

アルツハイマー病因ペプチドの凝集を 蛍光で検出する

三重大学 生物資源学部

生物圏生命科学専攻 創薬化学研究室

准教授 増田 裕一

長谷川式認知症スケール

質問内容		配点
1. お歳はいくつですか？（2歳までの誤差は正解）		0 1
2. 今日は何年の何月何日ですか？ 何曜日ですか？	年	0 1
	月	0 1
	日	0 1
	曜日	0 1
3. 私たちが今いるところはどこですか？ （自発的に出れば2点，5秒おいて，家ですか？ 病院ですか？ 施設ですか？ の中から正しい選択をすれば1点）		0 1 2
4. これから言う3つの言葉を言ってみてください。 あとでまた聞きますのでよく覚えておいてください。 （以下の系列のいずれか1つで，採用した系列に○印をつけておく）		0 1
1： a) 桜 b) 猫 c) 電車 2： a) 梅 b) 犬 c) 自動車		0 1
5. 100から7を順番に引いてください。 （100-7？ それから また7を引くと？ と質問する。 最初の答えが不正解の場合，打ち切る）	(93) (86)	0 1 0 1
6. 私がこれから言う数字を逆から言ってください。 （6-8-2, 3-5-2-9）	2-8-6 9-2-5-3	0 1 0 1
7. 先ほど覚えてもらった言葉をもう一度言ってみてください。 （自発的に回答があれば各2点，もし回答がない場合，以下の ヒントを与えて正解であれば1点）	a b c	0 1 2 0 1 2 0 1 2
8. これから5つの品物を見せます。それを隠しますので何が あったか言ってください。 （時計，鏡，タバコ，ペン，硬貨など必ず相互に無関係なもの）		0 1 2 3 4 5
9. 知っている野菜の名前をできるだけ多く言ってください。 （答えた野菜の名前を右側に記入する。途中で詰まり，約10秒 待っても出ない場合にはそこで打ち切る）		0 1 2 3 4 5
× 5個までは0点，6個=1点，7個=2点，8個=3点， 9個=4点，10個=5点		

20～30点・・・異常なし

16～19点・・・認知症の疑いあり

11～15点・・・中程度の認知症

5～10点・・・やや高度の認知症

0～4点・・・高度の認知症

アルツハイマー病

認知症の主な原因の一つ

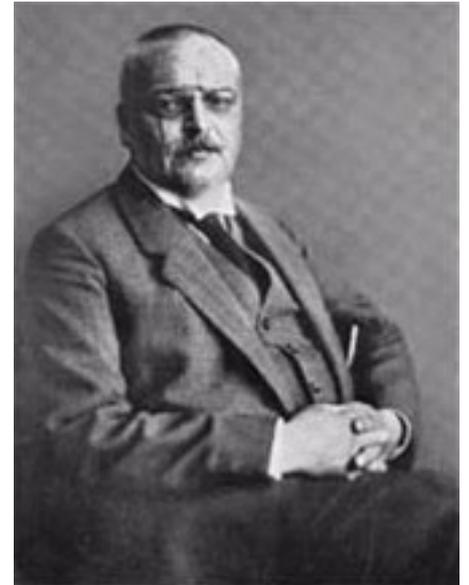
1906 Alois Alzheimer によって、その脳における神経病理学的特徴が初めて報告された
(*Neurologisches Centralblatt* 1906, 23, 1129-1136)



1984 アミロイドβ (Aβ) が単離された

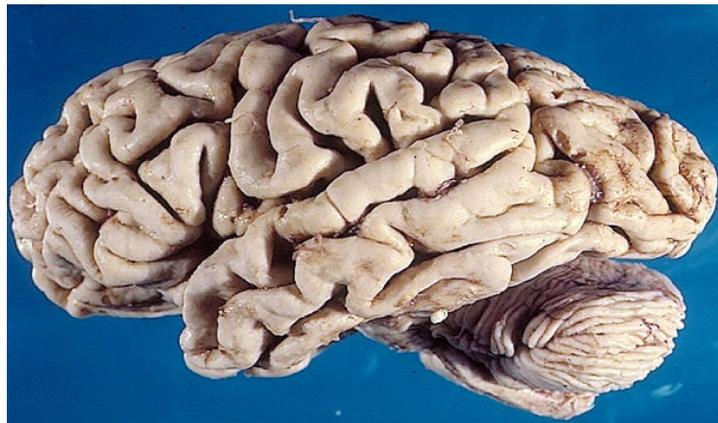
2017 日本における受診患者数：56 万人
(厚生労働省 平成29年患者調査)

2021 6/7 新薬「アデュカヌマブ」が承認されたが…。



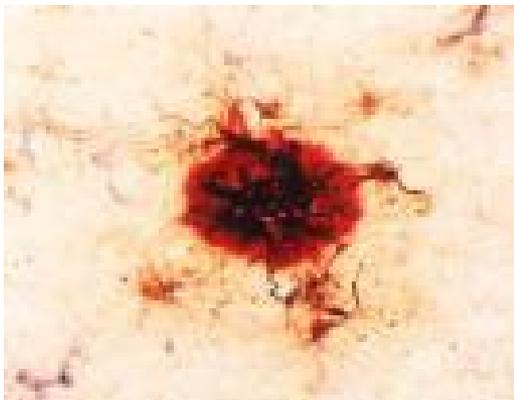
Alois Alzheimer
(1864~1915)

アルツハイマー病の神経病理学的特徴



アルツハイマー病
患者の脳

老人斑



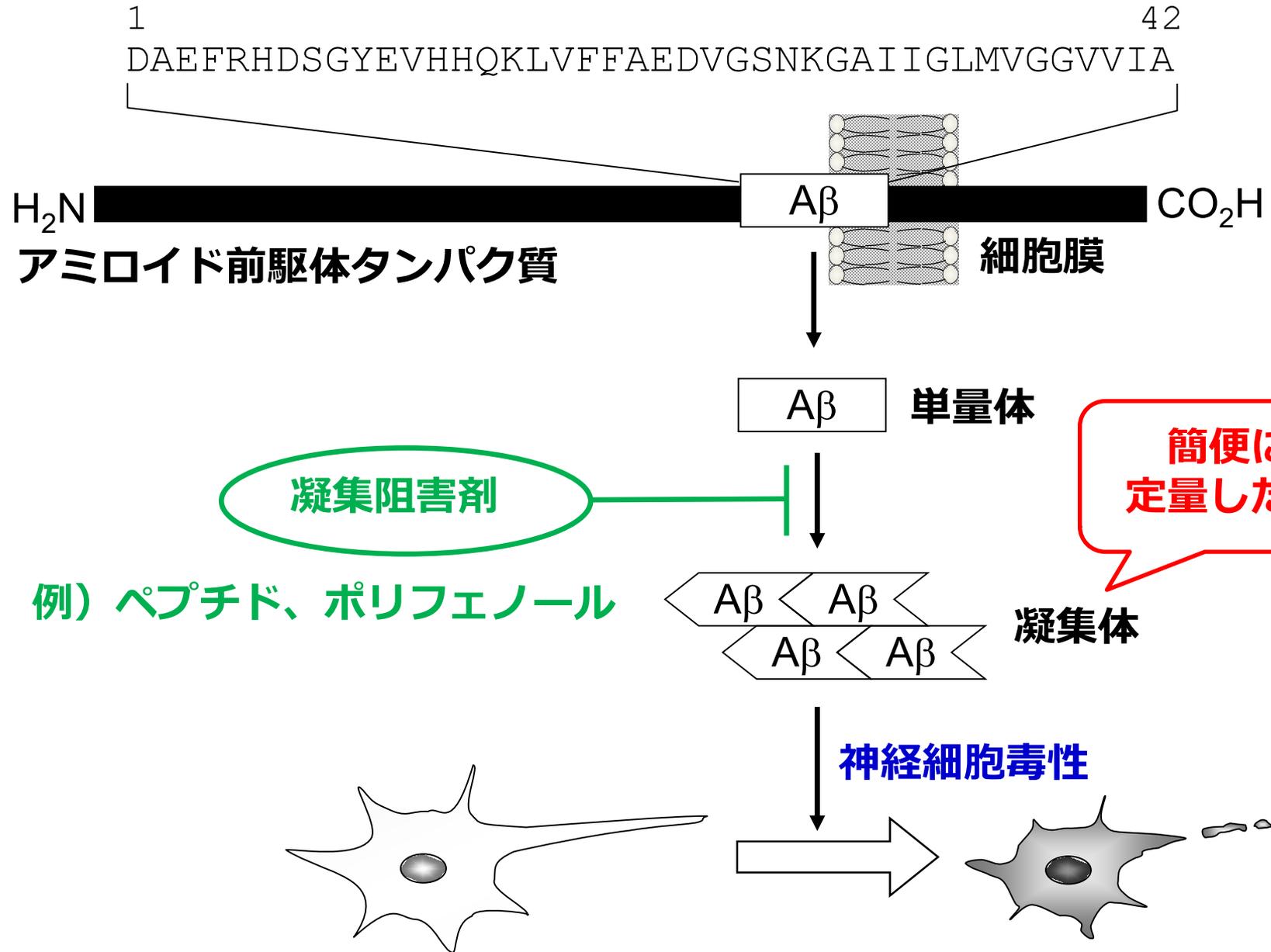
アミロイドβ (Aβ)

神経原線維変化



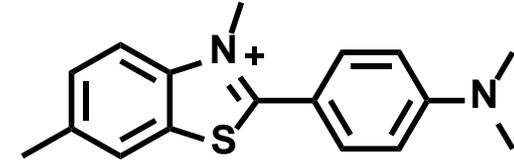
リン酸化されたタウ

アミロイド仮説

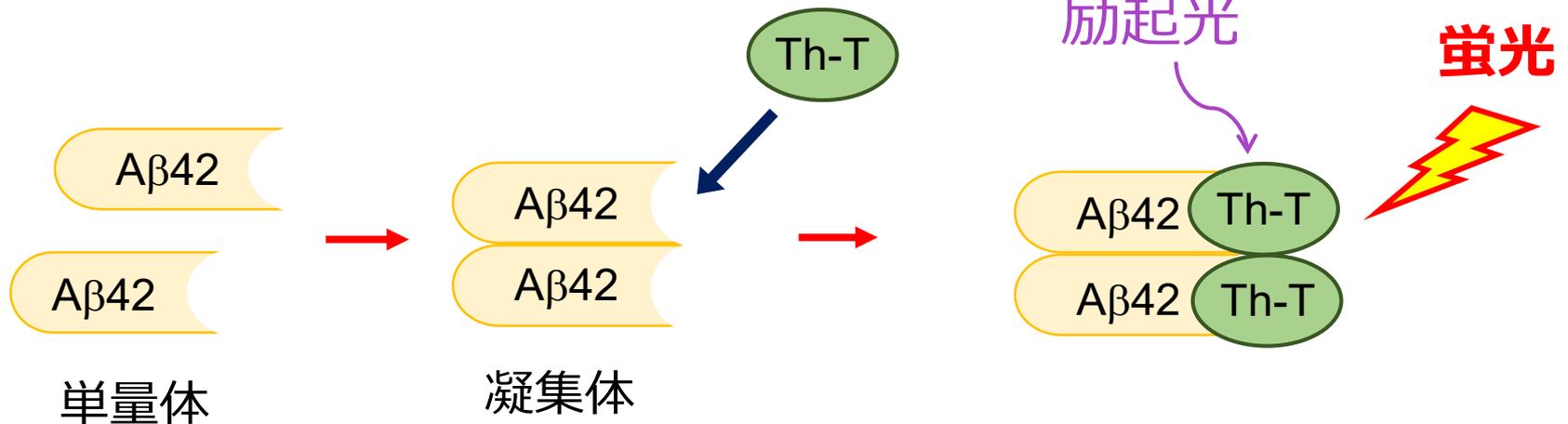


従来のA β 42凝集体の定量法 (Th-T法)

チオフラビンT (Th-T)が凝集体に結合して起こる蛍光増大を検出

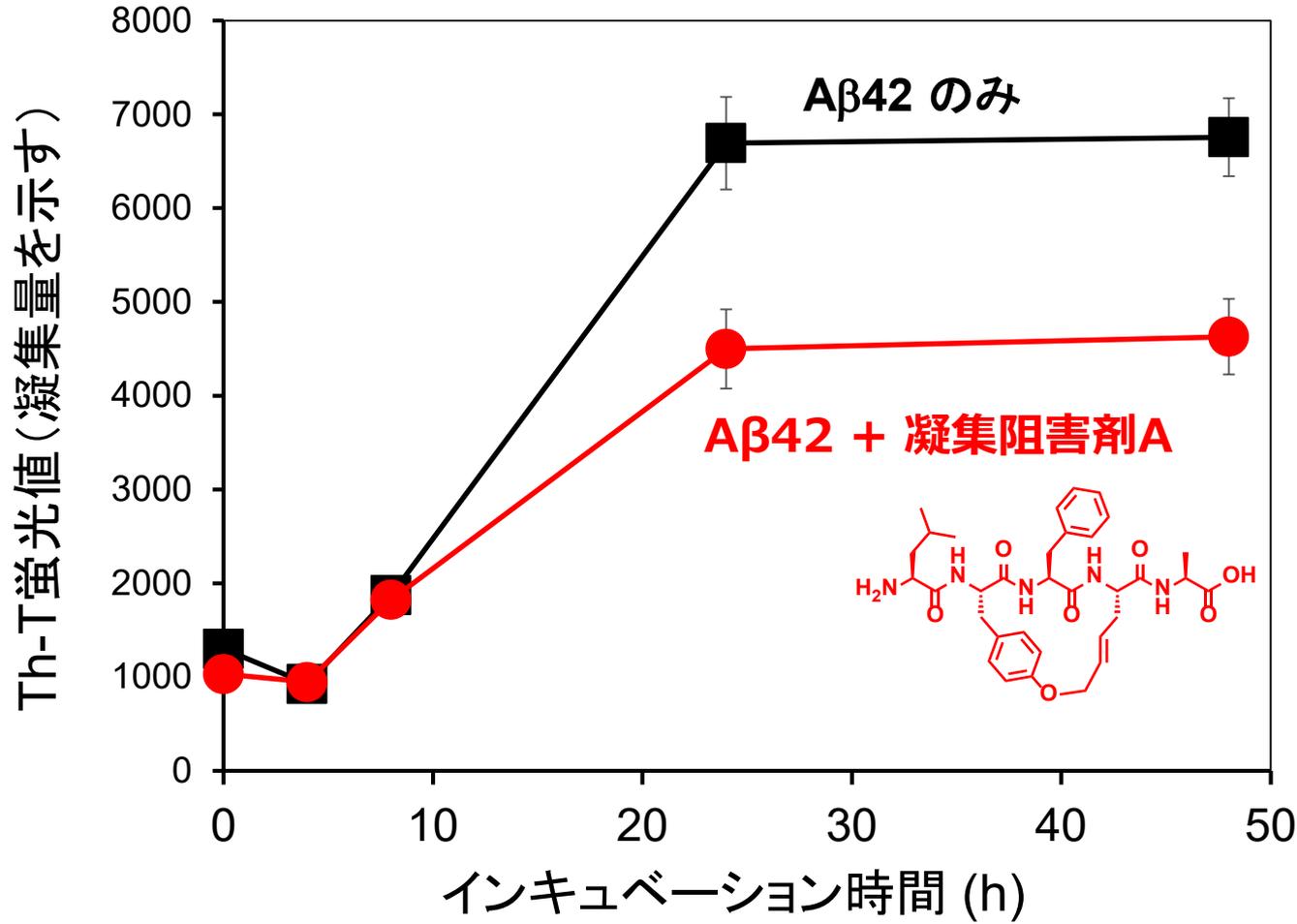


チオフラビンT (Th-T)



Th-T法によるA β 42凝集体の定量

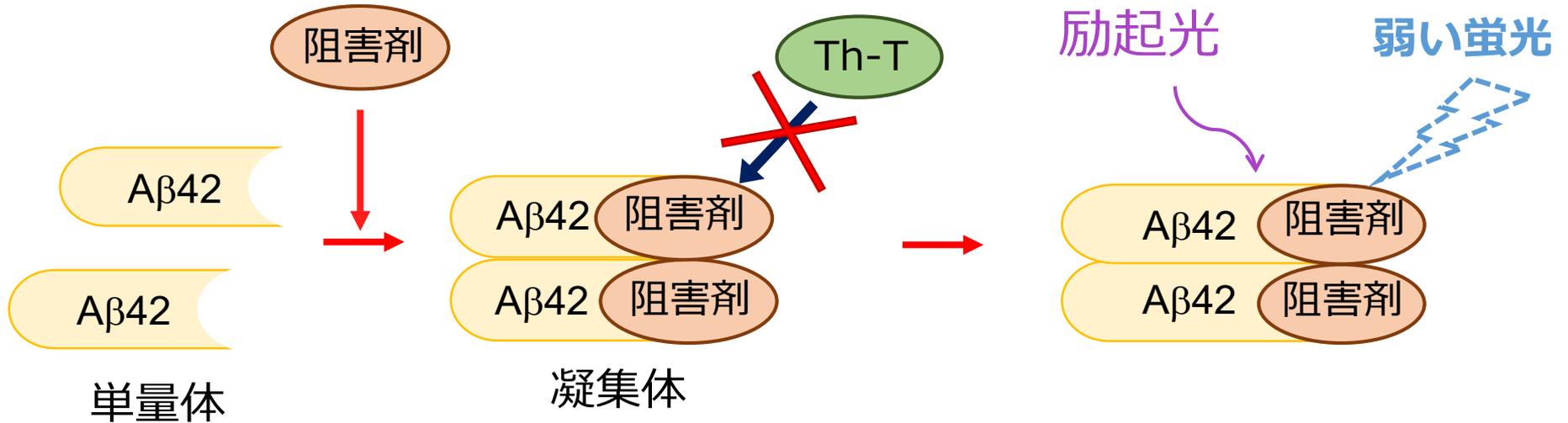
A β 42 10 μ M + 化合物 40 μ M, リン酸緩衝液 (pH 7.4), 37 $^{\circ}$ C, 励起: 430 nm, 蛍光: 510 nm



出展 : Tanaka, F., Shibata, K., Monobe, Y., Akagi, K., Masuda, Y.*
Bioorg. Med. Chem. **2020**, *28*, 115676.

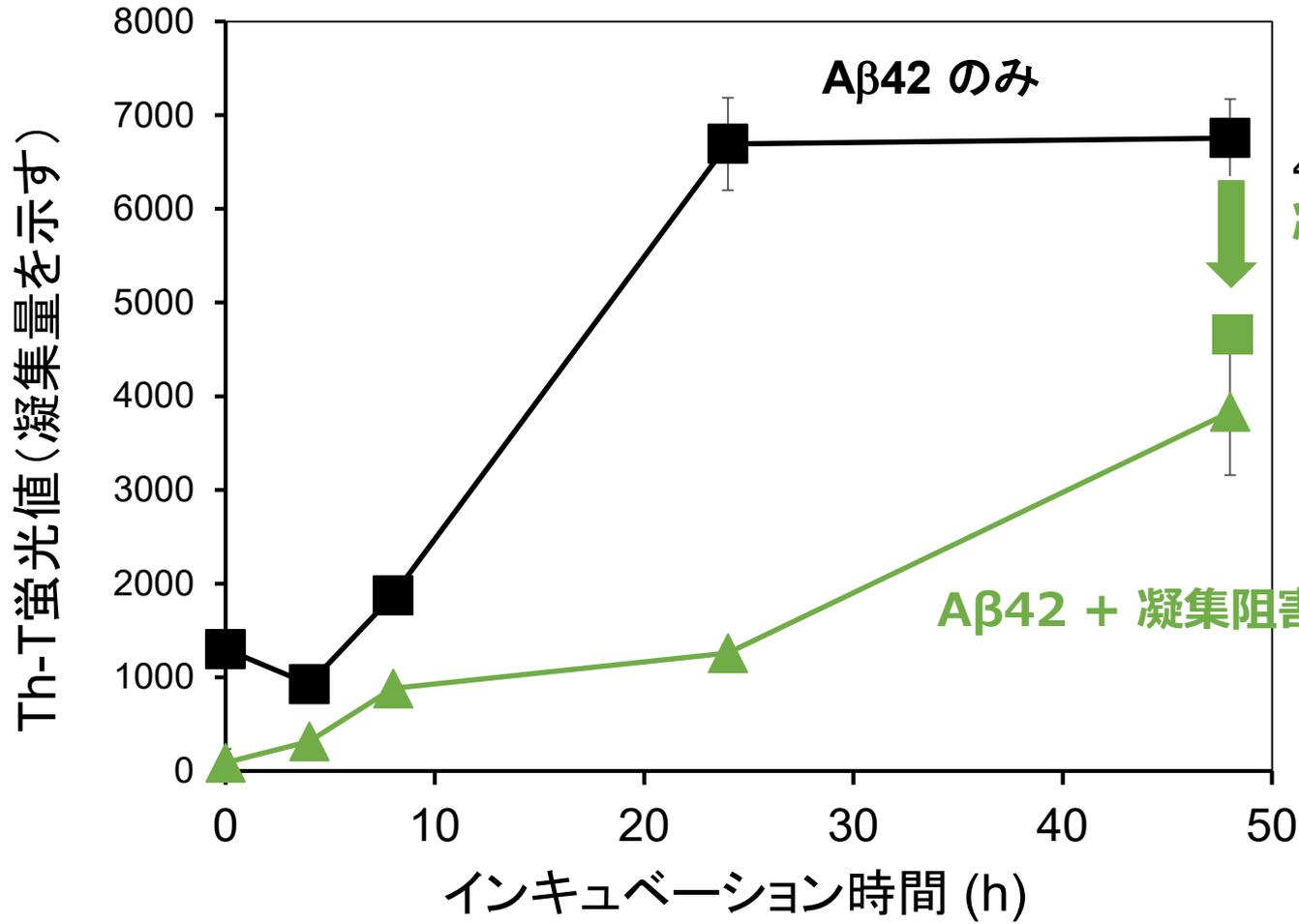
Th-T法（従来法）の欠点

Th-Tと凝集阻害剤が競合する場合がある

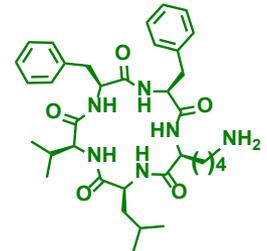


Th-Tと凝集阻害剤が競合するケース

Aβ42 10 μM + 化合物 40 μM, リン酸緩衝液 (pH 7.4), 37 °C, 励起: 430 nm, 蛍光: 510 nm



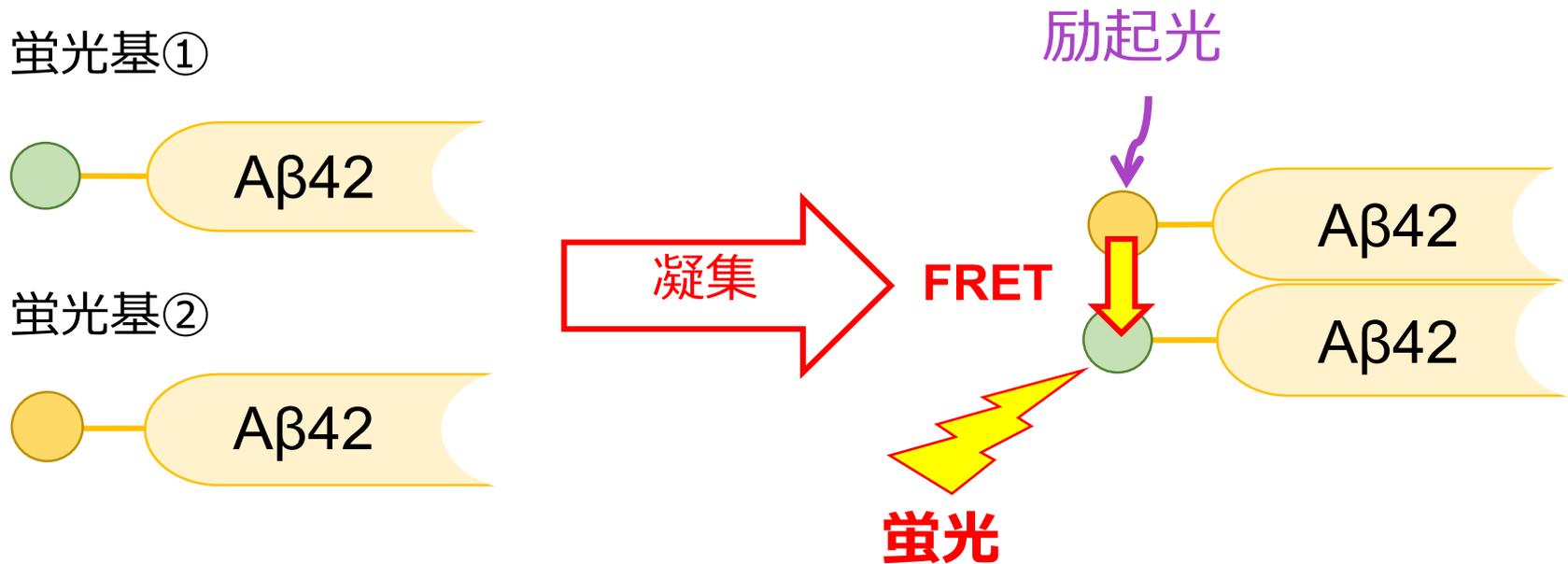
48時間後のAβ42に凝集阻害剤Bを添加して、蛍光を測定。



