

## 論文の内容の要旨

氏名：清水 武 則

博士の専攻分野の名称：博士（工学）

論文題名：アルツハイマー病診断のための  $A\beta_{1-42}$  凝集体の免疫学的評価に関する研究

本論文の構成は、第1章 本研究の背景と目的、第2章  $A\beta_{1-42}$  凝集体の作製とその形状評価および細胞毒性試験、第3章 各種  $A\beta_{1-42}$  凝集体に対するモノクローナル抗体の作製と反応特異性の検討、第4章 化学発光基質およびサンドウィッチELISAを用いた感度と特異性の高い検出法の検討、第5章 総括から成る。以下に各章の概要を記す。

第1章では、緒論としてアルツハイマー病の背景および本研究の目的について述べた。アルツハイマー病は、1905年にドイツの精神科医 A.アルツハイマー博士が初めて報告した痴呆症状であり、特徴的な脳細胞の減少と脳内構造を伴う疾患である。近年アルツハイマー病患者は、社会の高齢化に伴い増加している。アルツハイマー病の治療薬はいくつか知られているが、病気の進行を多少遅らせる対処療法であり、現状根本的な治療法はない。従って中心となっている心理的・社会的な治療のために、早期発見が重要であり、診断法の開発が必要となる。現在の一般的な診断法は心理テストや画像検査である。アルツハイマー病の原因と考えられているタンパク質の一つに Amyloid beta protein ( $A\beta$ )がある。 $A\beta$ は、脳内で生成されるタンパク質であり、 $A\beta$  前駆体から  $\gamma$  および  $\beta$ -セクレターゼにより切断され生成される。生成された  $A\beta$  は、切断部位の違いにより主にアミノ酸残基 40 の  $A\beta_{1-40}$ 、42 の  $A\beta_{1-42}$  となるが、脳内での生成割合は、 $A\beta_{1-40}$  が約 9 割であり  $A\beta_{1-42}$  が約 1 割である。凝集性は、 $A\beta_{1-42}$  のほうが非常に高く、また神経細胞に対する毒性も高いことが知られている。これまでに抗体を用いて髄液中や血中の  $A\beta_{1-42}$  凝集体を検出する研究がなされているが、凝集体のさまざまな形状やサイズを見分けるモノクローナル抗体はまだ得られていない。本論文は、 $A\beta_{1-42}$  凝集体を免疫学的手法により、その形状および凝集過程を評価することを目的とする。まず、様々な形態の  $A\beta_{1-42}$  凝集体の生成法を検討し、それらの凝集体の形状とサイズを分析した。さらにそれらの  $A\beta_{1-42}$  凝集体に対するモノクローナル抗体を作製し反応特異性について検討し、高感度化を検討した。このような抗原か抗体の作製、高感度検出までの一貫した研究によりアルツハイマー病診断への応用を目指した。

第2章では、 $A\beta_{1-42}$  の多様な凝集体である aggregate  $A\beta_{1-42}$ 、fibril  $A\beta_{1-42}$ 、可溶化  $A\beta_{1-42}$  を生成し、さらには可溶化  $A\beta_{1-42}$  から monomer  $A\beta_{1-42}$  を調製した。aggregate  $A\beta_{1-42}$  は、超純水:ダルベッコ PBS, 1:1 で希釈した  $A\beta_{1-42}$  (未処理  $A\beta_{1-42}$ ) に、凝集促進作用を持つ  $A\beta_{16-20}$  を添加し、37°C で 16 時間攪拌することにより作製した。この aggregate  $A\beta_{1-42}$  を 0.22  $\mu\text{m}$  フィルターによりろ過し、残渣を large oval aggregate (LOA) とし、0.22  $\mu\text{m}$  フィルター通過分を amorphous  $A\beta_{1-42}$  とし、これをさらに分子量に従い分画した。また、未処理  $A\beta_{1-42}$  に  $A\beta_{16-20}$  を添加せずに 37°C、16 時間インキュベートすることにより fibril  $A\beta_{1-42}$  を作製した。一方、 $A\beta_{1-42}$  を 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol に溶解し、4 °C で 16 時間保温後凍結乾燥して超純水に溶解し、可溶化  $A\beta_{1-42}$  溶液を調整した。可溶化  $A\beta_{1-42}$  溶液も 0.22  $\mu\text{m}$  フィルターによりろ過し、残渣と通過画分に分け、さらに通過画分を分子量に従い分画した。monomer  $A\beta_{1-42}$  は、可溶化  $A\beta_{1-42}$  溶液を 1000 倍希釈して超音波処理を行うことによって得られた。それらの  $A\beta_{1-42}$  の表面形状およびサイズを原子間力顕微鏡(AFM)により画像解析した。また、Thioflavin T との反応性を蛍光強度により評価したところ、aggregate  $A\beta_{1-42}$  および fibril  $A\beta_{1-42}$  の凝集過程における  $\beta$  シート構造形成が確認できた。aggregate  $A\beta_{1-42}$ 、fibril  $A\beta_{1-42}$  の初代培養神経細胞に対する毒性試験を行った結果、fibril  $A\beta_{1-42}$  に比べ aggregate  $A\beta_{1-42}$  の方が高い毒性を有することがわかった。

