

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) 医療分野研究成果展開事業 先端計測分析技術・機器開発プログラム  
(英語)

研究開発課題名： (日本語) 超音波を応用した神経変性疾患の低侵襲診断機器開発  
(英語) Development of ultrasonication-assisted non-invasive machine for  
diagnosis of neurodegenerative diseases

研究開発担当者 (日本語) 蛋白質研究所 教授 後藤 祐児

所属 役職 氏名： (英語) Institute for Protein Research, Professor, Yuji Goto

実施期間： 平成28年 9月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語)

開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名： (英語)

## II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発担当者である後藤祐児（蛋白質研究所・教授）は望月秀樹（大学院医学系研究科・教授）、荻博嗣（基礎工学研究科・准教授）、徳田隆彦（京都府立医科大学・教授）、橋本真一（コロナ電気・主任技師）とともに、超音波を応用した神経変性疾患の低侵襲診断機器開発の開発を開始した。

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患では、疾患特異的な蛋白質が異常凝集し、脳内にアミロイドとして蓄積することが原因で発症すると考えられている。髄液中の異常蛋白質凝集体の元（シード）や、その形成促進因子を検出して診断に活かす技術を開発、実用化すれば、異常蛋白質の凝集が引き起こす神経変性疾患の早期診断と治療効果判定が可能になる。HANABI は超音波発生機とマイクロプレートリーダーを組み合わせ、アミロイド原性蛋白質の線維形成を、短時間・全自動で検出する装置である。通常の振盪や攪拌では  $A\beta$  や  $\alpha$  シヌクレインの線維形成に数日を必要とするが、同装置を用いることによって、1時間以内でアミロイド形成を確認できる。一度に最大 96 サンプルのアミロイド線維形成を測定可能であり、大規模なスクリーニングを行うことができる。他方、旧型装置の問題点は、データの再現性の低さであり、その原因は、超音波発生機とマイクロプレート間の水の存在である。

本機器開発においては、現行の HANABI の問題点を解決し、さらなる高機能化を目指す。望月と徳田の臨床医学的な知見、荻の超音波工学技術、コロナ電気（株）の機器製作技術、そして、後藤の蛋白質科学を融合し、純国産の神経変性疾患診断装置を開発する。具体的には、水槽を除去することによって大幅なコンパクト化を行うとともに、安定性と再現性を格段に向上させ、臨床検査機器としての実用化を目指す。

平成 28 年度は以下の研究開発を実施した。

【開発項目 1：水槽を除去した装置を用いた最適化条件の開発】水槽を除去し、直接超音波発振動子板をプレート下面に取り付け、超音波を検体に照射する装置を製作した。この装置を用いて、実験データの豊富な  $\beta 2$  ミクログロブリン、モデル蛋白質であるニワトリ卵白リゾチーム、 $\alpha$  シヌクレインを用いて、水槽を除去してもアミロイド線維の誘導できることを明らかにした。

【開発項目 2：アレイ型超音波照射装置の開発】個々の検体に対して、音圧や周波数を制御して超音波を照射することのできるシステムの開発を開始した。このためのさまざまな条件を検討するとともに、モデル装置を作製した。

【開発項目 3：一体化装置の開発】一体型測定装置の超音波照射部の機構設計、回路設計、ソフト設計を行った。また、一体化装置の構成要素の内、検出部について、光学系、機構系、回路、ソフトの設計を行った。

【開発項目 4：臨床検体の測定と先制医療の確立】現存の HANABI を用いて、患者検体を用いた臨床実験の基盤を構築することを目指した。まず、人工的に作成したフィブリルを、ごく微量（pM 程度）加えて、そのフィブリルの存在を検出できるよう、条件検討を行った。また、 $\alpha$  シヌクレインを過剰発現する生体モデルの構築と、超音波の効果を検証した。

【開発項目 5：ELISA 法との比較】パーキンソン病とアルツハイマー病の患者の臨床検体(髄液・血液)および詳細な臨床情報も収集すると共に、収集した臨床検体中の  $\alpha$  シヌクレイン、 $A\beta$ 、それらのオリゴマーおよび他のアミロイド関連蛋白質を、既に保有している SAS-ELISA および Bio-Plex, Simoa などの測定系を用いて定量した。今後、HANABI の結果と比較対照する。

