

(様式5)

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

核酸アプタマーをもちいた患者剖検脳における α -シヌクレインの検出

研究代表者 泉尾 直孝¹⁾ ²⁾
研究分担者 柿田 明美³⁾, 村上 一馬⁴⁾

- 1) 東京大学 先端科学技術研究センター 細胞関連医科学分野
- 2) 富山大学 学術研究部 薬学・和漢系 薬物治療学研究室
- 3) 新潟大学 脳科学研究所 脳疾患標本資源解析学分野
- 4) 京都大学 大学院農学研究科 食品生物科学専攻 食品生命科学講座

研究要旨

核酸アプタマーは、抗体に匹敵する高い結合能と選択性を有し、さらに抗体に比べて開発コストが低いことから、神経疾患における新しい創薬・診断モダリティとして注目されている。本研究では、 α -シヌクレインに着目し、抗体作製が難しかった N 末領域を認識する RNA アプタマーを作製し、脳切片における検出性について評価した。 α -シヌクレインのプロトフィブリルを線条体内に投与し、投与領域の脳切片を用いて α -シヌクレインの凝集体の検出を試みた。抗 α -シヌクレイン抗体を用いた場合と同様に、RNA アプタマーは α -シヌクレインの凝集体を検出することができた。現在は、脳研究所より提供いただいた患者の脳切片を用い、検出系について条件検討を重ねている。今後は、RNA アプタマーを、シヌクレイノパチー患者（多系統萎縮症・パーキンソン病）の剖検脳切片に対して適用し、脳内に蓄積した α -シヌクレインの凝集体の検出を試みる。

A. 研究目的

核酸アプタマーは 1 本鎖のオリゴ DNA (ssDNA) あるいはオリゴ RNA から構成され、分子内水素結合により多彩な高次構造をとることによって標的分子を認識する。抗体に匹敵する高い結合能と選択性を有し、さらに抗体に比べて開発コストが低いことから、神経疾患における新しい創薬・診断モダリティとして注目されている。我々はこれまで、アルツハイマー病の原因タンパク質であるアミロイド β のオリゴマー構造を標的として作製した RNA アプタマーを用いることで、その蓄積を染色にて検出することに成功している (Murakami et al. J Biol Chem 2020, Obata et

al, ACS Omega 2020)。本研究では、 α -シヌクレインに着目し、抗体作製が難しかった N 末領域を認識するアプタマーを作製し、脳切片における検出性について評価した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

α -シヌクレインに対する RNA アプタマーの作製

Gold らのグループによって開発された Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX 法) (Tuerk and Gold, Science 1990) を用い、ランダム RNA プールに対して、 α -シヌクレインの N 末領域への結合実験を試験管内で繰り返すことで、RNA ア

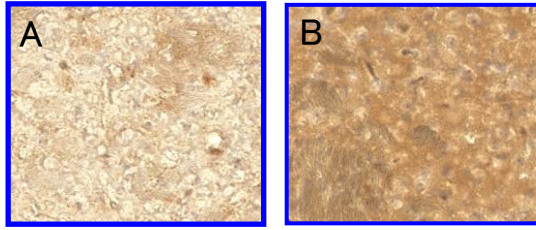


図. RNA アプタマーによる α -シヌクレイン凝集体の検出

(A) 抗 α -シヌクレイン抗体による検出。

(B) RNA アプタマーによる検出。

プタマーのクローンを得た。

α -シヌクレイン蓄積マウスの作製

α -シヌクレインのプロトフィブリルをマウス線条体に投与し、投与 1 週間後に解剖した。脳は 4% パラホルムアルデヒドの経心還流にて固定し、凍結切片 (20 μ m 厚) を作製した。

抗体を用いた α -シヌクレインの検出

凍結切片に対し、0.1%過酸化水素含有メタノール溶液により内因性ペルオキシダーゼの不活化処理を行った後、10% Normal goat serum 含有 PBST によりブロッキングを行った。1 次抗体 (抗 α -シヌクレイン (115-121 残基) 抗体、5005 倍希釈、室温、60 分) を反応させたのち、2 次抗体 (200 倍希釈、室温、30 分) 反応させ、DAB 反応にて検出した。

RNA アプタマーによる α -シヌクレインの検出

凍結切片はメタノールにて再固定し、Tris-EDTA (pH9.0) 溶液中にて抗原賦活処理を行った (90°C, 15 分間)。さらに、0.1%過酸化水素含有メタノール溶液により内因性ペルオキシダーゼの不活化処理を行った後、10 mM BSA, 10 mM yeast RNA 含有 PBST によりブロッキングを行った。ビオチン化アプタマーは、500 nM の濃度で室温で 60 分間反応させ、洗浄後、アビジンビオチン複合体反応にてシグナルを増強させ、DAB 反応にて検出した。

C. 研究結果

α -シヌクレインの C 末領域を認識する抗体により、 α -シヌクレインのプロトフィブリルを線条体に微量投与したマウスにおいて、 α -シヌクレイ

ンの蓄積が観察された (図内 A)。さらに、同マウスの切片に RNA アプタマーを適用したところ、 α -シヌクレインとみられるシグナルを検出することができた (図内 A)。現在は、脳研究所より提供いただいた患者の脳切片を用い、検出系について条件検討を重ねている。

D. 考察

本研究において作成した RNA アプタマーは α -シヌクレインの凝集を切片上で検出することができることが明らかとなった。

E. 結論

今後は、本研究において作成した RNA アプタマーを、シヌクレイノパチー患者 (多系統萎縮症・パーキンソン病) の剖検脳切片に対して適用し、脳内に蓄積した α -シヌクレインの凝集物を検出できるか否かを明らかにする。染色性を確認することができれば、病態の進行度や症状と、染色された α -シヌクレインの凝集物の蓄積度合いや分布を照らし合わせ、検証する。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし