

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22484

研究課題名（和文）超音波照射による神経変性疾患蛋白質の特異的増幅の研究

研究課題名（英文）Ultrasonically specific amplification of amyloid fibril seeds of neurodegenerative proteins

研究代表者

中島 吉太郎 (Kichitaro, Nakajima)

大阪大学・国際医工情報センター・特任研究員（常勤）

研究者番号：20867337

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：アミロイド線維はアルツハイマー病を代表とする神経変性疾患の原因物質である。これまで、これらの疾患発症の前兆として微量な線維核が血中に存在することが示唆されており、これを検出することが早期診断につながると考えられている。この研究では、超音波照射法がこの線維核検出過程において及ぼす影響を調査した。独自の超音波照射装置を構築して得られた実験結果は、超音波照射法がこれまでに使用されてきた振とう法と比べて優れた線維核検出能を示すことを明らかにした。またその機構についても議論を行い、超音波により水中に発生する小さな気泡が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、独自の超音波アミロイド装置の構築と超音波がアミロイド線維核検出過程に及ぼす影響を明らかにした。本研究で得られた成果は、パーキンソン病やアルツハイマー病などのアミロイド線維核検出に着目した早期診断法の確立に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Amyloid fibrils are causative matters of neurodegenerative diseases represented by Alzheimer's disease. Since recent studies revealed that patients with early-stage neurodegenerative diseases possess an ultra-trace amount of seeds in their body, detecting those amyloid seeds can provide an early-stage diagnosis method for neurodegenerative diseases. In this study, the effects of ultrasonic irradiation on amyloid seed detection were investigated experimentally. The experimental results suggested that ultrasonic irradiation can detect amyloid seeds more sensitive than a conventional shaking method and revealed that ultrasonic cavitation plays a crucial role in the mechanism.

研究分野：超音波化学

キーワード：アミロイド線維 超音波化学

### 1. 研究開始当初の背景

現在の高齢社会において、アルツハイマー病に代表される神経変性疾患が問題視され、根本的解決が急務となっている。神経変性疾患は、特定の蛋白質凝集体が原因物質である。アルツハイマー病ではアミロイドβが原因蛋白質である。通常、アミロイドβは生体内において、モノマー(単量体)の状態

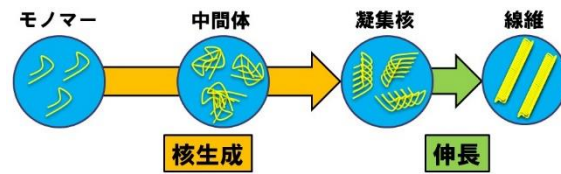


図1. アミロイドβの凝集反応

モノマー(単量体)の状態に血液や脳髄液に溶解し存在するが、疾患発症時には凝集体を形成する。その凝集反応は大別すると、核生成反応とそれに続く伸長反応からなる(図1)。凝集核を形成するまでのエネルギー障壁は高いため、生体内での核生成反応には数十年という長い時間を要する。ところが、反応の起点となる凝集核がひとたび形成されると、伸長反応は急速に進行する。凝集反応が進むと、凝集体が脳組織に蓄積され、神経毒性を発生し、認知機能低下などの症状を示す。死滅した脳組織を回復させることは困難であるため、予防可能な早期に診断し、治療を行うことがアルツハイマー病の解決に不可欠である(図2)。凝集体の形成が認知機能低下の20年以上も前から起こることが明らかとなっており、早期確定診断の重要性は極めて高い。神経変性疾患では凝集核の形成が発症の引き金となるため、生体中に核があるかを診断することが有効であると考えられる。しかし、生体中の凝集体濃度は極めて低く、検出が困難である。また、凝集体を構成する蛋白質分子が同一でも、その構造によって様々な性質を示すことが知られており、検出された凝集体が核としての活性を有するかを見極める必要がある。

