

## β 蛋白に対するモノクローナル抗体を用いた アルツハイマー病の免疫学的検討

齊藤 丹羽子 今井 浩三

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

### Immunological Analysis of Alzheimer's Disease Using Anti-β-protein Monoclonal Antibodies

Niwako SAITOH and Kohzoh IMAI

Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. A. YACHI)

**ABSTRACT** Anti-β-protein monoclonal antibodies (TB1, TB2, TB3, TB4 and TB5) were generated from the fusion of mouse myeloma X63-Ag8.653 cells with splenocytes obtained from a BALB/c mouse that had been immunized with a synthetic peptide of β-protein consisting of 24 amino acids. All these antibodies bound specifically to the amyloid changes of senile plaque and amyloid angiopathy of the brain tissues of patients with Alzheimer's disease (AD) or with senile dementia of Alzheimer type (SDAT), but not at all to protein in the normal brain or other tissues by the immunoperoxidase method. Formic acid pretreatment of brain tissue enhanced this reactivity. Positive reactions were clearly visible even in small deposits of plaque, senile plaque crown amyloid and amyloid deposits of capillary walls under this condition.

Western blot analysis revealed that monoclonal antibodies TB2 and TB3 reacted mainly with 116 kD band when extract of SDAT brain was used. They failed to react, however, with 116 kD band when extract of normal brains derived from patients with other diseases was used. Two dimensional electrophoresis revealed that the 116 kD band migrated at around pI 8.5. MoAbs TB1, TB2 and TB4 strongly reacted with the 1st part (7 amino acids near to N-terminus) of the synthetic peptide (24 amino acids) of the β-protein, which consists of hydrophilic amino acids.

(Received March 20, 1991 and accepted April 18, 1991)

**Key words :** Alzheimer's disease, β-protein, Amyloidosis, Monoclonal antibody

### 1 緒 言

アルツハイマー病患者の一症例が初めて報告<sup>1)</sup>されて80年余経過した現在、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, 以下 AD) およびアルツハイマー型老年痴呆 (senile dementia of Alzheimer type, 以下 SDAT) の増加とともに、これらの病態解析、早期診断ならびに治療は、臨床上益々重要な課題となってきた。

病理学的に AD に特徴的であり、診断の根拠として重要とされている変化に、老人斑 (senile plaque) とアルツハイマー原線維変化 (Alzheimer's

neurofibrillary changes または Alzheimer's neurofibrillary tangles, 以下 NFT)<sup>2)</sup> があげられる。特に老人斑については、その数が痴呆の重症度と強く相関することから、AD の病因解明にとって注目すべき変化であると考えられている<sup>3)</sup>。1984年、この老人斑の主要アミロイド蛋白として β 蛋白が見い出された<sup>4)</sup>。その後この β 蛋白の遺伝子が第 21 染色体上に存在することが明らかとなり、同じ第 21 染色体のトリソミーにその病因が求められ、かつ痴呆を呈するダウン症候群の長期生存例の脳組織に本蛋白が検出されることなどが判明<sup>5,6)</sup>し、病因との関連で強い興味もたれている。

本研究においては、この $\beta$ 蛋白の合成ペプチドを免疫原として、モノクローナル抗体(以下MoAb)を作製し、この抗体を用いてAD脳、SDAT脳、あるいは主要な組織における対応抗原エピトープの組織分布を検索するとともに、免疫化学的な解析を試みた。

## 2 方 法

### 2.1 モノクローナル抗体の作製

MoAbはKöhler and Milstein<sup>7)</sup>に準じて、以下の方法で作製した。すなわちアミノ酸合成装置(Biolynx, Pharmacia, Sweden)により作製され、逆相高速液体クロマトグラフィー(TSK gel ODS-120T, 東ソ, Japan)により精製された $\beta$ 蛋白のN末端より24残基の合成ペプチド(Fig. 1) 100  $\mu$ gを500  $\mu$ lの生理食塩水に溶解し、2週間隔で計4回BALB/cマウス(日本クレア)の腹腔内に免疫した。この際3度目の免疫後にマウス血清を採取、2.2.1に示す方法で抗体価の上昇を確認し、抗 $\beta$ 蛋白マウス・ポリクローナル抗体として本研究に用いた。さらに一週間後、腹腔内に合成ペプチドを100  $\mu$ g追加免疫し、3日後に脾臓を摘出、採取したリンパ球とマウス骨髄腫細胞X63-Ag 8.653を型のごとく<sup>8)</sup>細胞融合させた。この後、2.2の方法により選択したハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングした。これを培養し、その上清を採取するとともにBALB/cマウス腹腔内にハイブリドーマを増殖させ腹水を採取し、カプリル酸を用いて<sup>9)</sup>MoAbを精製した。また、その免疫グロブリンサブクラスをOuchterlony法<sup>10)</sup>により決定した。

### 2.2 ハイブリドーマのスクリーニング

#### 2.2.1 Radioimmunoassay (RIA)

免疫原である $\beta$ 蛋白の合成ペプチドを、生理食塩水により、0.1 mg/mlに調製した後、塩化ビニールプレート(Dynatec, USA)に100  $\mu$ l/wellずつ加え、4°C、20時間インキュベートし固相化した。その後、Tsujijsaki

*et al.*<sup>11)</sup>に従い、0.05% Tween 20 加リン酸緩衝食塩水(phosphate-buffered saline, 以下PBS)で3回洗浄、1%牛血清アルブミンを用いてブロックした後、培養上清を4°C、10時間反応させた。洗浄後、さらに<sup>125</sup>I標識抗マウスIgG (Fc)抗体(1 $\times$ 10<sup>5</sup> cpm/well)を加え、室温で2時間反応させた。Tween加PBSにより5回洗浄後、結合cpmを測定した。なお、<sup>125</sup>I標識はクロラミンT法によった。

#### 2.2.2 脳組織を用いたスクリーニング

SDAT患者の剖検脳を固定、薄切後、Bodian染色を施し、老人斑など病変の存在を確認した。その後、遠藤・今井の報告<sup>12)</sup>に従って、間接ペルオキシダーゼ法を施行し、上清の反応性を確認した。免疫染色の一次抗体としては今回作製したMoAbを、二次抗体としてはペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン(DAKO, Denmark)を反応させた。このスクリーニングで陽性反応を示した上清を以下の実験に供した。

