

博士学位論文

アルツハイマー病診断のための  
A $\beta$ <sub>1-42</sub>凝集体の免疫学的評価に関する研究

Study on Immunological Evaluation of A $\beta$ <sub>1-42</sub> Aggregates  
for the Diagnosis of Alzheimer's Disease

日本大学大学院 生産工学研究科 応用分子化学専攻  
清水 武則

## 目次

<b>第 1 章 本研究の背景と目的</b>	<b>4</b>
1-1 アルツハイマー病の現状と病態および治療法	4
1-2 アルツハイマー病の病因研究	5
1-3 Amyloid beta protein (A $\beta$ ) について	6
1-4 アルツハイマー病の診断法	8
1-5 免疫学的手法を用いたアルツハイマー病の検査法	9
1-6 本研究の目的	11
1-7 本論文の構成	12
<b>第 2 章 A<math>\beta</math><sub>1-42</sub>凝集体の作製とその形状評価および細胞毒性試験</b>	<b>14</b>
2-1 緒論	14
2-2 実験材料および実験方法	16
2-2-1 未処理 A $\beta$ <sub>1-42</sub> の作製	16
2-2-2 fibril A $\beta$ <sub>1-42</sub> の作製	17
2-2-3 aggregate A $\beta$ <sub>1-42</sub> の作製	17
2-2-4 LOA (Large Oval Aggregates) および amorphous A $\beta$ <sub>1-42</sub> の調製	17
2-2-5 可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> の作製	17
2-2-6 monomer A $\beta$ <sub>1-42</sub> の作製	18
2-2-7 AFM による A $\beta$ <sub>1-42</sub> 凝集体の形状観察とサイズ測定	18
2-2-8 Thioflavin T (ThT)法による A $\beta$ <sub>1-42</sub> 凝集体の $\beta$ シート構造解析	18
2-2-9 ラット胎児海馬由来初代培養神経細胞を用いた A $\beta$ <sub>1-42</sub> の細胞毒性試験	18
2-3 結果	20
2-3-1 各 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 凝集体の形状とサイズ	20
2-3-2 ThT 法を用いた凝集過程における A $\beta$ <sub>1-42</sub> の構造変化の解析	22

2-3-3	ラット胎児海馬由来初代培養神経細胞を用いた A $\beta$ <sub>1-42</sub> の細胞毒性試験	23
2-4	考察	26
2-5	結論	28
<b>第3章</b>	<b>各種 A<math>\beta</math><sub>1-42</sub> 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</b>	<b>29</b>
3-1	緒論	29
3-2	実験材料および実験方法	30
3-2-1	モノクローナル抗体の作製	30
3-2-2	抗体産生融合細胞株の ELISA ( <u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>S</u> orbent <u>A</u> ssay)による スクリーニング	32
3-2-3	モノクローナル抗体のサブクラス解析	33
3-2-4	ハイブリドーマ株のマウス腹腔内培養による抗体の増産	33
3-2-5	セルロースアセテート膜電気泳動によるマウス腹水中抗体タンパク質の確認	33
3-2-6	腹水からの抗体〈イムノグロブリン〉精製	34
3-2-7	SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による抗体精製の確認	35
3-2-8	ELISA によるモノクローナル抗体反応性の比較検討	35
3-3	結果	36
3-3-1	aggregate A $\beta$ <sub>1-42</sub> に対するモノクローナル抗体の作製とその反応性の検討	36
3-3-2	aggregtae A $\beta$ <sub>1-42</sub> に対するモノクローナル抗体の特異性の検討	39
3-3-3	可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> に対するモノクローナル抗体の作製とその反応性の検討	42
3-3-4	可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> に対するモノクローナル抗体の特異性の検討	45
3-4	考察	49
3-5	結論	51
<b>第4章</b>	<b>化学発光基質およびサンドウィッチ ELISA を用いた検出感度と反応特異性の向上</b>	<b>52</b>
4-1	緒論	52

4-2	実験材料および実験方法	53
4-2-1	本実験に使用したモノクローナル抗体および抗原	53
4-2-2	化学発光基質を用いた ELISA 感度増強	54
4-2-3	サンドウィッチ ELISA	55
4-2-4	タンパク質混合液中の可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> の検出	55
4-3	結果	56
4-3-1	化学発光基質を用いた aggregate A $\beta$ <sub>1-42</sub> に対する ELISA 感度増強の検討	56
4-3-2	化学発光基質 ELISA による aggregate A $\beta$ <sub>1-42</sub> に対する抗体使用量の削減	57
4-3-3	サンドウィッチ ELISA による可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> に対する ELISA 反応特異性向上の検討	57
4-3-4	タンパク質混合液中の可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> の化学発光 ELISA による検出	59
4-4	考察	60
4-5	結論	62
第 5 章	総括	63
参考文献		66

## 第1章 本研究の背景と目的

### 1-1 アルツハイマー病の現状と病態および治療法

総務省の統計によると、2013年現在我が国の65歳以上の老年人口が全人口に占める割合は25%であるが、2020年には29.4%にまで上昇することが予測されている<sup>1)</sup>。このような日本の高齢化に伴い、認知症患者数も年々増加傾向にある。認知症患者数は、厚生労働省の調査によると、2010年現在約200万人であり、今後高齢者人口の増加とともに認知症患者数も増加することが予想され、2020年には325万人にまで達すると報告されている<sup>2)</sup>。

認知症には、アルツハイマー型、脳血管性、レビー小体型の3つがあるが、アルツハイマー型が患者の約半数(約80万人)を占めている。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る<sup>3,4)</sup>。その症状は認知障害・記憶障害・注意障害・睡眠障害・妄想等である。アルツハイマー病は、老齢になると徐々に痴呆症状が進行していくが、一般の加齢による物忘れとは違い、特徴的な脳細胞の減少と脳内構造を伴う疾患である。多くは65歳以上になって発症するが、家族性アルツハイマー病という遺伝性疾患もある。

現在、アルツハイマー病の症状緩和薬としては、塩酸ドネペジル(商品名アリセプト)などの抗コリンエステラーゼ阻害薬が知られている。抗コリンエステラーゼ阻害薬は、アセチルコリン分解酵素を阻害することにより、アルツハイマー病患者に見られる脳内アセチルコリンの低下を防ぐ効果を示す<sup>5)</sup>。これは、病気の進行を多少遅らせる対症療法という意味では有効とされている。一方、NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体拮抗薬メマンチン塩酸塩(商品名メマリー)は、脳内のNMDA受容体と結合することにより、神経伝達物質グルタミン酸の過剰放出を阻止し、脳活動の異常を軽減する効果があるとされ、中等度から高度のアルツハイマー病患者に処方されることがある<sup>6)</sup>が、この療法の評価は定まっていない。いずれにせよ、どちらの薬物もアルツハイマー病の根本的な治療には結びついていない。

このように効果的な薬物療法がない現状では、心理的・社会的な治療法が中心となっている。

しかし、これも初期症状であれば改善が可能であるが、症状が進行した後では改善が期待できない。したがって、認知症の早期発見は、薬物療法・非薬物療法の双方にとって重要であり、発見が早ければ早いほど対処ができ、症状の進行を遅らせることができる。

## 1-2 アルツハイマー病の病因研究

アルツハイマー病発症のメカニズムとして現在考えられているのは、老人斑(アミロイドの生成、沈着および組織の崩壊と炎症反応)の形成、神経原線維変化(神経細胞内構造タンパク質の異常、リン酸化タウタンパク質の出現)、神経細胞消失というプロセスである。これまで、アルツハイマー病の病因解明研究は、神経原線維変化を中心に進められてきた<sup>7,8)</sup>。神経原線維変化の主原因は、リン酸化タウタンパク質であり、老人斑にアポリポタンパク質 E (ApoE) などのアルツハイマー因子が作用することにより発現して、神経細胞内に蓄積することが明らかになっている。

一方、神経原線維変化は Amyloid beta protein (A $\beta$ )の沈着、神経細胞の脱落の後に現れることから、A $\beta$  を主原因とする発症メカニズム研究もさかんに行われている<sup>9-12)</sup>。1980年代に、老人斑のタンパク質主成分が A $\beta$  タンパク質であることが発見され、その前駆体である amyloid  $\beta$ -protein precursor (APP) が同定された。家族性アルツハイマー病の遺伝的研究<sup>13)</sup>からも、APP がその病因遺伝子(21番染色体上)であることが明らかになった。また、その後家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として同定されたプレセニリン(Presenilin; PS) 1 (14番染色体上)が、APP を切断し A $\beta$  の産生に関与する酵素の一部(詳細は後述)であったことなどから、近年は A $\beta$  の形成、特に神経毒性を示す凝集体形成が、アルツハイマー病の発症に強く関わっているとす「アミロイド仮説」<sup>14)</sup> が支持されている。

さらに、「アミロイド仮説」とは別に、脳内で生成される  $\alpha$ -シヌクレイン( $\alpha$ -Synuclein)というタンパク質も半数以上のアルツハイマー病患者の脳内で蓄積が確認されている。 $\alpha$ -シヌクレインは、神経細胞のシナプスで働くタンパク質で、パーキンソン病とアルツハイマー病の両方の特徴をもつレビー小体認知症患者の脳内黒質ニューロンに見られるレビー小体の成分である<sup>15)</sup>。 $\alpha$ -シヌク

レインは主にパーキンソン病で研究され、家系調査の結果、パーキンソン病になりやすい家系では、アミノ酸配列に異常があることがわかっている。この異常な  $\alpha$ -シヌクレインは  $A\beta$  やタウタンパク質とも相乗作用して凝集体が蓄積する度合いが増すと考えられている<sup>16)</sup>。

以上のように、アルツハイマー病の原因については、これまで多くの研究がなされてきたが、 $A\beta$  がその中で主要な役割を持つことは確かである。

### 1-3 Amyloid beta protein ( $A\beta$ )について

$A\beta$  は、ニューロン、アストロサイト細胞、ミクログリア細胞など脳内のさまざまな細胞において、 $A\beta$  の前駆体である APP から  $\beta$ -セクレターゼおよび  $\gamma$ -セクレターゼという酵素によって切断され(Fig. 1-1)生成される<sup>17,18)</sup>。 $\beta$ -セクレターゼは、APP の 671 番目のアミノ酸部位を切断し、 $\gamma$ -セクレターゼは APP の 711 あるいは 713 番目のアミノ酸部位を切断する。よって、 $A\beta$  は、 $\gamma$ -セクレターゼが切断する位置の違いによりアミノ酸残基が 40 のもの( $A\beta_{1-40}$ )と 42 のもの( $A\beta_{1-42}$ )に大別される<sup>19-21)</sup>。 $A\beta_{1-40}$  の分子量は 4331.4、 $A\beta_{1-42}$  の分子量は、4510.4 である。その他に  $\alpha$ -セクレターゼと呼ばれる酵素も存在し、APP の細胞膜貫通部位の 687 番目のアミノ酸部位を切断するため、 $\alpha$ -セクレターゼによって切断された場合には  $A\beta$  は生成されない。脳内における  $A\beta_{1-40}$  および  $A\beta_{1-42}$  の生成割合は、 $A\beta_{1-40}$  が約 90%で、 $A\beta_{1-42}$  は約 10%である<sup>22)</sup>。 $A\beta_{1-42}$  は生成割合は低いが高凝集性は高く、また神経細胞に対する毒性も  $A\beta_{1-40}$  に比べて強いことが報告されている<sup>23-25)</sup>。 $A\beta_{1-42}$  は、脳内で生成された時点ではアミノ酸 42 残基の単量体であり、健常者でも生成されているが、蓄積は見られず代謝されている。しかし、アルツハイマー病患者では、何らかの原因により、脳内で  $A\beta_{1-42}$  凝集体が形成されることがわかっている。

Amyloid Precursor Protein (APP) Aβ前駆体タンパク質(分子量110-135kDa)

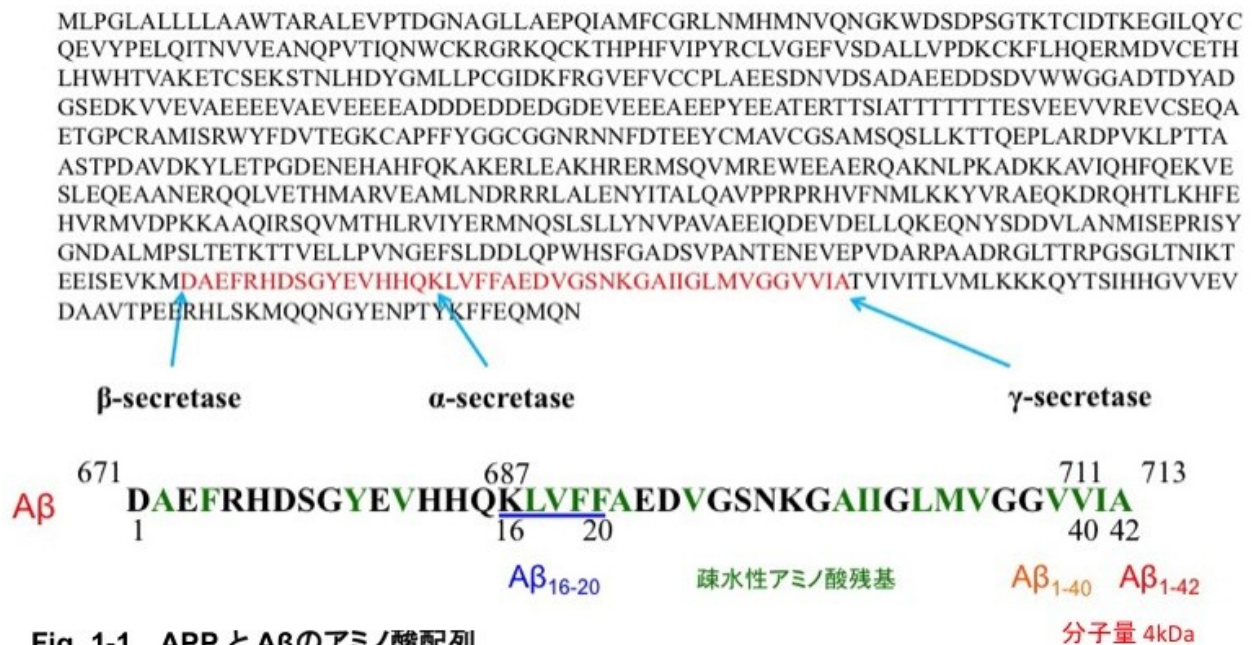


Fig. 1-1 APP と Aβ のアミノ酸配列

Aβ は APP より、γ-secretase と β-secretase により切り出され(赤字部分)、Aβ<sub>1-40</sub> と Aβ<sub>1-42</sub> の 2 種類が生成する。APP に α-secretase が作用すると、膜貫通部位近くで切断され、Aβ は生成しない。Aβ<sub>1-42</sub> に疎水性アミノ酸残基(緑字)の多い Aβ<sub>16-42</sub> (青字部分)を添加すると、fibril 化が抑制されて aggregate が生成する。

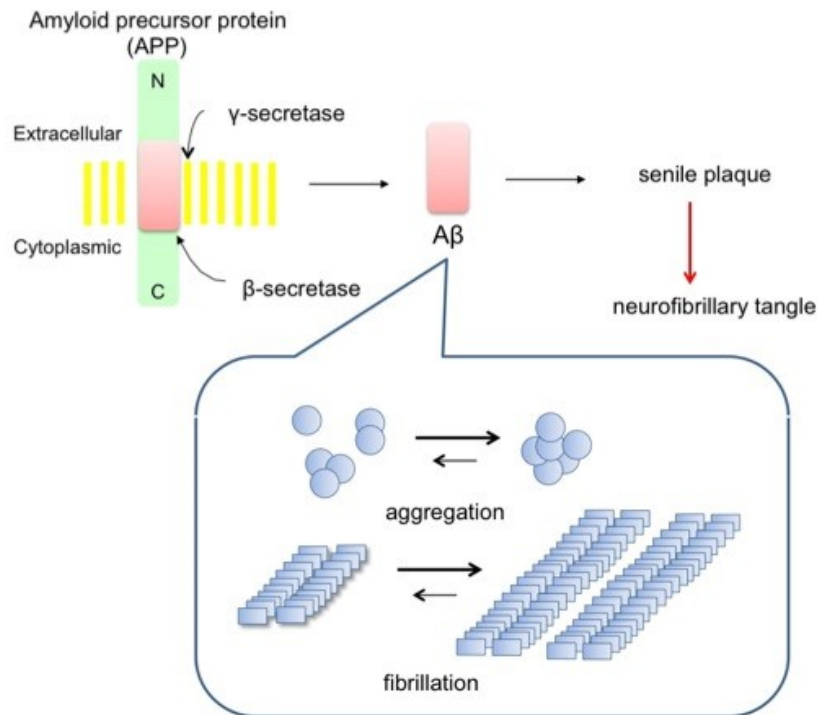
前述の家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として同定されたプレセニリン(Presenilin; PS) 1 (14 番染色体上)は、γ-セクレターゼの複合体の中心タンパク質であり、アルツハイマー病患者では、このプレセニリン 1 の変異により、γ-セクレターゼは APP の 313 番目のアミノ酸を切断し、細胞毒性の強い Aβ<sub>1-42</sub> が生成すると考えられている<sup>11)</sup>。Fig. 1-2 に示したように、Aβ<sub>1-42</sub> はさらに脳内で凝集蓄積して老人斑を形成、毒性を惹起して神経細胞を死滅させる<sup>26)</sup>。

さらに、Aβ<sub>1-42</sub> は前述したアポリポタンパク質 E (ApoE) などの影響により、神経原線維変化であるタウタンパク質のリン酸化を引き起こす。その結果、シナプスからシナプスへの情報伝達が困難となり、記憶障害などの症状が引き起こされると考えられている。

Aβ<sub>1-42</sub> の凝集過程には主として 2 つの経路が報告されている<sup>27)</sup>。1 つ目の経路は monomer から dimer, spherical 構造を経て fibril 構造へと変化する過程である。2 つ目の経路は、monomer 同士が凝集し、さまざまな大きさの球状凝集体である aggregate を形成する経路であり、aggregate 中



には、oligomer 状、さらに巨大な球状凝集体も存在する(Fig. 1-2)。A $\beta$ <sub>1-42</sub>は、aggregateの方がfibrilに比べ神経細胞毒性が強いことが報告されており<sup>27)</sup>、凝集体の構造やサイズの違いによっても細胞毒性に差があると考えられている。これ以外に3つ目の経路としてdimerからtetramerとなり、ring状の構造を形成する例も知られている<sup>28)</sup>。



**Fig. 1-2 アルツハイマー病におけるA $\beta$ 凝集の模式図**

A $\beta$ はアミロイド前駆タンパク質(APP)より、 $\gamma$ -secretaseと $\beta$ -secretaseという酵素によって切り出され、RandomcoilあるいはFibril状に凝集して、老人斑(senile plaque)を形成する。これが原因となり、neurofibrillary tangle(神経原繊維濃縮体)という構造ができ、神経変性が誘導される。他にタウタンパク質という細胞骨格関連タンパク質の関与も指摘されている。

#### 1-4 アルツハイマー病の診断法

現在、アルツハイマー病の診断法として一般に行われているのは、記憶や知能に関する心理テスト、およびコンピューター断層撮影法(CT; Computed Tomography)・磁気共鳴画像(MRI; Magnetic Resonance Imaging)・脳血流検査(SPECT; Single Photon Emission Computed Tomography)などの画像検査である。心理テストの診断基準のひとつが、アメリカ精神医学会による Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)で、精神障害の判断指針である<sup>2)</sup>。しかし、この方

法は患者への問診で診断が行われるため、正確な判断が難しい。また、この診断基準を満たす認知症は、かなり進行した状況であり、治療には結びつきにくい。

一方、画像検査では、特に MRI を用いた海馬(記憶に関係する脳内部位)の萎縮検査、脳血流 SPECT を用いた側頭頭頂葉や後部帯状回の血流低下検査により、比較的早期のアルツハイマー病診断が可能である。最近では、放射能を含む薬剤を用いるポジトロン断層法 (PET; Positron Emission Tomography)を利用した画像診断も開発されている<sup>29)</sup>。PET とは、陽電子検出を利用したコンピューター断層撮影であり、生体機能の検査に用いられている。放射性トレーサーを静脈注射により体内に取り込ませ、脳組織に集まったトレーサーから放出される陽電子をガンマ線検出器でとらえることにより、脳内活動(代謝や血液流量)を検出する。アルツハイマー病診断の場合、アミロイドの  $\beta$  シート構造に親和性のある低分子物質、例えばチオフラビン T(後述 ThT)やコンゴレッドの類似化合物を  $^{11}\text{C}$  や  $^{18}\text{F}$  などの放射性元素で標識し、それを静脈内投与により脳内に取り込ませ、脳内におけるアミロイドの分布画像を捉える。アミロイド PET は、アルツハイマー病を発症する前のアミロイド陽性健常者も検出できるので、今後の適用拡大が期待されているが、アルツハイマー病診断に関して感度はきわめて高いが、パーキンソン病等にも反応する可能性があるため、アルツハイマー病に対する特異性には問題がある。正しい診断には、他の診断法との併用が必要である。

#### 1-5 免疫学的手法を用いたアルツハイマー病の検査法

生体内における抗原抗体反応は特異的な反応性を示すので、抗体を利用した検査は、生体内の物質の構造や機構を解明していく上で非常に有効な手法である。近年、免疫学的検出法により  $\text{A}\beta$  を定量し、アルツハイマー病の診断を行うための研究が行われている<sup>30)</sup>。脳内で生成された  $\text{A}\beta$  は髄液中に流出するため、患者から採取した髄液中の  $\text{A}\beta$  を  $\text{A}\beta_{1-42}$  に対する抗体を用いて検出、測定することにより、アルツハイマー病の診断を行おうとするものである。しかし、この方法では患者から髄液を直接採取する必要があるため、苦痛を伴い、患者への負担が大きい。

このような負担を軽減する方法として、血液を採取して血漿中の A $\beta$  を検出、測定する方法が求められている。脳内から髄液中に流出した A $\beta$  は、低分子の場合、さらに血液中にも微量に流出すると考えられている。血液中の A $\beta$  検査の実施例として、A $\beta$  の monomer に対するモノクローナル抗体の作製と利用が報告されている<sup>32)</sup>。この報告では、血液中の微量な A $\beta$  を抗原抗体反応により検出、測定することでアルツハイマー病の診断薬に応用する研究を行っている。また他の例として、A $\beta$ -derived diffusible ligands (ADDLs)と呼ばれる A $\beta_{1-42}$ 凝集体(17-42 kDa の分子量をもつ oligomer A $\beta_{1-42}$ )に対するモノクローナル抗体 6E10 の作製が報告されている<sup>33)</sup>。128 kDa の分子量を持つ A $\beta_{1-42}$ 凝集体(amylospheroids ; ASPDs)に対するモノクローナル抗体の作製も報告されている<sup>34)</sup>。以上のように、A $\beta$  monomer および分子量の小さい凝集体に対してはモノクローナル抗体作製の報告はいくつかあるが、128 kDa よりも大きい A $\beta_{1-42}$ 凝集体に対するモノクローナル抗体の報告はまだない。

一方、血液と脳脊髄の間には、血液脳関門と呼ばれる物質交換を制限する機構が存在し、通常、物質は低分子を除いてこの関門を通過することはできないと考えられているので、分子量の大きい A $\beta_{1-42}$ 凝集体はそもそも血中に出でこない可能性がある。しかし、マウスを用いて、レセプタータンパク質による A $\beta$  の血液脳関門通過のメカニズムについて研究した例がある<sup>31)</sup>。この論文では、A $\beta$  が血液脳関門を通過する際、リポタンパク受容体(LRP1)とグリケーション最終産物(RAGE)の 2 種類の受容体が関与するとされている。脳内の A $\beta$  もしくは抗体と反応した A $\beta$  が LRP1 と反応すると、血液脳関門を通過し、血管側に移動する。血管側に移動した後、LRP1 は可溶性の sLRP1 となり、A $\beta$  は分離される。一方、RAGE は、血管側の A $\beta$  と反応し、血液脳関門を通過し、通過後、A $\beta$  は分離される。このようなメカニズムにより A $\beta$  は血液脳関門を通過し、血液中に流出すると著者らは主張している。従って、脳内から髄液中に流出した A $\beta_{1-42}$ 凝集体も血中に存在する可能性がある。

モノクローナル抗体を用いた臨床血液診断は、非侵襲的に簡便に行うことができる利点があるが、その検出感度が問題となる。A $\beta$  の血中濃度に関しては、血漿中の monomer 濃度の測定に関

する報告がある<sup>35)</sup>。この報告では、被験者の年齢が増加するに従い、血漿中の  $A\beta_{1-42}$  は約 10 pmol/L まで上昇することが確認されている。しかし、アルツハイマー病患者と健常者の血漿中の  $A\beta_{1-42}$  の濃度の差は、ほとんど見られず、両者ともに約 7 pmol/L であった<sup>35)</sup>。また、2 量体、3 量体、5 量体の凝集  $A\beta_{1-42}$  を捉える 7A1a ポリクローナル抗体を用いて、血漿中の  $A\beta$  を測定した論文が報告されている<sup>36)</sup>。この論文では、AD 患者の血漿中の  $A\beta$  の平均濃度は 642.5 ng/ml であった。ただし、7A1a ポリクローナル抗体は、N-末端に特異的な抗体であるため、血漿中の  $A\beta_{1-40}$  もとらえていて、特異性は低い可能性がある。他の臨床データとして、アルツハイマー病患者の血清中の  $A\beta$  monomer および 50-100 nm の soluble oligomer に対する抗体レベルを ELISA ( Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) で測定した報告がある<sup>37)</sup>。どちらの形状の  $A\beta$  に対する血清中の抗体濃度も約 0.5  $\mu$ g/ml 程度であった。この報告は、アルツハイマー病患者の血清中に  $A\beta$  monomer だけでなく、50-100 nm のサイズの凝集  $A\beta_{1-42}$  が存在する可能性を示唆している。

