

アルツハイマー認知症の免疫療法に関する抗体工学研究  
(Antibody Engineering on Immunotherapy for Alzheimer's Disease)

2008年3月

鹿児島大学 理工学研究科  
博士後期課程 物質生産工学専攻

吉原 智樹

# 目次

## 要旨

### 第1章 コンフォメーション変化と疾患

1-1	コンフォメーション病	3
1-2	アルツハイマー疾患	3
1-3	アルツハイマー疾患治療の現状	4
1-4	アルツハイマー疾患における免疫療法	5
1-5	A $\beta$ ペプチドの構造変化	7
1-6	研究戦略	7
1-7	抗体医薬とモノクローナル抗体	9
1-8	ファージディスプレイライブラリー	10

### 第2章 アミロイドベータペプチドのコンフォーマー

2-1	A $\beta_{42}$ の産生機構	12
2-2	A $\beta_{42}$ コンフォーマーの種類	12
2-3	オリゴマーA $\beta_{42}$ の構造	14
2-4	線維状 A $\beta_{42}$ の構造	15
2-5	目的	16
2-6	材料と方法	16
2-7	実験結果	17

### 第3章 コンフォーマー特異的ヒト抗体の作製

3-1 小序論	20
3-2 目的	20
3-3 材料と方法	21
3-4 実験結果	23

### 第4章 抗体を用いた構造変化阻害活性の評価

4-1 小序論	35
4-2 目的	35
4-3 材料と方法	36
4-4 実験結果	37

### 第5章 総括

## 第1章 コンフォメーション変化と疾患

### 1-1 コンフォメーション病

コンフォメーション病とは、もともと生体内に存在しているたんぱく質が従来の構造とは違った形に構造変化(特に $\beta$ シート構造)することによって、引き起こされる疾患の総称である。現在までに報告されている疾患には、プリオン病、ハンチントン病、アルツハイマー病などがある。

### 1-2 アルツハイマー疾患

痴呆性老人の増加は、先進国が共通に抱える社会問題である(1)。高齢者における痴呆症の主な原因の1つにアルツハイマー病(Alzheimer's Disease : AD)があるが、最近、アルツハイマー病の比率の増加が指摘されている。アルツハイマー病の病態の全容と真の発症原因は依然として不明であり、根本的な予防や治療法もいまだ確立されていない。アルツハイマー疾患の病理所見として、脳の委縮やシナプスの崩壊に加えて、細胞外に観察される老人斑の形成や細胞内に観察される神経原線維変化という異常な構造物が見られる。

早発性家族性アルツハイマー疾患(FAD)の解析によりアミロイドベータペプチド( $A\beta$ )の産生と凝集が、ADの発症に深く関わっている可能性があるということがわかってきた(2)。この $A\beta$ とは、1回膜貫通型のタンパク質であるベータアミロイド前駆体タンパク(Amyloid beta Protein Precursor : APP)が $\beta$ セクレターゼと $\gamma$ セクレターゼにより切断されることにより $A\beta_{40}$ (アミノ酸1番から40番までのペプチド断片)、 $A\beta_{42}$ (アミノ酸1番から42番までのペプチド断片)が産生されるということがわかっており、 $A\beta_{42}$ が病気の発症に関与していることが知られている(図 1-1) (5-7)。

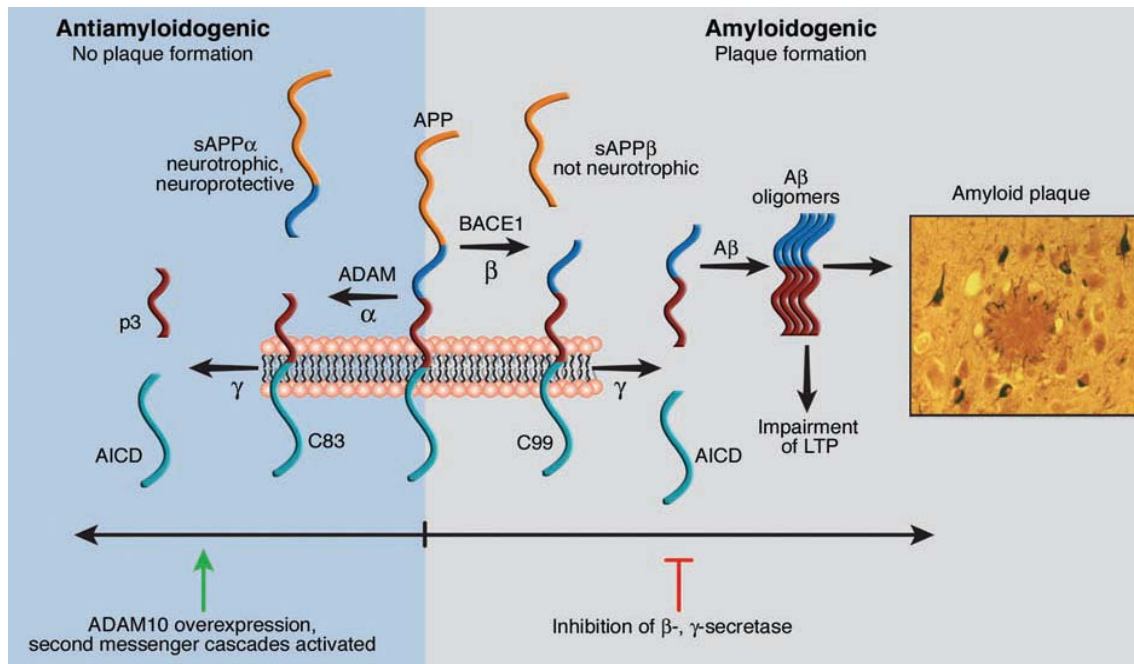


図 1-1 Aβ<sub>42</sub>の産生機構

### 1-3 アルツハイマー治療の現状

現在世界中で最も優れた薬効を示している薬剤はアリセプト(塩酸ドネペジル)であり、その作用機序はアセチルコリンエステラーゼ阻害剤である(図 1-2)。しかしながら、アリセプトは記憶障害の進行を緩和するだけで本質的な治療効果はない。従って、AD 発症の主要因であるAβ<sub>42</sub>の産生を抑制または、産生されたAβ<sub>42</sub>の分解を促進するような治療薬の開発が必要とされている。

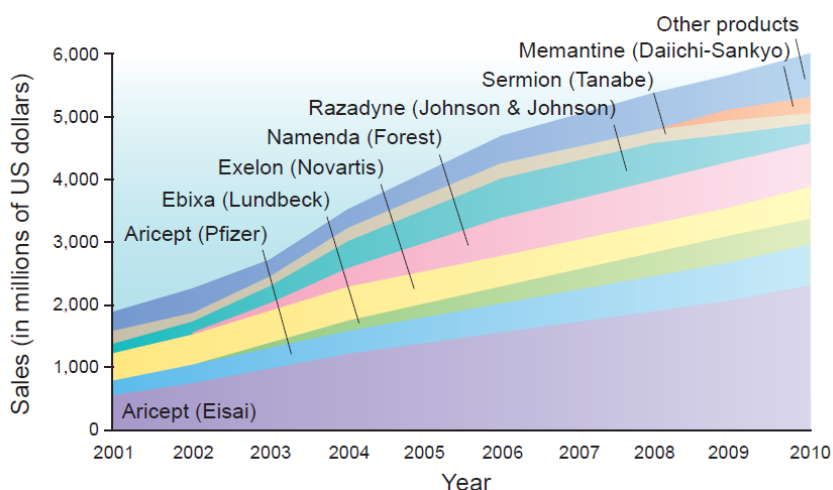


図 1-2 アルツハイマー治療薬

#### 1-4 アルツハイマー疾患における免疫療法

アルツハイマー疾患のモデルマウスである Tg2576 に  $A\beta_{42}$  を免疫することで脳内に沈着するアミロイドプラークを減少できることが報告された(図 1-3)。この結果から、ヒトにおいてもモデルマウスと同様に  $A\beta_{42}$  を免疫することで脳内でのアミロイドプラークの沈着を抑制し、アルツハイマー疾患の症状を改善することが期待され臨床試験が行われた。モデルマウスでの実験同様、ヒトにおいても  $A\beta_{42}$  の免疫により脳内でのプラークの沈着は阻害されたが、一部の患者さん(5%程度)において髄膜炎が生じたためにこれららの臨床試験は中止された(図 1-4)。その後の詳細な解析により、髄膜炎は活性化された T 細胞によるものであることが示された。また、脳内のアミロイドプラークの沈着を阻害したのは B 細胞が産生する抗体によるものであることも示された。

従って、 $A\beta_{42}$  に対する抗体の投与がアルツハイマー疾患においてアミロイドプラークの沈着を阻害し、治療効果をもたらすことが期待されモデルマウスにおいてその検証が行われた。モデルマウスを用いた実験により確かに、 $A\beta_{42}$  に対する抗体の投与により脳内のアミロイドプラークの沈着が阻害されていた(図 1-5)。これらの結果から抗体を用いた受動免疫の可能性が示唆されるようになってきた。

a-c: コントロール抗体投与群、 d-f: 抗 A $\beta_{42}$  抗体投与群

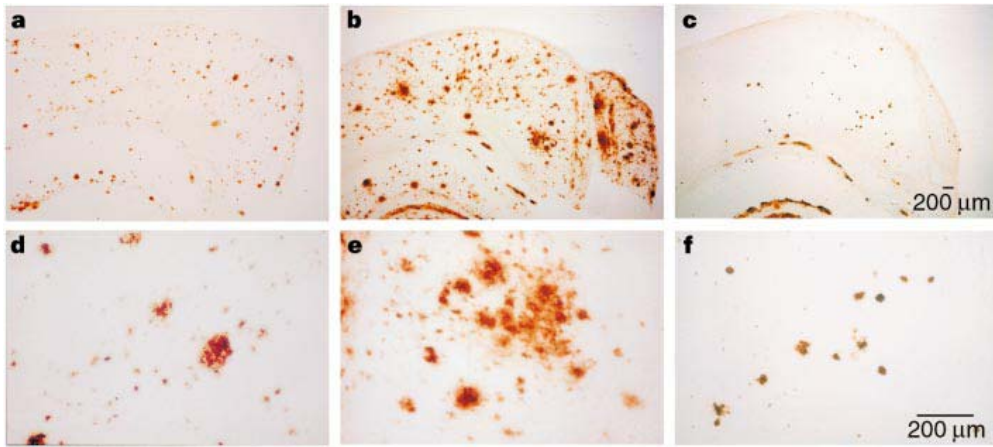


図 1-3 モデルマウス Tg2576 における能動免疫後の脳切片図

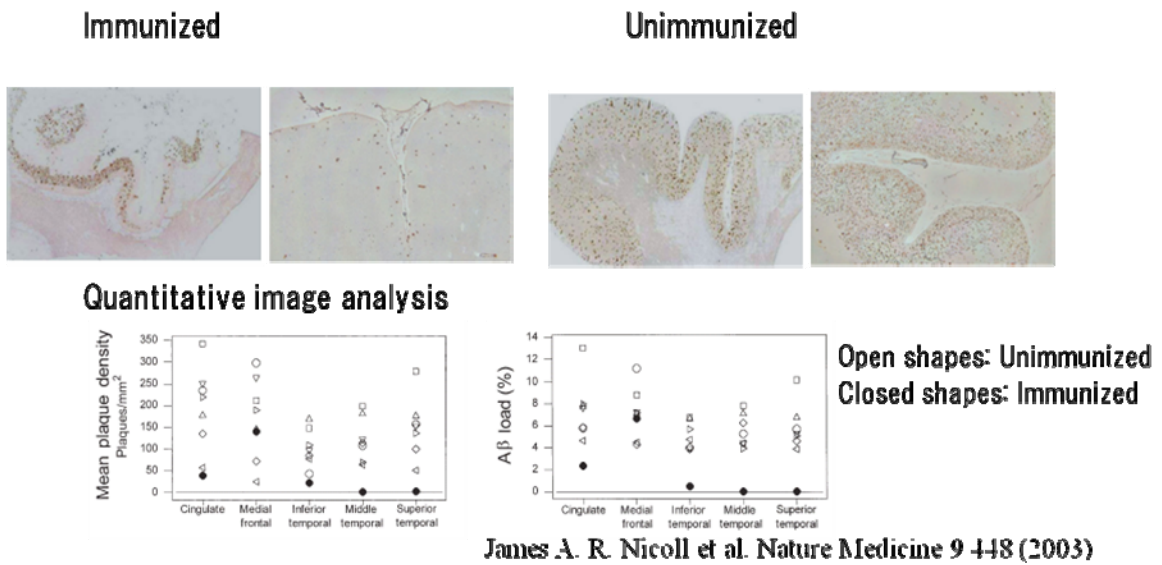
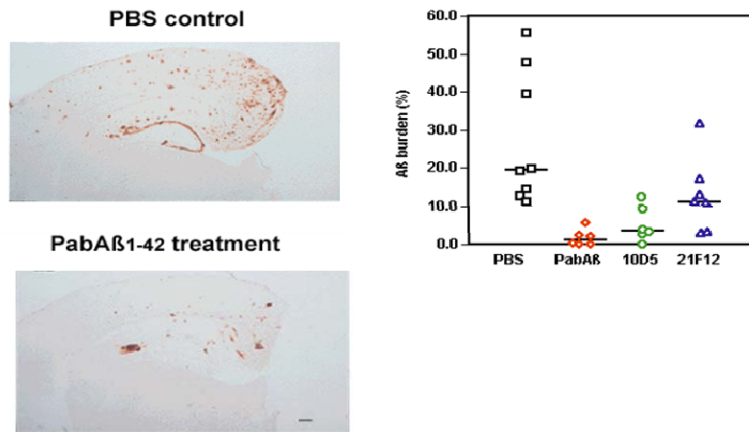


図 1-4 ヒトにおける能動免疫後のアミロイドプラークの沈着



FRÉDÉRIQUE BARD et al. Nature Medicine 6 916 (1999)

図 1-5 モデルマウスにおける受動免疫後のアミロイドプラークの沈着

### 1-5 Aβの構造変化

AD は、Aβ<sub>42</sub> がモノマーAβからオリゴマー形成を経て線維化することにより発症すると考えられている(図 1-6)。最近の研究では、このコンフォメーション変化の途中であるオリゴマーが強い神経毒性を持つことが報告されている(8-10)。Aβオリゴマーは、非常にヘテロジニアスなコンフォーマーの集合体となっており、どのコンフォーマーにおいても AD の発症との関係が言われている。これらのコンフォーマーの構造変化は非常にダイナミックであり、その構造は一時的である。

### 1-6 研究戦略

種々のコンフォーマーは *in vitro* で作製することができるが、モノクロナール抗体作製における従来のハイブリドーマ法では、抗原のコンフォーマーを生体内で維持することができない。その点、ファージディスプレイライブラリーは抗原のコンフォメーションを確認後、その構造を維持したまま直接反応させて抗体を単離することができる(図 1-7)。このように、抗体ファージライブラリーを用いることで、単にヒト抗体を単離するだけでなく、多種多様なコンフォーマーの混合状態の中から、特定のコンフォーマーと特異的に結合できる