### 2.3 対応抗原の免疫組織学的検索

1980年より1989年12月までに教室の関連施設において剖検が行われた患者のAD脳4例、SDAT脳5例それぞれの海馬領域、Pick disease脳1例の海馬領域、多発梗塞性痴呆(以下MID)脳6例の海馬領域、脳腫瘍により死亡した症例より得られた成人脳非癌部3例および小児脳非癌部2例それぞれの前頭葉、SDAT患者1例の心、肝、脾および腎、肝癌患者1例の正常心、脾、腎および肝臓非癌部、続発性アミロイドーシス1例のアミロイド沈着腎、さらに老化促進モデルマウスSAM-R2(以下老化マウス)、(京都大学胸部疾患研究所、竹田俊男教授より供与)およびBALB/cマウスの脳、心、肝、脾および腎について検討を行なった。

ヒトの組織については、10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋後4~5  $\mu$ mの連続切片として用いた。一方動物組織については、採取後30分以内に-80°Cに凍結保存し、RNAの抽出に用いた。またその組織の一部

For immunization:

(NH<sub>2</sub>)-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-(COOH)

For absorption experiment:

1st part: Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp

2nd part: Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val

3rd part: Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val

Fig. 1 Amino acid sequence of synthetic peptide for  $\beta$ -protein used for immunization and for absorption experiment

は4%パラホルムアルデヒドにより固定後、凍結切片を作製した。なお各例についてHE染色、ヒトの脳については、Bodian染色を行ない、老人斑、アミロイドアンギオパチー、アミロイド沈着の有無の確認を含め、組織学的検討を行なった。一部の症例についてはKitamoto *et al.*<sup>13)</sup>に準じて切片を88%蟻酸で処理した。この後に、2・2・2で示した方法により免疫染色を行なった。

また、得られた複数の抗体の対応抗原の異同を確認するため、2・4に示す吸収操作を用いて免疫染色を行なった。

#### 2・4 合成ペプチドによる吸収試験

各MoAbは、培養上清100  $\mu$ lに対し合成ペプチド10  $\mu$ gを混合し、4°C、一夜反応させ、遠沈後その上清を採取し、これを一次抗体として用い、吸収効果の有無をみた。なお吸収には $\beta$ 蛋白N末端より24残基、ならびにN末端より7残基 (Fig. 1, 1st part)、次の11残基 (Fig. 1, 2nd part) および最後の6残基 (Fig. 1, 3rd part)の計4種を用いた。また、吸収試験の対照として、癌遺伝子産物erb-B-2<sup>14)</sup>の合成ペプチド(20残基)を使用した。

#### 2・5 対応抗原の免疫化学的検討

##### 2・5・1 脳組織中の粗抗原の抽出

Bodian染色であらかじめ老人斑を確認した症例の脳(海馬領域)を抽出原とした。Van Nostrand *et al.*<sup>15)</sup>の方法に準じてこの脳組織(湿重量1g)を20mlの緩衝液(200mM塩化ナトリウム、20%グリセロール、1%Triton X-100、200mMリン酸カリウム、pH7.4)でホモジナイズした後、10,000 $\times$ g、4°C、15分間遠沈し、上清を得た。

##### 2・5・2 Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel電気泳動(SDS-PAGE)およびウェスタンブロット法による検討

SDS-PAGEはImai *et al.*<sup>16)</sup>の報告に準じて2・5・1で抽出した抗原(2.5mg/ml)、アルツハイマー病患者の血清(2倍希釈)および髄液原液をSDS-PAGEにより展開後、Ban *et al.*<sup>17)</sup>に従ってゲルよりニトロセルロース膜へ転写し、以下酵素抗体法を用いて対応抗原を検出した。

##### 2・5・3 二次元ゲル電気泳動法

Sidmanの方法<sup>18)</sup>に準じて、2・5・1で抽出した抗原を用い、一次元目は非平衡pH勾配電気泳動法により抗原を分離、二次元目を2・5・2に準じてSDS-PAGEで展開した後ウェスタンブロット法を行なった。

#### 2・6 ノーザンブロット法

2・3で免疫組織学的検討に用いた老化マウスおよびBALB/cマウスの脳、心、肝および腎の一部からChirgwin *et al.*の方法<sup>19)</sup>に従いtotal RNAを抽出した。抽出後Goldbergの方法<sup>20)</sup>に準じてノーザンブロット法を行なった。すなわち抽出されたtotal RNA20 $\mu$ gをエタノール沈澱後、50%ホルムアミド、Goldberg buffer (0.04MMOPS, 5mMクエン酸ナトリウム、0.5mM EDTA)および16%ホルムアミドからなるloading bufferで溶解し、65°C15分間恒温水槽内でインキュベートした。氷冷後、Goldberg buffer, 16%ホルムアルデヒドを含む1% agarose (Bio-Rad, USA) gelで、電気泳動を行なった。泳動後、agarose gelを1 $\mu$ g/ml ethidium bromide溶液で染色した後、ニトロセルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜を50%ホルムアミド、6 $\times$ SSC(SSC, 0.15M塩化ナトリウム、0.015Mクエン酸ナトリウム)、5 $\times$ Denhardt (0.1%BSA, 0.1%Ficoll 400, 0.1%polyvinylpyrrolidone)、0.5%SDS, 10mM EDTA (pH 8.0)、サケ精巢DNA (10mg/ml)にて42°C、2時間前処置した後、この溶液と、ニックトランスレーション法により<sup>32</sup>P標識したpAZ10<sup>21)</sup>( $\beta$ 蛋白ヒト前駆体cDNA, 1.6kb, JCRB細胞バンクより供与)を混合した溶液内でさらに42°C、20時間インキュベートした。ハイブリダイゼーション後ニトロセルロース膜を50°C、2 $\times$ SSC, 0.1%SDS溶液で15分間振盪しながら洗浄した。この操作を3回繰り返した後ニトロセルロース膜を乾燥させXAR5フィルム(Kodak, USA)に密着させ、-80°Cでオートラジオグラフィーを行なった。

### 3 成績

#### 3・1 抗 $\beta$ 蛋白モノクローナル抗体の作製と確立

Fig. 1に示した $\beta$ 蛋白の合成ペプチドを抗原として、RIA法により、スクリーニングを行なった。全体で約300クローンのハイブリドーマを得たが、この中で7種のハイブリドーマの産生する抗体が強陽性を示し、TB1~TB7と命名した (Table 1)。

