

目次

	頁
論文要旨	4
序論	6
第一章 $A\beta$ 部位特異的マウスモノクローナル抗体の樹立と $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 選択的 サンドイッチ ELISA 法の開発	9
緒言	9
方法	10
(1) $A\beta$ ペプチド	
(2) 免疫原の作製と免疫	
(3) 酵素標識化抗原の作製	
(4) 抗体価の測定	
(5) 細胞融合と抗 $A\beta$ モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立	
(6) 抗体の精製	
(7) 競合法酵素免疫測定法による抗 $A\beta$ モノクローナル抗体の反応特異性の検討	
(8) HRP 標識化抗 $A\beta$ モノクローナル抗体の作製	
(9) $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 選択的サンドイッチ ELISA 法	
結果	15
1.1 抗 $A\beta$ モノクローナル抗体の作製	15
1.2 競合法酵素免疫測定法による抗 $A\beta$ モノクローナル抗体の反応特異性の比較	16
1.3 $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 選択的サンドイッチ ELISA 法	22
考察	25
小括	27

第二章 $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 選択的サンドイッチ ELISA 法の応用：

培養細胞が分泌する $A\beta$ の解析に基づく家族性アルツハイマー病の発症機序に関する検討	28
緒言	28
方法	30
(1) サンドイッチ ELISA	
(2) 細胞培養	
(3) IMR-32 細胞の培養上清に含まれる $A\beta$ の分離精製	
(4) 質量分析とアミノ酸分析	
(5) Val ⁷¹⁷ 変異を持つ APP を導入したヒト神経芽細胞腫 M17 細胞の分泌する $A\beta$ の解析	
結果	31
2.1 野生型の神経系細胞株が生理的条件下に分泌する $A\beta$ の検討	31
2.2 IMR-32 細胞の培養上清に含まれる $A\beta$ の分子種	32
2.3 Val ⁷¹⁷ 変異を持つ APP を導入したヒト神経芽細胞腫 M17 細胞の分泌する $A\beta$ の解析	35
考察	37
小括	38

第三章 抗 $A\beta$ モノクローナル抗体の展開：

$A\beta$ の脳内蓄積機序の考察と抗 $A\beta$ 42(43) C 末端抗体 BC05 の受動免疫によるアルツハイマー病抗体療法の検討	39
緒言	39
方法	40
(1) AD 脳、ダウン症脳の免疫組織化学	
(2) 受動免疫に用いた APP トランスジェニックマウスと抗体	
(3) ビオチン化 BC05(BC05B) の脳内移行性の検討	
(4) BC05 の Tg2576 マウスへの連続投与試験	
(5) $A\beta$ ELISA	

(6) Tg2576 マウス脳の免疫組織化学	
結果	43
3.1 AD 脳の免疫組織化学	43
3.2 ビオチン化 BC05(BC05B)の脳内移行性	45
3.3 BC05 の9ヶ月間連続投与後の血漿 A β 濃度の変化	45
3.4 BC05 の9ヶ月間連続投与後の脳内 A β 濃度の変化	46
3.5 BC05 の9ヶ月間連続投与後の免疫組織化学	47
考察	50
小括	53
結論	54
謝辞	55
引用文献	56

論文要旨

アルツハイマー病(AD)の脳に特徴的な病理学的変化として出現する老人斑は、1 回膜貫通型のアミロイド前駆体蛋白質 (APP) から切り出される 39-43 アミノ酸残基の蛋白質断片アミロイド β ペプチド ($A\beta$) を主な構成成分とする。AD 脳から抽出される $A\beta$ には C 末端部の長さが異なる 2 種類の分子種、 $A\beta$ (1-40) と $A\beta$ (1-42) が含まれることが明らかになっていたが、両者の物理化学的・生化学的性質と AD 発症の関係は不明であった。

本研究ではまず、 $A\beta$ C 末端部分の 2-3 アミノ酸残基の違いに注目し、異なる C 末端を持つ $A\beta$ 分子種の産生・蓄積と AD 発症の関係を明らかにすることを目的として、Val⁴⁰ で終わる $A\beta$ 40 と Ala⁴² で終わる $A\beta$ 42 を識別することのできるマウスモノクローナル抗体を樹立した。さらに、アミノ (N) 末端側に対するマウスモノクローナル抗体を捕捉抗体として用いることにより、 $A\beta$ 40 と $A\beta$ 42(43) を分別して定量できる高感度サンドイッチ ELISA を開発した。そして、C 末端部の 2 アミノ酸残基の違いがもたらす物理化学的・生化学的変化と AD の発症の関係を明らかにするため、上記の ELISA 測定系と抗体を用いて以下の研究を行った。

まず、野生型の哺乳類培養細胞が内因性の APP を基質として産生する $A\beta$ 分子種を同定することを目的として、ヒト神経芽細胞腫 IMR-32 細胞が分泌する $A\beta$ の 1 次構造を解析した。質量分析の結果、最大の UV ピークを与えた $A\beta$ (1-40) に加え、 $A\beta$ (1-40) の酸化物、 $A\beta$ (1-37)、 $A\beta$ (1-38)、 $A\beta$ (1-39) および $A\beta$ (1-42) のシグナルが検出された。他の神経芽細胞腫やグリオーマ細胞株の分泌する $A\beta$ も ELISA を用いて検討した結果、IMR-32 細胞と同様、ヒトまたはげっ歯類由来の培養細胞株からは主に $A\beta$ (1-40) が分泌されること、高い凝集性を持つ $A\beta$ 42(43) は分泌される総 $A\beta$ 量の約 10% を占めることを見出した。

家族性アルツハイマー病(FAD)をもたらす APP 遺伝子変異によるアミノ酸置換として Val⁷¹⁷ ($A\beta$ の 46 位に相当) の置換 (V717I、V717F、V717G など) が知られていたが、それらによる FAD の発症機構は不明であった。そこで、これらの Val⁷¹⁷ 変異が細胞の $A\beta$ 産生に及ぼす効果を調べるため、種々の変異型 APP を一過性発現させたヒト神経芽細胞腫 M17 細胞の培養上清中の $A\beta$ 濃度を ELISA によって定量した。その結果、Val⁷¹⁷ 変異は、スウェーデン型変異とは異なり、総 $A\beta$ 量を変化させることなく、 $A\beta$ 42(43) の産生比率を 1.5-1.9 倍に

上昇させることがわかった。すなわち、Val⁷¹⁷変異は γ セクレターゼ切断部位のシフトをもたらし、高い凝集性を持つA β 42(43)の産生比率を増加させることにより、AD発症の原因となることを強く示唆した(Suzuki et al., 1994b)。

AD脳の老人斑を構成するA β の分子種を調べるため、A β のC末端に特異的な抗体を用いてAD患者およびダウン症患者の脳の免疫組織化学を行った。AD患者の脳皮質では、BS85抗体(抗A β 25-35)陽性の老人斑は同じくBC05抗体(抗A β 42(43) C末端)にも陽性であったことから、A β 42(43)はほぼすべての老人斑に含まれると考えられた。一方、BA27抗体(抗A β 40 C末端)陽性の老人斑は、成熟したコアを持つ老人斑や脳血管アミロイドに限られ、コアを持たない未成熟の老人斑は弱く染まるのみであったことから、A β 40は老人斑の成熟に伴って蓄積することが予想された。AD脳病変の時系列を再現するダウン症脳の検討でも、アミロイド沈着の初期形態と考えられるびまん性老人斑はBC05陽性でBA27陰性であったことから、A β の蓄積は凝集性の高いA β 42(43)の沈着から始まると考えられた(Iwatsubo et al., 1994, 1995)。

最後に、A β 42(43)のC末端に特異的な抗体BC05の受動免疫により、凝集性の高いA β 42(43)を脳内から選択的に除去することが可能かどうかを検討した。APP Tg マウス(Tg2576)に、A β 蓄積開始前(3ヶ月齢)から蓄積進行期(12ヶ月齢)にかけて長期受動免疫(腹腔内投与、0.5 mg/マウス/週、n=9-10)を行い、血漿中および脳内のA β レベルをコントロール群(マウスIgG投与群)と比較した。その結果、9ヶ月間連続投与後の血漿A β 42(43)濃度はコントロール群の約44倍に上昇し(A β 40濃度はコントロール群の70%程度に低下)、脳内可溶性A β 42(43)レベルはコントロール群の156%に上昇した。また同時に脳内不溶性A β レベルは、A β 40が27.3%、A β 42(43)が31.5%と低下傾向を示したことから、BC05は脳内可溶性A β 42を安定化させることにより、脳からのA β の排出を促進する可能性が想定された。

以上の結果から、本研究において私はC末端部の2アミノ酸残基の違いがもたらすA β 42(43)の高い凝集性が、ADの発症に決定的な役割を果たすことを示し、A β 40とA β 42(43)を高感度に分別して検出する方法を確立することによりADの病態生理の諸相を解明した。

序論

アルツハイマー病(AD)脳に特徴的な病理学的変化のひとつとして現れる老人斑は、アミロイド β ペプチド($A\beta$)を主要構成成分とする細胞外の凝集体である。 $A\beta$ は、1回膜貫通型のアミロイド前駆体タンパク (APP) から切り出されるアミノ酸 39-43 残基のペプチドで、そのカルボキシ(C)末端側の 11-15 残基は APP の膜貫通領域にあたり、極めて脂溶性の高い 1 次構造を持つ (図 i)。AD 脳の老人斑の主要構成成分として 4 kDa の $A\beta$ / A4 タンパクが見出されて以来 $A\beta$ の研究は進み (Glenner & Wong, 1984; Masters et al., 1985)、脳実質や脳血管壁に蓄積する $A\beta$ は 2 種類の分子種、 $A\beta$ (1-40) と $A\beta$ (1-42)、に大別されること (Kang et al., 1987; Miller et al., 1993; Roher et al., 1993a)、脳脊髄液中 (Vigo-Pelfrey et al., 1993) や培養細胞の培養上清中 (Haass et al., 1992; Shoji et al., 1992) に可溶性の $A\beta$ が存在することなどが知られるようになった。しかし、1990 年代前半までカルボキシ(C)末端部の長さがわずかに異なる 2 種類の分子種 ($A\beta$ (1-40) と $A\beta$ (1-42)) と AD 発症との関係は未解明なままであった。

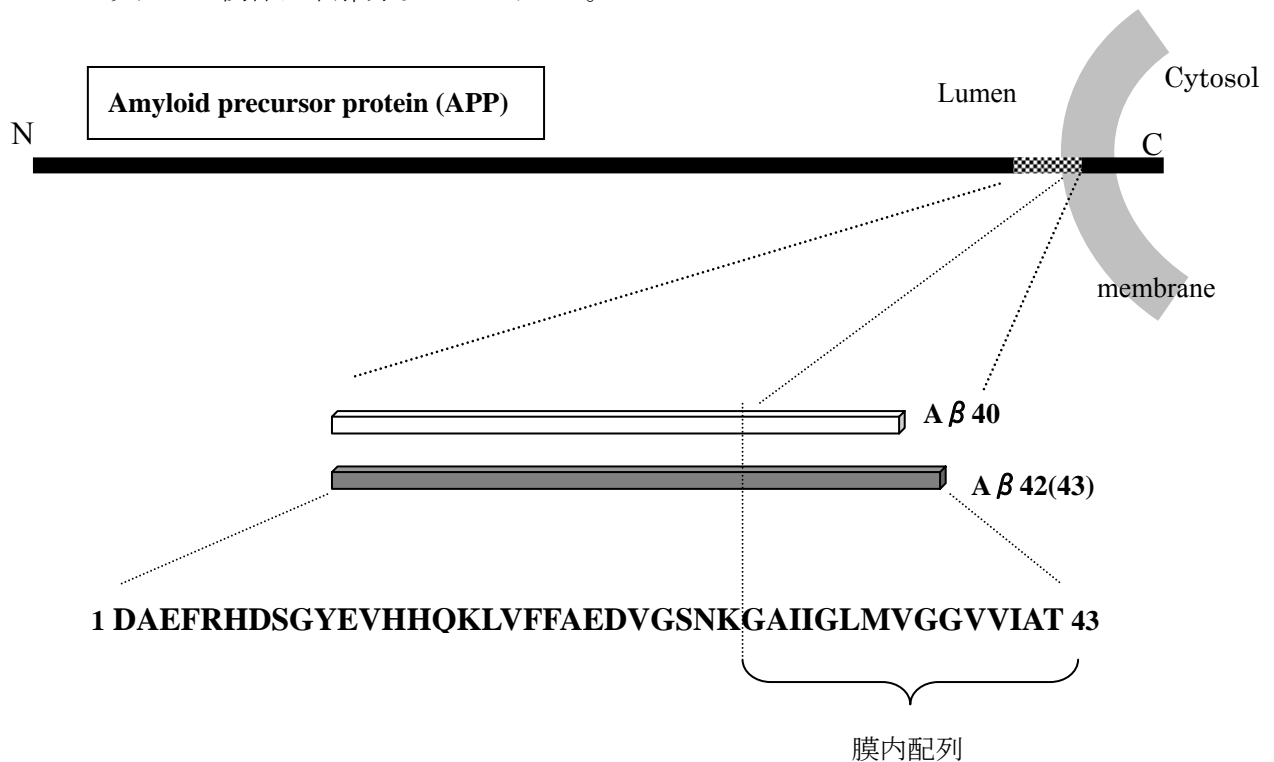


図 i Amyloid precursor protein (APP) と amyloid β peptide ($A\beta$)

発見当初から A β は高い凝集性を持つことが知られていたが (Masters et al., 1985)、A β の物性研究から、Ala⁴² で終わる A β (A β 42) が秒のオーダーで急速に凝集するのに対し、Val⁴⁰ で終わる A β (A β 40) は時間のオーダーで緩やかに凝集することがわかった (図 ii、Jarrett et al., 1993)。また A β 42 の重合体は凝集の種となって共存する A β 40 の凝集をも促進するというモデルが提示された (seed 仮説, Jarrett et al., 1993)。

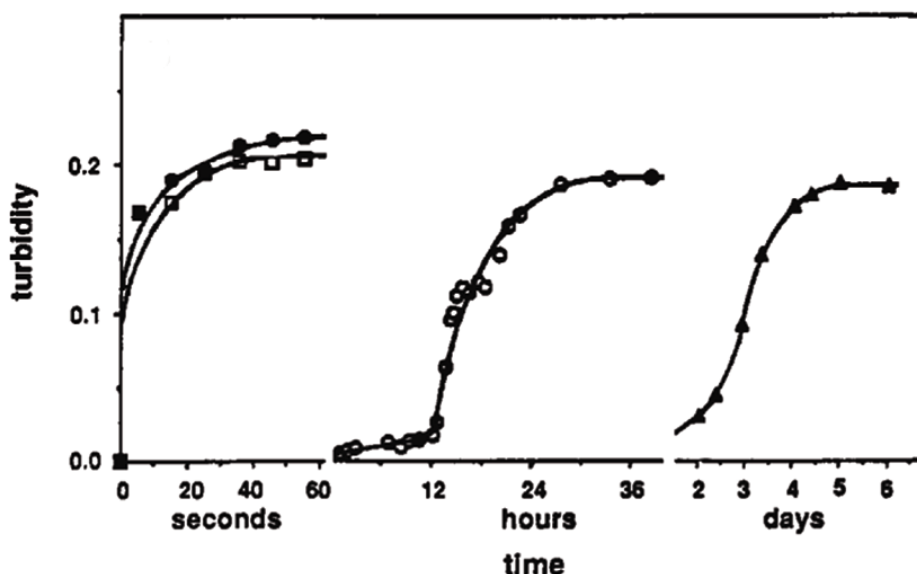


図 ii アミロイド線維形成の時間依存性 (Jarrett et al., 1993 より引用)
200 μ M の●A β (26-43)、□A β (26-42)、○A β (26-40)および▲A β (26-39)
の水溶液 (10%DMSO) の濁度を 400 nm で測定し、凝集速度を比較した。

このような A β 42 C 末端のアミノ酸わずか 2 残基がもたらす高い凝集性は、NMR を用いた A β の溶液中のコンフォメーション解析により徐々に解明されてきた。通常 mM オーダーという高濃度の被験分子の溶液を必要とする NMR 実験においては、凝集性の高い全長 A β の構造解析は極めて困難であるため、A β を可溶化するために有機溶媒や界面活性剤を加えるなど生理的な環境とは乖離した条件で測定を行った例も多い (Coles et al., 1998)。A β を注意深く溶解して重合体を除いた水溶液を低温 (5°C) に保つことにより、A β の単量体を長時間安定化させることに成功した Hou らの報告によれば、A β (1-40) の持つ疎水性領域は Leu17-Phe20 のみであるのに対し、A β (1-42) の疎水性領域は Leu17-Phe20、Ile31-Val36 および Val39-Ile41 の 3 つの領域にまたがるという (Hou et al., 2004)。Phe20-Ala30 の領域に存在する turn 構造のため、A β (1-42) ではこれらの領域間の分子内疎水性相互作用を生じ

る (Hou et al., 2004) というモデルは、 $A\beta 40$ と $A\beta 42$ の物性の違いの少なくとも一部を説明できるものと思われる。

本研究では、 $A\beta$ C 末端のわずか 2 残基の違いがもたらす物性の変化が AD の発症に関わるのかを明らかにし、AD 治療薬の開発につなげることを目的として以下の検討を行った。まず、 $A\beta 40$ 、 $A\beta 42$ を高感度に識別し、各 $A\beta$ 分子種の生体内における挙動を免疫化学的に比較することのできる、 $A\beta 40$ 、 $A\beta 42$ それぞれの C 末端部を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製した。そして $A\beta$ の N 末端部または中間部を認識するモノクローナル抗体と C 末端に対する抗体を組み合わせることにより、 $A\beta 40$ 、 $A\beta 42$ を高感度に分別定量可能なサンドイッチ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を開発した (第一章)。そして、このサンドイッチ ELISA 法を用いることにより、野生型の培養細胞が生理的条件下で分泌する $A\beta$ の分子種を明らかにし、家族性アルツハイマー病 (FAD) の発症において $A\beta 42$ が果たす役割を明らかにした (第二章)。さらにこれらのモノクローナル抗体を用いて AD 脳での $A\beta$ の蓄積機序を示すと共に、 $A\beta$ ワクチン療法に代わる AD 抗体療法のひとつとして、 $A\beta 42$ の C 末端部に対する抗体を用いる受動免疫の可能性について検討した (第三章)。

第一章 $A\beta$ 部位特異的マウスモノクローナル抗体の樹立と

$A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 選択的サンドイッチ ELISA 法の開発

緒言

生理活性ペプチドの N 末端、C 末端をそれぞれ認識する 2 種類のモノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA 法は、radio immunoassay (RIA) や競合法酵素免疫測定法に比べ非常に高感度かつ特異的に被験分子を定量しうることに長である。例えば、アミノ酸 21 残基からなるヒトエンドセリン(ET)には ET-1、ET-2、ET-3 という 3 つのアイソフォームが存在し、その前駆体であるビッグエンドセリンにも 3 つのアイソフォームが存在する。これらの N 末端、C 末端をそれぞれ認識するモノクローナル抗体を組み合わせて開発された ET-1、ET-3、およびビッグエンドセリン-1 特異的サンドイッチ ELISA は、0.04-0.08 fmol/well という驚異的に高い感度で各ペプチドの特異的検出に成功している (Suzuki et al., 1989, 1990; Matsumoto et al., 1989)。

アミノ酸 39-43 残基の $A\beta$ についてもこの技術の応用は可能であると考えられたが、 $A\beta$ C 末端部 2-3 残基の長さの違いを見分ける抗体の報告は従来なかった。これらを作製して N 末端部に対する抗体と組み合わせることにより、C 末端部の長さが異なる $A\beta$ の分子種に特異的なサンドイッチ ELISA 系が構築できれば、各 $A\beta$ の AD 脳における蓄積量、蓄積様式、あるいは体液中の濃度といった一連の挙動が免疫化学的に明らかになると予想された。さらに AD 発症と $A\beta$ C 末端部の長さとの関係も解明できると期待された。しかし、 $A\beta$ C 末端部に対する抗体作製のための免疫原として必要な C 末端部の部分ペプチドの合成と、得られたペプチドをウシサイログロブリンなどのキャリヤータンパクと架橋する過程は、ペプチド自身の凝集性の高さから非常に困難であった。また、ペプチド抗体、特に $A\beta$ のように疎水性の非常に高いペプチドに対して得られたハイブリドーマをスクリーニングする際には、抗原を固相化したプレートを用いる方法は適さない。本研究では、抗 ET マウスモノクローナル抗体の樹立などで培われた経験をもとにこうした問題点を克服し、Val⁴⁰ で終わる $A\beta$ 40 と Ala⁴² で終わる $A\beta$ 42 を識別することのできるマウスモノクローナル抗体および $A\beta$ の N 末端と中間部に対するマウスモノクローナル抗体を樹立し、これらを用いて高感度の $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 分別定量系 (サンドイッチ ELISA 法) を開発した。