以上に述べたように、モノクローナル抗体を用いた免疫学的  $A\beta_{1-42}$  凝集体診断法は、実際に応用されつつあるが、現状は monomer および oligomer に対する検査が主であり、128 kDa よりも大きい  $A\beta_{1-42}$  凝集体を対象とした検査はまだ行われていない。しかし、血液中に 50-100 nm のサイズの凝集  $A\beta_{1-42}$  が存在する可能性も示唆されていることから、もし、様々な形状とサイズの  $A\beta_{1-42}$  凝集体に対するモノクローナル抗体を種々とりそろえることができれば、脳の病理診断のみならず、血液を用いた診断に利用できると考えられる。アルツハイマーの症状が進行すると、 $A\beta$  の多くは脳内の老人斑に集まり、血中の monomer  $A\beta$  が減ると言われている<sup>38)</sup>。髄液中や血清中にどのくらいのサイズの  $A\beta_{1-42}$  凝集体が、どのくらいの濃度で存在するのかを詳細に把握することで、アルツハイマー病の症状の進行を知り、適切な治療の選択に役立てることができるであろう。

## 1-6 本研究の目的

本論文は、アルツハイマー病の診断法の開発を目標とし、アルツハイマー病の病因の1つとされている  $A\beta_{1-42}$  凝集体について、その形状および凝集過程を免疫学的手法により評価することを

目的とする。具体的には、まず基礎的知見を得るために、**oligomer** よりも大きいサイズの  $A\beta_{1-42}$  凝集体の作製法について検討し、生成した各凝集体の形状とサイズを分析する。次に、これらの  $A\beta_{1-42}$  凝集体に対するモノクローナル抗体を複数作製して、それぞれの凝集形態への反応特異性について評価する。さらに、実際に抗体を診断に応用する場合を想定して、各凝集体に対する検出感度と反応特異性を向上させる方法について検討する。このように、抗原の作製から抗体の作製、反応特異性の向上、そして検出感度増強法の探求までの一貫した研究を行い、アルツハイマー病早期診断への応用を目指す。

### 1-7 本論文の構成

本論文は、5章から構成されている。以下に第2章以降の構成を記す。

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  $A\beta_{1-42}$  を作製し、さらには可溶化  $A\beta_{1-42}$  から **monomer**  $A\beta_{1-42}$  を調製した。**aggregate**  $A\beta_{1-42}$  をサイズ分画し、 $0.22\ \mu\text{m}$  以上の **large oval aggregates (LOA)** とそれ以下の **amorphous**  $A\beta_{1-42}$  に分離した。可溶化  $A\beta_{1-42}$  を超音波処理して **monomer**  $A\beta_{1-42}$  を調製した。これらの  $A\beta_{1-42}$  の形状とサイズを原子間力顕微鏡(AFM, JSPM-5200; JEOL Ltd.)により画像解析し、Thioflavin T (ThT)との反応性を蛍光強度測定により LOA および **fibril** の  $\beta$  シート構造について分析した(ThT法)。また、**aggregate**  $A\beta_{1-42}$  および **fibril**  $A\beta_{1-42}$  の、ラット胎児海馬由来初代培養神経細胞に対する毒性について検討した。

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、第2章で述べた **aggregate**  $A\beta_{1-42}$ , 可溶化  $A\beta_{1-42}$  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。まず、**aggregate**  $A\beta_{1-42}$  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について、ELISAを用いて検討した。凝集体形成過程における、 $A\beta_{1-42}$  とモノクローナル抗体との反応性の変化について分析した。さらに **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。次に、可溶化  $A\beta_{1-42}$  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について、ELISA

を用いて検討した。さらに可溶化  $A\beta_{1-42}$  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。

第 4 章では、第 3 章で作製した  $A\beta_{1-42}$  凝集体に対するモノクローナル抗体を用い、実際に臨床応用することをめざして、より感度と特異性の高い ELISA 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を用いて、化学発光基質を利用した ELISA により、検出感度増強および使用抗体量の節約について検討した。次に、可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体を組み合わせたサンドウィッチ ELISA によって、可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対する反応特異性の向上を図った。一方、血清中では、 $A\beta_{1-42}$  凝集体は他のタンパク質と混在していることから、 $A\beta_{1-42}$  凝集体とウシ血清アルブミンとの混合物を抗原とし、可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体を用いた、化学発光 ELISA により検討を行った。

第 5 章では、総括として本研究で得られた知見をまとめ、それらをアルツハイマー病の早期診断に役立てるために、今後必要な研究開発と展望について述べた。

## 第2章 A $\beta$ <sub>1-42</sub>凝集体の作製とその形状評価および細胞毒性試験

### 2-1 緒論

A $\beta$ は、アルツハイマー病の原因<sup>8-11)</sup>と考えられている老人斑の主要構成成分である。脳内で生成されるタンパク質であり、APPから $\beta$ -セクレターゼおよび $\gamma$ -セクレターゼにより切断されA $\beta$ <sub>1-42</sub> monomerとして生成される<sup>15-19)</sup>。健常者では、生成されたA $\beta$ <sub>1-42</sub>は血液脳関門を通過することで代謝され、凝集は起こらないが、アルツハイマー病患者では、脳内でA $\beta$ <sub>1-42</sub>の凝集が促進され、さらに蓄積する。また、水溶液中に存在する高濃度のA $\beta$ <sub>1-42</sub>は、凝集性が高く、分子間相互作用により凝集反応が促進すると考えられている<sup>39)</sup>。

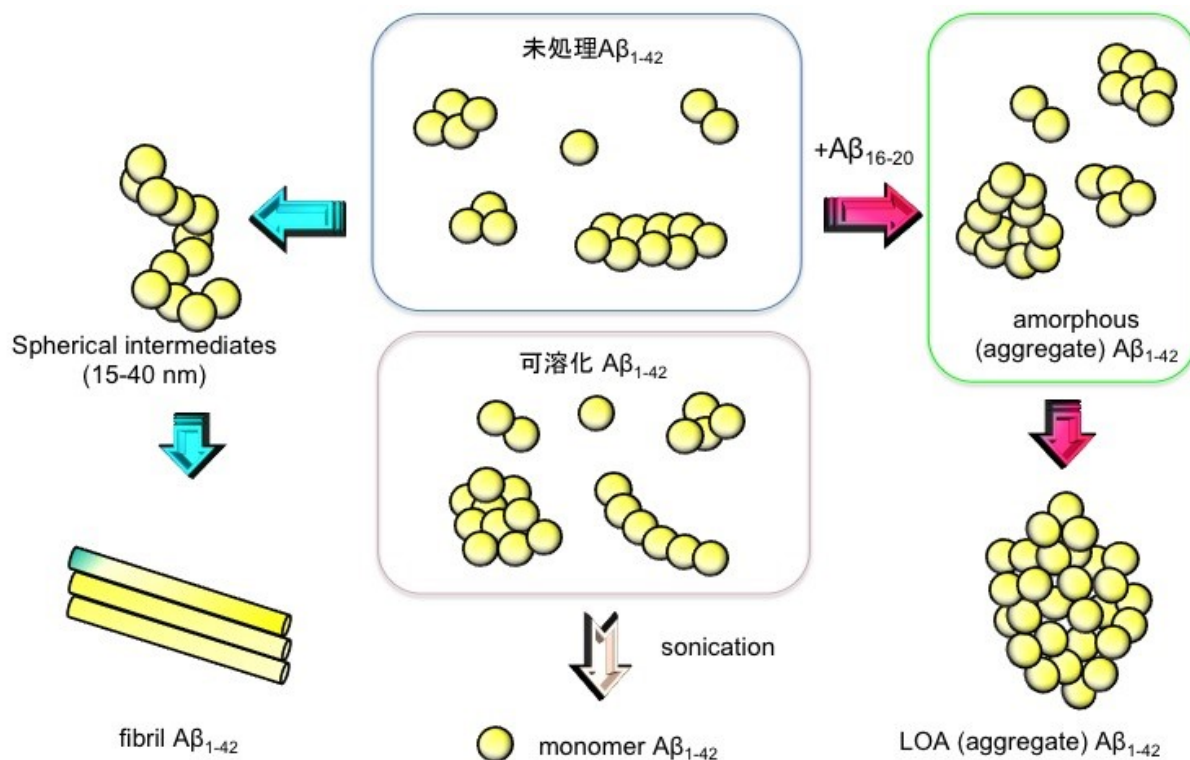
これまでに報告されているA $\beta$ <sub>1-42</sub>の凝集過程については、1章Fig. 1-2に示したが、主としてfibril形成とaggregate形成が挙げられる。fibril構造はmonomerが平行状に並んだ構造であり、 $\beta$ シート構造を持つ。内部に存在する $\beta$ シート構造は、積層構造を形成している場合が多く、クロス $\beta$ 構造と呼ばれる。ThTと呼ばれる蛍光色素は、fibrilの表面あるいは内部に存在する $\beta$ シートと相互作用を持つことが知られており<sup>40)</sup>、fibril形成の確認としてThT検出法が用いられている。一方、aggregate中には、作製方法によっても異なるが、oligomer状や巨大な球状凝集体など、様々な形状の凝集体が混在していると考えられる。

実験的にA $\beta$ <sub>1-42</sub>を凝集させる方法として、A $\beta$ <sub>16-20</sub>を添加する方法がある。A $\beta$ <sub>16-20</sub>はA $\beta$ <sub>1-42</sub>の16-20番目に位置するペプチドであり(Fig. 1-1)、この5残基、Lys-Leu-Val-Phe-Phe (KLVFF)は $\beta$ シート構造に結合し、fibril形成を阻害する働きを持つ<sup>41,42)</sup>。A $\beta$ <sub>16-20</sub>のC-末端側の4残基LVFFは疎水性アミノ酸であり、特に疎水性が強いフェニルアラニンが連続した構造である(Fig. 1-1)ことから、KLVFFを中心に凝集体が形成されていると考えられている<sup>43)</sup>。

A $\beta$ <sub>1-42</sub>は水溶液中で凝集性が高く、溶解が非常に困難であるといわれているため、A $\beta$ <sub>1-42</sub>を溶解させるために1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールやエタノールなどの有機溶媒を用いることが多い。可溶化A $\beta$ <sub>1-42</sub>は、水溶液中で溶解した状態のA $\beta$ <sub>1-42</sub>であるが、oligomerやfibril状の前

段階である protofibril などが混在し, monomer 状態ではないことが示唆され, 細胞に対する毒性を有することが報告されている<sup>44,45)</sup>。

本研究で作製した  $A\beta_{1-42}$  の多様な形態と凝集過程を Fig. 2-1 に示す<sup>27)</sup>。



**Fig. 2-1  $A\beta$  の多様な形態と凝集過程の模式図**

$A\beta_{1-42}$  水溶液 (未処理  $A\beta_{1-42}$ ) を 16 時間 37 °C 保温すると, 球状の中間体を経て繊維状の fibril  $A\beta_{1-42}$  となるが (左),  $A\beta_{16-20}$  を添加して同様に保温すると, 楕円状の amorphous (aggregate)  $A\beta_{1-42}$  (右) を経て, サイズの大きい LOA (aggregate)  $A\beta_{1-42}$  となる。 $A\beta_{1-42}$  を有機溶媒に溶解して凍結乾燥後, 超純水に溶解した可溶化  $A\beta_{1-42}$  を超音波処理することにより, monomer  $A\beta_{1-42}$  を調製した。

アルツハイマー病では, 脳内において記憶をつかさどる部位である海馬体の一部, 嗅内皮質で最も初期に病変が現れ, その後海馬全体に影響して, 海馬が委縮するといわれている<sup>25)</sup>。凝集, 蓄積された  $A\beta_{1-42}$  は毒性を惹起し, 海馬神経細胞を死滅させ記憶障害を引き起こす。fibril  $A\beta_{1-42}$  よりも aggregate  $A\beta_{1-42}$  の方が毒性が強いとされており, 3, 4 量体の oligomer 構造の  $A\beta_{1-42}$  がマウスの記憶を阻害する報告や<sup>46)</sup>, 神経細胞内において  $A\beta_{1-42}$  32 量体の細胞毒性が強いという報告もある<sup>47)</sup>。

細胞の毒性試験について, 本研究では, 細胞の DNA や膜を抗体や色素を用いて染色し, 蛍光強度から生細胞数, 死細胞数を判別する方法を用いた。細胞イメージアナライザー ArrayScan HCS



Reader (Thermo Fisher Scientific)は Carl Zeiss 光学系, 白色光源, 12-ビット冷却 CCD カメラ, 制御ソフトウェアからなり, ハイコンテンツスクリーニング/ハイコンテンツアナリシスのために開発された全自動細胞イメージアナライザーである。この装置とイメージ解析ソフトウェア (BioApplications)を使用して, リアルタイム-アナリシス機能により, イメージ取得と同時に自動的にイメージから細胞サイズ, 形状, 個数, 比率, 蛍光強度など多種の数値データを出力することができ, 細胞毒性のスクリーニングなどに利用されている。

A $\beta$  凝集体の構造を画像により解析する方法として, 本研究では AFM を用いた。AFM は, プローブにレーザー光を当て, その反射から表面形状を解析する走査型顕微鏡であり, タンパク質や粒子などの表面形状の観察を行う装置であり, カンチレバーの先端の探針が, 試料表面を感知することにより表面形状を画像として観察することができる<sup>48)</sup>。

本章では, 各種 A $\beta_{1-42}$  凝集体を作製し, その評価を行った。凝集反応促進作用を持つ A $\beta_{16-20}$  (KLVFF) を凝集体作成時に添加することにより, aggregate A $\beta_{1-42}$  を作製した。aggregate A $\beta_{1-42}$  を 0.22  $\mu\text{m}$  フィルターを用い, サイズによって分画した。また, 可溶化 A $\beta_{1-42}$  を作製し, 可溶化 A $\beta_{1-42}$  から monomer A $\beta_{1-42}$  への作製を試みた。A $\beta_{1-42}$  の凝集過程を時間経過ごとに ThT 法により分析することで, aggregate A $\beta_{1-42}$  凝集体および fibril A $\beta_{1-42}$  形成過程の  $\beta$  シート構造の変化を明らかにした。上記により作製した A $\beta_{1-42}$  凝集体の表面形状を AFM により観察し, その形状と大きさについて解析した。さらに, aggregate A $\beta_{1-42}$ , fibril A $\beta_{1-42}$  の神経細胞に対する毒性を調べるためラット胎児海馬神経細胞を使用し, ArrayScan HCS Reader により蛍光強度から死細胞数の割合を算出し, 毒性試験を行った。

## 2-2 実験材料および実験方法

### 2-2-1 未処理 A $\beta_{1-42}$ の作製

A $\beta_{1-42}$ (純度 84% ; HPLC 逆相クロマトグラフィによる検定)は, AnyGen Co., Ltd. Korea より購入した。A $\beta_{1-42}$  水溶液(0.44 mM ; 分子量約 4500 なので 2 mg/ml)を 4  $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間保温した後,

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (生理食塩水 PBS)(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>不含, 和光純薬, 大阪)で2倍希釈し 0.22 mM に調製した。この溶液中に存在する A $\beta$ <sub>1-42</sub> を「未処理 A $\beta$ <sub>1-42</sub>」とした。

#### 2-2-2 fibril A $\beta$ <sub>1-42</sub> の作製

「未処理 A $\beta$ <sub>1-42</sub>」0.22 mM 溶液を 37 °C で 16 時間保温し<sup>46)</sup>, 線維状の凝集体 A $\beta$ <sub>1-42</sub> である「fibril A $\beta$ <sub>1-42</sub>」を作製した。

#### 2-2-3 aggregate A $\beta$ <sub>1-42</sub> の作製

「未処理 A $\beta$ <sub>1-42</sub>」0.22 mM 溶液(1ml)に, fibril 形成を阻害する A $\beta$ <sub>16-20</sub> (KLVFF, AnyGen Co. Ltd., Korea) を, A $\beta$ <sub>1-42</sub> の 10 倍濃度 (2.2 mM) になるように添加し, 37 °C で 16 時間, shaking rotor により 7rpm の速度で攪拌すると球状の凝集体を形成した<sup>44, 48, 49)</sup>。本論文ではこの A $\beta$ <sub>1-42</sub> を「aggregate A $\beta$ <sub>1-42</sub>」とした。

#### 2-2-4 LOA (Large Oval Aggregates) および amorphous A $\beta$ <sub>1-42</sub> の調製

「aggregate A $\beta$ <sub>1-42</sub>」を 0.22  $\mu$ m のフィルター, アトプレップ MF (AE-1171 型, polyethersulfone membrane)でろ過して分画した。0.22  $\mu$ m 残渣であるサイズの大きい凝集体を「LOA」(Large Oval Aggregates) (長径 369  $\pm$  81 nm 短径 224  $\pm$  92 nm の楕円形)と呼ぶ。逆に 0.22  $\mu$ m のフィルターろ過分の小さいサイズの凝集体を「amorphous A $\beta$ <sub>1-42</sub>」とした。

#### 2-2-5 可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> の作製

A $\beta$ <sub>1-42</sub> (AnyGen Co., Ltd. Korea) 100  $\mu$ g を 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール 200  $\mu$ l に溶解し, この溶液を 4 °C で 16 時間保温し, さらに 37 °C で 3 時間保温した後<sup>44)</sup>, 凍結乾燥した。この操作を 2 回繰り返す, 最終的に得られた凍結乾燥 A $\beta$ <sub>1-42</sub> を超純水 100  $\mu$ l で溶解し, 0.22 mM の A $\beta$ <sub>1-42</sub> 溶液を調製した<sup>46)</sup>。本論文ではこの A $\beta$ <sub>1-42</sub> を「可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub>」とした。

## 2-2-6 monomer A $\beta_{1-42}$ の作製

「可溶化 A $\beta_{1-42}$ 」を超純水で 1000 倍希釈し、0.22  $\mu$ M の A $\beta_{1-42}$  溶液を調製した後<sup>49)</sup>、25°C で 16 時間超音波処理し、「monomer A $\beta_{1-42}$ 」溶液を得た。

## 2-2-7 AFM による A $\beta_{1-42}$ 凝集体の形状観察とサイズ測定

表面構造が均一状態の安定した mica 上に、2-2-1 から 2-2-5 の A $\beta_{1-42}$  溶液(0.22mM)を 10 倍希釈した液(22  $\mu$ M)10  $\mu$ l を滴下し、物理吸着させた。monomer A $\beta_{1-42}$  については、0.22  $\mu$ M monomer A $\beta_{1-42}$  溶液を 10  $\mu$ l を滴下し、物理吸着させた。その後、デシケータ中でそれぞれの溶媒を蒸発させた後、AFM により画像解析した<sup>50)</sup>。解析は空気中で、AC モードにより行った。190 kHz から 200 kHz の共鳴周波数、および 4.5 N/m のスプリングコンスタントを用いた<sup>51-53)</sup>。各サンプルを 6 回以上解析し、画像から凝集体のサイズ平均値および標準偏差を計測した。

## 2-2-8 Thioflavin T (ThT) 法による A $\beta_{1-42}$ 凝集体の $\beta$ シート構造解析

A $\beta_{1-42}$  凝集体表面の  $\beta$  シート構造について、ThT 法により解析した。Thioflavine T (ThT ; 分子量 318.86)と呼ばれる蛍光色素は、fibril の表面あるいは内部に存在する  $\beta$  シートと相互作用を持つので<sup>34)</sup>、fibril 形成の指標として用いられている。濃度 100  $\mu$ M になるように ThT を超純水に溶解し、25 °C で 16 時間攪拌後、反応に使用した。aggregate A $\beta_{1-42}$  または fibril A $\beta_{1-42}$  溶液の最終濃度が 0.22 mM、ThT の最終濃度が 10  $\mu$ M になるように溶液を超純水で調製した。それぞれの溶液 100  $\mu$ l を 96 well 黒プレート(Costar)に入れ、吸光度計 Micro plate reader (SPECTRA Max M2, Molecular Devices, USA)を使用して、1 時間ごとに 16 時間まで蛍光強度を測定(測定波長は、励起波長 444 nm、蛍光測定波長 485 nm を使用)した<sup>54-56)</sup>。

## 2-2-9 ラット胎児海馬由来初代培養神経細胞を用いた A $\beta_{1-42}$ の細胞毒性試験

実験操作 2-2 で作製した凝集 A $\beta_{1-42}$  の毒性を調べるために、ラット胎児海馬由来初代培養神経

細胞を用い、ArrayScan による毒性定量試験を行った<sup>57-59</sup>。

本研究では海馬神経細胞を必要とするためラット胎児を用いたが、ラットを用いる実験は、(株)イムノ・プローブにおいて、同社の動物倫理規定とプロトコルに基づいて行われた。胎生 20 日目の妊娠ラットの胎児から全脳を摘出し、Leibovitz's 15 (L-15)培養液(GIBCO)入りのシャーレに移した。大脳から海馬組織を切り出し、L-15 培養液で洗浄した。細胞培養を行うために、細胞分散用酵素パパイン溶液を用いた。パパイン溶液は、Dulbecco's PBS 10 ml に、DL-Cystein 塩酸塩(WAKO) 20mg, BSA (SIGMA-ALDRICH) 50 mg およびグルコース 50 mg をそれぞれ加え溶解した混合液に、純水に溶解させた 1.7 µg/µl のパパイン(WAKO)水溶液 100 µl を加え、37 °Cで 15 分間保温した。その後、氷冷し、1% DNase(WAKO)100 µl を加え、フィルター滅菌(pore size:0.45 µm)して調製した。洗浄した海馬組織にパパイン溶液を添加し、ウォーターバス中で振とうさせた(88 rpm, 37 °C 15 分間)。パパイン酵素反応の停止には、パパイン溶液の 30%相当のウシ胎児血清(Fetal Calf Serum ; FCS)〈過剰なタンパク質〉を加えた。遠心分離(1000 rpm, 3 分間)により解離した細胞を集め、10% FCS を含む Minimum Essential Medium (MEM)培養液(GIBCO)10 ml を添加し、10~15 回ピペッティングを行って細胞を分散した。さらにメッシュを用いて単細胞化し、血球計算盤で細胞数を算出した。ポリリジンコートした 96 well plate (Iwaki) の各 well に、10% FCS を含む MEM 培養液を 100 µl ずつ入れ、あらかじめ炭酸ガス培養器(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)内で 24 時間保温後、各 well に神経細胞が 1000-2500 個ずつになるように調製し播種した。

播種したラット胎児海馬神経細胞が入っている各 well 200 µl に 2-2-1 および 2-2-3 で作製した aggregate Aβ<sub>1-42</sub> および fibril Aβ<sub>1-42</sub> をそれぞれ 0.22 µM になるように(0.22 mM を 1000 分の 1)添加し、炭酸ガス培養器(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)内で培養した。培養開始時(0h)および Aβ<sub>1-42</sub> 添加 5 時間後(5h)に、その形態を顕微鏡観察し、細胞毒性を定量化するため、細胞染色を行った。

細胞染色は、培養液を取り除き、MEM 培養液で洗浄後、200 µl の調製した VitalDye / DeadDye Solution (Thermo Scientific 社) をそれぞれの well に添加し、炭酸ガス培養器(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)内で 30 分間反応させた。Dye Solution を除去し、200 µl の MEM 培養液を各 well に添加し、炭酸ガス

培養器(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)内で 30 分間保温して、未反応の Dye を完全に除去した。次に、200 μl の Fixation / Hoechst Solution (Thermo Scientific 社)をそれぞれの well に添加し、室温で 10 分間反応させた。その後 Fixation / Hoechst Solution を除去し、キット付属の Wash Buffer で 2 回洗浄し、固定液と未反応の Hoechst を除去した。最後の洗浄液を well 中に残して plate を密封し、Cellomics Array Scan (Thermo Scientific 社)にて生細胞/死細胞/核(VitalDye: 励起波長:492 nm, 蛍光波長:516 nm, DeadDye: 励起波長:535 nm, 蛍光波長:617 nm, HoechstDye: 励起波長:350 nm, 蛍光波長:461 nm)の蛍光強度を測定し、付属ソフトウェアにより、各 well 当たりの生細胞比率、死細胞比率を算出することで、毒性の有無を評価した<sup>60)</sup>。

## 2-3 結果

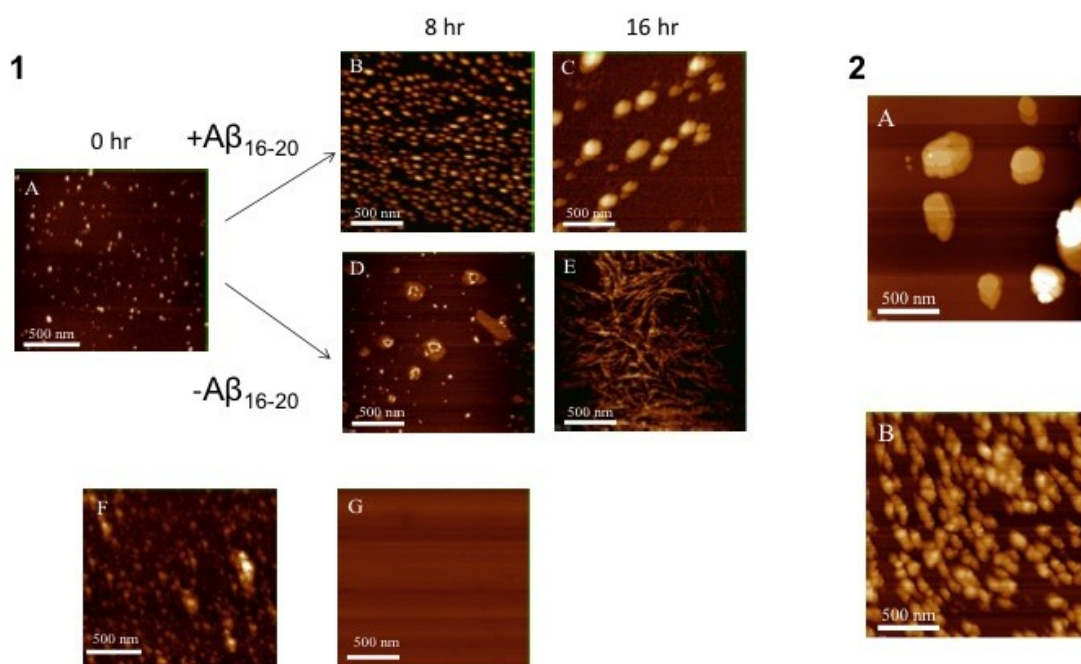
### 2-3-1 各 Aβ<sub>1-42</sub> 凝集体の形状とサイズ

Aβ<sub>1-42</sub> 凝集体である未処理 Aβ<sub>1-42</sub>, fibril Aβ<sub>1-42</sub>, aggregate Aβ<sub>1-42</sub>, LOA, 可溶化 Aβ<sub>1-42</sub>, および monomer Aβ<sub>1-42</sub> の構造を確認するために、AFM による表面形状の解析を行った。Aβ<sub>1-42</sub> の凝集過程における変化を Fig. 2-2 に示す。2-2-1 で作製した未処理 Aβ<sub>1-42</sub> (Fig. 2-2-1A)は凝集していることがわかった。また、Aβ<sub>16-20</sub> を添加した未処理 Aβ<sub>1-42</sub> は、37 °C で攪拌混和 8 時間 (Fig. 2-2-1 B)および 16 時間後 (Fig. 2-2-1 C)に aggregate Aβ<sub>1-42</sub> を形成することが確認された。一方、Aβ<sub>16-20</sub> を添加しない Aβ<sub>1-42</sub> は、37 °C で攪拌 8 時間 (Fig. 2-2-1 D)および 16 時間後 (Fig. 2-2-1 E) に fibril Aβ<sub>1-42</sub> を形成することが確認できた。また、aggregate Aβ<sub>1-42</sub> のうち、0.22 μm フィルターろ過残渣の LOA (Fig. 2-2-2 A) は、楕円形の球状形態を呈し、0.22 μm フィルターを通過した amorphous Aβ<sub>1-42</sub> (Fig. 2-2-2 B)は、同じく楕円形だが、LOA よりもサイズが小さかった。可溶化 Aβ<sub>1-42</sub> 溶液では、多様な形状の凝集体を形成していることが確認できた (Fig. 2-2F)が、monomer Aβ<sub>1-42</sub> (Fig. 2-2G)については、AFM では形状が確認できなかった。

次に、各凝集体のサイズによる比較を行った。 aggregate Aβ<sub>1-42</sub> サイズの最大値と最小値の標準偏差と平均値はそれぞれ 277±34 nm, 162±33 nm であった(Fig. 2-2-1 C)。LOA は、最大幅と最小

幅の標準偏差と平均値  $369 \pm 81$  nm,  $224 \pm 92$  nm の楕円形であった(Fig. 2-2-2 A)。0.22  $\mu$ m フィルターを通過した amorphous  $A\beta_{1-42}$  (Fig. 2-2-2 B) の凝集体のサイズは平均約 100 nm であり, その表面形状は楕円形であった。作製した fibril  $A\beta_{1-42}$  の直径の標準偏差と平均値は,  $30.7 \pm 10.9$  nm であった(Fig. 2-2-1 E)。また, 可溶化  $A\beta_{1-42}$  の粒径は, 50-300 nm の凝集体が混合していることが確認された(Fig. 2-2-1 F)。

以上の結果より, 本研究では  $A\beta_{1-42}$  は凝集体の作製方法により, 様々な大きさと形状になることを示し, その性質を AFM および ThT 法により評価することができた。結果を Table 2-1 にまとめた。



**Fig. 2-2  $A\beta_{1-42}$ 凝集体の原子間力顕微鏡(AFM)による解析**

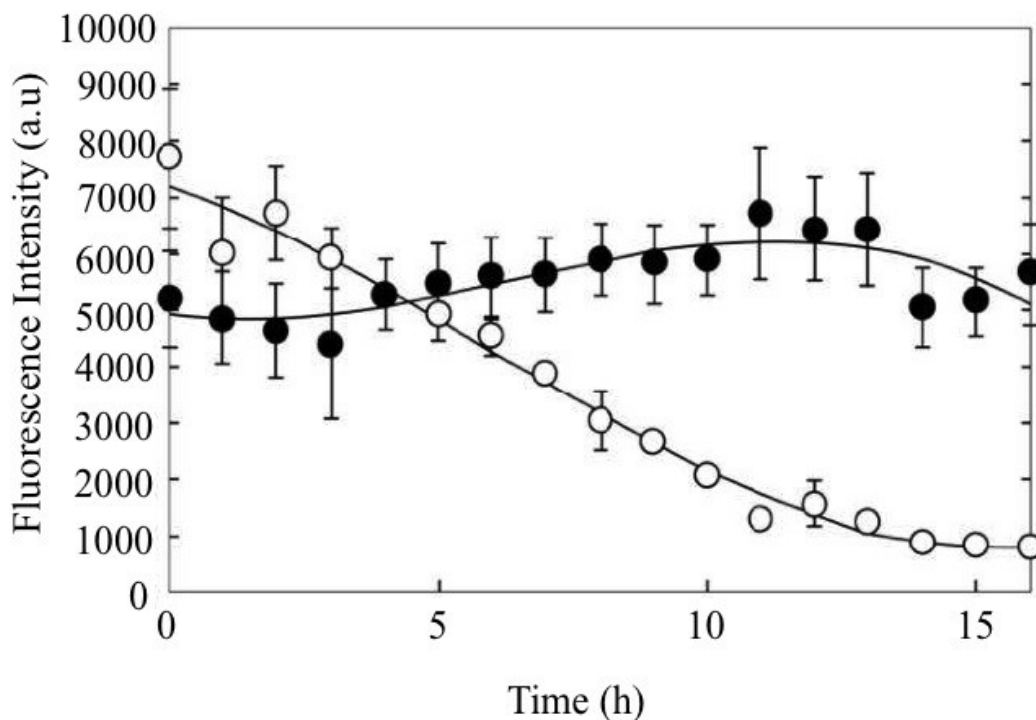
- 1:  $A\beta_{1-42}$ 水溶液(未処理 $A\beta_{1-42}$ ) (A)を,  $A\beta_{16-20}$ 存在下で8時間(B)および16時間(C)37 °C保温すると, 楕円形のaggregate  $A\beta_{1-42}$ が形成された。  $A\beta_{16-20}$ 非存在下で8時間(D)および16時間(E)37 °C保温すると, 繊維状のfibril $A\beta_{1-42}$ が形成された。  $A\beta_{1-42}$ を1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanolに溶解して凍結乾燥後, 超純水に溶解した可溶化 $A\beta_{1-42}$ (F)は, 様々なサイズの凝集体が混ざっていた。可溶化 $A\beta_{1-42}$ を超音波処理すると, monomer  $A\beta_{1-42}$ (G)が得られた。
- 2: aggregate  $A\beta_{1-42}$ を0.22 $\mu$ mフィルターでろ過すると, 残渣として得られる大きい楕円形のLOA(A)と, 通過画分のサイズの小さいamorphous  $A\beta_{1-42}$ (B)に分画できた。

Table 2-1 A $\beta_{1-42}$ 凝集体の形状とサイズおよび作製法のまとめ

カテゴリー	凝集	形状	サイズ(nm)	作製法
未処理	+	多様		0.44 mM A $\beta_{1-42}$ 水溶液を調製し、4 °Cで 30 分間インキュベート後、PBS で 2 倍希釈し 0.22 mM に調製
fibril	+++	繊維状	直径 30.7 $\pm$ 10.9	未処理 A $\beta_{1-42}$ の 0.22 mM 溶液を、37 °Cで 16 時間、shaking rotor により 7rpm の速度で混和
aggregate	++	楕円形	277 $\pm$ 34 ~162 $\pm$ 33	未処理 A $\beta_{1-42}$ の 0.22 mM 溶液に、fibril 形成を阻害する A $\beta_{16-20}$ を 10 倍濃度(2.2 mM) 添加し、37 °Cで 16 時間、shaking rotor により 7rpm の速度で混和
LOA	+++	楕円形	長径 369 $\pm$ 81 短径 224 $\pm$ 92	aggregate A $\beta_{1-42}$ 溶液を 0.22 $\mu$ m のフィルターで濾過して残った画分、大きい aggregate
amorphous	++	楕円形	50-400 (平均 100)	aggregate A $\beta_{1-42}$ 溶液の 0.22 $\mu$ m のフィルター通過画分、小さい aggregate
可溶化	+	多様	主として 50 (~300)	A $\beta_{1-42}$ を 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol に溶解し、4 °Cで 16 時間処理、37 °Cで 3 時間処理後、凍結乾燥(x2 回)、超純水で溶解し、0.22 mM に調整
monomer	-			可溶化 A $\beta_{1-42}$ を超純水で希釈して 0.22 $\mu$ M とし、25 °Cで 16 時間超音波処理

### 2-3-2 ThT 法を用いた凝集過程における A $\beta_{1-42}$ の構造変化の解析

2-3-1 では、AFM により A $\beta_{1-42}$  の凝集過程を観察した。さらに、凝集過程における aggregate A $\beta_{1-42}$ 、fibril A $\beta_{1-42}$  のそれぞれの形状変化を確認するために ThT 法を用いて蛍光強度を時間経過により測定した。前述したように ThT は、 $\beta$  シートと強い反応性を持つ蛍光色素であり、蛍光強度が高くなるに従い、 $\beta$  シートが増加したことを示す。未処理 A $\beta_{1-42}$  を A $\beta_{16-20}$  存在下または A $\beta_{16-20}$  非存在下で混和保温し、それぞれの ThT に対する反応性の時間変化を蛍光強度により測定した(Fig. 2-3)。A $\beta_{16-20}$  存在下(○)では、時間経過に従い、蛍光強度が減少した。この結果より、表面の  $\beta$  シート構造が減少し、aggregate A $\beta_{1-42}$  が形成されたと考えられる。一方、A $\beta_{16-20}$  無添加 (●)では、時間経過とともに蛍光強度の緩やかな増加がみられることから、 $\beta$  シートが増加することにより fibril A $\beta_{1-42}$  の形成が示唆された。この結果は、2-3-1 の AFM による画像解析結果と一致した。



**Fig. 2-3 ThT法によるβシート構造解析**

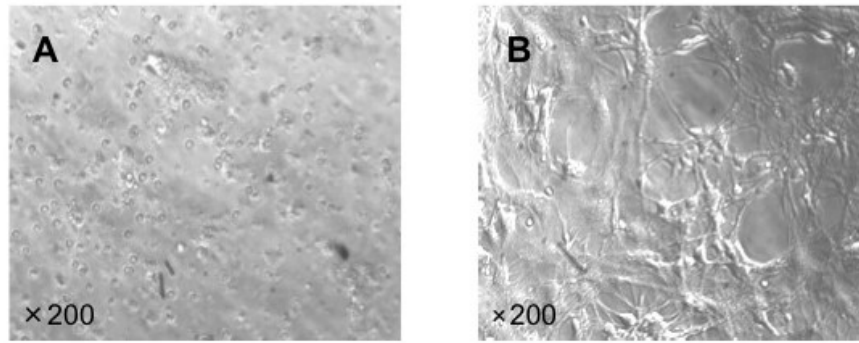
未処理Aβ<sub>1-42</sub> (0.22mM 1 mg/ml)を, Aβ<sub>16-20</sub> (2.2mM) 存在下(aggregate ○), 非存在下 (fibril ●)で37 °C保温し, 時間を追って, 蛍光強度を測定した。aggregate Aβ<sub>1-42</sub>形成に伴って蛍光強度が低下し, fibril Aβ<sub>1-42</sub>形成においてはゆるやかに増加することがわかった。

### 2-3-3 ラット胎児海馬由来初代培養神経細胞を用いた Aβ<sub>1-42</sub> の細胞毒性試験

ラット胎児脳由来の海馬神経細胞を 96 well plate 上で培養した。培養開始時の神経細胞の光学顕微鏡の画像を Fig. 2-4A, 培養 6 日後の神経細胞の光学顕微鏡画像の画像を Fig. 2-4B に示す。これらの画像から細胞培養の経過に伴い, 樹状突起の伸長により神経細胞が成長していることが観察された。

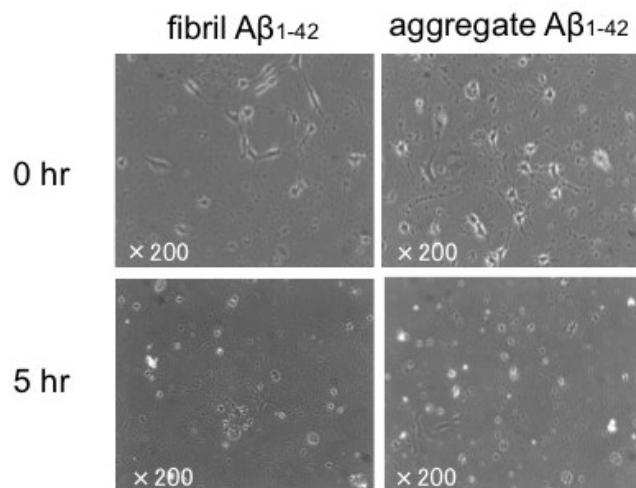
ラット胎児海馬神経細胞に第 2 章で作製した aggregate Aβ<sub>1-42</sub> および fibril Aβ<sub>1-42</sub> を 1 well あたりの終濃度が 0.2 μM になるように 96 well plate に添加し, 5 時間後の細胞形態を光学顕微鏡で観察した(Fig. 2-5)ところ, 樹状突起の形成への障害が確認できた。





**Fig. 2-4 ラット海馬神経細胞の培養**

培養0日(A)および6日目(B)ラット海馬由来神経細胞の光学顕微鏡写真。6日目には神経樹状突起形成が確認された。

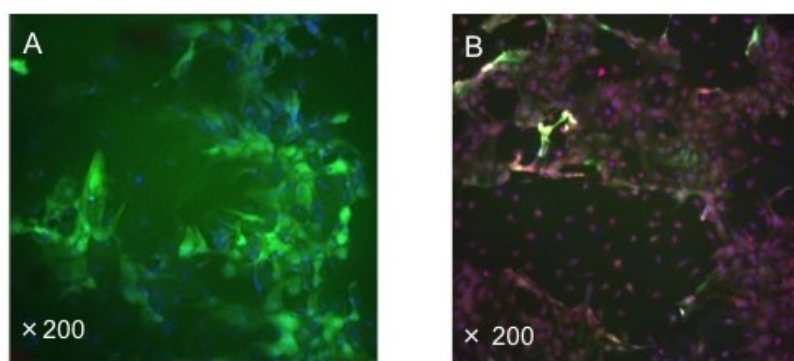


**Fig. 2-5 ラット海馬神経細胞に対するAβ<sub>1-42</sub>の毒性試験**

fibril Aβ<sub>1-42</sub>またはaggregate Aβ<sub>1-42</sub>(0.22μM)を添加時(0 hr)および5時間培養後(5 hr)のラット海馬由来神経細胞の光学顕微鏡写真。Aβ<sub>1-42</sub>添加により、神経樹状突起の萎縮と細胞死が観察された。

次に、蛍光顕微鏡 ArrayScan による観察および細胞毒性の定量解析を行った。ラット胎児海馬神経細胞による毒性試験は、Cell Viability Kit (Cellomics)を用いて測定した。Cell Viability Kit は蛍光波長の異なる 3 種類の蛍光色素(Vital Dye™ Fluorescent probe, Dead Dye™ Fluorescent probe, Hoechst Dye)であり、生細胞数と死細胞数の比率を算出することで、毒性を判定する試薬である。Vital Dye™ Fluorescent probe の主成分は、5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA)であり、細胞膜を緑色に染色する。Dead Dye™ Fluorescent probe の主成分は、propidium iodide であり、細胞質を赤色に染色する。Hoechst Dye の主成分は、Hoechst staining であり、核を青色に染色する。なお、

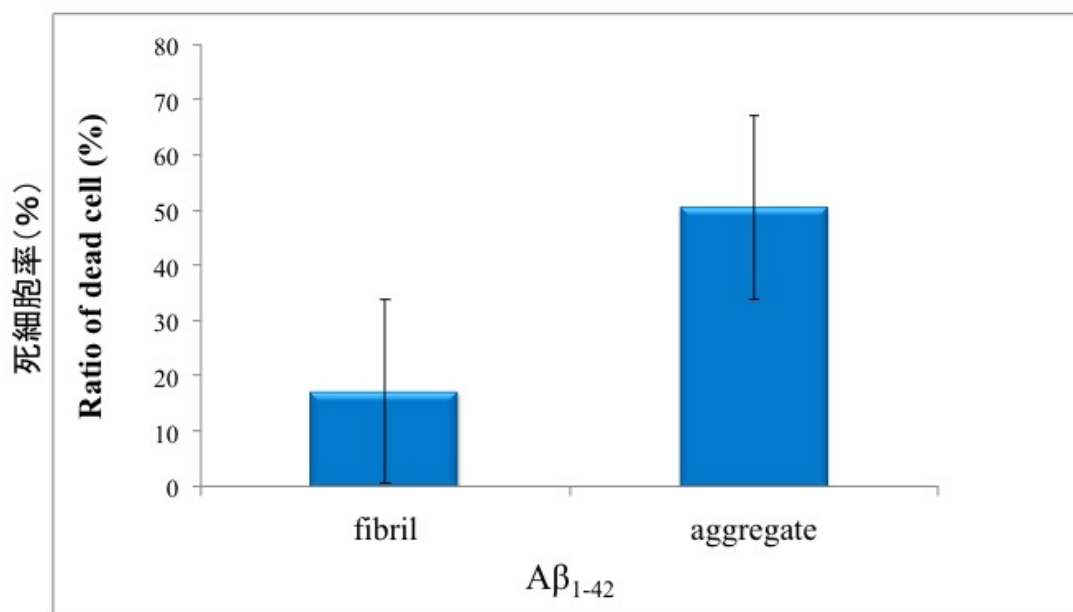
Hoechst staining (核染色)および Casein AM (膜染色)は生細胞を、 propidium iodide は死細胞(核から露出した DNA を染色)を染色する。本研究では、 蛍光強度を ArrayScan HCS Reader で測定することにより、 付属ソフトウェアを利用して生細胞/死細胞比率 cell viability を解析した。 aggregate  $A\beta_{1-42}$  のラット神経細胞に対する毒性の蛍光顕微鏡の画像を Fig. 2-6 に示した。 Fig. 2-6A は aggregate  $A\beta_{1-42}$  非存在下での培養 24 時間後の蛍光顕微鏡画像である。青色が核、緑色が細胞膜を染色していることから生細胞であることを表している。一方、 Fig. 2-6B は 0.2  $\mu\text{M}$  aggregate  $A\beta_{1-42}$  を添加 24 時間後の蛍光顕微鏡の画像であり、 緑色の蛍光色素はほとんど確認されず、 赤色の蛍光色素が認められたことから、 死細胞が多数存在していることを表している。



**Fig. 2-6 ArrayScanを用いた $A\beta_{1-42}$ の細胞死試験**

Aggregate  $A\beta_{1-42}$ 非存在下(A)および存在下(B)で培養24時間後のラット海馬由来神経細胞を、 Casein AM (green), Hoechst staining (blue), propidium iodide (red)で染色したArrayScan蛍光画像。  $A\beta_{1-42}$ 添加により、細胞死が誘導された。

また、この画像の蛍光強度から aggregate  $A\beta_{1-42}$  および fibril  $A\beta_{1-42}$  それぞれをラット胎児海馬神経細胞に添加した後 24 時間における死細胞率を、細胞イメージアナライザーArrayScan HCS Reader により定量解析した結果を Fig. 2-7 に示す。0.2  $\mu\text{M}$  の aggregate  $A\beta_{1-42}$  を添加した場合には、死細胞率は 50.50%であったが、0.2  $\mu\text{M}$  の fibril  $A\beta_{1-42}$  を添加した場合には、死細胞率は 17.23%であった。この結果より、 aggregate  $A\beta_{1-42}$  による細胞毒性は fibril  $A\beta_{1-42}$  よりも 3 倍ほど強いことが示唆された。



**Fig. 2-7 ArrayScanを用いたfibril Aβ<sub>1-42</sub> とaggregate Aβ<sub>1-42</sub>の毒性比較**

fibril Aβ<sub>1-42</sub>またはaggregate Aβ<sub>1-42</sub>を、ラット胎児海馬由来神経細胞に添加した際の細胞死誘導頻度を数値化して比較した。aggregate Aβ<sub>1-42</sub>の方が強い毒性を示した(培養24時間後)。

## 2-4 考察

本実験では、様々な反応条件下で Aβ<sub>1-42</sub> の凝集体を作製し、形状の観察および凝集体のサイズの測定を AFM により行った。

まず、Aβ<sub>1-42</sub> 水溶液を Dulbecco's PBS で 2 倍希釈した状態である未処理 Aβ<sub>1-42</sub> (Fig. 2-2-1 A)において、すでに凝集が進行していることがわかった。この未処理 Aβ<sub>1-42</sub> 溶液を 37°C で保温すると、8 時間後 (Fig. 2-2-1 D) には凝集体が集合し、16 時間後 (Fig. 2-2-1 E) には線維状に凝集した fibril Aβ<sub>1-42</sub> が生成した。つまり、最初に凝集していた Aβ<sub>1-42</sub> は時間経過とともに構造が Fig. 2-1 で示したような Spherical 構造を経て fibril になることが AFM の画像から推察された。fibril Aβ<sub>1-42</sub> の直径の標準偏差と平均値は、30.7±10.9 nm で、これまでに報告されている 1.6-8.5 nm よりも 1.5-2 倍大きいことが明らかとなった<sup>44, 61)</sup>。

一方、未処理 Aβ<sub>1-42</sub> (Fig. 2-2-1 A) に Aβ<sub>16-20</sub> を添加すると、8 時間後 (Fig. 2-2-1 B) には球状の凝集体 aggregate Aβ<sub>1-42</sub> が多数観察され、16 時間後 (Fig. 2-2-1 C) ではサイズの大きい凝集体がみられることがわかった。また、aggregate Aβ<sub>1-42</sub> のうち、0.22 μm 以上の LOA (Fig. 2-2-2 A) は、楕円形の球

状形態を呈し、最大幅と最小幅の標準偏差と平均値  $369 \pm 81$  nm,  $224 \pm 92$  nm の楕円形であった。これまでの報告では凝集体は 100 nm 程度とされていたので<sup>44)</sup>、これは大きいサイズの凝集体 LOA の作製法として、初めての報告である。0.22  $\mu$ m フィルターでろ過される大きさの amorphous A $\beta_{1-42}$ <sup>48)</sup> (Fig. 2-2-2 B)も楕円形だが、平均 100 nm 程度と、LOA よりもサイズが小さかった(Fig. 2-2)。

一方、前述のように、A $\beta_{1-42}$  は水溶液中で凝集性が高く、溶解が非常に困難であるといわれているため、A $\beta_{1-42}$  を溶解させるために 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールやエタノールなどの有機溶媒を用いる場合が多い。本研究では、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールを用いて A $\beta_{1-42}$  を溶解させ、可溶化 A $\beta_{1-42}$  とした(Fig. 2-2-1 F)。しかし、AFM 観察により、この条件でも完全に monomer 状態ではないことがわかった。これは、A $\beta_{1-42}$  表面の極性が非常に高く、また濃度も高いため完全に溶解できなかったためと考えた。そこで、可溶化 A $\beta_{1-42}$  溶液を超純水で 1000 倍希釈し、25 °C で 16 時間超音波処理を行って、完全に溶解させることを試みた。このサンプル(Fig. 2-2-1 G)では AFM の画像から、A $\beta_{1-42}$  凝集体の存在が確認されなかったことから、monomer A $\beta_{1-42}$  状態であると推測された。ただし、他のサンプルに比べて濃度が 1/100 であるために、検出できない可能性も否定できない。以上のように、AFM 観察により、A $\beta_{1-42}$  凝集体の様々な形状とサイズ、そして aggregate A $\beta_{1-42}$  および fibril A $\beta_{1-42}$  への凝集過程を明らかにすることができた(Fig. 2-2 ; Table 2-1)。

また、ThT 法により、凝集過程における aggregate A $\beta_{1-42}$  および fibril A $\beta_{1-42}$  表面の  $\beta$  シート構造について検討した(Fig. 2-3)。aggregate A $\beta_{1-42}$  形成過程における ThT の蛍光強度は、時間経過とともに低下したが、反応開始時の未処理 A $\beta_{1-42}$  で蛍光強度が高いことがわかった。これは、超純水に溶解した段階で、A $\beta_{1-42}$  が若干凝集し、すでに  $\beta$  シート構造を有していることを示している。A $\beta_{1-42}$  が fibril を形成する過程で  $\beta$  シート構造が増加し、ThT との反応性が高くなることが報告されている<sup>56)</sup>。未処理 A $\beta_{1-42}$  に A $\beta_{16-20}$  を添加し、16 時間凝集反応を行った後の aggregate A $\beta_{1-42}$  は、蛍光強度の低下が見られることから、 $\beta$  シート構造が減少していると考えられた。