さらにこれらの培養上清をSDAT脳を用いた免疫組織的方法でスクリーニングしたところ、5種のハイブリドーマの産生する抗体が老人斑、アミロイドアンギオパチーのいずれにも反応した (Table 2, Fig. 2)。

脳組織上のこのような染色は切片を88%蟻酸で前処置した場合さらに増強されるとともに、Bodian染色で明瞭に染色されない老人斑(Ikeda *et al.*により分類された型<sup>22)</sup>によればtype 4に相当する) (Fig. 3)、毛細血管から放射状に広がるアミロイド沈着までも確認で

**Table 1** Reactivity of monoclonal antibodies to the synthetic peptide of  $\beta$ -protein assessed by radioimmunoassay

Antibody	Reactivity to synthetic peptide (cpm)
TB1	32,285
TB2	17,781
TB3	15,845
TB4	36,397
TB5	41,416
TB6	38,257
TB7	23,722
Medium	1,439
MUSE11*	3,448
YH206**	2,932
DF2***	1,082
Anti- $\beta$ -protein antiserum****	24,985

\* Control monoclonal antibody MUSE11 (IgG1) reacting with a pancreas tumor-associated antigen.

\*\* Control monoclonal antibody YH206 (IgM) reacting with an adenocarcinoma-associated carbohydrate antigen.

\*\*\* Control monoclonal antibody DF2 (IgM) reacting with a prion-protein associated carbohydrate antigen.

\*\*\*\* Polyclonal antiserum was prepared by four times immunization with synthetic peptide of  $\beta$ -protein ( $\times 10$  dilution).

きた (Fig. 4).

### 3.2 対応抗原の検索

#### 3.2.1 主要組織に対するモノクローナル抗体の反応性

これらの5種類のMoAbを用いて、2.3で示した各

組織について検索を行なった。その結果、いずれの抗体を用いても、AD脳あるいはSDAT脳9例のすべての老人斑、アミロイドアンギオパチーが染色されたが、この中、MoAbTB5はやや染色性が弱かった (Table 2)。しかしながら、同一切片上のNFT、正常神経細胞および正常脳血管、他疾患で死亡した患者の脳、SDAT患者の心、肝、脾および腎は、染色されなかった。また、続発性アミロイドーシスのアミロイド沈着腎、肝癌患者の正常心、腎、脾、肝臓など非癌部は、いずれも染色されず、さらに老化マウス、BALB/cマウスの脳、心、肝、脾および腎も染色されなかった。また、対照抗体のMUSE11 (IgG1)を1次抗体として反応させた場合と、2次抗体のみを反応させた場合には、老人斑、アミロイドアンギオパチーのいずれもが染色されなかった。

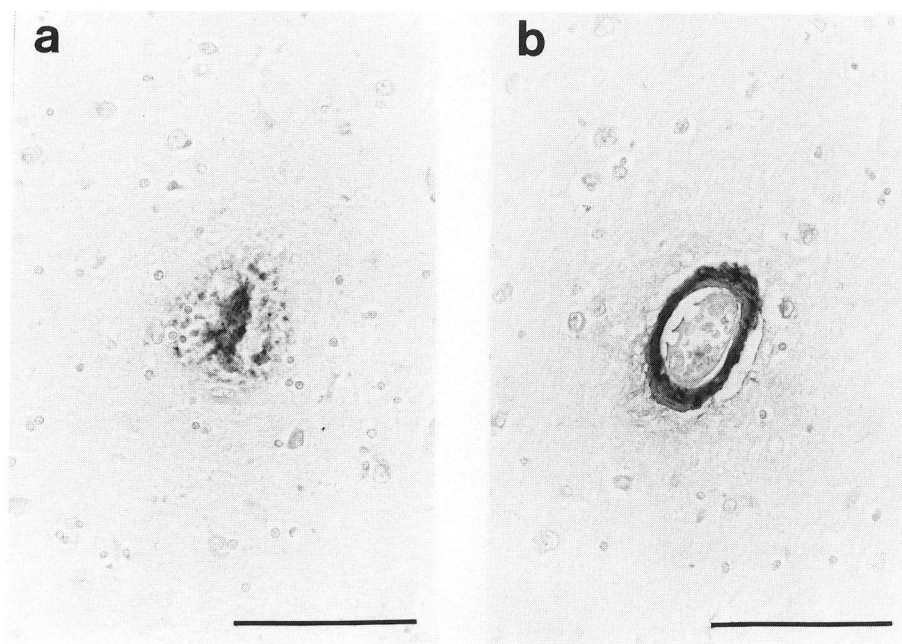
#### 3.2.2 対応抗原の免疫化学的検討

対応抗原の分子量検索の目的で、SDAT脳から2.5.1に従い抗原を抽出し、SDS-PAGEおよびウエスタンブロット法を行なった (Fig. 5)。MoAbTB2およびTB3では116kDに相当する位置に主要なバンドを認めた。一方、MoAbTB1、TB4およびTB5は明らかなバンドは認めなかった。次に、5種のMoAbを用いてADの血清、髄液を抗原としてウエスタンブロット法を施行したが、この場合明らかなバンドは見出せなかった。他方、MUSE11を1次抗体とした場合、また2次抗体のみを反応させた場合にも、上に示したバンドは認めなかった。さらに、MoAbTB2およびTB3を用いて、SDAT脳と対照脳の対応抗原の比較を行ないその代表例をFig. 6に示した。その結果、対照脳では116kDに相当する位置にバンドを認めなかった。また、二次元電気泳動法においては、SDAT脳を抗原とした場合、

