

# 構造異常型 SOD1 のシーディングを基盤とした神経難病 ALS の血液診断法の開発

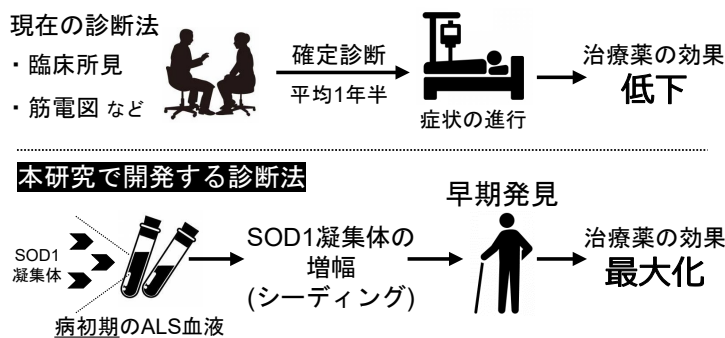
徳田 栄一

日本大学薬学部 臨床医学研究室

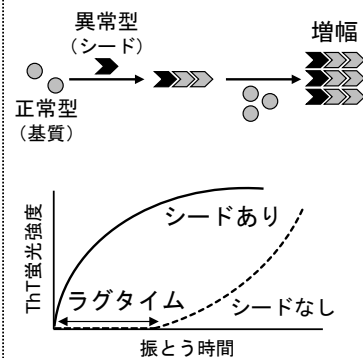
【背景】筋萎縮性側索硬化症(ALS)は筋萎縮や呼吸不全が急速に進展する神経難病である。現在、ALS の病状進行を緩徐にする薬剤が開発されているが、その効果は「病初期」に限られる。臨床所見と筋電図による従来の診断法では、確定診断まで年単位の時間を要するため、患者は治療の恩恵が得られにくい[図 A, 上段]。よって、発症前や病初期でも診断可能な手法を開発できれば、既存薬や治験薬の治療効果を最大化できると考えられる。

ALS の脳内には Superoxide dismutase-1(SOD1)タンパク質が凝集体として蓄積している。演者の先行研究から、SOD1 凝集体は「病初期」の ALS 患者の脳脊髄液(CSF)に含まれることが判明し[Tokuda 2019 *Mol Neurodegenet*]、SOD1 凝集体の診断バイオマーカーとして可能性が拓かれた。しかし、CSF の採取は腰椎穿刺で行われるため侵襲性が高く、繰り返しの採取は患者の身体的負担が大きいため、診断応用への可能性は限定的である。一方、CSF は脳の循環血液と合流するため[Ahn 2019 *Nature*]、SOD1 凝集体は極微量ながらも末梢血中に出現すると予想された。

## A. 本研究の目的 ~ALSの血液診断法の開発~



## B. シーディングとは?



【目的】本研究では、ALS の早期発見を可能とする血液診断法の開発を行う。申請者は「病初期」の ALS 患者の血中に含まれる極微量な SOD1 凝集体を試験管内で「シーディング」により増幅させることで、凝集体の増幅の有無から、病初期での診断が可能と考えた[図 A, 下段]。この目的を達成するためには、①組換え SOD1 を用いた高感度シーディングアッセイの開発、②ALS 血液を開発したアッセイで解析し、診断感度と特異度の算出、が必須となる。本課題では、①について注力した。

## 【結果】

**本研究の診断技術の原理** シーディングとは、凝集体が構造的な鋳型(シード)となり、正常型タンパク質を凝集化させる現象で、凝集体の増幅を可能とする[図 B, 上段]。シーディング現象は凝集体と特異的に結合するチオフラビン T(ThT)の蛍光強度を追跡することで容易にモニターできる。SOD1 と ThT の混合液を 96 ウェルプレートに加え振とう攪拌し、

ThT の蛍光強度を追跡すると、蛍光が見られない一定期間(ラグタイム)が存在する。その後、SOD1 の凝集化が進むと蛍光強度が増加する[図 B, 点線]。一方、事前に凝集体をシードとして SOD1 溶液に加えておくと、ラグタイム短縮し ThT 強度が爆発的に増加する[図 B, 実線]。つまり、ALS 患者と対照疾患の血液(=シード)を SOD1 溶液(=基質)に添加し、ラグタイム短縮の有無を比較することで、ALS であるかどうかを判断できると考えた。

**組換え SOD1 を用いた高感度シーディングアッセイの開発** 演者の先行研究から、ALS の血中に出現する SOD1 凝集体はピコ濃度以下であると推察された[Tokuda 2019 *Mol Neurodegenet*]。まず、ピコ濃度の凝集体がラグタイムを短縮するシーディング条件を探索した。タンパク質の溶解性や凝集性は溶液中に共存する塩の影響を受ける(塩析効果)。塩析は塩の種類や濃度によって異なり、その効果を順位付けしたものを「ホフマイスター系列」と呼ぶ。従来のシーディング実験は、低濃度(100 mM)の NaCl 溶液中で行われており、ホフマイスター系列に照らし合わせると、塩析効果は弱い。一方、グアニジン塩酸塩のような変性作用を持つホフマイスターイオンは、SOD1 のシーディングを加速することが古くから知られてる。そこで、ホフマイスターイオン全 16 種の中で、最も SOD1 のシーディング感度を増強するイオン種を探索した。

低濃度(100 mM)、中濃度(400 mM)および高濃度(1000 mM)の各ホフマイスターイオンを調製し、シーディングの基質となる SOD1 溶液と混合した。この混合液に SOD1 凝集体をシードとして添加し、振とう攪拌しながら、ThT の蛍光強度を定期的にモニターした。その結果、400 mM Cl<sup>-</sup>や Br<sup>-</sup>などの陰イオン溶液中で、SOD1 凝集体のシーディング感度が約 100 倍増強することが明らかとなった。

**【今後の展望】** シーディング感度の増強が見られたホフマイスターイオンについて、ヒト血液でピコ濃度まで段階希釈した SOD1 凝集体が、シーディングを誘発するか検証する。

**【結論】** ホフマイスターイオンにより、SOD1 凝集体のシーディング感度は大幅に向上する。

**【本課題に関連する研究活動】** 本研究課題の着想や一部の成果をもとに、科研費1件[挑戦的研究(萌芽)]、民間財団の助成金7件[①持田記念医学薬学振興財団, ②横山臨床薬理研究助成基金, ③日本ALS協会, ④濱口生化学財団, ⑤せりかALS基金, ⑥宮田幸比古記念ALS研究助成基金, ⑦武田科学振興財団]の獲得につながった。本課題は、本学 産官学連携知財センターが発刊する NUBIC NEWS 2021 December の「進化する研究の真価」にて紹介された。この NUBIC NEWS での紹介が契機となり、第1回 千葉エリア産官学連携シンポジウムにて招待講演を行うことができた。

**【謝辞】** 本研究は、2021年度 日本大学薬学部 研究推進助成金の支援を受けて遂行しました。心より感謝申し上げます。