凝集阻害剤BはTh-T蛍光自体を阻害するので、凝集体を定量できない

新技術の概要

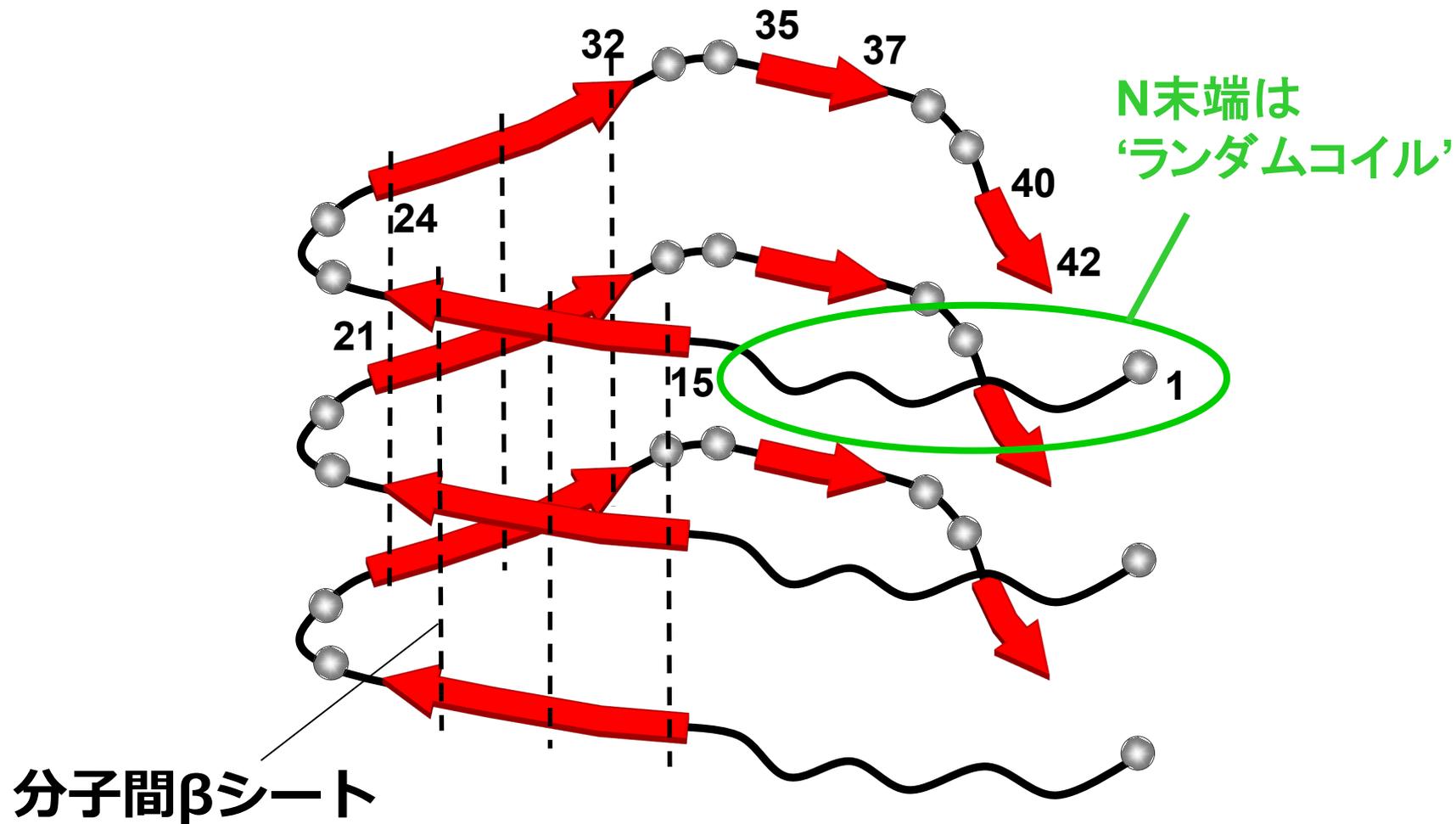
2種類の蛍光標識Aβ42を合成することにより、その凝集量を
フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) として検出する



[メリット]

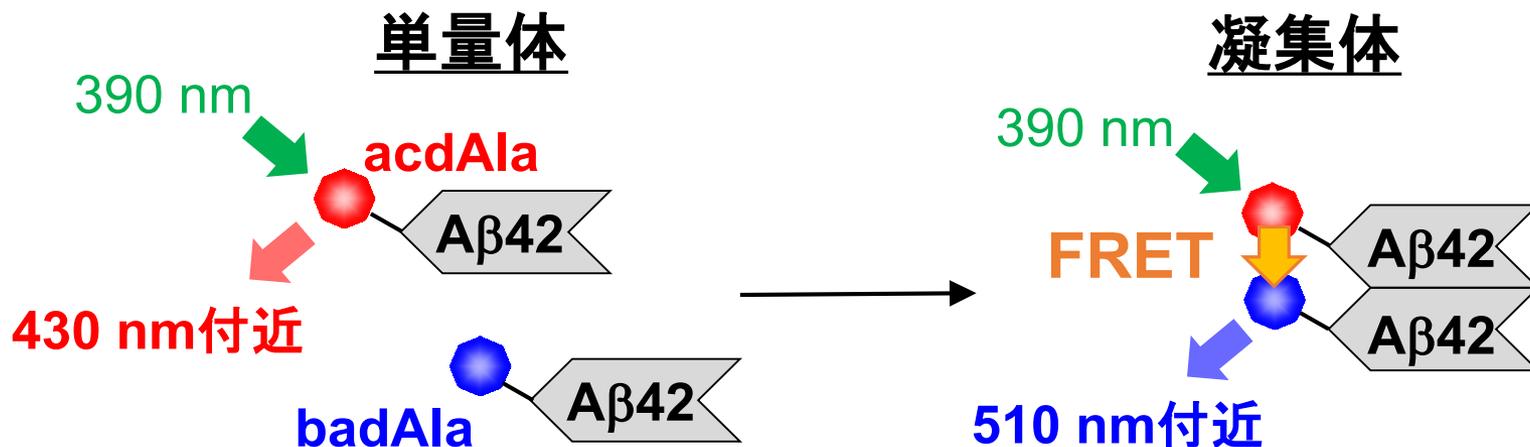
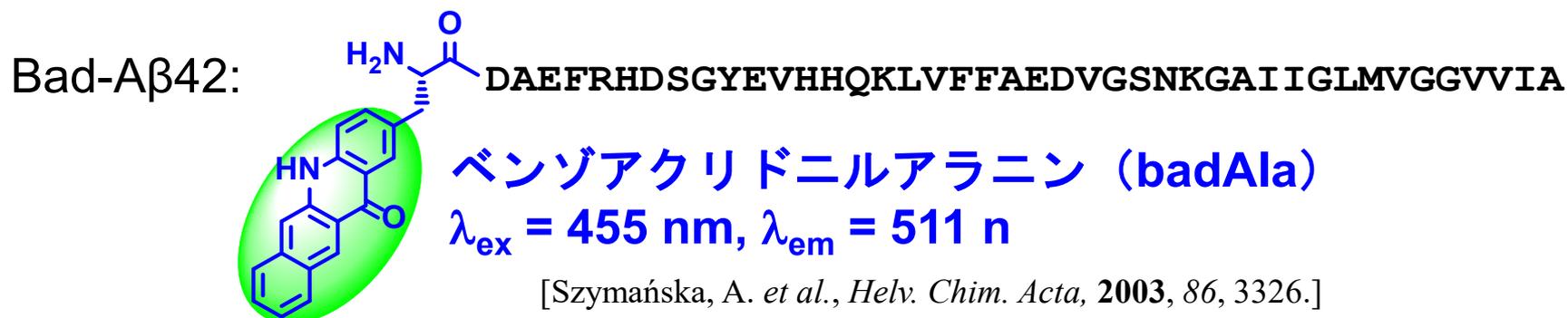
蛍光値が、凝集阻害剤による干渉を受けない