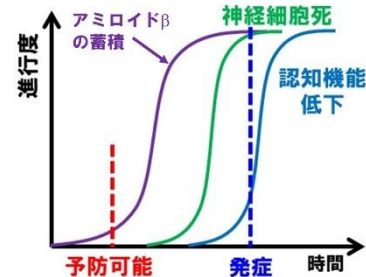


図2. アルツハイマー病の発症：発症後の根治は困難なため、予防可能な早期にアミロイドβを診断する方法が求められる。

死滅した脳組織を回復させることは困難であるため、予防可能な早期に診断し、治療を行うことがアルツハイマー病の解決に不可欠である(図2)。凝集体の形成が認知機能低下の20年以上も前から起こることが明らかとなっており、早期確定診断の重要性は極めて高い。神経変性疾患では凝集核の形成が発症の引き金となるため、生体中に核があるかを診断することが有効であると考えられる。しかし、生体中の凝集体濃度は極めて低く、検出が困難である。また、凝集体を構成する蛋白質分子が同一でも、その構造によって様々な性質を示すことが知られており、検出された凝集体が核としての活性を有するかを見極める必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では生体中の微量な活性を有する凝集核のみを特異的に増幅する方法を確立し、早期診断に応用することを旨とする。その手法として蛋白質溶液への超音波照射を用いる。応募者は先行研究において、アミロイドβ水溶液に対して、超音波を照射すると凝集体形成反応を劇的に加速できることを明らかにした。超音波の照射条件を最適化することにより、凝集核生成反応速度を1,000倍上昇させることに成功した。また、超音波による凝集加速が、超音波キャビテーションの圧壊時の蛋白質分子の局所濃縮と局所加熱によって引き起こされることを解明した。超音波により形成されるアミロイドβ凝集体はアルツハイマー患者のものと類似しており、生体内で起きる凝集反応を試験管の中で加速的に再現できる可能性がある。

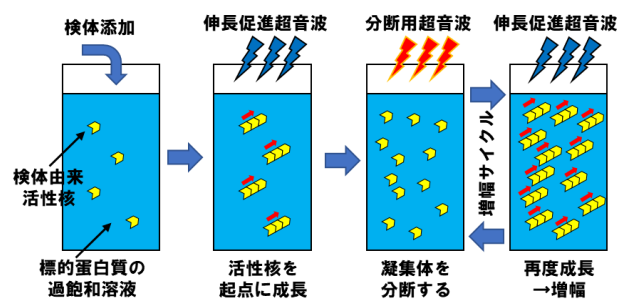


図3. 超音波照射法と過飽和現象に着目した微量アミロイド線維核検出

また、超音波による凝集加速が、超音波キャビテーションの圧壊時の蛋白質分子の局所濃縮

と局所加熱によって引き起こされることを解明した。超音波により形成されるアミロイドβ凝集体はアルツハイマー患者のものと類似しており、生体内で起きる凝集反応を試験管の中で加速的に再現できる可能性がある。

上記の成果を発展させ、超音波を蛋白質凝集体の特異的増幅に用いる。提案する手法を図3に示す。まず、標的となる疾患原因蛋白質の過飽和溶液を準備し、そこに検体溶液を添加する。検体溶液に活性な核が存在すると、それを起点に蛋白質分子が析出し、迅速に凝集反応が完了する。これは、金属の過飽和溶液に結晶核を投入すると瞬時に結晶化が起きる反応と類似している。そのため、検体中に様々な凝集体が含ま

れていても、活性核由来の凝集体のみを特異的に増幅することができる。微量な核からの凝集体伸長には時間を要するので、超音波照射により反応を促進する。その後、形成した凝集体を超音波により分断する。神経変性疾患患者では、図 4(左)に示すような線維状凝集体がよく見られる。線維状凝集体はその末端が凝集の起点となるため、超音波で断片化(図 4(右))することにより、新たな起点を増やすことができる。そして新たに過飽和溶液を添加し、伸長用超音波を照射する。この超音波による伸長と分断のサイクルにより、活性核特異的に短時間での爆発的増幅を狙うのが本研究の独自性である。

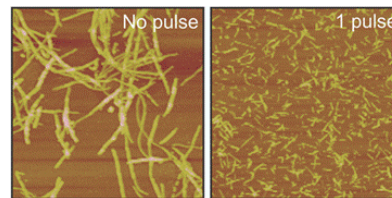


図 4. 超音波による凝集体の分断 (E.Chatani *et al.*, PNAS (2009), 左:分断前。右:分断後)。線維状凝集体はその末端が新たな凝集反応の起点になるため、分断により爆発的増幅が期待できる。

### 3. 研究の方法

まず初めに、図 3 に示した微量アミロイド各検出法を実現するための超音波照射システムを構築する。構築する超音波照射システムは、超音波照射部の他にアミロイド線維形成反応をモニタするための蛍光測定機能を有する。実験に用いる蛋白質は研究室において、大腸菌を用いて発現し、各種クロマトグラフィーで精製したものを用いる。β2 ミクログロブリンを中心として実験を実施する。線維核検出実験においては、人工的に合成した蛋白質溶液を用いて超音波照射条件を実験的に探索する。そして、その超音波照射条件により、増幅可能な活性核の濃度を検証する。蛍光色素を用いて活性核由来の凝集体を検出し、その検出限界が神経変性疾患の早期診断を実現可能な検出限界(濃度: ~10 pM)を有するかを実験的に検証する。また、凝集体量の経時変化曲線から検体に含まれる初期の活性核濃度を推定することができるかどうかを明らかにする。これらが明らかになった段階で、超音波を用いた増幅法が実際の神経変性疾患患者の血液・髄液の活性核を増幅できるかどうかを見極める。

### 4. 研究成果

#### (i) 超音波照射システムの構築と超音波照射が線維核検出過程に及ぼす影響

【K. Nakajima *et al.*, Ultrasonics Sonochemistry 73, 105508 (2021)として発表済】

図 5 に示すような超音波照射システムを構築した。市販の 96 ウェルプレートに封入された蛋白質溶液上に PZT 超音波素子を配置し、超音波を照射する。溶液中の超音波音場を調整するためにウェルの下方にマイクロフォンを設置し、音場計測を行った。また、試料のアミロイド線維形成反応をモニタするために、下方から蛍光測定を行った。

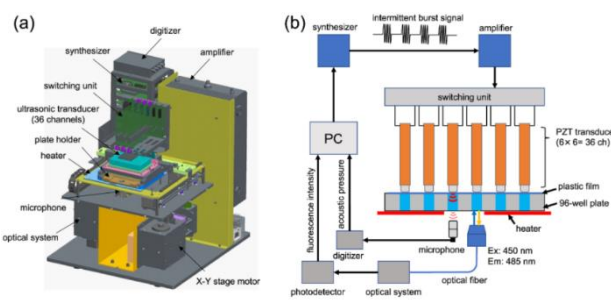


図 5. 構築した超音波アミロイド形成加速装置の(a) 外観図と(b) システムブロック図。

構築した超音波照射システムを用いて、β2 ミクログロブリンのアミロイド線維核検出実験を実施した。図 6 に代表的な結果を示す。ここではまず、あらかじめ作製したアミロイド線維を核とし、検出対象として使用した。結果として、超音波は加速的にごく微量のアミロイド線維核を検出できることが明らかになった。また、サンプル溶液がアミロイド線維を形成するまでに要する時間は溶液に含まれるアミロイド線維シードの濃度と対数相関があり、検量線を用いることで反応時間よりサンプルに含まれるアミロイド線維核の濃度を定量することができる可能性が示唆された。

次に、超音波がアミロイド線維核検出を促進するメカニズムについて反応速度論に基づく考察を行った。図 7(a), (b)には、静置条件下と超音波照射条件下で取得したアミロイド線維形成反応のアミロ

イド線維核濃度依存的な変化を示す。ここで、中抜き丸プロットは実験結果を示し、実線は、図 7(c)に示す反応スキームの各工程を考慮した反応速度論に基づく理論モデルによるフィッティング曲線である。理論モデルによる解析結果より超音波照射は静置条件と比べて、初期核形成反応と線維分断反応を加速していることが明らかになった。線維核検出の観点からいうと、初期核形成過程の加速は線維核非依存的な線維形成反応を促進してしまい、線維核の検出能を悪化させてしまう。一方で、線維分断反応は線維核検出に要する時間を効果的に短縮する効果がある。この結果から、超音波照射法を線維核検出に効果的に適用するためには、初期核形成反応を抑制しつつ、線維分断反応を加速することができる超音波照射条件を特定することが重要であることが示唆された。以上の研究成果を超音波化学の専門誌である *Ultrasonics Sonochemistry* に投稿し、発表済である。