方法

以下に記載する A β および A β の部分ペプチドは、特に断りがない場合はヒトの配列を指す。

(1) A β ペプチド

免疫に用いた A β (1-40)、[Cys¹⁷]A β (1-16) および A β (25-35) は、武田薬品工業株式会社開拓第一研究所（当時）のペプチド合成部門において、自動ペプチド合成機（Applied Biosystems モデル 430A、Perkin Elmer、Norwalk, CT）を用いて合成された。[Cys³⁴]A β (35-43) は同じく開拓第一研究所のペプチド合成部門において、N-[(9-fluorenylmethoxy) carbonyl (Fmoc)]-アミノ酸誘導体カートリッジ（Applied Biosystems）を用いて合成された。[Cys²⁹]A β (11-28) と A β (17-24) はバイオロジカ社（名古屋）から、[Cys²⁹]A β (17-28) はアコード社（東京）から購入した。

反応特異性の精査に用いた A β (1-38)、A β (1-39) は、A β (1-40) をカルキペプチダーゼ Y で限定分解することにより作製した。すなわち、A β (1-40) (Bachem Feinchemikalien AG, Bundendorf, Switzerland) とカルキペプチダーゼ Y（オリエンタル酵母、東京）を 0.5% 酢酸アンモニウム水溶液に溶解して 10°C で 2 時間反応させた。反応後、Vydac C4 カラム (The SeP/a/rations Group 社, Hesperia, CA) を用いる逆相 HPLC により分画し、UV (210 nm) で検出された 3 本の主なピークを質量分析により同定した。

(2) 免疫原の作製と免疫

1 - (1) で得られたペプチドとキャリアタンパク質との複合体を作製し、免疫原とした。A β (1-40) または A β (25-35) は、ペプチドとウシサイログロブリン (BTG) を混合し、終濃度 0.3-0.4% のグルタルアルデヒドを加えて室温で 3 時間反応させることにより抗原-BTG 複合体を作製した。[Cys¹⁷]A β (1-16)、[Cys²⁹]A β (11-28) を含む免疫原は、BTG を N-(γ -マレイミドブチルカルキ) サルシニト (GMBS) と反応させることにより BTG にマレイミド基を導入し、これをペプチドに組み込んだ Cys 残基のチオールと反応させることにより作製した。[Cys³⁴]A β (35-43) を含む免疫原は、GMBS を用いてマレイミド基を導入したウシ血清アルブミン (BSA) をペプチドの Cys 残基のチオールと反応させることにより作製した。

6-8 週齢の BALB/C マウスの雌に上述の免疫原のそれぞれ約 80 μ g/匹を完全フロイントアジュバントとともに皮下投与した。各免疫原に対しそれぞれ 8 匹のマウスを使用し、以後 3 週間おきに同量の免疫原を不完全フロイントアジュバントとともに 2-3 回追加免疫

した。

(3) 酵素標識化抗原の作製

β -D-ガラクトシダーゼ (β -Gal) 標識化 A β (1-40) は、A β (1-40) 70 μ g (16 nmol) をトリメチルアミン 160 nmol、N-スクシニミド 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP) 23 nmol と室温で 90 分間反応させた後、 β -Gal (ヘーリンガー・マンハイム社、Mannheim) 1.7 mg と 4°C で一晩反応させ、ウルトラゲル AcA34 カラム (ファルマシア LKB、Bromma, Sweden) で分画することにより作製した。西洋ワサビペーオキシダーゼ (HRP) で標識化した [Cys¹⁷]A β (1-16)、[Cys²⁹]A β (11-28) または [Cys³⁴]A β (35-43) の作製は以下のように行った。まず 100-300 nmol の HRP (ヘーリンガー・マンハイム社) を 10-15 倍のモル比で GMBS と反応させ、セファデックス G-25 カラムで分画することにより HRP にマレイミド基を導入した。次いで、このマレイミド基の導入された HRP 3-4 mg (70-80 nmol) を Cys が組み込まれた各ペプチド 0.5-3.2 mg と混合して 4°C で一晩反応させたのち、ウルトラゲル AcA44 カラム (ファルマシア LKB 社) で分画した。

(4) 抗体価の測定

抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートに抗体 (免疫したマウスの抗血清) を結合させたのち、1-(3) で酵素標識した抗原を反応させ、 β -Gal または HRP の基質が与える蛍光または比色を測定することにより抗体価を定量した。

まず、抗マウスイムノグロブリン抗体 (anti-mouse IgG, IgA, IgM, Cappel, Westchester, PA) を 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) に溶解して 96 ウェルマイクロプレート (Nunc, Kamstrup, Denmark) に固相化したのち、25% ブロックエース (雪印乳業、札幌) を用いてブロッキングすることにより抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートを作製した。マウス抗 A β (1-40) 抗血清およびマウス抗 A β (25-35) 抗血清は、バッファー A [0.1% BSA、0.1 M NaCl、1 mM MgCl₂、0.05% CHAPS [3-[(3-トリメチルプロピル)ジメチルアミノ]プロパンスルホン酸] および 0.1% NaN₃ を含む 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.0)] で希釈したのち抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートに加えて 4°C で一晩反応させた。プレートを PBS で洗浄後、 β -Gal 標識化 A β (1-40) (バッファー A で 200 倍希釈) 100 μ L を加えて室温で 1 日反応させ、PBS で洗浄した。固相上の酵素活性を測定するため、20 μ g/ml の 4-メチルウンベリフェリル β -D-ガラクトシド (4-MUG) をプレートに加えて 37°C で 3 時間反応させたのち 0.2 M Na₂CO₃ 100 μ L を加えて反応を停止し、遊離した 4-メチルウンベリフェロンの蛍光を蛍光プレートリーダー (フルオロスキャン II、Labsystems, Helsinki, Finland) にて励起波長 355 nm、測定波長 460 nm で測定した。

マウス抗 A β (1-16) 抗血清、抗 A β (11-28) 抗血清または抗 A β (35-43) 抗血清はバッファー C [1% BSA、0.4 M NaCl、および 2 mM EDTA を含む 0.02 M リン酸緩衝液 (pH7.0)] で希釈し、それぞれの HRP 標識化抗原とともに抗マウス IgG グロブリン抗体結合マイクロプレートに加えて 4°C で一晩反応させた。プレートを PBS で洗浄後、TMB マイクロウェルプレートキターセ基質システム (KIRKEGAARD & PERRY LAB, Gaithersburg, MD) を加え、室温で 10 分間反応後、1M リン酸 100 μ L で反応を停止した。450 nm の吸収をプレートリーダー (MTP-32、コロナ社、東京) で測定することにより固相上の酵素活性を求めた。

(5) 細胞融合と抗 A β モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

(4) の結果、比較的高い抗体価を示したマウス 1 匹に対して、200-300 μ g の免疫原を生理食塩水 0.25-0.3 ml に溶解させたものを静脈内に投与することにより最終免疫を行った。最終免疫 3-4 日後のマウスから脾臓を摘出し、ステンレスメッシュで圧迫、ろ過し、イーグル MEM 培地に浮遊させて脾臓細胞懸濁液を得た。この脾臓細胞と BALB/C マウス由来ミエローマ細胞 P3-X63.Ag8.U1 (P3U1) (Yelton et al., 1978) との細胞融合は原法に準じて行った (Kohler & Milstein, 1975)。すなわち、脾臓細胞および P3U1 をそれぞれイーグル MEM 培地で 3 回ずつ洗浄し、脾臓細胞と P3U1 の細胞数が 5:1 の比率になるように混合して、800 回転で 15 分間遠心した。上清を十分に除いた後、沈殿を軽くほぐし、45% ポリエチレングリコール (PEG) 6000 (Koch-Light 社、Colnbrook, UK) を 0.3 ml 加えて軽く混合し、37°C の温水浴中で 7 分間静置して融合させた。融合後の細胞に毎分 2 ml の割合でイーグル MEM 培地を添加し、15 ml の培地を加えた後 750 回転で 15 分間遠心して上清を除いた。沈殿を 10% ウシ胎児血清 (FBS) 含有 GIT 培地 (和光純薬) (GIT-10%FBS) で P3U1 細胞の数が 2×10^5 個/ml になるように懸濁し、24 ウェルプレートに 1 ml/ウェルで 120 ウェルに播種した。37°C、5%CO₂ で培養し、24 時間後に HAT (100 μ M ヒポキサンチン、0.4 μ M アミノプテリン、1.6 mM チミジン) を含んだ GIT-10%FBS (HAT 培地) を 1 ml/ウェル添加することにより HAT 選択培養を開始した。HAT 選択培養は、培養開始 3、6、9 日後に上清を新鮮な HAT 培地で半量交換することにより継続した。播種後 10 日目前後に上清を採取して、1-(4) の方法に従って抗体価を測定し、比較的高い抗体価を示したハイブリドーマ (各抗原につき数種類) を選択した。

選択したハイブリドーマは限界希釈法により単クローン化した。フィーダー細胞として BALB/C マウスの胸腺細胞を 96 ウェルプレートのウェルあたり 5×10^5 個加え、播種後 10

日目前後に培養上清の抗体価を測定し、陽性のクローンを選択した。各クローンのクラス、サブクラスの決定は、アイソタイピングキット (Mouse-Typer Sub-Isotyping Kit、バイオラッド、Hercules, CA) をにより各クローンの培養上清を用いて行った。

(6) 抗体の精製

選択したハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体は、抗体含有腹水より調製した。すなわち、あらかじめミネラルオイル 0.5 ml を腹腔内投与した BALB/C マウスに $1-3 \times 10^6$ 個/マウスのハイブリドーマ細胞を腹腔内投与することにより、6-20 日後に抗体含有腹水を得た。IgG は、定法に従いプロテイン A-アガロースカラムを用いてアフィニティ精製した。IgA は初回のみプロテイン A-アガロースカラムを用いて精製したが、以後は diethylaminoethyl (DEAE) 樹脂を用いる陰イオン交換クロマトグラフィにより精製するか、または KAPTIV-AE 樹脂 (TECNOGEN SCpA, Campania, Italy) を用いてアフィニティ精製した。DEAE 樹脂による IgA 精製は以下のように行った。まず抗体含有腹水に飽和硫酸アンモニウム水溶液を加え 50%飽和とし、4℃で二晩塩析した。PBS に再溶解して透析することにより硫酸アンモニウムを除き、10 mM Tris-HCl (pH8.5) で平衡化した DEAE-トヨパール (東ソー、東京) カラム (2.5 cm X 8.5 cm) に供した。0 mM から 350 mM NaCl の濃度勾配により分画し、抗体価の得られた画分を集め PBS に対して透析後濃縮した。KAPTIV-AE 樹脂は IgA、IgE に特異的な合成ペプチド担体を共有結合させたアガロースゲルであり、これを用いる IgA 精製は (株) タカラバイオに委託して行ったが、概略を以下に記す。腹水を綿ろ過後、飽和硫酸アンモニウム水溶液を加え 50%飽和とし、4℃で一晩塩析した。得られた沈殿を再溶解して PBS に対して透析した後、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) で平衡化した KAPTIV-AE カラム (25 ml) に供し、結合画分を 0.5 M NaCl 含有 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) にて溶出した。素通り画分からも結合画分を再回収し、溶出画分をすべてまとめて PBS に対して透析した。

(7) 競合法酵素免疫測定法による抗 A β モノクローナル抗体の反応特異性の検討

1-(6) で精製したモノクローナル抗体の反応特異性を競合法酵素免疫測定法によって調べるため、まず 1-(4) の方法で各精製抗体溶液の抗体価を測定した。酵素標識化抗原の結合量が飽和結合量の約 40%となる抗体濃度に抗体を希釈し、抗マウス IgG の抗体結合マイクロプレートに 50 μ L/ウェル加えた。さらに各濃度の A β 、A β の部分ペプチド、あるいは抗 A β (35-43) 抗体については AD 患者脳のギ酸抽出画分を 50 μ L/ウェル、酵素標識

化抗原を 50 μ L/ウェル加え、4℃で一晩反応させた。それぞれの希釈にはバッファーA（蛍光測定の場合）またはバッファーC（比色測定の場合）を用いた。反応後、PBS で洗浄したのち、1-（4）の方法で固相上の酵素活性を測定した。

（8） HRP 標識化抗 A β モノクローナル抗体の作製

精製したモノクローナル抗体 4-5 mg を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.8) に、15 倍のモル比で GMBS (DMF 溶液) を加え、室温で 40 分間反応させた。反応液を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.7) で平衡化したセファデックス G-25 カラムで分離し、マレイミド基の導入された抗体画分を得た。一方、HRP 12-14 mg を 0.15 M NaCl 含有 0.02M リン酸緩衝液 (pH6.8) に溶解し、15 倍のモル比の SPDP (DMF 溶液) を加え、室温で 40 分間反応させた。ここに 136 mM ジチオスルホニル含有 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH4.5) 0.5 ml を加えて室温で 20 分間反応後、2 mM EDTA 含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラムで分離し、SH 基の導入された HRP 画分を得た。マレイミド基の導入された抗体画分と SH 基の導入された HRP 画分を混合して濃縮後、4℃で一晩放置した。0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.5) で平衡化したウルトロゲル AcA34 カラムで反応液を分離し、HRP 標識化抗 A β モノクローナル抗体を得た。

（9） A β 40、A β 42 分別定量系（サンドイッチ ELISA 法）

5-15 μ g/ml の抗 A β (1-16) モノクローナル抗体 BAN50 または抗 A β (11-28) モノクローナル抗体 BNT77 を含む 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH9.6) を 96 ウェルマイクロプレートに 100 μ L/ウェルで分注し、4℃で 24 時間インキュベートした。抗体溶液を除いた後、25% ブロックエース含有 PBS 300 μ L/ウェルを分注して 4℃で 24 時間インキュベートすることにより、余剰の結合部位をブロッキングした。PBS 300 μ L/ウェルで 2 回洗浄後、バッファーEC [10% ブロックエース、0.2% BSA、0.4 M NaCl、0.05% CHAPS、0.05% NaN₃ を含む 0.02 M リン酸緩衝液 (pH7.0)] 50 μ L/ウェルを加え、さらにバッファーEC で希釈したヒト A β (1-40) 標準液または被験液を 100 μ L/ウェル加え、4℃で一晩反応させた。PBS 300 μ L/ウェルで 4 回洗浄後、1-（8）に従って作製した BS85-HRP（総 A β 定量用）、BA27-HRP（A β 40 定量用）または BC05-HRP（A β 42(43) 定量用）をバッファーC で 1000-1500 倍に希釈し、100 μ L/ウェル加え、4℃で一晩反応させた。PBS 300 μ L/ウェルで 4 回洗浄後、1-（4）と同様に固相上の HRP の活性を測定した。

結果

1.1 抗 A β モノクローナル抗体の作製

A β (1-16)-BTG、A β (11-28)-BTG、A β (25-35)-BTG、A β (1-40)-BTG、および A β (35-43)-BSA を免疫原として、ヒト A β N 末端部、A β 中間部、A β 40 C 末端部および A β 42 (43) C 末端部に対するモノクローナル抗体の作製を目的とする免疫を行った。各免疫原を BALB/C マウス 8 匹ずつに免疫した結果、それぞれ 4-8 匹のマウスで血中抗体価の上昇が認められ (図 1.1)、各免疫原に対して血中抗体価の高いマウスから順に細胞融合に供した。HAT 選択の開始から 10 日目前後に培養上清の抗体価を測定し、各免疫原に対して陽性のウェルをそれぞれ 1-20 個得た (図 1.2)。その後 2, 3 日の間に、細胞増殖に伴う抗体価の上昇を確認すると共に、A β の部分ペプチド、全長の A β (1-40) あるいは AD 脳ギ酸抽出物との反応性を調べ、クローニングに供するハイブリドーマを選択した。最終的にそれぞれの免疫原に対してハイブリドーマクローンを 1-8 個ずつ樹立した。

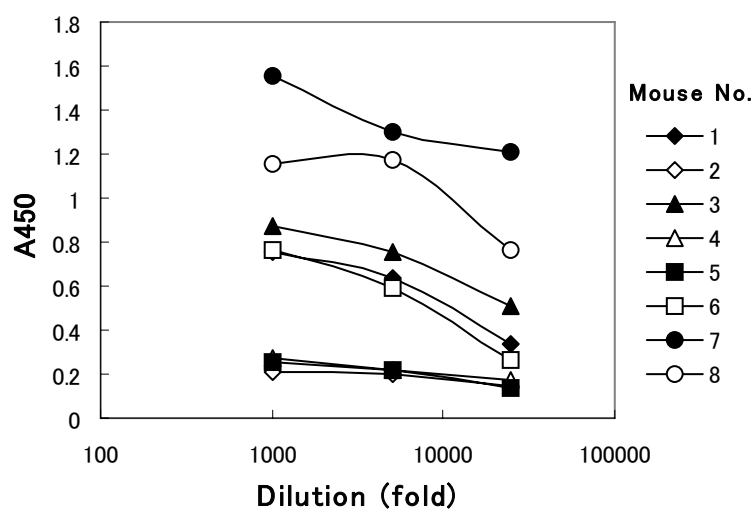


図 1.1 マウス抗血清の抗体価

2 回の追加免疫後の抗 A β (11-28) 抗血清の抗体価
をマウスごとに示した。

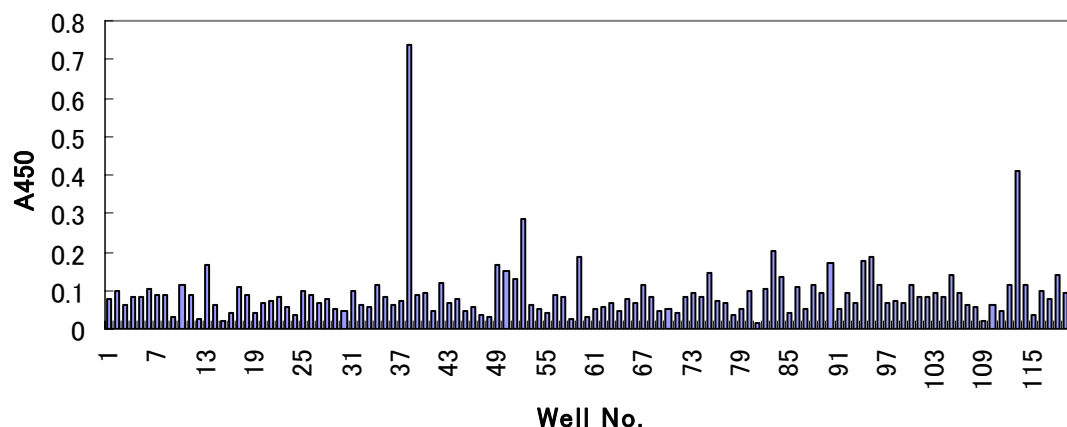


図 1.2 細胞融合後 10 日目の 24 ウェルプレート上清中の抗体価

$A\beta$ (11-28)を免疫したマウス No. 7 の細胞融合の結果を示した。

No. 113 のウェルから BNT77 を得た。

1.2 競合法酵素免疫測定法による抗 $A\beta$ モノクローナル抗体の反応特異性の比較

1.1 で比較的良好な反応性を示したモノクローナル抗体について、マウス腹水より調製した精製抗体を用いて、方法 1-(7) の記載に従って競合法酵素免疫測定法 (競合法 EIA) により反応性を精査した。ここでは β -Gal または HRP で標識した抗原とモノクローナル抗体との結合から得られる最大酵素活性 (蛍光強度または吸光度) を B_0 、標識抗原と非標識ペプチドをモノクローナル抗体と競合的に反応させた後、抗体に結合した標識抗原の酵素活性を B として、 B/B_0 を算出することにより非標識ペプチドと抗体との反応性を評価した。 B/B_0 の値が小さい非標識ペプチドほど抗体との反応性が高いことを示す。

$A\beta$ (1-16)を免疫原とする抗 $A\beta$ N 末端抗体産生細胞として 24 種類のハイブリドーマが得られ、それらが産生する抗体のうち BAN052、BAN11、BAN20、BAN30、BAN40、BAN50 の計 6 抗体を選択し腹水より精製した。競合法 EIA の結果、BAN40 を除く 5 抗体は、 $A\beta$ (1-40)、 $A\beta$ (1-28)および $A\beta$ (1-16)に対して同程度の反応性を有することがわかった。5 つの抗体の反応性には大きな差異はなかったが、BAN50 を用いる競合法 EIA が最も高感度であり、検出限界は約 0.15 pmol/ウェルだった (図 1.3)。