A β 42凝集体の立体構造

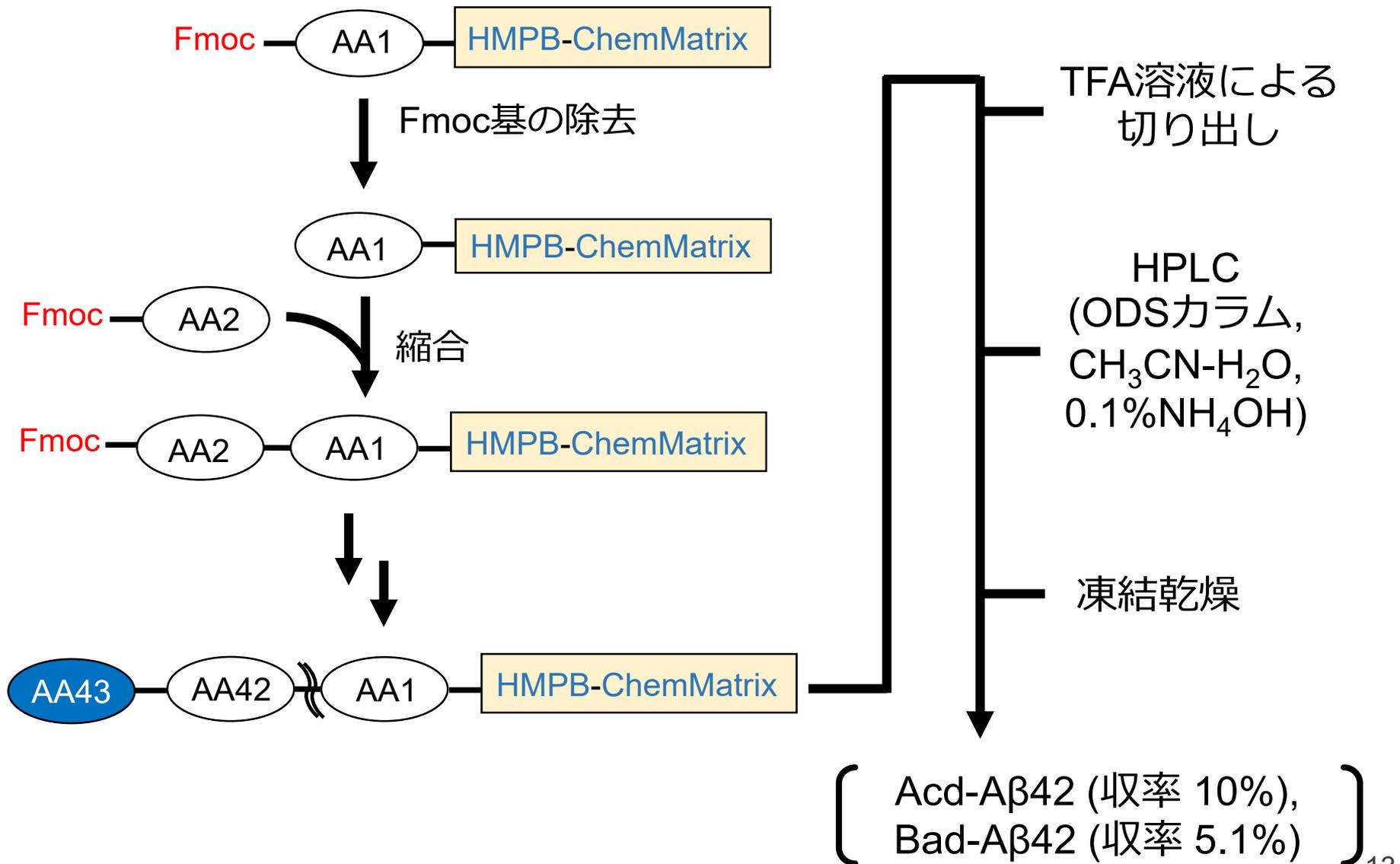


(Morimoto, A. *et al.*, *JBC*. 2004, 279, 52781; Masuda, Y. *et al.*, *ChemBioChem*, 2009, 10, 287)

