

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14936

研究課題名(和文)非侵襲で高精度な診断治療ナノデバイスの開発と腎排泄機構の解析

研究課題名(英文)Development of noninvasive and accurate theranostic nanodevices and analysis of their renal excretion

研究代表者

加藤 大(Kato, Masaru)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：30332943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：尿や血中に存在するcell free DNAは、がん等の疾患のバイオマーカーとして注目を集めている。そこで、本研究では、粒子を利用して体液中に存在するcfDNAの高効率な回収法の開発を行った。多数のリン酸基を有することから負電荷を帯びているDNAを効率的に回収するために、様々な正電荷を有する粒子を調製し、DNAの回収を試みた。その結果、ポリリジン、トリアミン、トリメチルアミンなどを修飾した粒子でDNAが効率的に回収できることが分かり、実際に、尿からcfDNAの回収にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Cell free DNAs in urine and blood are attracting many attentions as biomarkers for diseases such as cancer. Hence, we developed a simple and efficient extraction method of cfDNA in body fluid using particles in this study. In order to extract negatively charged DNA, particles coated with various positive charges were prepared and quantity of DNA extraction was examined. We found that particles coated with polylysine or triamine or trimethylamine captured DNA efficiently and we succeeded in extraction of large amount of cfDNA from urine.

研究分野：分析化学、ナノバイオ

キーワード：cfDNA 粒子 抽出 前処理 尿

1. 研究開始当初の背景

DNA 分析は、病気の診断や血縁・品種の鑑定など様々な用途で行われているが、その分析には、生物試料からの DNA 抽出が必須である。本研究では、DNA が多数のリン酸基を有することに注目し、ポリカチオンである poly-Lys を修飾したシリカ粒子を調製し、溶液中の DNA の効率的な回収法の開発を行った。

2. 研究の目的

ナノ粒子は、表面積が大きく、いろいろな機能を付与することができるので、新しい多機能ナノ粒子の研究開発が盛んに行われている。申請者は、静脈投与すると、血流のよって体内を循環した後、速やかに尿排泄される大きさ約 100 nm のナノ粒子を開発した。本研究提案は、糸球体膜の膜孔よりも大きなナノ粒子が尿排泄される仕組みを解明するために、ナノ粒子の排泄機構の解析、及び本ナノ粒子を血液中のバイオマーカーや不要物を捕捉した後、尿中に排泄させることで物質回収用デバイスとしての応用を目指し、標的物質の捕捉能を付与したナノ粒子を開発する。そのために、まず生体液である尿から効率的に DNA を回収する手法の開発を目指し、各種表面修飾した粒子を調製し、DNA の回収量を評価した。本報告書には、これまでに既に外部発表を行った成果のみを記載する。

3. 研究の方法

1) DNA 回収用 poly-Lys 修飾粒子の調製

10 mL の 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) 中でシリカ粒子 (silica gel 60N, 250 mg) と poly-Lys (100 mg, powder form) を 30 分間混合した。その後、粒子を 10 mL の 100 mM Tris 緩衝液で洗浄し、冷蔵庫 (4 °C) で保管した。

2) 粒子を利用した尿試料からの DNA の抽出

健康人から提供された 50 mL の尿を 10 分間遠心 (600 ×g) することで、細胞を取り除いた。100 μL のプロテイナーゼ K を加えた後、55 °C で 30 分間放置した。その後、20 μL の poly-Lys 修飾粒子 (約 6.8 mg) を添加し、30 分間攪拌を行った。上層を取り除いた後、粒子を水で 2 回洗浄した。さらに 30 μL の 100 mM 炭酸水素ナトリウム (pH 11) を添加し、80 度で 30 分間放置することで、粒子に捕獲されている DNA を脱離させ回収した。本回収は必要に応じて 2 回行った。

3) DNA の定量

96 穴マイクロプレートのウエルに 10 μL の試料溶液と 190 μL の Qubit dsDNA HS 溶液を加えた後、プレートリーダー (SH-9000) で測定を行った。励起波長と蛍光波長は、それぞれ 485 と 520 nm に設定した。

4. 研究成果

シリカ粒子自身は、カオトロピック剤が共存すると DNA に対して親和性を有することから DNA の捕捉・回収に利用されている。しかしゼータ電位が負であるシリカ粒子は正電荷の物質を添加すると、静電相互作用により粒子表面に吸着する。特にポリカチオン物質のような正電荷を多数有する高分子は高い親和性で表面吸着する。その結果、正のゼータ電位を有する粒子となり、今度はカオトロピック剤が存在しなくても DNA のような負電荷を有する物質に対して強い親和性を示すようになる。したがって、poly-Lys を修飾したシリカ粒子は、DNA を効率的に回収すると期待された。そこで市販のポリカチオンである poly-Lys に注目し、poly-Lys 修飾シリカ粒子の調製を試みた。本実験では、100 mg のシリカ粒子の懸濁液に対して poly-Lys を 40 mg 添加し、混合した後、水で繰り返し洗浄することで、吸着しなかった poly-Lys を除去することで、poly-Lys を被覆した粒子を調製した。シリカ粒子に poly-Lys が吸着したことを確認するために、粒子の懸濁液にアミノ基に反応する FITC-I を添加して、Lys のアミノブチル基を蛍光標識した。図 1 は、シリカ粒子の明視野像と蛍光像である。明視野像より、粒子は poly-Lys の被覆の有無に関わらず、大きさ 60 μm 程度の球体であることが確認された。蛍光像を比較すると、poly-Lys を被覆していないシリカ粒子からは蛍光がまったく検出されないのに対して、poly-Lys を被覆した粒子からは緑色の強い蛍光が観察された。これは粒子に吸着した poly-Lys に FITC-I が結合したためと考えられる。つまり添加した poly-Lys はシリカ粒子の表面に吸着していることが確認された。

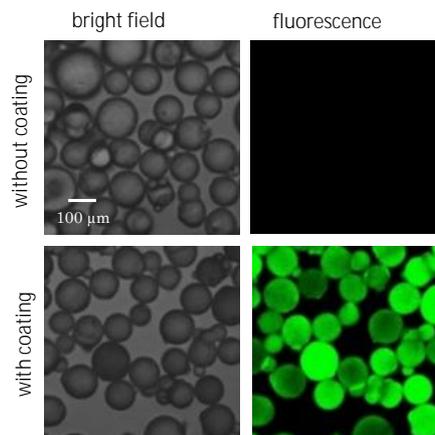


図 1 Poly-Lys 修飾を行った粒子と行っていない粒子の明視野及び蛍光像

次に、添加する poly-Lys 量を変化させた時にシリカ粒子によって回収される DNA の量を比較した(図2)。本実験では、100 mg のシリカ粒子の懸濁液に対して添加する poly-Lys を 0-100 mg の範囲で変化させ被覆した粒子を調製した。Poly-Lys を修飾していない粒子も DNA を捕獲する性質を僅かに示したが、poly-Lys の添加によって回収される DNA 量が大幅に増加し、添加量が最も多い 100 mg の時に最も多くの DNA が回収された。以上より、シリカ粒子に対して 100 mg の poly-Lys を添加することで DNA 捕捉に適した粒子が簡単に調製できると考えた。

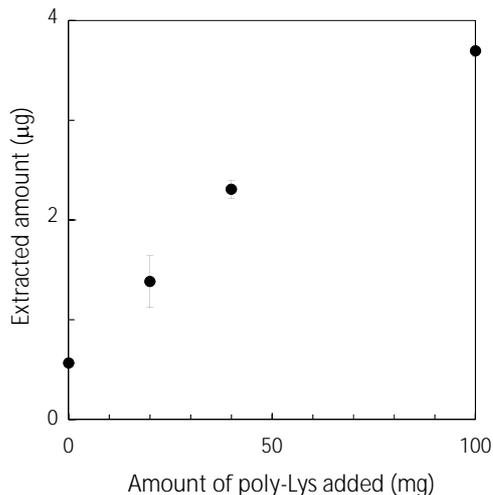


図2 Poly-Lysの添加量がDNAの回収に与える影響

次に調製した粒子の量を一定にして、溶液に添加する DNA 量を変化させることで、捕捉可能な DNA 量を求めた。0.2-200 μg の DNA を添加した溶液からの DNA の回収を試みた。溶液中の DNA が増加するほど回収される DNA の量も増加した(図3)。粒子で回収した溶液

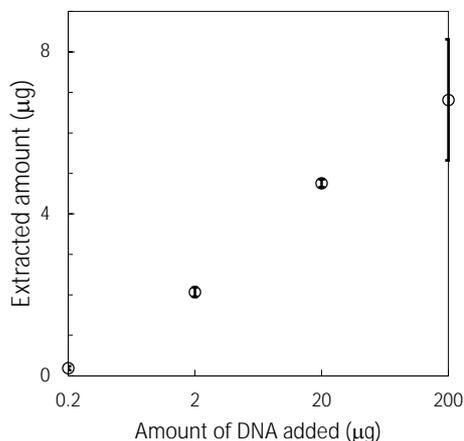


図3 DNAの添加量と回収量の関係

に残っている DNA の量を測定した結果、DNA の添加量が 0.2, 2 μg の溶液からは DNA は検

出されなかったが、20, 200 μg の溶液からは DNA が回収された。したがって、20 μL の poly-Lys 修飾粒子(約 6.8 mg)では、数μg 程度の DNA が回収可能であることが分かった。尿中には、100 ng/mL 程度の cfDNA が存在すると報告されていることから、本粒子によって回収可能と考えた。

DNA 回収用粒子が簡単に調製できたことから、今度は水と尿に、1 μg と 2 μg の DNA を添加した溶液からの回収を試みた。水と尿から回収される DNA は、添加量が増えるほど増加し、水と尿では回収量に大きな違いは見られなかった(図4)。本結果から尿成分は、DNA の回収に大きな影響を与えないと考えられる。つまり本粒子は、尿中 DNA の回収に利用可能であると予想された。

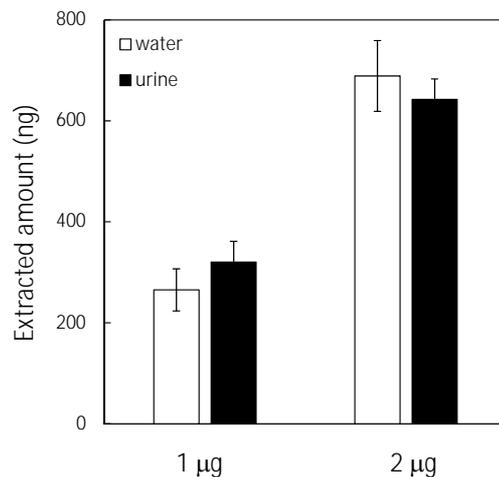


図4 DNAの添加量と回収量の関係

実際に健常人の尿から本粒子を用いて DNA の回収を試みた。その結果、50 mL の尿から 1.1-1.5 μg の高純度な DNA が回収された。そこで回収した DNA をそのまま、さらに RNase もしくは DNase で酵素処理した試料を電気泳動で分析した(図5)。本粒子によって、尿からは非常に短い DNA が回収されていることが分かった。また RNase で処理しても量がほとんど変化せず、DNase で処理することでバンドの信号が大きく減少したことから、本粒子によって尿から回収された成分は DNA であることが確認された。

短い鎖長の DNA が回収された理由を探るために、DNA ラダーを添加した溶液から本粒子を用いて DNA の回収を試みた。その結果、ラダー自身を電気泳動すると 100, 200, 500 bp の DNA の存在比が多いのに関わらず、粒子で回収された DNA は 20 bp の DNA の存在比が多かった(図6)。つまり本粒子は、鎖長の短い DNA を効率的に回収する性質を持っていると考えられる。

以上より、本研究によって、50m L 尿から、高純度の cfDNA を簡単に大量に回収する手法を開発した。cfDNA はガン等の疾患に関与

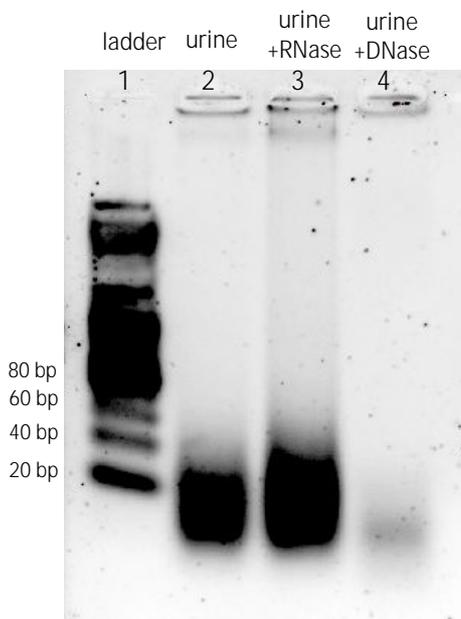


図5 尿から回収した DNA の電気泳動

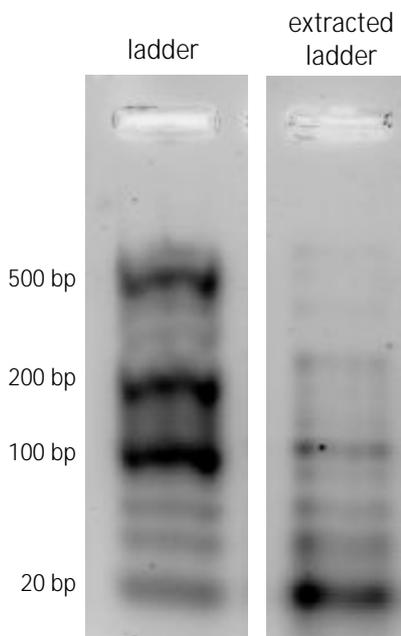


図6 粒子によって回収した DNA の鎖長分析

することが報告されているため、本手法は病気の早期診断などへの利用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

S. Takano, Q. Hu, T. Amamoto, P. Refinetti, K. Mimori, T. Funatsu, M. Kato, "Extraction of cell-free DNA from urine using polycationic polylysine-coated silica particles"

Analytical Bioanalytical Chemistry, 査読有, 409, 2017, 4021-4025, DOI: 10.1007/s00216-017-0345-3.

〔学会発表〕(計 4 件)

高野 勝、村山周平、青木伊知男、船津高志、加藤 大, 体液中 cell-free DNA 回収粒子の開発, 第 30 回バイオメディカル分析科学シンポジウム(BMAS2017), 2017 年

高野 勝、船津高志、加藤 大, Poly-Lys 修飾粒子を用いた尿中 cell-freeDNA の回収, 新アミノ酸分析研究会第 7 回学術講演会, 2017 年

高野 勝、村山周平、胡 慶江、三森功土、青木伊知男、船津高志、加藤 大, ナノ粒子を用いた生体液中 DNA 回収用デバイスの開発, 日本薬学会第 135 年会, 2016 年

高野 勝、加藤 大, 粒子を用いた生体液中 DNA 回収用デバイスの開発, 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
<http://www10.showa-u.ac.jp/~bachem/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 大(KATO, Masaru)
昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：30332943

(2)研究分担者

三森 功士 (MIMORI, Koshi)

九州大学・大学病院・教授

研究者番号：50322748

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()