

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 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：2014～2016

課題番号：26350552

研究課題名(和文) アミロイド ペプチドの電気化学的検出によるアルツハイマー病早期診断システムの開発

研究課題名(英文) Development of Early Diagnosis System for Alzheimer's Disease by Electrochemical Detection of Amyloid beta 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：血漿中のアミロイド ペプチド(A $\beta$ )の定量によるアルツハイマー病の早期診断を目指した検出系の開発を行った。

我々が開発したA $\beta$ の凝集を促進するペプチド(AFPP)を電極上に固定し、そこにA $\beta$ を集積、銅2価イオンを添加後、電気化学測定を行うことで試料中のA $\beta$ の定量を行ったところ、検出限界5 nMで検出することが可能となった。また、感度向上のため金ナノ粒子を修飾した電極では、検出感度は向上したが、物理的な脆弱性のため、洗浄による初期化再利用には問題が残った。現在のところ、血漿中のA $\beta$ 量を計測する感度には達していないため、更なる高感度化を目指して研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：We have developed an electrochemical sensor that aspires for early diagnosis of Alzheimer's disease by quantifying plasma amyloid-beta peptide. Amyloid-beta (A $\beta$ ) fibrillization promoting peptide, AFPP, which we have developed, was immobilized on a gold electrode, and then A $\beta$  was added. After accumulation of A $\beta$  on AFPP, copper ion was added and electrochemical measurements were carried out. By using this procedure, we succeeded in measuring A $\beta$  with the limit of detection, 5 nM. To improve the sensitivity, we made a gold nanoparticle modified electrode. Although the sensitivity was improved, the physical strength of the modified electrode became weak. Therefore, there is a problem with reusability after initialization by washing. Currently the sensitivity of our method does not reach the plasma A $\beta$  level. Further investigations are now under way.

研究分野：生物無機化学の医療応用

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

## 1. 研究開始当初の背景

2010年現在で、我が国の認知症患者数は約230万人と見積もられており(厚生労働省の発表による)、そのうちの約5割がアルツハイマー病(AD)患者だと推測されている。さらに、今後急速に進む社会の高齢化により、その患者数はますます増加するものと考えられる。

ADの原因は未だ完全に解明されていないが、内在性の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 $\beta$ ペプチド(A $\beta$ )の蓄積、線維化により神経細胞死が引き起こされるというアミロイドカスケード仮説が有力視されている。しかし、A $\beta$ をターゲットにした薬剤の開発は暗礁に乗り上げるケースが多く、最近では同じくADの病理に関係すると考えられているタウタンパク質をターゲットにした薬剤の開発も盛んに行われている。

現在、ADの診断は対話型問診や核磁気共鳴画像法、ポジトロン断層法などの画像診断、髄液中のA $\beta$ 量の測定などにより行われているが、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の問題も多い。根治薬も無い現状を考えると、ADの早期診断が強く望まれている。

A $\beta$ をターゲットにした薬剤の開発は失敗に終わるケースが多いものの、最も早く変化するバイオマーカーとしてA $\beta$ は有力視されており(C.R. Jack, Jr. *et al.*, *Lancet Neurol.*, **9**, 119, 2010)、2008年には米国コロンビア大学メディカルセンターのN. Schupfらによって、AD発症者らの認知症状が顕著になる4、5年前に血漿中のA $\beta$ がいったん減少し、再び増加に転ずることが報告されている(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14052, 2008)。

一方、研究代表者らは、ADの症状を更新すると考えられていたA $\beta$ と金属イオンの相互作用の研究を進める過程で、の凝集を促進するペプチドAFPP(Amyloid  $\beta$  Fibrillization Promoting Peptide)を開発しており、科学研究費補助金(基盤C H23~H25 23500571)によって、AFPPを用いたA $\beta$ の電気化学的定量に成功していた。

## 2. 研究の目的

本研究では、1に記載した状況を踏まえ、血漿中のA $\beta$ を低侵襲かつ安価に、また簡便、高感度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項目として血漿中A $\beta$ 量をモニターし、経年変化を追うことにより認知症状が顕著化する前にAD発症リスクを評価することが可能になると期待される。

