

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 15 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500571

研究課題名(和文) アミロイド 線維化促進ペプチドを用いたアルツハイマー病早期診断装置の開発

研究課題名(英文) Development of Diagnosis Device for Alzheimer's Disease Using Amyloid beta Fibrillization Promoting Peptide

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー型認知症(AD)の原因物質となるアミロイド ペプチド(A β)はAD発症リスクを評価できるバイオマーカーである。本研究では血漿中に含まれる極微量のA β を高感度、簡便、迅速、安価に測定することができる検出系を構築し、ADの早期診断装置の開発を目的とした。我々が開発したA β の線維化を促進するペプチドを用いて、1時間以内に数十nMのA β を定量的に検出することができた。今後さらなる高感度化を図り、実用化を実現させたい。

研究成果の概要(英文)：Amyloid beta peptide (A β) is a potential biomarker to evaluate the risk of Alzheimer's disease. Our purpose in this study was to develop a preclinical diagnostic device for Alzheimer's disease with ultra high sensitivity, ease, and high-through put, and at low cost. Using an A β aggregation promoting peptide which was developed by us, we can detect ~10 nM of A β quantitatively within 1 hour. We are now trying to improve the sensitivity to detect plasma A β and put it to practical use.

研究分野：総合領域

キーワード：アルツハイマー型認知症 アミロイド プロテインチップ 電気化学 センサー 水晶振動子マイクロバランス法

1. 研究開始当初の背景

2010年現在、我が国において認知症に苦しむ患者数は約200万人と見積もられており、今後社会の高齢化が進むにつれ、ますますその数は増加していくことが予想されている。中でもアルツハイマー型認知症(AD)は加齢が大きな危険因子であり、患者数の急増が危惧される。

ADの原因は完全に解明されたわけではないが、内在性であるアミロイド前駆体タンパク質から切り出されたアミロイドペプチド(A β)の蓄積、線維化が有力視されている。現在、対話型問診や核磁気共鳴画像法やポジトロン断層法等の画像診断、髄液中のA β 量の検出などの方法により、ADの診断が行われているが、ある程度病態の進行が進まないと判断できない、高額な検査費用が必要、検体の採取にリスクが伴う、など問題も多い。また、現状ではADの根治薬はなく、処方されるのは認知症状の進行を遅延させる薬剤であり、ADを早期に診断する方法の開発が望まれている。

そのような状況下、2008年に米国コロラド大学メディカルセンターのN. Schupfらによって、AD発症者認知症状が顕著になる4,5年前に血漿中のA β が一旦減少し再び増加に転ずることが報告された。

一方、研究代表者らは、ADの症状を亢進すると考えられていたA β と金属イオンの相互作用の研究を進める過程で、A β の凝集を非常に促進するペプチドAFPP (Amyloid β Fibrillization Promoting Peptide)を開発していた。

2. 研究の目的

本研究では、1に記載した状況を踏まえて、血漿中のA β を低侵襲かつ安価に、また簡便に測定することが可能なシステムを開発し、ADの早期診断につながる装置の開発を目的とした。このような装置が開発できれば、健康診断の1科目として血漿中A β 量をモニターし、経年変化を追うことで症状が顕著になる前にAD発症リスクを評価することが可能になると期待できる。

申請期間内には以下の4つのテーマについて検討する予定であった。

- (1) 血漿中に含まれる他成分のA β 線維化に及ぼす影響
- (2) 血漿中のA β 濃度を測定できる測定法の探索
- (3) AFPPの基板上への固定化の最適条件の検討
- (4) 使用済みチップの再生過程の最適化・繰り返し利用可能性の検討

3. 研究の方法

前項で記した4項目を以下の様な方法にて検討した。

- (1) 血漿中に含まれる他成分のA β 線維化に及ぼす影響

血漿中のA β をできるだけ簡便かつ安価に測定するためには、特別な処理を施さずにA β を測定に用いることが望ましい。そこで、血漿中に比較的少量に含まれるタンパク質や少量ではあるがアミロイド線維を形成しやすいタンパク質がA β 線維化・定量に及ぼす影響を検討する。

- (2) 血漿中の濃度を測定できる測定法の探索

通常の実験室レベルでは、数十 μ M程度の濃度のA β を用い、蛍光測定により定量するが、血漿中のA β は数十~数百pMであり、通常の蛍光測定では感度が不足しており検出できない。そこで、表面プラズモン共鳴法 (Surface Plasmon Resonance : SPR) や水晶振動子マイクロバランス法 (Quartz Crystal Microbalance : QCM) などAFPPを用いて、高感度にA β を測定できる方法を探索する。

- (3) AFPPの基板上への固定化の最適条件の検討

SPRやQCMでA β を測定する際、金などの薄膜上にAFPPを固定化する必要がある。A β を高感度かつ特異的に測定するためには、AFPPの固定化量や固定化法を最適化し、また非特異吸着などを防ぐ対策をとる必要がある。そこで、AFPPの固定化量や固定化法、非特異吸着を防ぐための被覆材の有無や種類を検討した。

- (4) 使用済みチップの再生過程の最適化・繰り返し利用可能性の検討

安価にA β を測定するためには、A β 検出に利用する固定化チップを繰り返し測定することが望ましい。そこで一度AFPP上に凝集させたA β のみを洗浄し、チップを初期化する方法の最適化を洗浄液の条件を変化させながら検討し、再利用時の測定値の再現性を調べた。

4. 研究成果

3.に記載した内容を複合的に進めていった結果、次のような成果を得た。

- (1) A β の高感度検出について

AFPPを固定したチップを用いてSPR、QCM、反射干渉分光法(RIFS)などによりA β の検出を試みたところ、SPR、RIFSについては、非特異吸着の影響やAFPPへのA β の凝

集がうまく起こらないなど、高感度検出は困難であった。しかし、本科学研究費で購入した QCM については、1 時間以内に A β を凝集させ、約 100 ng の A β が測定可能であったものの、血漿中 A β の検出には絶対的な感度が不足していることが分かった。

そこで、本 QCM 装置は電気化学測定も可能であったので、A β の凝集を電気化学的に検出することも試みた。その結果、AFPP の効果により QCM 同様 1 時間以内に A β を凝集させ、そこに金属イオンを加えた電気化学測定により、0.1~5 μ M の範囲で A β を定量できることがわかった (図 1)。検出自体は 50 nM でも可能であったが (図 2) 用いた装置の限界 (EQCM 用の測定装置で感度はそれほど高くない) もあって、その濃度では定量性は失われてしまった。

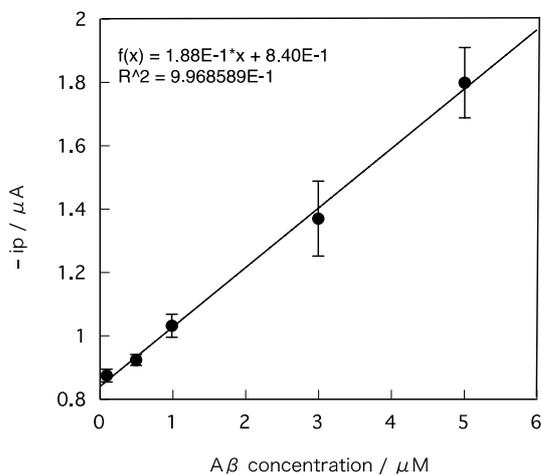
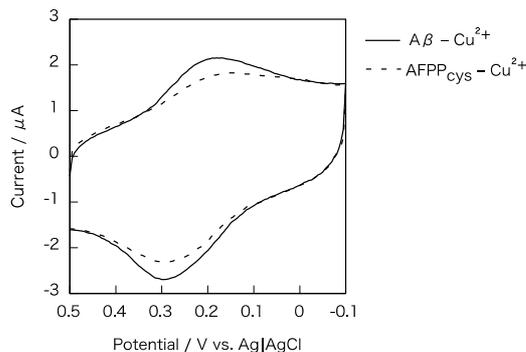