第3章では、免疫学的検出法による  $A\beta_{1-42}$  凝集体の検出を目的として aggregate  $A\beta_{1-42}$ 、可溶化  $A\beta_{1-42}$  それぞれに対するモノクローナル抗体を作製し、その反応性と特異性の検討を行った。モノクローナル抗体の作製は、細胞融合法を用いて行い、得られた抗体産生株をクローニングしてハイブリドーマ樹立株とした。その結果、aggregate  $A\beta_{1-42}$  に対する抗体産生株 4 クローン、および可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対する抗体産生株 9 クローンが得られた。これらのハイブリドーマをマウス腹腔内で増殖させて抗体の量産を行い、腹水よりカラムクロマトグラフィーにより抗体のアフィニティー精製を行った。精製したモノクローナル抗体をアクリルアミドゲル電気泳動により確認し、サブクラスの判定も行った。aggregate  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル

抗体は monomer  $A\beta_{1-42}$ , fibril  $A\beta_{1-42}$  に対する反応性は低かった。aggregate  $A\beta_{1-42}$  をサイズと分子量によって分画し、作製したモノクローナル抗体がどのような大きさの凝集体に特異的に反応するかについて、ELISA によって解析したところ、いずれのクローンも、0.22  $\mu\text{m}$  フィルター以上のサイズ (LOA) に対して高い反応特異性を持つが、それ以下のサイズの amorphous  $A\beta_{1-42}$  とは反応性が低いことが示唆された。一方、可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体は、可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対する反応性が高く、monomer  $A\beta_{1-42}$ , fibril  $A\beta_{1-42}$ , に対する反応性は低かった。可溶化  $A\beta_{1-42}$  をサイズと分子量によって分画したところ、いずれのクローンも、0.22  $\mu\text{m}$  フィルター通過画分の、300 kDa 以上の大きさの  $A\beta_{1-42}$  凝集体に対して高い反応特異性を持つことが示唆された。

第4章では、作製したモノクローナル抗体の臨床検査への応用をめざして、 $A\beta_{1-42}$  凝集体に対する ELISA 反応の検出感度と特異性を上げるための手法について検討した。まず、aggregate  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体 37-11 を用いて、化学発光基質を利用した ELISA を行った。この結果従来の発色基質に比べ、約 5-20 倍の感度が得られた。抗体使用量削減についても検討し、化学発光 ELISA では発色法に比べて 100-200 分の 1 の抗体量で検出可能であることを示した。次に、可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体の組合せによるサンドウィッチ ELISA を行い、可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対する反応特異性の高い抗体の組合せ(79-3 と 73-1)を決定した。実際に血液を用いた診断を行うことを想定すると、血清中では、 $A\beta_{1-42}$  凝集体は単独では存在せず、アルブミン等のタンパク質と混在していることから、特異性および感度増強の試験系として、 $A\beta_{1-42}$  凝集体とウシ血清アルブミンとの混合物を抗原とした化学発光 ELISA を行って、その反応感度について比較検討した。この結果、アルブミンの有無にかかわらず、可溶化  $A\beta_{1-42}$  が 1.1 pmol/well 以上で検出が可能であることが判明した。従って、血清中で他のタンパク質と  $A\beta_{1-42}$  が混在していても、高い感度で検出することができることが明らかとなった。

第5章では総括として本研究で得られた知見のまとめを述べた。その内容を以下にまとめる。

1. 様々な形状と大きさの  $A\beta_{1-42}$  凝集体である可溶化  $A\beta_{1-42}$ , aggregate  $A\beta_{1-42}$ , fibril  $A\beta_{1-42}$ , monomer  $A\beta_{1-42}$  を作製し、それぞれの形状やサイズ、構造および凝集過程について、AFM による表面形状の画像解析および ThT 法による  $\beta$  シート構造分析により明らかにした。
2. ラット胎児海馬初代培養神経細胞に対する毒性試験を行い、作製した凝集体の神経毒性を定量的に評価した。aggregate  $A\beta_{1-42}$  のほうが fibril  $A\beta_{1-42}$  に比べ高い毒性があることを示した。
3. aggregate  $A\beta_{1-42}$ , 可溶化  $A\beta_{1-42}$  それぞれに対するモノクローナル抗体を作製し、ELISA により反応性と特異性を評価した。その結果、それぞれ aggregate  $A\beta_{1-42}$ , 可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対して反応性が高く、fibril  $A\beta_{1-42}$  や monomer に対する反応性は低い特異的なモノクローナル抗体を得ることができた。aggregate  $A\beta_{1-42}$ , 可溶化  $A\beta_{1-42}$  を大きさと分子量に従ってフィルター分画し、それぞれ反応性が高い凝集体の画分を明らかにした。
4. 化学発光基質およびサンドウィッチ ELISA を用いることにより、抗体の  $A\beta_{1-42}$  凝集体に対する反応特異性と検出感度を高めることができた。また使用抗体量を削減することにも成功した。

以上の結果より、本研究では大きさと形状の異なる  $A\beta_{1-42}$  凝集体に対する特異的なモノクローナル抗体を作製し、凝集体の形状と構造および形成過程を免疫学的に評価することができた。今後、これらの抗体を利用した、脳内における  $A\beta_{1-42}$  凝集体の構造分析や病理診断への応用、髄液や血液を利用したアルツハイマー病診断薬の開発、さらに抗体医薬による治療の研究への展開が期待される。