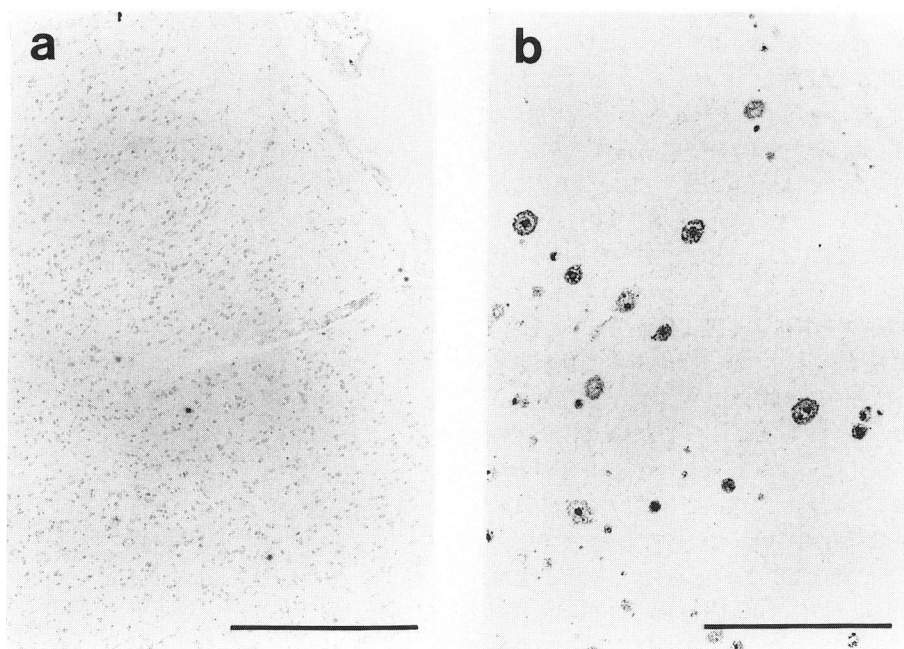
**Table 2** Histological distribution of antigenic determinants detected by anti- $\beta$ -protein peptide monoclonal antibodies

MoAb	Ig subclass	Brain from AD and SDAT			Normal brain		Brain from MID (n=6)	Pick disease's brain (n=1)
		Senile plaque (n=9)	Amyloid angiopathy (n=9)	NFT (n=9)	Adult (n=3)	Child (n=2)		
TB1	IgG1	++	++	-	-	-	-	-
TB2	IgG1	++	++	-	-	-	-	-
TB3	IgG2b	++	++	-	-	-	-	-
TB4	IgG1	++	++	-	-	-	-	-
TB5	IgG1	+	+	-	-	-	-	-
MUSE11	IgG1	-	-	-	-	-	-	-

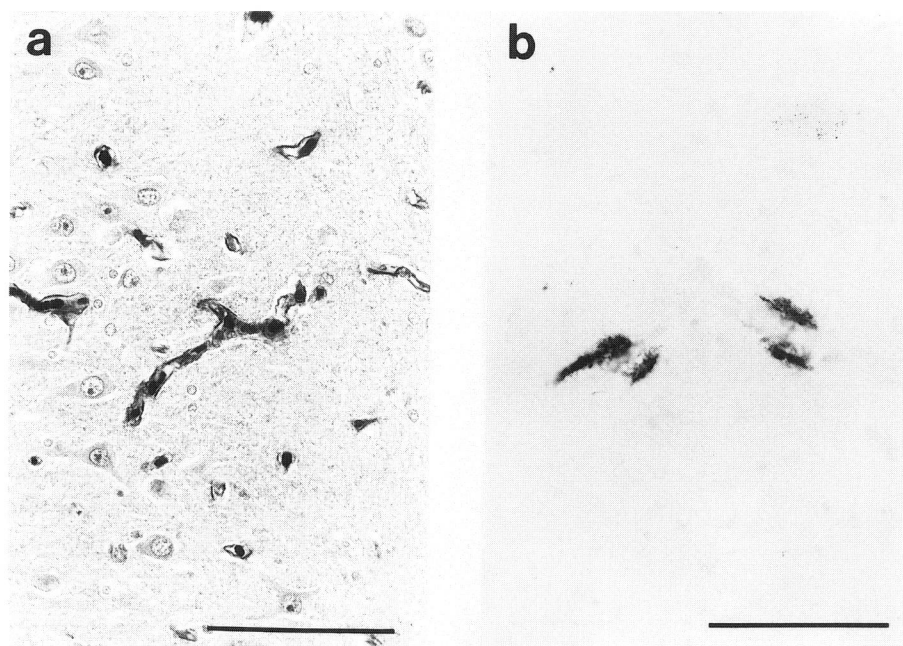
++ strongly positive, + weakly positive, - negative



**Fig. 2** An indirect immunoperoxidase staining of the brain tissue sections (hippocampus) of a patient with SDAT. Senile plaque (a) and amyloid angiopathy (b) were clearly stained with the monoclonal antibody TB1 (Bar, 100  $\mu$ m).



**Fig. 3** Senile plaques from a patient with SDAT. Without pretreatment, the monoclonal antibody TB1 reacted faintly with senile plaque (a). With formic acid pretreatment, positive reactions were clearly obtained in even the small plaques and senile plaque crown amyloid (b) (Bar, 400  $\mu$ m).



**Fig. 4** Azan staining of brain tissue of a patient with SDAT. Capillary walls were recognized (a). With formic acid pretreatment, immunoperoxidase positive reaction with monoclonal antibody TB1 was seen in the amyloid deposits of these capillary walls (b) (Bar, 100  $\mu$ m).

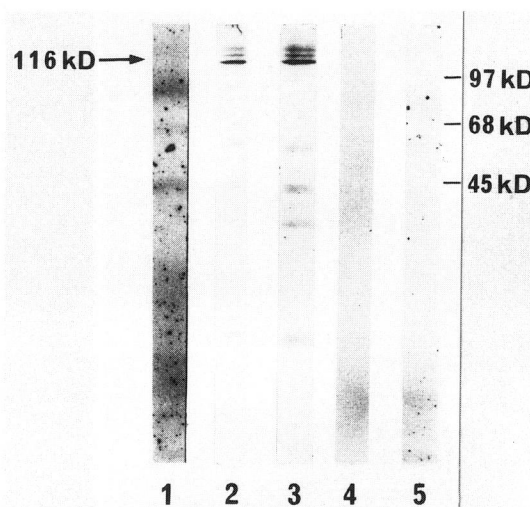
ほぼ pI 8.5 にスポットを認めた (Fig. 7).

