

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591016
 研究課題名（和文）アルツハイマー病におけるアミロイド 蛋白受動免疫療法と抗体の作用機序の解明
 研究課題名（英文）Mechanism of action in amyloid beta passive immunization for Alzheimer's disease
 研究代表者
 朝倉 邦彦（ASAKURA KUNIHICO）
 藤田保健衛生大学・医学部・准教授
 研究者番号：50333159

研究成果の概要：

アルツハイマー病に対する抗 A 抗体による受動免疫療法を確立するため、ヒト抗体を産生するヒト抗体遺伝子トランスジェニックマウスを用いて、ヒトモノクローナル抗 A 抗体を製作した。また、抗 A 抗体の作用機序を、培養神経細胞株に抗 A 抗体を加えて培養し、細胞の分子レベルでの変化を、蛍光色素を用いた定量的 2 次元電気泳動法で解析した。その結果、抗体投与により増加または減少する複数の分子を、プロテオミクス解析でペプチド部分配列を決定して同定した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：アルツハイマー病，受動免疫，脂質ラフト，シグナル伝達，リン酸化

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の発症にはアミロイド（A）蛋白の沈着が重要であると考えられている。1999年に Schenk らは、アミロイド前駆蛋白を過剰発現するアルツハイマー病モデルマウスを A₄₂ で免疫すると脳内の A 沈着量が減少することを報告し、その後他施設からもこのワクチン療法の有効性が報告された。さらには抗 A 抗体を投与して

も有効性が認められ、最近の研究成果から A 蛋白の N 末端が抗体認識部位として重要であることが示された。2001 年より A ワクチンによる臨床試験が行われ、ワクチン療法開始後髄膜脳炎をきたす症例が多数報告されるに至り、この副作用克服のためにその発症メカニズムの解明が急がれている状態であった。一方、抗 A 抗体投与による受動免疫療法は脳炎発症の心配がなく、アルツハイ

マー病モデルマウスを用いた実験では、ワクチン療法と同様に脳内の A 沈着量が減少することが報告され、その臨床応用が期待されていた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、これまでの研究代表者の多発性硬化症研究における抗体作製技術を活かしてヒト抗 A モノクローナル抗体をヒト抗体遺伝子改変マウス(マウス由来の抗体をまったく産生しないマウス)を用いて直接作製する。このマウスは内在性マウス抗体産生遺伝子がノックアウトされているため、免疫したマウスより直接ヒト抗体を産生するハイブリドーマを得られる利点があり、キメラ抗体やヒト化(humanized)抗体作製の必要がまったくないという利点がある。さらに、これらの抗体の脳内アミロイド斑除去能を *ex vivo*、*in vivo* で検討して、アルツハイマー病治療への応用(受動免疫療法確立)を目的とする。

(2) また、抗 A 抗体の神経細胞に及ぼす影響を細胞レベルで解析するため、作製したヒト抗 A 抗体やすでに市販されているヒト以外の動物種で作製された抗 A 抗体による培養神経細胞におけるリン酸化シグナルを解析することにより、種々の抗 A 抗体の細胞内シグナル伝達に及ぼす影響を検討する。さらに、最近の研究では脳内に蓄積する A β 蛋白質は、lipid raft で産生されることが示されていることから、lipid raft 内の A 代謝や糖脂質代謝に及ぼす影響を検討し、細胞レベルでの抗 A 抗体の作用機序の解明および受動免疫を効率よく行える抗体のスクリーニング法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト A N末端合成ペプチド(A 3-9 および A 5-11)にウシサイログロブリンを conjugate したものを抗原としてヒト抗体遺伝子トランスジェニックマウス(KMマウス)を免疫する。抗体価の上昇したマウスの脾細胞を X63 Ag8.653 ミエローマ細胞と細胞融合を行い、ハイブリドーマを作製する。得られたハイブリドーマ上清を用いて、免疫抗原との反応性を ELISA によりスクリーニングを行い、陽性細胞は 1 次および 2 次クローニング・スクリーニングを行う。陽性クローンは、A 1-40 あるいは A 1-42 の合成ペプチドとの反応性を調べ、さらにアルツハイマー病患者の脳切片を用いて免疫組織染色を行い最終的に陽性のクローンを得る。また、得られたクローンより mRNA を分離して cDNA を合成して RACE 法により、これら陽性クローンの cDNA をクローニングし、可変領域の全

塩基配列を決定する。

(2) 作製したヒトモノクローナル抗 A 抗体と市販のヒト以外の抗 A 抗体を、神経成長因子(NGF)の受容体である Trk を過剰発現している培養神経細胞株(PCtrlk)に加えて、抗 A 抗体による培養神経細胞におけるリン酸化シグナル、即ちチロシンリン酸化、セリン・スレオニンリン酸化をウエスタンブロット法で解析する。

さらに、Trk 受容体リン酸化を抗 Trk 抗体を用いて免疫沈降した後、抗チロシンリン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法により解析する。

(3) リン酸化に影響を及ぼすことが判明した抗 A 抗体を用いて PCtrlk 細胞を培養し、これらの細胞の lysate を蛍光色素を用いた定量的 2 次元電気泳動法により解析し、抗 A 抗体投与により発現が変化する細胞内分子を蛍光強度の変化から同定する。同定された 2 次元電気泳動上の spot より蛋白を分離し、プロテオミクス解析により、ペプチドの部分配列を決定し、その分子を同定する。

(4) 抗 A 抗体を加えて培養した細胞に界面活性剤を加えた後細胞を破碎し、sucrose gradient による超遠心により lipid raft 画分を精製する。精製した画分を用いて lipid raft 内の A 蛋白質や糖脂質の組成変化を解析することにより、種々の抗 A 抗体の lipid raft での A 産生や糖脂質代謝に及ぼす影響を検討し、抗体の作用機序の解明および受動免疫を効率よく行える抗体のスクリーニング法の確立を試みる。

4. 研究成果

(1) ヒト A N末端合成ペプチド(A 3-9 および A 5-11)を抗原として、ヒト抗体遺伝子トランスジェニックマウスを免疫して、ハイブリドーマを複数個作製し、クローニングの結果、最終的に免疫抗原である A 3-9 および A 5-11 ペプチドと強く反応するクローンが 1 つ得られた。

得られたハイブリドーマより mRNA を分離し RACE 法により可変領域の全塩基配列を決定し、IgG2 サブクラスに属する抗体であることが判明した。

この抗体は ELISA で A 1-40、A 1-42 とともに強く反応し、アルツハイマー病患者の脳切片を用いた免疫染色でも老人斑を染色することが確認された。

(2) 得られた A 蛋白質の N 末端に対するヒトモノクローナル抗体だけでなく、A 蛋白質の C 末端や中間部分、あるいは A 蛋白質全体を認

識する市販の各種抗A 抗体をPCtrlk神経細胞株に加えて培養し、この細胞におけるチロシンリン酸化とセリン・スレオニンリン酸化を各々特異抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。その結果、これらの抗A 抗体のうち、A 蛋白N末端を認識する抗体1つと、A 蛋白中間部分を認識する抗体1つで、それら抗体投与によりチロシンリン酸化が促進される分子や抑制される分子があることが判明した。一方、セリン・スレオニンリン酸化は抗A 抗体投与によってまったく影響を受けなかった。

また、抗A 抗体によるPCtrlk培養神経細胞におけるTrk受容体リン酸化をウエスタンブロット法により解析し、細胞内シグナル伝達に及ぼす影響を調べたが、Trk受容体リン酸化を促進する抗体は認められず、Trk受容体リン酸化に変化を及ぼさないものと抑制する2種類の抗体が認められた。

(3) チロシンリン酸化に影響を及ぼす抗A 抗体のうち、A 蛋白N末端に対する抗体を投与して培養したPCtrlk細胞から経時的に蛋白を抽出した。これらの蛋白を蛍光色素でラベルした後、2次元電気泳動法でその発現を定量的に解析した。対照の抗体では変化が認められないが、抗A 抗体投与によりその発現が増加する蛋白と発現が低下する蛋白が認められた。これらの蛋白を、ゲルより直接分離して、ペプチド部分配列をプロテオミクス解析により決定した。

その結果、以下に示すような複数の分子が同定された。

発現が増加する分子

1. cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha
2. reticulocalbin 1
3. tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein
4. aldehyde reductase 1
5. lectin, galactose binding, soluble 1
6. S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)
7. heat shock protein 8

発現が低下する分子

1. chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)
2. histidyl-tRNA synthetase, cytoplasmic
3. tublin alpha chain
4. eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
5. methionine adenosyltransferase II, alpha
6. aldehyde reductase 1
7. ubiquitin-conjugating enzyme E2N

これら同定された分子の抗A 抗体投与における生理学的な意義については現在検討中である。

(4) 抗A 抗体を経時的に投与した PCtrlk 培養細胞から lipid raft を超遠心により精製し、lipid raft 内の A 代謝や糖脂質組成に及ぼす影響を検討している。これまでのところ、種々の抗A 抗体のうち、lipid raft の糖脂質組成に変化を及ぼすものは見いだされてはいない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4件)

武藤多津郎、三原貴照、朝倉邦彦他. アルツハイマー病と糖脂質異常. 生体の科学 60(3), 印刷中 (査読無)

Ueda A, Asakura K, Mihara T, Hara H, Ueda M, Miyashita T and Mutoh T.: Acute Autonomic, Sensory and Motor Neuropathy: Successful Treatment with IVIg. Internal Medicine 48, 843-846, 2009 (査読有)

Asakura K, Murayama H, Himeda T, Ohara Y.: Expression of L* protein of Theiler's murine encephalomyelitis virus in the chronic phase of infection. Journal of General Virology. 88, 2268-2274, 2007 (査読有)

朝倉邦彦 アルツハイマー病におけるB細胞応答と A 蛋白受動免疫療法. Neuroimmunology 15, 219-222, 2007 (査読無)

[学会発表](計 6件)

上田真努香、島さゆり、吉川由佳、竹内誉子、朝倉邦彦、武藤多津郎. 髄膜炎症状で発症し咽後膿瘍から脊髄硬膜外膿瘍へ進展した一例. 第13回日本神経感染症学会総会. 2008.10.10. 東京

植田晃広、朝倉邦彦、三原貴照、武藤多津郎他. ステロイド離脱が困難であった肥厚性硬膜炎の3症例. 第26回日本神経治療学会総会. 2008.6.26. 横浜
朝倉邦彦、竹内誉子、三原貴照、武藤多津郎. 多発脳神経麻痺をきたした悪性リンパ腫の2例. 第119回日本神経学会東海北陸地方会. 2007.10.27. 金沢

大原義朗、朝倉邦彦他. Two-hybrid 法によるタイラーウイルスの持続感染機構の解析. 第 48 回日本神経学会総会. 2007.5.17. 名古屋

朝倉邦彦、植田晃広、古閑寛、武藤多津郎. 筋強直性ジストロフィー 2 型の 1 家系. 第 48 回日本神経学会総会. 2007.5.16. 名古屋

朝倉邦彦 アルツハイマー病における B 細胞応答と A 蛋白受動免疫療法. 第 19 回日本神経免疫学会学術集会. 2007.4. 金沢

〔図書〕(計 1 件)

Hara H, Mihara T, Asakura K, Ueda M, Ueda A, Senda M, and Mutoh T.: Nova Science Publisher. New research on auto-antibodies in **Autoantibody**. 2008. pp173-183

6 . 研究組織

(1)研究代表者

朝倉 邦彦 (ASAKURA KUNIHICO)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号：50333159

(2)研究分担者

武藤 多津郎 (MUTOU TATSURO)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：60190857

三原 貴照 (MIHARA TAKATERU)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号：20449458

(3)連携研究者

該当なし