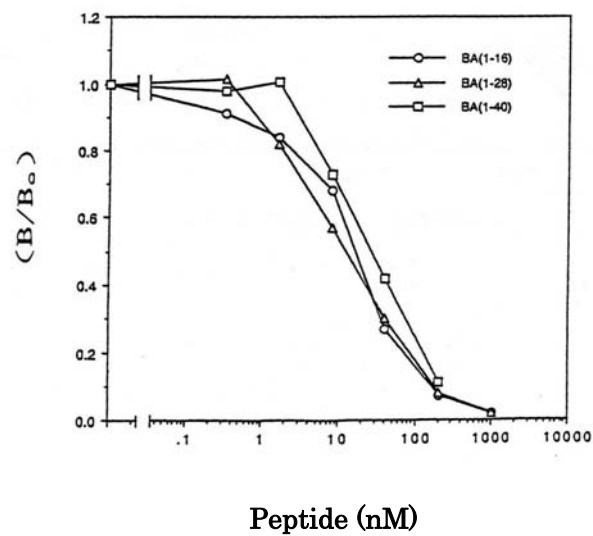


図 1.3 BAN50 を用いた競合法 EIA

BAN50 は $A\beta$ (1-40)、 $A\beta$ (1-28) および $A\beta$ (1-16) をほぼ同等の感度で検出した。

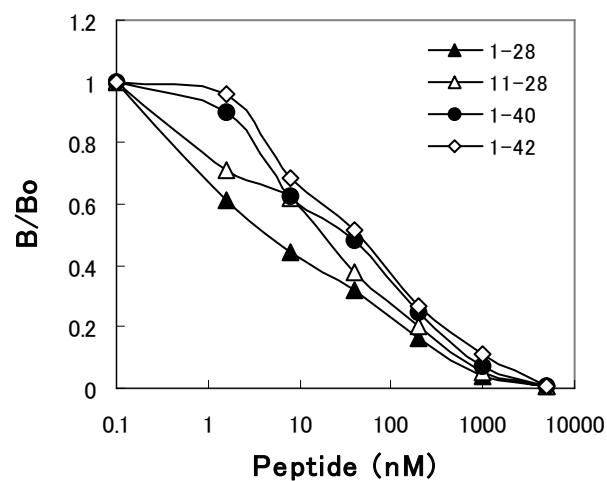


図 1.4 BNT77 を用いた競合法 EIA

BNT77 は $A\beta$ (1-40)、 $A\beta$ (1-42)、 $A\beta$ (1-28) および $A\beta$ (11-28) をほぼ同等の感度で検出した。

A β (11-28)を免疫原とする A β N 末端寄りの中間部に対する抗体産生細胞として、2回の細胞融合の結果、3 種類のハイブリドーマを選択した。そのうち BNT77 抗体は IgA であったが、プロテイン A との弱い親和性を利用してマウス腹水よりごく少量精製することに成功し、これを反応特異性の精査に用いた。競合法 EIA の結果、BNT77 だけが A β (1-40)、A β (1-28)および A β (11-28)と同程度に強く反応することがわかった (図 1.4)。また、A β (17-24)および A β (17-28)とは反応しなかったことからこの抗体のエピトープは A β (11-28)の N 末端側と考えられた (データ省略)。さらに、この BNT77 の A β (1-40)検出感度は BAN50 と同程度の約 0.1 pmol/ウェルだったことから、以後は方法 1-(6)に従って大量に精製し、サンドイッチ ELISA の検討に用いた。

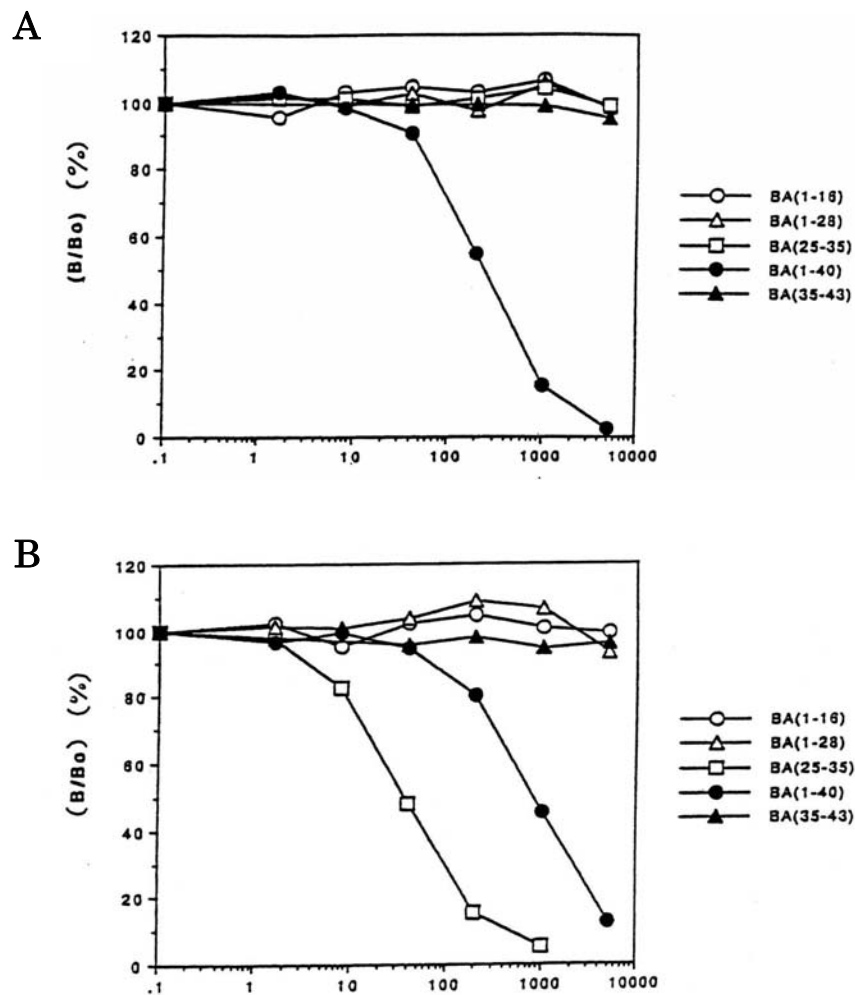


図 1.5 BA27、BS85 を用いた競合法 EIA

BA27(A)は A β (1-16)、A β (1-28)、A β (25-35)または A β (35-43)とは反応しなかった。BS85(B)は A β (1-28)とは反応することなく A β (25-35)および A β (1-40)と反応したことから、C末端寄りの中間部を認識するものと考えられた。

A β (1-40)を免疫原とするモノクローナル抗体としては BA27 を、A β (25-35)を免疫原とする A β C 末端寄りの中間部に対するモノクローナル抗体としては BS85 を選択した。競合法 EIA の結果、BA27 は A β (1-16)、A β (1-28)または A β (25-35)とは反応しなかったことから、A β の C 末端部の構造を認識するものの、A β (25-35)の部分構造に反応するものではないと考えた。一方、BS85 の A β (25-35)に対する反応性 (B/B_0)=0.5 を与える抗原濃度：20 nM、表 1.2 参照) は、A β (1-40)に対する反応性 (B/B_0)=0.5 を与える抗原濃度：800 nM) の 40 倍であった。

A β (35-43)を免疫原とする A β 42(43)の C 末端部に対する抗体産生細胞として、2 回の細胞融合の結果、8 種類のハイブリドーマを選択した。AD 脳ギ酸抽出物を用いた競合法 EIA の結果、このうち 4 種類のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体が AD 脳ギ酸抽出物と比較的強く反応した。高い抗体価を示したモノクローナル BC05 を選択し、以後の検討に用いた。表 1.1、1.2、1.3 に作製した抗 A β モノクローナル抗体のクローン名、反応性、クラス/サブクラスをまとめた。また、以上の検討で選択した代表的な抗体と認識部位を模式図に表した (図 1.7)。

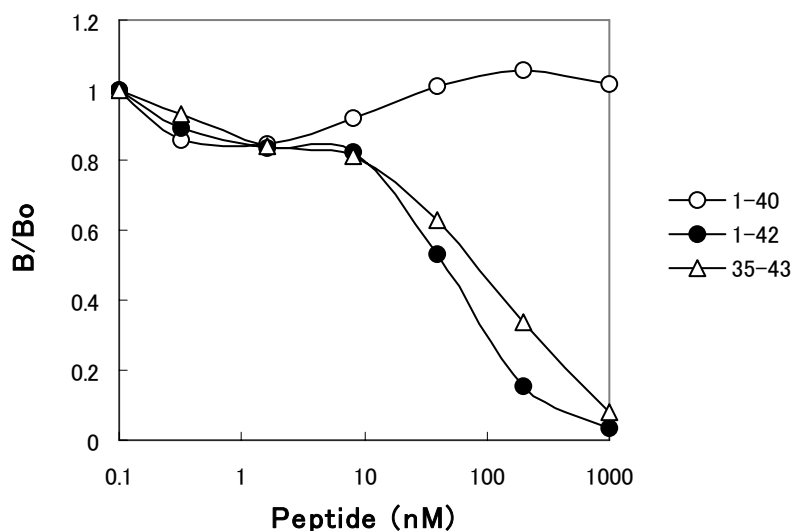


図 1.6 BC05 を用いた競合法 EIA

AD 脳のギ酸抽出物に対する反応性に基づいて選択した BC05 は、合成 A β (1-42) に対しても強い反応性を有し、かつ A β (1-40) とは反応しなかった。

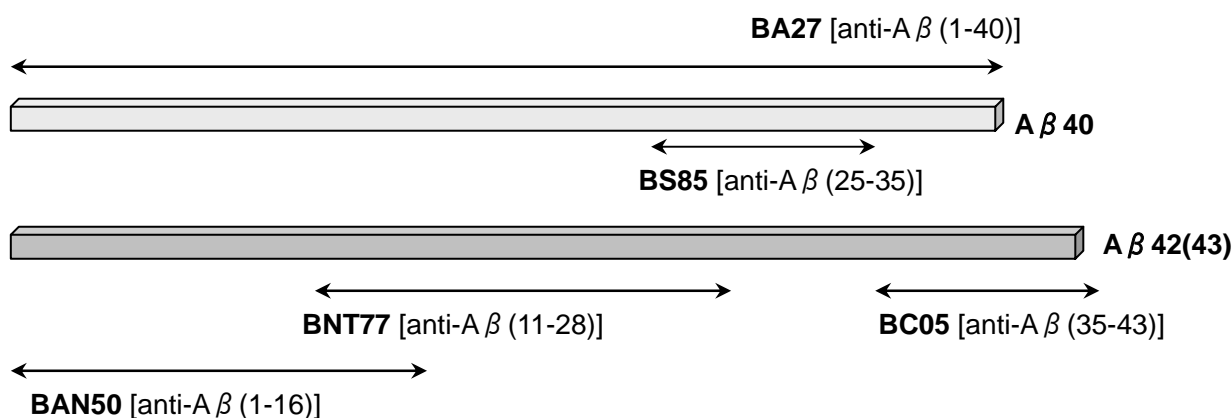


図 1.7 本研究で樹立した抗 A β モノクローナル抗体の認識部位

表 1.1 A β N 末端または N 末端側中間部に対するモノクローナル抗体の反応特異性

クローン名	免疫原	クラス/サブクラス	反応性 ¹⁾			
			A β (1-40)	A β (1-28)	A β (1-16)	A β (11-28)
BAN052	A β (1-16)	IgG1、 κ	+	+	+	ND
BAN11	A β (1-16)	IgG1、 κ	+	+	+	ND
BAN20	A β (1-16)	IgG1、 κ	+	+	+	ND
BAN30	A β (1-16)	IgG1、 κ	+	+	+	ND
BAN40	A β (1-16)	IgG1、 κ	+	-	+	ND
BAN50	A β (1-16)	IgG1、 κ	+	+	+	ND
BNT33	A β (11-28)	IgG1、 κ	-	-	ND	+
BNT77	A β (11-28)	IgA、 κ	+	+	ND	+
BNT88	A β (11-28)	IgG1、 κ	-	-	ND	+

ND : Not determined

1) 100 nM のペプチド [A β (1-40)、A β (1-28)、A β (1-16) または A β (11-28)] が存在したとき

+ : $(B/B_0) < 0.50$

- : $0.80 \leq (B/B_0)$

ただし、B: 非標識ペプチド存在下、抗体に結合した HRP 標識化 A β (1-16) または HRP 標識 A β (11-28) の量

B₀: 非標識ペプチド非存在下、抗体に結合した HRP 標識化 A β (1-16) または HRP 標識化 A β (11-28) の量

表 1.2 A β 40 C 末端または C 末端側中間部に対するモノクローナル抗体の反応特異性

クローン名	免疫原	クラス/サブクラス	反応性 ¹⁾		
			A β (1-40)	A β (1-28)	A β (25-35)
BA27	A β (1-40)	IgG2a、 κ	±	-	-
BS85	A β (25-35)	IgG1、 κ	±	-	+

1) 100 nM のペプチド [A β (1-40)、A β (1-28) または A β (25-35)] が存在したとき

+ : (B/B₀) < 0.50

± : 0.50 ≤ (B/B₀) < 0.90

- : 0.90 ≤ (B/B₀)

ただし、B: 非標識ペプチド存在下、抗体に結合した β -Gal 標識化 A β (1-40) の量

B₀: 非標識ペプチド非存在下、抗体に結合した β -Gal 標識化 A β (1-40) の量

表 1.3 A β 42(3) C 末端に対するモノクローナル抗体の反応特異性

クローン名	免疫原	クラス/サブクラス	反応性				
			A β (1-40) ²⁾	A β (35-43) ¹⁾	AD 脳画分 ¹⁾	A β (1-42) ²⁾	A β (1-43) ²⁾
BC05	A β (35-43)	IgG1、 κ	-	+	+	+	±
BC15	A β (35-43)	IgG1、 κ	ND	+	+	±	±
BC25	A β (35-43)	IgA、 κ	ND	+	-	±	+
BC35	A β (35-43)	IgG3、 κ	ND	+	-	±	+
BC55	A β (35-43)	IgG1、 κ	ND	+	+	±	±
BC65	A β (35-43)	IgG3、 κ	-	+	±	±	+
BC75	A β (35-43)	IgG1、 κ	ND	+	+	±	±
BC95	A β (35-43)	IgM、 κ	ND	+	-	-	+

ND: Not determined.

1) 500 ng/ml の A β (35-43) が存在したとき、または、100 μ g/ml の AD 脳ギ酸抽出物が存在したとき

+ : (B/B₀) < 0.60

± : 0.60 ≤ (B/B₀) < 0.80

- : 0.80 ≤ (B/B₀)

2) 100 nM のペプチド [A β (1-40)、A β (1-42) または A β (1-43)] が存在したとき、

+ : $(B/B_0) < 0.60$

\pm : $0.60 \leq (B/B_0) < 0.90$

- : $0.90 \leq (B/B_0)$

ただし、B: 非標識ペプチド存在下、抗体に結合した HRP 標識化 A β (35-43) の量

B₀: 非標識ペプチド非存在下、抗体に結合した HRP 標識化 A β (35-43) の量

1.3 A β 40、A β 42 分別定量系 (サンドイッチ ELISA 法)

① 固相抗体の選択

精製した抗 A β N 末端抗体 BAN052、BAN11、BAN20、BAN30 または BAN50 を固定した 96 ウェルマイクロプレートに A β (1-40) 標準液を反応させ、BA27-HRP を検出抗体としてマイクロプレート上の酵素活性を測定した。その結果、BAN50 を用いた場合、最も高感度に A β (1-40) を検出できることがわかった (検出限界 0.1 fmol/ウェル)。BS85-HRP を検出抗体として用いた場合も検出感度 0.4 fmol/ウェルで A β (1-40) の検出が可能であった (図 1.8)。上記とは逆に C 末端側に対するモノクローナル抗体 BS85 または BA27 を固相化し、BAN052-HRP を検出抗体として A β (1-40) をした場合は、検出限界がそれぞれ 20 fmol/ウェルおよび 2.4 fmol/ウェルとなり、N 末端に対する抗体を固相化した場合により高い感度が得られることがわかった (データ省略)。また、A β の N 末端寄りの中間部を認識するモノクローナル抗体 BNT77 も BA27-HRP を検出抗体として用いた場合、BAN50 よりも感度はやや下回るがヒト A β (1-40) を検出可能であった (検出限界 0.8 fmol/ウェル)。

② BS85-HRP、BA27-HRP または BC05-HRP を用いるサンドイッチ ELISA 法の特異性と感度

BAN50 を固相抗体として用い、検出抗体として BS85-HRP、BA27-HRP または BC05-HRP を用いるサンドイッチ ELISA 法の特異性と感度をさらに精査した。方法 1-(1) で作製した A β (1-38)、A β (1-39) および A β (1-40)、A β (1-42) (Bachem) の希釈系列をそれぞれ作製し、各 ELISA に供した。A β (1-38)、A β (1-39) の濃度は BAN50 を用いる競合法 EIA により決定した。その結果、BS85-HRP を用いた場合は A β (1-38)、A β (1-39)、A β (1-40) および A β (1-42) のいずれについてもほぼ同一の感度 (約 0.4 fmol/ウェル) で検出した (図 1.8A)。BA27-HRP を用いる測定系は、A β (1-40) を 0.1 fmol/ウェルという非常に高い感度で検出するのに対し、A β (1-39)、A β (1-42) をおよそ 4 fmol/ウェル、A β (1-38) を 20 fmol/ウェルの低い感度で検出した (図 1.8B)。BC05-HRP を用いる測定系は、A β (1-42) を 0.1

fmol/ウェルという非常に高い感度で検出するのに対し、 $A\beta$ (1-38)、 $A\beta$ (1-39)、 $A\beta$ (1-40) を全く検出しなかった (図 1.8C)。また $A\beta$ (1-43) (Bachem Feinchemikalien AG) に対する反応性は、 $A\beta$ (1-42) に対する感度よりも 3 倍程度低く 0.3 fmol/ウェルだった (図 1.8D)。

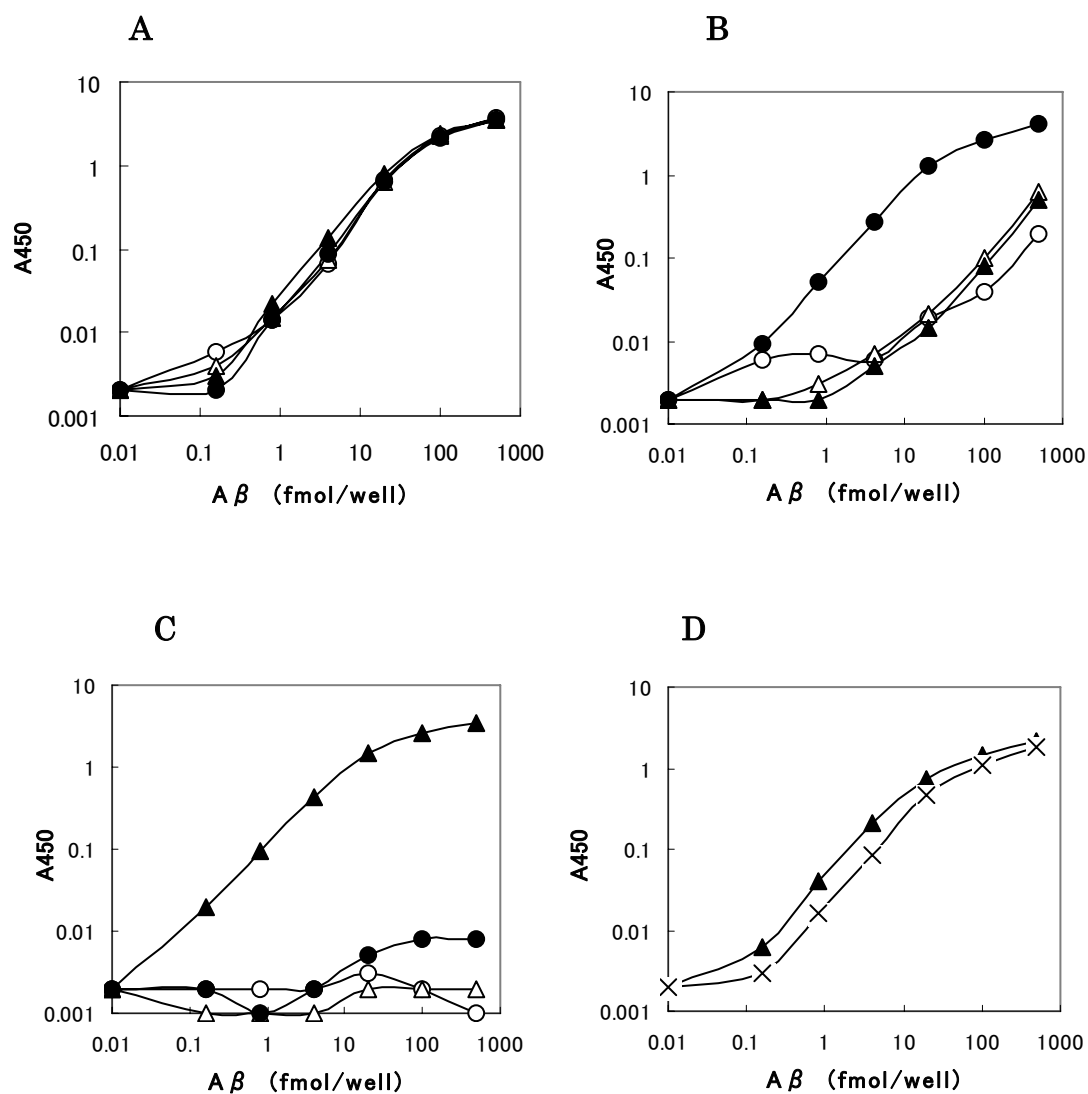


図 1.8 ヒト $A\beta$ 測定用サンドイッチ ELISA の標準曲線

BAN50 を固相抗体として用いた場合の各サンドイッチ ELISA の標準曲線を示した。 $A\beta$ (1-38) (○)、 $A\beta$ (1-39) (△)、 $A\beta$ (1-40) (●)、 $A\beta$ (1-42) (▲)、 $A\beta$ (1-43) (×)。BAN50/BS85 (A)、BAN50/BA27 (B)、BAN50/BC05 (C、D)。

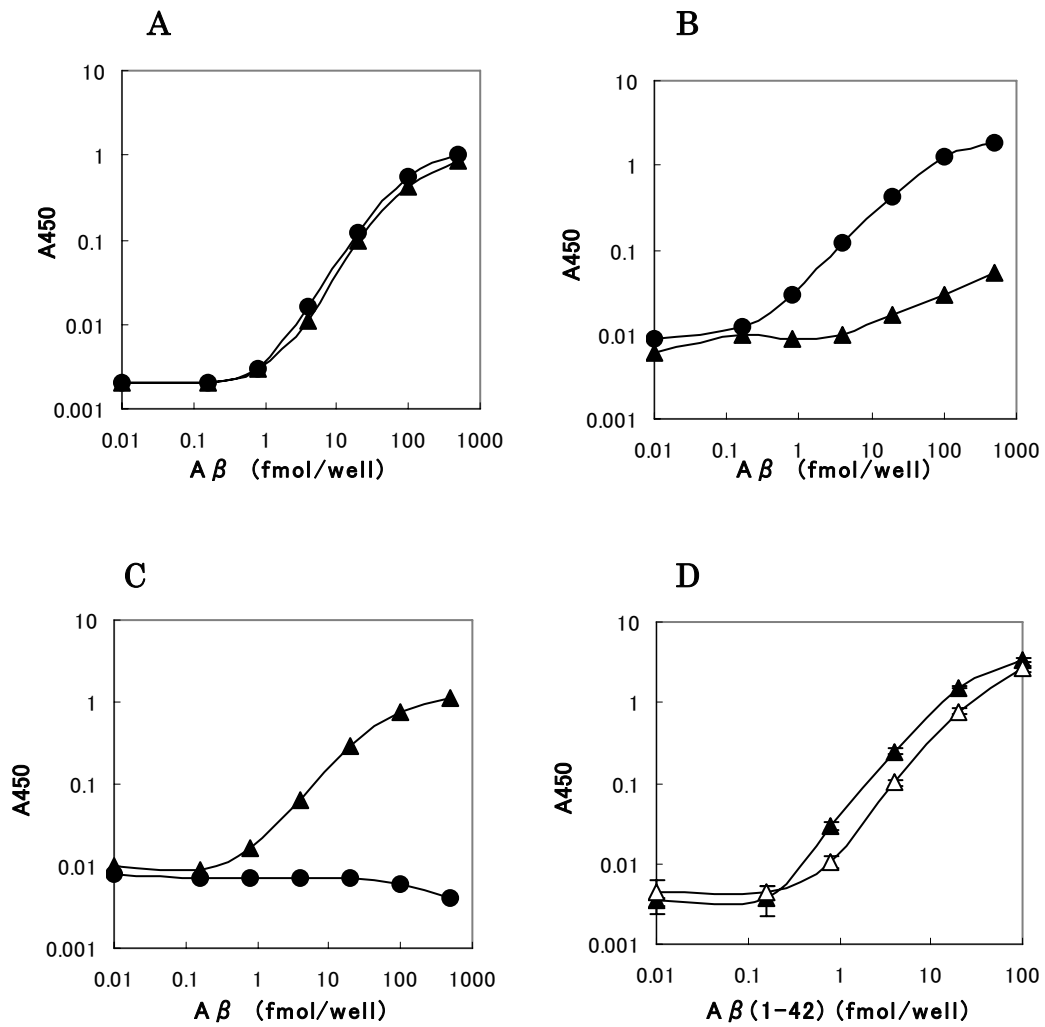


図 1.9 A β 測定用サンドイッチ ELISA の標準曲線

BNT77 を固相抗体として用いた場合の各サンドイッチ ELISA の標準曲線を示した。A β (1-40) (●)、ヒト A β (1-42) (▲)、げっ歯類 A β (1-42) (△)。BNT77/BS85(A)、BNT77/BA27(B)、BNT77/BC05(C、D)。

固相抗体に BNT77 を、検出抗体として BS85-HRP、BA27-HRP または BC05-HRP を用いるサンドイッチ ELISA 法の特異性は、固相抗体に BAN50 を用いた場合とほぼ変わらなかった (図 1.9)。感度は BAN50 よりも数倍低く、いずれも約 0.5 fmol/ウェルであった (図 1.9A, B, C)。一方、げっ歯類 A β とヒト A β はアミノ酸配列上 5 位、10 位および 13 位が異なるため、ヒト A β (1-16) を免疫原とする BAN50 はげっ歯類 A β を認識できないが、ヒト A β (11-28) を免疫原とする BNT77 は認識できる可能性がある。そこでヒト A β (1-42) とげっ歯類の A β (1-42) に対する BNT77/BC05 ELISA の感度を、ともに American Peptide 社 (Sunnyvale, CA) のペプチドを用いて比較した。げっ歯類 A β (1-42) に対してはヒト A β (1-42) に対するよりも 2 倍程度低い感度 (約 1.0 fmol/ウェル) だが十分検出可能であることがわかった (図 1.9D)。

以上の結果より、固相抗体として BAN50 または BNT77 を用い、検出抗体として BA27-HRP または BC05-HRP を用いる 2 種類の測定系を組み合わせることにより、A β 40 と A β 42 (43) を分別定量できることがわかった。なお、BC05 は A β 42 に高い特異性を持つものの A β 43 との十分な反応性も有していることから、BC05 により検出された A β は A β 42 (43) と表記した。

表 1.4 A β 40/A β 42 選択的サンドイッチ ELISA

固相抗体	検出抗体	特異的に検出する A β
BAN50	BS85	ヒト総 A β
	BA27	ヒト A β (1-40)
	BC05	ヒト A β (1-42)、ヒト A β (1-43)
BNT77	BS85	総 A β
	BA27	A β 40
	BC05	A β 42、A β 43

考察

A β (1-40)、A β (1-42 (43)) の部位特異的なモノクローナル抗体を作製した。今日に至っても優れた反応性を持つ抗 A β 抗体は少ないが、本研究で高い反応性・特異性を持つ一連の抗 A β モノクローナル抗体の樹立に成功した理由を、いくつか挙げる事ができる。まず溶解性が非常に低いために合成が極めて困難な A β 、特に A β 42 (43) C 末端部の部分ペ

ペプチドを作製できたこと、そして注意深く実験を進めることによって、扱いの難しいこれらのペプチドを用いて BTG や HRP との複合体の作製に成功したことである。また、抗マウスモノクローナル抗体を固定したマイクロプレートを用いて、抗 A β 抗体と液相中の HRP 標識化抗原との結合を指標にハイブリドーマを選別したことも、親和性、特異性に優れたモノクローナル抗体を得ることができた大きな理由のひとつであろう（図 1.10）。近年、他のグループにより樹立されている抗 A β 抗体に比べ、本研究で得られた抗体は可溶性 A β に対する親和性が概して高いこともこのスクリーニング法を選択したことに起因すると考えられた（Pirttila et al., 1994; Jensen et al., 2000）。

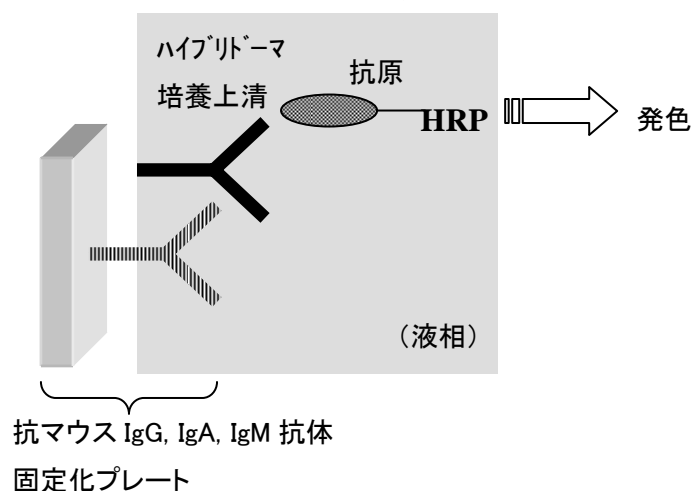


図 1.10 ハイブリドーマの選択法

抗マウスモノクローナル抗体結合マイクロプレートに抗体（ハイブリドーマの培養上清）を結合させたのち、酵素標識した抗原を反応させ、 β -Gal または HRP の基質が与える蛍光または比色を測定することにより抗体価を定量した。

抗 A β 42(43)C 末端抗体 BC05 の選別に際し AD 脳組織抽出画分を用いた主たる理由は、この当時合成品の A β (1-42) が市販されていなかったためであるが、この方法は極めて有効であった。のちにサンドイッチ ELISA 法の特異性精査を行った段階では市販の A β (1-42) を使用し、BC05 の A β 42(43) に対する反応特異性を改めて確認した。

これらのモノクローナル抗体を組み合わせ、ヒトまたはげっ歯類の A β (1-40) と A β (1-42) とを分別定量することが可能な超高感度のサンドイッチ ELISA 法の開発に成功した。A β (1-40) の C 末端断端部を特異的に認識する BA27 と、A β (1-42) の溶液中のコンフォメーションを認識する BC05 の反応特異性、および抗 N 末端抗体の感度の高さが、これらのサンドイッチ ELISA に高い選択性と感度をもたらした。健常人の体液中あるいは哺乳類由来の野

生型の培養細胞株の培養上清中の A β 濃度は pM のオーダーであり、特に A β 42 は総 A β 濃度の 10%程度であるため検出が非常に難しいが、上記の測定系はその特異的検出を可能にした。

BAN50 を用いたサンドイッチ ELISA と質量分析による AD 脳抽出物中の A β の詳細な解析から、AD 脳に蓄積した A β の N 末端部はヘテロであり、1 位の Asp から 10 位の Tyr まです順次短くなった分子種 (A β (2-42)、・・・A β (11-42)) や、3 位または 11 位の Glu がピログルタミル化した分子種 ([pGlu³]A β (3-42), [pGlu¹¹]A β (11-42)) が見出された (Tamaoka et al., 1994)。この結果に基づいて作製したのが、A β (11-28) を免疫原とするモノクローナル抗体 BNT77 であり、N 末端部分の多様性に影響されることなく A β を検出する抗体が樹立できた。サンドイッチ ELISA において、BNT77 の全長 A β の標準品ペプチドに対する感度は BAN50 のそれをやや下回るが、生体試料中の A β には BAN50 が反応しない N 末端部が短くなった分子も含まれるため、実際の測定値は BNT77 を用いる測定系の方がやや高めになることが多く、より真実に近い値を与えるものと考えた。また、BNT77 はヒト A β とげっ歯類 A β とでアミノ酸の異なる 13 位を認識配列に含むが、大きく感度が低下することなくげっ歯類 A β の検出も可能であった。ラット、マウス脳を用いる初代神経細胞の培養上清中 A β や、正常のラット、マウスおよび APPTg ではないモデルラット、モデルマウスの体液中 A β および脳内 A β の定量に用いることができるため、創薬開発においても有効な評価系となることがわかった。

小括

- (1) A β の部位特異的モノクローナル抗体として下記の抗体を選択した。
BAN50 (IgG1) : ヒト A β の N 末端部を特異的に認識
BNT77 (IgA) : ヒトおよびげっ歯類 A β の中間部を認識
BS85 (IgG1) : A β 40、A β 42(43) の中間部を認識
BA27 (IgG2a) : A β 40 C 末端断端部を特異的に認識
BC05 (IgG1) : A β 42(43) C 末端断端部を特異的に認識
- (2) これらのモノクローナル抗体を組み合わせ、ヒトまたはげっ歯類の A β 40 と A β 42(43) とを分別定量することが可能な超高感度のサンドイッチ ELISA 法を開発した。これらの測定系は創薬開発においても有効なツールとなるものと期待された。

第二章 $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 選択的サンドイッチ ELISA 法の応用：

培養細胞が分泌する $A\beta$ の解析に基づく家族性アルツハイマー病の 発症機序に関する検討

緒言

$A\beta$ の長さと生体内でのその蓄積部位、存在形態との関係についてはいくつかの報告がある。AD 脳の蓄積物から $A\beta$ 39、 $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42、 $A\beta$ 43 が見出され、脳血管アミロイド (Prelli et al., 1988、Joachim et al., 1988、Miller et al., 1993、Suzuki et al., 1994a) および脳脊髄液 (Vigo-Pelfrey et al., 1993) においては $A\beta$ 39、 $A\beta$ 40 などの C 末端が短い分子種が主体であることが示された。培養細胞が $A\beta$ を分泌することも見出され (Haass et al., 1992、Shoji et al., 1992)、スウェーデン型 FAD の変異を持つ APP751 を過剰発現させた HEK293 細胞の培養上清には $A\beta$ 40 が主要な分子種として存在し、 $A\beta$ 42 の比率はマイナーであることも示された (Dovey et al., 1993)。しかし野生型の神経系細胞が生理的条件下に分泌する $A\beta$ については、その濃度の低さから検出が困難であり、分子種に関する詳細な検討はなされていなかった。

一方、FAD をもたらす APP 遺伝子変異によるアミノ酸置換のうち、K670N、M671L ($A\beta$ の -1 位、-2 位に相当；以下コドンはアミノ酸 770 残基のアイソフォーム APP₇₇₀ での番号で示す) の二重置換 (スウェーデン型) は、 $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 両者の産生量を 5-6 倍上昇させることが報告され (Cai et al., 1993；Citron et al., 1992)、 $A\beta$ 産生の絶対量の増加が AD 発症の一因となることが示されていた。APP 上にはこれらの変異以外にも FAD の原因となるアミノ酸置換が複数存在し (図 2.1)、例えば $A\beta$ の 46 位に相当する Val⁷¹⁷ には、ロンドンやインディアナなどの家系で V717I、V717G、V717F など FAD の原因となる置換が見出された (Goate et al., 1991；Murrell et al., 1991；Chartier-Harlin et al., 1991；Murrell et al., 2000)。しかしそれらの変異による FAD の発症機構は不明であった。

AD 発症と $A\beta$ との関係を探る上で、野生型の神経系細胞が生理的条件下に分泌する $A\beta$ の分子種とその割合に関する詳しい情報は必須と考えられたことから、本研究では第一章で開発したサンドイッチ ELISA 法を用いてヒト神経芽細胞腫 IMR-32 細胞が分泌する $A\beta$ の詳細な解析を行った。また、 $A\beta$ の C 末端部に近接する Val⁷¹⁷ 変異が $A\beta$ C 末端の切断に及ぼす影響を調べるため、Val⁷¹⁷ 変異を導入した APP を一過性発現させた神経芽細胞腫が

産生する A β についてサンドイッチ ELISA 法を用いて解析し、 γ セクレターゼ切断部位のシフトにより高い凝集性を持つ A β 42(43) の産生比率が増加することを明らかにした (Suzuki et al., 1994b)。

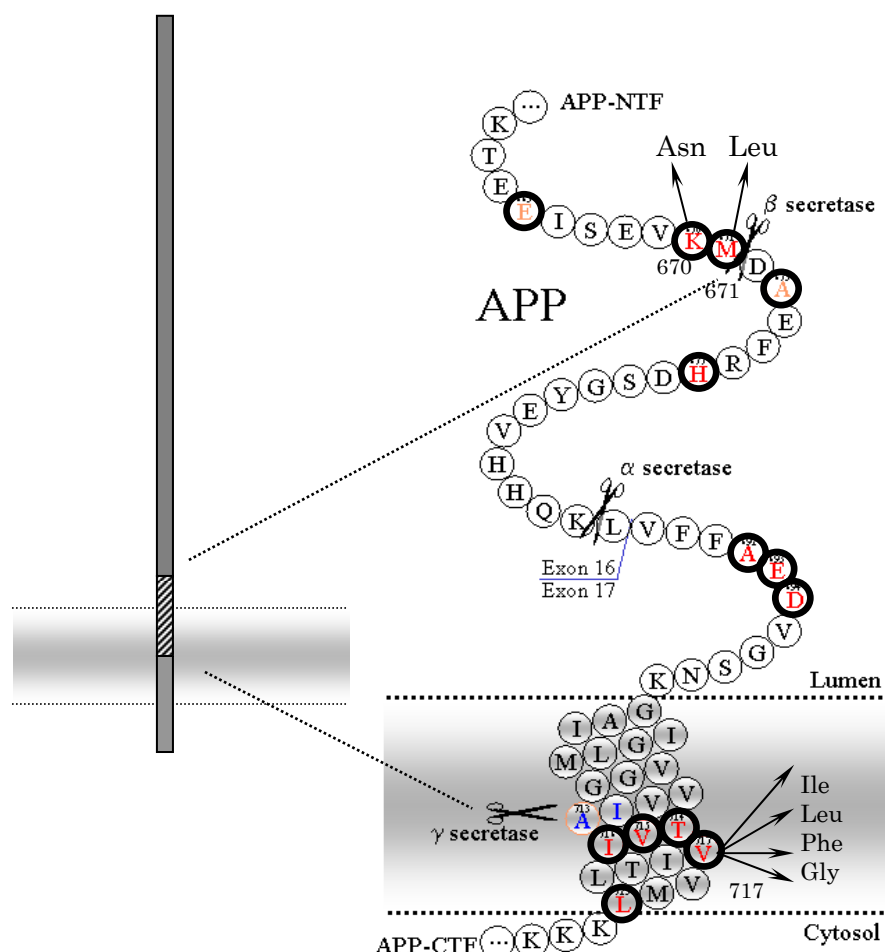


図 2.1 家族性アルツハイマー病 (FAD) に連鎖する APP のアミノ酸置換

(Alzheimer Research Forum : <http://www.alzforum.org> より改変)

太線で囲んだ残基では FAD に連鎖するアミノ酸置換が報告されている。スウェーデンの家系で見出されたコドン 670 の Lys, コドン 671 の Met がそれぞれ Asn、Leu に置換する二重変異は β セクレターゼ切断部の N 末端側に位置し、A β 40、A β 42 両者の産生量を増加させる。一方、コドン 717 の Val は γ セクレターゼ切断部の C 末端側に位置し、Ile、Phe、Gly など種々のアミノ酸に置換することが知られている。この他、A β 中間部に位置するコドン 693 の Glu→Gly (Arctic 型) の変異は A β の凝集性を高めることなどが報告されている。

方法

(1) 細胞培養

ヒト神経芽細胞腫 IMR-32 細胞、SK-N-SH 細胞、SK-N-MC 細胞、マウス神経芽細胞腫 Neuro-2a 細胞および NB41A3 細胞(以上 ATCC より購入)は、非必須アミノ酸、ペニシリン(100 U/ml)、ストレプトマイシン(100 μ g/ml) および 10%の非働化済みウシ胎児血清(FBS)を含むイーグル MEM 培地を増殖培地として、37°C、5% CO₂ で培養した。ラットグリオーマ C6 細胞(ATCC)は上記と同様にペニシリン、ストレプトマイシンおよび 10% FBS を含む DMEM 培地で培養した。ラットクロム親和性細胞腫 PC12h 細胞(Hatanaka et al., 1981)は故畠中寛先生よりご供与いただき、ペニシリン、ストレプトマイシン、5% FBS および 5% ウマ血清を含む DMEM 培地を用いて培養した。いずれの細胞も 25 cm²の培養フラスコでコンフルエントに達してから上清を新鮮な培地 5 ml で置換し、37°C、5% CO₂ で 48 時間培養後、上清を回収、遠心して細胞を除いた後、A β の測定まで-80°Cで保存した。

IMR-32 細胞の培養上清から A β を抽出する際には、150 cm²の培養フラスコで細胞がコンフルエントに達した後、5% FCS を含む培地に置換し、48 時間培養後に上清を回収した。回収した上清は 4 °C、3000 xg で 30 分間遠心した後、分画操作に供した。

(2) IMR-32 細胞の培養上清に含まれる A β の分離精製

回収した 1 L または 7.5 L の IMR-32 培養上清に含まれる A β を、抗 A β N 末端モノクローナル抗体 BAN052 (免疫原：ヒト A β (1-16)) を結合した抗体カラムで回収した。抗体カラムは 1.4 mg の BAN052 を 160 μ L のトレシルトヨパールレジン(東ソー、東京)に結合させたものを用いた。0.2%トリフルオロ酢酸(TFA)含有 60%アセトニトリル水溶液 3ml による溶出画分を SpeedVac (SAVANT Instruments, NY)で濃縮後、0.1% TFA 含有 40%アセトニトリル水溶液で平衡化した TSKG3000PW カラム (7.5 x 300 mm、東ソー)を用いるゲルろ過 HPLC で分画した。A β を含む画分を BAN50/BS85 ELISA で同定し、それらの画分を Vydac C4 カラム(4.6 x 250 mm)を用いる逆相 HPLC で分離した。溶出は流速 0.5 ml/分、0.1% TFA 存在下アセトニトリルのグラジエント溶離で行い、アセトニトリル濃度を 16%で 10 分間保ったのち、5 分間で 20%に上昇させ、ついで 100 分間かけて 35%に上昇させた。各画分を BAN50/BS85、BAN50/BA27 および BAN50/BC05 の各 ELISA に供した。