(ii) 超音波照射がアミロイド線維形成反応の速度と凝集形態に及ぼす影響の包括的研究

[K. Nakajima *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.* 12 (18), 3456-3466 (2021)として発表済]

アミロイド線維形成反応を加速するためのアジテーションとして一般的に用いられる振とう法と本研究で着目する超音波照射法がアミロイド線維形成反応に及ぼす影響の違いを線維形成反応の速度と形成される凝集体の形態を調査し、議論した。凝集体の二次構造の解析には円二色性スペクトル測定法を、凝集形態の観察には、原子間力顕微鏡観察を適用した。蛋白質濃度と溶液に添加する塩濃度を系統的に変化させることで蛋白質溶液の過飽和度を変化させ、その際の凝集体の差異を上記の手法で評価した。実験結果から、超音波照射条件下においては、静置・振とう条件下では非晶質(アモルファス)凝集体が形成される溶液条件においても、結晶性のアミロイド線維が形成されることが観察結果から示唆された。また、超音波照射条件下において形成された線維は細かく分断されており、これは先行研究の結果と一致するものであった。

次に、蛋白質濃度と塩濃度を系統的に変化させた溶液に対し、静置・振とう・超音波照射条件下でアミロイド線維形成反応を観察した際に形成に要する時間を評価した。結果を図 8 に示す。得られた線維形成速度のヒートマップに実験的に決定したβ2 ミクログロブリン蛋白質モノマーの溶解度曲線を重ね合わせるにより、過飽和状態を含めた相転移の相図を各条件下において作製した。この相図は 4 つの領域からなる。モノマー濃度がその溶解度を下回り、溶解して存在する溶解領域。モノマー濃度がその溶解

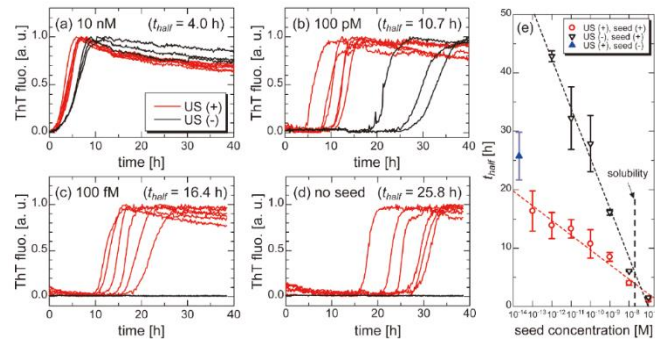


図 6.超音波照射装置を用いて実施したアミロイド核検出実験の結果. (a) 10 nM, (b) 100 pM, (c) 100 fM のシードを含む溶液の ThT 蛍光強度の経時変化と (d)シードを含まない比較対象溶液の ThT 蛍光強度変化。超音波を照射したサンプル(図中赤線)で静置サンプル(図中黒線)と比較して有意な加速効果が確認された。(e) シード濃度と反応時間の関係。

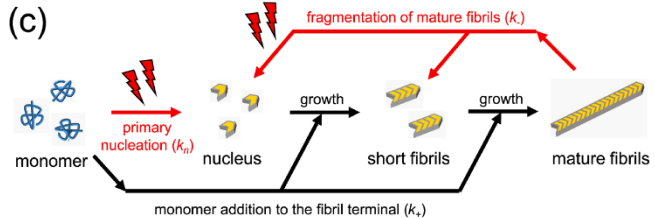
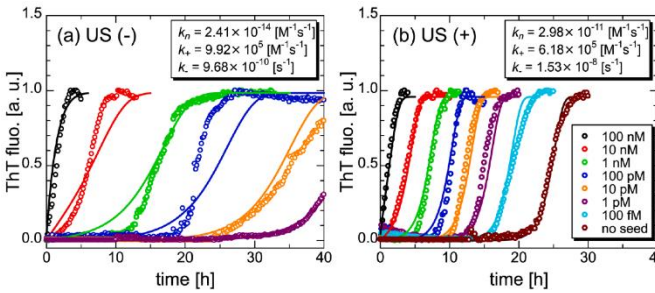


