

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12681

研究課題名（和文）アルツハイマー病の早期リスク評価を目指したアミロイド センサの超高感度化

研究課題名（英文）Enhancing sensitivity of beta-amyloid sensor for early diagnosis of Alzheimer's disease

研究代表者

藤井 敏司 (Fujii, Satoshi)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授

研究者番号：80271518

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、世界的に喫緊の課題となっているアルツハイマー病の発症リスクを、認知症状が顕著化する前に、血漿中に含まれるアミロイド（アルツハイマー病の原因物質）を迅速・簡便・安価に定量できる測定系の構築を目指している。これまで、我々が独自に開発したアミロイドの凝集を促進させるペプチドを金電極上に固定した修飾電極を用いて、標準試料のアミロイドを数十nMレベルで定量することに成功したが、目標とする血漿中のアミロイド（数十pM）を検出する感度には達していなかった。本研究課題の期間において、測定法を変更し、溶液の条件を最適化することで目的とする数十pMレベルのアミロイドの定量に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在アルツハイマー病の根治薬は存在せず、認知症状の進行遅延薬が処方されるのみである。そのため可能な限り早期にアルツハイマー病の発症リスクを評価することが重要であるが、これまでアミロイドをターゲットとした評価系は開発されているものの、汎用されるまでには至っていない。

本研究で開発している測定系が完成すれば、血液を試料とした低リスクで迅速、簡便、安価なアミロイド測定が可能となり、例えば健康診断の1項目として多くの被験者の試料を測定することで、認知症状が顕著化する前に発症リスクを評価することでアルツハイマー病患者のQOLを高く保ち、認知症関連の医療費の大幅削減に貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aims to construct a measurement system that can quickly, easily, and inexpensively quantify amyloid (the causative agent of Alzheimer's disease) contained in plasma before cognitive symptoms become pronounced, which has become an urgent global issue. Until now, we have succeeded in quantifying the amyloid of a standard sample at the level of several tens of nM using a modified electrode in which a peptide that promotes aggregation of amyloid is fixed on the gold electrode that we originally developed, but the sensitivity to detect amyloid (several tens of pM) in plasma has not been reached. During this research project, we succeeded in quantifying amyloid at the level of several tens of pM by changing the measurement method and optimizing the conditions of the solution.

研究分野：生体関連化学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド ペプチド 電気化学 電気化学センサ ペプチド 血液検査 バイオセンサ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 世界的に高齢化が進む中、増加し続ける認知症患者への対策が急務となっている。認知症患者の6～7割はアルツハイマー病(AD)の患者であると考えられているが、アルツハイマー病の発症原因は未だ明らかになっておらず、薬剤の開発も難航し、認知症状の進行を遅延させる薬剤が4種処方されているのみであった。

(2) ADの場合、他の病気とは異なり、患者の介護にも多くの人手を割く必要があり、対応するための社会的コストも莫大なものになる。高齢者人口の更なる増加とともに、AD患者数も増加の一途を辿ることから、病因の解明、診断法や根本治療薬の開発などの対策が急務であり、それらの解決に対する社会からの期待も大きい。

(3) 我々は、根本治療薬が無い状況下で、現在処方されている薬剤を有効活用し、患者のQOLを可能な限り高く維持するためには、ADの早期発症リスク評価が重要であると考え、独自に開発したADの原因物質と考えられているアミロイド(A $\beta$ )の凝集を促進するペプチドAFPPを用いて、A $\beta$ の迅速・簡便・高感度な測定法の開発に取り組んだ。その結果、サイクリックボルタンメトリ(Cyclic Voltammetry: CV)や電気化学インピーダンス分光法(Electrochemical Impedance Spectroscopy: EIS)などの電気化学的手法を用いて、検出限界値20 nMのA $\beta$ 40を測定することに成功していた。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、上述のように、ADの早期発症リスクを、簡便、迅速、安価で行える評価系の構築を目的としている。現在、ADの診断はMRIと放射性物質を用いたPETやSPECTなどの画像診断を併用したり問診などにより行われている。また、A $\beta$ 量の測定は脊髄穿刺による脳脊髄液の採取後、抗体を用いたELISAなどにより行われている。しかし、画像診断はある程度症状が進行していないと判断が難しく、費用も高額で装置も特殊なものが必要であるため実施できる施設が限られている。また、脊髄穿刺は試料採取の際、痛みや中枢神経を傷つける可能性があるなど患者へのリスクもあり、共に予防診断として利用するには困難も多い。そこで、本研究では、これらの問題点を解決すべく、多数の人々が受診する健康診断で実施されている血液検査の1項目として、各個人の血漿中のA $\beta$ 量の経時変化をモニタリングできるような測定法の開発を目指している。

(2) 上記の早期リスク評価が可能となる根拠として、血漿中のA $\beta$ 量とADの発症に関する大規模追跡調査の結果がある(引用文献)。血漿中のA $\beta$ は加齢とともに増加するが、認知症状が顕著化する3、4年前に一旦減少することが報告された。ただし、各個人のA $\beta$ 量は個人差も大きく、例えば血糖値のような閾値を設けることは難しいため、経時的に測定し、その変化を捉える必要がある。この変化を簡便、迅速、安価にまた試料を大量に処理できるような測定系の開発が最終的な研究の目的である。