(3) 質量分析とアミノ酸分析

IMR-32 細胞が分泌した A β の質量は、セシウムイオン源搭載の JMS-HX110HF (日本電子、東京)を用いる Fast atom bombing mass spectroscopy (FAB-MS)により測定した。

7.5 L の培養上清から分画した A β は ELISA 陽性画分ごとに SpeedVac で濃縮し、その 1 μ L を質量分析に供した。アミノ酸分析は、アミノ酸分析装置 (Applied Biosystems Model 120A) を付属したプロテインシークエンサー (Applied Biosystems Model 477A) を用いて自動化エドマン分解を行い、A β N 末端部のアミノ酸配列を確認した。

(4) Val⁷¹⁷に変異を持つ APP を過剰発現させたヒト神経芽細胞腫 M17 細胞の培養上清中の A β の ELISA 解析

野生型のヒト APP₆₉₅ (アミノ酸残基数 695 の APP アイソフォーム) に V717I または V717F の変異を導入した発現プラスミド (APP₆₉₅ Δ I または APP₆₉₅ Δ F) を作製し、これらを M17 細胞に一過性発現させた。細胞が 10cm シャーレにコンフルエントになってから 48 時間の培養上清をサンドイッチ ELISA にて定量し、野生型の APP₆₉₅、APP₆₉₅ Δ I または APP₆₉₅ Δ F を発現する細胞から分泌される A β 40、A β 42(43) の量を比較した。さらにスウェーデン型 APP (APP₆₉₅ Δ NL ;K670N、M671L) に V717I の変異を導入した発現プラスミド (APP₆₉₅ Δ NL+I) を構築し、上記と同様に APP₆₉₅ Δ NL を対照として APP₆₉₅ Δ NL+I から分泌される A β 40、A β 42(43) の量を比較した。

結果

2.1 野生型の神経系細胞株が生理的条件下に分泌する A β の検討

ヒト由来の細胞株として神経芽細胞腫 IMR-32 細胞、SK-N-SH 細胞、SK-N-MC 細胞を、またげっ歯類由来の細胞株としてラットグリオーマ C6 細胞、ラットクロム親和性細胞腫 PC12h 細胞、マウス神経芽細胞腫 Neuro-2a 細胞および NB41A3 細胞を培養し、培養上清中の A β 40、A β 42(43) の濃度を ELISA により定量した (表 2.1)。ヒト神経芽細胞腫株の分泌する A β 量は細胞株によって大きく異なり、BAN50 または BNT77 を用いる両測定系において、IMR-32 細胞の分泌量が最も多いことがわかった。げっ歯類由来の細胞株の分泌する A β は、BAN50 を固相に用いる系では検出できず、BNT77 を固相に用いる系でのみ検出できた。これは第一章にも記した通り、げっ歯類 A β の N 末端側に存在する 3 残基のアミノ酸置換 (Arg⁵→Gly、Tyr¹⁰→Phe、His¹³→Arg) が、BAN50 のエピトープ部分に位置し、逆に BNT77 のエピトープとはほとんど重ならないことから説明できる。

ここに示したヒトおよびげっ歯類の神経系細胞株が生理的条件下に分泌する A β の分別定量の結果から、哺乳動物の神経系細胞の多くは主として A β 40 を分泌し、高い凝集性を持つ A β 42(43) の分泌される比率は約 10%と一定であることがわかった。

表 2.1 各種細胞株が分泌した培養上清中の A β 濃度

細胞株	ELISA 固相抗体 検出抗体	BAN50			BNT77		
		BC05	BA27		BC05	BA27	
		(fmol/ml)	(%)		(fmol/ml)	(%)	
		A β 42 (43)	A β 40	ratio*	A β 42 (43)	A β 40	ratio*
ヒト	IMR-32	19	140	11.9	39	270	12.6
	SK-N-SH	5.2	57	8.3	<8	85	–
	SK-N-MC	<1.6	18	–	<8	48	–
ラット	PC12h	<1.6	<1.6	–	30	291	9.3
	C6	<1.6	<1.6	–	17	170	9.1
マウス	NB41A3	<1.6	<1.6	–	25	230	9.8
	Neuro2a	<1.6	<1.6	–	37	350	9.6

$$\text{ratio* (\%)} = \text{A}\beta 42(43) / (\text{A}\beta 42(43) + \text{A}\beta 40) \times 100$$

2.2 IMR-32 細胞の培養上清に含まれる A β の分離精製

2.1 の結果から、分泌する A β 量が最も多いヒト神経芽細胞腫として IMR-32 細胞を選び、この細胞の培養上清を用いて野生型の神経系細胞が分泌する A β の詳細な解析を行うことにした。予備検討として IMR-32 細胞の培養上清 1 L に含まれる A β を分離精製した。まず BAN052 抗体カラムを用いて A β を抽出したのち、TSKG3000PW を用いるゲルろ過 HPLC、次いで VydacC4 カラムを用いる逆相 HPLC に供して分画し、各分画を ELISA で測定すると共に、標準品の A β (1-40)、A β (1-42) の逆相 HPLC 溶出位置と比較した。図 2.2 に示すように、210 nm の UV で検出した逆相 HPLC のクロマトグラム上の最も大きなピークは、標準品の A β (1-40) の溶出位置と一致し、さらに BAN50/BA27 ELISA で最も高い濃度として検出されたピークとも一致することがわかった。BAN50/BC05 ELISA で最も高濃度に検出された画分も標準の A β (1-42) の溶出位置と一致した。そこで次に、IMR-32 細胞の培養上清 7.5 L から同様の手順で A β を分離精製し、質量分析とアミノ酸分析による分子種の同定を試みた。図 2.2 の(1)–(6)の画分についてアミノ酸分析を行った結果、いずれの画分に含まれる A β も Asp¹ から始まる A β N 末端部の配列を有していた。

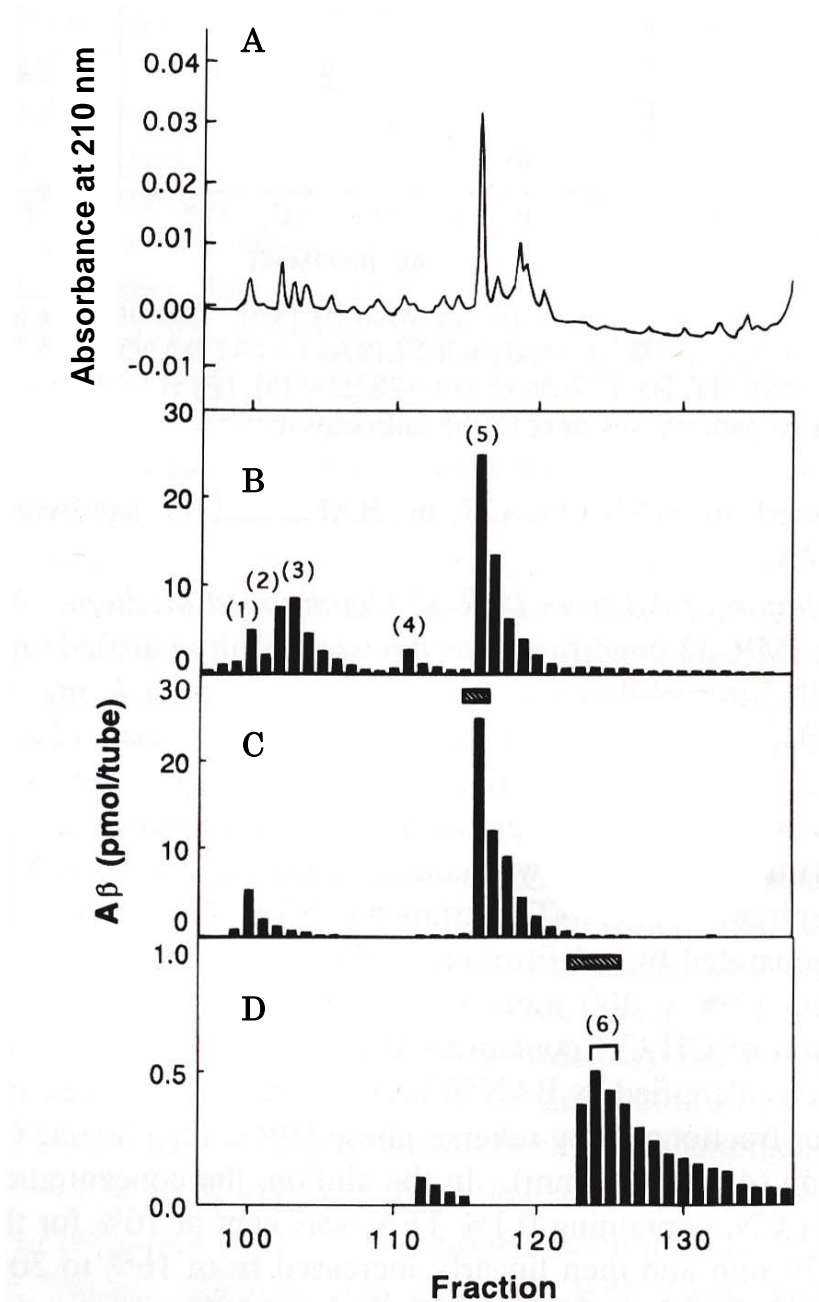


図 2.2 ヒト神経芽細胞腫 IMR-32 細胞の培養上清に含まれる Aβ の逆相 HPLC による分析
 IMR-32 細胞に含まれる Aβ を抗体カラムで抽出した後、ゲルろ過 HPLC を経て逆相 HPLC で分画した。Aβ の溶出位置を 210 nm の吸収 (A) およびサンドイッチ ELISA (B-D) で検出した。ELISA はそれぞれ BAN50/BS85 (B)、BAN50/BA27 (C) および BAN50/BC05 (D) の結果を示した。各 ELISA の特異性は表 1.4 参照。図中のバーで Aβ 標品の溶出位置を示した。Aβ (1-40) (C)、Aβ (1-42) (D)。

図 2.3 に得られたマスペクトルを示した。いずれの画分でも複数のシグナルが検出されたが、これらはそれぞれの主ピークとなっている $A\beta$ のプロトン付加体 ($[M+H]^+$) または、カチオン化 ($[M+Na]^+$ 、 $[M+K]^+$) や Met³⁵ の酸化 (またはその両者) を受けたものと同定された。従って、各 ELISA 陽性画分に含まれるのは単独の $A\beta$ 分子種と結論することができ、それぞれの主要な $[M+H]^+$ シグナルは $A\beta$ (1-40) 酸化物、 $A\beta$ (1-37)、 $A\beta$ (1-38)、 $A\beta$ (1-39)、 $A\beta$ (1-40) および $A\beta$ (1-42) の理論値とよく一致した。以上の結果から、BAN50/BA27、BAN50/BC05 ELISA で検出された $A\beta$ はそれぞれ $A\beta$ (1-40)、 $A\beta$ (1-42) に帰属できることがわかった。また、BAN50/BS85 ELISA で検出される $A\beta$ には、 $A\beta$ (1-40)、 $A\beta$ (1-42) に加え、 $A\beta$ (1-37)、 $A\beta$ (1-38)、 $A\beta$ (1-39) も含まれることがわかった。以上の質量分析結果と ELISA での定量結果から、IMR-32 細胞の分泌する $A\beta$ の大部分は $A\beta$ 40 であり、凝集性の高い $A\beta$ 42(43) はその約 10% であることが明らかになった。

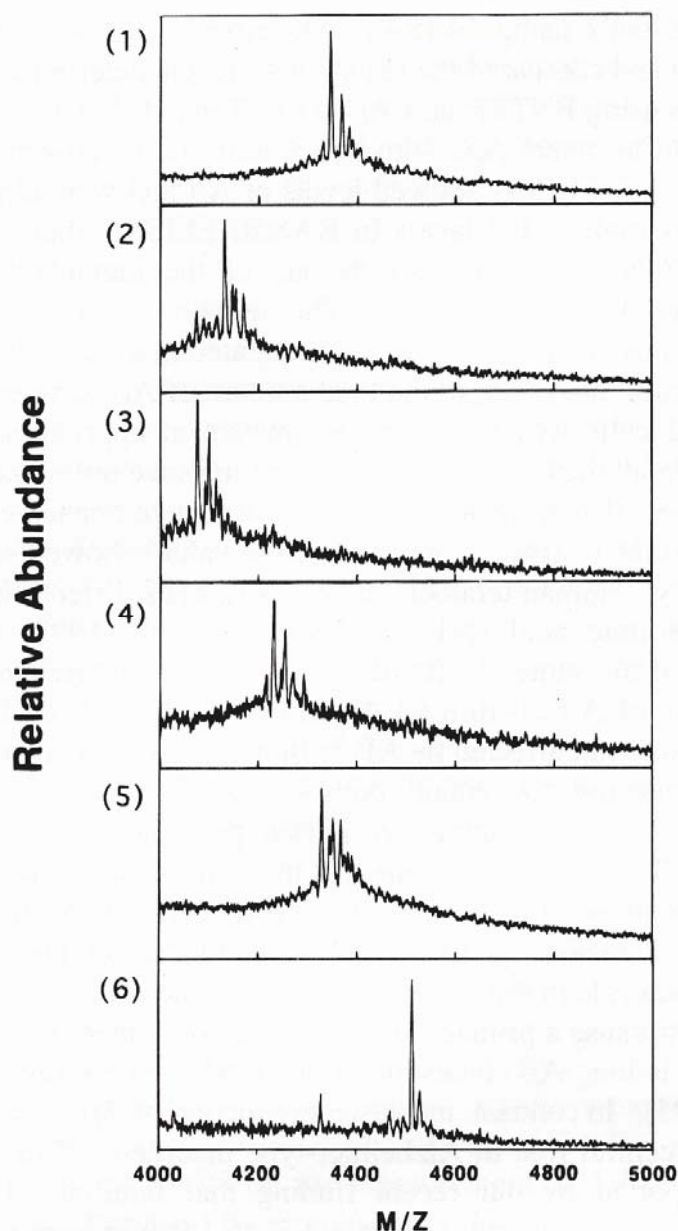


図 2.3 ヒト神経芽細胞腫 IMR-32 細胞が分泌した $A\beta$ の質量分析

(1) Fr. 100、(2) Fr. 102、(3) Fr. 103、(4) Fr. 111、(5) Fr. 116 および (6) Fr. 124-125 は図 2.1 に示したピーク番号に対応させた。マス値はそれぞれ $A\beta$ (1-40)-oxide、 $A\beta$ (1-38)、 $A\beta$ (1-37)、 $A\beta$ (1-39)、 $A\beta$ (1-40) および $A\beta$ (1-42) に帰属された (表 2.2 参照)。

表 2.2 IMR-32 細胞から分泌された A β 分子種の帰属

HPLC 分画 No.	[M + H] ⁺		帰属	抗体の反応性*		
	実測値	理論値		BS85	BA27	BC05
(1) 100	4346.6	4346.9	A β (1-40)-oxide	+	+	-
(2) 102	4132.5	4132.6	A β (1-38)	+	±	-
(3) 103	4075.5	4075.6	A β (1-37)	+	±	-
(4) 111	4232.1	4231.8	A β (1-39)	+	±	-
(5) 116	4330.5	4330.9	A β (1-40)	+	+	-
(6) 124-125	4514.2	4515.1	A β (1-42)	+	±	+

*(1)-(6)の画分はすべて BAN50/BS85 ELISA で陽性(+)であった。BA27 と BC05 の反応性はサンドイッチ ELISA における BS85 の反応性との比 (R) にもとづいて 3 段階に分けた (図 2.2 参照)。すなわち、 +、R >0.15 ; ±、0.01 < R <0.15 ; -、R <0.01

2.4 Val⁷¹⁷ 変異を持つ APP を導入したヒト神経芽細胞腫 M17 細胞の分泌する A β の解析

APP の Val⁷¹⁷ 変異が細胞の A β 産生に及ぼす効果を調べるため、種々の変異型 APP を一過性発現させたヒト神経芽細胞腫 M17 細胞の培養上清中の A β 濃度を ELISA で測定した。まず、A β 濃度を高めることにより ELISA を用いる定量を容易にするため、スウェーデン型変異 (K670N、M671L) を導入した APP (APP _{Δ NL}) を対照として、スウェーデン型変異とともに V717I (ロンドン型) を導入した APP (APP _{Δ NL+I}) から生成する A β 濃度を調べたところ、A β 40 濃度に変化はなかったが、A β 42(43)濃度が約 1.5 倍に上昇することがわかった (図 2.4)。さらにコドン 717 の種々のアミノ酸置換について、スウェーデン型変異の非共存下に同様の実験を行ったところ、いずれのコドン 717 変異によっても A β 42(43)の産生比率が 1.5-1.9 倍に増加することを確認した (表 2.3)。この結果は、コドン 717 変異が、総 A β 量を変化させることなく、 γ セクレターゼ切断位置をシフトさせることによって、高い凝集性を持つ A β 42 の産生比率を増加させることを示唆した (Suzuki et al., 1994b)。

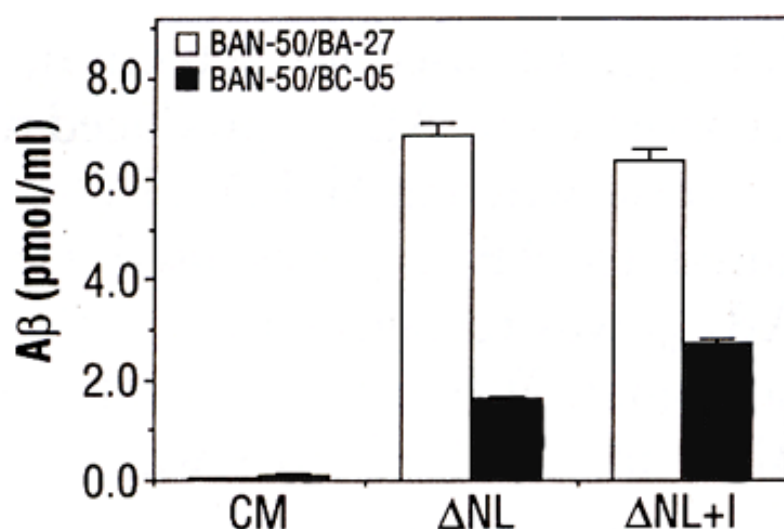


図 2.4 Val⁷¹⁷変異 APP を一過性導入したヒト神経芽細胞腫 M17 細胞の培養上清中の Aβ 濃度

型 APP (APP_{695ΔNL}; K670N、M671L) に V717I の変異を導入した発現プラスミド (APP_{695ΔNL+I}) を M17 細胞に一過性発現させ、APP_{695ΔNL} を対照として APP_{695ΔNL+I} から分泌される Aβ₄₀、Aβ₄₂₍₄₃₎ の量を比較した。BAN50/BC05 ELISA で定量された Aβ₄₂₍₄₃₎ の割合が増加した (Suzuki et al., 1994b)。

表2.3 Val⁷¹⁷変異APPを一過性導入したヒト神経芽細胞腫M17細胞の培養上清中のAβ濃度比 (Suzuki et al., 1994b)

APP	% Aβ 42(43)# (mean ± SE)	Aβ 42(43) 濃度比##
APP ₆₉₅	17.5 ± 0.5	1.0
APP _{ΔF}	31.4 ± 0.6*	1.8
APP _{ΔI}	25.7 ± 0.5**	1.5
APP _{ΔNL}	17.0 ± 1.0	1.0
APP _{ΔNL+I}	26.7 ± 1.8 ***	1.6

$$\% A\beta 42(43)\# = A\beta 42(43) / (A\beta 42(43) + A\beta 40) \times 100$$

Aβ 42(43)濃度比##: コントロール群の% Aβ 42(43)を1.0とした

* P < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

考察

この章の前半では、哺乳動物由来の神経系細胞株が分泌する可溶性 A β をサンドイッチ ELISA で解析し、検討した細胞株の多くで A β 42(43) が総 A β の約 10% という低い割合で分泌されること、A β 40 は分泌される A β の約 90% を占めることを示した。また、ヒト神経芽細胞腫 IMR-32 細胞の分泌する A β について精密な質量分析を行い、長鎖型の A β は A β (1-42) であること、分泌される A β のうちの主要な分子種は短鎖型の A β (1-40) であること、そしてこの他に A β (1-37)、A β (1-38)、A β (1-39) も分泌されることを確認した。IMR-32 細胞は神経細胞に類似した性質を持ち (Gotti et al., 1987)、内在的に APP751 と APP695 を高発現していることが報告されている (Shelton et al., 1990)。従って、本研究で検討した細胞株の中で IMR-32 細胞の A β 分泌量が最も高かったことを、神経細胞との類似性から理解することも可能であろう。

