

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：34506
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K01430
研究課題名(和文) アルツハイマー病の早期診断を志向するアミロイド の電気化学的バイオセンサの開発

研究課題名(英文) Development of electrochemical biosensor for amyloid beta peptide which can realize early diagnosis of Alzheimer's disease

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、超高齢化社会を迎えた現在における喫緊の課題であるアルツハイマー病の発病リスクを発症前の早期に可能とする測定システムの構築に資する電気化学的バイオセンサの開発を目的とした。申請者らが開発した、発病の鍵を握るアミロイド の凝集を促進するペプチドを固定化した修飾電極を用いて、アミロイド 抗体を用いない安価な方法としては最高クラスの高感度な測定系を構築できた。しかし、目的とする血中アミロイド の測定感度には達していないため、更なる高感度化を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義
アルツハイマー病は、根本治療薬がないため、出来るだけ早期の発見が望まれるが、現状、有効な早期診断法は開発されていない。本研究で開発を目指す測定系は、健康診断の1項目として採用できるよう少量の血液から迅速、簡便、安価にアミロイド を測定するものであり、開発に成功すれば、多くの人々のアルツハイマー病の発症リスクを定期的に評価できる。早期に発見することで、早期に対策をし、患者のQOLをできるだけ高く維持することが可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have been developing an electrochemical biosensor for beta-amyloid peptide, which is believed to be a causative agent for Alzheimer's disease, in order to achieve the early diagnosis of Alzheimer's disease. By using a peptide which promotes the fibrillization of beta-amyloid peptide, we succeeded in developing one of the highest sensitive be-ta amyloid sensor that does not use be-ta amyloid antibody.
Since we have not reached our final goal to measure beta-amyloid peptide in plasma, further investigation is now under way.

研究分野：生物無機化学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド 電気化学 バイオセンサ 早期診断

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 世界的に高齢化社会を迎えつつある中、増え続ける認知症患者は、人類にとって大きな問題となっている。我が国においても、200万人を超える認知症患者がおり、その6~7割をアルツハイマー病(AD)患者が占めていると考えられている。ADの発症原因は未だ厳密には明らかになっていないが、内在性のタンパク質であるアミロイドβペプチド(Aβ)やタウタンパク質などの異常な折りたたみが主たる原因であるとする説が有力である。

(2) 上記のように世界的な喫緊の課題であるADであるものの、根本治療薬は存在せず、症状の進行を遅延させる4種の薬剤のみが処方されている状況である。また、他の病気とは異なり、認知症患者には介護も必要となるため、対応するための社会的コストは莫大なものとなる。今後予想される高齢者人口の急増とともに、認知症患者数も急増することが予想されることから、病因の解明、診断法や根本治療薬の開発などの対策が急務であり、それらの解決に対する社会からの期待も大きいものであった。

2. 研究の目的

(1)本研究では、上記のような課題の解決の一つとして、ADの発病リスクを早期に評価できるような、簡便、迅速、安価でハイスループットにサンプル処理できる測定法の開発を目的とした。現在、ADの診断はMRIと放射性物質を用いたPETやSPECTなどの画像診断の併用や問診により行われており、Aβ量の測定は脊髄穿刺による脳脊髄液の採取後、抗体を用いたELISAなどにより行われている。しかし、画像診断はある程度症状が進行しないと判断が難しく、費用も高額で施設も限られる。また、脊髄穿刺は試料採取の際患者へのリスクもあり、共に予防診断として利用するには障害も多い。本研究では、これらの問題点を解決すべく、数多くの人々が受診する健康診断で実施されている血液検査の1項目として、各個人の血漿中のAβ量の経時変化を追跡できるような測定法の開発を目指している。

(2) 血漿中Aβ量の経時変化で早期にリスク評価が可能となる根拠として、血漿中のAβ量とADの発症に関する大規模追跡調査の結果がある(参考文献①)。血漿中のAβは加齢とともに増大するが、脳内に蓄積を始めると一旦減少に転じ、その減少は認知症状の顕著化の3、4年前に起こることが報告された。この変化を、安価、迅速、簡便かつ大量に処理できるような測定法の開発を目指して研究を行った。

3. 研究の方法

(1)我々が独自に開発したAβの凝集を促進するペプチドAFPPは、通常3~4日必要とするAβの線維化凝集時間を3~4時間に短縮し、かつ、自然凝集可能な数10μM以下のAβ40を凝集させることができる。このAFPPを金電極の上に修飾し、そこへAβ40を凝集させて、Aβ40と親和性が高く1:1で結合することが知られている銅2価イオンを結合させることで、得られた電流値からAβ40の定量を行うのが基本的な測定系である(図1。参考文献②)。

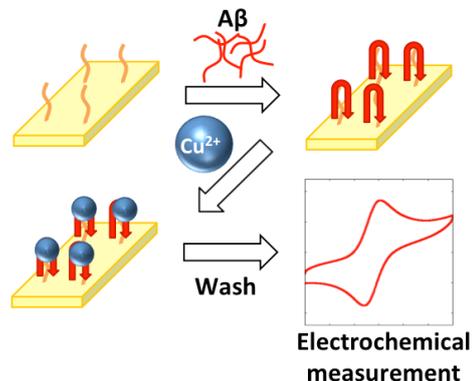


図1 Aβ測定法の概略図

(2)上記の方法の感度を高くするために、電極の表面積を拡げるため、金ナノ粒子や多層カーボンナノチューブなどで修飾した電極も用いた。

(3)AFPPの能力向上を図るため、配列を変えた改変型AFPPを用いた修飾電極を用いて、Aβ凝集量の向上を図った。

(4)さらに、電極表面の修飾状態と測定感度の相関を得るために、インピーダンス測定も行った。また、インピーダンスは電極表面の状態を鋭敏に反映するため、Aβ40の凝集によるインピーダンス値の変化から定量することも試みた。