図 1 A β 濃度と電流値の関係

図 2 50 nM の A β を検出したときのボルタモグラム



モグラム

(2) A β 線維化に及ぼす他成分の影響

AFPP による A β 線維化に対する他成分の影響を調べるために、A β と相互作用することが報告されている Amylin (Islet Amyloid Polypeptide, IAPP と呼ばれる)を用いて、蛍光法と電気化学的手法により検討した。蛍光法では、AFPP の有無により Amylin の線維化に変化が無いことがわかった。これは Amylin そのものの線維化が A β よりも非常に早く 1 時間程度で完了することもあって、そ

の効果を正しく評価できていない可能性もある。しかし、QCM 法、電気化学的手法においても、Amylin の共存下で A β の定量的検出には影響しないことがわかった (図 3)。今後、他のアミロイド性タンパク質なども検討する必要があるが、現状のところ AFPP の A β 凝集にはある程度特異性があると考えられる。

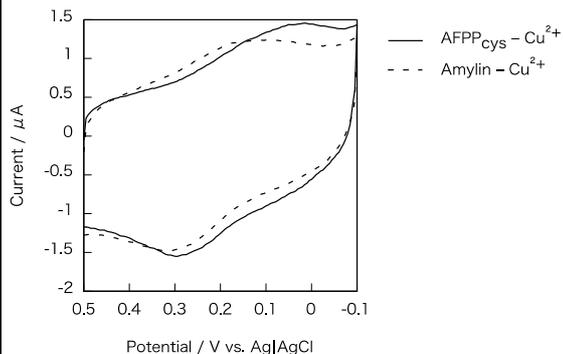
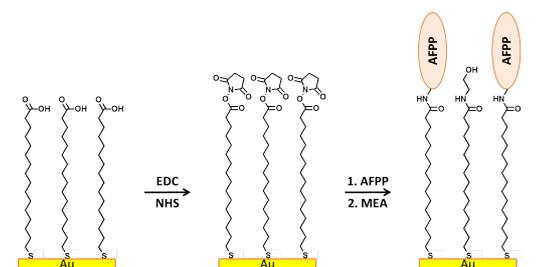


図 3 Amylin を試料としたときのボルタモグラム

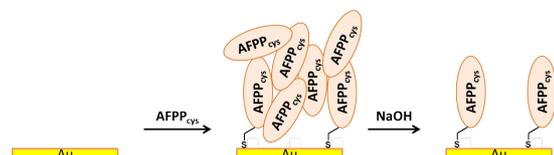
(3) AFPP の基板上への固定化方法の最適化

QCM の場合、A β 凝集量は MHA(16-メルカプトヘキサデカン酸)を SAM 膜として形成した後、AFPP を修飾したものが最も A β の凝集量が多かったが、AFPP あたりの A β 凝集量は AFPP を直接金薄膜に固定化した場合であった。ただし、最大でも添加した A β の 1.5 %程度しか凝集させることができず、凝集を効率良く起こさせる反応条件をさらに追求する必要がある。

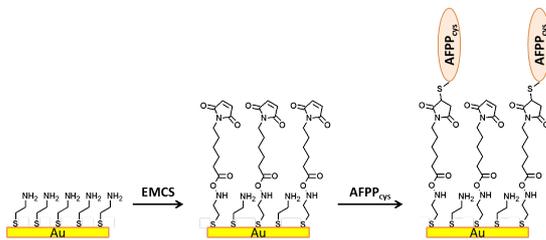
電気化学測定の場合、3 通りの固定化法 (図 4) で検出を行ったが、AFPP を直接金電極に固定した場合の応答が最も高感度であった。