抗体を作製することができる。コンフォメーション病の解析において、形の違いを見分ける抗体を作成する事は、構造と生物学的活性を解析する上で強力なツールとなる。

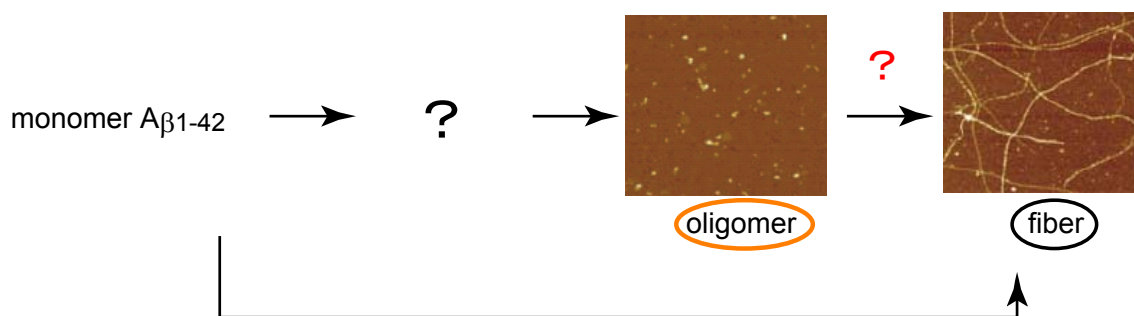


図 1-6 アミロイドベータの構造変化

経時変化する様々な構造体を、in vitro で安定に作製し構造を決定後、抗体ファージディスプレイライブラリを反応させることで構造特異的抗体を作製する。

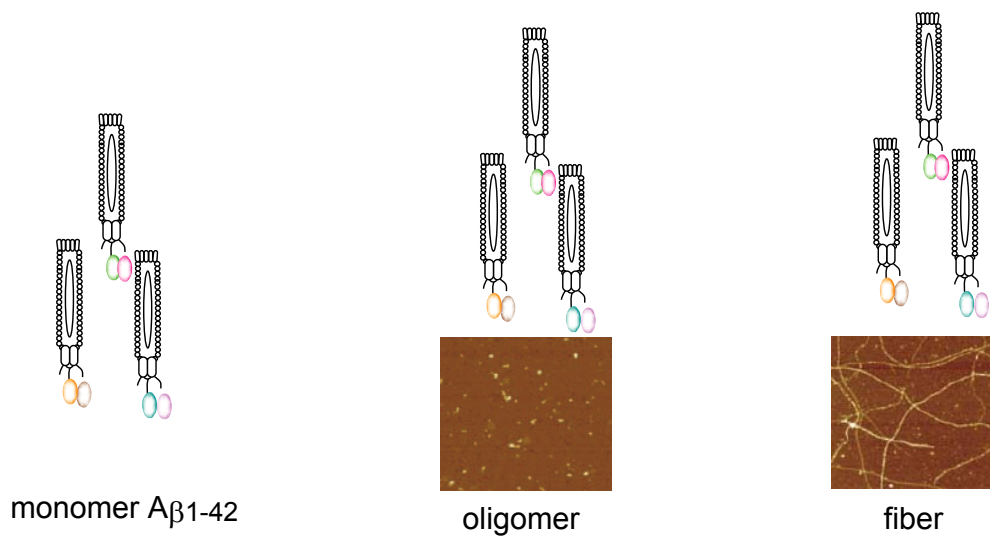
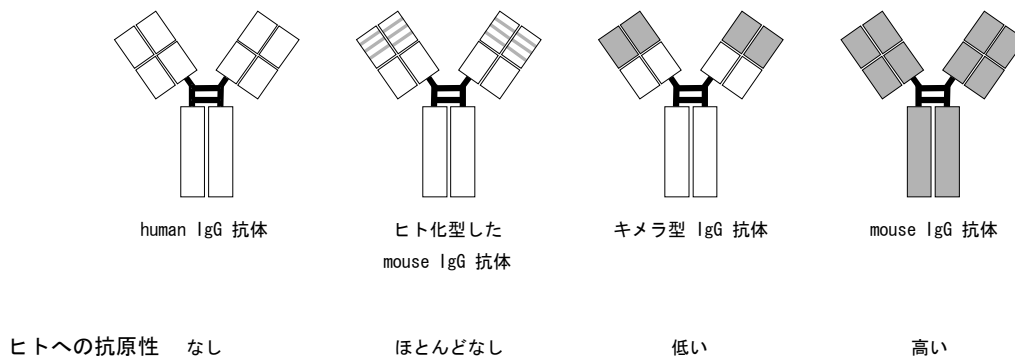


図 1-7 研究戦略

## 1-7 抗体医薬とモノクローナル抗体

1980年代に Koller と Milstein によってハイブリドーマ技術を用いたモノクローナル抗体の作製法が確立され、抗体医薬としての期待が集まった。しかしながらマウス抗体を医薬として投与した場合、ヒトの体内では異物として認識され、引き続いて起こる免疫応答によりその効果が急速に減弱してしまうため、それほどの効果をもたらさなかった。この問題を解決するために抗体のキメラ化、さらに抗原性を減少させたヒト化 (humanization) という試みが行われており、現在このヒト化抗体が臨床試験で試されている(図 1-8)。しかし抗体の humanize というプロセスは高度な技術と煩雑な操作を必要とするため実用的ではない。また、ヒトへの抗原性を解決する決定的な手法として現在、完全なヒト抗体の作製が希求されており、これを実現する技術として、ヒト抗体遺伝子をマウスに移植したトランスクロモマウスとヒト抗体ファージライブラリが確立された。このような完全ヒト抗体の医薬開発は急速に普及しており、今後ますます増えてくるものと予想される。



コンフォメーション特異的ヒト抗体は、発症メカニズムを解明するツールにとどまらず、診断、治療へと応用可能である。

抗原のコンフォメーションを変化させずに抗体を作製する技術はファージディスプレイ法だけである。

図 1-8 抗体医薬とモノクローナル抗体

## 1-8 ファージディスプレイライブラリー

酵素の活性部位,あるいはタンパク質やDNAの結合部位などのような生物学的活性分子に強く結合する分子構造を同定することは,基礎研究の領域ではもちろん,臨床医学に対しても大いに意義のあることと考えられる。これらの分子は酵素の阻害としても使用されうる可能性を秘めている。このような生理活性や結合活性をもったペプチドリガンドは,従来,既知の分子構造を参考にした修飾や天然の化学物質をスクリーニングすることによって得られてきた。しかし,スクリーニングを行なうのに十分な分子群をどのようにして準備するかが大きな問題であった。

1985年にG. Smithらによって開発,報告されたファージディスプレイライブラリーは,ファージと大腸菌の力を借りて,数千万種類にも及ぶペプチドの集合体を得ること,さらに必要に応じてそれらのペプチドを増幅することを可能とした(9)。これらのペプチドはファージのキャプシドタンパク分子であるg3pのN末端に発現されており,他の生物学的活性分子と結合可能であることから,上記のような結合分子構造の同定にはおきな威力を発揮する(図 1-9)。モノクロナール抗体の抗原決定基同定への応用が最初に報告されたが,現在は多彩な応用が行なわれつつある。また,抗体の結合部位は2つのポリペプチド鎖のVHとVLドメインから形成されているが,このVHとVLを短いリンカーで直列につないだ一本鎖Fv (single-chain Fv: scFv)でも抗体の結合活性を再現できることが1991年にG. Winterらによって示された(10)。本研究ではfdと同じ仲間の一本鎖DNAの線維状ファージのg3pにヒト抗体由来のscFvを提示させたファージディスプレイライブラリーを構築した(図 1-10)。

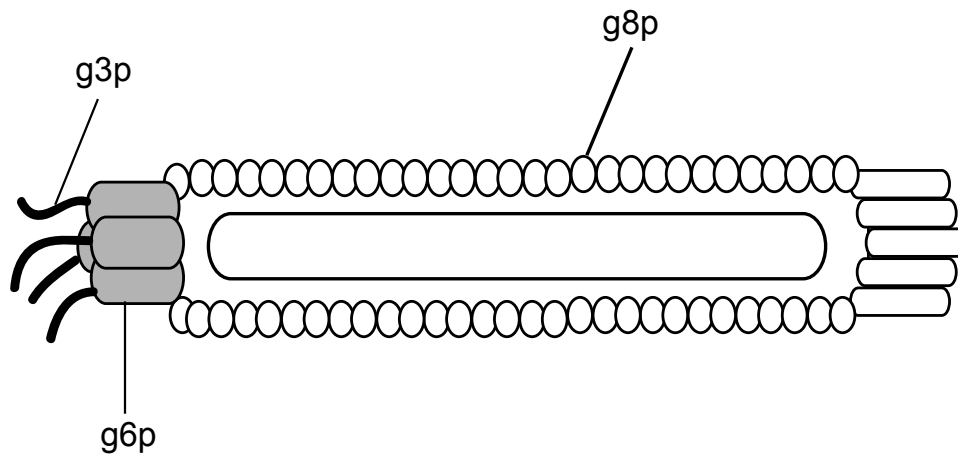


図 1-9 M13 ファージの構造

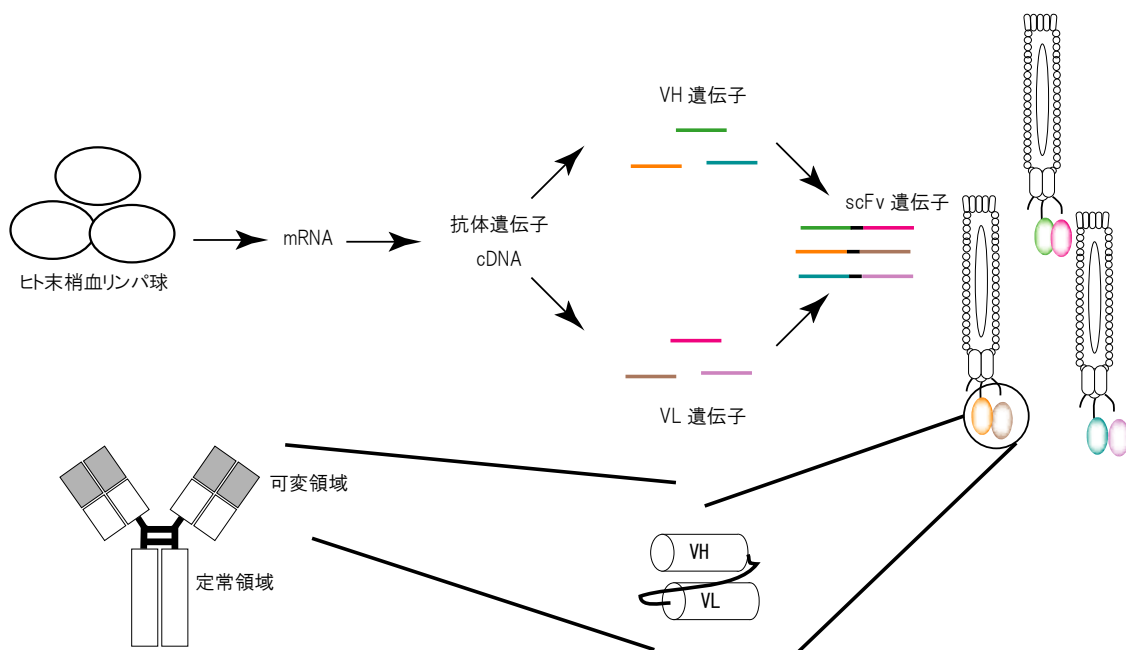


図 1-10 ヒト一本鎖抗体(scFv)ファージディスプレイライブラリー

## 第2章 アミロイドベータのコンフォーマー

### 2-1 $A\beta_{42}$ の産生機構

$A\beta$ は、1984年 GlennerとWongによって脳血管壁沈着物から発見されアミノ酸配列が決定された。 $A\beta$ は一回膜貫通タンパク質であるAPPから産生される。このAPPは主なアイソフォームとして695、751、770アミノ酸からなるAPP<sup>695</sup>、APP<sup>751</sup>、APP<sup>770</sup>が知られており、APP発現はほとんどの臓器に認められ、ニューロンはAPP<sup>695</sup>を特異的に発現している。APPは細胞膜近傍において $\beta$ -セクレターゼと $\gamma$ -セクレターゼにより切断されエクドメイン(secretory APP;sAPP)を分泌する(図1-1)(11-13)。それぞれの切断によるC末端断片はともに $\gamma$ -secretaseの基質になり、膜内部において切断をうけて細胞内ドメイン(APP intracellular domain;AICD)を遊離するとともにそれぞれp3、 $A\beta$ となって膜から遊離し分泌される。大半の場合はp3となって代謝されるが、ごく一部のみが $\gamma$ -セクレターゼの代謝による $A\beta$ 生成にあずかると考えられている。 $A\beta$ には、38、40、42、43アミノ酸からなる $A\beta$ の分子種( $A\beta_{38}$ 、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、 $A\beta_{43}$ )が知られている。これらはC末端の不均一性、すなわち $\gamma$ -セクレターゼによる切断点の差によって生じ、正常状態では $A\beta_{40}$ が約90%を、 $A\beta_{42}$ が約10%を占めている。このうち $A\beta_{42}$ は、ADの病態と深く関わっており、ADを発症した脳に早期から沈着することや凝集能が高くアミロイド線維を形成しやすいこと神経細胞に強い毒性を示すことが知られている。 $A\beta_{40}$ に比べて $A\beta_{42}$ は凝集しやすく、またトランスジェニックマウスを用いた研究から、 $A\beta_{42}$ が疾患に重要であって、 $A\beta_{40}$ は重要ではないということが示された(14,15)。

### 2-2 $A\beta_{1-42}$ のコンフォーマーの種類

現在までに報告されているコンフォーマーとして、低分子量のADDLs(3~4分子)(16)、condition medium  $A\beta$ : CM- $A\beta$ (2~3分子)(17)、高分子量のglobulomer(12分子)(18)や $A\beta_{56^*}$ (12分子)(19)、ファイバー状 $A\beta$ (20)などが知られている。これ

らのコンフォーマーのうち ADDLs, condition medium A $\beta$ , globulomer, A $\beta$  56\*はオリゴマーとして分類され、同じオリゴマーでも構造等が異なる(表 2-1)。また、これらのコンフォーマーは全てモノマーA $\beta$ が会合することにより形成されるがファイバー形成においてオリゴマーを経て形成されるのか、また直接ファイバー化するのは良くわかっていない。

Name	Origin	Size	Biological activity	Antibody	AD patient	Reference
Protofibril	Synthetic A $\beta$ 40	6-10 nm in diameter, 5-160 nm in length	induce neuronal cell death at 16 $\mu$ M	BAN-2401	-	J. Biol. Chem. (1999) 274, 25945
ADDLs	Synthetic A $\beta$ 42	Globules 4.8~5.7 nm 17-42 kDa	Induce neuronal death, block LTP	Rabbit pAbs recognize the trimer, tetramer	Detected	PNAS (1998) 95, 6448
CM-Abeta	V717F APP-transfected CHO cells	8-9 kDa	Block hippocampal LTP in vivo	-	-	Nature (2002) 416, 535
Amylospheroid	Synthetic A $\beta$ 40	Spherical structure 3-20 nm	Induce neuronal cell death	-	-	PNAS (2003) 100, 6370
Soluble amyloid oligomer	Synthetic A $\beta$ 40 or A $\beta$ 42	~40 kDa, octamer	Induce SH-SY5Y cell death	Rabbit pAbs (A11)	Detected	Science (2003) 300, 486
Globulomer	Synthetic A $\beta$ 42	Globular, 60 kDa	Blocks LTP in vitro	Rabbit pAbs (5598) mouse mAb (8F5)	Detected	J. Neurochem. (2005) 95, 834
A $\beta$ *56	Extract from brains of tg2576 mice	56 kDa	Impairs spatial memory	-	-	Nature (2006) 440, 352

表 2-1 A $\beta$ オリゴマーの種類

### 2-3 オリゴマーの構造

オリゴマーの構造は AFM や電子顕微鏡、電気泳動などにより解析されている。基本的にオリゴマーは AFM により観察すると粒状の構造として観察される(図 2-1)(16)。より簡単な解析法として電気泳動が用いられるが、これらのオリゴマーは SDS 存在下でもモノマーへと分解せずいくつかのバンドが確認される(図 2-1) (16-19)。ADDLs は合成ペプチドから作製され、モノマー、トリマー、テトラマーが主要な構成分子であり(16)、CM-A $\beta$  は APP を形質転換した CHO 細胞の培養上清から調整され、モノマー、ダイマー、トリマーが主要な構成成分である(17)。一方、globulomer は合成ペプチドから作製され、SDS-PAGE により 38/48 kDa 付近にバンドが観察され、ゲル濾過カラムを用いた場合分子量約 60kDa と推定される(18)。また、A $\beta$  56\*は APPトランスジェニックマウスの脳内から抽出されたもので 12 mer 構造体が確認できる(図 2-1) (19)。

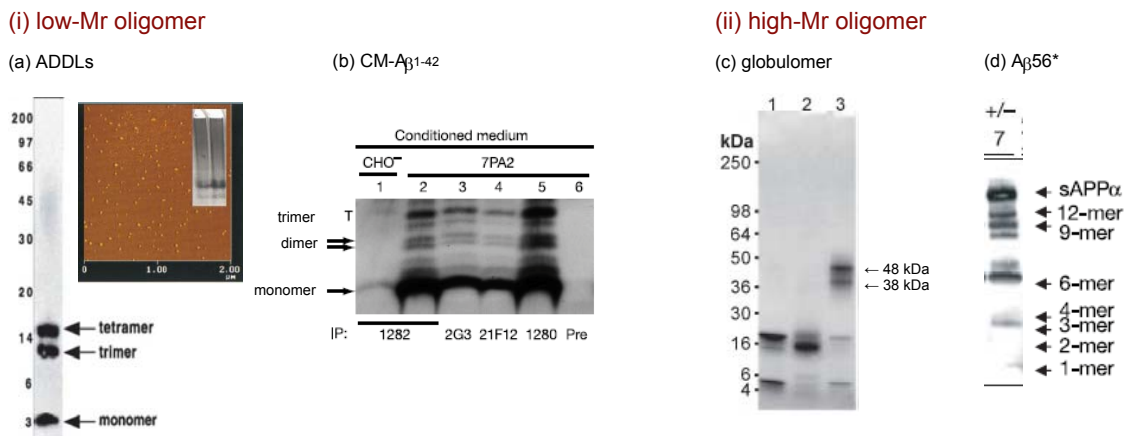


図 2-1 A $\beta$ オリゴマーの構造

## 2-4 ファイバーの構造

アミロイドファイバーの構造はチオフラビン T (ThT)、電子顕微鏡、NMR などによって解析されている。アミロイドファイバーは ThT を用いることで容易に検出することができる。また、電子顕微鏡を用いた観察では幅十数 nm 長さ数百 nm～数 $\mu\text{m}$  のサイズで観察される(図 2-2)(20)。NMR を用いた解析により、 $A\beta$  は  $\beta$  シートを分子内に2つ持ち( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ )これらの  $\beta$  シートがそれぞれとなりの  $\beta 2$ ,  $\beta 1$  と相互作用することによって非常に安定な構造をとっていることが報告された(図 2-3) (21)。