AD 脳蓄積物中の A β の N 末端部が多様であることは第一章でも述べたが、培養細胞株においても同様の結果が報告されている (Haass & Selkoe, 1993; Haass et al., 1994a, b; Busciglio et al., 1993)。本研究で検討したヒト由来の細胞株の培養上清中の A β 濃度は、固相抗体に BAN50 を用いた場合よりも BNT77 を用いた場合の方が 2 倍程度高い値となったが (表 2.1)、BNT77 は A β の N 末端部の配列に左右されることなく A β を検出することから、ここで検討した細胞株の培養上清においても N 末端部が欠損した分子種などが存在する可能性は高い。IMR-32 細胞の培養上清中の A β の質量分析で、N 末端が短縮した分子種が認められなかったのは、A β を抽出する際の抗体カラムに用いた BAN052 のエピトープがヒト A β の N 末端断端部に近く、Asp¹ から始まる全長 A β が選択的に精製されたためと思われる。

本章の後半では、FAD をもたらず APP コドン 717 のアミノ酸置換が凝集性の高い A β 42(43) の分泌比率を 50-90% 増加させることを示した。スウェーデン型 FAD のアミノ酸置換が総 A β 量を 5-6 倍増加させるのに比べ、この 50-90% という増加率は一見わずかであるように思われるが、核形成を律速段階とする A β の凝集過程においては (Jarrett et al., 1993)、A β の凝集を促進させるに十分な変化であると考えられた。A β 42(43) の増加率が小さいため、他の生化学的手法による解明は困難であったが、本研究において樹立した高感度で A β 40/42(43) 選択的なサンドイッチ ELISA はこれを明確かつ簡便に示すことに成功した (Suzuki et al., 1994b)。この APP コドン 717 のアミノ酸置換による FAD 発症機序の解明は、早期発症型 FAD と連鎖する presenilin (PS) 1, 2 の遺伝子変異の多くが A β

42(43) の産生比率を増加させるという事実の発見へとつながり (Scheuner et al., 1996; Tomita et al., 1997)、A β の凝集を AD の発症と関連付けるための重要な根拠をもたらした。

小括

細胞の分泌する A β のうち凝集性の高い A β 42(43) の占める割合は、哺乳動物由来の神経系細胞株のほとんどで約 10%に保たれていることがわかった。分泌される A β の約 90% は A β 40 であった。また、ヒト神経芽細胞腫 IMR-32 細胞の分泌する長鎖型の A β は A β (1-42) であること、分泌される A β のうち主要な分子種は短鎖型の A β (1-40) であるが、これに加え A β (1-37)、A β (1-38)、A β (1-39) も分泌されることを確認した。さらに、FAD をもたらす APP コドン 717 のアミノ酸置換は A β 42(43) の分泌比率を 50-90%増加させることを見出し、凝集性の高い A β 42(43) の増加という A β の質的变化が FAD 発症をもたらすことを初めて示した。

第三章 抗 A β モノクローナル抗体の展開：

A β の脳内蓄積機序の考察と抗 A β 42(43)C 末端抗体 BC05 の受動免疫によるアルツハイマー病抗体療法の検討

緒言

脳実質に蓄積したアミロイドを構成する A β の分子種は A β (1-42) が主体であるとする報告 (Kang et al., 1987; Roher et al., 1993a; Miller et al., 1993) とともに A β (1-40) が主体であるとする報告もある (Mori et al., 1992)。AD 脳に多く見られる脳血管壁へのアミロイド沈着 (脳アミロイドアンギオパチー、CAA) を構成する A β についても、A β 40 が主体とする結果 (Joachim et al., 1988, Miller et al., 1993) とともに A β 40、A β 42(43) 両者が大量に含まれたという報告もある (Roher et al., 1993b)。一方、AD 脳に見られる老人斑は免疫染色による形態からびまん性老人斑、原始老人斑、コンパクトな核を持つ成熟老人斑の三種類に分類される (Yamaguchi et al., 1988; Masliah et al., 1990) が、形態の異なる老人斑ごとに、構成 A β 分子種を検討した報告はなかった。そこで、A β の C 末端に特異的な抗体を用いて AD 患者およびダウン症患者の脳の免疫組織化学を行い、A β の蓄積機序を解析した。

こうした脳内の A β 蓄積と AD 発症との関係は長年に亘り議論されてきた問題である。タウタンパク、その他の因子の AD 発症への関与も依然検討しなければならないが、oligomer から protofibril に至る動的な凝集過程にある A β が毒性を発揮するという実験結果が多く示され、細胞内 A β と AD 発症との関与も示唆されていることから (Oddo et al., 2004)、脳内 A β の低減が AD 治療戦略のひとつであることは間違いないと考えられる。A β をターゲットとする AD 治療薬の開発には 3 つの方向性が考えられる。第一に APP から A β を切り出す 2 つの酵素、 β -secretase (BACE) または γ -secretase を阻害することによる A β の産生抑制、第二に A β 毒性の本体と考えられる A β の線維性凝集体の凝集抑制、そして第三に A β の分解または末梢への排出を高めることによる脳内 A β のクリアランス促進である。第一の A β 産生阻害については BACE 阻害薬、あるいは副作用の軽減を目指した第二世代の γ -secretase 阻害薬の探索が進められ、今後の進展が期待される (Siemers et al., 2005)。第二の A β 凝集抑制薬も低分子化合物の探索が盛んであり、副作用のない有効な化合物が見出される可能性も高い (Walsh et al., 2005)。第三の脳内 A β の分解系としては、ミクログリアによる貪食に加え、ネプリライシンや insulin degrading enzyme

(IDE)といったタンパク質分解酵素によるA β モノマーの分解機構が近年明らかになり、脳内のA β クリアランス機構のひとつとして注目されている。血液脳関門(BBB)や血液脳脊髄液関門を介するA β の末梢への排出に関しても、LRP-1などの排出系が明らかになり、創薬ターゲットとなる可能性がある(Matsubara, 2004)。

クリアランスに関係して注目を集めているのがA β の免疫療法であり、ADの新規治療法として近年開発されたA β ワクチンは、APP Tgマウス脳のA β 蓄積を劇的に減少させ、認知機能の改善をもたらしたことからヒトでの有用性が期待された(Schenk et al., 1999; Janus et al., 2000)。しかし臨床治験は自己免疫性脳炎の副作用によって第二相試験で中断されたため(Nicoll et al., 2003; Hock et al., 2003)、有効かつ安全なAD免疫療法の開発は、AD治療研究における重要課題となっている。投与ルートやアジュバントを改良することにより、2型のヘルパーT細胞(Th2)を活性化することなく有効なA β ワクチンが検討されているが(McLaurin et al., 2002; Lemere et al., 2002; Cribbs et al., 2003; Hara et al., 2003)、これと並行して抗A β 抗体の輸注による受動免疫法も検討されてきた(Bard et al., 2000)。A β 免疫療法による脳内A β のクリアランスは、脳内に進入した抗体がアミロイドに結合し、そのFc領域を介してミクログリアによる貪食を促進することにより生じるとの仮説が有力だが、ミクログリアを介さないルート、すなわち血液脳関門を介した末梢血液への排泄促進、あるいは脳内に進入した抗体による凝集阻害などの機序も想定されている(Backskai et al., 2002; Wilcock et al., 2003; Gelinas et al., 2004)。体外からのコントロールが可能で安全性の高い受動免疫はすでに臨床試験に進んでいるものもあるが、その多くにおいてはA β のN末端に対する抗体の有効性が強調され(Bard et al., 2003)、A β C末端に対する抗体の効果はほとんど検討されてこなかった。そこで本研究では、A β 42(43)のC末端に特異的な抗体BC05の受動免疫により、凝集性の高いA β 42(43)の選択的なクリアランスが可能かどうかを検討した。

方法

(1) AD脳、ダウン症脳の免疫組織化学

剖検脳は10%ホルマリン溶液で数週間以上固定後、脳内各部位から組織を切り出してパラフィン包埋し、6 μ m厚の切片を作製した。全例で海馬および下側頭回を含む側頭葉を解析対象とし、AD 4例では小脳と線条体も解析した。各切片は免疫染色前に5分間99%ギ酸で前処理した(Kitamoto et al., 1987)。3連続切片をBS85、BA27およびBC05の3抗

体で染色し、アビジン・ビオチン複合体-HRP を用いて特異的染色像を検出した。1 次抗体の使用濃度は、BC05 0.15 μ g/ml、BA27 0.22-2.2 μ g/ml および BS85 2.8 μ g/ml であった。老人斑の定量化は Olympus Image Analysis System (SP1000, Model 1500 C2, Olympus) を用いて行い、下側頭回のうちの 1.6 mm 四方 (2.8 mm²) に含まれる老人斑の数または総面積に占める老人斑の面積率を算出した。

(2) 受動免疫に用いた APP トランスジェニックマウスと抗体

本研究では、AD モデル動物としてスウェーデン型 APP (APP_{KM670/671NL}) をハムスタープリオンプロモーターを用いて過剰発現させた Tg マウス (Tg2576) (Hsiao et al., 1996) を用いた。また受動免疫には、A β 42(43) の C 末端に対するモノクローナル抗体 BC05 (第一章参照) および陰性対照としてマウスコントロール IgG (Jackson ImmunoResearch, Westgrove, PA; サブクラス限定なし) を用いた。

(3) ビオチン化 BC05(BC05B) の脳内移行性の検討

sulfo-NHS-biotin (Pierce, Rockford, IL) を用いて、1 mg/ml の BC05 またはマウスコントロール IgG 各 1 ml をビオチン化し、PBS に対して透析した後 280 nm の吸光度をもとに濃度を決定した。ビオチン化マウス IgG (n=4) または BC05B (n=5) を Tg2576 マウスに 1 匹あたり 0.5 mg ずつ腹腔内投与し、エーテル麻酔下 24 時間後に心採血および 20 ml の冷生理食塩水による灌流を行い、脳を採取した。採血時、EDTA とプロテアーゼインヒビターカクテル (Complete ; Roche, Mannheim, Germany) の添加により血漿を調製し、採取した血漿および脳はドライアイス上で急速に凍結して A β の測定まで -80°C で保存した。

脳組織は湿重量の 4 倍量の TS バッファー [150 mM NaCl およびプロテアーゼインヒビターカクテルを含有する 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)] を用いてホモジナイズしたのち、4°C、300,000xg で 10 分間超遠心した。脳の可溶性画分を含むこの遠心上清または血漿サンプルは、NeutrAvidin 固定化マイクロプレート (Pierce) に添加し、4°C で一晩インキュベートした。このとき、BC05B の希釈系列を調製し標準として用いた。300 μ L/ウェルの PBS で 4 回洗浄後、希釈した抗マウス IgG F(ab')₂-HRP (Amersham, Piscataway, NJ) を添加し、室温で 6 時間反応させた。上記と同様に洗浄後、HRP の基質 (TMB substrate) を添加し室温で 5 分間反応させた後、1 M リン酸で反応を停止させてから SpectraMax190 マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) にて 450 nm の吸光度を測定した。サンプル中の BC05B の濃度はプレートリーダー付属の解析ソフト、SoftMAXpro (Molecular Devices) を用いて算出した。

(4) BC05 の Tg2576 マウスへの連続投与試験

11 週齢の雄性 Tg2576 マウスを用いて実験を開始した。BC05 (n=9) またはコントロールマウス IgG (n=10) を週 1 回腹腔内投与したが、16 週齢までは 0.5 mg/マウス/週で投与し、その後 52 週齢まで 1 mg/マウス/週で投与した。最終投与の 24 時間後にペントバルビタル麻酔下に心採血し、20 ml の氷冷生理食塩水で灌流後、脳を採取した。3- (3) と同様に血漿を調製し、脳とともに凍結保存した。

(5) A β ELISA

BNT77 を固定化したマイクロプレートを用いるサンドイッチ ELISA (BNT77/BA27 および BNT77/BC05) によって、血漿および脳抽出物の A β 濃度を測定した (第一章参照)。血漿サンプルは測定に先立ち EC バッファーにて 50 倍に希釈した。また、A β と他のタンパクとの相互作用を断つ目的で、塩酸グアニジン処理後のサンプルの A β を測定する際には、終濃度 6 M 塩酸グアニジンになるように 8 M 塩酸グアニジン含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) を血漿に加え、室温で 30 分間インキュベートした後、EC バッファーで 15 倍希釈して ELISA に供した。

脳内 A β の ELISA による測定には各マウスの右脳を使用した。可溶性画分の調製は 3- (3) と同様に行い、残った沈殿を TS バッファーで 1 回洗ったのち、組織湿重量の 8 倍量にあたる 6 M 塩酸グアニジン含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) を加えてホモジナイズした。4°C、15000 rpm で 20 分間遠心したのち、上清を不溶性画分として採取し、EC バッファーで 2000 倍希釈してから ELISA に供した。

(6) Tg2576 マウス脳の免疫組織化学

BC05 投与群、コントロール IgG 投与群各 3 例の新鮮凍結脳をパラフィンで包埋し、8 μ m 厚の前額断切片をクライオスタット (leica CM3050S, Leica, Germany) を用いて作製した。MAS コートスライドガラス (Matsunami Glass Industries, Osaka) に貼り付け、4%パラホルムアルデヒド含有 100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4、和光純薬) に 4°C、10 分間浸漬することにより切片を固定した。PBS で 3 回洗浄し、抗体の非特異的な結合を抑えるため、終濃度 1%のウシ胎児血清 (FBS) を加えた 0.1% TritonX-100 含有 PBS (PBS-T) を用いて室温で 30 分間ブロッキングした。A β のマーカーとして抗 A β N 末端モノクローナル抗体 BAN50 (1 μ g/ml) を、活性化ミクログリアのマーカーとして抗マウス allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) ヤギポリクローナル抗体 (1:100 希釈、Abcam, UK) を用い、ともに切片と 4°Cで一晩インキュベートした。PBS-T で 3 回洗浄後、Alexa Fluor 594 (赤)

標識抗マウス IgG 抗体と Alexa Fluor 488 (緑) 標識抗ヤギ IgG 抗体 (共に 1:200 希釈、Molecular Probes Inc., OR) を 1:1 の混合物として切片に添加し、室温で 2 時間インキュベートした。これらの抗体はすべて 1%FBS 含有 PBS-T で希釈した。切片を PBS で洗浄後、DAPI 含有封入剤 (Vectashield, Vector, USA) とともにカバーガラスに封入し 4°C で暗箱に保管した。スライドの観察には蛍光顕微鏡 (Eclipse E800, Nikon, Tokyo) を用い、Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., CA) および MetaMorph (Meta Imaging Series Ver. 6.1, Molecular Devices) を用いて画像解析を行った。

すべての統計解析は Preclinical Package Ver. 5 (SAS Japan) による独立した 2 群の t 検定を用いて行った。

結果

3.1 AD 脳、ダウン症脳の免疫組織化学

図 3.1 に代表的な孤発性 AD 患者の脳皮質の免疫染色像を示した (Iwatsubo et al., 1994)。A β 中間部を認識する BS85 はすべての老人斑を認識するものと考えられるが、この抗体に陽性の老人斑のほとんどすべてが BC05 に陽性を示した。つまり全ての老人斑が A β 42(43) 陽性であることがわかった。これに対し、BA27 に陽性を示す A β 40 の存在する斑は全体の約 3 分の 1 にとどまり、コアを持つ成熟した老人斑に限られることがわかった。

21 番染色体のトリソミーであるダウン症では、加齢とともに脳に AD の病理学的変化が再現されることが知られている。そこで、次にダウン症脳を用いて A β 蓄積の進展を時系列的に検討した (Iwatsubo et al., 1995)。ダウン症患者脳の連続切片を、BC05 と BA27 で染色した結果、びまん性の老人斑が BC05 でのみ染色され、BA27 では完全に陰性であった (図 3.2 A, B)。BA27 の染色性は加齢に伴って変化し、44 歳の症例では成熟老人斑のコア部分のみが陽性だったのに対し (図 3.2D)、57 歳の症例では数多くの老人斑と血管壁アミロイドの大部分が BA27 で強く染色され、かつ成熟老人斑のコア部分および周辺部分が同等の強い BA27 染色性を示した (図 3.2F)。これらの結果から、A β の蓄積は A β 42 から始まり、老人斑の成熟に伴って A β 40 が加わっていくこと、 β アミロイド蓄積の初期形態と考えられるびまん性老人斑は A β 42 を主な構成要素とすることがわかった。

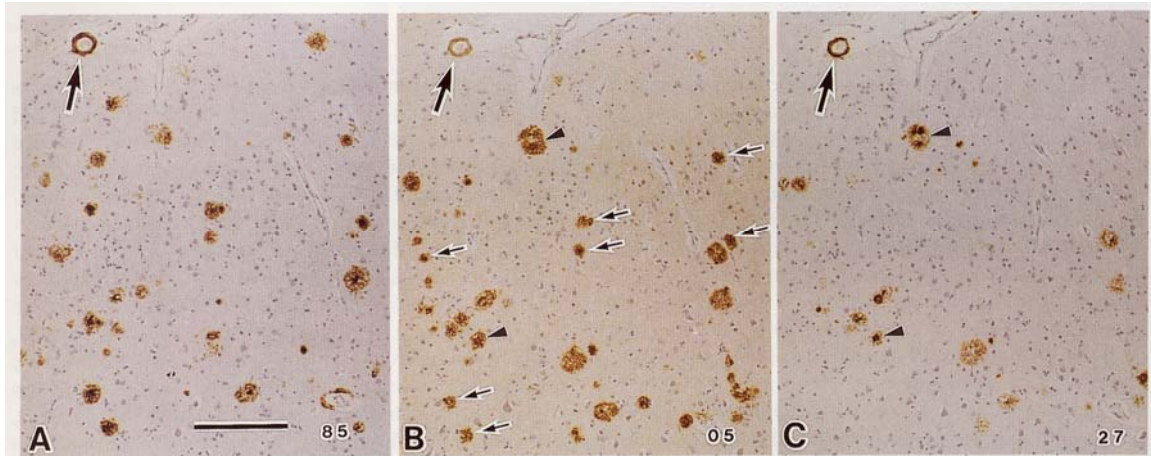


図 3.1 孤発性 AD 患者側頭葉に沈着した老人斑の免疫組織化学

3 連続切片を (A)BS85、(B)BC05、(C)BA27 の各抗体で染色した。BS85 と BC05 がほとんど同じ染色像を示しているのに対し、BA27 はその一部に対してのみ陽性であった。(B)の小矢印で示した BC05 陽性老人斑は BA27 には陰性であった (C)。BC05 とは異なり、BA27 は老人斑のコアの部分とより強く反応した (B, C の矢頭)。また、アミロイドが沈着した静脈壁 (A, B, C の大矢印) に対しては 3 抗体とも陽性であった。スケールバーは $500\mu\text{m}$ に相当 (Iwatsubo et al., 1994)。

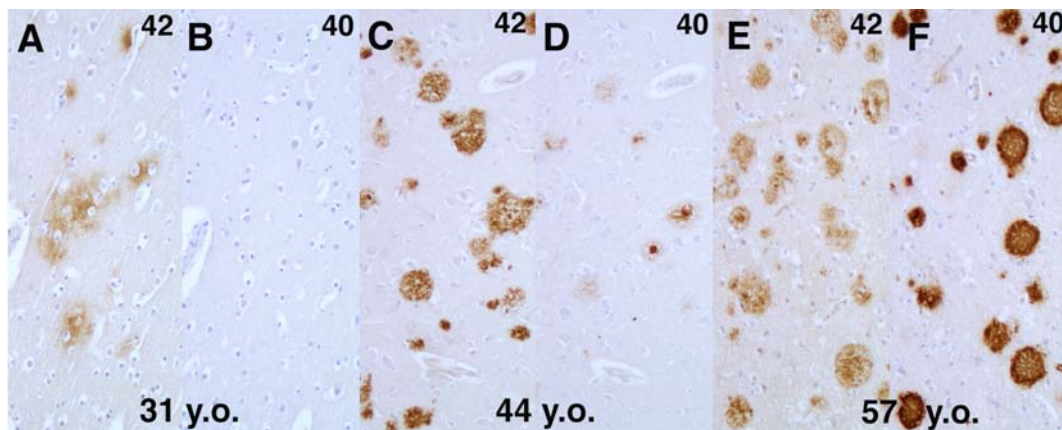


図 3.2 ダウン症患者前頭葉に沈着した老人斑の免疫組織化学

ダウン症患者脳の前頭葉の連続切片を BC05 (A, C, E) と BA27 (B, D, F) で染色した。31 歳、男性 (A, B) の症例では、びまん性の老人斑が BC05 でのみ染色され (A)、BA27 では完全に陰性であった (B)。44 歳、男性 (C, D) の症例では、数多くの未成熟老人斑、成熟老人斑が BC05 陽性であるのに対し (C)、BA27 に対して陽性なのは成熟老人斑のコア部分であった (D)。57 歳、男性 (E, F) の症例では、数多くの老人斑が BC05 陽性であり (E)、その大部分が BA27 で強く染色された (F)。D とは異なり、成熟老人斑のコア部分および周辺部分が同様に強く BA27 陽性であった。バー= $100\mu\text{m}$ (Iwatsubo et al., 1995)。

3.2 ビオチン化 BC05 (BC05B) の脳内移行性

腹腔内投与 24 時間後のビオチン化マウス IgG の血漿中の濃度は $1,300 \pm 296$ pmol/ml (平均値 \pm 標準誤差)、脳内濃度は 6.42 ± 0.475 pmol/g 組織であったのに対し、BC05B の血漿濃度は $1,030 \pm 94.8$ pmol/ml、脳内濃度は 4.75 ± 0.056 pmol/g 組織であった (表 3.1)。マウスの血漿容量を体重 1 kg あたり 48.9 ml (Durbin et al., 1992) として血漿と脳内に移行した抗体量を計算すると、マウスあたり 0.5 mg の BC05B を投与したうちの 29.1% が血漿に移行し、0.023% が脳内に移行したことがわかった。ビオチン化マウス IgG と BC05B の脳内移行性はほぼ同等の結果となった。

表 3.1 ビオチン化抗体の腹腔内投与 24 時間後の血漿・脳内抗体濃度

	Biotinylated mouse IgG (n = 4)	BC05B (n = 5)
Plasma (pmol/ml)	$1,300 \pm 296$	$1,030 \pm 94.8$
Brain (pmol/g 組織)	6.42 ± 0.475	4.75 ± 0.056
Plasma/dose (%)	36.8	29.1
Brain/dose (%)	0.031	0.023

All data are presented as the mean \pm SE.