蛍光標識Aβ42の設計

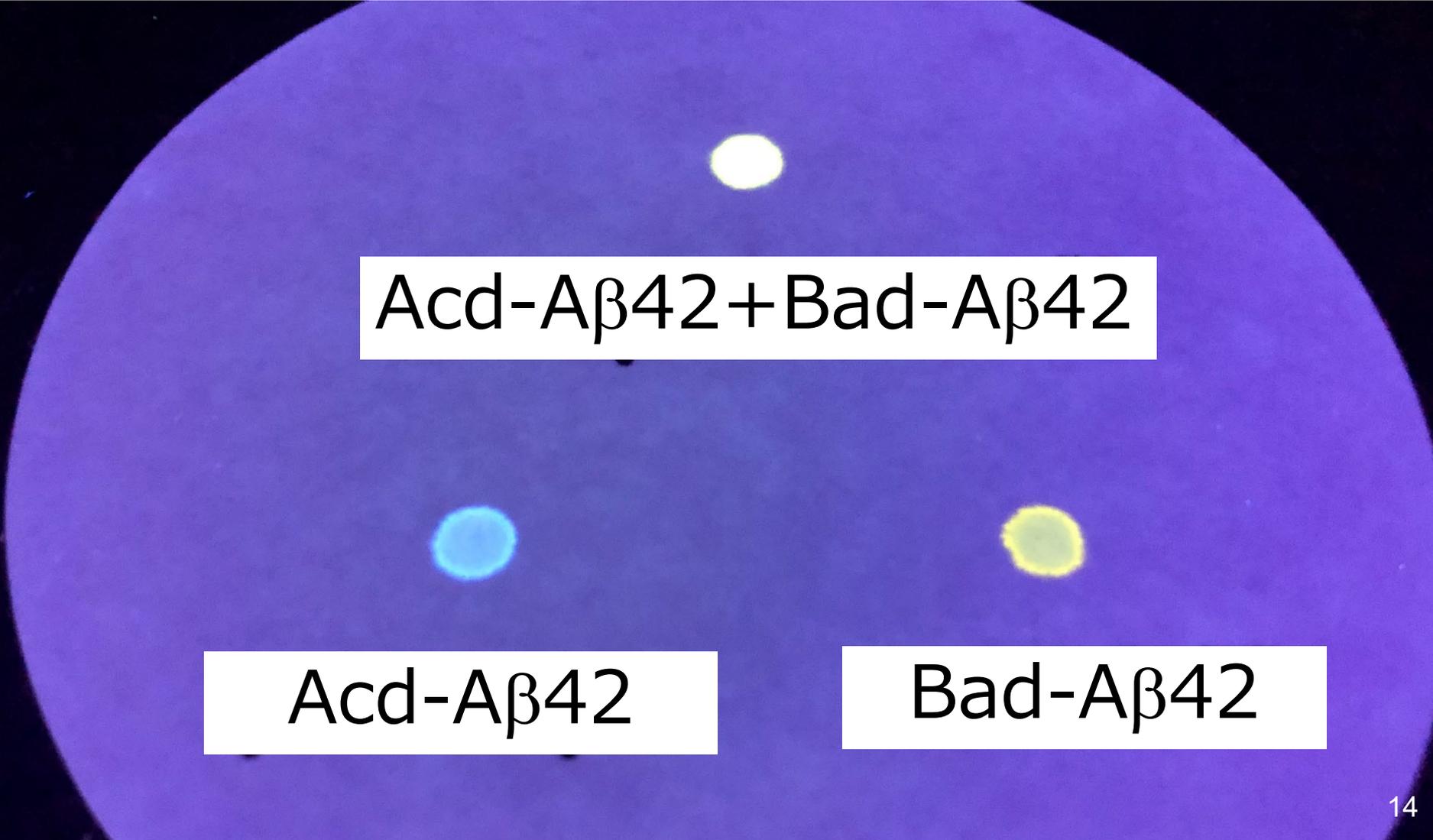


蛍光標識Aβ42の合成・精製



蛍光標識A β 42の蛍光発光の様子

水溶液をろ紙に染み込ませて、365 nmのUVを照射した

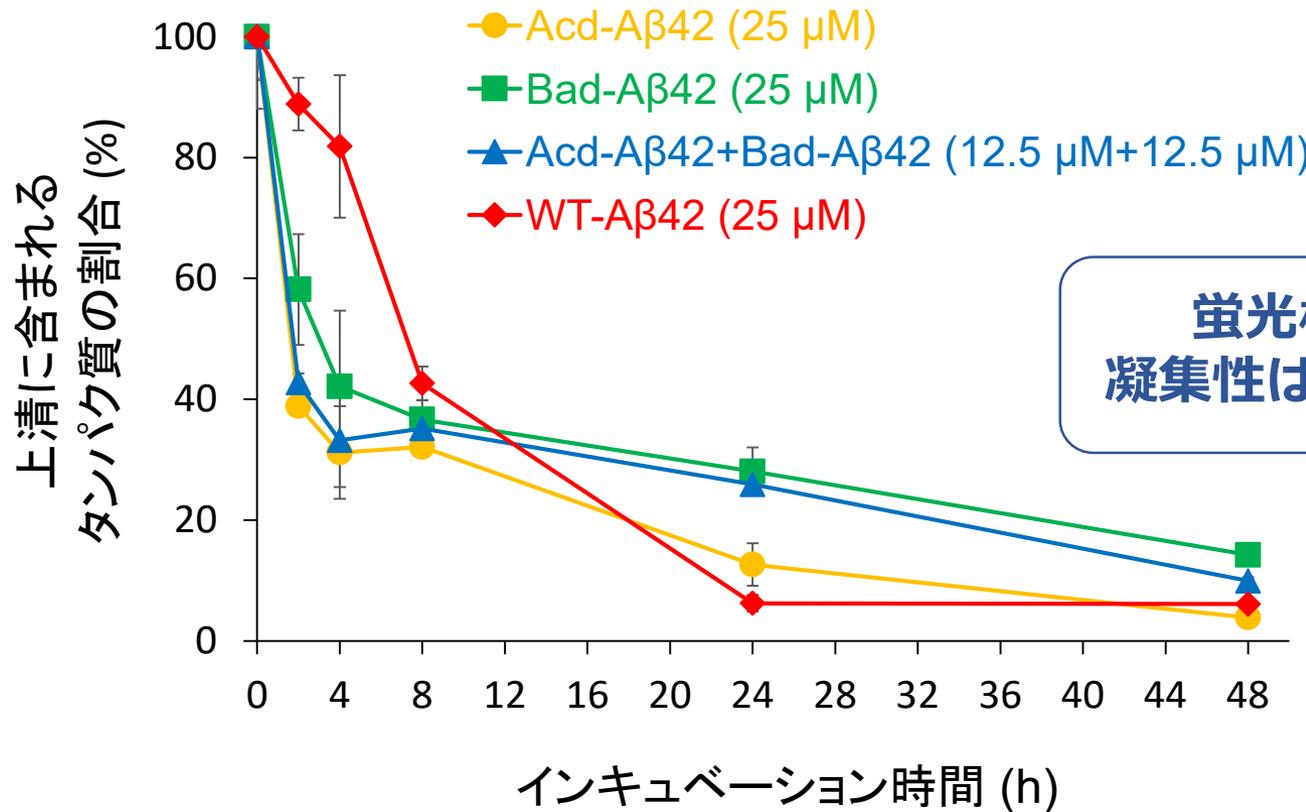
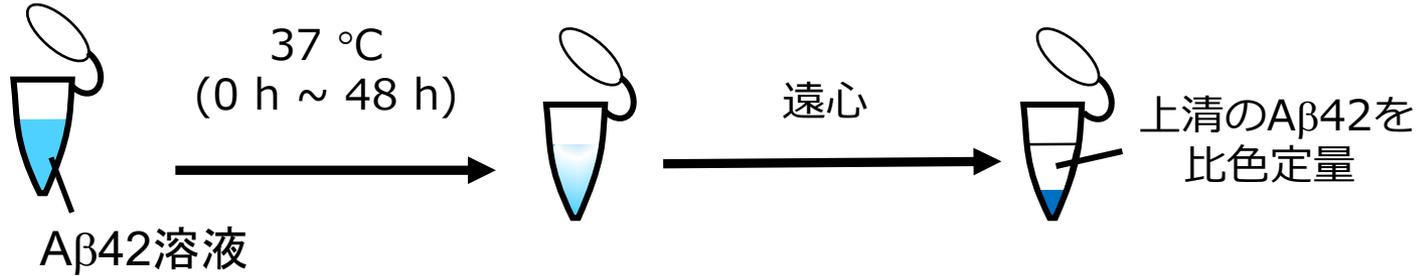


Acd-A β 42+Bad-A β 42

Acd-A β 42

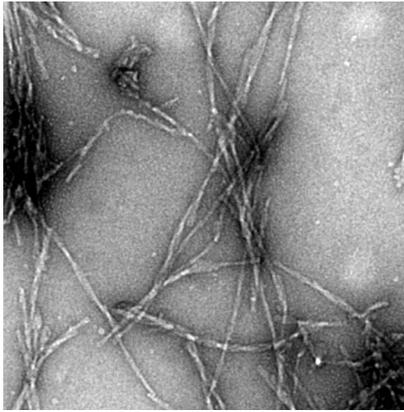
Bad-A β 42

蛍光標識Aβ42の凝集性の解析



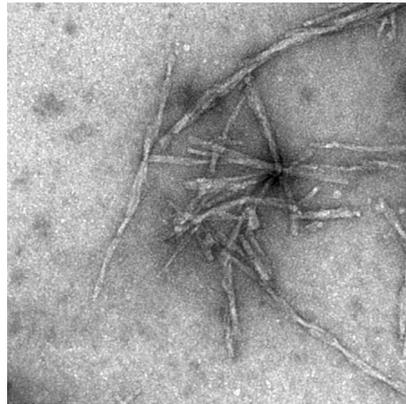
蛍光標識A β 42の凝集体の形態観察

各A β 42凝集体の形状を電子顕微鏡で観察



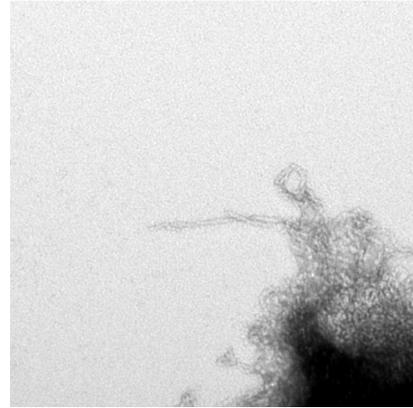
10 nm

WT-A β 42
(25 μ M)



10 nm

Acd-A β 42
(25 μ M)



10 nm

Bad-A β 42
(25 μ M)



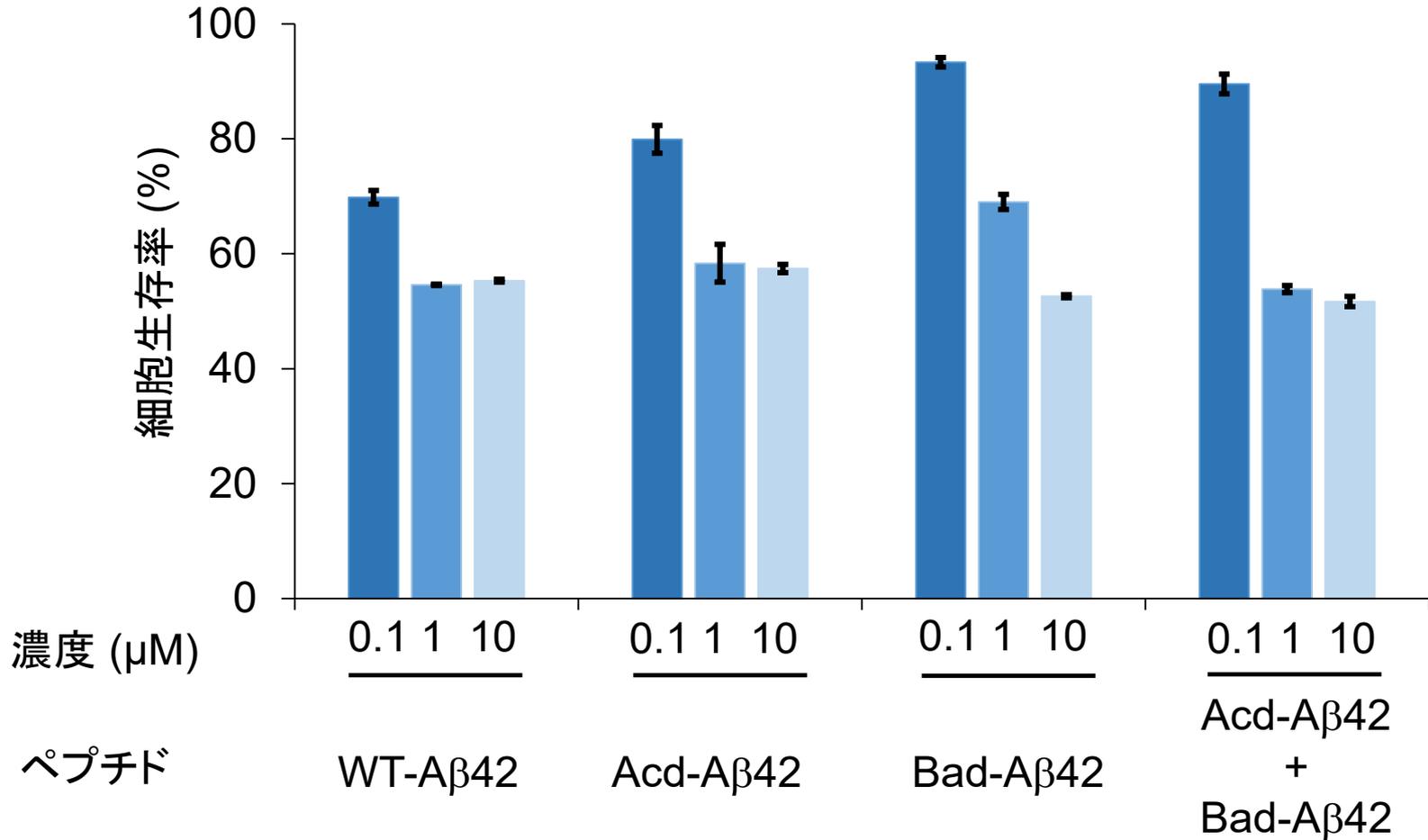
10 nm

Acd-A β 42 (12.5 μ M)
+ Bad-A β 42 (12.5 μ M)

- Acd-A β 42は、野生型と同様のフィブリルを形成する
- Bad-A β 42のフィブリルは、野生型に比べて短い

蛍光標識Aβ42の神経細胞毒性試験

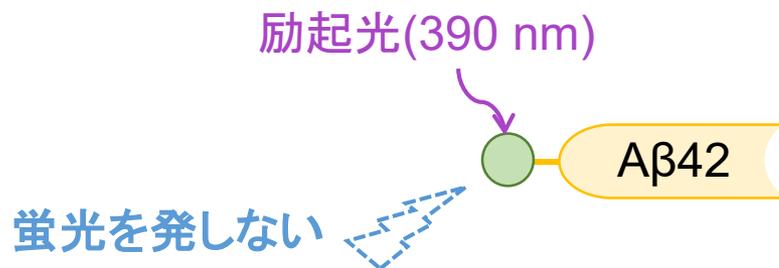
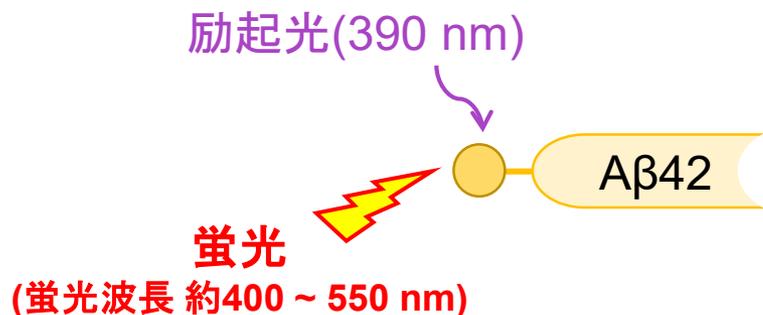
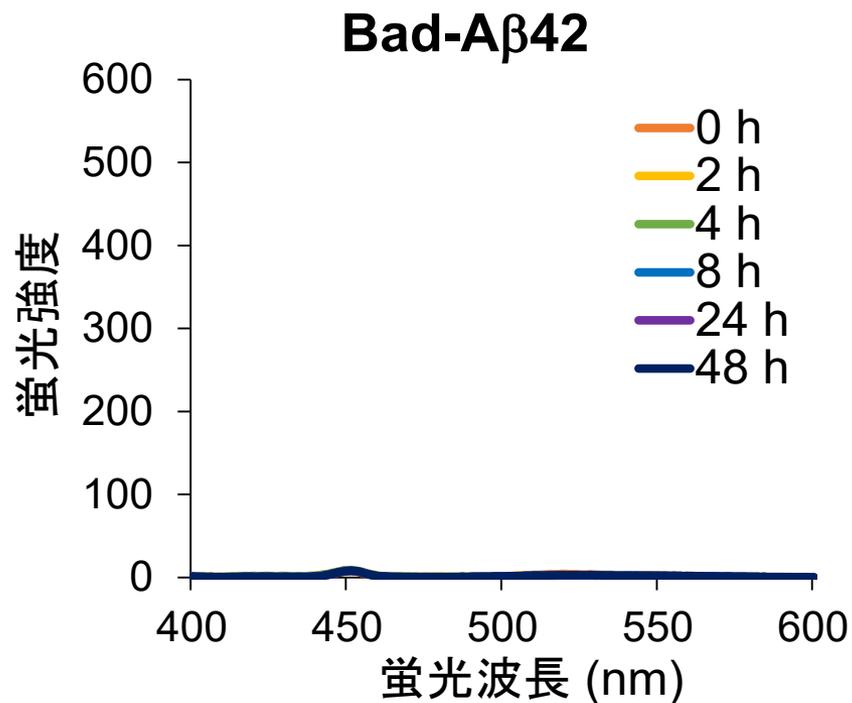
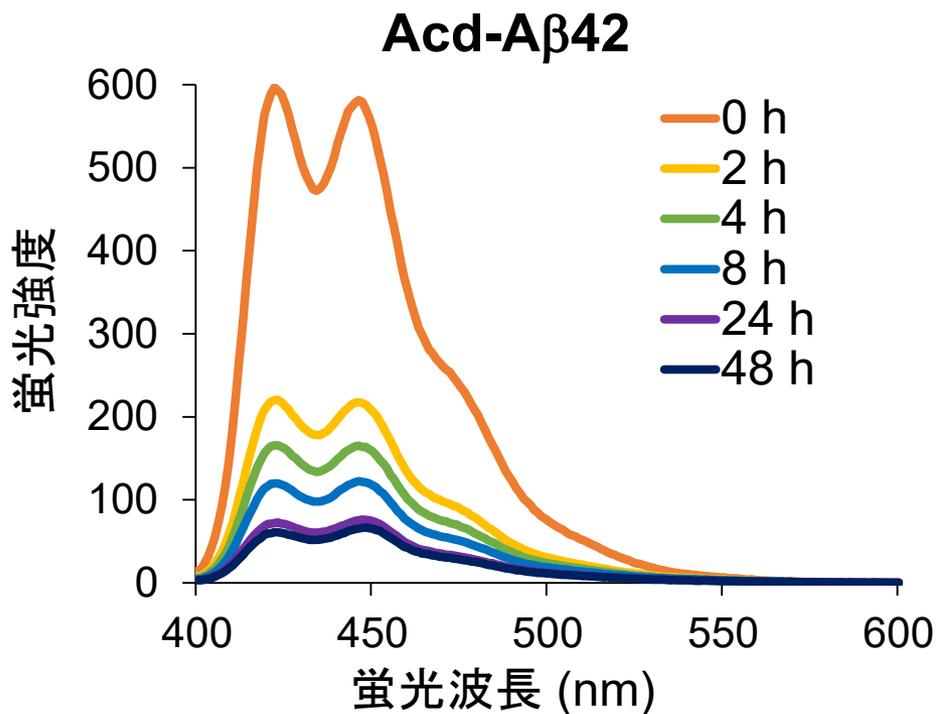
ヒト神経芽細胞腫細胞SH-SY5Yに各Aβ42を加えて、48 h 共培養



