

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14254

研究課題名(和文) A オリゴマー化動態検出センサの構築

研究課題名(英文) Fabrication and development of biosensor to detect aggregation of amyloid-beta oligomer

研究代表者

野田 実(Noda, Minoru)

京都工芸繊維大学・電気電子工学系・教授

研究者番号：20294168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質異常化凝集・蓄積型疾患であるアルツハイマー病の早期簡易診断および病理変化の進展度評価ができるアミロイド(A β)オリゴマー化動態検出センサの構築を進めた。構成するセンサデバイス技術、バイオ技術として、A β オリゴマー化動態検出センサの構築、センサ高感度化の研究、ELISA結果との比較、を研究対象として進めた。マイクロ流路を有するリポソームカンチレバーセンサから構成される μ TASチップを試作し、特にヒト血清中でのA β オリゴマー化に関連する同線維伸長動態を選択的に検出できた。またリポソーム脂質種の選定、低雑音化回路技術、基板温度制御技術により1 nM以下の高感度検出性が推定できた。

研究成果の概要(英文)：Liposome biosensors are developed to detect dynamics of aggregation and fibrillization of amyloid-beta oligomer. Those sensors are expected to realize early and simple diagnosis and evaluation of progress in pathological change of Alzheimer Disease that expresses aggregation and accumulation of abnormal protein. In this research, both sensor device and biosensing phospholipid of liposome are investigated and developed as follows: I. Construction of the sensor device, II. Improvement in sensitivity of the sensor, and III. Comparison with ELISA result. A micro-TAS chip comprising of liposome cantilever sensor and microfluidic channels was fabricated. Consequently, dynamic aggregation and fibrillization of amyloid-beta related to its oligomer was selectively detected in human serum. Also, a high sensitivity was estimated that can detect less than 1 nM by excellent selection of phospholipid species, techniques of low-noise electronic circuit and precise temperature control of substrate.

研究分野：集積デバイス工学

キーワード：バイオセンサー A オリゴマー 動態

1. 研究開始当初の背景

高齢者人口の加速度的増大に伴い蛋白質異常化凝集・蓄積型疾患であるアルツハイマー病(AD)等予防のための初期早期診断、特に簡易診断の重要性が益々高まり渴望されている。そのため簡易・短時間測定を可能とする診断チップ技術の重要性認識が強くなり、従来のバイオ化学分析技術とは異なる技術の具体化が非常に期待されている。本申請研究の対象とするAD原因物質と考えられるA β 蛋白質の検出には抗原抗体反応を用い、現在国内外の臨床現場ではELISA(酵素免疫吸着測定法)が主流、研究ベースでSPR(表面プラズモン共鳴)が主要な方法となっており、最近特に血漿中A β やA β 凝集体の中でもA β オリゴマー化の経時・動的挙動がバイオマーカーとしてなお一層注視されているが依然詳細不明である。前者の方法は蛍光標識分子を用いた高感度測定であるが測定時間、プロセス習熟、機器熟練等多大な手間がかかり非常に煩雑である、後者は精密光学系構築とその精密調整が不可避で、今後の診断対象者の爆発的増大目前において、両者とも**本格診断以前の初期簡易診断には適していない**。

2. 研究の目的

アルツハイマー病(AD)等の多様な認知症患者において、抗原抗体反応では不可能な疾患特異的な関連蛋白オリゴマーの動態化を検出し、迅速に、患者の血液・髄液で定量できる各々の認知症患者の**早期簡易診断**(診断バイオマーカー)および**病理変化の進展度評価**(重症度バイオマーカー)できる汎用ポテンシャルの高い電子物理的歪検出カンチレバーセンサ、さらにダイアフラム型センサの実現可能性を測定原理、構成エレクトロニクス技術面から検討する。

3. 研究の方法

本申請研究調査の研究計画に記載した以下の項目について行った。

I. A β オリゴマー化動態検出センサの構築

1.) オリゴマー検出脂質膜の適用検討

2.) オリゴマー検出リポソームの選定、調製

3.) 合成蛋白オリゴマーの調製

4.) センサ動作の基本構成

5.) μ TAS用センサ素子の構成、測定、評価

II. センサ高感度化の研究

1.) 抵抗歪ゲージ出力特性の低雑音化(変動幅1ppmオーダー)

①参照抵抗とのブリッジ回路化： 温度変化依存抵抗変動補償

②恒温装置内導入を可能とするバイオチップ構造($\Delta T = \pm 0.2^\circ\text{C}$)

2.) PZT圧電薄膜センサ化による動的検出

III. ELISA結果との比較

1.) 同一種サンプルのELISA測定、評価

4. 研究成果

I. A β オリゴマー化動態検出センサの構築

1.) オリゴマー検出脂質膜の適用検討

オリゴマーさらには線維前駆体(プロトフィブリル)と強い相互作用を有する候補脂質材料(例：中性脂質と疎水性脂質の混合系)が適用できる。一方で他報告材料(Nat Med 1995;1:1062-6, Mol Neurobio 2013;43:613-21, Neuron 2014; 82:308-19, Biophys J. 2014; 107:1441-52)の適用検討も考えられたが、今回はモノマー相互作用が抑制されオリゴマー相互作用が強いと報告されている cholesterol との混合系を主に検討することとした。ちなみに cholesterol 混合系はより生体膜構成により近く興味深い。

2.) オリゴマー検出リポソームの選定、調製
リポソーム用脂質種は、従来生体膜構成比率が最も高いDPPCに特化していたが、親水基、疎水基が異なり、室温での膜流動性の異なるDSPC, POPC, DMPC, DPPE, DPPGリポソームを新たに調製し、DPPCリポソームと同等サイズ約100nm径の調製条件を得た。

3.) 合成蛋白オリゴマーの調製

合成調製用設備に不具合が発生し本研究期間内での調製が困難となったため、市販キット(Sigma Aldrich社製)中相当A β オリゴマー溶液の使用が可能かを検討した。

4.) センサ動作の基本構成

今回実現を目指すセンサ動作では、最終的に被験者血液中の通常A β モノマーが脳細胞模倣膜としてのオリゴマー検出リポソーム上でどのように経時的に凝集するかの動態(kinetics)検出を行う。生体試料中のある時点の認知症関連蛋白オリゴマーをリポソーム上に捕捉した後に疾患関連蛋白モノマーを測定系流路に導入し、そのオリゴマーがカンチレバー上で凝集する反応のkinetics測定を狙っている。そのためのデバイス構造化を検討する(図1)。

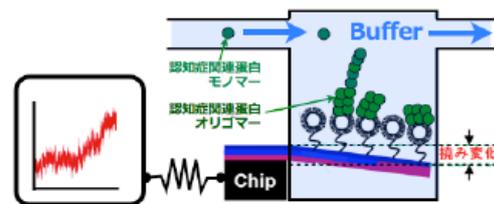


図1 A β オリゴマー化動態検出センサデバイス構造の概念図

5.) μ TAS用センサ素子の構成、測定、評価 各セルごとに異なるオリゴマー検出リポソーム

ーム種を設置してセンサアレイ動作させるための μ TAS用アレイセンサ構造を作製し、種々状態の被験者血液(、あるいはモノマー、オリゴマー状態を変化させた実験溶液)導入用マイクロ流路、各セルでのリポソーム固定化カンチレバーセンサを基本構成とした。その結果、生体親和性材料 PDMS でマイクロ流路構造を作製しその内部にカンチレバーセンサを構成した μ TAS チップを作製し、溶液流体制御性を確認した(図2)。その後カンチレバーセンサの正常出力動作を確認できた。但しセンサ出力雑音低減の必要性が明白になったため後節のセンサ高感度化により注力することとした。

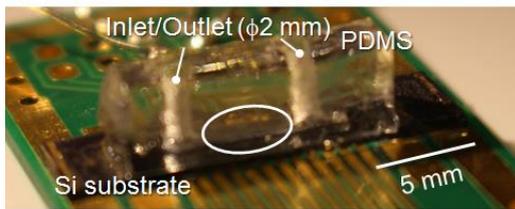


図2 カンチレバーセンサチップ上に設置したPDMSマイクロ流路

モノマー相互作用が抑制されオリゴマー相互作用が強いと期待される cholesterol との混合系を選定する前に、単一脂質種として感度が高い脂質種を実測により選定した。上述の6種脂質では、PC 以外の親水基を有する場合(DPPG, DPPE)、モノマー段階から非常に感度が高いが静電性相互作用が発現しており、ヒト血清中では他の多くのタンパク質と相互作用を生じるために不適と判断された。一方従来からの DPPC と同様に PC 親水基を有する場合(DMPC, POPC, DSPC) (図3)では中性であり静電性相互作用は発現せず疎水性相互作用が主と判断された。この中で疎水基長が短く不飽和炭素を有しない DMPC は流動性が高く相互作用がより大きいと推定されたが実測でも最大であった。よって脂質候補として DMPC を選定した。但し高感度と相俟ってモノマー段階からも強い相互作用を示し(他報告と一致)、cholesterol との混合系によるモノマー段階からの相互作用抑制を期待した。実測の結果、期待通りモノマー段階での相互作用は抑制されオリゴマー段階以降での相互作用強度増大が確認された(図4)。またヒト血清のみでの測定で DPPC/ cholesterol 混合系では相互作用強度の経時的変化はほぼ見られず、A β の凝集線維伸長現象を選択的に検出できることが明らかになった。

II. センサ高感度化の研究

1) 抵抗歪ゲージ出力特性の低雑音化(変動幅 1ppm オーダー)

①参照抵抗との分圧回路化、低雑音化フィル

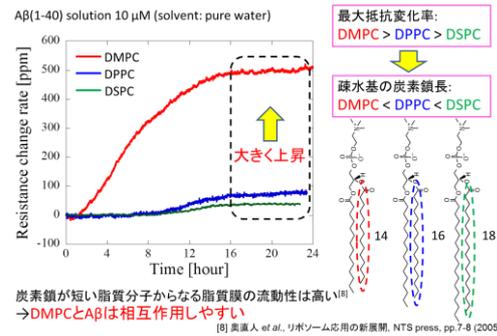
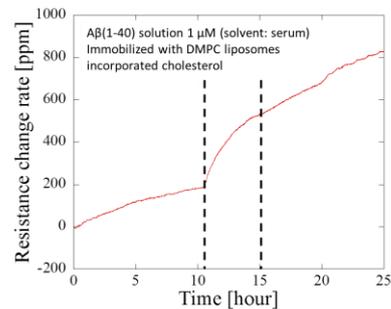


図3 PC親水基を有する脂質種リポソームでのA β 凝集線維伸長によるセンサ出力の経時特性と各疎水基の比較



時間	抵抗	A β の状態	A β との相互作用	血清との相互作用
0-11 h	増加	モノマー	○	×
11-15 h	急激に増加	凝集体	○	○
15 h-	増加率減少	A β 線維	×	○

抵抗変化の傾向から血清中においてもA β の凝集過程検知可能であることが示唆

図4 DMPC/cholesterolを用いたヒト血清中A β 凝集線維化のカンチレバーセンサ出力経時特性

タ技術の導入： 温度変化依存抵抗変動補償抵抗歪ゲージ NiCr 材料抵抗の温度依存性による抵抗変動を十分低減するために、同材料による参照抵抗との分圧回路化により抵抗の温度変化の影響をキャンセルする。基本機能を確認できたので(約 15-20 ppm)、参照抵抗形状、レイアウト位置等により特性、再現性向上を図ったが大きくは改善しなかったため、低雑音化フィルタ技術を検討した。センサ出力経時特性から周波数特性に変換し雑音発生周波数領域を確認した結果、 10^{-4} Hz 台に集中していたので同帯域のバンドストップフィルタ処理をバターワースフィルタによる出力信号ソフトウェア処理で行った。その結果、雑音変動を $\pm 1-2$ ppm まで低減できた。本低雑音化を行わない前節の DMPC/cholesterol での測定結果では 10 nM まで測定できており、本低雑音化で 1 nM オーダー以下の A β オリゴマー検出が可能と考えられる。

②測定系基板の高精度温度制御化 ($\Delta T = \pm 0.1$ °C)

従来同軸マイクロプロービングによりカンチレバーセンサ出力測定をしており、接触状態再現性、室内温度変動、電磁シールドの不

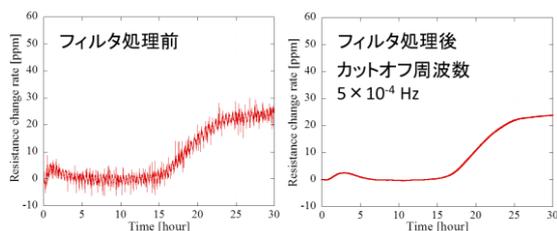


図5 バンドストップフィルタ(上限 5×10^{-4} Hz)によるセンサ出力の低雑音化 (1桁以上改善)

完全性が懸念された。このうち最も懸念の温度変動の対策として、測定系基板の高精度温度制御化を進めた。2cm角のペルチエ素子を同基板に埋込み測温フィードバック制御により温度制御を行い、設定温度として7-90°Cで制御でき、 $\Delta T = \pm 0.1$ °Cでの温度管理能力を確認した。本研究では脂質種を多く検討しており、相転移温度が低い場合常温で液相になる場合もあり、7°Cまで測定温度が低温化できるよう基板冷却機構も取入れた。①の低雑音化で $\pm 1-2$ ppmまでの測定が推定できたので、今後1 nM以下の検出時に本温度制御基板を使用する。

2) PZT 圧電薄膜センサ化による動的検出

圧電体を用いた振動センサとしてA β オリゴマー化/凝集時の応力を振動板の共振周波数変化として捉える。センサ構造の考察・設計を進めた。

同構造作製の問題点として、(1)液保持構造中液を上から供給する場合。振動板としてのPZT圧電薄膜ダイアフラムに接触の際の同膜の強度保持、(2)振動板を最上部にして強度確保の必要性を回避する場合、液供給、あるいは液滴保持構造をどうするか、の点で、センサ/ μ TASの構造設計中である。

III. ELISA 結果との比較

1) 同一種サンプルのELISA測定、評価

前述のように合成オリゴマーの調製ができなかったため、前述の市販品を用いるが同内容分子でのELISA評価結果は有している。そのため、本研究でのセンサ測定結果との初回としての比較を行える状況にある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. "A cantilever-based biosensor for real-time monitoring of interactions between amyloid- β (1-40) and membranes comprised of phosphatidylcholine lipids with different hydrophobic acyl chains", Z. Zhang, Y. Murakami, T. Taniguchi, M. Sohigawa, K. Yamashita, M. Noda: *Electroanalysis*, (査読有) **29**(3) (2017) 893-899.

2. "Biosensing of interaction between phospholipid membrane of liposome as model cell membrane and amyloid-beta protein in human serum by dielectric dispersion analysis", T. Yoshikawa, Z. Zhang, K. Yamashita, M. Noda: *Sens. Actuators B: Chemical*, (査読有) **236**(11) (2016) 1028-1035.
3. "Real-time characterization of fibrillization process of amyloid-beta on phospholipid membrane using a new label-free detection technique based on a cantilever-based liposome biosensor", Z. Zhang, M. Sohigawa, K. Yamashita, M. Noda: *Sensors and Actuators B: Chemical*, (査読有) **236**(11) (2016) 893-899.
4. "A Micromechanical Cantilever-Based Liposome Biosensor for Characterization of Protein-Membrane Interaction", Z. Zhang, M. Sohigawa, K. Yamashita, M. Noda, *Electroanalysis*, (査読有) **28**(3) (2016) 620-625.
5. Majbour NK, Chiasserini D, Vaikath NN, Eusebi P, Tokuda T, van de Berg W, Parnetti L, Calabresi P, El-Agnaf OM. Increased levels of CSF total but not oligomeric or phosphorylated forms of alpha-synuclein in patients diagnosed with probable Alzheimer's disease. *Sci Rep.* (査読有) 2017;7:40263.
6. "Monoclonal antibody with conformational specificity for a toxic conformer of amyloid β 42 and its application toward the Alzheimer's disease diagnosis", Murakami K, Tokuda M, Suzuki T, Irie Y, Hanaki M, Izuo N, Monobe Y, Akagi K, Ishii R, Tatebe H, Tokuda T, Maeda M, Kume T, Shimizu T, Irie K. *Sci Rep.* (査読有) 2016;6:29038.
7. "Calcein leakage behavior from vesicles induced by protein-vesicle interaction: a study by surface pressure-area isotherms", Saki Fukuma, Toshinori Shimanouchi, Keita Hayashi and Yukitaka Kimura, *Chemistry Letters*, (査読有) <http://dx.doi.org/10.1246/cl.170119>
8. "Contactless Liquid Sensing Technique Using a Quartz Oscillator", Tsubasa Susa, Takeru Watanabe, Masayuki Sohigawa, Takashi Abe, *Sensors and Materials*, (査読有) Vol. 28, No. 4, pp. 289-294, 2016, DOI: 10.18494/SAM.2016.1179.
9. "微量液体に対応した水晶発振回路式液体濃度センサの開発", 柳田祐太, 須佐翼, 寒川雅之, 安部隆, *電気学会論文誌 E*(査読有), Vol.136, No.7,

pp.319-322, 2016, 10.1541/ieejmas.136.319.

