

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：14303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630157

研究課題名(和文) A 異常化疾患簡易診断のための標識フリー集積チップ指向リポソーム物理センサ

研究課題名(英文) Liposome Physical Sensors Oriented to Label-free Integrated Chip for Early Diagnosis of Diseases Originated from Amyloid-beta Abnormality

研究代表者

野田 実 (Minoru, Noda)

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：リポソーム物理センサのセンシング手法として検討する開口プローブ誘電分散解析にて、複数のセンシング分子としての脂質種を使用でき、かつ異なるターゲットバイオ分子種・条件を同時に計測するためのアレイ計測システムを構成し、基本動作が可能であることを確認するとともに、複数セルの利用、測定から、健常者ヒト血清中でもA $\beta$ (1-40)の脂質膜(生体模擬膜)上の線維伸長・凝集反応現象を同誘電分散スペクトルでの誘電緩和幅変化から検出できた。申請者の他のセンサ技術であるカンチレバーセンサの測定からも同様の現象を確認できた。異なる脂質膜間ではA $\beta$ との相互作用強度が異なることが明白になり、本センサ感度向上の知見を得た。

研究成果の概要(英文)：We have developed a new biosensing system composed of arrayed cell structure for dielectric dispersion analysis (DDA) of interaction with phospholipid membrane of liposome in order to enable to use plural different phospholipids as sensing molecule, as similar to cell membrane, and to measure simultaneously plural different target biomolecules such as proteins with different conditions. When measuring with normal human serum, we have successfully observed phenomena relating to fibrillization and/or aggregation of A $\beta$ (1-40) with interaction of the liposomes by the DDA, also confirmed by a different sensing of cantilever sensor. Finally, we have detected 1 microM A $\beta$ (1-40) by the DDA method, implying that the concentration in Alzheimer disease patient (20-500 nM) could be measured by an order of improvement.

研究分野：センサ工学

キーワード：センシングデバイス バイオセンサ アミロイドベータ 簡易診断

## 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(A $\beta$ )予防のための初期早期診断、同時に簡易診断の重要性が益々高まっている。それに対して簡易・短時間測定を可能とする診断チップ技術の重要性が強く認識されており、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 $\beta$ 蛋白質の検出には、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 $\beta$ やA $\beta$ 凝集体の中でもA $\beta$ オリゴマーの挙動がバイオマーカーとして注目されているがまだ詳細不明である。前者の方法は蛍光標識分子を用いた精密測定であるが時間、手間がかかり煩雑である、後者は標識フリーであるが精密光学系とその精密な調整が必要、という点で本格診断以前の初期簡易診断には必ずしも適していない。

それら主たる手法に対して、本申請者が研究してきたリポソームバイオセンサ(特に熱化学反応センサ、誘電分散解析センサ)は物理量の電気電子計測原理だが、同センサで人工細胞膜上にA $\beta$ (1-42)、A $\beta$ (1-40)凝集、線維伸長が生じている状況を測定した結果、経時的な凝集・伸長現象に対応する物理量(吸発熱量、誘電緩和幅)の変化を検出しており(p.2, 図A,B)、同図からA $\beta$ の成長に対応して熱化学反応熱の温度スペクトル、水和水挙動が明白に変化していることが分かる。この変化はA $\beta$ 検出のマーカーとなり、また各々分、秒オーダーの短時間で計測できることから、簡易診断の手法に繋がると考えられる(Noda et al., IEEE Sensors 2009, Micro TAS 2009、未発表内容有)(A $\beta$ (約10 $\mu$ M)凝集・線維伸長像は光学/電子顕微鏡で同時に確認)。

## 2. 研究の目的

生体細胞(脳細胞)上でのA $\beta$ 蛋白質の異常化凝集・線維伸長現象を、人工細胞膜(脂質膜リポソーム)上で模倣して同A $\beta$ を凝集、伸長させ検出するリポソームセンサのAD早期簡易診断への適用可能性を検討する。研究項目は、

1) 候補センサ技術(熱化学反応センサ、誘電分散解析センサ)を高感度化(目標A $\beta$ 濃度50-200 nM検出)し、A $\beta$ 検出時同出力の基本的スペクトル特性を詳細に解明する。

