

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 脳科学研究推進プログラム  
(英語) Strategic Research Program for Brain Sciences

研究開発課題名： (日本語) 血漿 A $\beta$  によるアルツハイマー病バイオマーカー探索と脳内 A $\beta$  動態解析  
(英語) Biomarker for Alzheimer's disease in plasma and A $\beta$  dynamic analysis in the brain

研究開発担当者 (日本語) 同志社大学 生命医科学部 医生命システム学科 助教 角田 伸人  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Life and Medical Systems, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University  
Assistant Professor, Nobuto Kakuda

実施期間： 平成 28 年 5 月 20 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

角田伸人 (同志社大学 生命医科学部 助教) の研究グループは、本研究で得られる基礎研究の成果を臨床研究へ橋渡しすることを目標とし、3つのテーマを実施している。1・ヒト血漿に存在するアミロイド $\beta$ タンパク質 (A $\beta$ ) によるアルツハイマー病を早期診断できるバイオマーカーの確立、2・発症機序解明を目指した A $\beta$ 分子の脳内動態変化の解析、3・新規 A $\beta$ 産生抑制ペプチドの開発である。

本年度の成果として、アルツハイマー病に対する血漿バイオマーカーの測定に必須である A $\beta$ 分子を特異的に検出するモノクローナル抗体を作製した。これまでの研究においても、この A $\beta$ 分子に対するモノクローナル抗体を既に取得していた。しかしこの A $\beta$ 分子に対する抗体の特異性は十分に高かったが、A $\beta$ 分子との親和性が弱かった。そのため、血漿のような多くのタンパク質が多く含まれるサンプルの場合、目的とする A $\beta$ 分子を特異的に検出できなかった。本年度新たに取得した抗体は、既存抗体よりも親和性が向上しており、期待される性能を有している可能性を十分に示している。現在、血漿サンプルで A $\beta$ 分子を測定できるか検討を進めている。

アルツハイマー病患者では、多量の A $\beta$ 分子の脳内蓄積が認められる。この蓄積に関する A $\beta$ 分子の脳内動態変化を解析するため、脳内に蓄積している A $\beta$ 分子を網羅的に検出する方法の開発を試みた。その方法として、特定の分子を標識する必要がなく検出できるイメージング質量分析法をもちいた。方法として、薄切した一枚の脳組織切片をイメージング質量分析で解析した結果、長さの異なる A $\beta$ 分子をそれぞれ検出できた。特に、これまでの質量分析法では検出が困難であった A $\beta$ 分子も本方により検出できた。いくつかの A $\beta$ 分子に関して、近接する切片を各 A $\beta$ に対する抗体により染色した結果、イメージング質量分析の結果を支持するものであり、イメージング質量分析は標識をもちいることなく A $\beta$ 分子を検出できることを示すことができた。

また本研究では、A $\beta$ 産生抑制剤の開発も行なっている。A $\beta$ を細胞内で産生する酵素  $\gamma$ -secretase は、同じ細胞内で他のタンパク質も切断するため、この酵素活性を阻害することは困難である。そのため、酵素側ではなく基質側 (A $\beta$ として切断される前の前駆体タンパク質 ;  $\beta$ CTF) に結合して A $\beta$ の産生のみを阻害するペプチドを開発する。これまでに、この前駆体タンパク質の $\beta$ CTF に結合し、A $\beta$ 産生を抑制する候補ペプチドを作製していた。本研究では、既存のペプチドより低濃度でも効果を示す高親和性のペプチド阻害剤の作製を試みた。ペプチドの長さを短くすることで特異性を向上させ、さらに非天然アミノ酸を用いることで親和性を向上させたペプチドを作製した。この新規阻害ペプチドの効果を試験管中で検討した結果、既存ペプチドよりも低濃度で A $\beta$ 産生阻害効果を示した。さらに $\gamma$ -secretase による他のタンパク質の切断は抑制しなかった。つまり、特異性および親和性が向上したことを示した。今後、このペプチドが生体内においても効果を示すか検討する。

The team of Dr. Nobuto Kakuda (Assistant professor, Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University) is going to three subjects of study to translate from basic life science to medical science. 1) Establishment of early stage of Alzheimer's disease (AD) biomarker in human plasma. 2) Dynamic analysis of A $\beta$  in human brains to prove AD onset mechanism. 3) Production the new A $\beta$  generating inhibitory peptides.

In this year study, we have made some antibodies against A $\beta$  to measure A $\beta$  concentration in human plasma. Actually, we have had an antibody to detect this A $\beta$ . It has well specificity but it does not have enough affinity to measure A $\beta$  in plasma. Thus, it cannot measure A $\beta$  concentration in plasma, because many proteins in plasma inhibit A $\beta$ -antibody binding. The new antibodies definitely have high affinity rather than previous it. Therefore, these antibodies have expectation to be able to measure A $\beta$  concentration in human plasma.

Abundant A $\beta$  have deposited in AD patient brains. To dynamic analysis of A $\beta$  deposition mechanism for AD onset, we have established A $\beta$  detection with imaging mass spectrometry (IMS), which can detect broad range of A $\beta$  without specific raveling against molecule and specific antibodies for A $\beta$  on the brain tissue section.

To investing IMS data, brain sections from similar brain area have stained with A $\beta$  antibodies. Thus, IMS data demonstrated A $\beta$  detection as A $\beta$  immunostaining .

This study also has developed A $\beta$  generation inhibitors. All of A $\beta$ s have been generated by  $\gamma$ -secretase in the cell. However,  $\gamma$ -secretase also generates other proteins in the same cell. Thus,  $\gamma$ -secretase inhibition is an unsuitable target for A $\beta$  generation control. We have developed new inhibitors, which will bind to only A $\beta$  containing precursor protein ( $\beta$ CTF) and inhibit  $\gamma$ -secretase cleavage for  $\beta$ CTF. We already have had these inhibitors but these showed low specificity. To develop specificity and affinity, we selected short peptide length and non-natural amino acids in the peptide. The new inhibitor peptide demonstrated specific inhibition and lower concentration efficacy rather than previous peptide inhibitor. We will demonstrate whether this new peptide inhibit A $\beta$  production *in vivo*.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）  
該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表  
該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし