

《様式B》

研究テーマ 「 異常型アミロイドβの試験管内増幅法の開発 」

研究責任者 所属機関名 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

官職又は役職 准教授

氏 名 本田諒 メールアドレス honda.ryo.i9@f.gifu-u.ac.jp

共同研究者 所属機関名

官職又は役職

氏 名

(令和6年度募集) 第37回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1,000字程度)

本研究では、アルツハイマー病の原因分子の一つである異常型アミロイドβ (Aβ) の seeding 活性を高感度に検出する micelle-assisted seed amplification assay (Aβ-mSAA) の高度化を目的として、反応条件の最適化を実施した。申請者らは既に、界面活性剤 Brij-58 により基質モノマーを安定化させる mSAA 法を開発し、異常型 TDP-43 ではフェムトグラムレベル、Aβ でも従来法を上回る感度を達成しているが、Aβ では基質の自己凝集が残ることが課題であった。そこで本助成では、塩条件、Aβ プロリン変異体、PEG、界面活性剤の種類・濃度を中心に追加スクリーニングを進め、seed 存在下と非存在下の反応立ち上がり時間差を指標として評価した。その結果、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>を含む多くの塩は Aβ 凝集を促進したものの、seed 依存反応のみを選択的に高めるのではなく、背景となる seed 非依存凝集も同時に加速させることが明らかとなり、感度向上には直結しないことを見いだした。また、Proline 変異体、PEG、界面活性剤の最適化も検討したが、当初目標であった 10<sup>-15</sup> g レベルには到達しなかった。一方で、本研究により Aβ-mSAA では塩による静電遮蔽効果が支配的であり、臨床試料応用に際しては塩の持ち込み抑制や前処理設計が重要であることが明確になった。さらに、App<sup>NL-F</sup> マウス脳の調達とホモジェネート作製を完了し、最適条件確立後に直ちに実検体評価へ移行できる体制を整備した。本成果は論文原稿として取りまとめ、現在査読中である。加えて、塩条件の系統的マッピングにより、今後の条件探索を機序に基づいて進められる基盤も得られた。今後、脱塩、免疫沈降、細胞外小胞濃縮などの前処理と組み合わせることで、研究用試薬・測定サービス、さらには診断補助技術として社会実装し、アルツハイマー病の早期診断、治療介入判断、治療効果モニタリングに資することが期

待される。

## 2. 実施内容および成果の説明（A 4で、5ページ以内）

### (1) 研究の背景と目的

神経変性疾患の早期診断と治療介入のためには、病態の上流に位置する異常型タンパク質を高感度に検出する技術が不可欠である。シード増幅アッセイ（SAA）は、異常型タンパク質がもつ seeding 活性を利用して微量の病的凝集体を試験管内で増幅・検出する手法であり、プリオン病や  $\alpha$  シヌクレイン病では既に高感度化が進んでいる。これに対し、アルツハイマー病に関与する異常型アミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) は、基質となる正常型  $A\beta$  モノマー自体が不安定で自発凝集しやすく、従来法では高精度化が難しかった。申請者らはこれまでに、界面活性剤 Brij-58 を用いて基質をミセル複合体として安定化する micelle-assisted SAA (mSAA) 法を開発し、異常型 TDP-43 でフェムトグラムレベル、 $A\beta$  でも従来法を大きく上回る検出性能を示してきた。しかし  $A\beta$  では依然として背景凝集が残り、感度は約  $10^{-10}$  g にとどまっていた。そこで本研究では、 $A\beta$ -mSAA のさらなる高感度化を目指し、塩条件、基質モノマーの改変、PEG、界面活性剤など複数因子の最適化を体系的に進めた。

### (2) 実施内容

本研究では、Brij-58 を含む既存の  $A\beta$ -mSAA 系を基盤として、seed 存在下と非存在下における反応立ち上がり時間 (lag time) の差を主要指標に条件検討を行った。まず、Hofmeister 系列を意識した複数の塩について、カチオン種およびアニオン種の違いが  $A\beta$  の seed 依存凝集と seed 非依存凝集に与える影響を系統的に評価した。ついで、予備検討で有望性が示されていた  $A\beta$  の Proline 変異体、PEG、各種界面活性剤について、濃度や組み合わせ条件を段階的に見直し、背景凝集の抑制と seed 依存増幅の両立を試みた。評価には蛍光プレートリーダーによる Thioflavin T 蛍光測定を用い、再現性を確保しながら各条件の反応速度を比較した。さらに、最適条件が得られた段階で直ちに実検体評価へ移行できるよう、App<sup>NL-F</sup> マウス脳の調達とホモジェネート作製を進め、評価体制を整備した。

### (3) 研究結果

塩条件のスクリーニングでは、A $\beta$ -mSAA において検討した多くの塩が凝集反応を促進し、特に Mg<sup>2+</sup>および Ca<sup>2+</sup>は顕著な lag time 短縮を示した。しかし重要な点として、これらの塩は seed 存在下の反応だけを選択的に増強したのではなく、seed 非依存的な背景凝集も同時に加速した。その結果、seed 有無を判別するための時間差は大きく広がらず、単純な塩添加では検出感度の本質的改善に結びつかないことが明らかになった。この結果は、A $\beta$ -mSAA では塩の効果が主として静電遮蔽により説明され、病的 seed に依存した増幅のみを選択的に促進する条件設計が難しいことを示している。

次に、基質モノマーの Proline 変異体、PEG、界面活性剤の種類・濃度を検討した。これらは、基質の自発凝集を抑えつつ seed 依存反応を維持または増強することを期待して導入したものである。実際に一部の条件では反応挙動の変化が認められたものの、背景凝集の十分な抑制と高い増幅効率を同時に満たす条件は得られず、当初目標であった 10<sup>-15</sup> g レベルの検出感度達成には至らなかった。すなわち、本研究によって A $\beta$ -mSAA の高感度化に有効な条件が直ちに確立されたわけではないが、感度改善を妨げている主要因が「塩による非選択的促進」と「基質モノマーの不安定性」にあることを明確化できた点は大きな成果である。

また、塩条件の系統的比較結果は論文原稿として取りまとめており、mSAA 系におけるイオン効果の理解を深める基礎資料となった。加えて、App<sup>NL-F</sup> マウス脳の調達およびホモジェネート作製を完了したことで、最適条件が確立し次第、実検体を用いた性能検証へ速やかに移行できる段階に到達した。

#### (4) 成果の意義と今後の展開

本研究の意義は、単に条件探索を行ったという点ではなく、A $\beta$ -mSAA を高感度化するうえで有効な方向と、逆に避けるべき方向を明確にした点にある。特に、A $\beta$ -mSAA が生理的塩濃度の影響を強く受けることから、今後の実用化には検体前処理が極めて重要であることが示唆された。すなわち、脳抽出液や体液試料をそのまま反応系へ導入するのではなく、脱塩・バッファー交換、免疫沈降、細胞外小胞濃縮などを組み合わせ、塩の持ち込みを抑えつつ異常型 A $\beta$ を濃縮する工程の導入が有望である。

mSAA 法は、質量分析法や ELISA 法のように total A $\beta$  量を測るのではなく、seeding

活性を有する異常型  $A\beta$  を選択的に検出し得る点に大きな特徴がある。そのため、前処理系と一体化した測定技術へ発展させることができれば、アルツハイマー病の早期診断、病態進行の評価、疾患修飾薬の導入判断、治療効果モニタリングに資する産業技術となる可能性が高い。基盤技術である mSAA については既に特許出願を行っており、本研究で得られた最適化知見は、新規出願および  $A\beta$  応用の実用性を補強する成果と位置付けられる。今後は、今回得られた知見を踏まえて前処理工程を含めた全体設計を再構築し、マウス脳および将来的には患者由来試料での性能検証を進めることで、診断補助用試薬、受託測定サービス、研究用キット等への展開を目指す。