蛍光標識Aβ42の神経細胞毒性は、野生型と同等

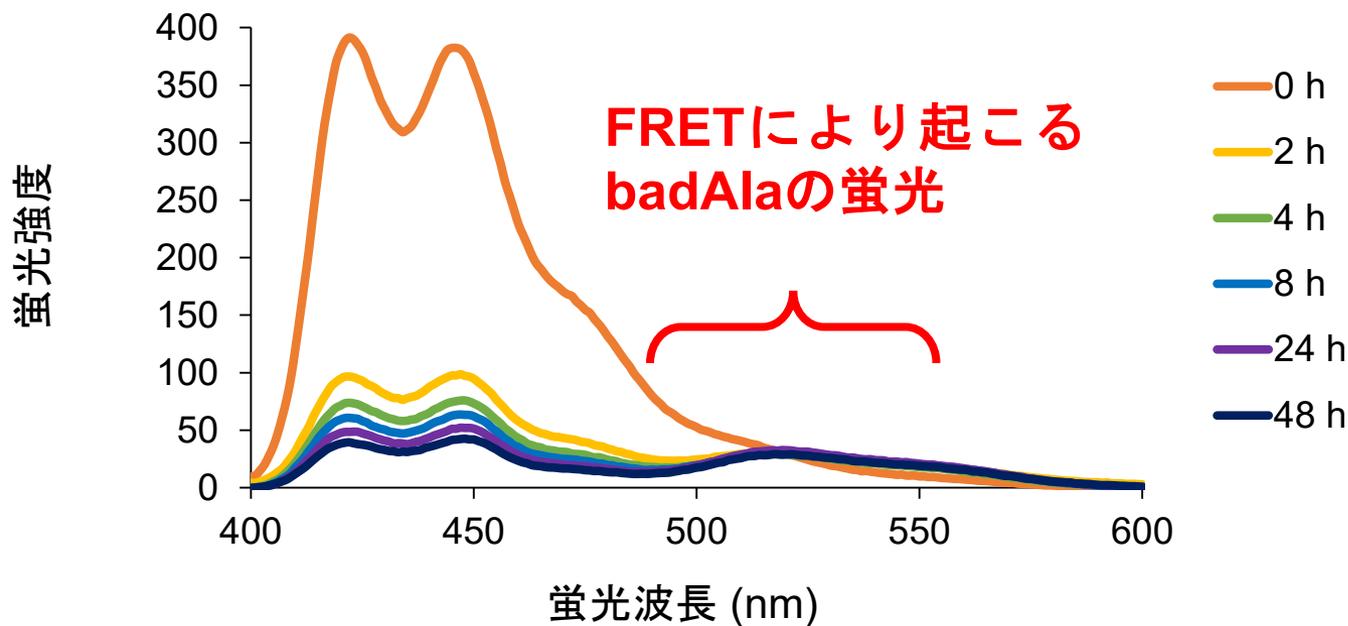
蛍光標識A β 42の蛍光スペクトル

各A β 42 (25 μ M) をPBS中、37 $^{\circ}$ Cでインキュベーション。励起390 nm。



蛍光標識Aβ42の等量混合物の蛍光スペクトル

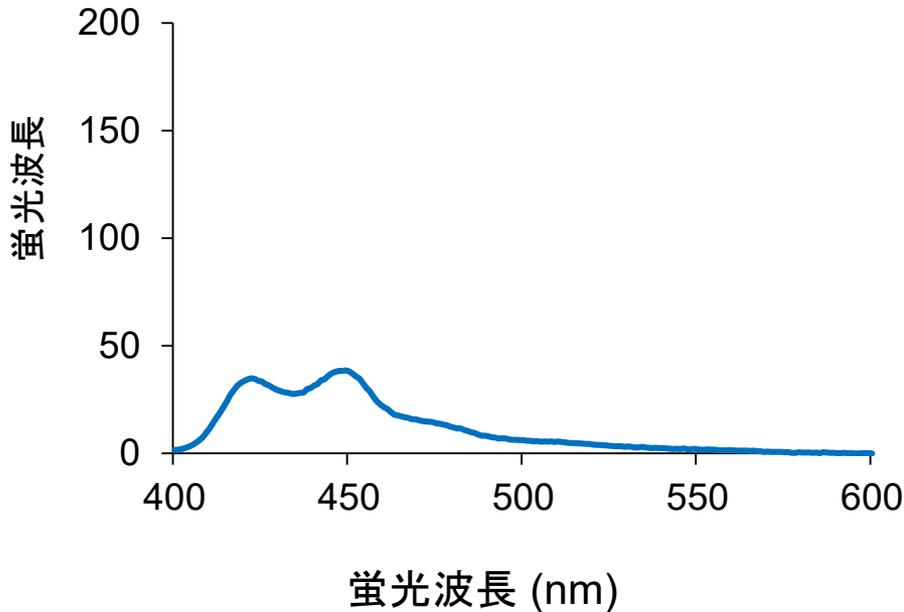
Acd-Aβ42 (12.5 μM) + Bad-Aβ42 (12.5 μM)をPBS中、37 °Cでインキュベーション。
蛍光スペクトル (励起光 390 nm)を測定



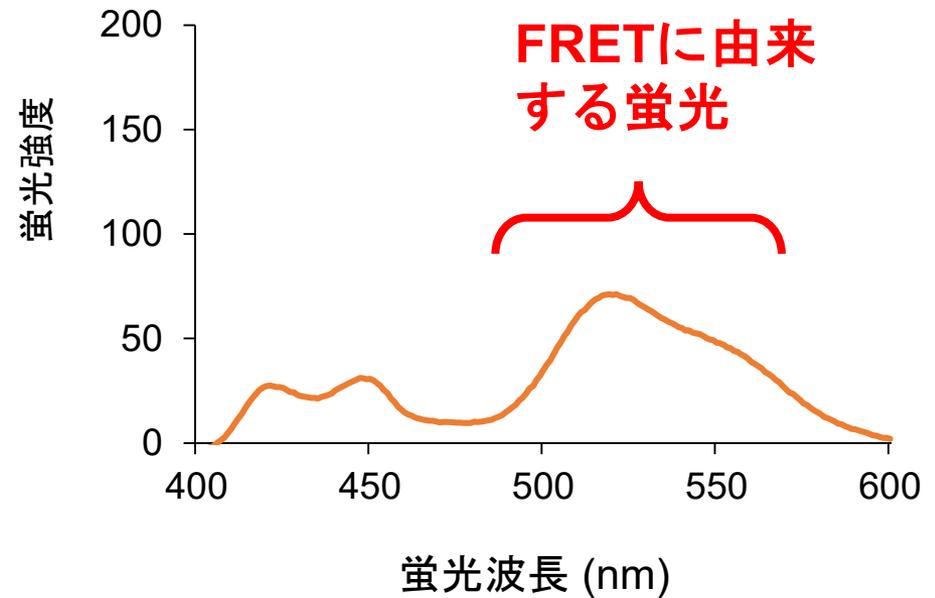
蛍光標識A β 42の等量混合物の上清と沈殿の蛍光スペクトル

48 h後のサンプルを遠心して上清と沈殿に分け、それぞれの蛍光スペクトル (励起光 390 nm)を測定

上清



沈殿



本技術のまとめ

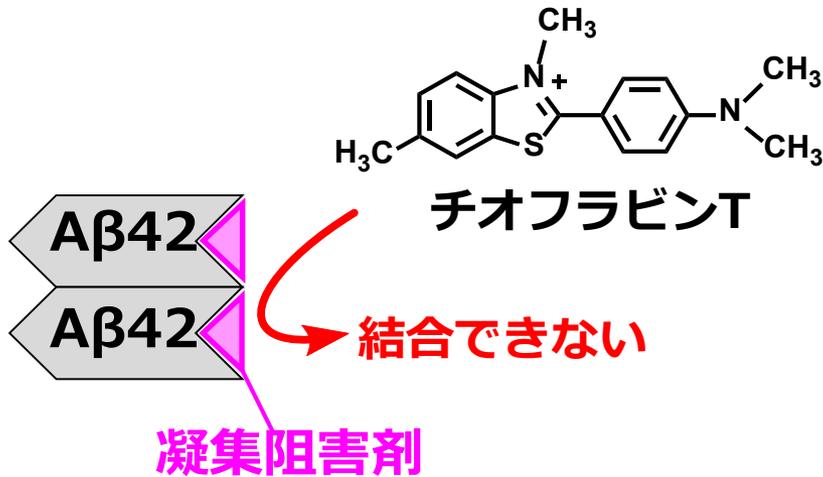
- Acd-A β 42とBad-A β 42の性質は、野生型A β 42に近い
- Acd-A β 42とBad-A β 42の蛍光強度は、かなり強い
- Acd-A β 42とBad-A β 42を混合することにより、凝集をFRETとして観察できる

本技術の課題

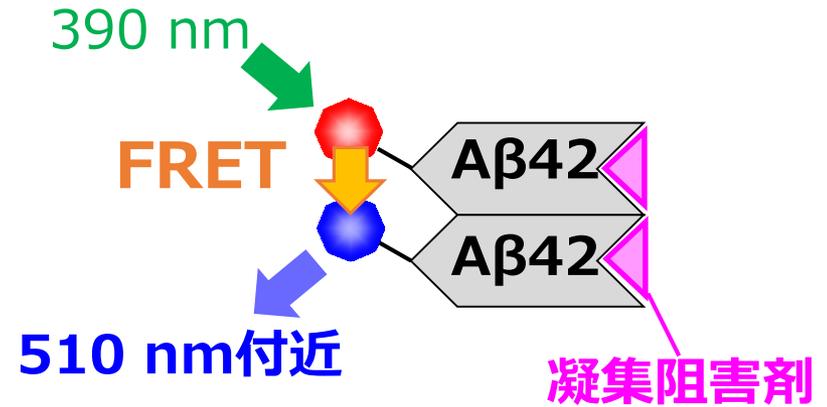
- 凝集すると、蛍光が弱くなってしまふ
- FRETの強度が弱い

従来技術との比較

[従来法（チオフラビンT法）]



[本技術（FRET法）]



本技術では、凝集量を示す蛍光値が凝集阻害剤による干渉を受けない

想定される用途

- A β 42の凝集阻害剤の簡便なスクリーニング
- 細胞や生体内におけるA β 凝集の可視化
- Acd-A β 42 or Bad-A β 42の単体使用



企業への期待

- 化合物ライブラリーを持っていて、A β 42の凝集阻害剤の探索に興味がある企業
- 生体の蛍光観察技術をお持ちの企業

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：アミロイドβの凝集体の測定方法
- 出願番号：特願2020-018764
- 出願人：国立大学法人三重大学
- 発明者：増田裕一、杉山恵里

お問い合わせ先

- 三重大学地域イノベーション推進機構
知的財産統括室

TEL: 059-231-5495 FAX: 059-231-9743

E-mail: chizai-mip@crc.mie-u.ac.jp

- 株式会社 三重ティーエルオー

TEL: 059-231-9822 FAX: 059-231-9829

E-mail: mie-tlo@mie-tlo.co.jp