### 3・2・3 合成ペプチドとの反応性

それぞれの MoAb の認識するエピトープをより明らかにする目的で、免疫原となった合成ペプチドをあらかじめ 3 つの部分に分けて合成し、それぞれに対する 5 種の MoAb の反応性を RIA 法によって検討した (Table 3). その結果、MoAbTB1, TB2, TB4 は N 末端側の合成ペプチド (1st part) と強く反応した。また、MoAbTB3, TB5 はいずれの合成ペプチドとも反応が弱かった。

### 3・2・4 合成ペプチドによる吸収試験

RIA 法によって 3・2・3 で得られた結果を免疫組織学的に確認するため、吸収試験を行なった。免疫原として合成ペプチド 24 残基による吸収試験では 5 種の MoAb による反応はいずれも消失した。MoAbTB1, TB2, TB4 については、N 末端の合成ペプチド (1st part) による吸収操作で組織上の反応は完全に消失した (Fig. 8 に TB1 の場合を示す)。しかし、他の部分の合成ペプチド (2nd part, 3rd part) による吸収では組織上の反応は阻止されなかった。MoAbTB3, TB5 による組織上の反応は 1st part, 2nd part, 3rd part いずれの合成ペプチドでも阻止されなかった。また、吸収操作において、対照として erb-B-2 の合成ペプチド



**Fig. 5** SDS-PAGE (10% gel) and Western blot analysis of the corresponding antigen recognized by the anti- $\beta$  monoclonal antibodies (lane 1-5, extract of the brain from SDAT patient). The monoclonal antibody (MoAb) TB1 was used for lane 1, MoAb TB2 for lane 2, MoAb TB3 for lane 3, MoAb TB4 for lane 4, and MoAb TB5 for lane 5. 97kD, 68kD and 45kD denote positions of molecular weight markers.

用いたが、いずれの反応も阻止し得なかった。

### 3.3 老化マウスおよび BALB/c マウスにおける $\beta$ 蛋白前駆体 mRNA の発現

マウスにおける  $\beta$  蛋白前駆体 (amyloid precursor protein, 以下 APP) の mRNA の発現をノーザンブロット法により検討した。Fig. 9 に示すように、老化マウスならびに BALB/c マウスのいずれにおいても検索した脳、心、肝および腎において 3.7 kb にバンドが認められ、mRNA の発現をみた。いずれのマウスの場合にも脳、腎において特に発現量が多かった。また、各組織とも、老化マウスにおける mRNA の発現量が BALB/c マウスに比較して多く認められた。

## 4 考 察

アルツハイマー病の老人斑主要アミロイド蛋白である  $\beta$  蛋白の合成ペプチドを免疫原として細胞融合法により、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。これらの抗体は合成ペプチドのみならず、native な  $\beta$  蛋白とも反応することが明らかにされた。

最近遺伝子クローニングの普及により、合成ペプチドに対する MoAb の作製が盛んに試みられつつあるが、得られた MoAb が合成ペプチドとは反応しても native な蛋白とは必ずしも反応するとは限らない。本研究に

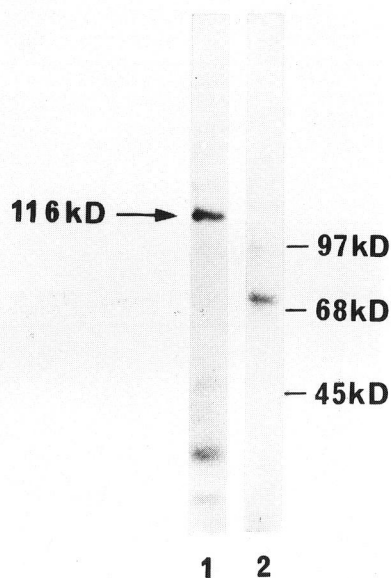


Fig. 6 SDS-PAGE (7.5% gel) and Western blot analysis of the corresponding antigen recognized by the anti- $\beta$  monoclonal antibody TB2 (lane 1; extract of the brain from SDAT patient, lane 2; extract of the normal brain from the control). 97kD, 68kD and 45kD denote positions of molecular weight markers.

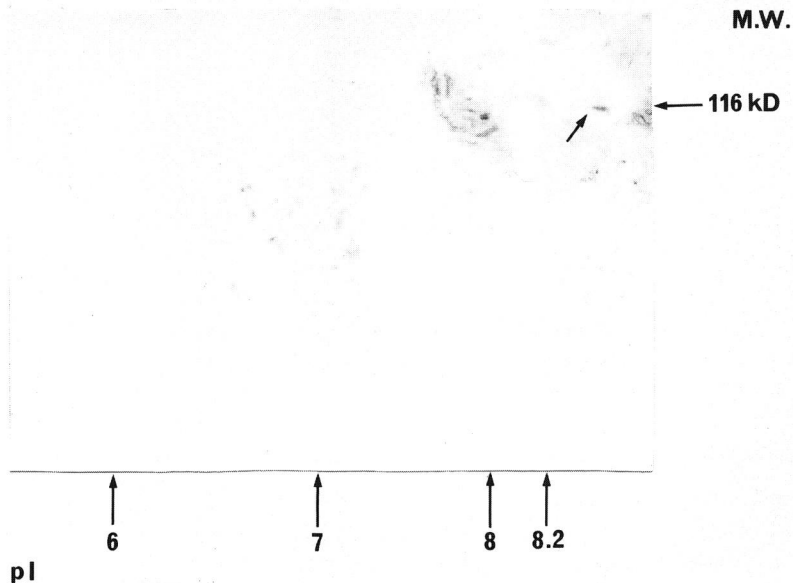


Fig. 7 Analysis of  $\beta$ -protein precursor in SDAT brain using two-dimensional electrophoresis (1st dimension; nonequilibrium pH gradient electrophoresis, 2nd dimension; SDS-PAGE (7.5% gel)). Arrow indicates 116kD (pI 8.5) band.

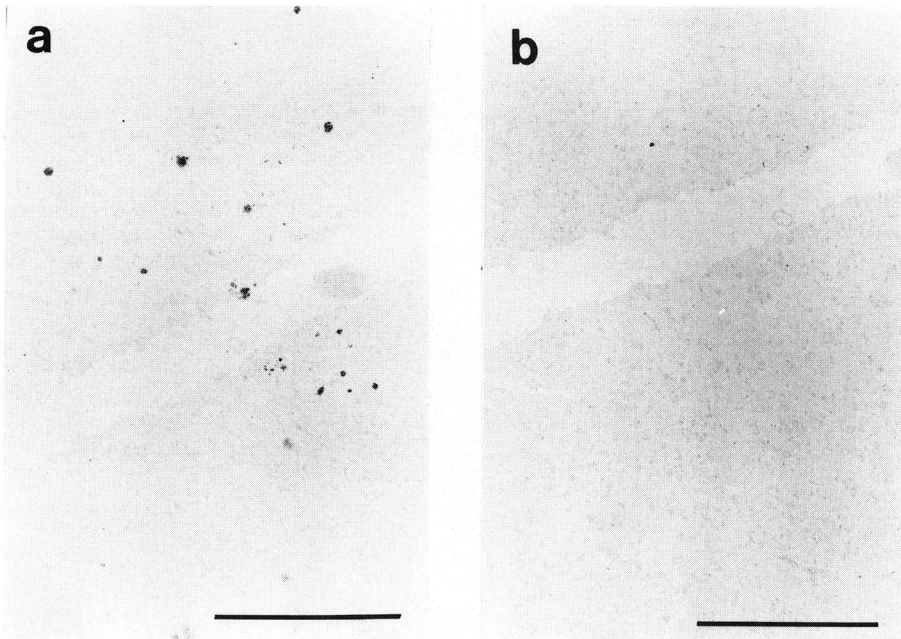
**Table 3** Reactivity of anti- $\beta$  monoclonal antibodies with synthetic peptide assessed by radioimmunoassay