図 7. (a)静置条件下と(b)超音波照射条件下におけるβ2 ミクログロブリンのアミロイド線維形成反応のシード濃度依存性の実験結果(中抜き丸)と理論モデルによるフィッティング結果(実線)。図中の  $k_n$ ,  $k_+$ ,  $k_-$  はグローバルフィッティングから求めた、初期核形成、線維伸長、線維分断反応の反応速度定数である。(c) 超音波照射条件下において加速されるアミロイド線維形成反応経路(赤矢印)。

度を上回っているが、結晶性の析出を起こさない準安定領域、結晶性のアミロイド線維が自発的に析出する不安定領域、析出の駆動力が高く非晶質の凝集体が析出するアモルファス領域である。子の相図に対し、振とうのアジテーション

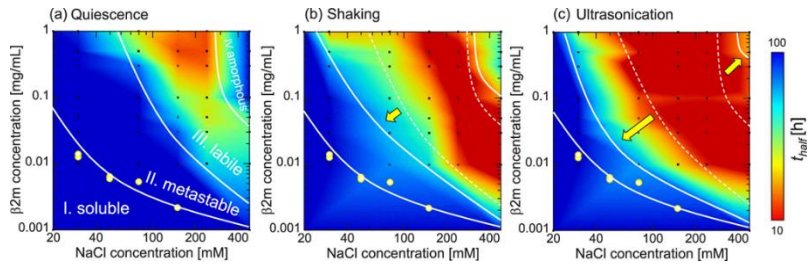


図 8. 凝集体形成に要する反応時間より推定して作製した(a) 静置条件下、(b) 振とう条件下、(c) 超音波照射条件下における $\beta 2$ ミクログロブリンの凝集形態の相図とそれに及ぼすアジテーションの影響。

ションは準安定-不安定領域の境界を下方に移動させ、準安定領域の溶液条件の過飽和溶液からの結晶性のアミロイド線維の析出を促す。これに対して超音波は振とうと同様に過飽和溶液からのアミロイド線維形成を促進し、その程度は振とうアジテーションと比して高かった。また、不安定-非晶質領域の境界線を上方に移動させることも明らかになった。これは、形成速度的に優位な非晶質凝集体を分解し、その溶液条件下で真に安定なアミロイド線維を形成させる能力があったためだと考えられる。また、アミロイド線維核の検出能力の比較を静置・振とう・超音波照射条件下で比較したところ、図 9 に示すように超音波照射条件下においては、他の 2 条件と比して、シード検出能が 2 桁以上向上することが分かった。

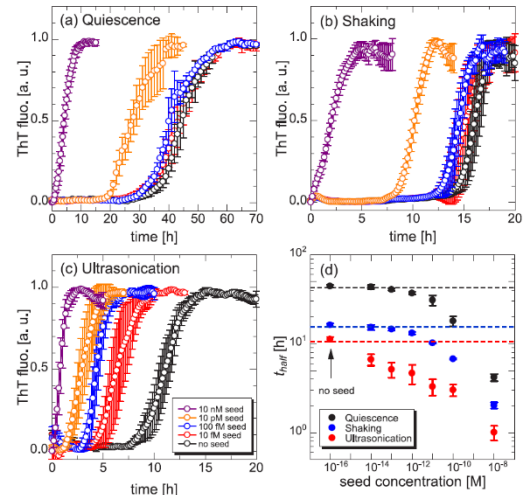


図 9. (a) 静置条件下、(b) 振とう条件下、(c) 超音波照射条件下におけるアミロイド線維形成反応のシード濃度依存性。(d) シード濃度と線維形成に要する時間の関係。

最後に得られた結果より、超音波照射がアミロイド線維形成の自由エネルギー地形に及ぼす影響に関する考察を行った(図 10)。アミロイド線維形成は蛋白質濃度と塩濃度に応じて敏感に変化する(図 10(a))。低塩濃度条件下においては、アモルファス凝集体は不安定であり、熱力学的に安定な結晶性のアミロイド線維が蛋白質の析出形態として現れる。しかし、高塩濃度条件下では、アモルファス凝集体の安定性もアミロイド線維と同等になり、形成のエネルギー障壁が低い分、静置条件下ではアモルファス凝集体が選択される。しかし超音波音場下では、キャビテーションバブルが発生し、この擾乱効果により不安定な非晶質凝集体は分解され、真に安定なアミロイド線維の形成が誘発されたと考えられる。

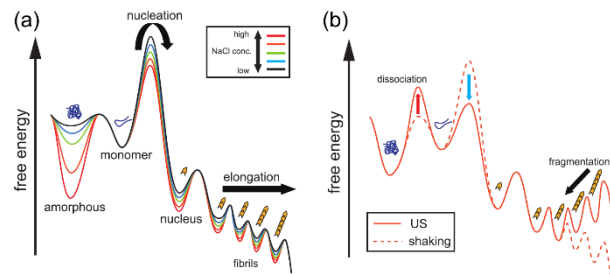


図 10. (a) 静置条件下におけるアミロイド線維形成反応の自由エネルギー地形に及ぼす塩濃度の影響。(b) 自由エネルギー地形の超音波照射が及ぼす特異的影響。準安定状態であるアモルファス凝集体の分解、超音波キャビテーションによる核形成エネルギー障壁の現象、線維の分断が顕著であった。

この過程でキャビテーションバブルは気液界面の導入によりアミロイド線維の核形成のエネルギー障壁を低下させる触媒のような働きを果たす。また、形成されたアミロイド線維に対しては、気泡の圧壊現象に伴う線維の分断を引き起こす。これらの効果は、超音波音場下における特異的な効果であり、機構を理解して超音波照射を有効活用することにより、アミロイド線維に関連するアッセイへの適用範囲を広げることができる可能性がある。上記の成果は米国科学会の神経科学の専門誌 ACS Chemical Neuroscience から発表済である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakajima Kichitaro, Noi Kentaro, Yamaguchi Keiichi, So Masatomo, Ikenaka Kensuke, Mochizuki Hideki, Ogi Hirotsugu, Goto Yuji	4. 巻 73
2. 論文標題 Optimized sonoreactor for accelerative amyloid-fibril assays through enhancement of primary nucleation and fragmentation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ultrasonics Sonochemistry	6. 最初と最後の頁 105508 ~ 105508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ultsonch.2021.105508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima Kichitaro, Toda Hajime, Yamaguchi Keiichi, So Masatomo, Ikenaka Kensuke, Mochizuki Hideki, Goto Yuji, Ogi Hirotsugu	4. 巻 12
2. 論文標題 Half-Time Heat Map Reveals Ultrasonic Effects on Morphology and Kinetics of Amyloidogenic Aggregation Reaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Chemical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3456 ~ 3466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscemneuro.1c00461	査読の有無 有
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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kichitaro Nakajima, Hajime Toda, Keiichi Yamaguchi, Masatomo So, Hirotsugu Ogi, and Yuji Goto
2. 発表標題 High-throughput sonochemical reactor for accelerative amplification of ultratrace amyloid-fibril seeds
3. 学会等名 The 41th Symposium on Ultrasonic Electronics (USE2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryota Matsuda, Yasushi Oshikane, Kentaro Noi, Masatomo So, Kichitaro Nakajima, Keiichi Yamaguchi, Yuji Goto, and Hirotsugu Ogi
2. 発表標題 Highly sensitive detection of 2-microglobulin seeds by ultrasonic irradiation
3. 学会等名 The 41th Symposium on Ultrasonic Electronics (USE2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島吉太郎、戸田元、山口圭一、宗正智、荻博次、後藤祐児
2. 発表標題 同時多検体超音波照射システムを用いた加速的アミロイド線維形成反応の研究
3. 学会等名 2021年蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島吉太郎、山口圭一、山本卓、荻博次、後藤祐児
2. 発表標題 超音波照射を利用した夾維物存在下におけるb2mミクログロブリンのアミロイド線維形成反応の研究
3. 学会等名 2021年生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島吉太郎、戸田元、山口圭一、荻博次、後藤祐児
2. 発表標題 アミロイド線維形成反応に対する超音波照射の特異的効果
3. 学会等名 The 42th Symposium on Ultrasonic Electronics (USE2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kichitaro Nakajima
2. 発表標題 Mechanism of supersaturation-limited onset of dialysis-related amyloidosis by b2-m
3. 学会等名 6th Ulm Meeting - Biophysics of Amyloid Formation (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------