(3) 本研究期間においては、20 nMであった本手法の検出限界値を、血漿中のA $\beta$ 濃度(数十～数百 pM)を測定できるよう高感度化することが目的である。

### 3. 研究の方法

(1) 我々が独自に開発したペプチドAFPPは、通常3～4日必要とするA $\beta$ 40(40残基からなるA $\beta$ 。生体内A $\beta$ の主成分)の凝集を3～4時間に短縮し、かつ、自然凝集が起こらない10  $\mu$ M以下のA $\beta$ 40を凝集させることが可能である。このAFPPを金電極上に修飾し、そこへA $\beta$ 40を凝集させ、A $\beta$ 40と親和性が高く1:1で結合することが知られているCu<sup>2+</sup>イオンを添加することで得られる電流値からA $\beta$ 40の定量を行うのが、我々の基本的な測定系である(図1。引用文献、)

(2) 基本的な測定系の改良として、金ナノ粒子やカーボンナノチューブなどを用いて修飾した電極上にAFPPを固定することで、電極の表面積を広げることによって感度の上昇が見られたが、基本測定系の数十倍程度であり、目的とする血漿中のA $\beta$ 40濃度を検出できる感度まで向上させることができなかった。

(3) 本研究期間においては、EISを用いた方がより高感度にA $\beta$ 40測定が可能であったため、主

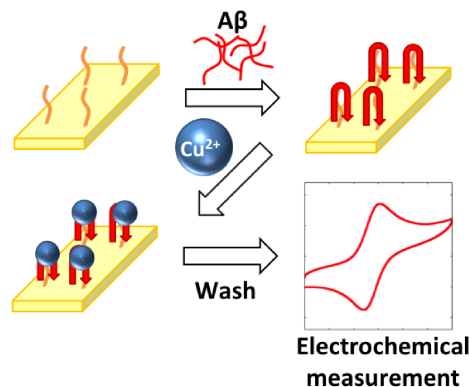


図1 A $\beta$ 測定法の概略図

に EIS を中心に検討した。基本的な測定系と同じ AFPP 修飾電極による  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  の酸化還元に対するインピーダンス値を測定し、修飾電極上への A $\beta$ 40 凝集によるインピーダンス値の変化量により、定量を行った。また、その際測定溶液の条件等を変更することで感度の上昇が見られるかどうかを検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 図 2 に A $\beta$ 40 濃度を变化させた時の、インピーダンス値の Nyquist plot を示す(橙:0.6, 灰:0.1, 黄:0.01, 青:0.001  $\mu\text{M}$  A $\beta$ 40)。図 2 の半円の直径が電荷移動抵抗 (Rct) に相当し、Rct 値が A $\beta$ 40 濃度に比例して変化することが分かっていった。この時の測定条件は従来の基本的な測定系と同じであるが、 $\text{Cu}^{2+}$  を用いた方法の定量限界が 180 nM であったのに対し、インピーダンスを用いた本方法の定量限界は 20 nM と感度が 9 倍向上した。

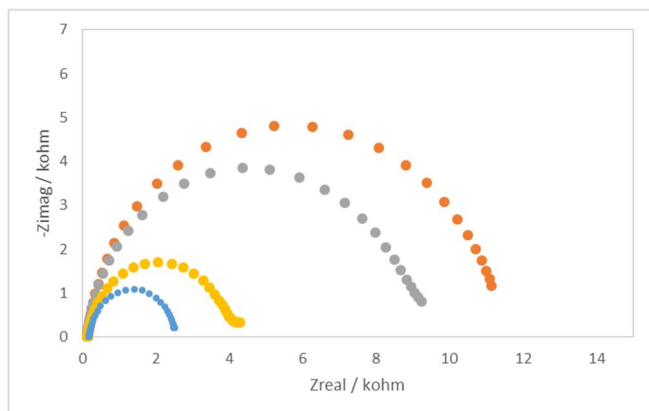


図 2 EIS 測定結果の Nyquist plot

(2) 従来の測定で用いた試料溶液は、AFPP 上への A $\beta$ 40 の凝集に対して最適化されたものではなかったため、pH や共存物など溶液の条件を変更して測定を行ったところ、0.5 ~ 500 pM の範囲で濃度とインピーダンス値の間に良好な直線関係が得られた。

(3) 試験管レベルではあるが、目的とする血漿中の A $\beta$ 40 の濃度を定量的に測定することが可能となったため、血漿を試料として A $\beta$ 40 の測定を試みた。その結果、1nM 以上の A $\beta$ 40 に対しては定量的に測定することができたが、それ以下の濃度では定量性が著しく低下した。この原因は、血漿中の夾雑タンパク質が電極表面に非特異的に吸着することであると考えられたため、今後は血漿中の夾雑物質の影響の排除に取り組み、目的とする血漿中の A $\beta$ 40 を定量的に測定可能なシステムの構築を図る。

#### < 引用文献 >

N. Schupf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008, 105, 10452-10457

S. Fujii et al., Sens. Bio-sens. Res., 2015, 6, 7-12

藤井敏司, 「BIOINDUSTRY」, シーエムシー出版, 2022, 39(10), 13-17

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 藤井敏司	4. 巻 39
2. 論文標題 血液検査によるアルツハイマー病の早期リスク評価を可能とする電気化学センサの開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIOINDUSTRY	6. 最初と最後の頁 13-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------