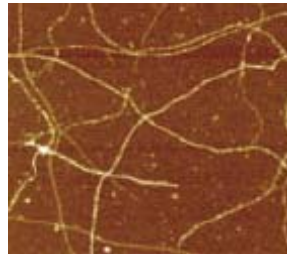
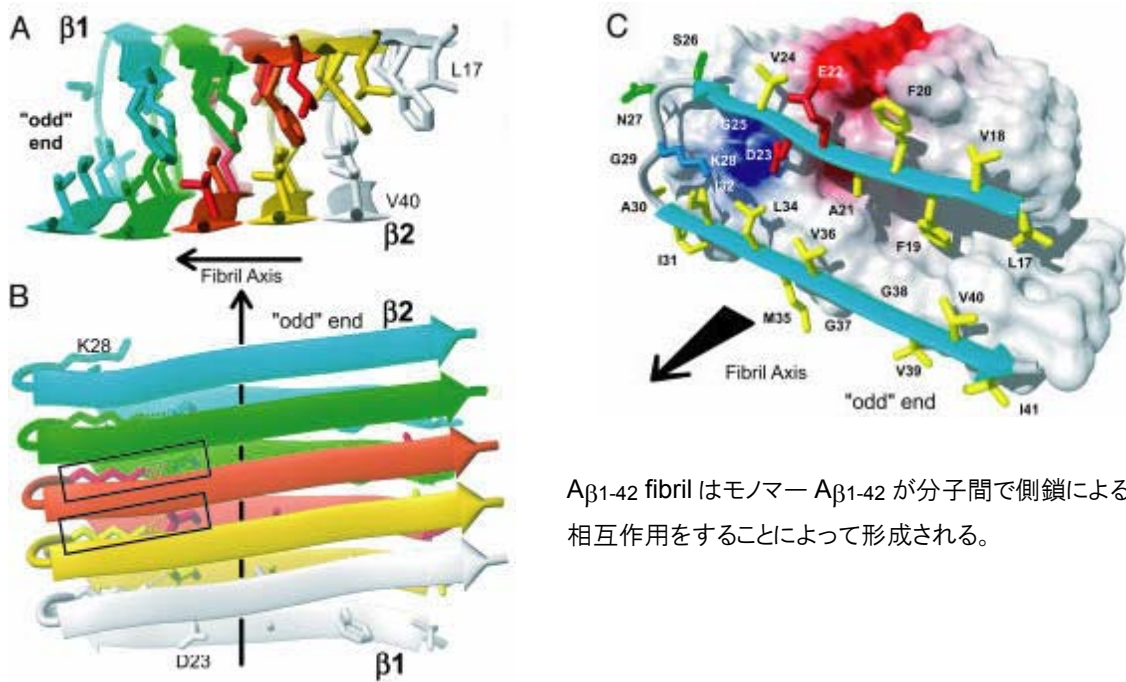


図 2-2  $A\beta$ ファイバーの AFM 像



$A\beta_{1-42}$  fibril はモノマー  $A\beta_{1-42}$  が分子間で側鎖による相互作用をすることによって形成される。

図 2-3 NMR 解析により得られた  $A\beta$ ファイバーの構造



## 2-5 目的

本研究では、安定したコンフォーマーの作製とその構造解析が重要なステップであると考えられる。そこで、現在報告されているオリゴマー (globulomer)、ファイバーを作製しそれらの構造が報告されているものと同様であるかを検討する。

## 2-6 材料と方法

### 2-6-1 アミロイドペプチド

ペプチド研究所より購入した  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  を用いた。

### 2-6-1 アミロイドペプチドの処理

ペプチド研究所より購入した  $A\beta_{40}$  (Human) と  $A\beta_{42}$  (Human) を HFIP (Hexafluoroisopropanol) で 1 mg/ml になるように溶解後、減圧遠心により HFIP を揮発させ、フィルム状にした。この状態で  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し使用する際に目的の濃度に PBS で希釈して用いた。

### 2-6-2 globulomer $A\beta_{42}$ の作製

フィルム状の  $A\beta_{42}$  20  $\mu\text{g}$  を DMSO 1  $\mu\text{l}$  で溶解し、室温で 5 分静置する。良くサスペンドした後超音波処理を 20 秒間する。9  $\mu\text{l}$  の PBS を加え、さらに SDS を最終濃度 0.2% になるように加える。37 $^{\circ}\text{C}$  で 6 時間静置後さらに 33  $\mu\text{l}$  の ddw を加え 37 $^{\circ}\text{C}$  で 18 時間静置する。

### 2-6-3 線維状 $A\beta_{42}$ の作製

フィルム状の  $A\beta_{42}$  20  $\mu\text{g}$  を DMSO 5  $\mu\text{l}$  で溶解し、室温で 5 分静置する。良くサスペンドした後超音波処理を 20 秒間する。39  $\mu\text{l}$  のリン酸緩衝液を加え 37 $^{\circ}\text{C}$  で 1 週間静置する。

#### 2-6-4 ウェスタンブロッティング

1  $\mu\text{g}$  の線維状  $\text{A}\beta_{42}$ 、オリゴマー $\text{A}\beta_{42}$  4  $\mu\text{l}$  に 4  $\mu\text{l}$  の 2 x SDS sample buffer を加え 12.5%の Tris·Glycine gel にアプライした。泳動後メタノール処理した PVDF メンブレンとゲルを重ね 80 mA, 5V 2h でタンパク質を転写した。転写後、5%スキムミルクを用いてブロッキングを行い、1 次抗体として抗アミロイドベータ抗体 BAM-10 (1000 倍希釈)、2 次抗体として HRP 標識されたヤギ抗マウス IgG 抗体(1000 倍希釈)をそれぞれ 1 時間反応させた。検出は ECL、るみのイメージアナライザー(Fuji film)を用いて行った。

#### 2-6-5 チオフラビン T アッセイ

40  $\mu\text{M}$  の濃度で線維化させた  $\text{A}\beta_{42}$  5  $\mu\text{l}$  を PBS, 100  $\mu\text{M}$  チオフラビン T を用いて終濃度が 2  $\mu\text{M}$  になるように希釈した(チオフラビン T の終濃度は 10  $\mu\text{M}$ )。希釈後室温で 1 分間置き、Wallac 1420 ARVOsx (Wellesley, MA)を用いて蛍光強度を測定した。

### 2-7 実験結果

#### 2-7-1 globulomer $\text{A}\beta_{42}$ の作製

globulomer の形成は SDS-PAGE によって評価した。Globulomer は 38/48 kDa 付近に 2 本の特徴的なバンドが観察されるが、今回作製した globulomer にも同様のバンドが確認された(図 2-4)。Globulomer のより native な構造を知るために変性状態で電気泳動する SDS-PAGE ではなく Blue-Native PAGE を行った。Blue-Native PAGE は変性材である SDS を用いずタンパク質を分子量ごとに分けることができる。その結果、作製した globulomer は 38/48 kDa 付近にバンドが確認されたのでこれらのバンドは SDS によって生じた分解物等ではなく溶液中に存在する native な構造であることが示された。

### 2-7-1 fibrillar A $\beta$ <sub>42</sub> の作製

A $\beta$ <sub>42</sub> のファイバー化を ThT アッセイで観察したところ、経時変化に伴う蛍光の増強が確認された。また、同様の経時変化を SDS-PAGE を用いて観察したところ、はじめ低分子量のところにあったバンドが時間の経過と共に高分子量の方へシフトしているのが観察された。また、24 時間目のファイバーの電子顕微鏡観察により線維状の構造をとっていることが確認された(図 2-5)。

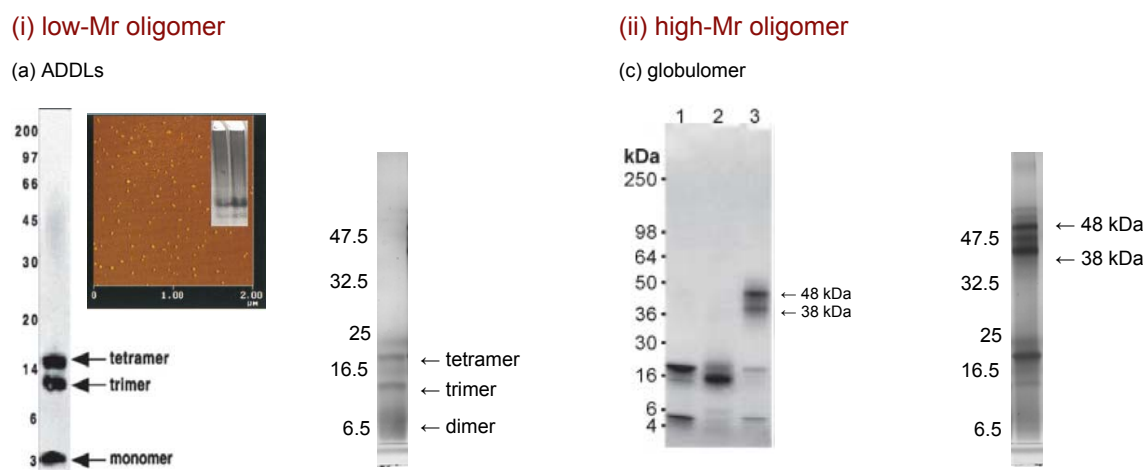
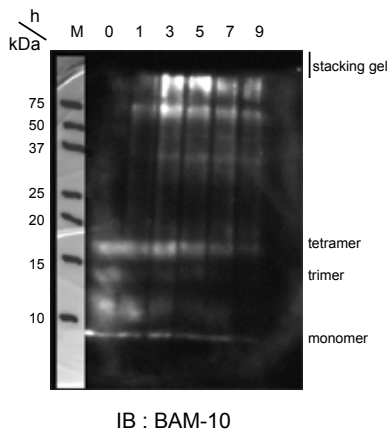


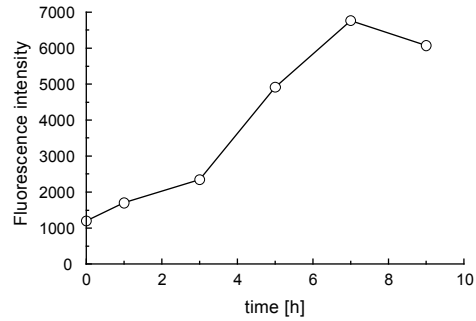
図 2-4 作製した A $\beta$ オリゴマーの構造

HFIP 処理した 20  $\mu$ g の A $\beta$ <sub>42</sub> を終濃度 5 mM になるように DMSO を加え、20 秒超音波処理を行った。さらに 2.2% SDS を 1/10 量加え、PBS を用いて 400  $\mu$ M になるように希釈した。37°C で 6 時間培養後、ddw を用いて 100  $\mu$ M になるように希釈後 37°C で 18 時間培養した。得られたサンプルを SDS-PAGE、BN-PAGE により解析した。

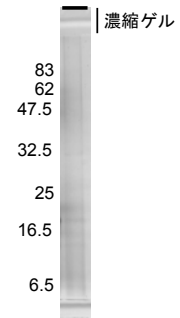
(a) Immunoblotting



(b) Thioflavin T assay



(c) SDS-PAGE



(d) Electron microscopy

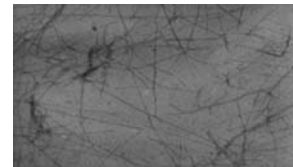


図 2-5 作製した Aβファイバーの構造解析

HFIP 処理した 20  $\mu\text{g}$  の A $\beta_{42}$  を DMSO で 10 mg/ml になるように溶解後、PBS を加え終濃度 1 mg/ml にし、37°C で 48 時間培養した。線維化の様子を (a) ウェスタンブロッティング、(b) チオフラビン T アッセイ、(c) SDS-PAGE、(d) 電子顕微鏡を用いて観察した。

## 第3章 コンフォーマー特異的ヒト抗体の作製

### 3-1 小序論

現在までに  $A\beta_{42}$  に特異的に結合する抗体は、マウスのハイブリドーマを用いた研究により数多くなされてきた。しかしながら、マウスに  $A\beta_{42}$  を免疫して抗体を作製する方法では、抗原の高次構造をうまく生体内で保持し、構造特異的抗体を作製する事は困難である。

抗体ライブラリを用いた抗体の作製は、マウスのハイブリドーマ法とは異なり、*in vitro* であらかじめ構造を確認した  $A\beta_{42}$  を抗原として直接抗体を作製できる。この方法を用いれば、抗原の構造情報をきちんと決めさえすれば、構造を認識する抗体を得ることが比較的容易になると考えられる。

$A\beta_{42}$  の構造変化が原因で引き起こされて生じる AD はコンフォメーション病とも呼ばれ、 $A\beta_{42}$  の構造と病気の発症メカニズムを解明することは重要なことである。したがって、構造特異的抗体の作製は、疾患の治療だけではなく疾患の発症のメカニズムを解析することにおいても非常に有用なツールとなりうる。

### 3-2 目的

診断や治療法開発のため、抗  $A\beta$  抗体がハイブリドーマ法によって作製されている。しかし、その中で立体構造をダイレクトに認識でき、かつ診断に使用可能な抗体はない。本研究では、アミロイドベータの構造変化で発症するアルツハイマー認知症に着目し、アルツハイマー認知症の診断や治療法の開発を目的としてその蛋白質の様々な立体構造(コンフォメーション)をダイレクトに識別できるヒト抗体の作製を試みた。

### 3-3 材料と方法

#### 3-3-1 low-Mr A $\beta$ oligomer

フィルム状の A $\beta$ <sub>42</sub> を 5  $\mu$ l で溶解し、室温で 5 分静置する。良くサスペンドした後超音波処理を 20 秒間する。39  $\mu$ l のリン酸緩衝液を加え用いた。

#### 3-3-2 線維状 A $\beta$ <sub>42</sub> の作製

フィルム状の A $\beta$ <sub>42</sub> 20  $\mu$ g を DMSO 5  $\mu$ l で溶解し、室温で 5 分静置する。良くサスペンドした後超音波処理を 20 秒間する。39  $\mu$ l のリン酸緩衝液を加え 37°C で 1 週間静置する。

#### 3-3-3 バイオパンニング

ペプチド研究所より購入した A $\beta$ <sub>42</sub> より可溶性 A $\beta$ <sub>42</sub>、線維状 A $\beta$ <sub>42</sub> を作製し 0.1M NaHCO<sub>3</sub> (pH8.6) で 1  $\mu$ g/100  $\mu$ l に調整後、96 穴イムノプレートに固定化した。固定化の条件は、いずれも 4°C、4 h で行った。その後、0.5%ゼラチン/PBS で O/N でブロックし、全種類の抗体ファージライブラリ ( $1 \times 10^{12}$  TU) を室温で 1 時間反応させた。結合していないファージなどを 0.1% Tween20/PBS で洗浄して取り除き、結合したファージを 100  $\mu$ l の 0.1M glycine-HCl (pH2.2) で溶出し、10  $\mu$ l の 1M Tris-HCl (pH9.1) で中和した。それを大腸菌 TG-1 に感染させて増幅した。増幅したファージクローンの A $\beta$ <sub>42</sub> への結合強度と特異性を高めるため、2 ラウンド目のパンニングでは 0.25% BSA/PBS でブロックして同様の操作を行った。

#### 3-3-4 可溶性 scFv の発現と精製

可溶性 scFv の発現は、ファージミドベクター pCANTAB5E の性質上の特性を利用し、選別されたクローンを大腸菌 TG1 株(amber mutation)から大腸菌 HB2151 株(no amber mutation)に宿主を換えることで scFv へのフォーマットの変換を行った。その後

大腸菌の培養液に IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) で可溶性 scFv の発現を誘導した。回収した培養液から anti-E tag カラム (RPAS Purification Module ; Pharmacia )を用いて可溶性 scFv を精製した。

### 3-3-5 ELISA

マイクロタイタープレート(Nunc)に種々の抗原(50 ng/ 40  $\mu$ l/wel)をコートし、0.5%ゼラチンでブロックした。PBST で3回洗浄後、パンニングによって得られたファージクローンもしくは scFv を加え室温で1時間反応させた。さらに PBST で3回洗浄後、ファージを用いた ELISA ではビオチン化した抗 g8p 抗体(Pharmacia)、アルカリフォスファターゼ(AP)標識されたstreptavidin(Vector Laboratories, Burlingame)と反応させた。scFv の検出では抗 E-tag 抗体(Pharmacia)、AP 標識された抗マウス IgG 抗体(goat anti-mouse IgG-AP, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)と反応させた。最後に基質を加えて 405 nm の吸光度を測定した。競合阻害実験では、5  $\mu$ g/ml の scFv 40  $\mu$ l と 100  $\mu$ g/ml の線維状 A $\beta$ <sub>42</sub>または、可溶性 A $\beta$ <sub>42</sub>とを室温で1時間反応後プレートに固定化した線維状 A $\beta$ <sub>42</sub> と反応させ、結合した抗体をビオチン化した anti-E tag mAb (Pharmacia)、AP 標識streptavidinで検出した。

### 3-3-6 scFv 抗体の遺伝子配列解析

scFv 抗体の DNA 配列は、KEB-107 (5'-CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC-3') と KEB-108 (5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3') のプライマーを用いた Dye Terminator 法を行い解析した。

得られた DNA 配列をもとにアミノ酸配列を決定し、IMGT/V-QUEST データベースにより解析し抗体の超可変領域(CDR)、フレームワーク(FR)を決定した。