2) バイオ技術:A $\beta$ オリゴマー検出用リポソームの検討を行う。

3) 上記1)、2)で高感度化されたセンサを用いて、各重症度のアルツハイマー病患者血液でのアルツハイマー病A $\beta$ マーカー

一となるセンサ信号の抽出と選択を、従来の実績ある臨床医学研究結果と比較して行う。の3つであり、これらを連動して進める。

## 3. 研究の方法

1) リポソームセンサA $\beta$ 検出高感度化の研究 (1) 誘電分散解析センサ :

### I. センシング原理面

従来の検出対象である誘電緩和幅以外に、

①誘電緩和周波数の変化を評価

②誘電損失強度の評価(複素誘電率の虚部): 通常使用の同実部の誘電率と比べて、

### II. センサエレクトロニクス向上面

① プローブ開口面の表面状態が検出特性に与える効果、影響

・ プローブ表面処理プロセスによる高感度化の考察検討

(2) バイオ技術:A $\beta$ オリゴマー検出用リポソームの検討

① リポソーム種、混合、添加物質の検討

② 血液模擬系である血清蛋白質を添加した水溶液での評価

③ 同血液模擬系でのA $\beta$ オリゴマー評価(濃度等)

2) AD患者血液を最終ターゲットとして使用、評価する臨床医学的研究

(1) 研究分担者大学病院での倫理委員会審査依頼

(2) 承認後、AD患者血液の入手、生化学状態の確認

I. AD患者血液での測定

II. 同血清中オリゴマーの存在状態(種類、濃度等)をパラメータとした測定

以上の方法を計画して研究を進めた。

## 4. 研究成果

1) リポソームセンサA $\beta$ 検出高感度化の研究 (1) 誘電分散解析センサ :

### I. センシング原理面

①誘電緩和周波数の変化を評価

周波数挙動を精密に測定するためには周波数分解能の向上が必要であり、従来の201点/1-6GHzから4倍、8倍の高分解能測定が行えた。その結果、従来単一誘電緩和とみなしていた緩和スペクトルが、4倍測定でも複数の緩和形状が測定回数N=20で再現性良く観察できた(未発表)。しかし測定条件の変更になるため、従来測定結果からの連続的な議論が難しいこと、また上記複数の緩和スペクトルの起源を先に検討することが妥当、必要であることから、測定技術向上の結果を確認できたという点で一旦延期することにした。

②誘電損失の変化を評価

通常測定している複素誘電率の虚部データ

を見直した。誘電スペクトルでの肩状の誘電緩和幅変化の計測に比べ、単一ピーク形状となる誘電損失は計測しやすいため、高精度測定で有利と考えたが、実際には背景雑音損失スペクトルがかぶるため、通常の誘電率緩和測定と比較しても同等の精度であることが分かった。よって従来からの誘電緩和測定手法を継続することとした。

## II. センサエレクトロニクス向上

### ①プローブ開口面の表面状態が検出特性に与える効果、影響

#### ・表面洗浄と再現性、・測定原理での前提と表面分子修飾の妥当性

本開口プローブ法の原理は電磁気学から導出された近似解析式で記述され、開口部近傍の測定対象媒質の複素誘電率は一定と仮定されている。そのためプローブ金属材料レベルの導体とはならないプローブ金属表面形成分子は測定対象媒質側に含まれると原則は推定されるので、現実の測定を阻害する可能性が高いと考えられるが、測定対象媒質の体積と表面形成物の体積は数桁違うためその影響は小さい可能性もある。よって表面分子修飾の有用性を期待したが、本研究の主目的からは、**測定対象媒質として開口部近傍に十分大きい体積を有しその平均的な変化を定量的に検出すべき**との考えから、プローブ開口面の表面分子修飾は優先しないことにした。

### ②アレイ化システム

バイオ化学技術の観点からは本手法により脂質膜、ターゲット分子双方の複数条件での測定を効率よく行い統計情報処理を行うことが、従来のバイオセンサ技術でも明らかであるため、本研究で新規にアレイ化測定システムを構成した(図1)。