Synthetic peptide	Anti- $\beta$ polyclonal antibodies	control	TB1	Monoclonal Antibody			
				TB2	TB3	TB4	TB5
full length (24AA)	56,086 cpm	4,313	68,843	94,237	17,245	103,511	121,852
1st part	17,810	3,248	16,254	32,178	4,175	21,283	6,201
2nd part	14,948	3,017	3,311	9,736	3,388	7,874	3,143
3rd part	15,192	2,878	7,133	16,266	5,405	12,946	4,811

1st part : Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp

2nd part : Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val

3rd part : Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val

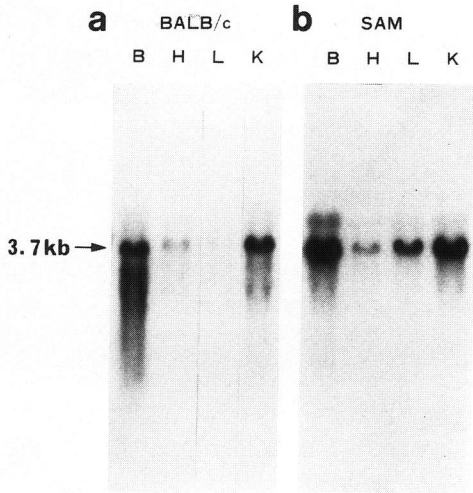


**Fig. 8** Absorption experiment with synthetic peptide (1st part) in the brain tissue sections. The staining of monoclonal antibody TB1 (a) was completely diminished by absorption procedure of the antibody with synthetic peptide (b) (Bar, 400  $\mu$ m).

においても、作製した MoAb の中には、RIA 法では合成ペプチドと反応するが、免疫組織学的には老人斑アミロイドアンギオパチーと反応しない MoAb が数種得られている。しかし今回 native な  $\beta$  蛋白にも反応する MoAb を樹立することができた。その理由としては、以下に述べるような可能性が考えられる。すなわち、免疫原となった合成ペプチドを選択する際の要因として、1) 免疫応答の過程で認識され得るだけの長さ<sup>23)</sup> をもっ

ていたということ。Tanaka *et al.*<sup>23)</sup> によれば、アミノ酸残基が 10 未満のペプチドでは求める抗体を産生するハイブリドーマはほとんど作製できず、10 から 20 残基のペプチドではその 97% に抗体産生を認めたとしている。さらに Niman *et al.*<sup>24)</sup> によれば 30 および 36 残基のアミノ酸からなるペプチドに対して作られた抗体は、それぞれその中の 100%、76% の抗体が native な蛋白と反応したが、13~16 残基のアミノ酸からなるペプチ





**Fig. 9** Northern blot analysis of total RNA in 4 tissues from BALB/c mouse (a), and from SAM (b) with APP probe, pAZ10. B; brain, H; heart, L; liver, K; kidney

ドに対して作製された抗体はその比率が25%~50%に低下するとしている。以上より、合成ペプチドの長さは、単に免疫原として認識され易い要因であるばかりでなく、nativeな蛋白と反応する場合の重要な因子となっていると思われる。2)糖鎖が結合する可能性のないアミノ酸配列の部分免疫原としたこと。3)nativeに存在する膜蛋白は、親水性に富むアミノ酸配列が外に向いており、免疫反応においては一般的にこの部分が認識され易いとされる<sup>25,26)</sup>。今回使用した合成ペプチドもN末端に近い1st partを中心に親水性に富む部分を使用したこと。さらに抗原側の要因としては、4)アミロイド線維は非常に安定な蛋白であるため、特に免疫組織学的検索の際、抗体と反応するまでの種々の処理において抗原性を減弱し難いこと、などがあげられる。

今回作製した抗 $\beta$ 蛋白MoAbで検出可能な対応抗原の組織分布をみると、ADあるいはSDAT脳では、老人斑およびアミロイドアンギオパチーに局限していた。また、ここで成績に示してはしていないが、これらの抗体の対応抗原は、老人斑のアミロイド線維部分に一致していることが免疫電子顕微鏡による検索により確認された(山口大学医学部病理石原助教との共同研究による)。また検索した限りでは、ヒト正常脳(成人、小児とも)、正常各組織で陽性所見を認めなかった。Mas-

ters *et al.*<sup>27)</sup>は、老人斑、アミロイドアンギオパチー以外に、paired helical filament (PHF)にも $\beta$ 蛋白が存在し、抗 $\beta$ 蛋白抗体がNFTと反応すると報告している。しかし、今回の検索ではどのMoAbを用いても、また組織に蟻酸処理、過ヨウ素酸処理、プロテアーゼ処理を加えてもNFTは染色されなかった。他施設の報告<sup>13),28)</sup>でも、免疫染色についてはそれぞれの抗 $\beta$ 蛋白抗体がNFTと反応しないとしており、この成績の差異は、1)それぞれのMoAbの認識するエピトープが異なり、Masters *et al.*<sup>27)</sup>のそれはPHFに存在するエピトープに反応した、あるいは、2)反応するにしてもPHFには通常の $\beta$ 蛋白エピトープは極めて少ないことを反映しているものと思われる。また大山<sup>29)</sup>は、脳以外でも血管内皮細胞に彼らの抗体が反応すると報告しているが、我々の検索では正常脳、心、肝、脾、腎、SDAT患者の心、肝、脾、腎に存在する組織内血管に染色陽性物質を認めていない。一方、Pardridge *et al.*<sup>30)</sup>は胸腺上皮細胞に免疫組織学的に陽性物質を認めたとしているが、今回1例を検索した限りでは陽性所見を認めなかった。