申請期間内には、以下の5つのテーマについて検討する予定であったが、進捗状況の関係から、実際に行ったのは(1)~(4)であった。

- (1) 電気化学的検出感度の向上に向けたプロテインチップ作製法の探索
- (2) AFPPのA $\beta$ 線維化促進メカニズムの解明
- (3) 血漿中に含まれる夾雑物質のA $\beta$ 検出に対する影響とその対策
- (4) プロテインチップ初期化の最適化・耐久性向上の検討
- (5) 血漿を試料とした際に生じる諸問題のあぶり出しと対策

## 3. 研究の方法

前項で記した4項目を以下のような方法によって検討した。

(1) 電極表面に固定化された酸化還元種の場合、その数を増加させることが感度向上につながる。そのためには、AFPPが固定化される電極表面の面積を拡げる必要がある。そこで、金ナノ粒子(AuNP)を電極表面に修飾して、A $\beta$ 検出を試みた。また、本科学研究費にて購入した電気化学測定装置を用いて、パルステクニックにより感度が向上するかを検討した。

(2) AFPPの線維化促進メカニズムを解明するために、AFPP単体、A $\beta$ 単体、AFPPとA $\beta$ の混合試料の凝集過程を円二色性(CD)スペクトルやアミロイド線維に特異的に吸着する蛍光試薬ThioflavinT(ThT)で追跡し、生じた線維の形状を透過型電子顕微鏡で調べた。

(3) 血漿中には様々な成分が含まれるが、濃度も高く、最も電気化学的検出に影響を及ぼすと考えられるアスコルビン酸(ビタミンC)共存下でのA $\beta$ 検出を試みた。アスコルビン酸の酸化還元電流を防ぐために、長さの異なるアルキルチオールで電極表面を被覆し、銅イオンの酸化還元電流を測定した。

(4) 高感度化を狙って作製したAuNP修飾電極は物理的に脆く、繰り返し測定に対する耐久性に欠けることが予想される。そこで、アルカンジチオールでAuNPと電極表面、またAuNP同士を連結することで、耐久性が向上するか検討した。

## 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) 感度向上について

通常のAu電極(Au面の直径3mm)の表面に、常法により作製したAuNP(直径約15nm)を修飾した電極を作製した(図1)。酸化還元サイクル(ORC)により表面積の増大を見積もったところ、約20~30倍になっていることがわかったが、作製法の都合上、一定した電極を作製することは困難であった。

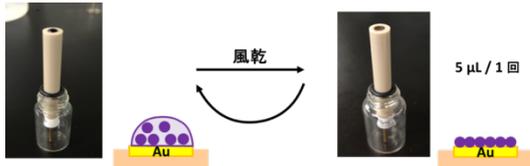


図1 AuNP 修飾電極の作製

通常電極の 27 倍の表面積をもつ AuNP 修飾電極を用いて A $\beta$ を測定した (図2) と、約 8 倍の電流値が得られ、感度が上昇することが分かった (図3)。

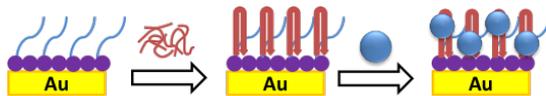


図2 AuNP 修飾電極を用いた A $\beta$ 測定 (赤い線は A $\beta$ を青い○は銅イオンを示す)

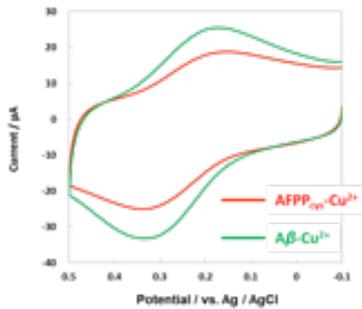


図3 AuNP 修飾電極による A $\beta$ の検出のサイクリックボルタモグラム

また、パルステクニックの1つである矩形波ボルタメトリー (SWV) により同濃度の A $\beta$ を検出したところ、約 1 桁の感度向上を達成できた (従来法の検出限界 18 nM  $\rightarrow$  5 nM)。

