（ 様式D－２ ）
（ 別　　紙 ）

令和　５ 年度　海外派遣研究員研究報告書

令和６年５月６日

日本大学理事長　　殿
日本大学学長　　殿

所　　属　生産工学部
資格・氏名　教授　・　吉宗一晃
■本報告書の内容を公表することは了承しております。
（公表可の場合，チェック■すること）

令和 ５ 年度海外派遣研究員（　短期Ｂ　）の研究実績を，下記のとおり報告いたします。

記

１　区　　分　　短期Ｂ
２　研 究 課 題

医療分野への応用を目的としたタンパク質複合体の新規制御方法に関する研究

３　派 遣 期 間　　西暦　2024　年　3　月　27 日　～　2024　年　4　月　10 日
４　派　遣　先　　アメリカ
５　研 究 目 的　　世界的な高齢化に伴って認知症患者が増加しており，世界で5,500万人が認知症を患っている。今後もこの傾向が続くことが予想され，2050年までに患者数は1.5億人以上にのぼると予測されている。認知症は患者本人だけでなく，介護する負担も生じるためその早急な対応が必要である。認知症の中でもアルツハイマー病(AD)はその過半数を占めており，特に治療法の確立が求められている。ADの発症原因には様々な説があるものの，ADの特徴の一つである脳に現れる老人斑の主要な構成成分であるアミロイドβ(Aβ)の凝集がきっかけとなって神経細胞死を引き起こすというアミロイドカスケード説が有力である。この説に基づいて，脳内Aβ凝集体を抗体により除去することでADの進行を抑制する抗体薬が2023年に発売されている。しかしながらAβ凝集体には様々な形状があり，その形状によって抗体との反応性が大きく変化する。我々はこれまでに化学合成したAβの凝集体形状を制御して、抗体が結合しやすい形，つまり治療しやすい形にする方法を明らかにしている。本海外派遣ではこの化学合成したAβに対する凝集制御方法がヒト脳組織由来のAβに対しても有効であることを示す。この研究によって，これまでの合成Aβを用いた研究がヒト由来の試料にも適用できることが確認できれば，これまでに得た知見を医療分野に応用できる。

（ 様式D-２ ）

6　研 究 概 要

アミロイドカスケード説においてADを引き起こすと考えられているAβは疎水性アミノ酸残基を多く有するため，非常に凝集しやすく，その凝集の程度によって毒性が大きく異なる。例えばAβモノマーは毒性が低いが，凝集してオリゴマーになると細胞毒性が高くなることが報告されている。さらに凝集が進むと規則正しいβシート構造からなる線維状凝集体及び，Aβが不規則に凝集した非晶質凝集体となる。線維状凝集体や非晶質凝集体の毒性の程度については様々な報告があるが，少なくともAβ凝集体の大きさや形状によって毒性が異なることは間違いない。このため，Aβ凝集体の大きさや形状を制御すること，それらを正確に把握するための測定技術が必要である。

これまでにAβ凝集体の大きさや形状を測定するために，チオフラビンTを用いたβシート構造の検出，フーリエ変換赤外分光法や円二色性スペクトル(CD)を用いた二次構造の測定，金ナノ粒子をAβに標識してX線照射して得られる回折像を解析することでAβ分子の動態を測定する回折X線ブリンキング法による解析及び，原子間力顕微鏡(AFM)による画像解析を行った。しかしながらこれらの分析方法は様々な夾雑物質が混在している脳組織由来のAβでは夾雑物の妨害により正確に分析することはできない。このため，これらの方法では合成したAβを不純物の少ない条件で観測する必要がある。これらの測定結果から生体内でのAβの挙動を推測しているが，合成Aβを用いた実験による結果が生体内のAβの挙動を反映しない恐れがある。

この問題を解決するために，我々はモノクローナル抗体を用いて生体中のAβ凝集体の大きさや形状の評価を試みている。抗体は夾雑物の共存下においても特定のタンパク質に特異的に結合する性質を持つため，酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)や免疫染色により，生体中のAβ凝集体の大きさや形状を評価できる。これまでに合成Aβを用いた凝集実験や神経細胞にAβ遺伝子を強制的に発現させた実験において，細胞内に形成されたAβ凝集体と抗Aβ抗体との反応性が経時的に変化することを観察しており，これら抗体を用いて生体中のAβ凝集体の大きさや形状を評価できることを示した。この結果においても生体由来Aβ挙動と合成したAβの挙動との相違については評価されておらず，生体内のAβの挙動が正しく予想されていない恐れもある。

本海外派遣ではAD患者の脳組織由来のAβを用いて，これまでに合成Aβを用いた実験で得た凝集形態の制御方法の適用を試みた。このAβ凝集体の制御は我々が作成した非晶質Aβ凝集体とのみ反応する抗Aβモノクローナル抗体を用いて評価した。合成Aβを用いた凝集体は低濃度の試薬の添加により構造変化し，抗Aβモノクローナル抗体との反応性が上昇する。この様な合成Aβを用いた実験で見られた現象が，ヒト脳由来のAβにも見られることを確認する計画を立て，アミロイドカスケード説の提唱者の一人であるアメリカのハーバード大学医学部のデニス・セルコー教授の研究室の研究責任者の一人である劉磊博士(Dr. Lei Liu)の研究室で研究を行った。今回の研究に用いた抗Aβ凝集体３次元モノクローナル抗体は株式

会社イムノ・プローブで販売されている５種類を用いた。これらの抗体は凝集過程で形成されるＡβの立体構造を認識する抗体で，Ａβの凝集過程に応じて凝集体との反応性が異なる。これらの抗体を用いたELISAにより，Ａβの凝集過程を評価し，ヒト脳組織由来のＡβ凝集体の凝集過程の制御に関する研究を行った。

7　研究結果・成果

これまでに我々は人工合成した$A\beta_{42}$について，その凝集の抑制やＡβ凝集体の脱凝集方法に関する研究を行ってきた。この知見をヒト脳組織由来のものに適用することを目的としていたため，アメリカのハーバード大学医学部ブリガム・アンド・ウィメンズ病院神経内科の研究責任者である劉磊博士(Dr. Lei Liu)の研究室で研究を行った。この研究室では人工合成されたＡβは使っておらず，すべての実験においてAD患者の脳組織由来のＡβを使用して実験している研究室である。

これまでの我々の実験では合成$A\beta_{42}$を有機溶媒により処理することで可溶性のＡβ凝集体を作製し実験に用いている。この可溶性Ａβ凝集体はリン酸緩衝食塩水(PBS)中で比較的安定で，その形状がほとんど変化しない性質を持つ。しかしながら特定の条件において，この凝集体の形状は経時的に変化するため，その変化を我々が作製したモノクローナル抗体との反応性を測定することで評価した。この様にＡβ凝集体の形状を制御することで脳内に蓄積したＡβ凝集体を脱凝集し細分化することで，脳から排出させることができれば，ADの治療に貢献できる可能性がある。

ヒト脳組織などの生体試料には様々な夾雑物が含まれるため，Ａβ凝集体の形状はELISAを用いて評価した。抗Ａβ抗体は株式会社イムノ・プローブで市販されている抗Ａβモノクローナル抗体である抗体31-2，37-11，75-2，77-3及び，79-3を用いた。これらの抗体はＡβに対する抗体であるが，Ａβ凝集体の大きさや形状に対してそれぞれ異なる反応特異性をもち，例えば抗体31-2は直径220 nm以下のタンパク質を通過させる限外ろ過膜上に残渣として濃縮される相対的に大きな非晶質のＡβ凝集体と反応しやすく，抗体75-2はこの限外ろ過後のろ液に存在する相対的に小さなＡβ凝集体と良く反応する。

今回行ったELISAにより，使用した抗Ａβモノクローナル抗体はすべてAD患者の脳組織から得たＡβと反応することを確認できた。このことから今回用いた脳組織由来の試料中にも非晶質のＡβ凝集体が含まれていることが示唆された。さらにこの脳組織由来の試料に対し合成$A\beta_{42}$凝集体が脱凝集する試薬で処理することで，これら抗体との反応性が上昇することを確認できた。これらのことから合成$A\beta_{42}$の凝集体と同様な方法で脳組織由来のＡβ凝集体を脱凝集できる可能性を示唆できた。この脱凝集処理は非常に低濃度の試薬を添加するため，生体にほとんど無害な方法である。この様にヒト脳組織由来のＡβは合成$A\beta_{42}$の凝集体と同様の抗体反応性を有しており，これまでの合成$A\beta_{42}$凝集体の結果をヒト脳組織のＡβに適用でき

ることが示唆された。今後は，この方法を用いた脳内Aβ凝集体の脱凝集を試みる。

研究室内には学会発表に使用されたポスターが貼付されており，その発表内容について議論できた。その中にはAβに結合する抗体を用いて毒性の高いAβを除去する多くの試みがなされていた。抗Aβ抗体の立体構造を計算で予測し，部位特異的変異の導入により脳組織のAβとより選択性の高い抗体をデザインした結果など，抗Aβ抗体の高品質化に関する研究があった。一方でADの抗体薬による治療の限界についても議論された。非常に高額な費用をかけてAD患者に対して週に2度，長時間かけて点滴注射して大きな効果が見られない場合もあり，抗体薬以外の治療の研究の必要性についても意見交換した。

これらの議論を通じて，今後の共同研究を含む研究方針を立てることができただけでなく，ハーバード大学におけるアルツハイマー病研究の最新の動向をある程度知ることができた。短い間ではあったが，有意義な海外派遣となった。

劉磊博士には渡航前の準備から帰国後まで親身な助言を頂きました。ジャン・ピエール博士(Dr. Jean Pierre Roland Bellier)には，実験だけでなく研究室でのセミナーやコーヒーを頂きながらの研究紹介及び，研究のアドバイスを頂いた大変お世話になりました。研究室の皆様にもこの場を借りてお礼申し上げます。

以　　上