4. 研究成果

(1)図2に示すように、金ナノ粒子を電極表面に修飾することで、表面積を約90倍増大させることが可能であった(図2)。その結果、AFPPの固定化量は約20倍に、また、同量のAβを測定した際に、約40倍の見かけの感度上昇を得ることができた。

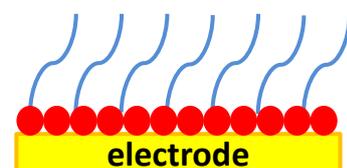


図2 金ナノ粒子修飾電極の模式図

(2) 19 残基からなる AFPP の配列を改変することで、 $A\beta$ の凝集能力の向上を図った。従来の AFPP は、現在の実験条件では、試料として添加した $A\beta$ 40 の 1% しか、電極上に集積することが出来なかった。いくつか合成した変異体のうち、6 番目のヒスチジンをプロリンに置換した変異体を用いた電極では、試料中の約 3% の $A\beta$ 40 を集積させることができた。このことにより、見かけ上の測定感度は従来型に比べて約 3 倍に向上した。

(3) 電極表面への AFPP の固定化の状態と $A\beta$ 40 の検出能力の相関を得るために、修飾電極のインピーダンスとその電極の $A\beta$ 40 測定を行った。その結果、AFPP を固定化した際のインピーダンス値は、温度や AFPP 固定化条件を様々検討しても一定しないことが判明した。ただし、表面のインピーダンス値にかかわらず、微分パルスボルタメトリで測定した電流値はほぼ一定であり、表面インピーダンス値と、電極の $A\beta$ 40 測定能力には明確な相関が無いことがわかった。

(4) これまで、修飾電極上に集積させた $A\beta$ 40 に 1 : 1 で銅 2 価イオンを結合させることで流れる電流値により、定量を行ってきたが、電極のインピーダンス値は表面状態に鋭敏に応答する。そこで、電気化学インピーダンス分光法 (Electrochemical Impedance Spectroscopy: EIS) により $A\beta$ 40 の定量を試みた。

図 3 に $A\beta$ 濃度を変化させたときの AFPP 修飾電極の Nyquist plot を示す (橙: 0.5, 灰: 0.1, 黄: 0.01, 青: 0.001 μM $A\beta$ 40)。図 3 の半円の直径がほぼ電荷移動抵抗値 (Rct) に相当するが、添加した $A\beta$ 40 の量に依存して、抵抗値が変化していくことがわかった。

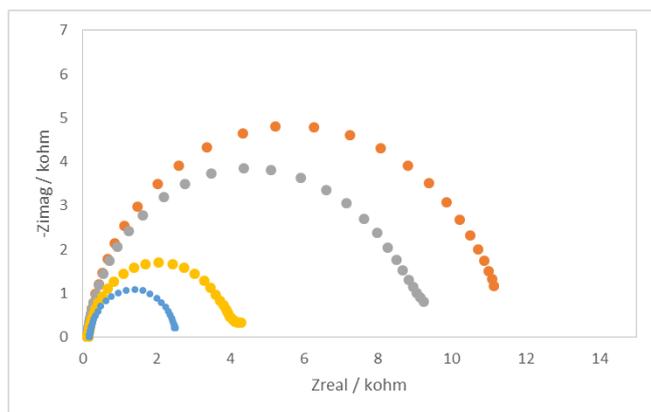


図 3 EIS 測定結果の Nyquist Plot

(5) EIS 測定により得られた $A\beta$ 40 と Rct 値との関係を表すグラフを図 4 に示す。 $A\beta$ 40 濃度に対して、Rct は良好な直線関係を示し、EIS による $A\beta$ 40 の定量が可能であることがわかった。また、現段階での定量限界は 20 nM と求められ、我々のプロトタイプの実験法 (参考文献②) の定量限界値 180 nM よりも 9 倍の向上が達成することができた。

図 4 の測定結果については、金ナノ粒子や多層カーボンナノチューブで修飾していないため、電極面積の拡大を合わせることで、更なる感度上昇が期待できることから、今後は、良好な電極作成、高凝集性改良型 AFPP の開発、測定法のブラッシュアップなどを同時進行で行い、目的とする血漿中 $A\beta$ の測定が可能な測定システムの構築を図る。

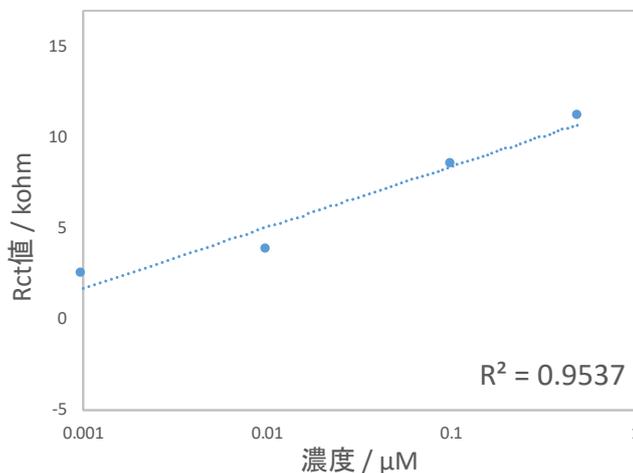


図 4 Rct 値の $A\beta$ 40 濃度依存性

<引用文献>

- ① C. R. Jack, Jr. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008, 105, 10452-10457
- ② S. Fujii et al., Sens. Biosens. Res., 2015, 6, 7-12

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 國光祐希、藤井敏司
2. 発表標題 表面積を増加させた電極を用いたアミロイド 定量法の検討
3. 学会等名 電気化学会第49回大会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----