#### (2) AFPP による線維化促進メカニズムについて

AFPP の CD スペクトルの経時変化より、AFPP は速やかに  $\beta$ シート構造に変化し、1 時間で小さな構造体を 1 日でアミロイド線維を形成することが分かった。このような速やかな変化は A $\beta$ のみを試料とした際には見られないものであった。また、A $\beta$ と AFPP の混合試料では、AFPP の変化に合わせて A $\beta$ も凝集していく様子が見られたことから、AFPP がコアとなり、そこに A $\beta$ がドッキングしていくことで、通常 A $\beta$ の線維化に見られるラグタイムを回避して、線維化が促進されていることが示唆された。しかし、詳細については不明な点も多いので、今後も検討を進めていく予定である。

#### (3) 夾雑物質による影響について

アスコルビン酸の酸化還元電位(270mV vs Ag/AgCl)は A $\beta$ の検出に用いている銅イオン

の酸化還元電位(250 mV vs. Ag/AgCl)と近接しており、共存した場合、定量測定に影響を及ぼすことになる。そこで、アスコルビン酸が電極表面に接近できないように、さまざまな長さのアルカンチオールで表面を被覆したところ、ドデカンチオール (C12) に電極を 24 時間浸漬させたところ、アスコルビン酸の酸化還元電流をおさえることができた (図4)

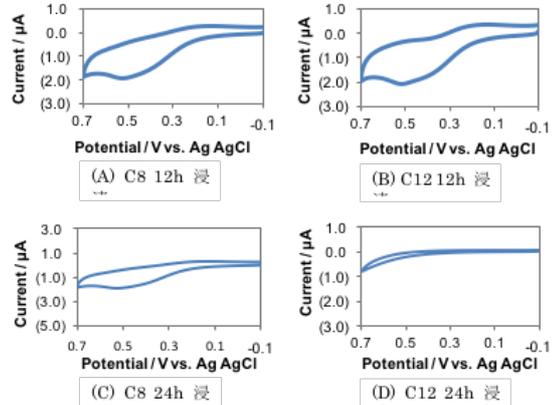


図4 オクタンチオール (C8) とドデカンチオール (C12) で被覆した電極によるアスコルビン酸 (150  $\mu$ M) のサイクリックボルタメトリー測定

ドデカンチオールで電極表面を被覆しても、銅イオンによる A $\beta$ 検出の感度には影響はなかった。さらに、副次的効果として、アスコルビン酸が共存すると、A $\beta$ 検出の感度が若干向上することが分かった。その理由については、現在検討を進めている。

#### (4) 修飾電極の耐久性向上について

AuNP 修飾電極は、AuNP が電極表面に吸着しているだけであるので、A $\beta$ 測定後に行う水酸化ナトリウムとエチレンジアミン四酢酸による洗浄によって剥離していく可能性がある。実際、ORC により電極表面積を測定したところ、洗浄を繰り返す毎に、AuNP が剥離し表面積が減少していくことが分かった。そこで、AuNP と電極表面、AuNP 同士の接着力を上げるために、アルキルジチオールで AuNP 間や AuNP と金表面の固定を試みたところ、若干の強度が向上するものの、AuNP の剥離を防ぐことはできなかった。現在、さらなる改良を重ねて耐久性の向上を図っている。

#### (5) まとめ

本研究では、これまでの我々の測定法の検出限界が 18 nM であったのに対し、測定法の改良、修飾電極の利用などにより 5 nM と一桁減少させることに成功した。しかし、最終目標である血漿中の A $\beta$ を測定するためには、さらに 1 ~ 2 桁の感度向上を図る必要がある。また、修飾電極により感度は向上したものの、耐久性に問題が生じている。今後は、様々な方策による感度の更なる向上と、電極の耐久性の向上などを中心に研究を進めていく。

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6件)