10. “水素振動子を用いた液体分析用コンボセンサにおける形状最適化”, 坂井了, 今井寛明, 寒川雅之, 安部隆, 電気学会論文誌 E (査読有), Vol.136, No.8, pp.343-347, 2016, 10.1541/ieejmas.136.343.

[学会発表] (計 13 件)

1. "Dielectric Dispersion Analysis of Interaction with Plural Phospholipid Species of Liposome by Arrayed Cells System Using Small Open-Ended Coaxial Probe", M. Kawasaki, K. Yamashita, M. Noda: C-4-117, *IEEE Sensors 2016*, (査読有) Orlando, USA, Oct. 30–Nov. 2 (2016) 1368.
2. "A Highly Sensitive Amyloid- β Detection by Cantilever Microsensor Immobilized with Liposome with Incorporated Cholesterol and Phosphatidylcholine Lipid with Short Hydrophobic Acyl Chains", Y. Murakami, T. Taniguchi, Z. Zhang, M. Sohgawa, K. Yamashita, M. Noda: A-4-115, *IEEE Sensors 2016*, (査読有) Orlando, USA, Oct. 30–Nov. 2 (2016) 208.
3. "Improvement of sensitivity for A β Protein on Cantilever Biosensor by Incorporating DPPC Liposome with Cholesterol", Y. Murakami, T. Taniguchi, Z. Zhang, M. Sohgawa, K. Yamashita, M. Noda: W189h, *MicroTAS 2016*, (査読有) Dublin, Ireland, Oct. 9–13 (2016) 1390.
4. "Detection of Fibrillization Process of Amyloid Beta Protein Using Arrayed Biosensor with Liposome Encapsulating Fluorescent Molecules", R. Imamura, T. Shimanouchi, N. Murata, K. Yamashita, M. Fukuzawa, M. Noda: MP.FLU-4-8198, *The 30th European Conference on Solid-State Transducers (Euroensors2016)*, (査読有) Budapest Hungary, Sep. 4–7 (2016) 1414–1417 (in *Procedia Engineering*, vol. 168).
5. "A High-Sensitive Detection of Several Tens of nM of Amyloid-Beta by Cantilever-Type Biosensor Immobilized DPPC Liposome Incorporated with Cholesterol", Y. Murakami, Z. Zhang, T. Taniguchi, M. Sohgawa, K. Yamashita, M. Noda: MP.CHM-25-8204, *The 30th European Conference on Solid-State Transducers (Euroensors2016)*, (査読有) Budapest Hungary, Sep. 4–7 (2016)

565–568 (in *Procedia Engineering*, vol. 168).

6. "Enhanced sensitivity of cantilever-based liposome biosensor for detection of A β aggregation and fibril growth by incorporating DPPC liposome with cholesterol", Z. Zhang, Y. Murakami, T. Taniguchi, M. Sohgawa, K. Yamashita, M. Noda: *Biosensors 2016*, (査読有) Gothenburg, Sweden, May 25–27 (2016)
7. 【招待講演】 "Growth Behavior of Amyloid Fibrils on Membrane Interfaces of Lipid Membranes", Toshinori Shimanouchi, Saki Fukuma, Miki Iwamura, Yukitaka Kimura, Hiroshi Umakoshi, , Annual Meeting on AICHE 2016, (査読有) San Francisco, 2016年11月14-17日
8. "Accumulation and fibril formation of amyloid β on lipid-or polymer-based membranes", Toshinori Shimanouchi, Miki Iwamura, Shintaro Deguchi, Yukitaka Kimura, KJF-ICOME 2016, (査読有) Hakata, 2016年9月5~7日

[その他]

<http://www.cis.kit.ac.jp/~led/>

http://www.es.kit.ac.jp/upload/labs/eled_device.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 実 (NODA MINORU)

京都工芸繊維大学・電気電子工学系・教授
研究者番号：20294168

(2) 研究分担者

徳田 隆彦 (TOKUDA TAKAHIKO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科
(研究院)・教授
研究者番号：80242692

島内 寿徳 (SHIMANOUCI TOSHINORI)

岡山大学・環境生命科学研究科・准教授
研究者番号：10335383

寒川 雅之 (SOHAWA MASAYUKI)

新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号：70403128

山下 馨 (YAMASHITA KAORU)

京都工芸繊維大学・電気電子工学系・
准教授
研究者番号：40263230