

作成日 2025 年 3 月 13 日

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

## 日本人由来ヒトアルツハイマーアミロイドを対象とした NMR 研究

研究代表者 石井 佳誉<sup>1)</sup>  
研究分担者 柿田 明美<sup>2)</sup>, 星 美奈子<sup>3)</sup>, 山崎 俊夫<sup>4)</sup>

1) 東京科学大学 生命理工学院 2) 新潟大学 脳研究所 病理学分野 3) 神戸医療産業都市推進  
機構 4) 理化学研究所 生命機能科学研究センター

### 研究要旨

アルツハイマー病は主要な認知症で、APP タンパク質から A $\beta$  ペプチドが切り出され、線維状沈殿 (アミロイド) として蓄積するところから始まると考えられている。近年、固体 NMR 測定を中心とした解析でアミロイドの立体構造が明らかになった。脳由来のアミロイドを核として成長させた線維の立体構造は、患者ごとに異なっていた。アミロイドの立体構造と病気の性質との相関があるかが今後注目される。A $\beta$  ペプチドは主に、40 残基の A $\beta$ 40 と 42 残基の A $\beta$ 42 からなる。本研究は、日本人患者の脳組織から抽出した、A $\beta$ 42 を含む A $\beta$  ペプチドのアミロイド構造の種類の全体像を把握することを目的とする。今年度は、脳組織から A $\beta$  線維を抽出・精製する方法の改良、質量分析を用いた微量 A $\beta$  ペプチド定量方法の確立に取り組んだ。また、ヒト脳 (新潟大学脳研究所提供) より A $\beta$  線維を抽出した。得られた線維を超音波破碎により断片化し A $\beta$ 42 モノマーで成長させ、アミロイド線維が形成する事を確認した。

### A. 研究目的

(1) A $\beta$ 42を含むA $\beta$  ペプチドのアミロイド構造の種類の全体像を把握することを最終目的として、本研究では固体NMRによる構造研究のフィージビリティスタディー (実行可能性の検証) を行う。

(2) 本研究によりアミロイドの立体構造が決まる。患者によってアミロイドの構造が異なるため (Wickramasinghe *et al.*, JACS 2021など)、構造の種類の全体像を把握することが必要である。全容を把握し分類を確立することで、アミロイドの型に応じた治療法の開発が期待される。この基礎研究の成果が医療にフィードバックされ、病気の

分類確立、機序解明、治療へとつながることが期待される。

### B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

新潟大学脳研究所におけるアルツハイマー型認知症患者の剖検 (死亡後解剖) で病理診断過程に作製された脳組織を凍結保存したものを受領する。受領した凍結脳組織から A $\beta$  由来のアミロイドを抽出・精製・定量し、別途合成した安定同位体標識された A $\beta$  モノマーと混合培養する等の作業により固体 NMR 測定用に調製する。NMR 測定用に調製されたアミロイド試料は、固体 NMR 装置を用いて測定・解析を行う。必要に応じて、電子顕微鏡測定・解析も行う。

固体 NMR 測定により得られたスペクトルを試料ごとに比較し、構造の差異を検証し、分類可能であるかを調べる。質の良い試料が得られた場合は追加で測定を行い、原子レベルの構造決定を行う予定である。

本研究は、東京科学大学 人を対象とする研究倫理審査委員会（承認番号：第 2022368 号、第 2021138 号）、新潟大学 倫理審査委員会（承認番号：2020-0404）、神戸医療産業都市推進機構 研究倫理審査委員会（承認日：2021 年 7 月 11 日）、理化学研究所 横浜事業所研究倫理審査委員会（許可番号：2021-16）の承認を得ている。

### C. 研究結果

東京科学大学内での実験制限のため、A $\beta$  の抽出～定量の過程における新たなプロトコルを作成することになった。動物（豚）の凍結脳組織と合成アミロイド線維試料を用いて抽出プロトコル改良を行った。

しかし、上述の従来法をもとにしたプロトコルには、（１）A $\beta$  線維の回収量が低い、（２）抽出工程による抽出物へのバイアスがかかる（界面活性剤に溶出可能なアミロイドのみ抽出される等）という問題がある。これらの問題を克服し、本研究の目的であるアミロイド構造の全体像を把握するためには、バイアスが少なくより回収量の多い抽出法が必要である。このため、動物（豚）の凍結脳組織と合成アミロイド線維試料を用いて、磁器ビーズを用いた抽出方法の予備実験に取り組んだ。

サブピコモルオーダーの定量を指向した ELISA 法に加え、質量分析（MALDI TOF MS）を用いることで、従来の臭化シアンを用いた方法と比べ、比較的安全でかつ全長の A $\beta$  を検出可能な方法の開発にも取り組んだ。

抽出後の A $\beta$  線維の確認は電子顕微鏡を用いて行っているが、抽出過程で脳組織由来の不純物が混在していた場合、A $\beta$  線維の特定が困難となる。そのため、金ナノ粒子で標識した抗体を用いた、A $\beta$  線維特異的な観察法の最適化を行った。動物（豚）の凍結脳組織と合成 A $\beta$  線維を試料とした予備実験では、A $\beta$  線維が金ナノ粒子で標識されていることを確認した。さらに、新潟大学より受領したヒト脳組織試料から抽出したアミロイド

線維を試料として、同様の結果を得ることに成功した。

また、ヒト脳組織試料から抽出したアミロイド線維を超音波破碎したものを少量用いて別途合成された A $\beta$  モノマーと混合培養し、アミロイド線維が形成された事を蛍光測定により確認した。

### D. 考察

なし（研究継続中のため）

### E. 結論

なし（研究継続中のため）

### F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

#### 1. 論文発表

なし（研究継続中のため）

#### 2. 学会発表

なし（研究継続中のため）

### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし