

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19456

研究課題名（和文）異常型タンパク質のシーディングを利用した神経難病ALSの血液診断法の開発

研究課題名（英文）Development of a hemodiagnosis for ALS based on the seeding reaction induced by misfolded proteins

研究代表者

徳田 栄一（TOKUDA, Eiichi）

日本大学・薬学部・講師

研究者番号：00757510

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、神経難病ALSの早期発見に寄与できる血液診断法の開発に挑戦した。具体的には、異常型タンパク質が普遍的に持つシーディング反応を利用し、ALS血液中の極微量な異常型タンパク質を試験管内で増幅させる手法の開発を行った。ALS異常型タンパク質とヒト正常血清からALSモデル血液を調製し、特定のホフマイスターイオン存在下でシーディング実験を行うと、シーディング反応に感度増強と反応特異性を付与することができた。この実験条件では、0.1ピコmol/L濃度のALS異常型タンパク質であってもシードとして機能し増幅可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患の研究領域において、夾雑物質が豊富に含まれる血液中には、異常型タンパク質はシーディングを誘発できないと考えられており、当該分野では、脳脊髄液を対象にバイオマーカー探索が行われてきた。本研究では、既存のコンセンサスの打破に挑戦し、極微量な異常型タンパク質が血液の夾雑環境においても、シードとして機能できるアッセイ系の開発に成功した。本研究で開発したアッセイ系は、原理的には血中に存在する様々な異常型タンパク質のシード機能の評価にも適応できると考えられ、汎用性が高く、幅広い学術分野に波及効果のある手法と言える。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present study was to develop a hemodiagnosis for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) that can contribute to the early detection of patients with ALS. In the development, we focused on the seeding reaction where a misfolded protein acts as a conformational template to induce the conversion of a folded protein into its misfolding. The reaction can amplify as little as a misfolded protein, which will be advantage in the development of an ALS hemodiagnosis. We found that the ALS-related misfolded protein was amplified with as little as 0.1 pmol/L under the existence of a certain Hofmeister's ion.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 血液診断 早期発見 異常型タンパク質 シーディング ホフマイスターイオン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は筋萎縮や呼吸不全が急速に進展する神経難病である。現在、ALSの病状進行を緩徐にする薬剤が開発されているが、その効果は「病初期」に限られる。臨床所見と筋電図による従来の診断法では、確定診断まで年単位の時間を要するため、患者は治療の恩恵が得られ難い。代表者は、ALSの脳脊髄液に Superoxide Dismutase-1 (SOD1) タンパク質が異常型として存在することを発見した。しかし、脳脊髄液の採取は腰椎穿刺で行われるため侵襲性が高く、繰り返しの採取が困難であり、診断応用への可能性は限定的である。一方で、脳脊髄液は脳を循環し血液と合流するため、極微量な異常型 SOD1 が血中に出現すると予想された。

シーディングとは、異常型タンパク質が普遍的に持つ性質のひとつで、異常型タンパク質が構造的な鋳型(シード)となり、正常型タンパク質をシードと同じ構造に変換する現象である。シーディングの最大の特徴は、シードが極微量であってもシーディングが繰り返されることで増幅され、検出可能になる点である。つまり、代表者の先行研究で示唆された「病初期」のALS患者の血液に出現する極微量な異常型 SOD1 を試験管内でシーディングにより増幅させることで、初期段階での診断が可能になると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、異常型タンパク質が正常型タンパク質の構造異常を誘発する「シーディング」を利用し、ALSの罹患が疑われた時点で採血した「病初期」の血液を用いた新規ALS診断法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 本研究で開発する診断技術の原理

SOD1 タンパク質溶液を 96 ウェルプレートに加え、振とう攪拌し、溶液の濁度をモニターすると、濁度変化のない一定期間が存在する。その後、SOD1 が構造異常を呈し濁度が増加する。一方、異常型 SOD1 をシードとして、あらかじめ SOD1 溶液に添加しておくと、ラグタイムが短縮し濁度が爆発的に増加する。つまり、ALS または対照疾患の血液 (=シード) を SOD1 溶液 (=基質) に添加し、ラグタイム短縮の有無を比較することで、異常型 SOD1 を含む ALS であるかどうかを判断できる。

(2) シーディングの基質となる SOD1 タンパク質の精製

大腸菌発現系を用いて、ヒト野生型 SOD1 タンパク質を合成し、アフィニティー精製、アフィニティータグの切断、タグ切断用プロテアーゼの除去、サイズ排除クロマトグラフィーを行い高純度の SOD1 タンパク質を準備した。

(3) 血中でも増幅可能なシーディング条件の探索

代表者の先行研究から ALS の血中に存在する異常型 SOD1 量はピコ mol/L (10^{-12}) 以下であると推察された。そこで、ピコ、または、フェムト濃度の異常型 SOD1 タンパク質をヒト正常血清(コスモバイオより購入)と混合し、シーディング実験を行うことで、極微量な異常型 SOD1 がラグタイムを短縮させる条件を探索した。