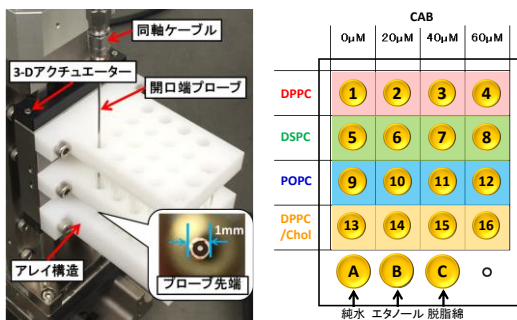


図1 誘電分散解析アレイデバイス構造

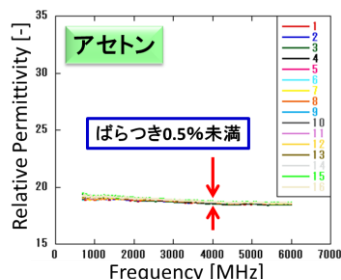


図2 アレイ全セルでの測定結果(アセトン)

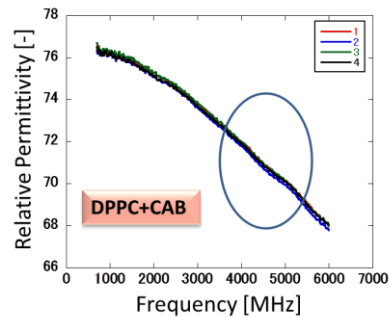


図3 同一試料(DPPC+CAB)のアレイ複数セルでの誘電分散スペクトル(4GHz付近に誘電緩和有り)

まず標準溶液アセトンで全セルを測定した結果、十分な絶対値と均一性を確認できた(図2)。次に実際の蛋白質 CAB を DPPC リポソームに添加し同一条件で複数セルで同時測定の結果、同等スペクトルを得た(図3)。

### (2) バイオ技術：A $\beta$ オリゴマー検出用リポソームの検討

#### ①リポソーム種、混合、添加物質の検討

生体細胞、特に脳細胞を構成する主要脂質の一部の検討を行った。最も存在比率が高い DPPC をはじめ、親水基が同じ POPC, DSPC, DMPC、そして親水基が異なる DPPE, DPPG を検討している。また生体細胞膜に多く存在するバイオ分子としてコレステロール添加を検討した。これら複数の脂質種膜を本研究の誘電分散解析以外に、カンチレバーセンサを用いて A $\beta$  (1-40) の動態を測定、評価した。

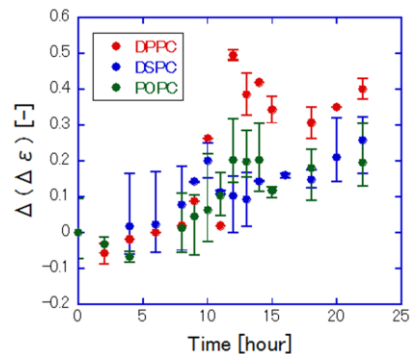


図4 異なる脂質種上での A $\beta$ 線維伸長・凝集による誘電緩和幅変化の経時特性 (A $\beta$ 濃度：1 $\mu$ M)

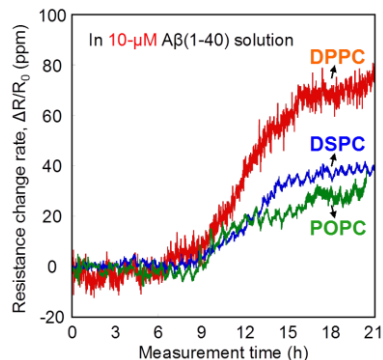


図5 異なる脂質種上での A $\beta$ 線維伸長・凝集によるカンチレバーセンサ出力の経時特性

A $\beta$ はモノマー、オリゴマー、線維前駆体を経て線維成長開始に至って急激に成長、凝集反応を生じるがその経時変化がどの脂質種上でも観察され、図4の誘電分散解析と同様傾向の結果が図5のカンチレバーセンサ測定でも得られた。また相互作用強度の違いが各脂質種で確認された。