### 3-3-7 ウェスタンブロッティング

4  $\mu$ l の 100  $\mu$ g/ml 可溶性、線維状  $A\beta_{42}$  に 4  $\mu$ l の 2xSDS sample buffer を加え 12.5%の Tris·Glycine gel にアプライした。泳動後メタノール処理した PVDF メンブレンとゲルを重ね 80 mA, 5V 2 h でタンパクを転写した。転写後、5%スキムミルクを用いてブロッキングを行い、1 次抗体として scFv (Fv1E1, Fv1E4, Fv2A7, B6, B7, D1 or F10)、2 次抗体として HRP 標識された anti-E tag mAb (Pharmacia) を反応させた。検出は ECL、ルミノイメージアナライザーを用いて行った。

## 3-4 実験結果

### 3-4-1 ファージクローンの単離

scFv ライブラリを用いてパンニングを行った(図 3-1)。Low-Mr  $A\beta_{42}$  oligomer を用いたパンニングを 2 回行い 196 個のファージクローンを単離した。

さらに、線維状  $A\beta_{42}$  を用いたバイオパンニングを行い 196 個のファージクローン中を単離した。

### 3-4-2 ファージクローンの結合特異性

可溶性  $A\beta_{42}$  を用いたバイオパンニングにより単離されたファージクローンを用いて ELISA を行ったところ、単離された 196 クローンのうち 5 クローン(Fv1E1, Fv1E4, Fv1E7, 2A7, Fv2A8, Fv2B6)が  $A\beta_{42}$  に特異的な結合活性を有していた(図 3-2)。一方線維状  $A\beta_{42}$  を用いたバイオパンニングにより単離されたファージクローンでは、196 クローン中 4 クローン(B6, B7, D1, F10)が  $A\beta_{42}$  に特異的な結合活性を有していた(図 3-3)。

### 3-4-3 scFv の結合特異性

得られた scFv 抗体を用いて結合特異性を ELISA により評価したところ、全ての抗体が  $A\beta_{42}$  に特異的に結合した。パンニングに可溶性  $A\beta_{42}$  を用いて得られたクローンは可



溶性  $A\beta_{42}$ , 線維状  $A\beta_{42}$  のどちらにも結合したが、線維状  $A\beta_{42}$  から得られたクローンは線維状  $A\beta_{42}$  とより強く結合した。さらにこれらの scFv は  $A\beta_{40}$  には結合しないことがわかった(図 3-4)。線維状  $A\beta_{42}$  特異的抗体の中で scFv B6 はより特異的に線維状  $A\beta_{42}$  を認識しており、このクローンについてより詳細な結合活性等を評価した(図 3-5)。

#### 3-4-5 scFv B6 の $A\beta_{42}$ コンフォーマーに対する結合特異性

scFv B6 の  $A\beta_{42}$  コンフォーマー(soluble, globulomer, fibrillar)に対する特異性を検討するために ELISA を行った。Globulomer  $A\beta_{42}$  は soluble  $A\beta_{42}$  との混合物として得られるためにまず BN-PAGE を用いた分各を行い、38/48 kDa に相当するバンドを切り出しマイクロタイタープレート中で破碎することによりタンパク質の抽出を行った。ELISA 法にて scFv B6 の結合特異性を評価したところこの抗体は soluble  $A\beta_{42}$  にはほとんど反応性を示さなかった。しかしながら、globulomer  $A\beta_{42}$  に対しては fibrillar  $A\beta_{42}$  ほどではないが若干の反応性を示した。(図 3-6)

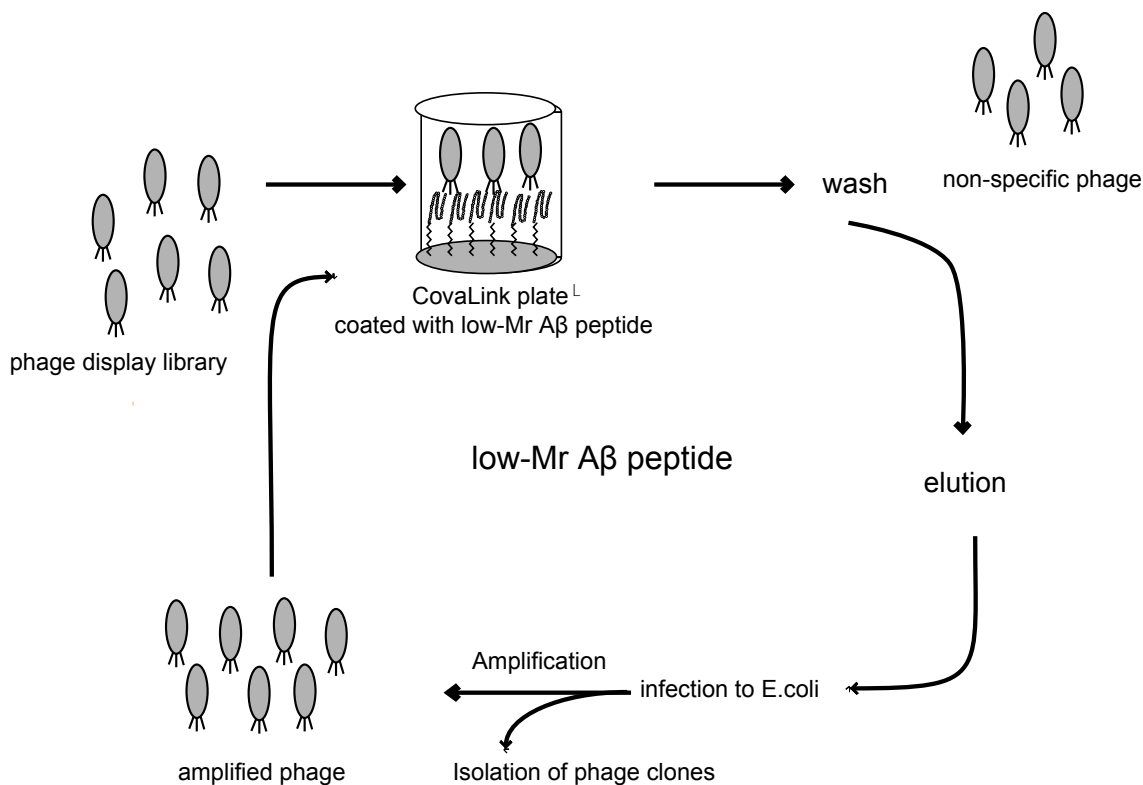


図 3-1 Aβ<sub>42</sub> を用いたバイオパンニング

ペプチド研究所より購入した Aβ<sub>42</sub> より可溶性 Aβ<sub>42</sub>、線維状 Aβ<sub>42</sub> を作製し 0.1M NaHCO<sub>3</sub>(pH8.6)で 1 μg/100 μl に調整後、96 穴イムプレートに 4°C で 4 時間静置し固定化した。固定化後 0.5%ゼラチン/PBS で 16 時間ブロックし、全種類の抗体ファージライブラリ (γ-λ, γ-κ, μ-λ or μ-κ : 1×10<sup>12</sup> TU)を室温で 1 時間反応させた。結合していないファージを 0.1%Tween20/PBS で 10 回洗浄して取り除き、結合したファージを 100 μl の 0.1M glycine-HCl (pH2.2)で溶出し、10 μl の 1M Tris-HCl ( pH9.1 )でただちに中和した。それを大腸菌 TG-1 に感染させて増幅した。増幅したファージクローンの Aβ<sub>42</sub> への結合強度と特異性を高めるため、2 ラウンド目のパンニングでは 0.25% BSA/PBS でブロックして同様の操作を行った。

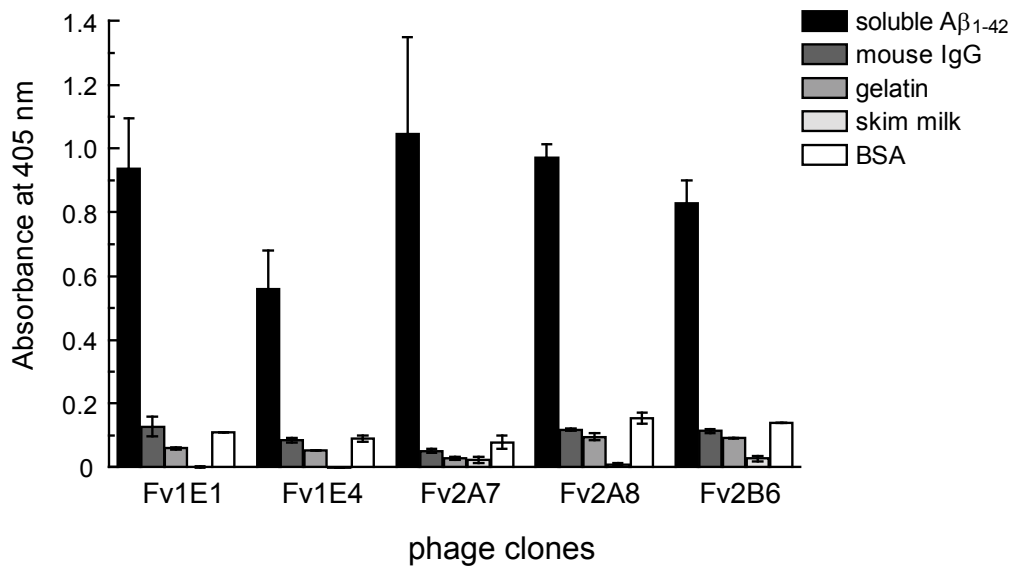


図 3-2 可溶性 Aβ<sub>42</sub> を用いたパンニングで得られたファージクローンの結合活性

マイクロタイタープレート(Nunc)に soluble Aβ<sub>42</sub>、マウスイムノグロブリン、ゼラチン、スキムミルク、ウシ血清アルブミン(50 ng/ 40 μl/wel)を室温で 6 時間コートし、0.5%ゼラチンで 4°C 16 時間ブロッキングを行った。PBST で3回洗浄後、 $1.0 \times 10^{12}$  virions/ml のファージクローンを 40 μl 加え室温で1時間反応させた。さらに PBST で3回洗浄後ビオチン化した抗 g8p 抗体(Pharmacia)を反応させた。結合したファージクローンはアルカリフォスファターゼ標識されたストレプトアビジン、p-ニトロフェニルフォスフェイトを加えて 405 nm の吸光度を測定した。

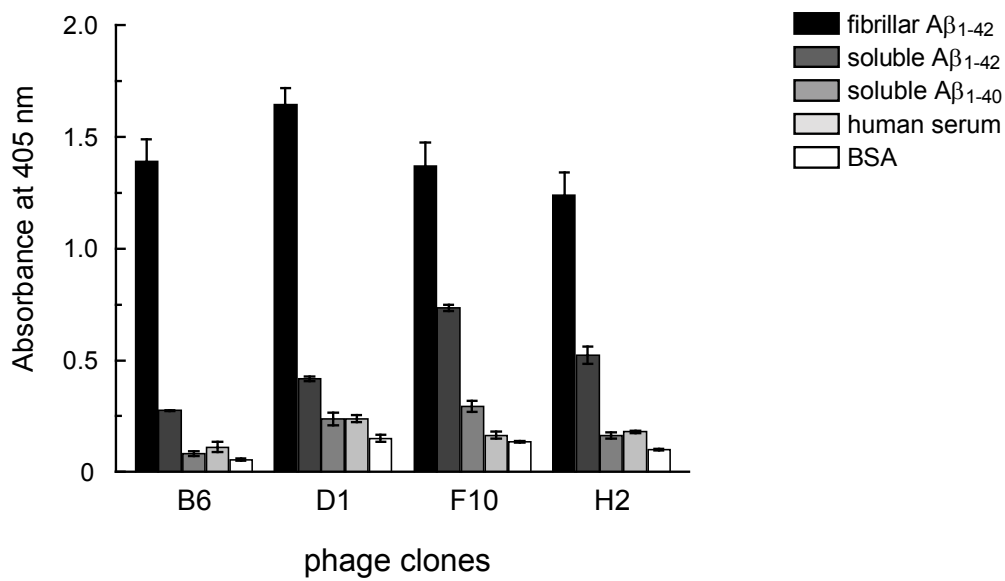


図 3-3 線維状 Aβ<sub>42</sub> を用いたパンニングで得られたファージクローンの結合活性

マイクロタイタープレート(Nunc)に fibrillar Aβ<sub>42</sub>、soluble Aβ<sub>42</sub>、soluble Aβ<sub>40</sub> ヒト血清 (50 ng/ 40 μl/wel) を室温で 6 時間コートし、0.5%ゼラチンで 4°C 16 時間ブロッキングを行った。PBST で3回洗浄後、1.0 x 10<sup>12</sup> virions/ml のファージクローンを 40 μl 加え室温で 1 時間反応させた。さらに PBST で3回洗浄後抗 g8p 抗体(Pharmacia)を反応させた。結合したファージクローンはアルカリフォスファターゼ標識されたヤギ抗マウス IgG ポリクロナール抗体、p-ニトロフェニルフォスフェイトを加えて 405 nm の吸光度を測定した。

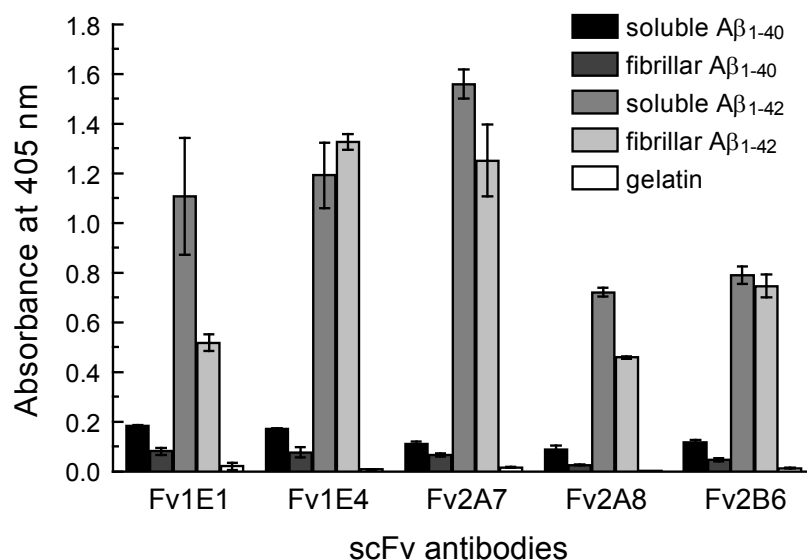


図 3-4 可溶性 Aβ<sub>42</sub> を用いたパンニングで得られた scFv の結合活性

マイクロタイタープレート(Nunc)に soluble Aβ<sub>40</sub>、fibrillar Aβ<sub>40</sub>、soluble Aβ<sub>42</sub>、fibrillar Aβ<sub>42</sub> (50 ng/ 40 μl/wel)を室温で6時間コートし、0.5%ゼラチンで4℃ 16時間ブロッキングを行った。PBSTで3回洗浄後、5.0 μg/mlのscFvを40 μl加え室温で1時間反応させた。さらにPBSTで3回洗浄後ビオチン化した抗 E-tag 抗体(Pharmacia)を反応させた。結合したファージクローンはアルカリフォスファターゼ標識されたストレプトアビジン、p-ニトロフェニルフォスフェイトを加えて405 nmの吸光度を測定した。

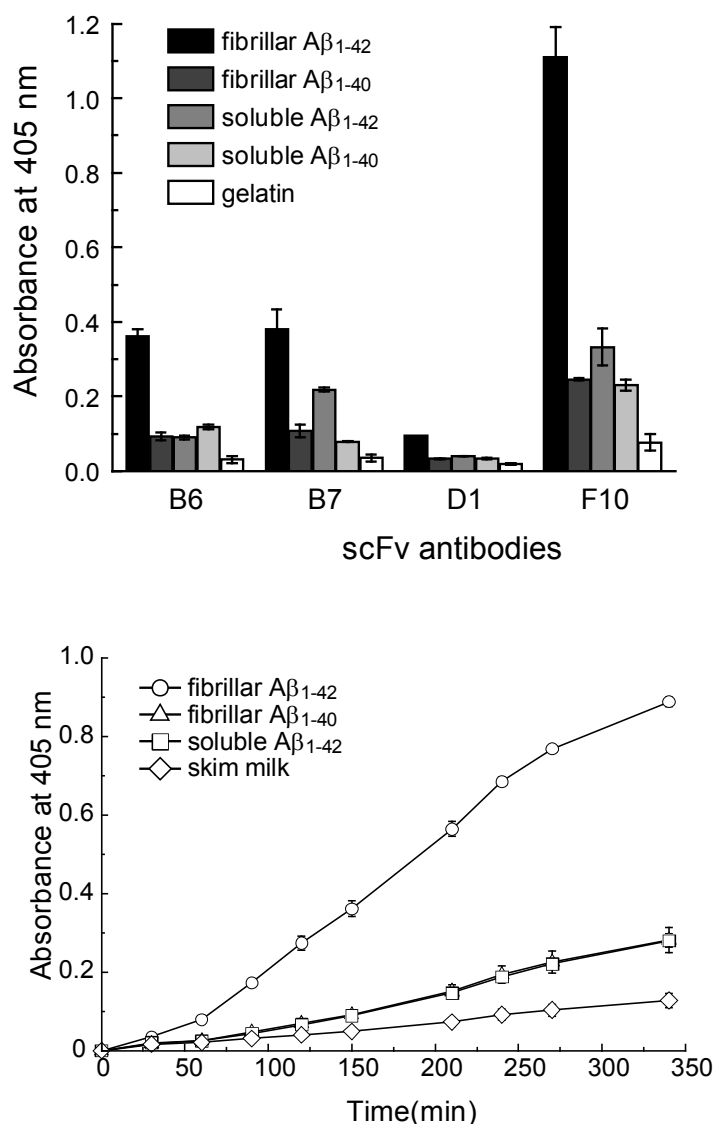


図 3-5 線維状 Aβ<sub>42</sub> を用いたパンニングで得られた scFv の結合活性

マイクロタイタープレート(Nunc)に soluble Aβ<sub>40</sub>、fibrillar Aβ<sub>40</sub>、soluble Aβ<sub>42</sub>、fibrillar Aβ<sub>42</sub> (50 ng/ 40 μl/wel)を室温で 6 時間コートし、0.5%ゼラチンで 4℃ 16 時間ブロッキングを行った。PBST で3回洗浄後、5.0 μg/ml の scFv を 40 μl 加え室温で1時間反応させた。さらに PBST で3回洗浄後ビオチン化した抗 E-tag 抗体(Pharmacia)を反応させた。結合したファージクローンはアルカリフォスファターゼ標識されたストレプトアビジン、p-ニトロフェニルフォスフェイトを加えて 405 nm の吸光度を測定した。