- ① Seiya Watanabe, Kunihiko Tajima, Satoshi Fujii, Fumiyasu Fukumori, Ryotaro Hara, Rio Fukuda, Mao Miyazaki, Kuniki Kino, Yasuo Watanabe  
“Functional characterization of aconitase X as a cis-3-hydroxy-L-proline dehydratase”  
*Scientific Reports*, **6**, 38720 (2016), DOI:10.1038/srep38720
- ② Makoto Ozaki, Kazuma Nagai, Hiroto Nishiyama, Takaaki Tsuruoka, Satoshi Fujii, Tamaki Endoh, Takahito Imai, Kin-ya Tomizaki, Kenji Usui  
“Site-specific control of silica mineralization on DNA using a designed peptide”  
*Chemical Communications*, **52**, 4010-4016 (2016), DOI:10.1039/c5cc07870a
- ③ Koji Kawamura, Runa Nakayama, Ai Matsumoto, Satoshi Fujii, Takashi Murashima  
“Facile Quantification of Alzheimer’s Disease Amyloid- $\beta$  Based on Aggregation-Induced Emission”  
*Journal of Pharmaceutical and Medicinal Research*, **1**, 27 (2015),  
URL:<http://jacsdirectory.com/journal-of-pharmaceutical-and-medicinal-research/articleview.php?id=10>
- ④ Satoshi Fujii, Daiki Sono, Kaoru Matsubara, Hitoshi Abe  
“Electrochemical Quantification of the Alzheimer’s Disease Amyloid- $\beta$  (1-40) Using Amyloid- $\beta$  Fibrillization Promoting Peptide”  
*Sensing and Bio-Sensing Research*, **6**, 7 (2015), DOI: 10.1016/j.sbsr.2015.09.001
- ⑤ Kotomi Takagi, Yasuhiro Kashima, Satoshi Fujii, Kazuya Koumoto  
“Enhanced Chromogenic Sensitivity of Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidative Reactions in the Presence of Betaine-type Metabolite Analogus”  
*Bulletins of the Chemical Society of Japan*, **88**, 1074 (2015), DOI:10.1246/bcsj.20150050
- ⑥ Yuichi Nakagawa, Shiro Sehata, Satoshi Fujii, Hiroaki Yamamoto, Akihiko Tsuda, Kazuya Koumoto  
“Mechanistic Study on the Facilitaion of Enzymatic Hydrolysis by a-Glucosidase in the Presence of Betaine-type Metabolite Analogs”

*Tetrahedron*, **70**, 5895 (2014), DOI: 10.1016/j.tet.2014.06.028

[学会発表] (計5件)

- ① 國光祐希、園大樹、中村暢文、藤井敏司  
「金ナノ粒子修飾電極を用いたアミロイド $\beta$ 測定法の高感度化」  
電気化学会第48回大会 (2017年3月25日～3月27日、首都大学東京 (東京都八王子市))
- ② 國光祐希、中村暢文、藤井敏司  
「金ナノ粒子修飾電極を用いたアミロイド $\beta$ 定量法の高感度化」  
第10回バイオ関連化学シンポジウム (2016年9月7日～9日、石川県音楽堂・もてなしドーム (石川県金沢市))
- ③ Murashima Takashi, Koji Kawamura, Runa Nakayama, Ai Matsumoto, Satoshi Fujii  
“The development of diagnosis tools for Alzheimer’s diseases based on AIE phenomenon”  
Pacifichem2015, (2015年12月15日～20日、Honolulu, Hawaii, USA)
- ④ 河村浩司、松本亜衣、中山瑠奈、藤井敏司、村嶋貴之  
「凝集誘起発光 (AIE) 色素標識プローブを用いた生体分子検出法の開発」  
第8回バイオ合同シンポジウム (2014年9月11日～13日、岡山大学 (岡山県岡山市))
- ⑤ 藤井敏司、青屋奈津希、萩野千夏、宮崎洋  
「Three Helix Bundle 型人工金属タンパク質におけるペプチド長の効果について」  
第8回バイオ合同シンポジウム (2014年9月11日～13日、岡山大学 (岡山県岡山市))

[図書] (計1件)

- ① 西方敬人、川上純司、藤井敏司、長濱宏治、川内敬子  
「ゼロからはじめるバイオ実験マスターコース3 細胞培養トレーニング」  
学研メディカル秀潤社、2015/3/27, 176ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：アミロイド $\beta$ ペプチドを電気化学的に測定するためのバイオセンサ  
発明者：藤井敏司  
権利者：学校法人甲南学園  
種類：特許  
番号：特願 2015-60724  
出願年月日：2015年3月24日  
国内外の別：国内

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