3.3 BC05 の 9 ヶ月間連続投与後の血漿 A β 濃度の変化

9 ヶ月間 BC05 を連続投与した後の血漿 A β 40 濃度は、血漿の 6 M 塩酸グアニジン (GuHCl) 処理の有無によらずコントロール IgG 投与群の約 70% に減少した (GuHCl 未処理 IgG 群 : 2.99 ± 0.208 pmol/ml、GuHCl 未処理 BC05 群 : 2.35 ± 0.128 pmol/ml、GuHCl 処理 IgG 群 : 3.16 ± 0.302 pmol/ml、GuHCl 処理 BC05 群 : 2.27 ± 0.186 pmol/ml) (図 3.3)。これに対し A β 42 (43) 濃度は、GuHCl 未処理の血漿で BC05 投与群がコントロール群の約 22 倍高く (8.81 ± 0.224 および 0.389 ± 0.020 pmol/ml)、GuHCl 処理後の血漿では BC05 投与群の濃度がさらに約 2 倍上がりコントロール群の約 44 倍高い値になった (18.8 ± 1.10 および 0.588 ± 0.029 pmol/ml)。以上の結果より、血漿中 A β 42 (43) 濃度の大幅かつ特異的な上昇は、BC05 の投与によりもたらされたものと考えられた。

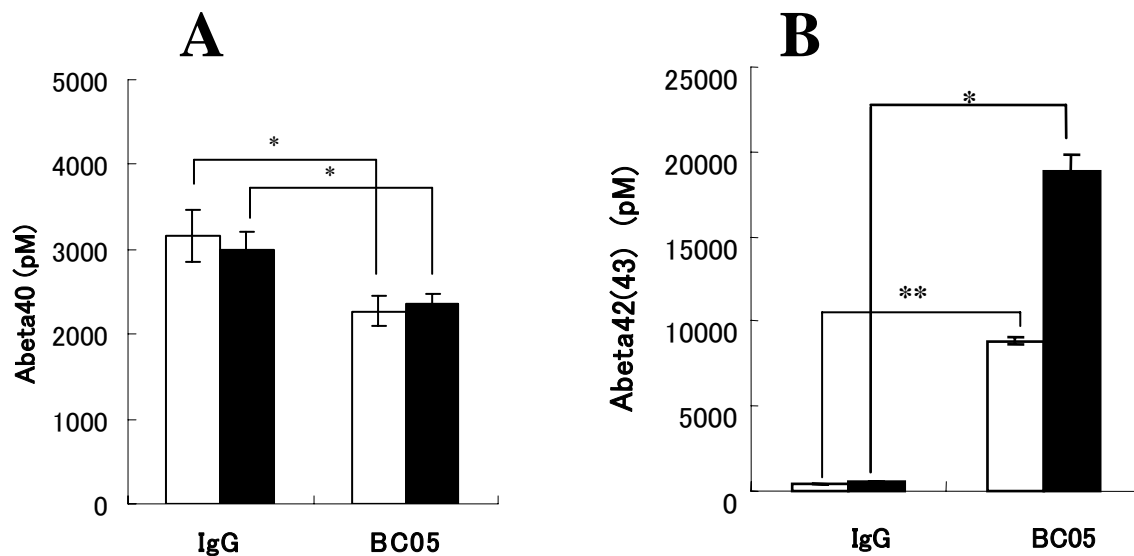


図 3.3 APPTg マウスへの BC05 抗体 9 ヶ月連続投与後の血漿 Aβ 濃度

A. コントロール IgG または BC05 9 ヶ月連続投与後の血漿 Aβ 40 濃度

B. コントロール IgG または BC05 9 ヶ月連続投与後の血漿 Aβ 42(43) 濃度

白のカラムは未処理の血漿、黒のカラムはグアニジン処理（本文参照）後の血漿の定量値を示す。BC05 の投与により血漿 Aβ 42(43) 濃度はコントロールに比べ 22 倍（未処理）－44 倍（グアニジン処理）に上昇した(B)。一方、血漿 Aβ 40 濃度は BC05 の投与により有意に低下した(A)。

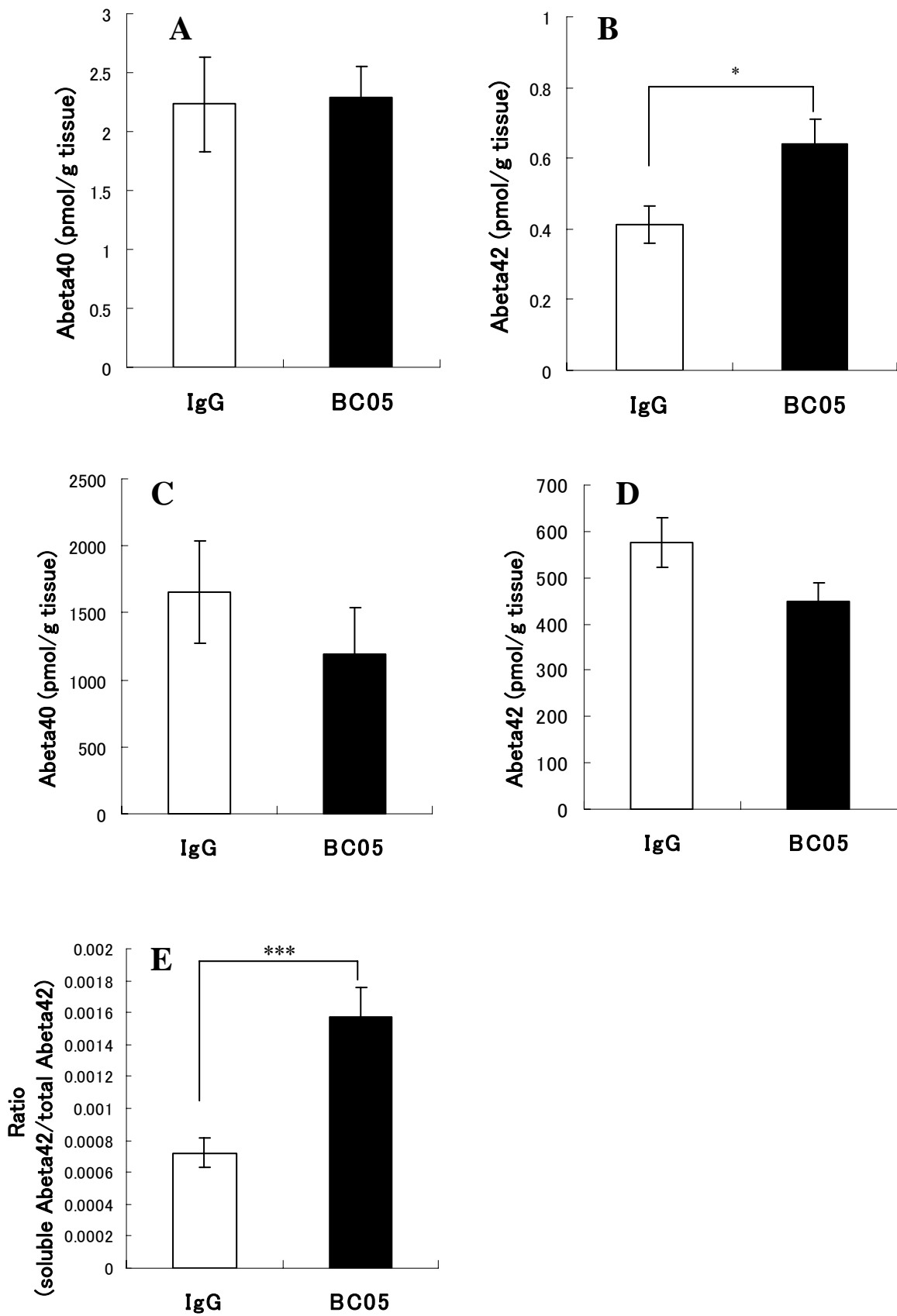
3.4 BC05 の 9 ヶ月間連続投与後の脳内 Aβ 濃度の変化

脳内可溶性 Aβ 40 濃度は、BC05 投与群 (2.29 ± 0.270 pmol/g 組織) とコントロール IgG 投与群 (2.23 ± 0.402 pmol/g 組織) との間に差が認められなかったが、脳内可溶性 Aβ 42(43) 濃度では、BC05 投与群 (0.643 ± 0.0687 pmol/g 組織) がコントロール IgG 投与群 (0.413 ± 0.0521 pmol/g 組織) の 156%に上昇した (図 3.4A, B)。

一方、脳内不溶性 Aβ 40 レベルは、BC05 投与群 ($1,200 \pm 347$ pmol/g 組織) がコントロール IgG 投与群 ($1,650 \pm 383$ pmol/g 組織) よりも 27.3%の低下、脳内不溶性 Aβ 42(43) レベルは、BC05 投与群 (442 ± 57.4 pmol/g 組織) がコントロール IgG 投与群 (654 ± 102 pmol/g 組織) よりも 31.5%の低下を示した (図 3.4C, D)。これらの結果を総合すると、脳内総 Aβ 42(43) 量に占める可溶性 Aβ 42(43) の比率は、BC05 の連続投与により有意に上昇したが (コントロール群: $0.07 \pm 0.03\%$ 、BC05 投与群: $0.15 \pm 0.05\%$; 図 3.4E)、脳内総 Aβ 40 量に占める可溶性 Aβ 40 の割合は変化しなかった (データ省略)。

3.5 BC05 の 9 ヶ月間連続投与後の免疫組織化学

BC05 またはコントロール IgG を連続投与した各マウスの大脳皮質左半球の切片を抗 A β N 末端抗体 BAN50 で染色し、脳内の β アミロイド沈着を検出した。BC05 投与群ではコントロール群に対し老人斑の数および面積に減少傾向を認めたが、有意ではなかった (図 3.5A-F, I)。また、BAN50 陽性老人斑の大部分は AIF-1 陽性のミクログリアに囲まれていたが、IgG 投与群と BC05 投与群との間に違いは認められなかった (図 3.5G, H)。



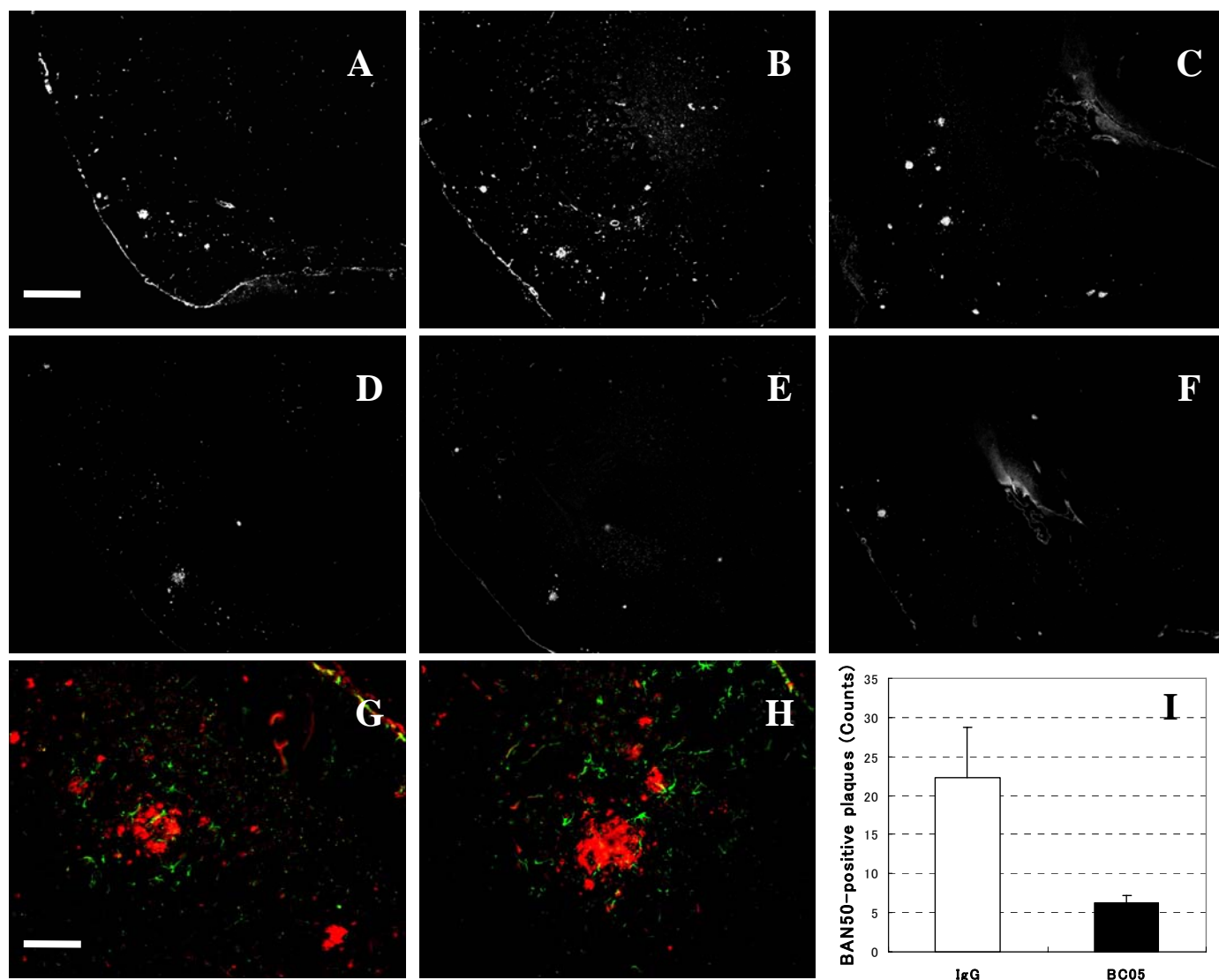


図3.5 APP^{sw}TgマウスへのBC05抗体9ヶ月連続投与後の免疫組織化学

コントロールIgG (A, B, C) またはBC05 (D, E, F) を9ヶ月間連続投与したTg2576マウス (n=6) の大脳皮質の老人斑を、抗A β (1-16)モノクローナル抗体BAN50を用いて蛍光免疫染色した。単位面積あたりの老人斑数は、有意差はつかなかったものの、BC05投与群で減少傾向が認められた(I)。ほとんどの老人斑はAIF-1陽性のミクログリアと共存し、ミクログリアの活性化に関してIgG投与群(G)とBC05投与群(H)に違いは認められなかった。

考察

本章前半では、 $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42(43)のC末端を識別するモノクローナル抗体を用いて、AD脳、ダウン症脳の免疫組織化学による染色を行い、ほぼ全ての老人斑が $A\beta$ 42(43)陽性であること、 $A\beta$ 40は老人斑の成熟に伴って蓄積すること、そして $A\beta$ の蓄積は凝集性の高い $A\beta$ 42(43)の沈着から始まることを明らかにした。

従来行われてきたAD脳に蓄積した $A\beta$ に関する検討の多くは生化学的な定量、分析に基づくものであったため、脳実質の沈着物を検討する際にはCAAの混入を避けがたかった。これは脳実質内に沈着した $A\beta$ の分子種の比率を検討する際に誤った結果を招きやすい。また明瞭なアミロイド線維ではなく不定形の凝集物からなるびまん性老人斑は、微量の $A\beta$ によって構成されるため、脳のホモジネートからの同定は困難が予想される。こうした問題点は、 $A\beta$ の分子種に対して特異性の高い抗体を用いた免疫組織化学的解析により克服され、脳実質内に蓄積した $A\beta$ の分子種を *in situ* で同定することができた。本研究から孤発性AD脳では $A\beta$ 42(43)陽性斑が老人斑の大部分を占めることがわかったが、この結果はそれまでの生化学的解析結果と一致するものであった (Kang et al., 1987; Miller et al., 1993; Roher et al., 1993a)。また、びまん性老人斑は $A\beta$ 42(43)に陽性で $A\beta$ 40には陰性であること、孤発性AD脳の $A\beta$ 40陽性斑は一部の成熟した老人斑に限られることも明らかとなった。こうした病理像と、 $A\beta$ 42は $A\beta$ 凝集のseedとなるという *in vitro* の結果 (Jarrett et al., 1993)およびMaggioらが示したあらかじめ凝集させた $A\beta$ 40は血管壁および老人斑に特異的に沈着するという結果 (Maggio et al., 1992)を考え合わせて、老人斑の形成機序を推測した。すなわち、不溶性の凝集体となった $A\beta$ 42(43)がびまん性老人斑として蓄積し、さらなる $A\beta$ 42(43)の凝集体が加わることでより原始老人斑となる。この未成熟な老人斑を足場として $A\beta$ 40が蓄積を増し、老人斑の成熟が進行すると考えられた。

本章後半では、抗 $A\beta$ 42(43)C末端抗体BC05の受動免疫によるマウス脳内の可溶性 $A\beta$ 42(43)または不溶性 $A\beta$ 42(43)の選択的除去作用を検討した。まず、ビオチン化BC05を用いることにより、腹腔内投与24時間後には投与した抗体の約29%が血漿に、約0.023%が脳内に移行することを確認した。これらの値はAPPを過剰発現させたSAMP8マウスで報告のある腹腔内投与後の抗体の脳内移行性と近いレベルであったことから (Banks et al., 2002)、BC05連続投与効果の一部は、脳内に移行したBC05が脳内の $A\beta$ 42(43)に直接作用した結果と考えられた。

BC05 投与群では血漿 A β 42(43)濃度が特異的に大きく上昇し、一方 A β 40 濃度は低下した (図 3.3)。抗 A β 抗体の受動免疫または A β ペプチドの能動免疫が、検討に用いたトランスジェニックモデルマウスの血中 A β 濃度を 28-1000 倍に上昇させることはすでに報告されている (DeMattos et al., 2001; Lemere et al., 2003)。しかし、本研究で示したような血漿 A β 42(43)濃度の特異的な上昇はこれまでに報告がない。0.5 mg/マウス/週で腹腔内投与した BC05B の 24 時間後の血漿濃度は約 1000 pmol/ml であったことから、BC05 を 1.0 mg/マウス/週で腹腔内投与した場合にはおよそ 2000 pmol/ml の血漿 BC05 濃度が得られると推測された。1.0 mg/マウス/週で BC05 を連続投与した際の GuHC1 処理後のマウス血漿 A β 42(43)濃度は約 18 nM (18 pmol/ml)であったので、このとき血漿中には A β 42(43)の 100 倍のモル数の BC05 が存在したことになる。従って、BC05 を投与したマウスの血中では、脳から排出された A β 42(43)はフリー型と BC05 結合型との動的な平衡状態にあると推測される。またデータは示していないが、Tg2576 マウスへの BC05 腹腔内投与に伴う血漿 A β 42(43)濃度の上昇は、投与後 3-6 時間後の時点ですでに 30-100 倍に達することも別の実験で確認した。これらの結果を総合すると、血漿 A β 42(43)濃度の極めて大きな上昇は、BC05 との結合によりもたらされた代謝安定性による可能性が高いと考えられた。BC05 が脳内から末梢への A β 42(43)排出促進作用を有しているか否かについては、脳内投与したラベル化 A β 42 の末梢排出が BC05 の末梢投与により促進されるかどうかを調べる必要がある。