以上の成績は、このような差異をmRNAレベルでも検討する必要があることを示唆している。そのためには新鮮な材料の入手が比較的容易であり、ヒトとの間でAPPにおいて、アミノ酸配列で96.8%、核酸配列で89.2%ホモロジーのある<sup>21,31)</sup>マウスの各組織を用いて免疫ペルオキシダーゼ法とノーザンプロット法を並行して行った。その結果、老化マウス、BALB/cマウスのいずれも脳、心、肝、腎組織上で免疫組織学的に $\beta$ 蛋白の陽性所見を認めなかった。しかし、同時に行ったノーザンプロット法では、老化マウス、BALB/cマウスとも脳、心、肝、腎いずれの組織でもmRNAの明らかな発現をみた。

以上の結果は、ヒト組織においても同様の検討が必要であるが、老人斑、アミロイドアンギオパチー以外の組織上に存在する、このモノクローナル抗体に対する対応抗原が、少なくとも抗原検索の時点で非常に微量にしか存在しないことを推測させる。さらに、蛋白レベルでとらえられない原因のひとつとして、発現している蛋白上に、今回作製したモノクローナル抗体の対応エピトープが存在しないことも考えられる。これらの点に関しては、今後組織の処理上の操作あるいは、 $\beta$ 蛋白部分以外の前駆体部分に対するモノクローナル抗体を作製するなどの検討が必要と思われる。

次に、SDS-PAGEとウエスタンプロット法により対応抗原分子の解析を試みた。その結果、SDAT脳抽出

抗原と、MoAbTB2およびTB3の反応において、116kDの位置に主要バンドを認めたと、対照脳からの抽出物を抗原とした場合、116kDにバンドを認めず、MoAbTB2およびTB3はSDAT脳に特有の、あるいは多量に存在する抗原分子を認識していると思われる。

$\beta$  蛋白は既に述べたように老人斑、アミロイドアンギオパチーのアミロイド沈着部位から同定された蛋白<sup>4)</sup>である。この $\beta$  蛋白の前駆体(APP)はcDNAのクローニングによりアミノ酸695個よりなる全配列<sup>32)</sup>が決定された。興味あることに、その配列には膜通過部分、細胞質領域が含まれ、膜表面レセプター様構造<sup>32)</sup>を示している。その後同様の構造を示し、セリンプロテアーゼインヒビタードメインを含む2種類<sup>33,34)</sup>のAPP cDNAが見い出され、機能との関連で注目を集めている。

さらに最近、APPには膜蛋白として存在する以外に全長のAPPからC末端が切り取られた形の可溶性APP(分泌型)も存在することが明らかとなった<sup>35)</sup>。培養細胞を用いた実験<sup>36)</sup>によると、APPのプロテアーゼによる切断部位は、 $\beta$  蛋白内のグルタミン—リシン(Gln<sup>15</sup>—Lys<sup>16</sup>)(Fig. 1参照)間とされており興味深い。すなわち、この部位はFig. 1の $\beta$  蛋白合成ペプチドの2nd partであり、3rd partは可溶性APPに含まれない。従って血清や髄液中での可溶性APPの検出のためには、1st partまたは2nd partのグルタミンよりN末端側のペプチドを認識する抗体を選別する必要がある。今回作製したモノクローナル抗体中、MoAbTB1, TB2およびTB4はこの条件に合致していた。しかも、これらの抗体はいずれも合成ペプチドのみならず、患者脳の組織中に存在する蛋白とも反応しており、かつ、対応エピトープにも若干の差異が認められることより、可溶性APPの測定系を確立するのに有用と思われた。APPの細胞外ドメインの中で、 $\beta$  蛋白と数10残基離れた部分の合成ペプチドに対して抗体を得つつあり、これらを組み合わせることにより、可溶性APPの測定系を準備中である。

## 要 約

1) ADあるいはSDAT患者の脳に存在する老人斑に沈着する主要アミロイド蛋白である $\beta$  蛋白の合成ペプチドを免疫原として、抗 $\beta$  蛋白モノクローナル抗体5種(TB1, TB2, TB3, TB4, TB5)を確立した。この抗体はいずれも免疫原となった合成ペプチドと反応するばかりでなく、免疫組織学的にみて、nativeな蛋白、すなわち、AD脳あるいはSDAT脳の老人斑、ア

ミロイドアンギオパチーと特異的に反応した。

2) SDAT脳より抽出した粗抗原を用いたウエスタンブロット法において、MoAbTB2およびTB3では116kDに主要なバンドを認めたと。しかし、これらのMoAbと、対照脳から抽出した抗原を反応させても116kDにバンドを認めなかった。また、SDAT脳の抽出抗原で等電点電気泳動を試みたところほぼpI 8.5にスポットを認めた。

3) MoAbTB1, TB2およびTB4は $\beta$  蛋白合成ペプチド24残基中の、親水性に富む1st partに強く反応した。

以上よりこれらの $\beta$  蛋白の合成ペプチドに対して作製したMoAbを、アルツハイマー病およびSDATにおける免疫組織学的、免疫化学的検討に応用できることを確かめた。さらにこれを血清、髄液診断に応用すべく測定法を検討したい。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲いただいた谷内昭教授に深謝いたします。また、ご助言、ご校閲いただいた本学神経精神医学講座深津亮助教授、組織の供与にご協力いただいた熊本大学医学部精神科宮川太平教授、東日本学園大学歯学部病理学講座奥山富三教授、北海道大学免疫科学研究所上出利光教授および慈啓会病院長浦澤喜一博士、またご協力いただいた中央組織研究室大谷静治先生他諸先生に深謝いたします。

本研究は、厚生省特定疾患原発性アミロイド—シス調査研究班(谷内)、文部省科学研究費補助金一般研究(C)(01570363, 今井)ならびに代謝異常治療研究基金(谷内)の補助による。

## 文 献

1. Alzheimer, A.: Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiat.* **64**, 146-148 (1907).
2. Katzman, R.: Alzheimer's disease. *New Engl. J. Med.* **314**, 964-973 (1986).
3. Blessed, G., Tomlinson, B. E. and Roth, M.: The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral gray matter elderly subjects. *Br. J. Psychiat.* **114**, 797-811 (1968).
4. Glenner, G. G. and Wong, C. W.: Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Com-*