### 3-4-3 溶液中での scFv の結合特異性の解析

可溶性  $A\beta_{42}$  で得られた抗体 Fv1E4、線維状  $A\beta_{42}$  で得られた抗体 B6 についてプレートに固定化した分子だけでなく、溶液中の  $A\beta_{42}$  に対しても結合活性を有するかを競合阻害実験により評価した。Fv1E4 は可溶性  $A\beta_{42}$ 、線維状  $A\beta_{42}$  と前培養することで固定化した線維状  $A\beta_{42}$  との結合がほぼ阻害された。一方、B6 は線維状  $A\beta_{42}$  と前培養することにより固定化した線維状  $A\beta_{42}$  との結合は阻害されたが、可溶性  $A\beta_{42}$  と前培養しても固定化した線維状  $A\beta_{42}$  との結合活性は阻害されなかった。これらの結果は、Fv1E4, B6 が溶液中でも  $A\beta_{42}$  との結合活性を持っていることを示している。さらに、B6 の特異性は溶液中の  $A\beta_{42}$  に対しても可溶性より線維状  $A\beta_{42}$  に特異的に結合しているということを示した(図 3-7)。

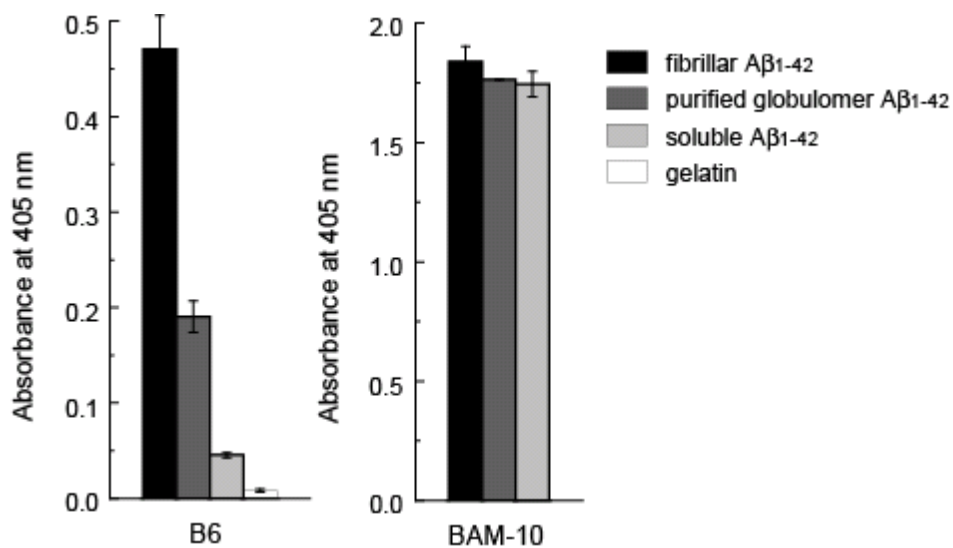


図 3-6 種々の Aβ<sub>42</sub> コンフォーマーに対する scFv の結合活性

マイクロタイタープレート(Nunc)に soluble Aβ<sub>42</sub>、purified globulomer Aβ<sub>42</sub>、fibrillar Aβ<sub>42</sub> (50 ng/ 40 μl/wel)を 4℃で 14 時間コートし、0.5%ゼラチンで室温で 2 時間ブロッキングを行った。PBST で3回洗浄後、5.0 μg/ml の scFv を 40 μl 加え室温で1時間反応させた。さらに PBST で3回洗浄後ビオチン化した抗 E-tag 抗体(Pharmacia)を反応させた。結合したファージクローンはアルカリフォスファターゼ標識されたストレプトアビジン、p-ニトロフェニルフォスフェイトを加えて 405 nm の吸光度を測定した。



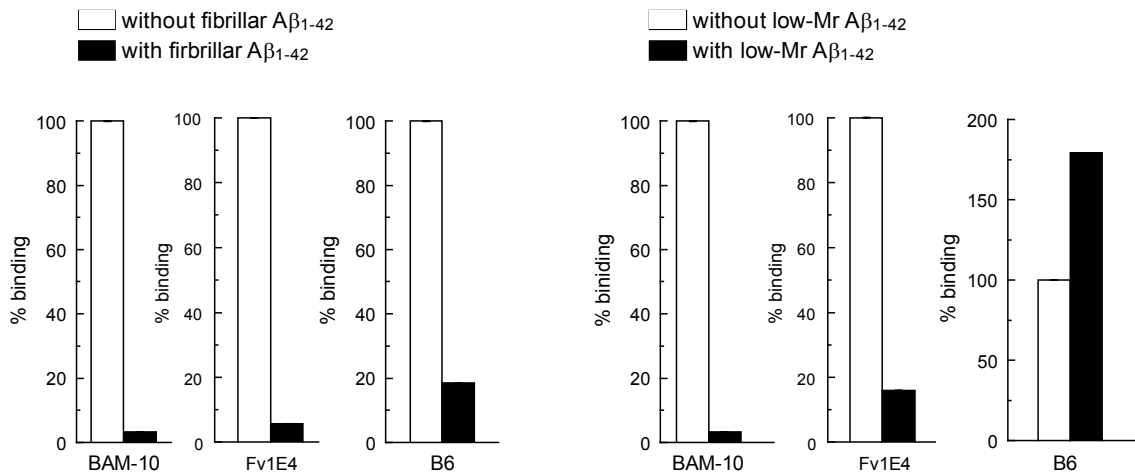


図 3-7 scFv B6 の液層での結合特異性

1.25 μg/ml の可溶性、線維状 Aβ<sub>42</sub>、Aβ<sub>40</sub> 40 μl を ELISA plate に加え、4°C で 6 時間コートした。その後 0.5%ゼラチンを用いて 4°C で 16 時間ブロッキングを行った。5 μg/ml の scFv 40 μl と 100 μg/ml の線維状 Aβ<sub>42</sub> または、可溶性 Aβ<sub>42</sub> とを室温で 1 時間反応後プレートに固定化した線維状 Aβ<sub>42</sub> と反応させ、結合した抗体をビオチン化した anti-E tag mAb (Pharmacia)、AP 標識ストレプトアビジンで検出した。

### 3-4-4 得られた抗体の遺伝子配列解析

得られた scFv クローンの plasmid を回収後、Big Dye Terminator v.3.1 を用いて遺伝子配列を解析した。解析後、DNAPLOT により抗体の CDR, FR を決定した。解析の結果得られた scFv はすべて配列が異なっていることがわかった。また、線維状 Aβ<sub>42</sub> を用いて得られた抗体は軽鎖の配列が同じジャームライン由来であることがわかった(表 3-1)。これらの結果は、線維状 Aβ<sub>42</sub> 特異的抗体の特異性が軽鎖によって決められていることが示唆される。

(a) Amino acid sequence of the Vh domains

clone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Fv1E1 (IgG)	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVVKVCKASGGTFS	<b>S--YAIIS</b>	WVRQAPGGQLEWVG	<b>RIIP--IFGIANYAQKFGQ</b>	RVITITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	<b>GTTAS-----PLDY</b>	WGQGTLLTVSS
Fv1E4 (IgG)	EVQLVDSGTEVKKPKGESLKIICKGSEYRFS	<b>S--YWIA</b>	WVRQMPGKGLDWMG	<b>LIYP--GDSITRYSPFQ</b>	QVTISADKSIATYLVQWSSLKASDTAMYYCAR	<b>HQLRGIARSP-FDI</b>	WGQGTMTVTVSS
Fv2A7 (IgM)	QVQLVQSGGLVQPGKSLRLSCTASGFTFG	<b>D--YAMS</b>	WVRQAPGGKLEWVG	<b>FIRSKAYGGTEYAASVKG</b>	RFTISRDDSKSIATYLVQWSSLKASDTAMYYCTR	<b>VRSGSY---YAREPY</b>	WGQGTLLTVTVSS
Fv2A8 (IgM)	QVQLVQSGAEVKKPKGASVVKVCKASGFTFS	<b>S--YMH</b>	WVRQAPGGQLEWVG	<b>LIIN--SGGSTSYAQKFGQ</b>	RVITITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	<b>FRYMNW--GDAPDI</b>	WGQGTMTVTVSS
Fv2B6 (IgM)	EVQLVDSGGLVQPGKSLRLSCTASGFTFS	<b>D--YGMH</b>	WVRQAPGGKLEWVF	<b>LTSH--DGSNTKYADSVKG</b>	RFTISRDNKNTVYLQWSSLRADDVAVYYCAN	<b>GFCGSNC---YFHH</b>	WGRGTTVTVSS
B6 (IgM)	QVQLVQSGGVVQPGKSLRLSCTASGFTFS	<b>R--YAMS</b>	WVRQAPGGKLEWVS	<b>AMSG--SGDTFYADSVKG</b>	RFTISRDNKNTVYLQWSSLRADDVAVYYCAN	<b>DGRFNRNS--DGFDF</b>	WGQGTLLTVSS
B7 (IgM)	QVQLVQSGGLVQPGKSLRLSCTASGFTFS	<b>N--YAVS</b>	WVRQAPGGKLEWVA	<b>GVNG--GGNTFYADSVKG</b>	RFTISRDNKNTVYLQWSSLRADDVAVYYCAK	<b>DGRFNRNP--DGFDF</b>	WGQGTLLTVSS
D1 (IgM)	QVQLVQSGGLVQPGKSLRLSCTASGFTFR	<b>K--YVMA</b>	WVRQAPGGKLEWLS	<b>TIYN--SGDIIDYADSVKG</b>	RFTISRDNKNTVYLQWSSLRADDVAVYYCAR	<b>EYFES-----FDV</b>	WGRGTLTVTVSS
F10 (IgM)	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVVKVCKASGFTFS	<b>S--YAIIS</b>	WVRQAPGGQLEWVG	<b>RIIP--IFGIANYAQKFGQ</b>	RVITITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	<b>AKRFARARGLDADI</b>	WGQGTMTVTVSS

(b) Amino acid sequence of the VI domains

clone	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Fv1E1	LPVLTQPPASAGTPGQRTVISC	<b>SGSSSNIQTN-IVY</b>	WYQQLPGTAPKLLIY	<b>RN-----NQRPS</b>	GVPDRFSGSKSG--TSDSLAISGLRSEDEADYYC	<b>AVWD-ASLRGWL</b>	FGGGTQLTVL
Fv1E4	QSALTQPPASAGTPGQRTVISC	<b>TGTSQDVGRNIVYS</b>	WYQHHPGKAPKLMIIY	<b>DV-----SKRPS</b>	GVSNRFSGSKSG--NTASLTISGLQAEDADYYC	<b>SSYT-SSST-WV</b>	FGGQTKLTVL
Fv2A7	QAVLTQPPASAGTPGQRTVISC	<b>SGSSSNIQGN-IVY</b>	WYRQLGAPRLLIY	<b>SY-----NQRPS</b>	GVPDRFSGSKSG--TASLAIISGLRSEDEADYYC	<b>AAMD-DLISGVY</b>	FGGQTKLTVL
Fv2A8	QVVTQEPFAVSVLALGQVTRITC	<b>QG-DL-LRSY-YAS</b>	WYQQKPGQAPVLIY	<b>GR-----NKRPS</b>	RIPARFASASSR--NTASLTIHGARAEDADYYC	<b>ESRDISGNELIV</b>	FGGQTKLTVL
Fv2B6	QVVTQEPFSLVTSVPGGTVLITC	<b>GSSTGAVTSGHYPY</b>	WYQQKPGQAPRLLIY	<b>DT-----SNKHS</b>	WTPARFSGSLLG--GKAALTLGSAQPEDEADYYC	<b>-LLSYSGVR--V</b>	FGGQTKLTVL
B6	SSELTQDFAVSVLALGQVTRITC	<b>QG-DL-LRSY-YAS</b>	WYQQKPGQAPVLIY	<b>GK-----DNRPS</b>	GIPDRFSGSSSG--NAASLTITGAQAEDADYYC	<b>NSRDTSGNHL-V</b>	FGGQTKLTVL
B7	SSELTQDFAVSVLALGQVTRITC	<b>QG-DL-LRNN-FPT</b>	WYQQKPGQAPVLIY	<b>GK-----DNRPS</b>	GIPDRFSGSRSG--TTASLTIHGARAEDADYYC	<b>NSRDTSGNHL-V</b>	FGGQTKLTVL
D1	SSELTQDFAVSVLALGQVTRITC	<b>QG-DL-LRSY-YAS</b>	WYQQKPGQAPVLIY	<b>GK-----NKRPS</b>	GIPDRFSGSRSG--NTASLTIHGARAEDADYYC	<b>NSRDTSGNHL-V</b>	FGGQTKLTVL
F10	SSELTQDFAVSVLALGQVTRITC	<b>QG-DL-LRSY-YAS</b>	WYQQKPGQAPVLIY	<b>GK-----NKRPS</b>	GIPDRFSGSSSG--NTASLTIHGARAEDADYYC	<b>NSRDTSGNHL-V</b>	FGGQTKLTVL

(c) Variable gene usage

Clone#	Heavy chain (h)			Light chain (l)	
	V	D	J	V	J
Fv1E1	IGHV1-69*09	IGHD4-17*01	IGHJ4*02	IGLV1-47*01	IGLJ3*02
Fv1E4	IGHV5-51*01	IGHD6-6*01	IGHJ3*02	IGLV2-14*01	IGLJ3*02
Fv2A7	IGHV1-8*01	IGHD6-6*01	IGHJ4*02	IGKV3-20*01	IGKJ2*01
Fv2A8	IGHV3-49*03	IGHD1-26*01	IGHJ4*02	IGLV1-47*02	IGLJ1*01
Fv2B6	IGHV3-30*03	IGHD2-21*02	IGHJ2*01	IGLV7-46*01	IGLJ3*02
B6	IGHV3-23*04	IGHD6-6*01	IGHJ3*02	IGLV3-19*01	IGLJ3*02
B7	IGHV3-23*04	IGHD6-13*01	IGHJ3*02	IGLV3-19*01	IGLJ3*02
D1	IGHV3-11*01	IGHD2-21*01	IGHJ2*01	IGLV3-19*01	IGLJ3*02
F10	IGHV1-69*09	IGHD6-6*01	IGHJ3*02	IGLV3-19*01	IGLJ3*01

表 3-1 抗体のアミノ酸配列

### 3-4-5 ウェスタンブロッティング法による結合活性の評価

得られた抗体が変性状態の  $A\beta_{42}$  と結合するかを評価した結果、ポジティブコントロールである BAM-10 (1-12 aa を認識する抗体)は可溶性、線維状  $A\beta_{42}$  どちらにも結合するが、得られた抗体はそのどちらとも結合活性を示さなかった(図 3-8)。これは、得られた抗体が  $A\beta_{42}$  の高次構造を認識しており、その構造が変性条件で変わってしまった可能性を示唆しているが、その詳細についてはよくわかっていない。

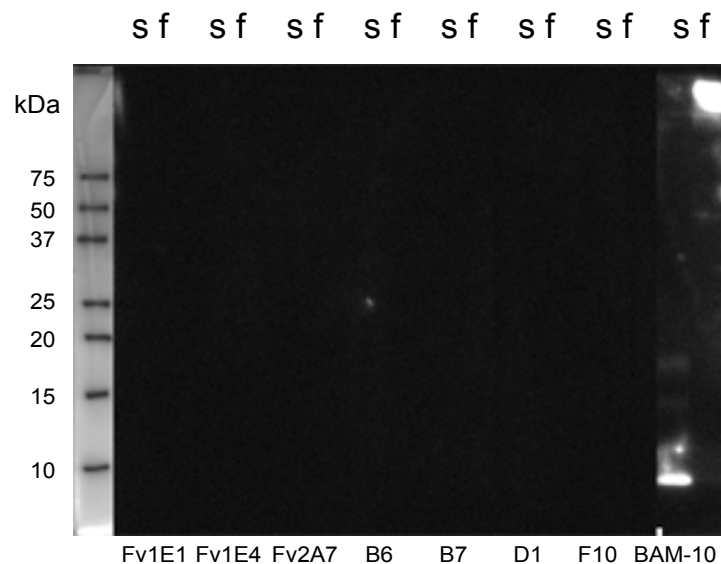


図 3-8 scFv B6 の液層での結合特異性

1  $\mu\text{g}$  の可溶性、線維状  $A\beta_{42}$  を非還元、非加熱で SDS-PAGE を行った後、PVDF メンブレンに転写した。転写したメンブレンをスキムミルクでブロッキング後 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の scFv 溶液を用いてブロッティングを行った。検出は HRP 標識した抗 E-tag 抗体を用いて行った。

## 第4章 抗体を用いた構造変化阻害活性の評価

### 4-1 小序論

A $\beta$ <sub>42</sub> の特定のコンフォーマーを認識する抗体の開発は、診断のみならず治療へも応用が可能である。scFv 抗体は完全ヒト抗体であるので、マウスモノクローナル抗体のようなヒトに対する抗原性がないのでヒトに投与しても諸々の問題が生じない。実際、モデルマウスを用いたアルツハイマー疾患の治療はいくつかなされてきた。ヒトにおいても A $\beta$ <sub>42</sub> ペプチドを抗原として患者に免疫することで、体内で抗体を産生できるようになり、実際症状の改善等も見られたが、活性化 T 細胞による脳内での炎症がみられたために断念された。

しかしながら、抗体のみを投与する受動免疫であれば活性化した T 細胞による炎症反応等は抑えられ、抗体を介した治療効果が認められた。それゆえ、A $\beta$ <sub>42</sub> に特異的に結合し、モノマー A $\beta$ <sub>42</sub> の構造変化を阻害するような抗体は治療薬としても有用である。

そこで第4章では単離した scFv 抗体の線維化阻害活性、オリゴマー化線維化阻害活性の評価を行った。また、線維化阻害活性が見られたクローンについて、ランダムペプチドファージディスプレイライブラリーを用いたエピロープの解析及び、マウスのモノクローナル抗体を用いた競合阻害実験によるエピトープの解析を行い、これらの抗体の線維化阻害メカニズムの解析を行った。

### 4-2 目的

本研究で単離された各コンフォーマーに特異的結合活性を有する scFv 抗体が A $\beta$ <sub>42</sub> ペプチドのファイバー化及び、オリゴマー化にどんな影響を与えるかを検討した。また、線維化阻害活性のメカニズムを解析するためにペプチドファージライブラリー、競合 ELISA を用いてエピトープ解析を行った。

#### 4-3 材料と方法

##### 4-3-1 線維化阻害実験

20 mMリン酸バッファー pH 7.0 を用いて 40  $\mu$ M に希釈した A $\beta$ <sub>42</sub> ペプチドに scFv を様々な濃度(0, 160, 320, 640 or 1200 nM)で加えた。0, 6, 24 時間に 10  $\mu$ l のサンプルを回収し 1  $\mu$ M の ThT/リン酸バッファー90  $\mu$ l を加え Wallac 1420 ARVOSx (Wellesley, MA)を用いて蛍光強度を測定した。

##### 4-3-2 オリゴマー化阻害実験

フィルム状の A $\beta$ <sub>42</sub> 20  $\mu$ g を DMSO 1  $\mu$ l で溶解し、室温で 5 分静置する。良くサスペンドした後超音波処理を 20 秒間する。9  $\mu$ l の PBS を加え、さらに SDS を最終濃度 0.2%になるように加える。37°Cで 6 時間静置後 scFv を加えさらに 37°Cで 18 時間静置する。

##### 4-3-3 ペプチドファージライブラリーを用いたパンニング

scFv B6 を NaHCO<sub>3</sub> で 1  $\mu$ g/100  $\mu$ l に調整後、96 穴イムノプレートに固定化した。固定化の条件は 4°C、4 h で行った。その後、0.5%ゼラチン/PBS で O/N でブロックし、ペプチドファージライブラリー( $1 \times 10^{12}$  TU)を室温で 1 時間反応させた。結合していないファージを 0.1%Tween20/PBS で洗浄して取り除き、結合したファージを 100  $\mu$ l の 0.1M glycine-HCl (pH2.2)で溶出し、10  $\mu$ l の 1M Tris-HCl (pH9.1)で中和した。それを大腸菌 *ER2738*に感染させて増幅した。増幅したファージクローンの scFv B6 への結合強度と特異性を高めるため、トータル 3 ラウンドのパンニングを行った。

##### 4-3-4 ELISA

マイクロタイタープレート(Nunc)に scFv B6 (50 ng/ 40  $\mu$ l/wel)をコートし、0.5%ゼラチンでブロックした。PBST で3回洗浄後、パンニングによって得られたファージクローン(1.0 x

$10^{12}$  virions/ml)を 40  $\mu$ l 加え室温で1時間反応させた。さらに PBST で3回洗浄後、ビオチン化した抗 g8p 抗体(Pharmacia)、アルカリフォスファターゼ(AP)標識されたストレプトアビジン(Vector Laboratories, Burlingame)と反応させた。最後に基質を加えて 405 nm の吸光度を測定した。

#### 4-3-5 ペプチドファージの塩基配列解析

scFv 抗体の DNA 配列は、KEB-107 (5'-CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC-3') と KEB-108 (5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3') のプライマーを用いた Dye Terminator 法を行い解析した。

#### 4-3-6 競合 ELISA によるエピトープ解析

マイクロタイタープレート(Nunc)に scFv B6 (100 ng/40  $\mu$ l/wel)をコートし、0.5%ゼラチンでブロックした。PBST で3回洗浄後、100 ng/40  $\mu$ l の線維状  $A\beta_{42}$  を加え室温で1時間反応させた。さらに PBST で5回洗浄後、N 末特異的抗体(BAM-10)または、C 末特異的抗体(8G7)を室温で1時間反応させた。結合した抗体を検出するために AP 標識された抗マウス IgG 抗体(goat anti-mouse IgG-AP)と室温で1時間反応させ、基質を加えて 405 nm の吸光度を測定した。

### 4-4 実験結果

#### 4-4-1 線維化阻害活性の評価

2種類のバイオパンニングを行い得られた scFv (Fv1E1, Fv1E4, Fv2A7, Fv2A8, Fv2B6, B6, B7, D1 or F10)を用いてこれらの scFv が  $A\beta_{42}$  の線維化に与える影響を評価した。可溶性  $A\beta_{42}$  を抗原として単離された scFv クローンのうち Fv1E4 は弱いながらも  $A\beta_{42}$  の線維化を阻害することが示されたがそれ以外のクローンではほとんど阻害活性は見られなかった(図 4-1)。一方、線維状  $A\beta_{42}$  を抗原として単離された scFv クローン

においてはそのすべてのクローンにおいて $A\beta_{42}$ の線維化阻害活性が観察された(図4-1)。B6抗体は線維状化 $A\beta_{42}$ に対する特異性、阻害活性どちらにおいてもすぐれた結果を示したのでより詳細な解析を行った。まず、B6抗体の線維化阻害活性における濃度依存性を評価した結果、B6抗体は濃度依存的に $A\beta_{42}$ の線維化を阻害することがわかった(図4-2)。

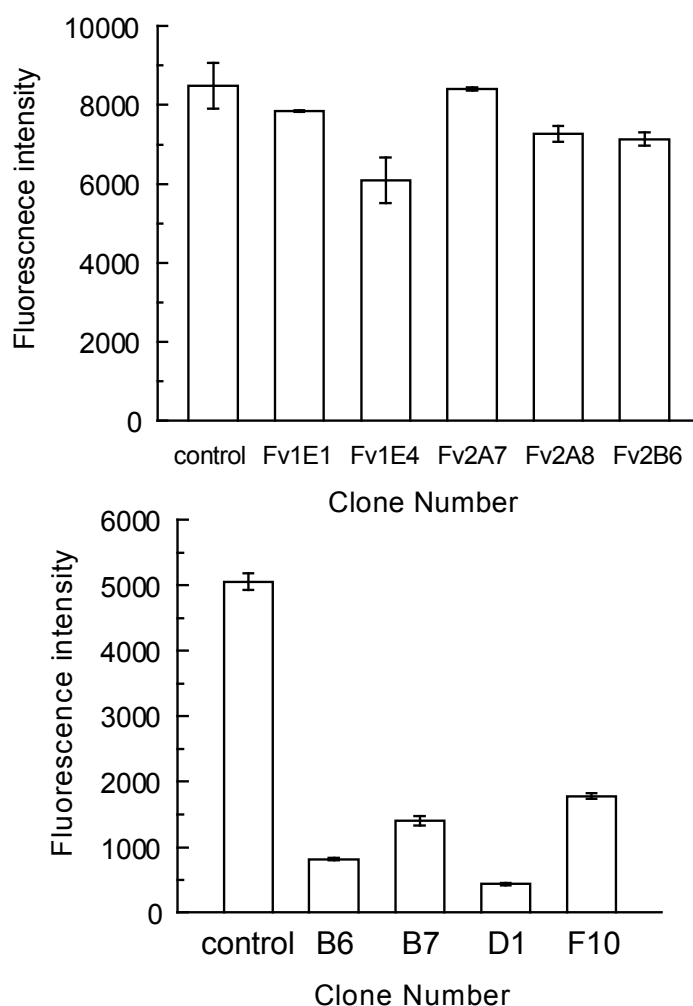
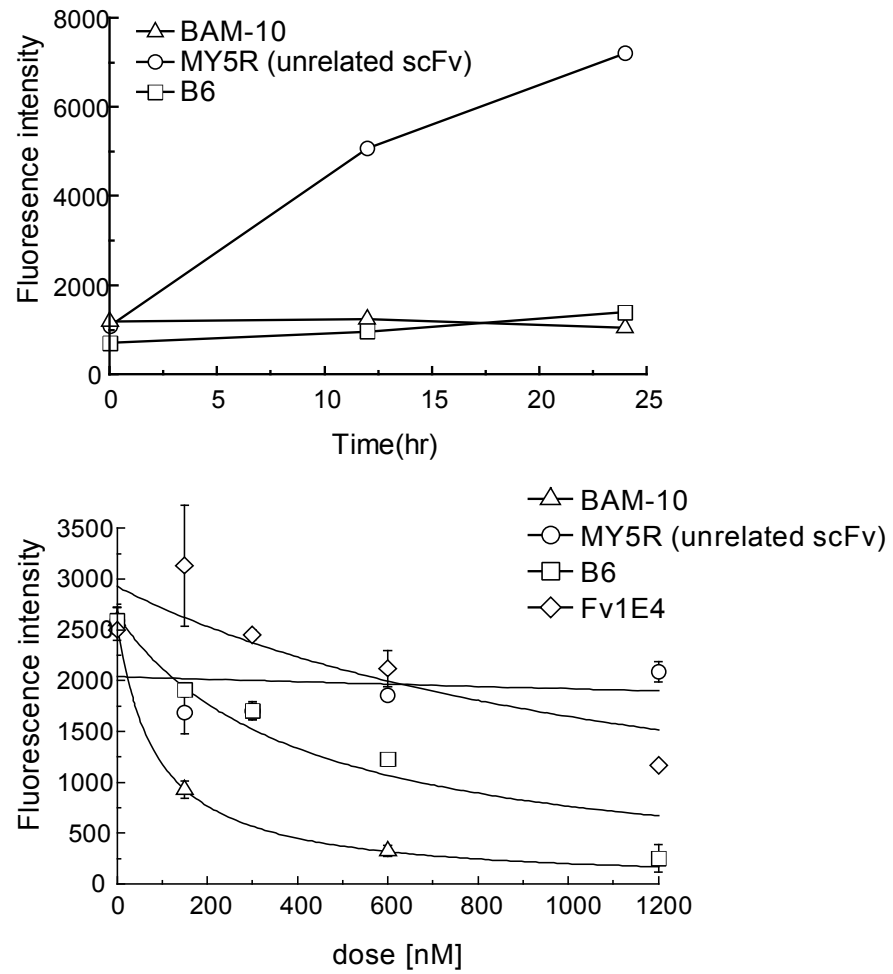


図4-1 単離されたscFvの線維化阻害活性の評価

20 mMリン酸バッファー pH 7.0 を用いて 40  $\mu$ M に希釈した  $A\beta_{42}$  ペプチドに 1200 nM の scFv を加え 24 時間後に 10  $\mu$ l のサンプルを回収し 1 uM の ThT/リン酸バッファー 90  $\mu$ l を加え Wallac 1420 ARV0sx (Wellesley, MA)を用いて蛍光強度を測定した。



clone	IC50
BAM-10	150 nM
B6	600 nM
B7	800 nM
D1	400 nM
F10	1000 nM
Fv1E4	1400 nM <

図 4-2 scFv B6 の線維化阻害活性の評価

20 mMリン酸バッファー pH 7.0 を用いて 40  $\mu$ M に希釈した  $A\beta_{42}$  ペプチドに 0, 160, 320, 640 or 1200 nM の scFv を加え 24 時間後に 10  $\mu$ l のサンプルを回収し 1  $\mu$ M の ThT/リン酸バッファー 90  $\mu$ l を加え Wallac 1420 ARV0sx (Wellesley, MA)を用いて蛍光強度を測定した。



#### 4-4-2 抗体の添加時間の違いによる線維化阻害活性の評価

$A\beta_{42}$  の線維化をおこなうと同時に抗体を添加すると効率よく  $A\beta_{42}$  の線維化を阻害することが示されたが、 $A\beta_{42}$  の線維化の過程で抗体を加えることによる線維化への影響をチオフラビン T アッセイにより調べた。線維化開始後 1, 3, 6 時間目に抗体を添加したところ、それ以後  $A\beta_{42}$  の線維化を阻害した(図 4-3)。電子顕微鏡を用いた観察から、6 時間目に抗体を添加した実験ではもともと存在している  $A\beta_{42}$  の線維を阻害していないことが示された(図 4-4)。この結果は、抗体の線維化阻害のメカニズムとして線維の突端に抗体が結合していることを示唆している。この抗体は線維化の進行を止めることができるが、一旦形成されてしまった線維は分解できないことがわかった。

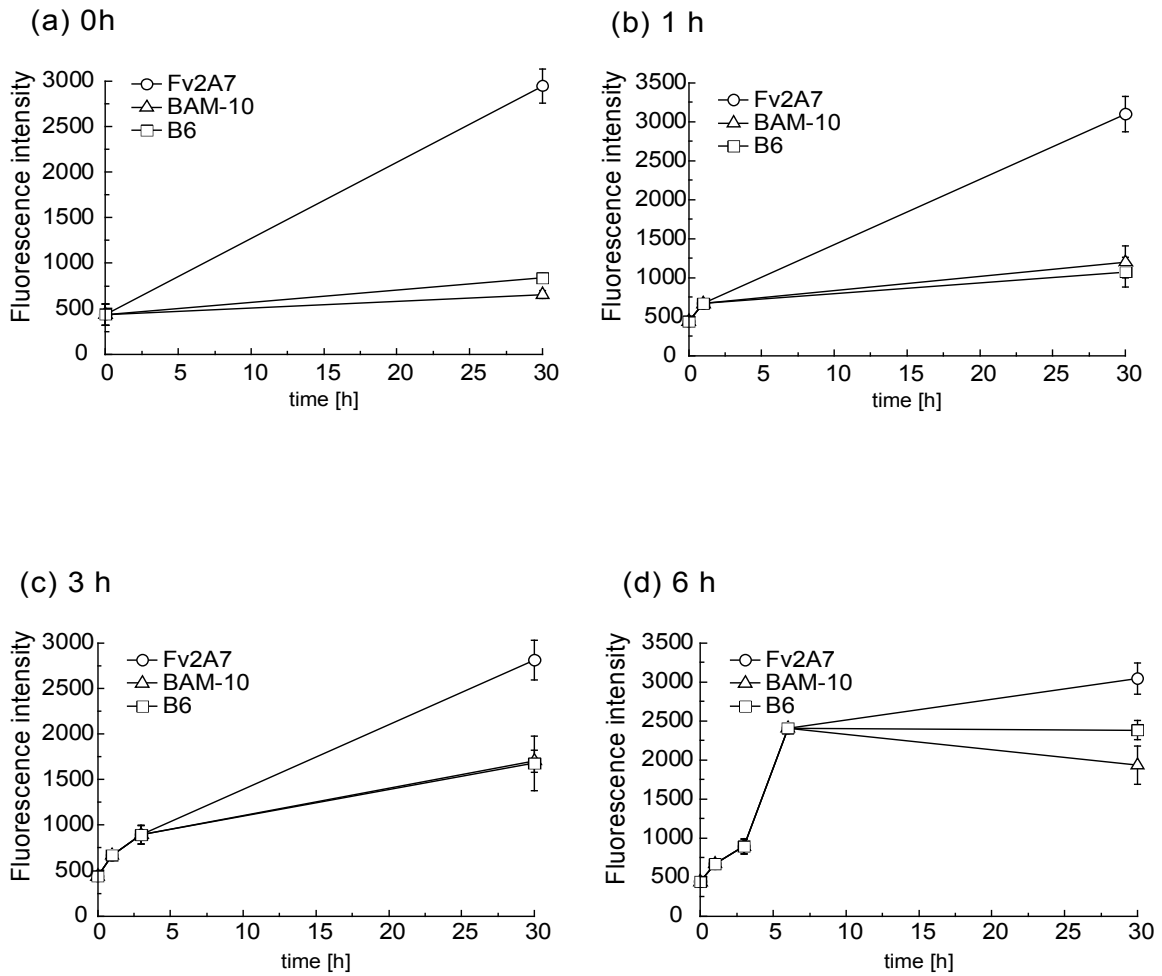


図 4-3 抗体添加のタイミングの違いによる線維化阻害活性の変化

20 mM リン酸バッファー pH 7.0 を用いて 40  $\mu$ M に希釈した A $\beta$ <sub>42</sub> ペプチドを 37°C で培養する際に、0、3、6 時間目に抗体を終濃度 1200 nM になるように加えた。24 時間に 10  $\mu$ l のサンプルを回収し 1 uM の ThT/リン酸バッファー 90  $\mu$ l を加え Wallac 1420 ARV0sx を用いて蛍光強度を測定した。

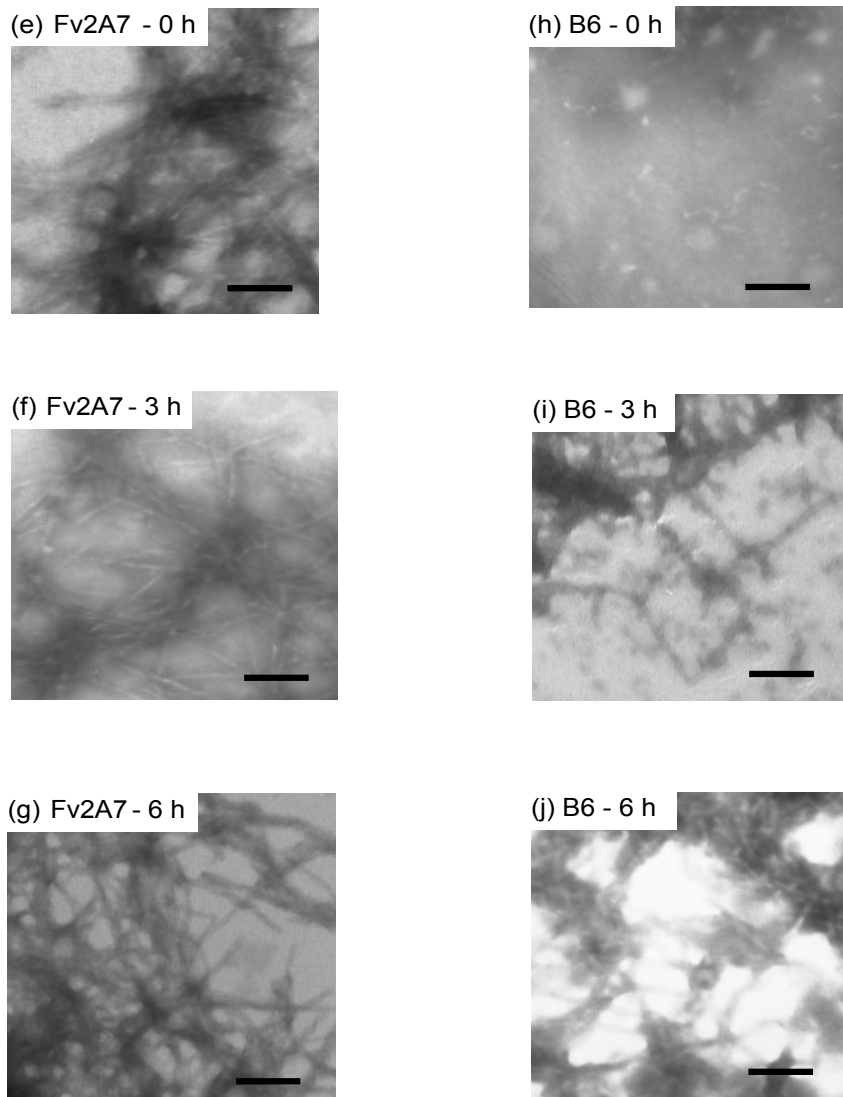
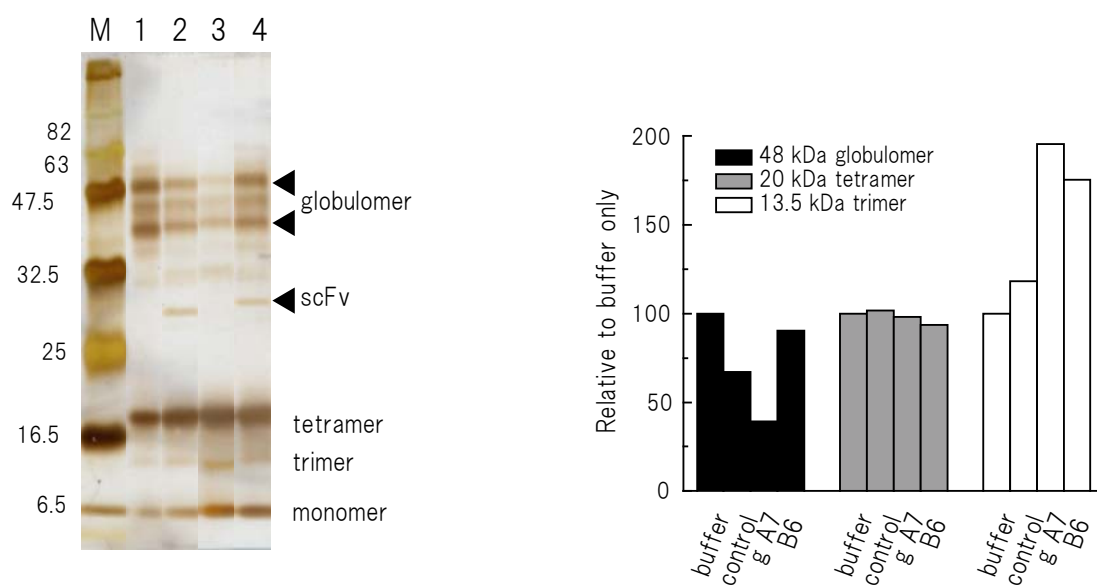


図 4-4 抗体添加のタイミングの違いによる線維化阻害活性の変化

20 mM リン酸バッファー pH 7.0 を用いて 40  $\mu$ M に希釈した  $A\beta_{42}$  ペプチドを 37°C で培養する際に、0, 3, 6 時間目に抗体を終濃度 1200 nM になるように加えた。24 時間に 10  $\mu$ l のサンプルを回収し電子顕微鏡を用いて観察した。

#### 4-4-3 オリゴマー化阻害活性の評価

線維状 A $\beta_{42}$  特異的抗体 B6 が A $\beta_{42}$  オリゴマー化に与える影響を SDS-PAGE により評価したが、この抗体は A $\beta_{42}$  のオリゴマー化を阻害しなかった(図 4-5)。オリゴマー化の過程で SDS と DMSO を加えておりそれらが抗体の反応性を阻害している可能性も考えられ、より詳細な検討が必要である。



Lane 1: buffer only

Lane 2: 1.2 uM ctrl scFv

Lane 3:  $2.0 \times 10^{12}$  v/ml g A7 phage

Lane 4: 1.2 uM scFv B6

図 4-5 scFv B6 のオリゴマー化阻害活性の評価

20  $\mu$ g の HFIP 処理した A $\beta_{42}$  を 2  $\mu$ l の DMSO を用いて溶解した。超音波処理を 20 秒間行ったあと 2.2% SDS を 1  $\mu$ l 加えさらに PBS を 8  $\mu$ l 添加した。37°C で 6 時間静置後、ddw で希釈する際終濃度 1.2  $\mu$ M になるように scFv を添加し 37°C でさらに 16 時間培養した。サンプルを SDS-PAGE し、銀染色によりたんぱく質を検出した。各バンドの濃さを数値化しグラフ化した。

#### 4-4-4 ペプチドファージライブラリーを用いたエピトープ解析

ランダムペプチドファージライブラリーを用いた抗体のエピトープ解析を行った(図 4-6)。ランダムペプチドファージを用いて scFv B6 に対してバイオパンニングを行い scFv B6 に特異的結合活性を有するペプチドファージクローンを単離した(図 4-7)。これらのファージクローンは scFv B6 にのみ特異的結合活性を有しておりコントロール scFv とは結合活性を有していなかった。これらペプチドファージクローンの配列を解析したところ2つの配列が決定された。得られた配列は G MLDIFA PIRHV, TSP ILDVLT PPR であった。これらの配列を Clustal W により  $A\beta_{42}$  との相同性を確認したところ、 $A\beta_{42}$  の 31-36 番目のアミノ酸とわずかに相同性を示した(図 4-7)。この相同性の低さは抗体が高次構造認識しているためだと考えられる。

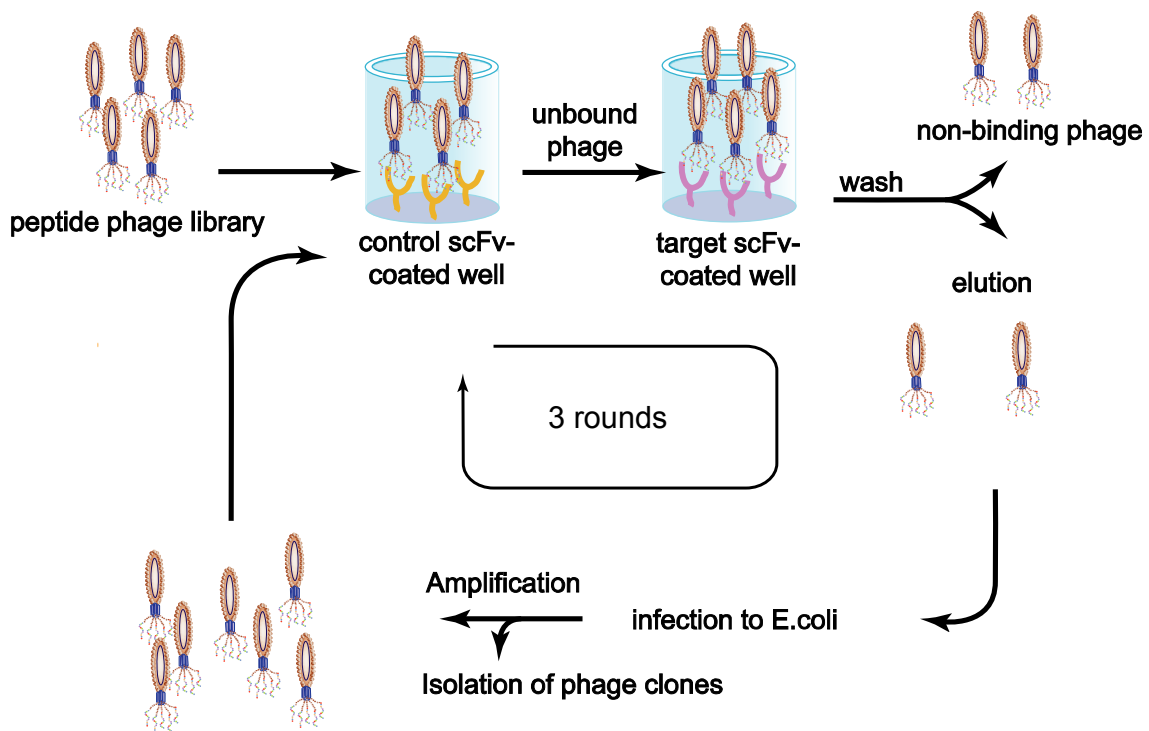
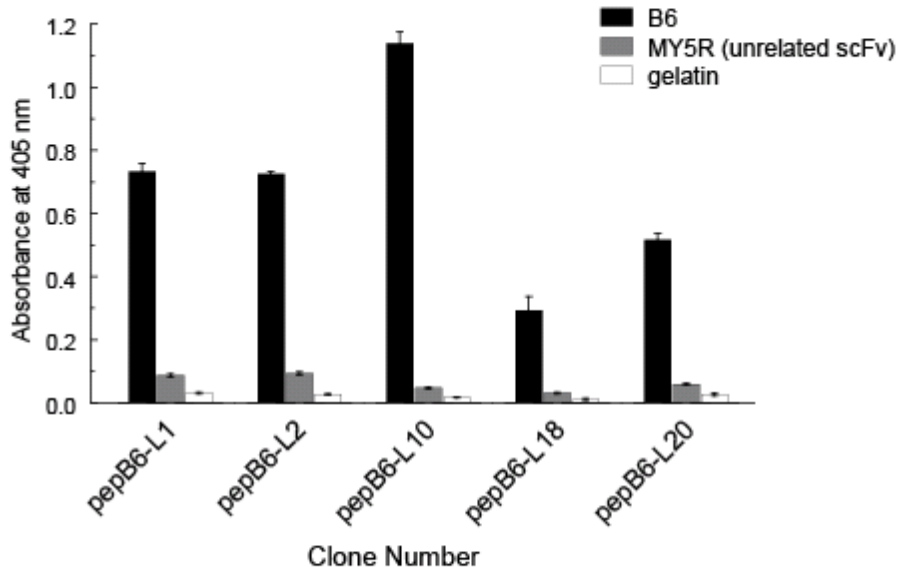


図 4-6

scFv B6 を  $\text{NaHCO}_3$  で  $1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  に調整後、96 穴イムノプレートに固定化した。固定化の条件は  $4^\circ\text{C}$ 、4 h で行った。その後、0.5%ゼラチン/PBS で O/N でブロックし、ペプチドファージライブラリー ( $1 \times 10^{12}$  TU) を室温で 1 時間反応させた。結合していないファージを 0.1% Tween20/PBS で洗浄して取り除き、結合したファージを  $100 \mu\text{l}$  の 0.1M glycine-HCl (pH2.2) で溶出し、 $10 \mu\text{l}$  の 1M Tris-HCl (pH9.1) で中和した。それを大腸菌 *ER2738* に感染させて増幅した。増幅したファージクローンの scFv B6 への結合強度と特異性を高めるため、トータル 3 ラウンドのパンニングを行った。

(a)



(b)

A $\beta$ 1-42	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA		
pepB6-1		GMLDIFAPIRHV	4 / 5
pepB6-10		TSPILLDVLT PPR	1 / 5
		.....	

図 4-7 ペプチドファージライブラリーを用いた scFv B6 のエピトープ解析

マイクロタイタープレート(Nunc)に scFv B6 (50 ng/ 40  $\mu$ l/wel)をコートし、0.5%ゼラチンでブロックした。PBST で3回洗浄後、パンニングによって得られたファージクローン(1.0 x 10<sup>12</sup> virions/ml)を 40  $\mu$ l 加え室温で1時間反応させた。さらに PBST で3回洗浄後、ビオチン化した抗 g8p 抗体(Pharmacia)、アルカリフォスファターゼ(AP)標識されたstreptavidin(Vector Laboratories, Burlingame)と反応させた。最後に基質を加えて 405 nm の吸光度を測定した。

#### 4-4-5 競合 ELISA によるエピトープ解析

A $\beta$ <sub>42</sub> の N 末に特異的モノクローナル抗体(BAM-10: 1-12 aa)と C 末特異的抗体(8G7)を用いて scFv B6 とサンドイッチ EISA によりエピトープの解析を行った。その結果、N 末抗体である BAM-10 とは競合活性を示さなかったが C 末抗体である 8G7 とは競合活性を示した(図 4-8)。この結果は、scFv B6 が A $\beta$ <sub>42</sub> の C 末付近を認識していることを示唆している。また、これらの結果をより確かなものにするためにエピトープのわかっている別の N 末に特異的な抗体(6E10: 3-8 aa)と C 末特異的抗体(12F4:37-42 aa)を用いて競合 ELISA をおこなった。その結果、この実験でも scFv B6 は N 末抗体である 6E10 とは競合しなかったが、C 末抗体である 12F4 と競合活性をもつことが示された(図 4-9)。

これらの結果からも今回単離された線維状 A $\beta$ <sub>42</sub> コンフォメーション特異的抗体は A $\beta$ <sub>42</sub> の C 末の立体構造を認識していることが考えられる。