BC05 の投与による脳内可溶性 A β 42(43)の増加量は脳内総 A β 量に比べれば非常に少なかったが、コントロール群に比べ有意に 156%に増加した (図 3.4B)。BC05 の投与により、脳内総 A β 42(43)量に占める脳内可溶性 A β 42(43)量の割合が有意に増加し、脳内の不溶性 A β 40、A β 42(43)の量はコントロール群に対しそれぞれ 27.3%または 31.5%低下したことから、連続投与された BC05 は脳内の可溶性 A β 42(43)を安定化させることによって、脳内から末梢への A β の排出を促進し、その結果脳内の β アミロイド蓄積を減少させたと推測された。これらの結果は、A β 凝集抑制薬クロロキンを Tg2576 マウスに投与した際に観察された可溶性 A β 濃度の上昇と脳内総 A β 量の低下作用に類似しており、可溶性 A β との高い親和性を持つクロロキンや BC05 は一部共通する作用機序を有する可能性がある (Cherny et al., 2001)。また、本研究で用いたサンドイッチ ELISA は、オリゴマーやプロトフィブリンなどの高い細胞毒性をもつ凝集 A β に対しては低い検出感度しか持たないため、BC05 投与群でみられた可溶性 A β 42(43)濃度の上昇は可溶性の A β オリゴマーがモノマーに変換した結果を表すものかもしれない。BC05 の投与と A β の凝集状態との関係について

は今後検討の必要がある。免疫組織化学においても、統計学的には有意でなかったが脳内 β アミロイドの蓄積量の低下傾向がみられた (図 3.5)。投与方法の改良などにより BC05 の脳内移行性を向上させることができれば、より効果的な $A\beta$ 42(43) 沈着の抑制が期待できると思われた。

抗 $A\beta$ 抗体を用いる受動免疫は、AD モデルマウスの検討を経て臨床試験に進んでいるものもあるが、 $A\beta$ C 末端に対する抗体が検討された例はわずかである (McLaurin et al., 2002, Bard et al., 2000, 2003)。Bard らは受動免疫における抗体の有効性は可溶性 $A\beta$ との親和性には依存しないとしており、 $A\beta$ C 末端に対する抗体 21F12 と 16C11 は *in vivo* または *ex vivo* での検討で、生化学的にも組織化学的にも効果を示さなかった (Bard et al., 2000, 2003)。これに対し、Mohajeri らは $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 両者の C 末端に反応する抗体 22C4 を Tg2576 マウスに受動免疫することにより、脳の SDS 可溶性画分の $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 濃度の有意な低下を報告している (Mohajeri et al., 2002)。Das らも $A\beta$ (35-42) を免疫原とする抗体 2.1.3 を Tg2576 マウスに投与し、7 ヶ月齢のマウスで脳の $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 濃度の有意な低下を認めているが、11 ヶ月齢のマウスでは有意差が得られていない (Das et al., 2003)。私の検討では、TS バッファーおよび GuHCl を用いることにより可溶性および不溶性 $A\beta$ をそれぞれ抽出しており、前出の報告とは方法が異なる。可溶性 $A\beta$ 、不溶性 $A\beta$ を注意深く検討することにより、 $A\beta$ 42(43) 選択的な可溶化が、 $A\beta$ 40、 $A\beta$ 42 両者からなる老人斑の蓄積を抑制する傾向を示すことができた。

本章前半の検討で、AD 脳では $A\beta$ 42(43) の沈着から老人斑の形成が始まり、老人斑の成熟に伴って $A\beta$ 40 が蓄積していくことを示したが、本章後半の検討では Tg2576 マウスで老人斑の形成が認められる 8 ヶ月齢よりも前のかなり早い段階から BC05 の受動免疫を行うことにより、脳内の可溶性 $A\beta$ 42(43) を安定化し、老人斑の成熟を予防できたものと考えられた。この結果は BC05 の反応特異性に依存したものと思われるが、その作用機序を検討することにより、有効で安全な $A\beta$ の免疫療法の開発につながるものと期待している。

小括

A β 40、A β 42(43)のC末端を識別するモノクローナル抗体を用いて、AD脳、ダウン症脳の免疫組織染色を行い、A β の蓄積は凝集性の高いA β 42(43)の沈着から始まり、A β 40は老人斑の成熟に伴って蓄積することを明らかにした。

さらに、APP^{swTg}マウスのA β 蓄積前から蓄積進行期にいたる9ヶ月間に亘って、抗A β 42(43)C末端特異抗体BC05を連続投与することにより、A β 40、A β 42両者からなる老人斑の蓄積を抑制することが可能であった。同時に可溶性A β 42(43)の有意な濃度上昇が認められたことから、この作用はA β 42(43)の選択的な可溶化（可溶状態の保持）を介したものと考えられた。投与方法を検討することなどにより脳内に移行するBC05の割合を高めることができれば、有効な抗体医療となりうるものと考えられた。

結論

A β C末端部分の2残基の違いを識別するモノクローナル抗体を樹立し、C末端長がわずかに異なるA β 40、42(43)を高感度に分別定量可能なサンドイッチELISA法を開発した。このサンドイッチELISA法を用いて、生理的条件下の培養細胞が分泌するA β 42(43)の比率は、分泌A β 総量の約10%に過ぎないが、AD脳におけるA β の蓄積は高い凝集性を持つA β 42(43)から開始されることを明らかにした。さらに、APP Val717の変異は高い凝集性を持つA β 42(43)の産生比率を増加させることによりFADを発症させることを見出した。そして、A β 42(43)のC末端に特異的なBC05抗体の受動免疫による脳内A β 42(43)の選択的な除去は、トランスジェニックマウス脳におけるA β の蓄積量を減少させる可能性を示し、AD治療法としての応用が期待された。

本研究において私は、C末端部の2アミノ酸残基の違いがもたらすA β 42(43)の高い凝集性が、ADの発症に決定的な役割を果たすことを示すとともに、A β 40とA β 42(43)を高感度に分別して検出することによりADの病態生理の諸相を解明することができた。今後のAD治療法の研究開発においても、これらのA β 40/A β 42(43)分別測定系は重要なツールになるものと期待される。

本研究の内容は以下の論文として出版した

Asami-Odaka A, Ishibashi Y, Kikuchi T, Kitada C, Suzuki N. Long amyloid β protein secreted from wild-type human neuroblastoma IMR-32 cells. *Biochemistry* **34**, 10272–10278, 1995.

Asami-Odaka A, Obayashi-Adachi Y, Matsumoto Y, Takahashi H, Fukumoto H, Horiguchi T, Suzuki N, Shoji M. Passive immunization of the A β 42(43) C-terminal-specific antibody BC05 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurodegenerative Dis.* **2**, 36-43, 2005.

謝辞

本研究をまとめるに際し、終始懇切なる御助言と御指導を賜りました 東京大学大学院薬学系研究科 岩坪 威 教授に心から感謝申し上げます。

本研究の機会を与えて下さいました 武田薬品工業株式会社 元代表取締役会長 故 藤野 政彦 博士、取締役 医薬研究本部長 左右田 隆 博士、製品戦略部領域リーダー 宮本 政臣 博士、創薬第三研究所所長 黒川 勉 博士に深く感謝いたします。

本研究は、開拓研究所所長 鈴木 伸宏 博士のご指導のもとに行われたものであり、心から御礼申し上げます。

本研究を進めるに際し、ご指導とご援助を賜りました、岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 助教授 東海林 幹夫 博士、東京大学大学院 医学系研究科 教授 井原 康夫 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたって有益なご助言とご協力をいただきました筑波大学 臨床医学系 神経内科 助教授 玉岡 晃 博士、医薬研究推進部 主席部員 北田 千恵子 博士、医薬開発本部 開発戦略部 菊地 崇 主席部員、開拓研究所 主任研究員 石橋 祥弘 博士、医薬研究本部 主席部員 加藤 光一 博士、創薬第一研究所 松本 芳男 主任研究員、創薬第三研究所 大林 由佳 所員、高橋 秀樹 主任研究員、開拓研究所 主席研究員 松本 寛和 博士、原田 征隆 主任研究員に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるに際し、有益なご助言とご援助を賜りました創薬第三研究所 主席研究員 中西 淳 博士、主席研究員 堀口 隆司 博士、主席研究員 新谷 靖 博士、主席研究員 福元 宏明 博士に深く感謝申し上げます。

最後に、ご協力と激励をいただきました創薬第三研究所の諸氏、そして常なる協力と共にたくさんのアイデアを与えてくれる夫と家族に感謝いたします。

引用文献

Bacskai BJ, Kajdasz ST, McLellan ME, Games D, Seubert P, Schenk D, Hyman BT: Non-Fc-mediated mechanisms are involved in clearance of amyloid- β *in vivo* by immunotherapy. *J Neurosci.* **22**, 7873–7878, 2002.

Banks WA, Terrell B, Farr SA, Robinson SM, Nonaka N, Morley JE: Passage of amyloid β -protein antibody across the blood–brain barrier in a mouse model of Alzheimer's disease. *Peptides* **23**, 2223–2226, 2002.

Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T: Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med.* **6**, 916–919, 2000.

Bard F, Barbour R, Cannon C, Carretto R, Fox M, Games D, Guido T, Hoenow K, Hu K, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee C, Lee M, Motter R, Nguyen M, Reed A, Schenk D, Tang P, Vasquez N, Seubert P, Yednock T: Epitope and isotype specificities of antibodies to β -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 2023–20, 2003.

Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, Yankner BA. Generation of β -amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2092–6, 1993.

Cai XD, Golde TE, Younkin SG. Release of excess amyloid β protein from a mutant amyloid β protein precursor. *Science* **259**, 514–6, 1993.

Cherny RA, Atwood CS, Xilinas ME, Gray DN, Jones WD, McLean CA, Barnham KJ, Volitakis I, Fraser FW, Kim Y, Huang X, Goldstein LE, Moir RD, Lim JT, Beyreuther K, Zheng H, Tanzi RE, Masters CL, Bush AI: Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits β -amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* **30**, 665–676, 2001.

Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J, et al. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature* **353**, 844–6, 1991.

Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases

β -protein production. *Nature* **360**, 672-4, 1992.

Coles M, Bicknell W, Watson AA, Fairlie DP, Craik DJ. Solution structure of amyloid β -peptide(1-40) in a water-micelle environment. Is the membrane-spanning domain where we think it is? *Biochemistry* **37**,11064-77, 1998.

Cribbs DH, Ghochikyan A, Vasilevko V, Tran M, Petrushina I, Sadzikava N, Babikyan D, Kesslak P, Kieber-Emmons T, Cotman CW, Agadjanyan MG: Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with β -amyloid. *Int Immunol.* **15**, 505–514, 2003.

Das P, Howard VG, Golde TE: Passive Immunization with an Anti-A β 35-42 End Specific Monoclonal Antibody Significantly Reduces Amyloid Loads in Tg2576. Program No. 133.13. 2003 *Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington DC, Society for Neuroscience*, 2003 Online.

DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM: Peripheral anti-A β antibody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 8850–8855 2001.

Dovey HF, Suomensaaari-Chrysler S, Lieberburg I, Sinha S, Keim PS. Cells with a familial Alzheimer's disease mutation produce authentic β -peptide. *Neuroreport* **4**, 1039-42, 1993.

Durbin PW, Jeung N, Kullgren B, Clemons GK. Gross composition and plasma and extracellular water volumes of tissues of a reference mouse. *Health Phys.* **63**, 427–442, 1992.

Gelinas DS, DaSilva K, Fenili D, St. George-Hyslop P, McLaurin J. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **101 Suppl 2**, 14657-62, 2004

Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **120**, 885-90, 1984.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R., Newton P., Rooke K., Roques P., Talbot C., Pericak-Vance M., Roses A., Williamson R., Rossor M., Owen M., Hardy J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704-6, 1991.

Gotti C, Sher E, Cabrini D, Bondiolotti G, Wanke E, Mancinelli E, Clementi F. Cholinergic receptors, ion channels, neurotransmitter synthesis, and neurite outgrowth are independently regulated during the in vitro differentiation of a human neuroblastoma cell line. *Differentiation* **34**, 144-55, 1987.

Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, Selkoe DJ. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells

during normal metabolism. *Nature* **359**, 322-5, 1992.

Haass C, Selkoe DJ. Cellular processing of β -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β -peptide. *Cell* **75**, 1039-42, 1993.

Haass C, Koo EH, Teplow DB, Selkoe DJ. Polarized secretion of β -amyloid precursor protein and amyloid β -peptide in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1564-8, 1994a.

Haass C, Hung AY, Selkoe DJ, Teplow DB. Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid β -protein precursor. *J Biol Chem* **269**, 17741-8, 1994b.

Hara H, Adachi K, Tabira T. New Oral Vaccine for Alzheimer's Disease using Recombinant AAV. Program No. 201.2. 2003 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington DC, Society for Neuroscience, 2003. Online.

Hatanaka H. Nerve growth factor-mediated stimulation of tyrosine hydroxylase activity in a clonal rat pheochromocytoma cell line. *Brain Res.* **222**, 225-33, 1981.

Hock C, Konietzko U, Streffer JR, Tracy J, Signorell A, Müller-Tillmanns B, Lemke U, Henke K, Moritz E, Garcia E, Wollmer MA, Umbricht D, De Quervain DJ, Hofmann M, Maddalena A, Papassotiropoulos A, Nitsch RM: Antibodies against β -amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* **38**, 547-554, 2003.

Hou L, Shao H, Zhang Y, Li H, Menon NK, Neuhaus EB, Brewer JM, Byeon IJ, Ray DG, Vitek MP, Iwashita T, Makula RA, Przybyla AB, Zagorski MG. Solution NMR studies of the A β (1-40) and A β (1-42) peptides establish that the Met35 oxidation state affects the mechanism of amyloid formation. *J Am Chem Soc.* **126**, 1992-2005, 2004.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G: Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* **274**, 99-102, 1996.

Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y: Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron* **13**, 45-53, 1994.

Iwatsubo T, Mann DM, Odaka A, Suzuki N, Ihara Y. Amyloid β protein (A β) deposition: A β 42(43) precedes A β 40 in Down syndrome. *Ann Neurol* **37**, 294-9, 1995.

Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P,

Westaway D: A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* **408**, 979–982, 2000.

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr: The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**, 4693–4697, 1993.

Jensen M, Hartmann T, Engvall B, Wang R, Uljon SN, Sennvik K, Naslund J, Muehlhauser F, Nordstedt C, Beyreuther K, Lannfelt L. Quantification of Alzheimer amyloid β peptides ending at residues 40 and 42 by novel ELISA systems. *Mol Med.* **6**, 291-302, 2000.

Joachim CL, Duffy LK, Morris JH, Selkoe DJ. Protein chemical and immunohistochemical studies of meningeovascular β –amyloid protein in Alzheimer's disease and normal aging. *Brain Res.* **474**, 100-111, 1988.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733-6, 1987.

Kitamoto T, Ogomori K, Tateishi J, Prusiner SB. Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Lab. Invest.* **57**, 230-236, 1987.

Kohler G & Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-7, 1975.

Lemere CA, Spooner ET, Leverone JF, Mori C, Clements JD. Intranasal immunotherapy for the treatment of Alzheimer's disease: *Escherichia coli* LT and LT (R192G) as mucosal adjuvants. *Neurobiol Aging* **23**, 991–1000, 2002.

Lemere CA, Spooner ET, LaFrancois J, Malester B, Mori C, Leverone JF, Matsuoka Y, Taylor JW, DeMattos RB, Holtzman DM, Clements JD, Selkoe DJ, Duff KE. Evidence for peripheral clearance of cerebral A β protein following chronic, active A β immunization in PSAPP mice. *Neurobiol Dis.* **14**, 10–18, 2003.

Masliah E, Terry RD, Mallory M, Alford M, Hansen LA. Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **137**, 1293-1297, 1990.

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **82**, 4245-4249, 1985.

Matsubara E. Brain and systemic A β clearance. *Dementia Japan*, **18**, 228-235, 2004.

- Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun*, **164**, 74-80, 1989.
- McLaurin J, Cecal R, Kierstead ME, Tian X, Phinney AL, Manea M, French JE, Lambermon MH, Darabie AA, Brown ME, Janus C, Chishti MA, Horne P, Westaway D, Fraser PE, Mount HT, Przybylski M, St George-Hyslop P. Therapeutically effective antibodies against amyloid- β peptide target amyloid- β residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nat Med*. **8**, 1263–1269, 2002.
- Miller DL, Papayannopoulos IA, Styles J, Bobin SA, Lin YY, Biemann K, Iqbal K. Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys*. **301**, 41-52, 1993.
- Mohajeri MH, Saini K, Schultz JG, Wollmer MA, Hock C, Nitsch RM. Passive immunization against β -amyloid peptide protects CNS neurons from increased vulnerability associated with an Alzheimer's disease-causing mutation. *J Biol Chem*. **277**, 33012–33017, 2002.
- Mori H, Takio K, Ogawara M, Selkoe DJ. Mass spectrometry of purified amyloid β protein in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. **267**, 17082-6, 1992.
- Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* **254**, 97-9, 1991.
- Murrell JR, Hake AM, Quaid KA, Farlow MR, Ghetti B. Early-onset Alzheimer disease caused by a new mutation (V717L) in the amyloid precursor protein gene. *Arch Neurol*. **57**, 885-7, 2000.
- Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid- β peptide: a case report. *Nat Med*. **9**, 448–452, 2003.
- Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM. A β immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron* **43**, 321–332, 2004.
- Pirttilä T, Kim KS, Mehta PD, Frey H, Wisniewski HM. Soluble amyloid β -protein in the cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease, vascular dementia and controls. *J Neurol Sci*. **127**, 90-95, 1994.
- Prelli F, Castano E, Glenner GG, Frangione B. Differences between vascular and plaque core amyloid in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. **51**, 648-51, 1988.
- Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Wolkow C, Wang R, Cotter RJ, Reardon IM, Zurcher-Neely

HA, Heinrikson RL, Ball MJ, Greenberg, BD. Structural alterations in the peptide backbone of β -amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* **268**, 3072-83, 1993a.

Roher AE, Lowenson JD, Clarke S, Woods AS, Cotter RJ, Gowing E, Ball MJ. β -Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 10836-40, 1993b.

Shelton ER, Cohn R, Fish L, Obernolte R, Tahilramani R, Nestor JJ, Chan HW. Characterization of β -amyloid precursor proteins with or without the protease-inhibitor domain using anti-peptide antibodies. *J Neurochem* **55**, 60-9, 1990.

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandever C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **400**, 173–177, 1999.

Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med.* **2**, 864-70, 1996.

Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, Younkin SG. Production of the Alzheimer amyloid β protein by normal proteolytic processing. *Science*, **258**, 126-9, 1992.

Siemers E, Skinner M, Dean RA, Gonzales C, Satterwhite J, Farlow M, Ness D, May PC. Safety, tolerability, and changes in amyloid β concentrations after administration of a γ -secretase inhibitor in volunteers. *Clin. Neuropharmacol.* **28**, 126-132, 2005.

Suzuki N, Matsumoto H, Kitada C, Masaki T, Fujino M. A sensitive sandwich-enzyme immunoassay for human endothelin. *J Immunol Methods.* **118**, 245-50, 1989.

Suzuki N, Matsumoto H, Kitada C, Kimura S, Miyauchi T, Fujino M. A sandwich-type enzyme immunoassay to detect immunoreactive big-endothelin-1 in plasma. *J Immunol Methods.* **127**, 165-70, 1990.

Suzuki N, Iwatsubo T, Odaka A, Ishibashi Y, Kitada C, Ihara Y. High tissue content of soluble β 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy. *Am J Pathol.* **145**, 452-60, 1994a.

Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Eckman C, Golde TE, Younkin SG: An increased percentage of long amyloid β protein secreted by familial amyloid β protein precursor (β APP717) mutants. *Science* **264**, 1336–1340, 1994b.

Tamaoka A, Odaka A, Ishibashi Y, Usami M, Sahara N, Suzuki N, Nukina N, Mizusawa H, Shoji S, Kanazawa I, Mori H. APP717 missense mutation affects the ratio of amyloid β protein species ($A\beta$ 1-42/43 and $A\beta$ 1-40) in familial Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem*. **269**, 32721-4, 1994.

Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Kume H, Shinozaki K, Tokuhito S, Capell A, Walter J, Grunberg J, Haass C, Iwatsubo T, Obata K. The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid β protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**, 2025-30, 1997.

Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberburg I, Schenk DB. Characterization of β -amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J Neurochem*. **61**, 1965-8, 1993.

Walsh DM, Townsend M, Podlisny MB, Shankar GM, Fadeeva JV, Agnaf OE, Hartley DM, Selkoe DJ. Certain inhibitors of synthetic amyloid β -peptide ($A\beta$) fibrillogenesis block oligomerization of natural $A\beta$ and thereby rescue long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience* **25**, 2455–2462, 2005.

Wilcock DM, DiCarlo G, Henderson D, Jackson J, Clarke K, Ugen KE, Gordon MN, Morgan: Intracranially administered anti-A β antibodies reduce β -amyloid deposition by mechanisms both independent of and associated with microglial activation. *J Neurosci*. **23**, 3745–3751, 2003.

Yamaguchi H, Hirai S, Morimatsu M, Shoji M, Nakazato Y. Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia. *Acta Neuropathol*. **77**, 113-119, 1988.

Yelton DE, Diamond BA, Kwan SP, Scharff MD. Fusion of mouse myeloma and spleen cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. **81**, 1-7, 1978.