本章では、ラット胎児海馬初代培養細胞(Fig. 2-4)に対する aggregate  $A\beta_{1-42}$  および fibril  $A\beta_{1-42}$  の細胞毒性を形態観察(Fig. 2-5)および ArrayScan (Cellomics) による定量解析(Fig. 2-6; Fig. 2-7)にて評価した。その結果、fibril  $A\beta_{1-42}$  よりも aggregate  $A\beta_{1-42}$  の方が高い毒性を示すことがわかった。ラット胎児海馬神経細胞を用いた凝集  $A\beta_{1-42}$  の毒性試験については、第 1 章背景で記述した ADDLs や ASPDs などに関する報告がある<sup>27,62)</sup>。ADDLs, ASPDs の分子量はそれぞれ 17-42 kDa, 約 128 kDa であり、本章で使用した aggregate  $A\beta_{1-42}$  よりも小さいと予測される。Klein らが行ったラット胎児海馬由来神経細胞に対する毒性試験でも、2-5 nm の  $A\beta_{1-42}$  凝集体および fibril  $A\beta_{1-42}$  を用いている<sup>62)</sup>。このように、これまでにサイズの小さい  $A\beta_{1-42}$  凝集体のラット胎児海馬神経細胞に対する細胞毒性試験は行われているが、本研究で作製したような大きいサイズの aggregate  $A\beta_{1-42}$  に対する毒性試験は報告されていないという点で、本研究は新規性がある。

## 2-5 結論

本章では、aggregate  $A\beta_{1-42}$ (LOA および amorphous), fibril  $A\beta_{1-42}$ , 可溶化  $A\beta_{1-42}$  など、それぞれサイズ、形状の異なる  $A\beta_{1-42}$  凝集体の作製を行った。これら凝集体の形状およびサイズを、AFM によって解析した。その結果、凝集体の作製方法によって凝集体の形状もサイズも異なること、特に aggregate  $A\beta_{1-42}$  および fibril  $A\beta_{1-42}$  では形状が全く異なることが明らかとなった。一方 ThT 法による蛍光測定結果より、aggregate  $A\beta_{1-42}$  および fibril  $A\beta_{1-42}$  の凝集過程における  $\beta$  シート構造形成の変化が数値として示された。aggregate  $A\beta_{1-42}$  および fibril  $A\beta_{1-42}$  のラット胎児海馬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明らかとなった。このように多様な形態の  $A\beta_{1-42}$  凝集体の作製に成功したので、次に凝集体のうち、aggregate  $A\beta_{1-42}$ , 可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体の作製へと研究を進めた。

### 第3章 各種 A $\beta$ <sub>1-42</sub>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

#### 3-1 緒論

生体内に病原菌などの異物が侵入すると、Bリンパ球からその病原菌に対する「抗体(Immunoglobulin)」が産生される。抗体は病原菌と特異的に結合して病原菌が生物に感染するのを抑制し、さらにマクロファージなどの白血球と協同して病原菌を生体内から効率良く除去することが知られている。このように抗体がその対応する物質(抗原)と結合する反応を抗原抗体反応と言う。抗体イムノグロブリン分子は2本のH鎖(重鎖)と2本のL鎖(軽鎖)がY字型に結合した基本構造から成るが、H鎖の一部の配列(定常領域)の違いによりIgG, IgM, IgA, IgE, IgDの五つのクラスに分類される<sup>63</sup>。IgMは基本の4本鎖構造が5つ結合した構造をとる(分子量約970kDa)。マウスでは、IgGクラスの抗体(分子量約170kDa)はさらにIgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>の4つのサブクラスに分けられている。抗原抗体反応を利用した抗原もしくは抗体の測定法を免疫学的検定法(Immunoassay)と呼び臨床診断薬や研究に利用されている<sup>32, 64</sup>。抗原抗体反応における抗原と抗体は、共有結合以外の力である水素結合、クーロン力、ファンデルワールス力などの力で結合している。結合の強さは、親和性と結合活性で表される。親和性は抗原と抗体の1:1での結合の強さであり、結合活性は結合している抗原と抗体すべての結合力である。

モノクローナル抗体作製については、1975年にKöhlerとMilsteinが細胞融合法を用いた方法を発見した<sup>65</sup>。1975年以降この細胞融合法によるモノクローナル抗体作製法が主流であり、Immunoassayを用いたさまざまな検出に利用されている<sup>66</sup>。これは、抗原で免疫したマウスの脾臓細胞とがん細胞であるミエローマ細胞を細胞融合して、1種類の抗体のみを産生し、かつ高い細胞増殖能をもつハイブリドーマを作製する技術である。

これまでのA $\beta$ <sub>1-42</sub>に対するモノクローナル抗体の作製の報告を以下に記す。monomer A $\beta$ <sub>1-42</sub>に対するモノクローナル抗体として、A $\beta$ <sub>1-42</sub>のN-末端に特異的に反応する抗体BA27(Takeda Chemical Industries, Osaka, Japan)が報告されている<sup>26</sup>。また、比較的小さなoligomer A $\beta$ <sub>1-42</sub>(~64 kDa)

に対する抗体として、6E10 モノクローナル抗体の作製例がある<sup>67)</sup>。しかし、サイズの大きい凝集体に対するモノクローナル抗体の作製例はほとんどなく、その構造についてはまだ詳細に解明がなされていない。したがって、今後凝集体の構造解析の上でもサイズの大きい凝集体に対するモノクローナル抗体が重要となる。抗体が認識する抗原部位であるエピトープの解析研究も行われている。A $\beta$ <sub>1-42</sub>におけるエピトープの解析例としては、A $\beta$ <sub>1-42</sub>の一部である 22 と 23 の折り返し部位を認識する 11A1 (Immuno-Biological Laboratories Inc.) モノクローナル抗体を用いて、oligomer 状の A $\beta$ <sub>1-42</sub> の構造を解析した報告がある<sup>68)</sup>。ただし、この報告では認識サイズの検討までは行われていない。

第 3 章では、第 2 章で述べた各種 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 凝集体に対するモノクローナル抗体を作製し、Immunoassay による各種凝集 A $\beta$ <sub>1-42</sub> の検出を目的とし、その特異性の検討を行った。特に aggregate A $\beta$ <sub>1-42</sub> 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について、ELISA 法を用いて検討した。凝集体形成過程における、A $\beta$ <sub>1-42</sub> とモノクローナル抗体との反応性の変化について分析した。さらに aggregate A $\beta$ <sub>1-42</sub> 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の認識する凝集体の特性について、ELISA を用いて解析した。また、可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 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について、ELISA を用いて検討した。さらに可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 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の認識する凝集体の特性について、ELISA を用いて解析した。

## 3-2 実験材料および実験方法

### 3-2-1 モノクローナル抗体の作製

以下のモノクローナル抗体作製における動物実験は日本大学生産工学部動物実験委員会の審査、認証を経て行った。本実験計画は平成 23 年 1 月 12 日に認証され、その認証番号は、第 AP10IT001 号である。

第 2 章で作製した aggregate A $\beta$ <sub>1-42</sub> および可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> を抗原としてマウス(BALB/c 8 週齢(雌))

に免疫した。抗原 0.1mg とアジュバント(complete または incomplete Freund's adjuvant ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を 100  $\mu$ l ずつ混合し, 20 分間振とうし, エマルジョンを作製した。作製したエマルジョン(抗原 30  $\mu$ g/回)をマウスの皮下へ注射し免疫した。この操作を 2 週間間隔で 3 回行った。

マウスに 3 回免疫を行った後, マウスに麻酔し, 尾静脈採血を行い血中抗体価の上昇を ELISA により確認した。血中抗体価の上昇を確認したのち, 抗原 30  $\mu$ g を追加免疫した。2 日後, 免疫したマウスに麻酔し, 心臓から血液を採取し, さらに麻酔剤を投与し, 安楽死させた。クリーンベンチ内でマウスの脾臓を摘出し, 無血清培地により 3 回洗浄した。洗浄した脾臓からメッシュにより細胞を分離し, 浮遊細胞に適した RPMI (Invitrogen) 培養液に浸した。この脾臓細胞とマウスミエローマ細胞 P3U1 細胞株を, 脾臓細胞:マウスミエローマ細胞=5:1 になるように混合し, ポリエチレングリコール 1500 (50% w/v polyethylene glycol 1500 in 75 mM HEPES; Roche) を用いて細胞融合を行った<sup>65,66</sup>。細胞融合後, 5 分間炭酸ガス培養器(37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)でインキュベートを行った後, 遠心分離により細胞を回収した。細胞に, ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン培地(HAT; Invitrogen)を含む RPMI (10%FCS 添加) 培養液を加えて懸濁し, 5 cell/100  $\mu$ l になるように細胞濃度を調整し, 96 well プレーートの各 well に 200  $\mu$ l ずつ播種した。炭酸ガス培養器(37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>)中で培養し, 約 10 日後, 各 well にコロニーを確認した後, 各 well の培養上清について, 下記のとおり, ELISA 法によるスクリーニング(3-2-2 参照)を行った。

スクリーニングで陽性の well については, さらに細胞を限界希釈法によりクローニングを行った。細胞を 96 well プレートから体積の大きい 24well プレートに移動させ, コロニー形成を確認した。その後, 24 well 中のコロニーを 1 コロニー/well となるように 96 well プレートに撒いた。各 well のコロニーが 1 つであることを確かめた上で, その培養上清をとり, ELISA により抗原との反応を確かめた。得られた抗体産生株をハイブリドーマの樹立株とした<sup>60,62</sup>。



### 3-2-2 抗体産生融合細胞株の ELISA ( Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)によるスクリーニング

ELISA とは、免疫検定法の一つで、抗原を 96 穴マイクロプレートなどの固相に固定し、抗体と反応後、酵素を結合した 2 次抗体と反応させて、最後に酵素反応による発色・発光で抗体との反応性を定量化する方法である。定量性および感度が良好なので、微量タンパク質抗原の検出や定量に用いられている<sup>69)</sup>。直接法、間接法、サンドウィッチ法などがあり、測定する物質の性質や量によって方法を選択する。

本実験では、96 穴マイクロプレート固相に固定する抗原として、免疫に使用したのと同じ aggregate A $\beta$ <sub>1-42</sub> および可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 抗原を使用した。比較対象として、fibril A $\beta$ <sub>1-42</sub>, monomer A $\beta$ <sub>1-42</sub> も固定化抗原として使用した。2-2 で作製した各種 A $\beta$  (0.22 mM)をダルベッコ PBS で希釈して 0.22  $\mu$ M (1  $\mu$ g/ml)に調製し、96 well ELISA プレート (F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE; Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY, USA) の各 well に 100  $\mu$ l (22 pmol)添加して固定化し、4  $^{\circ}$ C で 16 時間保温して各 well に抗原を吸着させた。抗原を吸引により除去し PBS-T(0.05% Tween20 を含む PBS)を 200  $\mu$ l/well 添加して洗浄を行った後、PBS-T を除去しブロッキングバッファー(イムノブロック, DS ファーマバイオメディカル)を 200  $\mu$ l/well 添加し、37  $^{\circ}$ C で 2 時間保温した。再び PBS-T (0.1% Tween を含む PBS) (200  $\mu$ l/well)により 3 回洗浄を行い、1 次抗体としてハイブリドーマ細胞培養上清を 100  $\mu$ l/well 添加 (ネガティブコントロールとして培養液のみ 100  $\mu$ l/well 添加)し、37  $^{\circ}$ C, 2 時間反応させた。PBS-T (200  $\mu$ l/well)により 3 回洗浄を行った後、2 次抗体として、horseradish peroxidase (HRP)標識した抗マウス IgG ヤギ由来抗体(SIGMA-ALDRICH)を 100  $\mu$ l/well (0.164  $\mu$ g/ml)添加し、37  $^{\circ}$ C, 2 時間反応させた。2 次抗体を除去した後 PBS-T (200  $\mu$ l/well)にて well を 5 回洗浄した。基質液としてリン酸-クエン酸緩衝液(phosphate-citrate buffer, pH 5.0) 25 ml に *o*-フェニレンジアミンジヒドロクロライド (OPD, SIGMA-ALDRICH) 10 mg, 30%過酸化水素水 5  $\mu$ l を添加した溶液を作製し、これを 100  $\mu$ l ずつ各 well に添加した。25  $^{\circ}$ C, 20 分間遮光して反応させた後、0.5 M硫酸 50  $\mu$ l/well を添加し酵素反応を停止させた。その後、マイクロ

プレートリーダーにより各 well の波長 492 nm における吸光度を測定した。

### 3-2-3 モノクローナル抗体のサブクラス解析

培養上清中のモノクローナル抗体のクラスおよびサブクラスの確認を行った。確認には IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche) および BIO-RAD # 172-2055 Mouse-Typer Isotyping Panel (BIO RAD) を用いた。クラスおよびサブクラスの確認は間接法 ELISA で行い、1 次抗体として各培養上清、2 次抗体としてクラスおよびサブクラスチェック試薬(ウサギ抗体)、3 次抗体として抗ウサギ IgG-HRP 標識抗体を使用し、波長 492 nm で吸光度を測定した。

### 3-2-4 ハイブリドーマ株のマウス腹腔内培養による抗体の増産

次に、ハイブリドーマ株のマウス腹腔内培養を行った。この腹水中には、培養上清に比べて 100~1000 倍高い濃度の抗体が含まれているので、抗体を増産する際にはよく用いられる方法である。マウス(BALB/c 10 週齢雄)に腹水中でのモノクローナル抗体産生時にアジュバント(免疫賦活剤)として使用されるプリスタン (2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン, SIGMA-ALDRICH) 0.5 ml を投与し、免疫系を活性化させた。10 日後、このマウスの腹腔内に、PBS で洗浄したハイブリドーマ細胞約  $1 \times 10^8$  cell/0.5 ml を移植した。腹腔内でハイブリドーマ細胞を増殖させ(1 週間から 2 週間)、 $A\beta_{1-42}$  モノクローナル抗体を含む腹水を得た。

### 3-2-5 セルロースアセテート膜電気泳動によるマウス腹水中抗体タンパク質の確認

マウス腹水内でモノクローナル抗体の増産を行った後、マウス腹水内の IgG タンパク質の確認を行うためにセルロースアセテート膜電気泳動を行った<sup>70)</sup>。腹水 1  $\mu$ l をとり、セルロースアセテート膜上に塗布し、バルビタール緩衝液(pH8.6)を用いて電気泳動した。泳動後に 0.1 M ニグロシン(アシッドブラック)により 2 時間以上染色し、2% 酢酸溶液で脱色して、IgG のバンドを確認した。

### 3-2-6 腹水からの抗体〈イムノグロブリン〉精製

マウス腹水中で増産したモノクローナル抗体を、イムノグロブリン IgG に特異的に結合するプロテイン G を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。Protein G は、黄色ブドウ球菌の細胞膜より単離されたタンパク質であり、IgG の Fc 領域(抗原結合部位とは異なる Y 字構造の根元部位)と特異的に結合する。同様に性質をもつ Protein A もよく用いられるが、IgG のサブタイプにより結合性が異なり、マウスでは IgG<sub>1</sub> は Protein A との結合性は低く、Protein G との結合性が高い。IgG<sub>2</sub> はどちらにも同じく高い結合性を示す。IgG を含むタンパク質液と Protein G を反応させ、洗浄後、結合した IgG を溶液の pH を変化させて溶出させ、回収する精製方法である。

注射器を用いてマウス腹水 10 ml を回収し、これに 0.2 M リン酸ナトリウム水溶液(pH7.0) 1.0 ml を加え、攪拌した。次に、この溶液に飽和硫酸アンモニウム水溶液(50%) 10 ml を氷上でゆっくりと加え、1 時間攪拌後、遠心分離(4 °C, 10,000 rpm, 10 分間)を行って沈殿を得た。沈殿を PBS で洗浄後、少量の 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)で沈殿物を溶解させ、20 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)に対して一晩透析した。透析後、フィルターろ過(0.45 µm, 東洋濾紙)により不溶物を除き、プロテイン G Sepharose カラム (1 ml, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより、モノクローナル抗体の精製を行った<sup>60,61</sup>。20 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)でカラムを平衡化し、透析したサンプル溶液をカラムに添加した。20 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)でカラムを洗浄し、0.1 M グリシン-HCl 緩衝液(pH 2.7-3.0)で IgG を溶出した。溶出液は、あらかじめ中和液 1.0 M Tris-HCl 緩衝液(pH9.0) を 100 µl ずつ添加したチューブに 1 ml ずつ分画し、合計 10 ml を回収した。各分画のタンパク質濃度を、波長 280 nm の吸光度から計算し、最も濃度の高い分画を回収し、再度一晩 PBS に対して透析した。

### 3-2-7 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による抗体精製の確認

3-2-5 で精製したモノクローナル抗体の確認を、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により行った。12.5%ポリアクリルアミドゲルを調製し、Tris-Glycine-SDS 泳動バッファー(pH 8.3)を用いて電気泳動を行った。抗体をゲルにアプライする際、処理液として、2-メルカプトエタノール(10%)を含む2倍濃縮電気泳動サンプル用バッファー(0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% Glycerol, 0.01% BPB)と2-メルカプトエタノールを含まない2倍濃縮電気泳動サンプル用バッファーを使用した。メルカプトエタノールは還元作用があり、抗体のS-S結合を切断する働きを持つ。電気泳動時にサンプルバッファーとモノクローナル抗体溶液を体積比1:1で希釈し、2-メルカプトエタノールを添加したサンプルは、泳動前に95℃で3分間熱処理し、2-メルカプトエタノールを添加しないサンプルは熱処理せずに、各レーンに注入した。泳動後にクマシーブリリアントブルーによるゲル染色を行った。

### 3-2-8 ELISAによるモノクローナル抗体反応性の比較検討

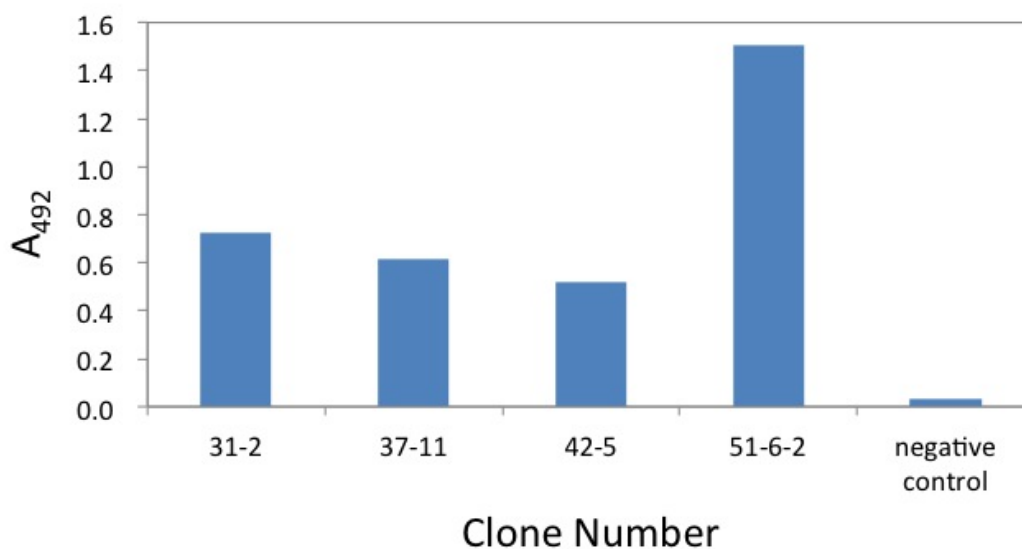
アフィニティークロマトグラフィーにより精製済みの、腹水由来のモノクローナル抗体を用いてELISAを行い、各抗体の反応特異性を比較検討した。

抗原として2-2で作製した aggregate A $\beta$ <sub>1-42</sub>, LOA, amorphous A $\beta$ <sub>1-42</sub>, 可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub>, fibril A $\beta$ <sub>1-42</sub>, monomer A $\beta$ <sub>1-42</sub>, A $\beta$ <sub>16-20</sub>の各形状A $\beta$ を用いた。濃度依存的反応を検出する実験(Fig. 3-4, Fig. 3-11)以外においては、各種A $\beta$  (0.22 mM) をダルベッコPBSで希釈し、0.22  $\mu$ M (1  $\mu$ g/ml) に調製し、96 well ELISAプレートの各wellに100  $\mu$ l (22 pmol) 添加して固定化し、3-2-2に示した方法で反応および検出を行った。1次抗体であるモノクローナル抗体は、特に指定がない場合は0.2  $\mu$ g/wellで使用した。

### 3-3 結果

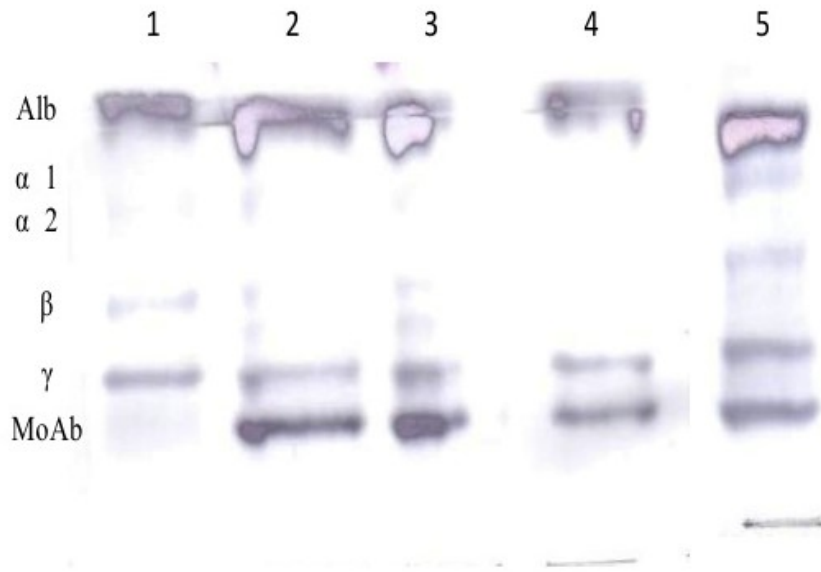
#### 3-3-1 aggregate A $\beta_{1-42}$ に対するモノクローナル抗体の作製とその反応性の検討

aggregate A $\beta_{1-42}$  をマウスに免疫し、脾臓細胞とミエローマ細胞の細胞融合を行った後、960 well に融合細胞を播種した。ELISA によるスクリーニングで抗原と反応した well の細胞について、限界希釈法により細胞クローニングをして、ハイブリドーマを樹立した。その後、それぞれのハイブリドーマ株の産生した抗体(細胞培養上清)を用いて再び ELISA を行い、モノクローナル抗体を抗原 aggregate A $\beta_{1-42}$ , 22 pmol/well (濃度 1  $\mu$ g/ml を 100  $\mu$ l/well 分注), 抗体濃度 2  $\mu$ g/ml の条件で、抗原との反応性について確認した(Fig. 3-1)。ネガティブコントロールの培養液のみの場合と比較して、aggregate A $\beta_{1-42}$  に対して反応性 (波長 492 nm 吸光度)の高い 4 クローンのハイブリドーマ株 31-2, 37-11, 42-5, 51-6-2 が得られた。これらのモノクローナル抗体のサブクラスを IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit により確認したところ 4 クローンすべて IgG<sub>1</sub> クラスであった。3-2-6 で述べたように、IgG<sub>1</sub> の場合は Protein G によるアフィニティ精製が適している。



**Fig. 3-1 Aggregate A $\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体の作製**  
抗体濃度2 $\mu$ g/mlの条件で, Aggregate A $\beta_{1-42}$  (22pmol/well) との反応性をELISAで検出した。

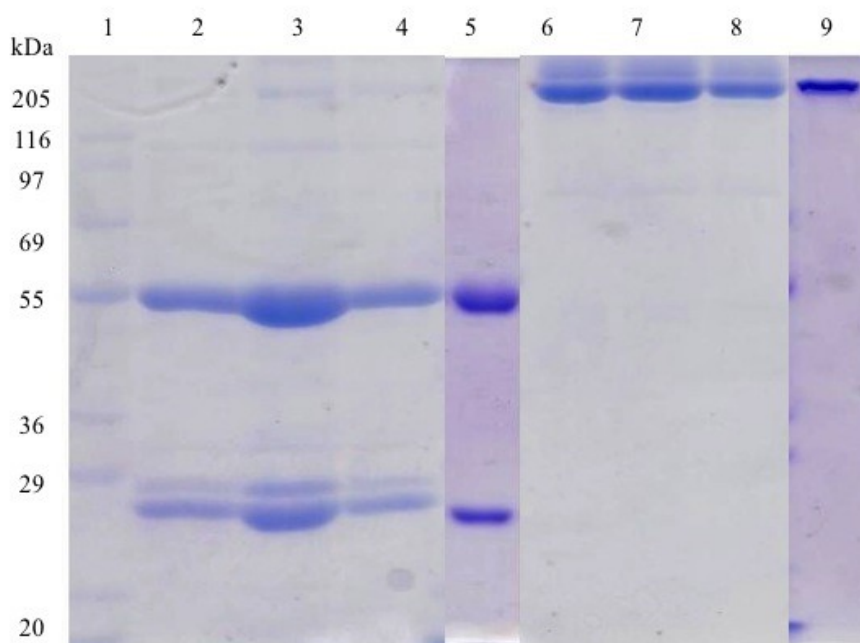
マウス腹腔中培養の後、その腹水を用いてセルロースアセテート膜電気泳動によりモノクローナル抗体 IgG の各バンドを確認した(Fig. 3-2)。4 クローンすべてにおいてモノクローナル抗体部



**Fig. 3-2 セルロースアセテート膜電気泳動によるマウス腹水中で増産したaggregate  $A\beta_{1-42}$ に対するモノクローナル抗体の確認**

イムノグロブリン $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 鎖およびアルブミン(Alb)