- mun.** **120**, 885-890 (1984).
5. Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L. and Beyreuther, K.: Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **82**, 4245-4249 (1985).
  6. Glenner, G. G. and Wong, C. W.: Alzheimer disease and Down's syndrome: Sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **122**, 1131-1135 (1984).
  7. Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature** **256**, 495-497 (1975).
  8. Imai, K., Ng, A. K. and Ferrone, S.: Characterization of monoclonal antibodies to human melanoma associated antigens. **J. Natl. Cancer Inst.** **66**, 489-496 (1981).
  9. Russo, C., Callegaro, L., Lanza, E. and Ferrone, S.: Purification of IgG monoclonal antibody by caprylic acid precipitation. **J. Immunol. Meth.** **65**, 269-271 (1983).
  10. Ouchterlony, O.: Diffusion in gel. Methods for immunological analyses. **Prog. Allergy** **5**, 1-78 (1958).
  11. Tsujisaki, M., Kusama, M. and Sasaguchi, K.: A sandwich assay to detect and characterize syngenic antiidiotypic antibodies to murine anti-HLA and tumor associated antigen monoclonal antibodies. **J. Immunol. Meth.** **75**, 47-55 (1986).
  12. 遠藤高夫, 今井浩三: ヒト肺腺癌細胞に対するモノクローナル抗体の作製と癌患者血清中抗原の検出. **札幌医誌** **54**, 393-410 (1985).
  13. Kitamoto, T., Ogomori, K., Tateishi, J. and Prusiner, S. B.: Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloid. **Lab. Invest.** **57**, 230-236 (1987).
  14. Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Miyajima, N., Saito, T. and Toyoshima, K.: Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. **Nature** **319**, 230-234 (1986).
  15. Van Nostrand, W. E., Wagner, S. L., Suzuki, M., Choi, B. H., Farrow, J. S., Geddes, J. W., Cotman, C. W. and Cunningham, D. D.: Protease nexin-II, a potent antichymotrypsin, shows identity to amyloid  $\beta$ -protein precursor. **Nature** **341**, 546-549 (1989).
  16. Imai, K., Galloway, D. R. and Ferrone, S.: Serological and immunological analysis of the specificity of xenoantiserum 8986 elicited with hybrids between human melanoma cells and murine fibroblasts. **Cancer Res.** **41**, 1028-1033 (1981).
  17. Ban, T., Imai, K. and Yachi, A.: Immunohistological and immunochemical characterization of a novel pancreatic cancer associated antigen MUSE11. **Cancer Res.** **49**, 7141-7146 (1989).
  18. Sidman, C.: 二次元ゲル電気泳動法, Lefkovits, I., Pernis, B. 編: 免疫実験法, 53-64, 西村書店, 新潟 (1987) (original title: Immunological methods. © 1979, Immunological methods. vol. 2, © 1981).
  19. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Rutter, W. J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry** **18**, 5294-5299 (1979).
  20. Goldberg, D. A.: Isolation and partial characterization of Drosophila alcoholdehydrogenase gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **77**, 5794-5798 (1980).
  21. Yamada, T., Sasaki, H., Furuya, H., Miyata, T., Goto, I. and Sasaki, Y.: Complementary DNA for the mouse homolog of the human amyloid beta protein precursor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **149**, 665-671 (1987).
  22. Ikeda, S., Allsop, D. and Glenner, G. G.: Morphology and distribution of plaques and related deposits in the brains of Alzheimer's disease and control cases. An immunohistochemical study using amyloid  $\beta$ -protein antibody. **Lab. Invest.** **60**, 113-122 (1989).
  23. Tanaka, T., Slamon, D. J. and Cline, M. J.: Efficient generation of antibodies to oncoproteins by using synthetic peptide antigens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **82**, 3400-3404 (1985).
  24. Niman, H. L., Houghten, R. A., Walker, L. E., Reisfeld, R. A., Wilson, I. A., Hogle, J. M. and Lerner, R. A.: Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: Implications for the structural basis of immune recognition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **80**, 4949-4953 (1983).
  25. Kyte, J. and Doolittle, R. F.: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **J. Mol. Biol.** **157**, 105-132 (1982).
  26. Yanaihara, C., Matsumoto, T., Nishida, T., Uchida, T., Kobayashi, S., Moody, A. J., Orci, L. and Yanaihara, N.: Chemical approach to develop glicentin C-terminal specific radioim-

- munoassay. **Biomed. Res.** 5, 19-32 (1984).
27. Masters, C. L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R. N. and Beyreuther, K.: Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaques and blood vessels. **EMBO J.** 4, 2757-2763 (1985).
28. Wong, C. W., Quaranta, V. and Glenner, G. G.: Neuritic plaques and cerebro-vascular amyloid in Alzheimer disease are antigenically related. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 82, 8729-8732 (1985).
29. 大山俊郎, 石井賢二, 金丸和富, 腰原康子, 山本清高, 朝長正徳: 培養ヒト血管細胞における $\beta$ -protein 関連抗原の局在. 厚生省特定疾患原発性アミロイドーシス調査研究班, 昭和62年度総会報告集. 55-57 (1987).
30. Pardridge, W. M., Vinters, H. V., Miller, B. I., Tourtellotte, W. W., Eisenberg, J. B. and Yang, J.: High molecular weight Alzheimer's disease amyloid peptide immunoreactivity in human serum and CSF is an immunoglobulin G. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 145, 241-248 (1987).
31. Tanzi, R. E., Gusella, J. F., Watkins, P. C., Bruns, G. A. P., St. George-Hyslop, P., Van Keuren, M. L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D. M. and Neve, R. L.: Amyloid  $\beta$ -protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the alzheimer locus. **Science** 235, 880-884 (1987).
32. Kang, J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K.-H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B.: The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor. **Nature** 325, 733-736 (1987).
33. Ponte, P., Gonzalez-DeWhitt, P., Schilling, J., Miller, J., Hsu, D., Greenberg, B., Davis, K., Wallace, W., Lieberburg, I., Fuller, F. and Cordell, B.: A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. **Nature** 331, 525-527 (1988).
34. Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S. and Ito, H.: Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. **Nature** 331, 530-532 (1988).
35. Weldemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. H., Masters, C. L. and Beyreuther, K.: Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. **Cell** 57, 115-126 (1989).
36. Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D. and Ward, P. J.: Cleavage of amyloid  $\beta$  peptide during constitutive processing of its precursor. **Science** 248, 1122-1124 (1990).
- 
- 別刷請求先:  
(〒062) 札幌市中央区南1条西16丁目  
札幌医科大学第1内科学講座 齊藤丹羽子