4. 研究成果

極微量な異常型 SOD1 タンパク質がシードとして機能するためには、シーディング感度の増強が必要と考え、タンパク質の塩析効果に着目した。塩析効果は、塩の種類や濃度によって異なり、その効果を順位付けしたものを「ホフマイスター系列」と呼び、陽イオン 8 種 (Na^+ 、 NH_4^+ など)と陰イオン 8 種 (Cl^- 、 SO_4^{2-} など)から構成される。従来のシーディング実験は、低濃度(100 mM)の NaCl 溶液中で行われており、ホフマイスター系列に照らし合わせると、塩析効果は弱い。このため、他のホフマイスターイオンを利用することで、異常型 SOD1 のシーディング感度の増強が可能と考えた。そこで、ホフマイスターイオン 16 種の中で、異常型 SOD1 のシーディング感度を増強するイオン種を探索した。

本研究では、異常型 SOD1 とヒト正常血清を混合した試料を「ALS モデル血液」として使用した。シーディングの基質となる SOD1 は、さまざまな濃度のホフマイスターイオン存在下で調製した。ALS モデル血液をシードとして、基質溶液に添加し、振とう攪拌しながら、溶液の濁度を定期的にモニターした。その結果、高濃度のイオン A 存在下では、ALS モデル血液を添加したウェルでのみ濁度の増加が見られ、特異度の高いシーディング条件を見出すことができた。

次に、段階的希釈した異常型 SOD1 をヒト正常血清に添加し、極微量なシードでもイオン A 存在下では、シーディング反応を起こすか検証した。現時点で、 10^{-13} mol/L 濃度のシードでもシーディングの誘発が確認できており、今後、本アッセイの検出限界値を決定する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujino Yuzo, Ueyama Morio, Ishiguro Taro, Ozawa Daisaku, Sugiki Toshihiko, Ito Hayato, Murata Asako, Ishiguro Akira, Gendron Tania F., Mori Kohji, Tokuda Eiichi, Taminato Tomoya, Konno Takuya, Koyama Akihide, Kawabe Yuya, Takeuchi Toshihide, Furukawa Yoshiaki, Fujiwara Toshimichi, Ikeda Manabu et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 FUS regulates RAN translation through modulating the G-quadruplex structure of GGGGCC repeat RNA in C9orf72-linked ALS/FTD	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 RP84338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.84338.1	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 該当する

1. 著者名 Takashima Chika, Kosuge Yasuhiro, Inoue Masahisa, Ono Shin-Ichi, Tokuda Eiichi	4. 巻 22
2. 論文標題 A Metal-Free, Disulfide Oxidized Form of Superoxide Dismutase 1 as a Primary Misfolded Species with Prion-Like Properties in the Extracellular Environments Surrounding Motor Neuron-Like Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4155 ~ 4155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22084155	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 Hirose Mikako, Asano Mito, Watanabe-Matsumoto Saori, Yamanaka Koji, Abe Yoichiro, Yasui Masato, Tokuda Eiichi, Furukawa Yoshiaki, Misawa Hidemi	4. 巻 171
2. 論文標題 Stagnation of glymphatic interstitial fluid flow and delay in waste clearance in the SOD1-G93A mouse model of ALS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 74 ~ 82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2020.10.006	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 Asami Satoru, Suzuki Mikana, Nakayama Toshimitsu, Shimoda Yasuyo, Miura Motofumi, Kato Koichi, Tokuda Eiichi, Ono Shinichi, Kawakubo Takashi, Nishizawa Kenji, Yamanaka Kenzo, Suzuki Takashi	4. 巻 40
2. 論文標題 Apoptotic Effects of a Thioether Analog of Vitamin K3 in a Human Leukemia Cell Line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Toxicology	6. 最初と最後の頁 517 ~ 529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/10915818211047992	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 徳田 栄一、阪下 優芽、山老 直哉
2. 発表標題 Zn未結合型SOD1を認識する市販ミスフォールドSOD1抗体MS785
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Eiichi Tokuda, Maiko Keima, Chiako Ikeda, Yasuhiro Kosuge, Shin-ichi Ono
2. 発表標題 Zinc-binding metallothionein inhibits the SOD1 aggregation via binding of core regions for aggregate growth
3. 学会等名 Neuro2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳田 栄一、桂馬 茉衣子、池田知亜子、小菅 康弘、小野 真一
2. 発表標題 ALS病因タンパク質の凝集化を抑制するZn結合型メタロチオネイン
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳田栄一
2. 発表標題 神経難病ALSの創薬標的としてのメタロチオネイン: ALS関連タンパク質の凝集抑制作用
3. 学会等名 千葉エリア産官学公金共創イノベーションネットワーク 第1回産官学公金マッチングシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eiichi Tokuda, Chika Takashima, Yasuhiro Kosuge, Masahisa Inoue, and Shin-ichi Ono
2. 発表標題 A conformational feature of extracellular misfolded SOD1 with prion-like properties in the extracellular environment surrounding motor neuron-like cells
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会 CJK第1回国際会議 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳田栄一, 桂馬茉衣子, 池田知亜子, 小野真一
2. 発表標題 神経変性疾患ALSに対するメタロチオネインの防御作用: SOD1タンパク質の凝集化抑制
3. 学会等名 第47回 日本毒性学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>日本大学薬学部ホームページ https://www.pha.nihon-u.ac.jp/</p>

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
研究分担者	原 誠 (HARA Makoto) (10817224)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	中嶋 秀人 (NAKAJIMA Hideto) (20330095)	日本大学・医学部・教授 (32665)	

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