サンプル 1; 正常マウス血清, 2; No. 31-2 clone, Lane 3; No. 37-11 clone, Lane 4; No. 42-5 clone, Lane 5; No. 51-6-2 cloneをそれぞれ腹水中で培養したサンプル。



**Fig. 3-3 SDS-ポリアクリルアミド ゲル電気泳動によるaggregate A $\beta_{1-42}$ に対する精製モノクローナル抗体の確認**

サンプル 1; 分子量Marker, Lane 2と 6; No. 31-2, Lane 3 と7; 37-11, Lane 4 と 8; 42-5, Lane 5 と 9; 51-6-2 各クローン由来の抗体。Lane 2-5; 還元処理下, Lane 6-9; 非還元処理下。

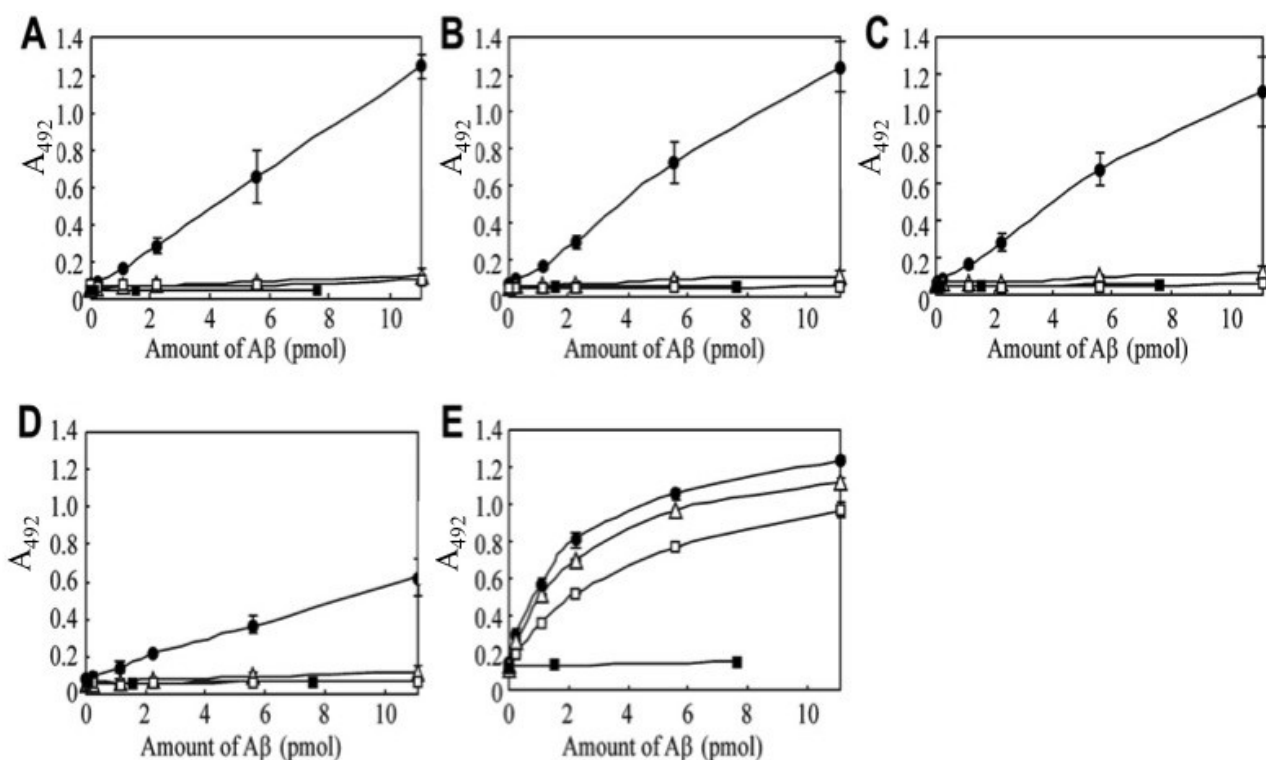
位にバンドが確認された。硫酸アンモニウムによる塩析後、Protein G カラムによるアフィニティークロマトグラフィーを用いてモノクローナル抗体を精製し、得られたモノクローナル抗体を還元処理下および非還元処理下で、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によりバンドを確認した。サンプルの還元処理とは、2-メルカプトエタノールを加えて熱処理することで、この処理により内部の S-S 結合が還元されて、抗体イムノグロブリンは、分子量約 50 kDa の H 鎖と分子量約 25 kDa の L 鎖に分かれる。Fig. 3-3 の Lane 2-5 は還元処理下, 6-9 は非還元処理下に、おける SDS-PAGE の結果であり、Lane 1 は分子量マーカー、Lane 2, 6 は 31-2, Lane 3, 7 は 37-11, Lane 4, 8 は 42-5, Lane 5, 9 は 51-6-2 クローンの産生抗体を示す。非還元処理下(Lane 6-9) では、いずれの抗体も抗体全体の分子量である 200 kDa 付近にバンドが、還元処理下(Lane 2-5)では 50 kDa と 25 kDa のバンドが確認できた。還元処理下、非還元処理下ともに抗体の分子量と一致しており、腹水中に存在していた他のタンパク質のバンドが現れていないことから、モノクローナル抗体の精製が確かめられた。

### 3-3-2 aggregate A $\beta_{1-42}$ に対するモノクローナル抗体の特異性の検討

aggregate A $\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体 31-2, 37-11, 42-5, 51-6-2 を精製し, それらのモノクローナル抗体の aggregate A $\beta_{1-42}$  に対する反応性および特異性を, ELISA によって調べた。抗原としては, 第 2 章で作製した aggregate A $\beta_{1-42}$  を用いた。また, 比較として fibril A $\beta_{1-42}$ , monomer A $\beta_{1-42}$ , A $\beta_{16-20}$  に対する反応性も検討した。さらに対照実験として市販のモノクローナル抗体 82E1 (Immuno-Biological Laboratories Inc., Minneapolis, MN) を用い, 本研究で作製したモノクローナル抗体との比較を行った。

様々な形状の A $\beta_{1-42}$  凝集体抗原に対する各モノクローナル抗体の ELISA 反応性(波長 492 nm 吸光度)を Fig. 3-4 に示した。各抗原のタンパク質量 0-11 pmol(横軸)の範囲で測定したところ, 31-2, 37-11, 42-5, 51-6-2 (それぞれ Fig.3-4 A, B, C, D) いずれの抗体においても aggregate A $\beta_{1-42}$  に対して反応した。一方, monomer A $\beta_{1-42}$ , fibril A $\beta_{1-42}$  に対しては高濃度側でも反応性は低かった。したがって, これらのモノクローナル抗体は, aggregate A $\beta_{1-42}$  に対して特異的な反応性を示すことが明らかとなった。11 pmol における fibril A $\beta_{1-42}$  および monomer A $\beta_{1-42}$  への反応性(aggregate A $\beta_{1-42}$  への反応性を 100%としたときの比率)を Table 3-1 に示す。31-2, 37-11, 42-5 抗体の monomer A $\beta_{1-42}$  に対する反応性は aggregate A $\beta_{1-42}$  に対する反応の 10%以下であり非常に低かった。一方, 対照として市販のモノクローナル抗体 82E1 モノクローナル抗体を用いた場合には, aggregate A $\beta_{1-42}$ , monomer A $\beta_{1-42}$ , fibril A $\beta_{1-42}$  すべてに対してほぼ同程度の反応性がみられた(Fig. 3-4 E)。したがって, 本研究では aggregate A $\beta_{1-42}$  に対する特異性の高いモノクローナル抗体が作製できたと言える。次に, 本研究で得られた抗体が, aggregate A $\beta_{1-42}$  のうちどのサイズの aggregate と反応するかについて検討した。aggregate A $\beta_{1-42}$  を 0.22  $\mu$ m のフィルターで限外ろ過(遠心 500 rpm, 5 分間)し, このフィルターを通過した画分 amorphous A $\beta_{1-42}$  を, 順次 1000 kDa, 300 kDa, 100 kDa, 30 kDa, 10 kDa のフィルターを用いて限外ろ過(遠心 500 rpm, 5 分間)を行った。各分画の amorphous A $\beta_{1-42}$  の濃度を吸光度(波長: 280 nm における吸収  $A_{280}=1$  を 1 mg/ml として計算)から求め, 1  $\mu$ g/ml に調製して各 well あたり 100  $\mu$ l 撒いた。すなわち各 well あたりのタンパク質量は 22 pmol となるよ





**Fig. 3-4 ELISAによるaggregate  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体の反応性評価.**

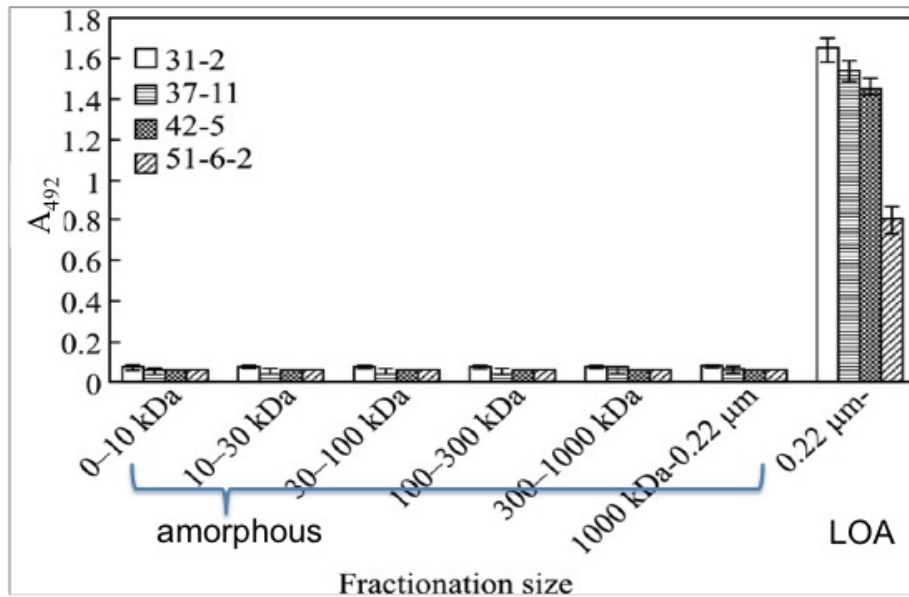
モノクローナル抗体 31-2 (A), 37-11 (B), 42-5 (C), 51-6-2 (D) and 82E1 (E) について, aggregate  $A\beta_{1-42}$  (●), fibril  $A\beta_{1-42}$  (△),  $A\beta_{16-20}$  (■), and monomer  $A\beta_{1-42}$  (□) との濃度依存反応性について ELISA によって検討した。ODが高い方が反応性が高い。各モノクローナル抗体の濃度は2  $\mu\text{g/ml}$  (0.2  $\mu\text{g/well}$ )。82E1 は市販のモノクローナル抗体で, どの形態の $A\beta$ とも反応した。

**Table 3-1 Aggregate  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体各クローンのmonomer  $A\beta_{1-42}$  および fibril  $A\beta_{1-42}$  に対する反応性.**

	monomer (%) <sup>1)</sup>	fibril (%) <sup>1)</sup>
31-2	8.3	7.1
37-11	5.1	9.1
42-5	5.4	11.1
51-6-2	11.6	17.7

1) aggregate  $A\beta_{1-42}$  に対するELISA反応値を100%としたときの値を示す

うに調製した。Fig. 3-5 に示すように, 各分子量分画について, モノクローナル抗体各クローン (31-2, 37-11, 42-5, 51-6-2) に対する反応性を ELISA により測定した (波長 492 nm 吸光度)。モノクローナル抗体はいずれも, 0.22  $\mu\text{m}$  フィルター以上のサイズの, LOA  $A\beta_{1-42}$  (0.22  $\mu\text{m}$  残渣; 2 章参照) 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。中でもクローン 31-2 は LOA に対する反応性が特に高いことが示唆されたので,

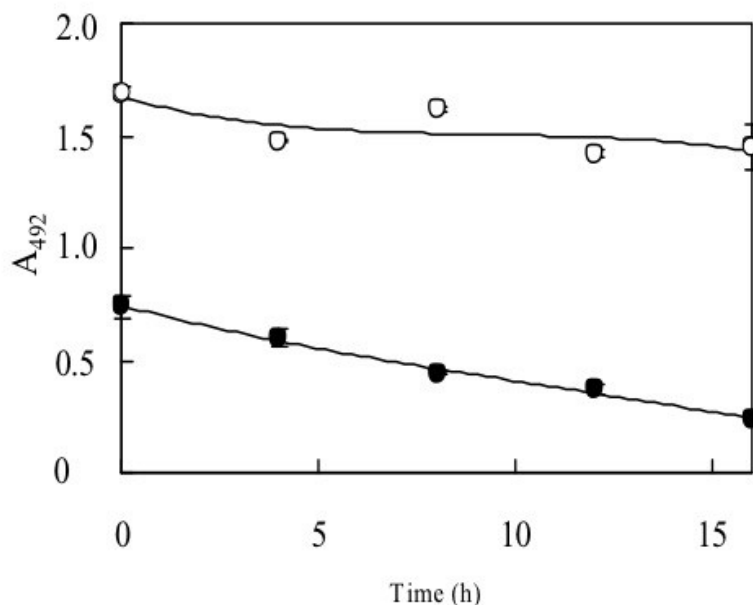


**Fig. 3-5 Aggregate  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体 31-2, 37-11, 42-5 および 51-6-2 クローンの aggregate  $A\beta_{1-42}$  サイズによる反応性の違い.**

aggregate  $A\beta_{1-42}$  をさらに0.22  $\mu\text{m}$ フィルターを用いて分画し, 0.22  $\mu\text{m}$ 以上のLOAと以下のamorphous  $A\beta_{1-42}$ に分けた。さらにamorphous  $A\beta_{1-42}$ を1000, 300, 100, 30, and 10 kDa フィルターでサイズに従って分画し, 各分画22pmol/well について, 4クローンの抗体との反応性をELISAで評価した。4クローンの抗体ともに, amorphous  $A\beta_{1-42}$ に対する反応性は低く, LOA (0.22  $\mu\text{m}$ -)に高い反応性を示した。特に クローン31-2 はLOA (0.22  $\mu\text{m}$ -)に対する反応が高かった。

aggregate  $A\beta_{1-42}$  形成過程におけるモノクローナル抗体の反応性の変化へ実験を進めた。

aggregate  $A\beta_{1-42}$  および fibril  $A\beta_{1-42}$  の形成過程における抗 aggregate  $A\beta_{1-42}$  抗体 31-2 に対する反応性の時間変化を, ELISA により測定した(Fig. 3-6)。未処理  $A\beta_{1-42}$  に  $A\beta_{16-20}$  を添加した場合(aggregate  $A\beta_{1-42}$  形成)と添加しない場合(fibril  $A\beta_{1-42}$  形成)について, 調べたところ,  $A\beta_{16-20}$  を添加した場合は, 凝集反応開始直後で反応性が高く, 時間変化とともに吸光度の変化が見られなかった。一方,  $A\beta_{16-20}$  を添加しない場合は, 抗体の反応性は, 反応開始時で添加した場合の反応性の 1/2 程度であり, さらに時間経過とともに反応が低下していることから, 時間経過とともに, 31-2 抗体と反応性の低い fibril 状に形状が変化したことが示唆された。



**Fig. 3-6 Aggregate Aβ<sub>1-42</sub> およびfibril Aβ<sub>1-42</sub>形成過程におけるモノクローナル抗体31-2との反応性の変化**

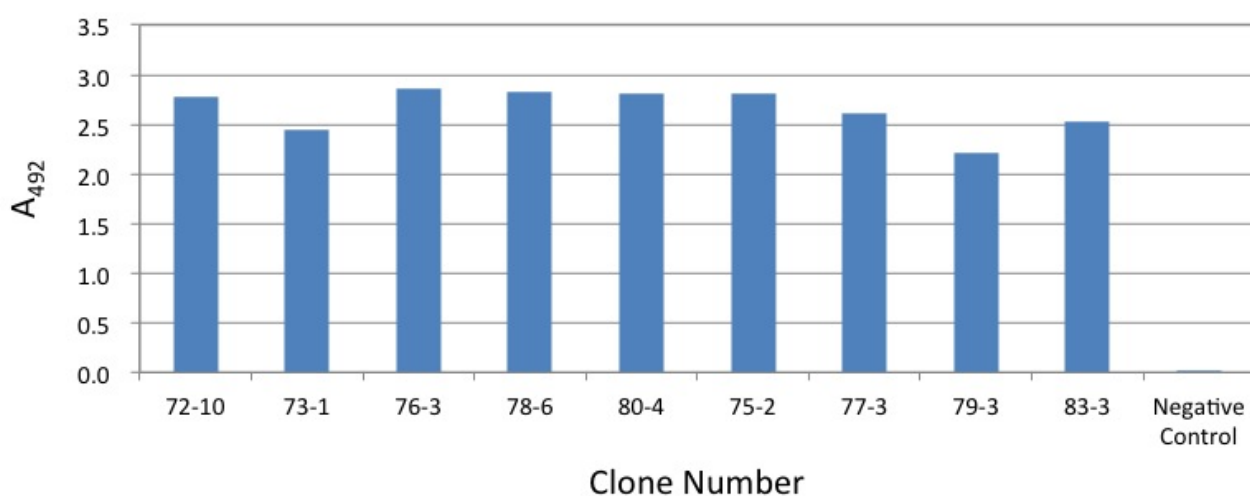
未処理Aβ<sub>1-42</sub>をAβ<sub>16-20</sub>を添加(○)または非添加(●)条件下で凝集させ、それぞれaggregate Aβ<sub>1-42</sub>(○)およびfibril Aβ<sub>1-42</sub>(●)を形成させた。Aβ<sub>1-42</sub>凝集体とモノクローナル抗体31-2との反応性を、時間を追ってELISAによって検出した。

### 3-3-3 可溶性 Aβ<sub>1-42</sub> に対するモノクローナル抗体の作製とその反応性の検討

可溶性 Aβ<sub>1-42</sub> をマウスに免疫し、脾臓細胞とミエローマ細胞の細胞融合を行った後、960 well に融合細胞を播種した。それぞれのハイブリドーマ株の細胞培養上清を用いて、可溶性 Aβ<sub>1-42</sub> 22 pmol/well(濃度 1 μg/ml を 100 μl/well 分注)を抗原とし、抗体濃度 2 μg/ml の条件で、ELISA によるスクリーニングを行った。抗原と反応した well の細胞を選出し、細胞が複数クローンから成る可能性もあるので、限界希釈法(1well あたり 1 細胞になるように細胞を撒く)によりクローニングを行って、ハイブリドーマクローンを樹立した。それぞれのハイブリドーマ株の細胞培養上清を用いて上記条件で ELISA を行い、抗原との反応性を確認した。その結果を Fig. 3-7 に示した。ELISA の結果、ネガティブコントロールである培養液のみの場合と比較して、可溶性 Aβ<sub>1-42</sub> 溶液に対して高い反応性(発色 492 nm 吸光度)を示す 9 クローンのハイブリドーマ株, 72-10, 73-1, 76-3, 78-6,

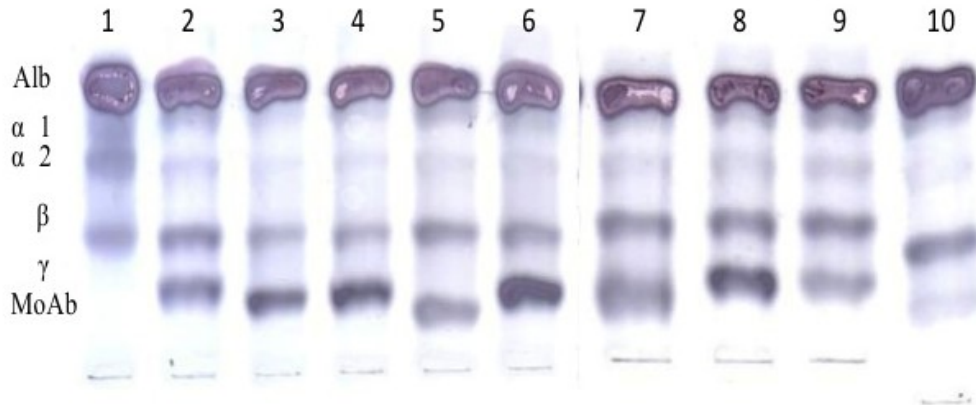
80-4, 75-2, 77-3, 79-3, 83-3 が得られた。これらのモノクローナル抗体のサブクラスを BIO-RAD #172-2055 Mouse-Typer Isotyping Panel により確認したところ 9 クローンすべて IgG<sub>2</sub> クラスであった。

マウス腹腔中培養の後、その腹水を用いてセルロースアセテート膜電気泳動によりモノクローナル抗体 IgG の各バンドを確認した(Fig. 3-8)。9 つのハイブリドーマ株すべてにおいて、イムノグロブリン(抗体)サイズにバンドが確認された。硫酸アンモニウムによる塩析後、Protein G カラ



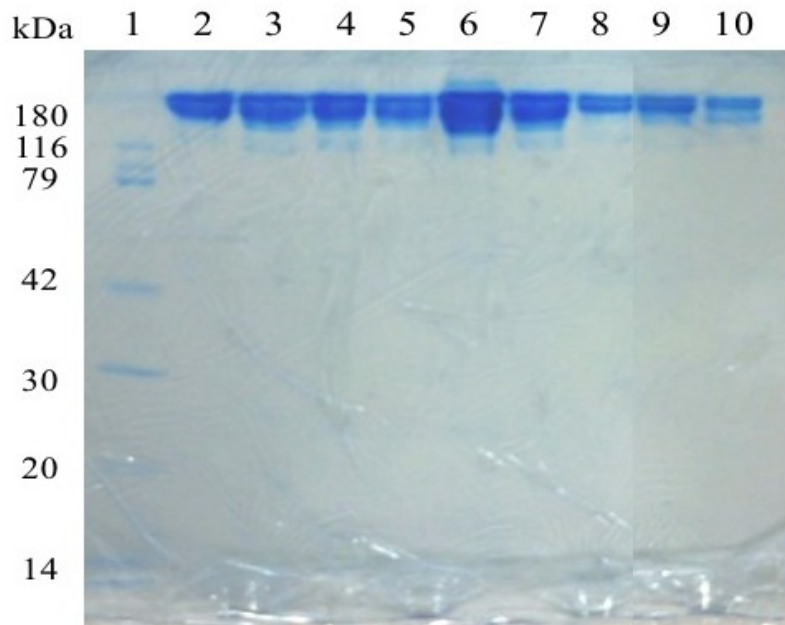
**Fig. 3-7 可溶化A $\beta$ <sub>1-42</sub>に対するモノクローナル抗体の作製**

可溶化A $\beta$ <sub>1-42</sub>溶液に対して反応性を示す9クローンのハイブリドーマ株, 72-10, 73-1, 76-3, 78-6, 80-4, 75-2, 77-3, 79-3, 83-3について可溶化A $\beta$ <sub>1-42</sub>に対する反応性をELISAを用いて比較した。



**Fig. 3-8 セルロースアセテート膜電気泳動によるマウス腹水中で増産した可溶性Aβ<sub>1-42</sub>に対するモノクローナル抗体の確認**

Lane 1;正常マウス血清, Lane 2; 72-10, Lane 3; 73-1, Lane 4; 76-3, Lane 5; 78-6, Lane 6; 80-4, Lane 7; 75-2, Lane 8; 77-3, Lane 9; 79-3, Lane 10; 83-3 の各ハイブリドーマクローンを注射したマウスから得られた腹水を, 電気泳動サンプルとした。左側に, モノクローナル抗体(MoAb)のイムノグロブリンα1, α2, β, γ鎖およびアルブミン(Alb)の泳動位置を示した。



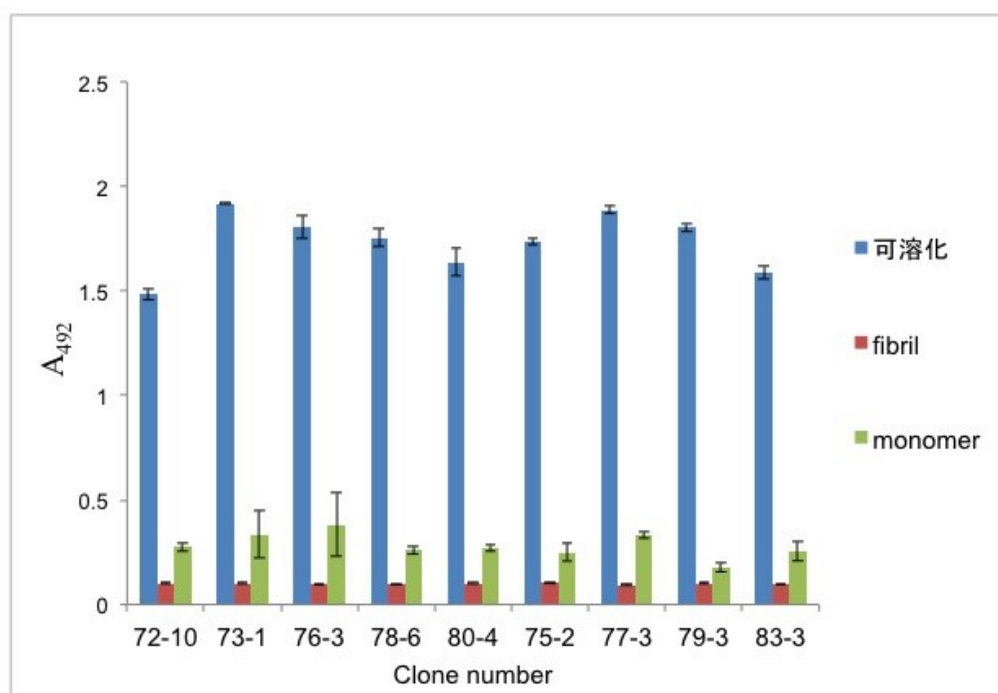
**Fig. 3-9 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による可溶性Aβ<sub>1-42</sub>に対する精製モノクローナル抗体の確認**

Lane 1; 分子量Marker, Lane 2; 72-10, Lane 3; 73-1, Lane 4; 76-3, Lane 5; 78-6, Lane 6; 80-4, Lane 7; 75-2, Lane 8; 77-3, Lane 9; 79-3, Lane 10; 83-3 の各ハイブリドーマクローン由来の抗体をサンプルとし, 非還元下で電気泳動を行った。

ムによるアフィニティークロマトグラフィーを用いてモノクローナル抗体を精製し，得られたモノクローナル抗体を還元処理下および非還元処理下で，SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によりバンドを確認した(3-3-1 参照)(Fig. 3-9)。いずれの抗体においても抗体，イムノグロブリン(抗体)の分子量である 200 kDa 付近にバンドが現れており，腹水中に存在していた他のタンパク質も現れていないことからモノクローナル抗体の精製に成功した。

### 3-3-4 可溶化 A $\beta_{1-42}$ に対するモノクローナル抗体の特異性の検討

第 3 章で作製した可溶化 A $\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体の反応性を評価するため，ELISA を行った。抗原として可溶化 A $\beta_{1-42}$  溶液，fibril A $\beta_{1-42}$ ，monomer A $\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体の反応性を ELISA により確認した(Fig. 3-10)。各 A $\beta_{1-42}$  の濃度を吸光度(波長：280 nm における吸収 A<sub>280</sub>=1 を 1 mg/ml として計算)から求め，1  $\mu$ g/ml に調製して各 well あたりタンパク質量 22



**Fig. 3-10 可溶化A $\beta_{1-42}$ に対するモノクローナル抗体各クローンの可溶化A $\beta_{1-42}$ ，fibril A $\beta_{1-42}$ ，monomer A $\beta_{1-42}$ に対する反応性の比較**

可溶化A $\beta_{1-42}$ に対するモノクローナル抗体各クローン，72-10，73-1，76-3，78-6，80-4，75-2，77-3，79-3，83-3について可溶化A $\beta_{1-42}$ ，fibril A $\beta_{1-42}$ ，monomer A $\beta_{1-42}$ に対する反応性をELISAを用いて比較した。いずれのクローンも，可溶化A $\beta_{1-42}$ に対する特異性が高く，fibrilやmonomerとはほとんど反応しないことがわかった。

pmol となるように入れた。可溶化 A $\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体 9 クローンは、可溶化 A $\beta_{1-42}$  に対する反応性 (波長 492 nm 吸光度) は高いが、monomer, fibril に対しては反応性が低いことがわかった。monomer A $\beta_{1-42}$  および fibril A $\beta_{1-42}$  に対する反応性(可溶化 A $\beta_{1-42}$  に対する反応を 100% としたときの反応比)を Table 3-2 にまとめた。

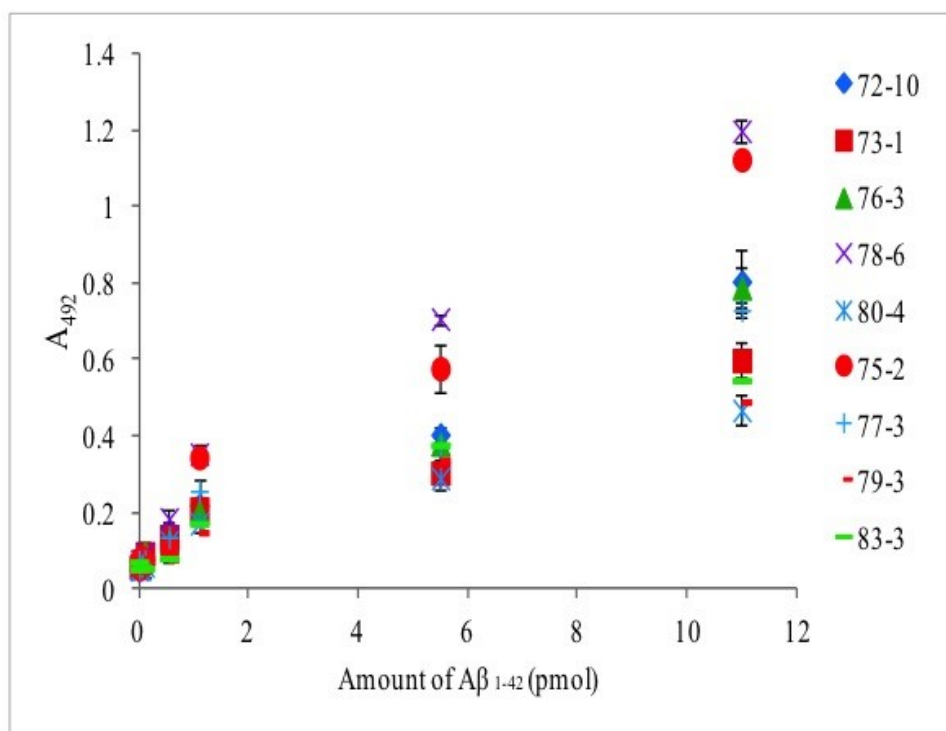
**Table 3-2 可溶化A $\beta_{1-42}$ に対するモノクローナル抗体各クローンのmonomer A $\beta_{1-42}$  および fibril A $\beta_{1-42}$ に対する反応性.**

	monomer (%) <sup>1)</sup>	fibril (%) <sup>1)</sup>
72-10	18.6	6.8
73-1	17.5	5.2
76-3	21.1	5.4
78-6	14.9	5.4
80-4	16.5	6.2
75-2	14.3	5.9
77-3	17.6	5.0
79-3	9.8	5.7
83-3	16.0	6.1

1) 可溶化A $\beta_{1-42}$ に対するELISA反応値を100%としたときの値を示した。

Table 3-2 より monomer A $\beta_{1-42}$  に対する反応性では、76-3 抗体で 21.1%と最も高く、79-3 抗体で 9.8%と最も低い値となった。また、fibril に対しての反応性はすべてのクローンにおいて可溶化 A $\beta_{1-42}$  に対する反応の 10%以下であった。したがって、得られた 9 クローンのモノクローナル抗体は、可溶化 A $\beta_{1-42}$  に特異的に高い反応性を示すことがわかった。

次に、可溶化 A $\beta_{1-42}$  に対するこれら 9 クローンのモノクローナル抗体の可溶化 A $\beta_{1-42}$  抗原量ごとの反応性を調べるために ELISA により検討を行った(Fig. 3-11)。すべての抗体において、可溶化 A $\beta_{1-42}$  の量に比例して吸光度が増加した。また 78-6 および 75-2 が最も可溶化 A $\beta_{1-42}$  に対して反応性が高いことが示唆された。

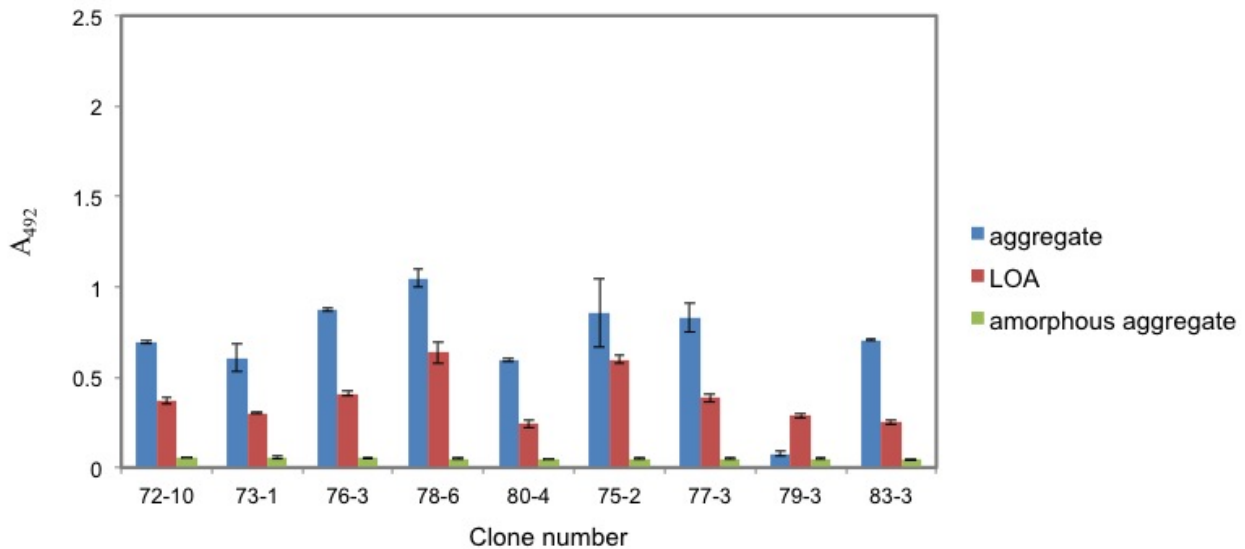


**Fig. 3-11 可溶化Aβ<sub>1-42</sub>に対するモノクローナル抗体各クローンの可溶化Aβ<sub>1-42</sub>に対する抗原量依存的ELISA反応**

可溶化Aβ<sub>1-42</sub>溶液に対して反応性を示す9クローンのハイブリドーマ株, 72-10, 73-1, 76-3, 78-6, 80-4, 75-2, 77-3, 79-3, 83-3について可溶化Aβ<sub>1-42</sub>Aの濃度を0-12 pmolの間で変化させた場合の反応性をELISAによって検出した。78-6抗体が最も可溶化Aβ<sub>1-42</sub>に対して反応性が高かった。

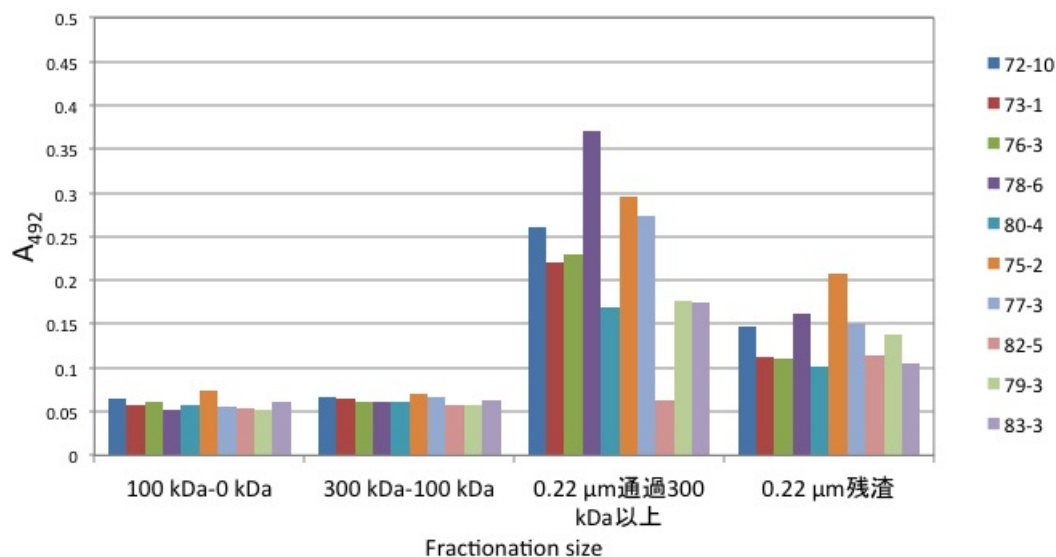
さらに他の凝集 Aβ<sub>1-42</sub> との反応性を調べるため, aggregate Aβ<sub>1-42</sub>, LOA, amorphous aggregate Aβ<sub>1-42</sub> それぞれの凝集体を抗原とし, 9 クローンに対する反応性を ELISA により検討した(Fig. 3-12)。各 Aβ<sub>1-42</sub> の濃度を吸光度(波長: 280 nm における吸収 A<sub>280</sub>=1 を 1 mg/ml として計算)から求め, 1 μg/ml に調製して各 well あたりタンパク質量 22 pmol となるように入れた。79-3 を除くクローンは, aggregate Aβ<sub>1-42</sub> に対しても反応性を示すことがわかった。aggregate に対する反応性は, 可溶化 Aβ<sub>1-42</sub> に対する反応性(Fig. 3-10)と比較して, 約 50%の値を示したが, LOA に対する反応性はさらに低かった。これらの結果より, 特に 79-3 抗体は, 可溶化 Aβ<sub>1-42</sub> に対して特異性の高いモノクローナル抗体であるということが示唆された。





**Fig. 3-12** 可溶化Aβ<sub>1-42</sub>に対するモノクローナル抗体各クローンのaggregate Aβ<sub>1-42</sub>, LOA, amorphous Aβ<sub>1-42</sub>に対する反応性の比較

可溶化Aβ<sub>1-42</sub>に対するモノクローナル抗体各クローン, 72-10, 73-1, 76-3, 78-6, 80-4, 75-2, 77-3, 79-3, 83-3についてaggregate Aβ<sub>1-42</sub>, LOA, amorphous Aβ<sub>1-42</sub>に対する反応性をELISAを用いて比較した。Fig.3-10に示した可溶化Aβ<sub>1-42</sub>に対する反応性と比較すると, aggregate Aβ<sub>1-42</sub>では半分以下, LOAやamorphousではさらに低い値を示した。79-3はaggregate Aβ<sub>1-42</sub>にほとんど反応しなかった。従って, 79-3モノクローナル抗体が可溶化Aβ<sub>1-42</sub>に対して最も特異性が高いということになる。



**Fig. 3-13** 可溶化Aβ<sub>1-42</sub>に対するモノクローナル抗体各クローンの可溶化Aβ<sub>1-42</sub> サイズによる反応性の違い。

可溶化Aβ<sub>1-42</sub>を0.22 μmフィルターを用いて分画し, 通過画分と残渣に分けた。さらに通過画分をさらに300kDaおよび100kDa フィルターで分子量に従って分け, 可溶化Aβ<sub>1-42</sub>に対するモノクローナル抗体各クローンとの反応性をELISAで評価した。0.22 μm通過画分のうち300 kDa以上の分画で最も高い反応性がみられた。

Fig.2-2 に示したように、可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> にも多様な大きさの凝集体が混在している。そのため、可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> に対するモノクローナル抗体が、どの大きさの可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> と反応するのかについて検討した。可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 溶液を 0.22  $\mu$ m, 300 kDa, 100 kDa フィルターにより限外濾過を行い、各分画に対する反応性を ELISA により検討した(Fig. 3-13)。各分画のタンパク量は波長：280 nm における吸収 A<sub>280</sub>=1 を 1 mg/ml として計算から求め、1  $\mu$ g/ml に調製して各 well あたりタンパク質量 22 pmol となるように入れた。この結果から、これらの抗体は、少しずつ反応性に違いはあるものの、0.22  $\mu$ m のフィルターは通過しかつ 300 kDa 以上の画分の A $\beta$ <sub>1-42</sub> に対する特異性が高いことが示唆された。

### 3-4 考察

本章では、A $\beta$ <sub>1-42</sub> 凝集体に対するモノクローナル抗体の作製を行った。モノクローナル抗体の作製は、1975 年に Köhler と Milstein による細胞融合による方法<sup>65)</sup>が確立されて以来、一般的な抗体作製法として用いられている。

第 2 章で作製した aggregate A $\beta$ <sub>1-42</sub> または可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> を抗原として、マウス(BALB/c 8 週齢/雌)に免疫した。脾臓細胞とマウスミエローマ細胞を細胞融合し、HAT 培地で融合細胞を選択し、ハイブリドーマを作製した。培養上清を用いたスクリーニングの後、aggregate A $\beta$ <sub>1-42</sub> または可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> に対する反応性の高い細胞を選択した。陽性の細胞についてはさらに細胞クローニングを行い、モノクローナル抗体を産生するクローンを得た。モノクローナル抗体を大量に得るために、各クローンをマウス腹腔中に注入し、得られた腹水から、プロテイン G によるアフィニティ・クロマトグラフィーを用いて、抗体 IgG を精製した。腹水中の抗体 IgG の存在についてはアセテート膜電気泳動により(Fig. 3-2, Fig.3-8)、抗体 IgG の精製については SDS ポリアクリルアミド電気泳動により(Fig. 3-3, Fig. 3-9) 確認した。抗体のクラス・サブクラスは、キットを用いて判定した。最初のスクリーニングでは 5 量体の IgM 抗体を産生するクローンも含まれていたが、定量的な免疫検定法には 2 量体の IgG が適しているので、IgG 抗体を産生するクローンを選んで用いた。

aggregate  $A\beta_{1-42}$  に対して反応性の高い 4 クローンハイブリドーマ株由来の精製モノクローナル抗体 31-2, 37-11, 42-5, 51-6-2 について、詳細に ELISA 解析した(Fig. 3-1)。いずれの抗体においても monomer  $A\beta_{1-42}$ , fibril  $A\beta_{1-42}$  に対する交差反応性は低く、31-2 および 37-11 に関しては monomer  $A\beta_{1-42}$ , fibril  $A\beta_{1-42}$  とともに交差反応性は 10%以下であった。(Fig. 3-4, Table 3-1)。aggregate  $A\beta_{1-42}$  をポアサイズ  $0.22 \mu\text{m}$  のフィルターで分画してフィルターに残る残渣(LOA)と通過する画分 amorphous  $A\beta_{1-42}$  に分け、さらに amorphous  $A\beta_{1-42}$  を、分子量フィルターで分画したところ、モノクローナル抗体はいずれも、 $0.22 \mu\text{m}$  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、 $0.22 \mu\text{m}$  通過分のサイズの amorphous  $A\beta_{1-42}$  とは反応性が低いことが示唆された(Fig.3-5)。本研究では、サイズの大きい  $A\beta_{1-42}$  凝集体を作製し、それに対するモノクローナル抗体を作製した。その理由として、レビー小体認知症患者の脳内において  $20-40 \mu\text{m}$  の非常に大きい  $A\beta$  の存在が示されている<sup>65)</sup>こと、また、 $A\beta_{1-42}$  が主成分である老人斑も数  $10 \text{ nm}$  の塊であることが挙げられる。したがって、脳内にはサイズの大きい  $A\beta_{1-42}$  凝集体の存在も十分に考えられ、本研究で得られた aggregate  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体をアルツハイマー病の病因研究や診断に応用できる可能性がある。aggregate  $A\beta_{1-42}$ , fibril  $A\beta_{1-42}$  の形成過程における抗体反応性の変化について調べたところ、31-2 との反応性は fibril  $A\beta_{1-42}$  形成に伴って低下することが示唆された(Fig. 3-6)。

一方、可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体 72-10, 73-1, 76-3, 78-6, 80-4, 75-2, 77-3, 79-3, 83-3 について、詳細に ELISA 解析することにより、その反応特異性を評価した(Fig. 3-7)。可溶化  $A\beta_{1-42}$  は、2 章で述べたとおり、 $A\beta_{1-42}$  を 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールに溶解し、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$  で 16 時間さらに  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  で 3 時間保温、凍結乾燥後超純水で溶解して得られた  $A\beta_{1-42}$  であり、粒径は  $50-300 \text{ nm}$  であることが、AFM 解析により明らかになっている。いずれの抗体においても可溶化  $A\beta_{1-42}$  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(Fig. 3-10, Table 3-2)。これらの抗体は、可溶化  $A\beta_{1-42}$  量に比例した反応性を示した(Fig. 3-11)。抗可溶化  $A\beta_{1-42}$  抗体は、aggregate  $A\beta_{1-42}$  (および LOA, amorphous  $A\beta_{1-42}$ ) とともに反応したが(Fig. 3-12)、その反応性(波長  $492 \text{ nm}$  吸光度値)は、可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対する反応の値(Fig. 3-10)に比べて約 50%

程度であり,中には aggregate  $A\beta_{1-42}$ とはほとんど反応しない(可溶化  $A\beta_{1-42}$ に特異性の高い)抗体クローン(79-3)もあった(Fig. 3-12)。可溶化  $A\beta_{1-42}$ をポアサイズ 0.22  $\mu\text{m}$ のフィルターで分画してフィルターに残る残渣と通過する画分に分け,さらにフィルター通過画分を分子量で分画したところ,いずれのクローンのモノクローナル抗体も,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(Fig.3-13)。

### 3-5 結論

本章では第2章で作製した aggregate  $A\beta_{1-42}$ および可溶化  $A\beta_{1-42}$ に対する特異的モノクローナル抗体を作製した。aggregate  $A\beta_{1-42}$ に対するモノクローナル抗体 31-2, 37-11, 42-5, 51-6-2 各クローンが得られた。これらの抗体について ELISA を用いた反応特異性検討結果より,この4クローンは aggregate  $A\beta_{1-42}$ にの中でも特にサイズの大きい LOA に対する反応性が高いことが示唆され, fibril や monomer との反応性は低いことがわかった。また,モノクローナル抗体との反応性の変化により,凝集過程での経時変化を識別できることが明らかとなった。

可溶化  $A\beta_{1-42}$ に対するモノクローナル抗体 72-10, 73-1, 76-3, 78-6, 80-4, 75-2, 77-3, 79-3, 83-3 が得られた。これらの抗体は, fibril  $A\beta_{1-42}$ , monomer  $A\beta_{1-42}$ に対する反応性は低かった。フィルター分離によりサイズの検討を行った結果,0.22  $\mu\text{m}$ フィルター通過画分の 300 kDa のサイズの  $A\beta_{1-42}$ 凝集体に最も高い反応性を示すことが示唆された。

本章で作製したモノクローナル抗体は,第2章で作製した aggregate  $A\beta_{1-42}$ 凝集体,可溶化  $A\beta_{1-42}$ の構造をそれぞれ認識し,判別することが可能であるので,これを用いて病理診断および髄液・血液検査を行うことにより,アルツハイマー病の病因解明や診断に応用展開できる可能性がある。

## 第4章 化学発光基質およびサンドウィッチ ELISA を用いた検出感度と反応特異性の向上

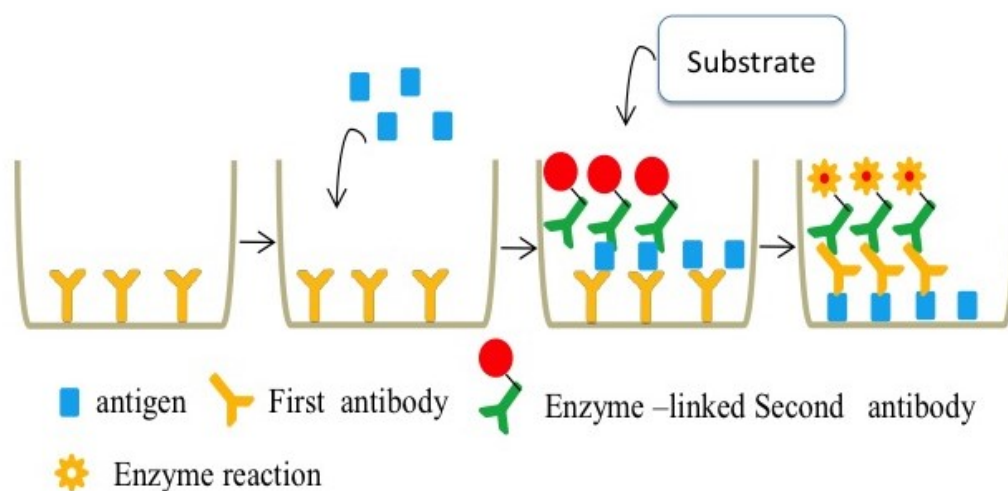
### 4-1 緒論

3章では aggregate  $A\beta_{1-42}$  および可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体を作成し、その反応性と特異性について詳細に解析したが、作製した  $A\beta_{1-42}$  凝集体に対するモノクローナル抗体を、実際にアルツハイマー病の臨床診断に応用するためには、血中の微量のアミロイドを検出する必要があり、検出感度および特異性の高い検査法が求められている。そこで本章では、化学発光基質を用いた ELISA およびサンドイッチ ELISA を用い、検出感度と反応特異性を向上させる手法について検討した。

ELISA の検出感度を上げる方法として良く用いられるのが、化学発光基質である。2次抗体に結合させる酵素の種類によって基質も異なるが、よく用いられるのは HRP の基質で、いろいろな化合物がある。本研究で用いたのは SuperSignal® ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) であるが、これは 425 nm の測定波長で 0.17 pg/well のタンパク質抗原を検出可能であるとされている。化学発光基質は、一般的に用いられる発色基質よりは検出感度が高いが、化学発光を検出可能なプレートリーダーが必要である。

サンドウィッチ ELISA の原理を Fig. 4-1 に示す。まず、プレートなどの固相化支持体に抗体を固定させた後、抗原を結合させ、さらにこの抗原に対する酵素標識した抗体を2次抗体として反応させる。その後、酵素基質液を加えることにより、発色あるいは発光させ、マイクロプレートリーダーにより定量的に反応性を測定する。2次抗体に標識する酵素および基質液の種類により、異なる吸光波長あるいは発光波長を選ぶことができる。検体として血清等を用いる場合、多くのタンパク質の混合液中から目的タンパク質のみを1次抗体が捕らえてプレートに固定するので、この時点で目的タンパク質抗原が濃縮され、2次抗体による酵素抗体法の検出感度が上がることになる。臨床診断を目的としたサンドウィッチ ELISA を用いた  $A\beta_{1-42}$  の検出は、これまでにいくつかの報告例がある。 $A\beta_{11-28}$  に対するモノクローナル抗体 BNT77 と  $A\beta_{1-40}$  および  $A\beta_{1-42}$  に対する

モノクローナル抗体，それぞれ BA27，BC05 を用いて，アルツハイマー病患者の血漿中の A $\beta$  の測定をサンドウィッチ ELISA により行った論文が報告されている<sup>35)</sup>。



**Fig. 4-1 サンドウィッチELISA法の原理.**

1次抗体をプレートなどの固相化支持体に吸着させる。次に抗原を反応させ，さらにこの抗原に対する抗体に酵素標識した2次抗体を結合させる。余剰抗体を除去後，酵素基質液を加えることにより発色，発光させ，その度合いにより定量的な反応測定が可能となる。

また，6E10 モノクローナル抗体を用いて，血漿中の A $\beta_{1-40}$  と A $\beta_{1-42}$  の濃度の割合をサンドウィッチ ELISA により測定し，アルツハイマー病の罹患リスクを判定する試みが行われている<sup>70)</sup>。これらの報告は，monomer A $\beta_{1-42}$  あるいは凝集 A $\beta_{1-42}$  がアルツハイマー病患者の血液中に存在していることを示しており，血液中の A $\beta$  の状態を検出することにより，アルツハイマー病の診断につながると考えられる。

## 4-2 実験材料および実験方法

### 4-2-1 本実験に使用したモノクローナル抗体および抗原

モノクローナル抗体の作製法および ELISA 等の詳細は 3 章に記載した通りである。本章ではまず，aggregate A $\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体クローン 37-11 を用いて，化学発光基質による感度増感を試みた。また，可溶化 A $\beta_{1-42}$  に対する抗体 8 クローン，72-10，73-1，76-3，78-6，80-4，75-2，77-3，83-3，と可溶化 A $\beta_{1-42}$  に特に特異性の高いモノクローナル抗体 79-3 を組み合わせた

サンドウィッチ ELISA について検討した。生体内や血液中では、 $A\beta_{1-42}$  凝集体は単独では存在せず、他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 ELISA およびサンドウィッチ ELISA を行い、その反応感度について比較検討した。

#### 4-2-2 化学発光基質を用いた ELISA 感度増強

本章では、aggregate  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体の測定感度を上げるため、化学発光基質を用いて ELISA を行った。化学発光基質は、SuperSignal® ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific)を使用し、その成分はルミノール、過酸化水素である。ルミノールは、HRP の触媒作用により、過酸化水素と反応すると中間体 I が生成する。中間体 I にエンハンサーを加えると中間体 II が生成され、その後 3-アミノフタレイトジアニオンが生成し、化学発光が引き起こされる。

96 well ELISA プレートに、aggregate  $A\beta_{1-42}$  を 0-22 pmol/well 添加し、37 °C、1 時間保温して各 well 表面に固定化した。その後、溶液を除去し PBS-T 200  $\mu$ l/well で洗浄し、ブロッキングバッファーとしてイムノブロックを 200  $\mu$ l/well 添加した。37 °C、2 時間保温し、溶液を除去した後、再び PBS-T 200  $\mu$ l/well で 3 回洗浄した。一次抗体として aggregate  $A\beta_{1-42}$  のうちサイズの大きい LOA に反応性の高かった 37-11 モノクローナル抗体を 0-2  $\mu$ g/ml 加え、37 °C で 1 時間反応させた。溶液を除去し、2 次抗体として、HRP を標識したヤギ由来の抗マウス IgG を 100  $\mu$ l/well (0.164  $\mu$ g/ml) 添加し、37 °C、1 時間反応させた。2 次抗体を除去した後 PBS-T (200  $\mu$ l/well) にて well を 5 回洗浄した。化学発光基質である SuperSignal® ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate を 100  $\mu$ l/well 加え、室温で 1 分間反応させた後、マイクロプレートリーダーを用いて 425 nm の波長で発光強度を測定した。

#### 4-2-3 サンドウィッチ ELISA

1次抗体として、可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> に対するモノクローナル抗体 72-10, 73-1, 76-3, 78-6, 80-4, 75-2, 77-3, 79-3, 83-3(濃度 2  $\mu\text{g/ml}$ )を 96 well plate に 100  $\mu\text{l/well}$  入れて 37°C, 1 時間保温し, 抗体をプレートに結合させた。抗体溶液を除去し, PBS-T で 5 回洗浄した後, 抗原として可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> (0.22  $\mu\text{M}$ )を 100  $\mu\text{l/well}$  (22 pmol) 添加した。37°C, 1 時間反応させた後, 抗原溶液を除去し, PBS-T 200  $\mu\text{l/well}$  で 5 回洗浄した。2次抗体として, HRP 標識したモノクローナル抗体 79-3 クローンを (濃度 0.144  $\mu\text{g/ml}$ )を 100  $\mu\text{l/well}$  添加した。37°C, 1 時間反応させた後, PBS-T 200  $\mu\text{l/well}$  で 5 回洗浄した。クエン酸バッファー 25 ml に OPD 10 mg, 過酸化水素水 5  $\mu\text{l}$  を添加し, 基質液とした。この溶液を 100  $\mu\text{l/well}$  加え, 25°C, 20 分間遮光した状態で反応させた。酵素反応を停止するため, 0.5 M 硫酸 50  $\mu\text{l/well}$  を添加した。その後, 各 well の吸光度を 492 nm の波長でマイクロプレートリーダーにより測定した<sup>71)</sup>。

#### 4-2-4 タンパク質混合液中の可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> の検出

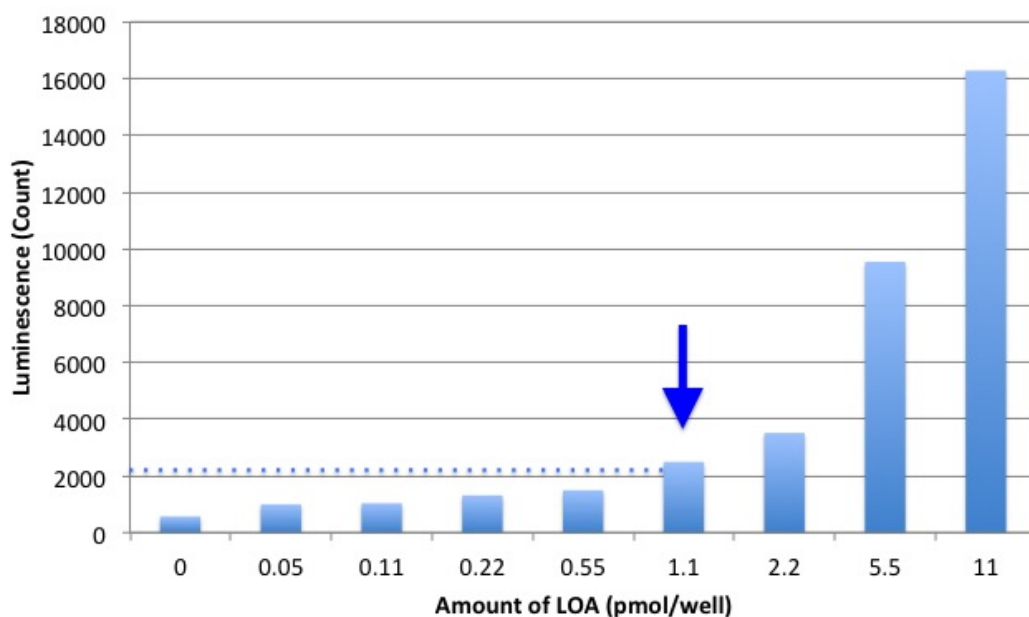
血清中の微量抗原検出のモデルとして, 可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> とウシ血清アルブミンとの混合物を抗原とした化学発光 ELISA を行った。96 well プレートの各 well に総タンパク質量が 500 ng/ml となるように混合比率を変えて調整し, 各穴には 100  $\mu\text{l}$  入れた。具体的比率は以下の通りである。A $\beta$  が全体の 100% (11 pmol/well), 50% (5.5 pmol/well), 20% (2.2 pmol/well), 10% (1.1 pmol/well), 5% (0.55 pmol/well), 2% (0.22 pmol/well), 1% (0.11 pmol/well), 0% (0 pmol/well)となるようにし, 残りをアルブミン溶液で調整して, トータル 50 ng/well になるようにして, プレートに固定した。別に対照実験として, アルブミンを入れずに可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> の希釈シリーズを作って同様にプレートに固定した。その後は 4-2-2 に示した方法で化学発光 ELISA を行い, マイクロプレートリーダーを用いて 425 nm の波長で発光強度を測定した。



## 4-3 結果

### 4-3-1 化学発光基質を用いた aggregate A $\beta_{1-42}$ に対する ELISA 感度増強の検討

aggregate A $\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体の高感度化を、化学発光を利用した ELISA 検出法を用いて行った。抗体は 37-11 モノクローナル抗体を用いた。抗原である LOA (aggregate A $\beta_{1-42}$  のうち 0.22  $\mu\text{m}$  フィルター残渣) のタンパク量は 0-11 pmol/well と Fig. 3-4 と同程度の量の範囲で測定を行い、抗体濃度は 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (0.2  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) で反応性を評価した。この結果、1.1 pmol/well 以上の抗原濃度で、検出可能な化学発光度(カウント 2000 以上)が得られた(Fig. 4-2)。したがって、化学発光基質を用いた ELISA では LOA に対しての抗原濃度の検出限界が 1.1 pmol であり、従来の発色法(5.5 pmol/well, Fig. 3-4)に比べて 1/5 程度の抗原量を検出可能であることを示している。この結果は、微量抗原を検出するための感度増強に化学発光基質による ELISA が有効であることを示している。



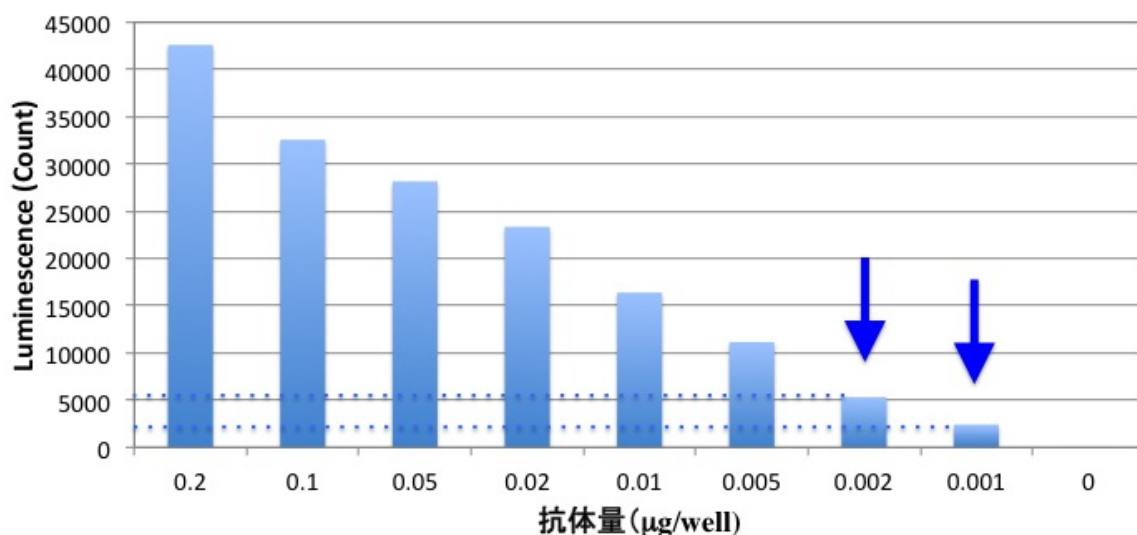
**Fig. 4-2 化学発光基質による aggregate A $\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体 37-11 クローンの LOA に対する ELISA 反応の感度増強**

化学発光を利用した ELISA による検出。発光基質 (SuperSignal<sup>®</sup>) の反応生成物を 425nm の吸光度で測定した。抗原である LOA のタンパク質量は well あたり 0-2.2 pmol, 37-11 抗体濃度は 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (0.2  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) で反応させた。LOA 抗原量 1.1 pmol/well から検出可能であり、従来法の ELISA (発色) における抗原量 (5.5-22 pmol/well) に比べ、1/5-1/20 程度の抗原量で検出可能であった。

#### 4-3-2 化学発光基質 ELISA による aggregate A $\beta_{1-42}$ に対する抗体使用量の削減

実際に血中 A $\beta_{1-42}$  体凝集体の検査をする際には、抗体が多量に必要となるため、検査コスト削減の上からも抗体使用量の削減が望まれる。化学発光基質を利用した高感度化によって、使用するモノクローナル抗体を削減できる可能性について検討した。

抗体は 37-11 モノクローナル抗体を用いた。抗原である LOA (aggregate A $\beta_{1-42}$  のうち 0.22  $\mu\text{m}$  フィルター残渣)のタンパク量は 22 pmol/well で測定を行い、抗体濃度は 0-2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (0-0.2  $\mu\text{g}/\text{well}$ )の範囲で反応性を評価した。抗体量を 0.001-0.002  $\mu\text{g}/\text{well}$  (0.01-0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )まで減らしても検出可能(化学発光カウント 2000-5000 以上)であり、従来法の ELISA(発色)(0.2  $\mu\text{g}/\text{well}$ )に比べて、1/100-1/200 程度の抗体量で検出可能であることがわかった(Fig. 4-3)。この結果は検査に使用する抗体を節約する上で有用なデータとなる。



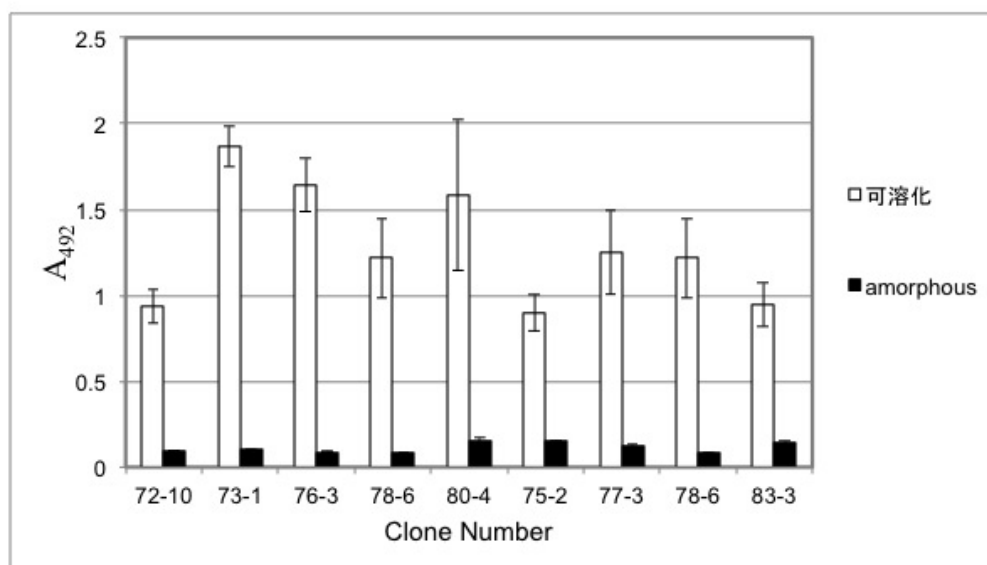
**Fig. 4-3 化学発光基質ELISAによる抗体使用量の削減**

化学発光を利用したELISAによる検出の高感度化により、抗体の使用量を削減できることがわかった。抗原であるLOAのタンパク量は22 pmol, 37-11 抗体濃度は0-0.2  $\mu\text{g}/\text{well}$  で反応させた。抗体量を0.001-0.002  $\mu\text{g}/\text{well}$  (0.01-0.02  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )まで減らしても検出可能であり、従来法のELISA(発色)(0.2  $\mu\text{g}/\text{well}$ )に比べて、1/100-1/200程度の抗体量で検出可能であることがわかった。

#### 4-3-3 サンドウィッチ ELISA による可溶化 A $\beta_{1-42}$ に対する ELISA 反応特異性向上の検討

3-3-4 より, 79-3 モノクローナル抗体が可溶化 A $\beta_{1-42}$  に特異性の高い抗体であることがわかった。さらなる特異性と感度向上のために、サンドウィッチ ELISA について検討した<sup>71)</sup>。1次抗体とし

て可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体, 72-10, 73-1, 76-3, 78-6, 80-4, 75-2, 77-3, 83-3, 82-5 の 8 クローンを用い, マイクロプレートに固定した。次に抗原として, 2-2 で作製した可溶化  $A\beta_{1-42}$  または amorphous  $A\beta_{1-42}$  を用いた。2 次抗体は, HRP 標識した 79-3 モノクローナル抗体を用いた。1 次抗体濃度は, 2  $\mu\text{g/ml}$ , 2 次抗体濃度は, 0.144  $\mu\text{g/ml}$ , 抗原濃度は, 1  $\mu\text{g/ml}$  とした。通常の発色基質による ELISA 結果を Fig. 4-4 に示す。どの 1 次抗体を用いた場合でも, 可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対して高い反応性がみられ, aggregate  $A\beta_{1-42}$  に対しては低い反応性を示した。この実験結果からも, 79-3 モノクローナル抗体が可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対して高い特異性を持つこと, aggregate  $A\beta_{1-42}$  に対しては低い反応性であることが確認できた。また, 79-3 モノクローナル抗体は, 73-1 モノクローナル抗体との組合せにおいて反応性が最も高いことがわかった。以上の結果から, 複数のモノクローナル抗体を組み合わせることにより, 可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対する高い感度および特異性をもつ測定系を開発できる可能性が示唆された。

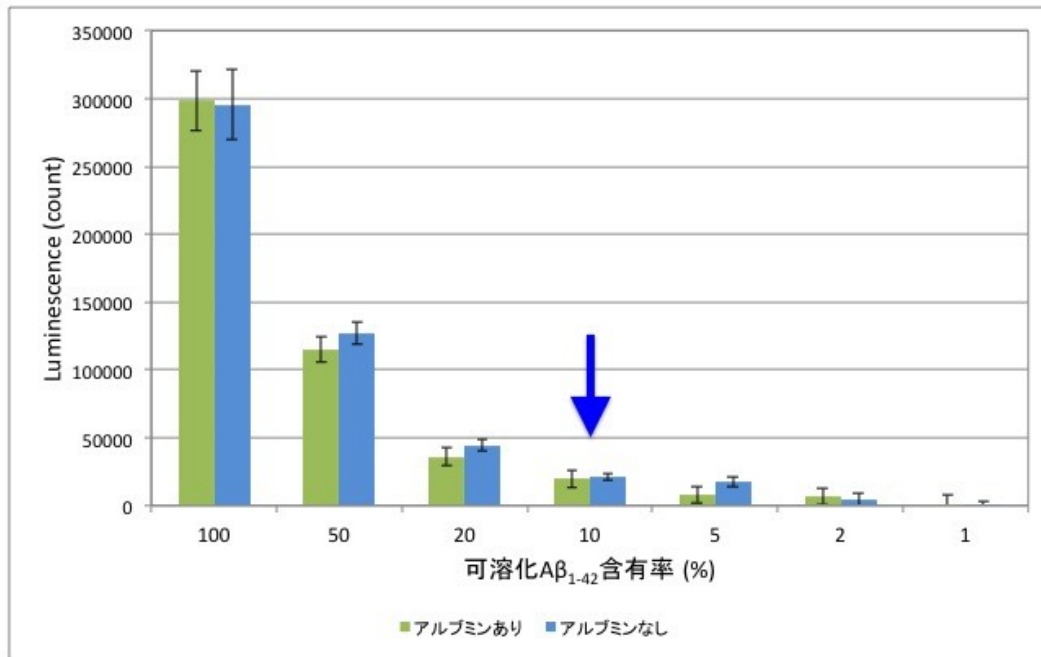


**Fig. 4-4** サンドウィッチ ELISAによる, 可溶化 $A\beta_{1-42}$ に対する特異性の高いモノクローナル抗体 79-3 クローンの, 可溶化  $A\beta_{1-42}$  (□) およびamorphous ( aggregate)  $A\beta_{1-42}$  (■) に対する反応性の測定

1次抗体として可溶化 $A\beta_{1-42}$ に対するモノクローナル抗体, 72-10, 73-1, 76-3, 78-6, 80-4, 75-2, 77-3, 83-3を用い, 抗原として, 2-2で作製した可溶化 $A\beta_{1-42}$ またはamorphous  $A\beta_{1-42}$ を用いた。2次抗体は, HRP標識した79-3モノクローナル抗体を用いた。いずれのクローンも可溶化 $A\beta_{1-42}$ に対して特異性が高かったが, 73-1との組合せが一番高い反応特異性を示した。

#### 4-3-4 タンパク質混合液中の可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> の化学発光 ELISA による検出

生体内や血液中では、A $\beta$ <sub>1-42</sub> 凝集体は単独では存在せず、他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 $\beta$ <sub>1-42</sub> 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 を行い、アルブミンの有無による反応感度について比較検討した。抗原として可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> を用い、A $\beta$  が全体の 100% から 0% (11-0 pmol/well) となるようにし、残りをアルブミン溶液で調整して、トータル 50 ng/well にしてプレートに固定した。別に対照実験として、アルブミンを入れずに可溶化 A $\beta$ <sub>1-42</sub> の希釈シリーズを作って同様にプレートに固定した。それぞれの条件で HRP 標識 79-3 モノクローナル抗体との反応性を化学発光 ELISA により評価した (Fig. 4-5)。この結果、アルブミンの有無にかかわらず、A $\beta$  が全体の 10% 即ち 1.1 pmol/well 以上で検出が可能であることが判明した。この値は、Fig. 4-2 に示した aggregate A $\beta$ <sub>1-42</sub> に対するモノクローナル抗体 37-11 の LOA に対する検出限界と同じ結果であった。また、血清中で他のタンパク質と A $\beta$ <sub>1-42</sub> 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。



**Fig. 4-5 可溶性Aβ<sub>1-42</sub>に対する特異性の高いモノクローナル抗体79-3 クローンによるタンパク質混合中の可溶性Aβ<sub>1-42</sub>の化学発光ELISAによる検出**  
 血清中の微量抗原検出のモデルとして、可溶性Aβ<sub>1-42</sub>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を行った。96 wellプレート各wellに総タンパク質量が500 ng/mlとなるように混合比率を変えて調整した可溶性Aβ<sub>1-42</sub>(100%で11pmole/well)とアルブミンを100μl/well(50ng/well)加え、抗原としてプレートに固定した。別にアルブミンを入れずに可溶性Aβ<sub>1-42</sub>の希釈シリーズを作って同様に固定した。次に、HRP標識した79-3モノクローナル抗体を2次抗体として用い、化学発光によるELISA検出を行った。アルブミンの有無にかかわらず、10%即ち1.1 pmol/well以上で検出が可能であった。

#### 4-4 考察

第4章では、抗原抗体反応の検出感度を高め、特異性を上げることで、Aβ<sub>1-42</sub>凝集体のELISA診断に役立つ手法について検討した。

化学発光基質を用いると、LOA (Fig. 4-2) および可溶性Aβ<sub>1-42</sub> (Fig. 4-5)についてELISA検出限界が1.1 pmolとなり、従来の発色法(5.5 pmol/well, Fig. 3-4)に比べて5倍の検出感度を示すことが明らかとなった。この結果は、微量抗原を検出するための感度増強に化学発光基質によるELISAが有効であることを示している。また、22 pmol/wellのLOA抗原濃度で、0.001-0.002 μg/well (0.01-0.02 μg/ml)以上の抗体濃度があれば、化学発光ELISAにより検出可能であることが判明し、従来法のELISA(発色)(0.2 μg/well)に比べて、1/100-1/200程度の抗体量で済むことがわかった(Fig. 4-3)。この結果は検査に使用する抗体量を削減する上で有用なデータとなる。化学発光基質につ

いてより発光度の高いものを選定し、アビジン-ビオチン系を用いるなどして増感させることにより、さらに感度の高い検出法を開発できる可能性がある。

可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対する各モノクローナル抗体を組み合わせたサンドウィッチ ELISA 法を用いて、各種凝集  $A\beta_{1-42}$  に対する反応特異性を検討した。まず、1 次抗体として可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体 72-10, 73-1, 76-3, 78-6, 80-4, 75-2, 77-3, 83-3, 82-5 を用い、可溶化  $A\beta_{1-42}$  または aggregate  $A\beta_{1-42}$  を抗原とし、2 次抗体は、HRP 標識した 79-3 モノクローナル抗体(可溶化  $A\beta_{1-42}$  に特異性の高い)を用いたサンドウィッチ ELISA の結果を行った。その結果、どの 1 次抗体を用いた場合でも、可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対しての高い反応性を示し、aggregate  $A\beta_{1-42}$  に対しては低い反応性を示した(Fig. 4-3)。79-3 モノクローナル抗体は、73-1 モノクローナル抗体との組合せにおいて反応性が最も高いことがわかった。以上の結果から、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を見つけることができた。

次に、モノクローナル抗体におけるエピトープ(抗体の認識部位)の考察について述べる。4G8 と 82E1 モノクローナル抗体は、 $A\beta$  の N 末端に対して特異的なモノクローナル抗体である<sup>27)</sup>。11A1 モノクローナル抗体は  $A\beta_{1-42}$  オリゴマーの 22 と 23 のアミノ酸残基にエピトープを持つモノクローナル抗体である<sup>65)</sup>。このように  $A\beta_{1-42}$  に対するエピトープに関するいくつかの報告があるが、これらは立体構造を認識するのではなく特定のアミノ酸残基を認識する考えに基づく研究である。本研究で用いた可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対する抗体は、他の形状の凝集体には反応特異性が低いことから、 $A\beta_{1-42}$  の特定のアミノ酸配列を認識するのではなく、表面の立体構造を認識していると考えられる。また、サンドウィッチ ELISA で 1 次抗体として使用した 8 クローンのモノクローナル抗体、特に 73-1 は、79-3 モノクローナル抗体とは異なるエピトープを持つので、この組み合わせの反応性が最も高かったのではないかと推察された。

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 を行い、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。このモデル測定での  $A\beta_{1-42}$  濃度およびアルブミンとの比率は、実際に想定される血中での濃度および比率よりもずっと緩い条件であるので、今後はさらにアルブミン濃度が高く  $A\beta_{1-42}$  比率が低い条件下で検討する必要がある。

#### 4-5 結論

本章では、実際に臨床応用することをめざして、 $A\beta_{1-42}$ 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を検討した。

まず、化学発光基質を利用した ELISA により、従来の発色基質に比べ、約 5 倍の感度の検出が可能であることがわかった。また、従来法の発色法に比べて、1/100-1/200 程度の抗体量で検出可能であることも示された。この結果は検査に使用する抗体量を削減する上で有用なデータとなる。また、サンドウィッチ ELISA で可溶化  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体を組み合わせることにより、より抗原特異的な反応を得ることができた。一方、 $A\beta_{1-42}$  凝集体とウシ血清アルブミンとの混合物を抗原とした ELISA を行ったところ、アルブミンの有無に関わらず、同じ  $A\beta_{1-42}$  量を検出可能であることが明らかになった。実際に血中診断に応用するために、さらなる感度および特異性の向上をめざして、化学発光基質の選択、アビジン-ビオチン系による感度増強などの検討を行っている。

## 第5章 総括

本論文は、アルツハイマー病の病因の1つとされている  $A\beta_{1-42}$  凝集体を、免疫学的手法により評価することを目的とする。

本研究で得られた成果および結論を各章ごとに以下に示す。

第2章では、 $A\beta_{1-42}$  の多様な形状の凝集体を調整した。aggregate  $A\beta_{1-42}$  は、 $A\beta_{1-42}$  の水溶液である未処理  $A\beta_{1-42}$  に、 $A\beta_{16-20}$  を添加し、37°Cで16時間インキュベートすることによって得られた楕円形の凝集体(277±34 nm-162±33 nm)である。aggregate  $A\beta_{1-42}$  のうちサイズが0.22  $\mu\text{m}$  以上である凝集体を large oval aggregates (LOA; 長径 369 ± 81 nm 短径 224 ± 92 nm)、それ以下のものを amorphous  $A\beta_{1-42}$  (平均約 100 nm)と定義した。一方、未処理  $A\beta_{1-42}$  に、 $A\beta_{16-20}$  を添加せずに37°C16時間インキュベートすることによって得られる線維状の凝集体(直径 30.7±10.9 nm)が fibril  $A\beta_{1-42}$  である。また、 $A\beta_{1-42}$  を 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールに溶解し、4 °Cで16時間さらに 37 °Cで3時間インキュベート、凍結乾燥後超純水で溶解して得られる可溶化  $A\beta_{1-42}$  (粒径 50-300nm)、可溶化  $A\beta_{1-42}$  を 25 °Cで16時間超音波処理して得られる monomer  $A\beta_{1-42}$  も調整した。これら凝集体の形状およびサイズを、AFM によって解析し、ThT 法によって LOA および fibril の  $\beta$  シート構造について分析した。また、aggregate  $A\beta_{1-42}$  および fibril  $A\beta_{1-42}$  のラット胎児海馬神経細胞に対する毒性を調べた。その結果、aggregate  $A\beta_{1-42}$ 、fibril  $A\beta_{1-42}$  ともに毒性が見られたが、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確認できた。

第3章では、第2章で作製した  $A\beta_{1-42}$  凝集体に対するモノクローナル抗体の作製を行った。aggregate  $A\beta_{1-42}$  または可溶化  $A\beta_{1-42}$  で免疫したマウスの脾臓細胞と、ミエローマ細胞を細胞融合し、HAT 培地で融合細胞を選択した。目的の  $A\beta_{1-42}$  凝集体と反応する融合細胞を、培養上清を用いた ELISA によってスクリーニングした。陽性の細胞についてはさらに細胞クローニングを行い、モノクローナル抗体を産生するクローンが得られた。アセテート膜電気泳動および SDS-PAGE により、抗体の確認を行った。aggregate  $A\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体4クローンの反応特異性



を調べた結果、LOA に特異性が高く amorphous A $\beta_{1-42}$  および monomer A $\beta_{1-42}$ , fibril A $\beta_{1-42}$  とは反応性の低い抗体であることがわかった。これらのモノクローナル抗体は、A $\beta_{1-42}$  の凝集過程において反応性が変化することから、凝集形成時の A $\beta_{1-42}$  の分析が可能となった。また、可溶化 A $\beta_{1-42}$  に対するモノクローナル抗体 9 クローンの反応特異性を調べた結果、0.22  $\mu\text{m}$  フィルターろ過残渣でかつ 300 kDa 以上のサイズの A $\beta_{1-42}$  凝集体に最も高い反応性がみられた。

第 4 章では、実際に臨床応用することをめざして、A $\beta_{1-42}$  凝集体に対する ELISA 反応の検出感度と特異性向上のための手法について検討した。化学発光基質を用いることにより、検出感度を 5 倍上げることができた。血清中では、A $\beta_{1-42}$  凝集体はアルブミン等のタンパク質と混在していることから、可溶化 A $\beta_{1-42}$  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 を行ったところ、アルブミンの有無に関わらず、同じ A $\beta_{1-42}$  量を検出可能であることが明らかになった。実際に血中診断に応用するために、さらなる感度および特異性の向上をめざして、化学発光基質の選択、アビジン-ビオチン系による感度増強などの検討を行っている。

本研究では、A $\beta_{1-42}$  凝集体の各形状に対する特異的なモノクローナル抗体を作製し、異なる形状の A $\beta_{1-42}$  凝集体を見分けることに成功した。また、A $\beta_{1-42}$  凝集体を、凝集過程を通じて認識する抗体も得られた。

1-5 に示した通り、血漿中の凝集 A $\beta$  の濃度は、624.5 ng/ml という報告<sup>36)</sup>、およびアルツハイマー病患者の血清中では、可溶化 A $\beta_{1-42}$  に対する抗体が約 0.5 ng/ml 存在している<sup>37)</sup> という報告がある。これらの報告は、抗原である A $\beta_{1-42}$  凝集体あるいはそれに対するモノクローナル抗体を利用することにより、アルツハイマー病の診断が可能であることを示している。本研究で作製したモノクローナル抗体を、実際に血液を用いた臨床診断に用いるためには、さらに検出感度を上げる必要がある。今後は、サンドウィッチ法にアビジン-ビオチン感度増幅系や発光効率のよい化学発光基質を併用し、さらに高感度化を行うことによって、アルツハイマー病の臨床診断法の開発をめざしたい。

一方、最近、国立長寿医療研究センター等より、半導体イメージセンサーを用いたアルツハイ

マー病診断機器の開発に関する発表があった。この機器でもマイクロビーズに抗体を結合させたセンシング部を用いており、診断システムを実用化するためには、多様なサイズの凝集体に対する反応特異性が高い抗体が求められている。そういう意味で、本研究で作製した多様な形態の凝集体とそれに対するモノクローナル抗体は有用であると考えられる。

また、本研究で作製したモノクローナル抗体を利用して凝集体の形成過程および構造分析をさらに進め、アルツハイマー病発症のメカニズムを解明したいと考えている。さらにこれらの抗体を抗体医薬として用い、アルツハイマー病の治療や予防に貢献することを希望している。

## 参考文献

- 1) 総務省統計局ホームページ「人口推計」  
<http://www.start.go.jp/data/jiusui/new.htm>
- 2) 厚生労働省ホームページ「知ることからはじめよう みんなのメンタルヘルス」  
[http://www.mhlw.go.jp/kokoro/speciality/detail\\_recog.html](http://www.mhlw.go.jp/kokoro/speciality/detail_recog.html)
- 3) Graeber M.B., Kösel S., Egensperger R., Banati R.B., Müller U., Bise K., Hoff P., Möller H.J., Fujisawa K., Mehraein P.: Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis, *Neurogenetics* 1, 73-80 (1997).
- 4) 下方浩史: 我が国の疫学統計, 日本臨床 増刊号 痴呆症学 3, 62, 増刊号 4, 121-125 (2004).
- 5) Muir, J.L.: Acetylcholine, aging, and Alzheimer's disease, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 56, 687-696 (1997).
- 6) 加藤武: メマンチンによる治療 : MK-801 との相違, 日本薬理学雑誌 第 124 巻第 3 号, 日本薬理学会, 145-151, (2004).
- 7) Ishiguro, K., Ohno, H., Arai, H., Yamaguchi, H., Urakami, K., Park, J-M., Sato, K., Kohno, H., and Imahori, K.: Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.*, 270, 91-94 (1999).
- 8) Arai, H., Ishiguro, K., Ohno, H., Moriyama, M., Itoh, N., Okamura, N., Matsui, T., Morikawa, Y., Horikawa, E., Kohno, H., Sasaki, H., and Imahori, K.: CSF phosphorylated Tau protein and mild cognitive impairment: A prospective study, *Exp. Neurol.*, 166, 201-203 (2000).
- 9) Portelius, E., Zetterberg, H., Andreasson, U., Brinkmalm, G., Andreasen, N., Wallin, A., Westman-Brinkmalm, A., and Blennow, K.: An Alzheimer's disease-specific  $\beta$ -amyloid fragment signature in cerebrospinal fluid, *Neurosci. Lett.*, 409, 215-219 (2006).
- 10) Crouch, P.J., Harding, S.M., White, A.R., Camakaris, J., Bush, A.I., and Masters, C.L.: Mechanisms of A $\beta$  mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 40, 181-198

(2008).

- 11) Hardy, J.A. and Higgins, G.A.: Alzheimer's disease: The Amyloid cascade hypothesis, *Science*, 256, 184-185 (1992).
- 12) Hardy, J. and Selkoe, D.J.: The Amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics, *Science*, 297, 353-356 (2002).
- 13) Fujita M, Sugama S, Sekiyama K, Sekigawa A, Tsukui T, Nakai M, Waragai M, Takenouchi T, Takamatsu Y, Wei J, Rockenstein E, Laspada AR, Masliah E, Inoue S, Hashimoto M.: A  $\beta$ -synuclein mutation linked to dementia produces neurodegeneration when expressed in mouse brain. *Nat. Commun.*, 1: 110, (2010).
- 14) Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S., and Selkoe, D. J.: Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6382-6387 (2003).
- 15) Tomita, T., Maruyama, K., Saido, T.C., Kume, H., Shinozaki, K., Tokuhiro, S., Capell, A., Walter, J., Grünberg, J., Haass, C., Iwatsubo, T., and Obata, K.: The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid  $\beta$  protein ending at the 42nd (or 43rd) residue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 2025-2030 (1997).
- 16) Jensen, P.H., Hager, H., Nielsen, M.S., Hojrup, P., Gliemann, J., and Jakes, R.:  $\alpha$ -Synuclein binds to tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356, *J. Biol. Chem.*, 274, 25481-25489 (1999).
- 17) Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Müller-Hill, B.: The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor, *Nature*, 325, 733-736 (1987).
- 18) Matsui, T., Ingelsson, M., Fukumoto, H., Ramasamy, K., Kowa, H., Frosch, M.P., Irizarry, M.C., and Hyman, B.T.: Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease, *Brain Res.*,

1161, 116-123 (2007).

- 19) Ohno, M., Sametsky, E.A., Younkin, L.H., Oakley, H., Younkin, S.G., Citron, M., Vassar, R., and Disterhoft, J.F.: BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease, *Neuron*, 41, 27-33 (2004).
- 20) Kimberly, W.T., LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J.:  $\gamma$ -secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6382-6387 (2003).
- 21) Esler, W.P., Kimberly, W.T., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Diehl, T.S., Selkoe, D.J., and Wolfe, M.S.: Activity-dependent isolation of the presenilin- $\gamma$ -secretase complex reveals nicastrin and a  $\gamma$  substrate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 2720-2725 (2002).
- 22) Jankowsky, J.L., Fadale, D.J., Anderson, J., Xu, G.M., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Lee, M.K., Younkin, L.H., Wagner, S.L., Younkin, S.G., and Borchelt, D.R.: Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue  $\beta$ -amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase, *Hum. Mol. Genet.*, 13, 159-170 (2004).
- 23) Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H.H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A.I., Gandy, S.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, D.L., Younkin, S.G., and Sisodia, S.S.: Familial Alzheimer's disease-linked Presenilin 1 variants elevate A $\beta$  1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo, *Neuron*, 17, 1005-1013 (1996).
- 24) Suzuki, N., Cheung, T.T., Cai, X.D., Odaka, A., Otvos, L. Jr., Eckman, C., Golde, T.E., and Younkin, S.G.: An Increased percentage of long amyloid  $\beta$  protein secreted by familial amyloid  $\beta$  protein precursor ( $\beta$  APP<sub>717</sub>) mutants, *Science*, 264, 1336-1340 (1994).
- 25) Kimberly, W.T., LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J.:  $\gamma$ -secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2, *Proc. Natl.*

*Acad. Sci. USA*, 100, 6382-6387 (2003).

- 26) Andreasen, N. and Blennow, K.:  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) protein in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease, *Peptides*, 23, 1205-1214 (2002).
- 27) Matsumura, S., Shinoda, K., Yamada, M., Yokojima, S., Inoue, M., Ohnishi, T., Shimada, T., Kikuchi, K., Masui, D., Hashimoto, S., Sato, M., Ito, A., Akioka, M., Takagi, S., Nakamura, Y., Nemoto, K., Hasegawa, Y., Takamoto, H., Inoue, H., Nakamura, S., Nabeshima, Y., Teplow, D.B., Kinjo, M., and Hoshi, M.: Two distinct amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) assembly pathways leading to oligomers and fibrils identified by combined fluorescence correlation spectroscopy, morphology, and toxicity analyses, *J. Biol. Chem.*, 286, 11555-11562 (2011).
- 28) Bernstein, S.L., Dupuis, N.F., Lazo, N.D., Wyttenbach, T., Condrón, M.M., Bitan, G., Teplow, D.B., Shea, J.E., Ruotolo, B.T., Robinson, C.V., and Bowers, M.T.: Amyloid- $\beta$  protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease, *Nat. Chem.*, 1, 326-331 (2009).
- 29) Klunk, W.E., and Mathis, C.A.: The future of amyloid-beta imaging: a tale of radionuclides and tracer proliferation, *Curr. Opin. Neurol.*, 21, 683-687 (2008).
- 30) Youkin, S.G.: Evidence that A beta 42 is the real culprit in Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.*, 37, 287-288 (1995).
- 31) Deane, R., Bell, R.D., Sagare, A., and Zlokovic, B.V.: Clearance of amyloid- $\beta$  peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease, *CNS. Neurol. Disord. Drug. Targets*, 8, 16-30 (2009).
- 32) Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y.: Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43), *Neuron*, 13, 45-53 (1994).
- 33) Klyubin, I., Walsh, D.M., Lemere, C.A., Cullen, W.K., Shankar, G.M., Betts, V., Spooner, E.T., Jiang,

- L., Anwyl, R., Selkoe, D.J., and Rowan, M.J.: Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes A $\beta$  oligomers that disrupt synaptic plasticity *in vivo*, *Nat. Med.*, 11, 556-561 (2005).
- 34) Hoshi, M., Sato, M., Matsumoto, S., Noguchi, A., Yasutake, K., Yoshida, N., and Sato, K.: Spherical aggregates of  $\beta$ -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6370-6375 (2003).
- 35) Fukumoto, H., Tennis, M., Locascio, J.J., Hyman, B.T., Growdon, J.H., and Irizarry, M.C.: Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid  $\beta$ -protein levels, *Arch. Neurol.*, 60, 958-964 (2003).
- 36) Zhou, L., Chan, K.H., Chu, L.W., Kwan, J.S.C., Song, Y.Q., Chen, L.H., Ho, P.W.L., Cheng, O.Y., Ho, J.W.M., and Lam, K.S.L.: Plasma amyloid- $\beta$  oligomers level is a biomarker for Alzheimer's disease diagnosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 423, 697-702 (2012).
- 37) Klaver, A.C., Coffey, M.P., Smith, L.M., Bennett, D.A., Finke, J.M., Dang, L., and Loeffler, D.A.: ELISA measurement of specific non-antigen-bound antibodies to A $\beta$ 1-42 monomer and soluble oligomers in sera from Alzheimer's disease, mild cognitively impaired, and noncognitively impaired subjects, *J. Neuroinflammation*, 8, (2011).
- 38) Abdullah, L., Paris, D., Luis, C., Quadros, A., Parrish, J., Valdes, L., Keegan, A.P., Mathura, V., Crawford, F., and Mullan, M.: The influence of diagnosis, intra- and inter-person variability on serum and plasma A $\beta$  levels, *Neurosci. Lett.*, 428, 53-58 (2007).
- 39) Lesné, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K. H.: A specific amyloid- $\beta$  protein assembly in the brain impairs memory, *Nature*, 440, 352-357 (2006).
- 40) LeVine, H. 3rd: Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution, *Protein Sci.*, 2, 404-410 (1993).
- 41) Sehlin, D., Englund, H., Simu, B., Karlsson, M., Ingelsson, M., Nikolajeff, F., Lannfelt, L., and Pettersson, F.E.: Large aggregates are the major soluble A $\beta$  species in AD brain fractionated with

- density gradient ultracentrifugation, *PLoS. One.*, 7, e32014 (2012).
- 42) Kim, W. and Hecht, M.H.: Generic hydrophobic residues are sufficient to promote aggregation of the Alzheimer's A $\beta$ 42 peptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 15824-15829 (2006).
- 43) Chafekar, S.M., Malda, H., Merckx, M., Meijer E.W., Viertl, D., Lashuel, H.A., Baas, F., and Scheper, W.: Branched KLVFF tetramers strongly potentiate inhibition of  $\beta$ -amyloid aggregation, *ChemBioChem.*, 8, 1857-1864 (2007).
- 44) Noguchi, A., Matsumura, S., Dezawa, M., Tada, M., Yanazawa, M., Ito, A., Akioka, M., Kikuchi, S., Sato, M., Ideno, S., Noda, M., Fukunari, A., Muramatsu, S., Itokazu, Y., Sato, K., Takahashi, H., Teplow, D.B., Nabeshima, Y., Kakita, A., Imahori, K., and Hoshi, M.: Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) assembly from Alzheimer disease brains, *J. Biol. Chem.*, 284, 32895-32905 (2009).
- 45) Yu, L., Edalji, R., Harlan, J.E., Holzman, T.F., Lopez, A.P., Labkovsky, B., Hillen, H., Barghorn, S., Ebert, U., Richardson, P.L., Miesbauer, L., Solomon, L., Bartley, D., Walter, K., Johnson, R.W., Hajduk, P.J., and Olejniczak, E.T.: Structural characterization of a soluble amyloid beta-peptide oligomer, *Biochemistry*, 48, 1870-1877 (2009).
- 46) Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., and Ashe, K.H.: Natural oligomers of the amyloid- $\beta$  protein specifically disrupt cognitive function, *Nat. Neurosci.*, 1, 79-84 (2005).
- 47) Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals P, Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A., and Klein, W.L.: Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A $\beta$ <sub>1-42</sub> are potent central nervous system neurotoxins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 6448-6453 (1998).
- 48) Vincent, V.A., DeVoss, J.J., Ryan, H.S., and Murphy, G.M. Jr.: Analysis of neuronal gene expression with laser capture microdissection, *J. Neurosci. Res.*, 69, 578-586 (2002).



- 49) Shimizu, T., Yoshimune, K., Komoriya, T., Akiyama, T., Ye, X., and Kohno, H.: Monoclonal antibodies against large oval aggregates of A $\beta$ <sub>1-42</sub>, *J. Biosci. Bioeng.*, 115, 216-220 (2013).
- 50) Lin, S., Wang, Y-M., Huang, L-S., Lin, C-W., Hsu, S-M., and Lee, C-K.: Dynamic response of glucagon/anti-glucagon pairs to pulling velocity and pH studied by atomic force microscopy, *Biosens. Bioelectron.*, 22, 1013-1019 (2007).
- 51) Lyubchenko, Y.L., Gall, A.A., Shlyakhtenko, L.S., Harrington, R.E., Jacobs, B.L., Oden, P.I., and Lindsay, S.M.: Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 10, 589-606 (1992).
- 52) Yamaguchi, K., Takahashi, S., Kawai, T., Naiki, H., and Goto, Y.: Seeding-dependent Propagation and Maturation of Amyloid Fibril Conformation, *J. Mol. Biol.*, 352, 952-960 (2005).
- 53) Koh, C.J. and Lee, M.: Structural analysis of amyloid aggregates by multifunctional fluorescence nanoscopy, *Curr. Appl. Phys.*, 6S1, e257-e260 (2006).
- 54) Yoshiike, Y., Chui, D-H., Akagi, T., Tanaka, N., and Takashima, A.: Specific compositions of amyloid- $\beta$  peptides as the determinant of toxic  $\beta$ -aggregation, *J. Biol. Chem.*, 278, 23648-23655 (2003).
- 55) Tjernberg, L.O., Naslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlstrom, A.R., Thyberg, J., Terenius, L., and Nordstedt, C.: Arrest of  $\beta$ -amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand, *J. Biol. Chem.*, 271, 8545-8548 (1996).
- 56) Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S.A., Krishna, V., Grover, R.K., Roy, R., and Singh, S.: Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils, *J. Struct. Biol.*, 151, 229-238 (2005).
- 57) Takashima, A., Noguchi, K., Sato, K., Hoshino, T., and Imahori, K.: tau protein kinase I is essential for amyloid  $\beta$ -protein-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7789-7793 (1993)
- 58) Bankar, G.A. and Cowan, W.M.: Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture, *Brain Res.*, 126, 397-425 (1977).

- 59) 清水武則, 神野英毅: アルツハイマー病における amyloid beta protein(A $\beta$ )の検出, 日本大学生産工学部第 40 回学術講演会, (2007).
- 60) Gasparri, F., Mariani, M., Sola, F., and Galvani, A.: Quantification of the proliferation index of human dermal fibroblast cultures with the ArrayScan high-content screening reader, *J. Biomol. Screen.*, 9, 232-243 (2004).
- 61) Jerne, N.K. and Nordin, A.A.: Plaque formation in agar by single antibody-producing cells, *Science*, 140, 405 (1963).
- 62) Klein, W.L., Stine, W.B. Jr., and Teplow, D.B.: Small assemblies of unmodified amyloid  $\beta$ -protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, 25, 569-580 (2004).
- 63) はじめての抗体精製ハンドブック, Principles and Methods, Amarshan Bioscience, (2006).
- 64) Komoriya, T., Kikuchi, M., Terashima, Y., Okamoto, M., Ogawa, M., Moriyama, M., and Kohno, H.: Development of a highly sensitive latex reagent directed against C-reactive protein (CRP) using epitope analysis with monoclonal antibodies, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 292-297 (2010).
- 65) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 256, 495-497 (1975).
- 66) Barghorn, S., Nimmrich, V., Striebinger A., Krantz, C., Keller, P., Janson, B., Bahr, M., Schmidt, M., Bitner, R.S., Harlan, J., Barlow, E., Ebert, U., and Hillen, H.: Globular amyloid  $\beta$ -peptide<sub>1-42</sub> oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease, *J. Neurochem.*, 95, 834-847 (2005).
- 67) Cotton, R.G.H., Secher, D.S., and Milstein, C.: Somatic mutation and the origin of antibody diversity. Clonal variability of the immunoglobulin produced by MOPC 21 cells in culture, *Eur. J. Immunol.*, 3, 135-140 (1973).
- 68) Murakami, K., Horikoshi-Sakuraba, Y., Masuda, Y., Murata, N., Noda, Y., Masuda, Y., Kinoshita, N., Hatsuta, H., Murayama, S., Shirasawa, T., Shimizu, T., and Irie, K.: Monoclonal antibody against the

turn of the 42-residue amyloid  $\beta$ -protein at positions 22 and 23, *ACS Chem. Neurosci.*, 1, 747-756 (2010).

69) Armstrong, R.A. and Cairns, N.J.: Size frequency distribution of the  $\beta$ -amyloid ( $a\beta$ ) deposits in dementia with Lewy bodies with associated Alzheimer's disease pathology, *Neurol. Sci.*, 30, 471-477 (2009).

70) van Oijen, M., Hofman, A., Soares, H.D., Koudstaal, P.J., and Breteler, M.M.B.: Plasma  $A\beta_{1-40}$  and  $A\beta_{1-42}$  and the risk of dementia: a prospective case-cohort study, *Lancet Neurol.*, 5, 655-660 (2006).

71) Shimizu, T., Yoshimune, K., Komoriya, T., Akiyama, T., Ye, X., and Kohno, H.: Combination of specific monoclonal antibodies allow identification of soluble aggregates of  $A\beta_{1-42}$  by sandwich ELISA, *Adv. Biosci. Biotechnol.*, 4, 63-66 (2013).

## 謝辞

本研究を行うにあたり，終始丁寧な御指導ならびに御教授を賜り，また多くの研鑽の場を与えていただきました日本大学生産工学部教授 野呂 知加子 先生に深く感謝いたします。本論文を作成するにあたり，適切な御助言ならびに御指導を賜りました日本大学生産工学部教授 山田和典 先生，同教授 津野 孝 先生ならびに応用分子化学科の先生方に深く感謝いたします。また，星薬科大学理事 神野 英毅 先生，日本大学生産工学部准教授 吉宗 一晃 先生，同大学専任講師 小森谷 友絵 先生には長きにわたり御指導，御教授いただきましたことを心より感謝申し上げます。

最後に，本研究に携わったすべての方々に心から感謝いたします。