(A) MHA による固定化法



(B) 直接固定化法



(C) AET による固定化法

図4 AFPPの電極への固定化法

(4) 使用済みチップの再生過程の最適化・繰り返し利用可能性の検討

QCM法及び電気化学測定法ともに、一度使用してAβが凝集したチップを洗浄することにより、10分で初期化することが可能であった。また、初期化されたチップを再度測定に利用した際、良好な再現性を示した(図5)。耐久性の限界までは検討できていないが、少なくとも数十回は信頼性のあるデータを得ることができるので、一測定あたりの費用を軽減することが可能であると考えられる。

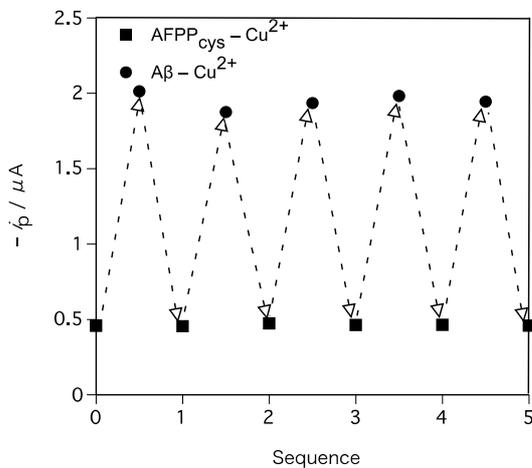


図5 同一電極による繰り返し測定の結果

(5) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

本研究において、血漿中のAβを測定すべく、様々な手法によりAβの高感度、迅速、簡便、安価な測定法の開発に取り組んだ。実試料のAβを測定できるほどの高感度化はまだ実現できていないが、電気化学的手法をさらにブラッシュアップしていくことにより、実試料中のAβを測定できる可能性を見いだせた。また、我々が開発したAFPPを使用することにより、迅速化についても1時間以内に測定を完了させることが可能となっている。さらに、測定に使用したチップを洗浄することで、繰り返し利用可能なシステムを構築できることが示唆されている。

Aβの測定法はこれまで様々なものが報告され、実用化されているものもあるが、測定費用が高額、測定時間が長い、試料採取にリ

スクが伴う、などの問題点もあった。本研究で開発を目指すシステムは、これらの問題点を解決できるものであり、今回得られた結果を活用し、明らかになった問題点をクリアしながら、今後も研究を展開していく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kenji Usui, Hiroto Nishiyama, Kazuma Nagai, Takaaki Tsuruoka, Satoshi Fujii, and Kin-ya Tomizaki

“Control of Site-Specific Silica Precipitation Using PNA Peptides and DNAs”

Peptide Science, 162-163, 2013 (査読有)

Hiroshi Miyazaki, Kenji Usui, and Satoshi

Fujii

“De Novo Designed Nitric Oxide Sensor Protein Consisted of Iron Complex-Peptide Conjugate”

Peptide Science, 303-304, 2012 (査読有)

Hiroshi Miyazaki, Kenji Usui, and Satoshi

Fujii

“A Novel Nitric Oxide Sensor Using Fluorescent Peptides Attached to Iron Complexes”

Peptides: A Building Bridges

The Proceedings of the Twenty-Second American Peptide Symposium, 224-225, 2011 (査読無)

〔学会発表〕(計 13 件)

Kenji Usui, Kazuma Nagai, Hiroto Nishiyama, Aoi Yamada, Takaaki Tsuruoka, Satoshi Fujii, Kin-ya Tomizaki

“Site-Specific Control of Silica Mineralization on DNA Using Designed Peptides”

第50回ペプチド討論会(2013年11月6日～8日 大阪ホテル阪急エキスポパーク)

藤井敏司・宮崎 洋・櫻井健志

「3ヘリックスバンドル構造を有する鉄ジチオカルバメート鉄錯体と一酸化窒素との反応」

第63回錯体化学討論会(2013年11月2日～4日 琉球大学)

白井健二・長井和磨・西山浩人・山田葵・
鶴岡孝章・藤井敏司・宮崎欣也

「設計ペプチドを用いた DNA 上でのシリカ
の位置特異的ミネラルゼーション」

第 7 回バイオ関連化学シンポジウム(2013 年
9 月 27 日~9 月 29 日, 名古屋大学)

園大樹・藤井敏司

「アミロイド 線維化促進ペプチドを用い
たアミロイド の電気化学的検出」

第 7 回バイオ関連化学シンポジウム(2013 年
9 月 27 日~9 月 29 日, 名古屋大学)

Kenji Usui, Hiroto Nishiyama, Kazuma
Nagai, Takaaki Tsuruoka, Satoshi Fujii, Kinya
Tomizaki

“Control of Site-Specific Silica Precipitation
using PNA Peptides and DNAs”

24th American Peptide Symposium (June
22-27, 2013, Hawaii)

西山浩人・長井和磨・鶴岡孝章・藤井敏司・
富崎欣也・白井健二

「PNA ペプチドを用いた DNA 上でのシリカ
の位置特異的沈殿」

第 93 回日本化学会春季年会(2013 年 3 月 22
日~3 月 25 日, 立命館大学 BKC)

園大樹・藤井敏司

「アミロイド ペプチドの線維化促進メカ
ニズムに関する研究」

第 93 回日本化学会春季年会(2013 年 3 月 22
日~3 月 25 日, 立命館大学 BKC)

Kenji Usui, Kazuma Nagai, Hiroto
Nishiyama, Takaaki Tsuruoka, and Satoshi Fujii

“A PNA Peptide for Control of Site-Specific
Silica Precipitation on DNA”

第 49 回ペプチド討論会(2012 年 11 月 7 日~
9 日, 鹿児島大学)

白井健二・西山浩人・長井和磨・鶴岡孝章・
藤井敏司

「人工ペプチドと DNA を用いたシリカ沈殿
の位置特異的制御」

第 6 回バイオ関連化学合同シンポジウム、

(2012 年 9 月 6 日~8 日, 北海道大学)

園大樹・松田春香・藤井敏司

「アミロイド 凝集促進ペプチドの凝集促
進メカニズムに関する研究」

第 6 回バイオ関連化学合同シンポジウム、
(2012 年 9 月 6 日~8 日, 北海道大学)

宮崎洋, 白井健二, 藤井敏司

De Novo Designed Nitric Oxide Sensor
Protein Consisted of Iron Complex-Peptide
Conjugate

第 4 8 回ペプチド討論会(2011 年 9 月 27~
29 日 札幌)

Hiroshi Miyazaki, Kenji Usui, and
Satoshi Fujii

A Novel Nitric Oxide Sensor Using Iron
Complex with Dithiocarbamate-
Fluorescent Peptide Conjugate That Forms
A Three-Helix Bundle Structure

15th International Conference on
Biological Inorganic Chemistry (ICBIC15),
Vancouver, Canada August 7-12, 2011

Hiroshi Miyazaki, Kenji Usui, and
Satoshi Fujii

Novel Nitric Oxide Sensor Using
Fluorescent Peptides Attached to Iron
Complexes

22nd American Peptide Symposium, (San
Diego, CA, USA, June25-30, 2011)

〔図書〕(計 3 件)

藤井敏司

「元素 1 1 1 の新知識 第 2 版 増補版」
講談社ブルーバックス, 桜井 弘編, 2013
年 2 月, 496 ページ

西方敬人・川上純司・藤井敏司・長濱宏治

「ゼロからはじめるバイオ実験マスターコ
ース 1 実験の基本と原理」

学研メディカル秀潤社, 2012/9/27, 171 ペー
ジ

西方敬人・川上純司・藤井敏司・長濱宏治

「ゼロからはじめるバイオ実験マスターコ
ース 2 遺伝子組換え基礎実習」

学研メディカル秀潤社，2012/12/7，211 ページ

6．研究組織

(1)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