## ②健常者ヒト血清中 A $\beta$ 線維伸長・凝集評価

上記①の測定実験と連続して、健常者ヒト血清中での A $\beta$  (1-40)の動態を測定、評価した。製品入手できるヒト血清中に存在する多種類の蛋白質等は A $\beta$  のような経時的な動態を示さないことが他生化学手法で報告されているが、本研究での手法(誘電分散解析、カンチレバーセンサ)でも同様に、純水溶媒中では示さない出力が存在するものの経時変化は示さなかった。よって **ヒト血清中での A $\beta$  動態測定・評価が本研究の手法で可能性のある示唆を得た。**

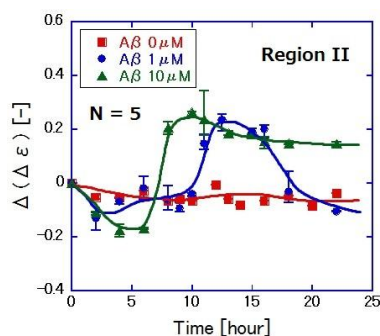


図6 ヒト血清中での異なる脂質種上での A $\beta$ 線維伸長・凝集による誘電緩和幅変化の経時特性

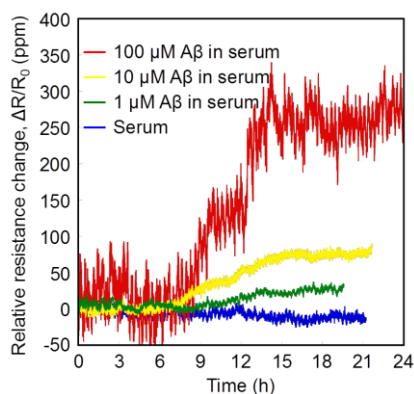


図7 ヒト血清中での異なる脂質種上での A $\beta$ 線維伸長・凝集によるカンチレバーセンサ出力の経時特性

図4の純水溶媒中と誘電分散特性と異なり、図6の低濃度 A $\beta$ (1  $\mu$ M)では凝集反応完了以降の17 h 以降で緩和幅増加が減少している。一方、図7のカンチレバーでは同減少は見られていない。両センサの測定対象とする現象メカニズムの相違に対応する可能性が考えられる。

## 2) AD患者血液を最終ターゲットとして

## 使用、評価する臨床医学的研究

I. 本研究期間中に行われた **研究分担者大学病院での倫理委員会審査の結果、まずAD患者血清製品での事前評価を行い、その結果検討後、同学病院実患者生体液(血清、脳髄液)で評価することになった。**期間中は血清市販品の選択を検討したが、各品での A $\beta$  濃度が不明であるため、初期結果として2, 3種購入測定することとした。(その後、当大学で同液のオリゴマー評価を行う可能性有)

II. **A $\beta$  合成オリゴマー測定**の計画化  
実患者生体液を用いる手法と同時に、**A $\beta$  オリゴマー**を生化学的に合成する技術があり、本研究期間からの継続となるが、同大学で**オリゴマー濃度や関連特性を調製した A $\beta$  溶液を測定する計画を検討した。**

なお1) リポソームセンサ A $\beta$  検出高感度化の研究として(3)熱化学反応センサー マイクロボロメータ を計画していたが、装置修繕後もボロメータ薄膜形成用スパッタ装置の製膜状態を改善できず、研究時間の観点で研究進展効率化のため、上記項目(1)、(2)に注力した。

## 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 9 件)

1. T. Yoshikawa, Z. Zhang, K. Yamashita, M. Noda, "Biosensing of interaction between phospholipid membrane of liposome as model cell membrane and amyloid-beta protein in human serum by dielectric dispersion analysis", *Sensors and Actuators B: Chemical*, (査読有) (2016) in press. doi:10.1016/j.snb.2016.04.185
2. "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. Sohgewa, K. Yamashita, M. Noda, *Sensors and Actuators B: Chemical*, (査読有) (2016) in press. doi:10.1016/j.snb.2016.03.025
3. "A Micromechanical Cantilever-Based Liposome Biosensor for Characterization of Protein-Membrane Interaction", Z. Zhang, M. Sohgewa, K. Yamashita, M. Noda, *Electroanalysis*, (査読有) **28**(3) (2016) 620-625.
4. "Detection of Amyloid Beta Fibril Growth by Liposome-immobilized Micro-cantilever with NiCr Thin Film Strain Gauge", M. Sohgewa, Z. Zhang, T. Akai, K. Takada, K. Yamashita, M. Noda: *IEEE Sensors Journal*, (査読有) **15**(12) (2015) 7135-7141.

[学会発表] (計 18 件)

1. Z. Zhang, Y. Murakami, T. Taniguchi, M. Sohgwawa, K. Yamashita, M. Noda: "Enhanced sensitivity of cantilever-based liposome biosensor for detection of A $\beta$  aggregation and fibril growth by incorporating DPPC liposome with cholesterol", *Biosensors 2016*, Gothenburg, Sweden, May 25-27 (2016)
2. R. Imamura, Z. Zhang, T. Yoshikawa, T. Shimanouchi, N. Murata, K. Yamashita, M. Fukuzawa, M. Noda: "Discrimination of target proteins using arrayed fluorescent liposomes incorporated with cholesterol by principal component analysis", B4L-D2, *IEEE Sensors 2015*, Busan, Korea, Nov. 1-4 (2015) 1231-1234.
3. Z. Zhang, M. Sohgwawa, K. Yamashita, M. Noda: "Detection of amyloid-beta at different stages of fibrillization using a cantilever-based liposome biosensor", M.460g, *The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (MicroTAS2015)*, Gyeongju, Koera, Oct. 24-29 (2015) 1649-1651.
4. R. Imamura, Z. Zhang, T. Yoshikawa, T. Shimanouchi, N. Murata, K. Yamashita, M. Fukuzawa, M. Noda: "A fluorescent arrayed biosensor using liposome encapsulating Calcein for discrimination of different target proteins by principal component analysis", PS-11-9, *The 47th International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM2015)*, Sapporo, Japan, Sep. 27-30 (2015) 390-391.
5. M. Sohgwawa, Z. Zhang, Y. Abe, T. Abe, K. Yamashita, M. Noda: "Detection of amyloid-beta Proteins during fibrillization process by liposome-immobilized microcantilevers in microfluidic channel", F-3-3, *The 47th International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM2015)*, Sapporo, Japan, Sep. 27-30 (2015) 828-829.
6. Z. Zhang, M. Sohgwawa, K. Yamashita, M. Noda: "Characterization of Fibrillization Process of Amyloid-Beta on Lipid Membrane Utilizing a Cantilever-Based Liposome Biosensor", AS02-4, *The 29th European Conference on Sensors and Transducers (Euroensors 2015)*, Freiburg, Germany, Sep. 6-9 (2015) 41-44 (in *Procedia Engineering*, vol. 120).
7. T. Yoshikawa, Z. Zhang, K. Yamashita, M. Noda: "Biosensing of Interaction between Liposome of Model Cell Membrane and Amyloid-Beta Protein by Dielectric Dispersion Analysis", MP-A09, *The 29th European Conference on Sensors and Transducers (Euroensors 2015)*, Freiburg,

Germany, Sep. 6-9 (2015) 560-563 (in *Procedia Engineering*, vol. 120).

8. R. Imamura, Z. Zhang, T. Yoshikawa, T. Shimanouchi, N. Murata, K. Yamashita, M. Fukuzawa, M. Noda: "Target Protein Discrimination Based on Array Sensor Using Calcein-Encapsulating Liposomes with Cholesterol by Principal Component Analysis", MP-F07, *The 29th European Conference on Sensors and Transducers (Euroensors 2015)*, Freiburg, Germany, Sep. 6-9 (2015) 699-702 (in *Procedia Engineering*, vol. 120).

[その他]

ホームページ等

京都工芸繊維大学・大学院工芸科学研究科・電子システム工学専攻・電子機器工学講座のホームページ

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

[http://www.es.kit.ac.jp/upload/labs/eled\\_device.pdf](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

島内 寿徳 (SHIMANOUCI, Toshinori)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准教授

研究者番号： 10335383

松岡 照之 (MATSUOKA, Teruyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号： 40636544

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

### (3) 連携研究者

馬越 大 (UMAKOSHI, Hiroshi)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号： 20311772

成本 迅 (NARIMOTO Jin)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号： 30347463