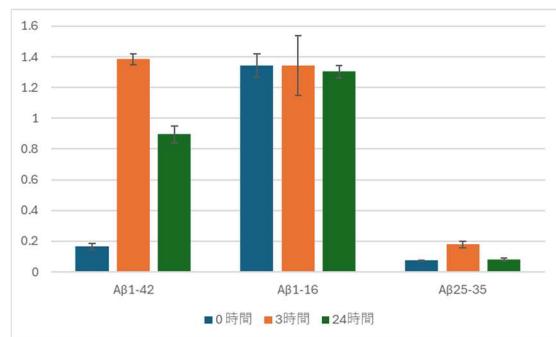


Fig. 1 時間経過に沿ってまとめたグラフ

左から順に、A β ₁₋₄₂、A β ₁₋₁₆、A β ₂₅₋₃₅を示す。各色は時間経過を示しており、青は懸濁直後、橙は3時間後、緑は24時間後における反応の有無を表している。

A β ₁₋₄₂では、時間の経過に伴い反応性が一度上昇した後、低下する傾向が確認された。これは、凝集過程の中間段階において抗体が認識しやすい構造が一時的に露出する一方で、凝集が進行するにつれて分子が大きくなり、規則的な構造により抗体が結合できる部位が減少したためと考えられる。A β ₁₋₁₆では大きな変化は認められず、凝集や構造変化が進行しないことが示唆された。A β ₂₅₋₃₅においても時間依存的な変化は小さく、反応性は低いまま推移した。これは、A β ₂₅₋₃₅が抗体と結合しにくい疎水性領域を含む配列であることが原因と考えられる。これらの結果から、A β の配列や二次構造の違いが抗体との反応性に大きな影響を及ぼすことが示唆された。

4. 考察・まとめ

A β ₁₋₄₂では時間経過に伴い抗体反応性が一時的に上昇した後に低下する結果が得られ、凝集に伴う構造変化が示唆された。一方、A β ₁₋₁₆およびA β ₂₅₋₃₅では大きな変化は認められず、A β の配列や二次構造の違いが抗体反応性に影響することが明らかとなった。

5. 参考文献

- 1) Weller, J., Budson, A., F1000Res. 2018, F1000 Faculty Rev-1161.
- 2) Yu, X., Zheng, J., PLoS One 2011, 6, e20575.