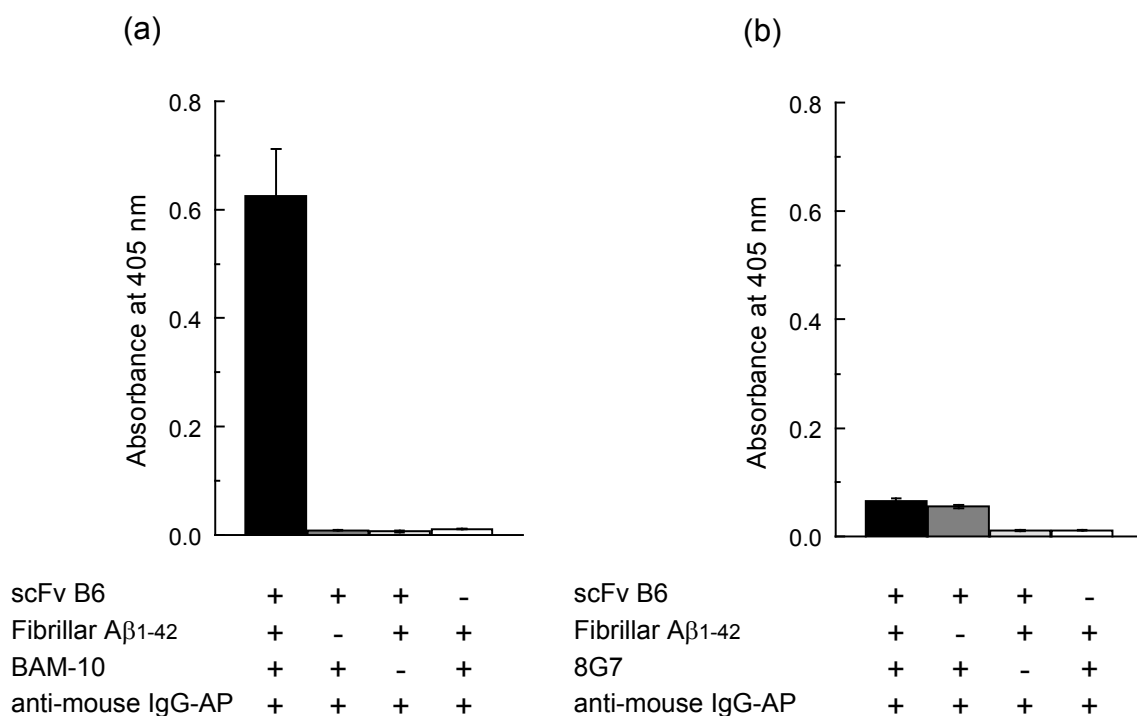


図 4-8 競合 ELISA による B6 抗体のエピトープ解析

マイクロタイタープレート(Nunc)に scFv B6 (100 ng/40  $\mu$ l/wel)をコートし、0.5%ゼラチンでブロックした。PBST で3回洗浄後、100 ng/40  $\mu$ l の線維状 A $\beta$ <sub>42</sub> を加え室温で1時間反応させた。さらに PBST で5回洗浄後、N 末特異的抗体(BAM-10)または、C 末特異的抗体(8G7)を室温で 1 時間反応させた。結合した抗体を検出するために AP 標識された抗マウス IgG 抗体(goat anti-mouse IgG-AP)と室温で1時間反応させ、基質を加えて 405 nm の吸光度を測定した。

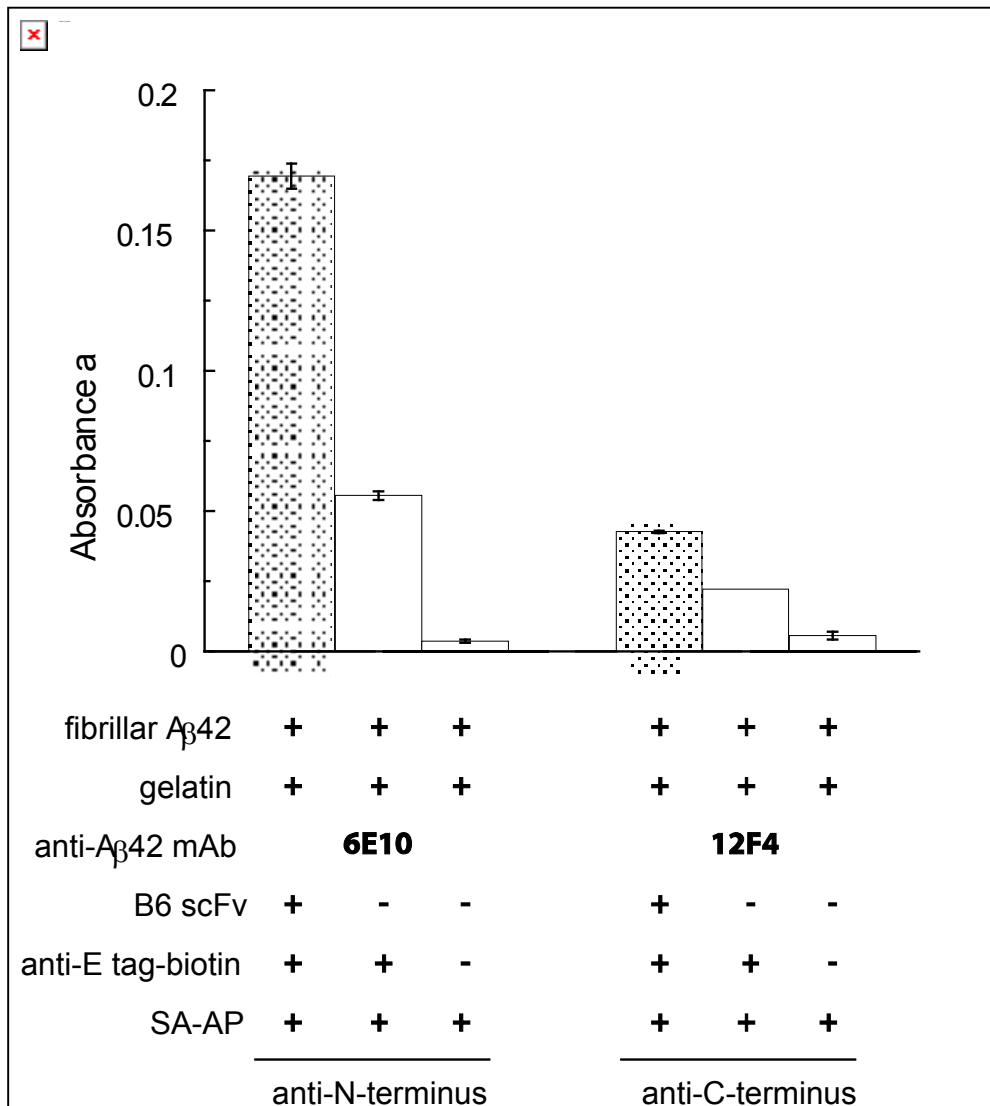


図 4-9 競合 ELISA による B6 抗体のエピトープ解析

マイクロタイタープレート(Nunc)に線維状 A $\beta$ <sub>42</sub> (40 ng/40  $\mu$ l/wel)をコートし、0.5%ゼラチンでブロックした。PBST で3回洗浄後、5  $\mu$ g/ml の 6E10 または 12F4 を 40  $\mu$ l 加え室温で1時間反応させた。さらに PBST で 5 回洗浄後、anti-E tag モノクロナール抗体を加え室温で 1 時間反応させたあと、結合した抗体を検出するために AP 標識されたストレプトアビジンと室温で 1 時間反応させ、基質を加えて 405 nm の吸光度を測定した。

## 第5章 総括と展望

アルツハイマー疾患は、痴呆を主徴とする進行性の神経変性疾患である。有病者数は全世界で 1,800 万人を超えるといわれており、有病率が加齢と共に増加することから、早期診断及び根治的治療法の確立への希求は、社会の高齢化に伴い著しく高まっている。しかしながら、疾患が生じるメカニズムは  $A\beta_{42}$  が関与しているということはわかっているが詳細についてはまだはっきりとわかっていない。近年  $A\beta_{42}$  の特定の構造体が疾患の発症に重要であるということが報告されており、さらに詳細な解析が急がれる。

現在行われている AD の治療はその症状を遅らすことはできても、完治することはできない。その他の AD の治療法としては、 $A\beta_{42}$  を用いた免疫療法、 $A\beta_{42}$  の産生を阻害する  $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤、産生された  $A\beta_{42}$  の分解を行うプレセリニンの活性増強などが考えられる。 $A\beta_{42}$  を用いた免疫療法において、抗体による  $A\beta_{42}$  の排除によりマウスではその効果がはっきりと示された。しかしながら、ヒトにおいては T 細胞による炎症反応が脳で観察され、また治療を受けた患者がなくなるということがおこりその使用は否定された。しかしながら、抗体による治療効果は確かに確認され、その有用性は否定されていない。したがって、 $A\beta_{42}$  に結合する抗体を直接投与する方法であれば AD の治療は可能であると考えられる。

また、AD においてはその診断法がまだ確立されていないという問題がある。現在のところ痴呆が発症する前に疾患を特定することは困難であり、生きている状態で AD 疾患の兆候を調べることができればその治療に大いに貢献できると考えられる。そのためにも、疾患を引き起こす特定の構造体に対する抗体の作製は重要であると考えられる。

従来までのチオフラビン T や CD、NMR を用いた解析では安定で多く存在するコンフォーマーが優先的に観察され、一時的にしか存在せずかつ非常に微量に存在するコンフォーマーの解析は困難である。ハイブリドーマ法ではある特定のコンフォーマーを免疫し

でも体内で抗原提示細胞に取り込まれ主要組織適合遺伝子複合体(MHC II)に提示される際には、ペプチド断片に分解されて提示されるので、高次構造特異的作製は困難である。そこで本研究では人の免疫系をそのまま利用できるファージディスプレイライブラリーを用いて抗原と直接反応させることで、ハイブリドーマ法では困難である構造に特異的な抗体の単離を行った。本研究では、この方法により A $\beta$ <sub>42</sub> の構造特異的な抗体の単離に成功している。さらに同様の手法を用いて様々な構造体に特異的な抗体を作製することができれば、どの構造体が AD 発症に関与しているかを解明することができ、発症のメカニズムを調べることができるかもしれない。

また、抗体によるファイバー化阻害実験における阻害メカニズムの解析を抗体添加のタイミング、エピトープ解析により行った。抗体添加時間のタイミングを変え線維化を引き起こした際の電子顕微鏡の結果から、抗体が線維の先端に結合しキャッピングすることにより阻害活性を発揮している可能性を示唆した。線維の構造解析の結果から、線維の先端にあるアミロイドペプチドは  $\beta$  1,  $\beta$  2 シートと呼ばれる配列のうち  $\beta$  2 シートが相互作用をしておらずフリーになっていることが知られている。そこで、抗体のエピトープを検討することで阻害メカニズムを考察した。ペプチドファージライブラリーを用いたエピトープ解析で得られた結果は、わずかながら  $\beta$  2 シートとの相同性を示したが決定的なものではなかった。これは、抗体がアミロイドの高次構造を認識していると考えられる。また、N 末特異的抗体、C 末特異的抗体を用いた競合 ELISA の結果から B6 抗体が  $\beta$  2 シートである C 末を認識していることが示唆された。従って、B6 抗体の阻害メカニズムとしてアミロイド線維の先端にあるフリーな  $\beta$  2 シートと結合し、エンドキャッピングにより線維化を阻害していると考えられる。より詳細なエピトープ解析や線維化阻害のメカニズムは X 線結晶構造解析などを用いた実験により明らかにできるかもしれない。

今回確立したコンフォメーション特異的抗体の作製法はアルツハイマー病だけではなくその他のコンフォメーション疾患の原因分子に対するコンフォメーション特異的抗体の作製にも応用可能であると考えられる。

## 参考文献

- 1 Claire Mount and Christian Downton. (2006) Alzheimer disease: progress or profit? *Nature* **12** 780 (2006)
- 2 Katzman, R., and Saitoh, T. (1991) Advances in Alzheimer's disease. *FASEB J* **5**, 278-286
- 3 Haass, C., Schlossmacher, M., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, L. B., Lieberburg, I., Koo, H. E., Schenk, D., Teplow, B. D., and Selkoe, J. D. (1992) Amyloid  $\beta$ -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **359**, 322-325
- 4 Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., McCormack, R., Wolfert, R., Selkoe, D., Lieberburg, I. and Schenk, D. (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's  $\beta$ -peptide from biological fluids *Nature* **359**, 325-327
- 5 Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, L. M., Cai, X. D., McKay, D. M., Tintner, R., and Frangione, B. (1992) Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* **258**, 126-129
- 6 Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., and Liosatos, M. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A $\beta$ 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 6448-6453
- 7 Roher, A. E., Chaney, M. P., Kuo, Y., Webster, S. D., Stine, W. B., and Havrkamp, L. J. (1996) Morphology and toxicity of A $\beta$ -(1-42) dimer

- derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **271**, 20631-20635
- 8 Sylvain, L., Ming, T. K., Linda, K., Rakez, K., Charles, G., Austin, Y., Michela, G., and Karen, H. A. (2006) A specific amyloid- $\beta$  protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440**, 352-357
- 9 Smith, G. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **14**, 1315-1317
- 10 Clackson T., Hoogenboom HR., and Winter G. (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**, 624-628
- 11 Haass, C., Schlossmacher, M., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, L. B., Lieberburg, I., Koo, H. E., Schenk, D., Teplow, B. D., and Selkoe, J. D. (1992) Amyloid  $\beta$  -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **359**, 322-325
- 12 Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., McCormack, R., Wolfert, R., Selkoe, D., Lieberburg, I. and Schenk, D. (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's  $\beta$ -peptide from biological fluids *Nature* **359**, 325-327
- 13 Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, L. M., Cai, X. D., McKay, D. M., Tintner, R., and Frangione, B. (1992) Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* **258**, 126-129
- 14 Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., Yates, J., Cotman, C., and Glabe, C. (1992) Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol*

*Chem* **267**, 546-554

- 15 Jarrett, J. T., Berger, E. P., and Lansbury P. T., Jr. (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**, 4693-4697
- 16 Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., and Liosatos, M. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 6448-6453
- 17 Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J., and Selkoe, D. J. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* **416**, 535-539
- 18 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. (2005) Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **95**, 834-847
- 19 Lense, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K. H. (2006) A specific amyloid- $\beta$  protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440**, 352-357
- 20 LeVine, H., 3rd. (1993) Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* **2**, 404-410

## 発表論文

Tomoki Yoshihara, Sho Takiguchi, Akifumi Kyuno, Koichi Tanaka, Sayaka Kuba, Shuhei Hashiguchi, Yuji Ito, Tadafumi Hashimoto, Takeshi Iwatsubo, Shinichiro Tsuyama, Toshihiro Nakashima and Kazuhisa Sugimura: Immunoreactivity of Phage Library-derived Human Single-chain Antibodies to Amyloid Beta Conformers *In vitro*. Journal of Biochemistry, *In press*.

T. Yoshihara, K. Tanaka, A. Kyuno, S. Takiguchi, S. Kuba, S. Hashiguchi, T. Nakashima, Y. Ito, T. Hashimoto, T. Iwatsubo and K. Sugimura: Snapshots of Amyloid-beta 1-42 conformers by human antibody-displaying phage library. 8<sup>th</sup> International conference AD/PD 2007. *In press*.

## 国内学会報告

T. Yoshihara, K. Tanaka, A. Kyuno, S. Takiguchi, S. Hashiguchi, T. Nakashima, Y. Ito, T. Hashimoto, T. Iwatsubo and K. Sugimura: Snapshots of Amyloid-beta 1-42 conformers by human antibody-displaying phage library, AD/PD 2007, March, 2007, Salzburg, Austria

T. Yoshihara, A. Kyuno, S. Hashiguchi, T. Nakashima, Y. Ito, S. Tsuyama and K. Sugimura : Human antibodies specific to fibrillar amyloid-beta 1-42, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, June, 2006, Kyoto, Japan

T. Yoshihara, A. Kyuno, S. Hashiguchi, T. Nakashima, Y. Ito, S. Tsuyama and K. Sugimura : Human antibodies specific to fibrillar amyloid-beta 1-42, Cambridge Healthtech Institute's 6th annual international conference : Recombinant antibody, May 2005, Boston

T. Yoshihara, A. Kyuno, S. Hashiguchi, T. Nakashima, Y. Ito, S. Nonaka, S. Tsuyama and K. Sugimura : Human antibodies specific to amyloid-beta 1-42, IBC's 15th Annual International



Antibody Engineering conference, November 2004, San Diego

**T. Yoshihara**, A. Kyuno, K. Yoshinaga, S. Hashiguchi, T. Nakashima, Y. Ito and K. Sugimura : Human VL chain fragment specific to amyloid-beta 1-42, Cambridge Healthtech Institute's 5th annual international conference : Recombinant antibody, April 2004, Boston

#### 国際学会報告

**T. Yoshihara**, S. Kuba, S. Takiguchi, Hashiguchi, T. Nakashima, Y. Ito and K. Sugimura : Human antibodies specific to fibrillar amyloid-beta 1-42, The 80th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, June 200, Kyoto

**T. Yoshihara**, A. Kyuno, T. Murata, S. Hashiguchi, T. Nakashima, Y. Ito, S. Tsuyama and K. Sugimura : Human antibodies specific to fibrillar amyloid-beta 1-42, The 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, October 2005, Kobe

**T. Yoshihara**, A. Kyuno, S. Hashiguchi, T. Nakashima, Y. Ito, S. Nonaka, S. Tsuyama and K. Sugimura : Human antibodies specific to amyloid-beta 1-42, The 78th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, October 2004, Yokohama

## 謝辞

本研究は、鹿児島大学大学院、理工学研究科物質生産工学専攻、分子生物工学講座において行われ、私が本研究室に在籍中約 5 年をかけてまとめた研究成果である。終始御懇意なご指導とご鞭撻を賜りました杉村和久教授、伊東祐二准教授、橋口助教に深く感謝いたします。共同研究において、電子顕微鏡の手ほどきを頂いた鹿児島大学医学部津山准教授、共同研究でご指導頂いた東京大学岩坪教授、橋本助教に心より感謝申し上げます。

平凡な学生生活を送り、やりがいのある学生生活を送れない中これは面白いと夢中になることができた研究と出会えたことが人生の分岐点であったのだらうと思います。研究とはなんぞやということを教えて頂いた杉村教授、幅広い知識で常に目標となる存在であった伊東准教授、いちばん身近で相談にのって頂いた橋口助教すべての方のおかげで今の私があるのだと思います。また、研究をともにした研究室の皆さんに心より感謝申し上げます。杉村研究室での7年間は私の研究に対する全ての基礎となり今後それらの上にさらに経験が積み上がっていくと思います。杉村教授の下で、叱咤激励されながら日々実験に励み続けてき、これからは製薬企業で頑張っていきますので今後ともよろしくお願い致します。。