【開発項目 6：実用化と事業展開に向けた調査研究】神経変性疾患治療薬の治験に経験のある CRO の知識・ノウハウを活用して、本チームをはじめとする神経・精神内科専門医、および治療薬開発会社にインタビュー等のニーズ調査を実施すると共に、本診断システムの適応市場について特に診断薬市場および

コンパニオン診断市場の両面から調査した。

## 英文

Yuji GOTO (PI, Professor, Institute for Protein Research), Hideki Mochizuki (Professor, Medical Doctor, Medical School, Osaka University), Hirotsugu Ogi (Associate Professor, Graduate School of Basic Engineering), Tatsuhiko Tokuda (Professor, Medical Doctor, Medical College of Kyoto Prefecture), Shinichi Hashimoto (Corona Electric Co., Chief Engineer) started to work together to develop HANABI, noninvasive machine to examine the potential risks of neurodegenerative diseases taking advantage of ultrasonication to promote amyloid fibrillation dramatically.

Alzheimer's or Parkinson's diseases are likely to be caused by deposits of responsible proteins unique to each disease in brain as amyloid fibrils. Developing technologies detecting a tiny amount of seeds or related factors present in cerebra spinal fluid as well as utilizing such information for predicting a potential risk of diseases will contribute significantly to diagnosis of those diseases and moreover judging the impact of therapeutic strategies. Handai Amyloid Burst Inducer (HANABI), which combines ultrasonication and microplate reader makes efficient fibrillation of amyloidgenic proteins. Usual agitations require several days for fibrillation of A $\beta$  or  $\alpha$ -synuclein. Markedly, HANABI caused fibrillation of these proteins in an hour. Moreover, we can measure multiple samples at most 96 simultaneously, enabling a high through put analysis. On the other hand, we recognize a serious issue of current HANABI that reproducibility is low because of water bath present between ultrasonicator and sample well.

This project aims at tremendous advancement by clearing the issues of current HANABI. Specifically, by removing water-bath, HANABI will become a compact equipment with distinguished stability and reproducibility, which are qualified as a machine practically useful in medical area.

During the fiscal year of 2016, we performed the following researches and developments.

1. We developed a concise system without water bath. We demonstrated that amyloid fibrillation occurs even without water bath with several proteins. We tried to optimize the conditions of amyloid fibrillation with this system.
2. We developed an array-type system with multiple sample wells, where ultrasonic pressure and frequency applied to each well can be controlled.
3. We designed a combined system of an array-type ultrasonicator and fluorescence detector. These include mechanical design, electronic circuit design, and software design of ultrasonicator and mechanical design, optical system design, circuit design and software design of fluorescence detector.
4. We examined the conditions where we can detect a small amount of fibrils or a factor promoting fibrillation, where we used seeds fibrils made of recombinant proteins as well as samples from patients.
5. We collected clinical specimen from patients of Parkinson's and Alzheimer's patients and examined the amount of  $\alpha$ -synulcein and A $\beta$  as well as their oligomers and related components. These results will be compared with those analyzed by HANABI.
6. We performed marketing research with doctors of neurology and psychiatry and medical companies who develop therapeutic drugs, aiming to survey the potential markets and requirements for the instrument we develop.

### 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 0 件、国際誌 2 件）

1. NAKAJIMA D, NISHIOKA M, HIRAO M, SO M, GOTO Y, OGI H. Drastic acceleration of fibrillation of insulin by transient cavitation bubble. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 36, 206-211.
2. SO M, HATA Y, Naiki H, GOTO Y. Heparin-induced amyloid fibrillation of  $\beta$ 2-microglobulin explained by solubility and a supersaturation-dependent conformational phase diagram. Protein Sci. 2017, 26, 1024-1036.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 超音波に依存した蛋白質過飽和溶液の相転移現象, 口頭, 後藤祐児, 日本物理学会第 72 回年次大会シンポジウム「フォノン物理学のフロンティ: 格子振動解析から超音波応用研究まで」, 2017/3/18 日, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願