

令和 元年 9 月 2 日現在

機関番号：82108

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0246

研究課題名（和文）低インフラ地域でも利用可能な感染症バイオマーカーの早期検出法の開発（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Development of Early Diagnostic Method for Infectious Diseases in the Developing World(Fostering Joint International Research)

研究代表者

荏原 充宏（Ebara, Mitsuhiro）

国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・グループリーダー

研究者番号：10452393

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,300,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：本国際共同研究プロジェクトでは、温度応答性ポリマーと抗体との複合体を作製し、それを用いて目的バイオマーカーの分離・濃縮・検出を行った。まず、シクロオクチン化温度応答性ポリマーを合成し、アジド化抗体との反応効率の検討を行った。その結果、溶液の純度によらず抗体に約2 - 3本のポリマーが導入可能であることが明らかとなった。次に、得られた最適条件を基にしてp24抗体の効率的な分離・濃縮を詳細に検討した。Stayton教授の研究室にて、ラテラルフロー用のニトロセルロース膜上における温度応答性ポリマーとの反応を試みた。その結果、わずか一回の熱沈殿によって診断シグナルを約100倍増幅することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低インフラ地域では、毎年1000万人以上が5歳まで生きられずに死亡しており、その死因の半分以上がマラリア、結核、インフルエンザなどの疫病である。すなわち感染症の早期発見と治療ができれば、著しく死亡率を向上させることができるのだが、残念ながら途上国で利用可能なイムノクロマト法などの検査では難しい。本研究で提案するような、1．特殊な環境下でも駆動し、2．利用者の手技によらず誰でも簡単に使用でき、3．短時間・低コストで診断結果が得られる診断技術の創生の学術的意義および社会的意義は非常に高い。

研究成果の概要（英文）：We have developed a facile early diagnostic test using temperature-responsive polymer to purify and enrich the target biomarkers. First, we synthesized alkyne group modified temperature-responsive polymers and then conjugated with azido-modified antibody by azido-alkyne Huisgen cycloaddition reaction. Next, we examined thermal precipitation of p24 antibody using the prepared conjugates. As a result, we have successfully enriched the p24 antibody 100 times by a simple thermal precipitation. We believe that development of smart polymer technology will promise to impact medical treatment in multiple ways, improving patient outcomes and lowering overall medical costs, as well as providing health delivery services and new options for conventional therapies, particularly in the resource-limited environments such as aerospace, or low-infrastructure sites such as developing world.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：早期診断 バイオマーカー スマートポリマー

1. 研究開始当初の背景

現在、世界 70 億人のうち、1/2 は衛生面で問題を抱え、1/3 は電気が使えず、1/5 がまともな水が飲めない環境で生活しているといわれている。また、そのうちおよそ 50 億人もの人々が 1 日 2 ドル未満で生活しており、そのほとんどがアフリカやインドなどの開発途上国で暮らしている。こうした地域では、毎年 1000 万人以上が 5 歳まで生きられずに死亡しており、その死因の半分以上が早期に適切な診断・治療を受ければ助かるような epidemics (マラリア、結核、インフルエンザなどの疫病) である。事実、HIV 感染症では、早期に発見し適切な時期から抗 HIV 薬による多剤併用療法(HAART 療法)を行えば、AIDS の発症を予防できるようになってきた。また、マラリアも AIDS、結核とともに世界 3 大感染症の一つに数えられ、毎年 3 億人が感染しているが、早期に抗マラリア薬を投与することでその治療効果が得られるようになってきた。それにも関わらず患者数が拡大傾向にあるのは、病院が近くにない地域では再び来院するのが困難であり、3 分の 1 の患者は検査結果を取りに来ず治療が遅れると同時に二次感染が拡大するためである。通常、先進国においては注射器を用いて採血されたサンプルが標準検査機関に送られ、専門的なスタッフのもと、分離・精製などの処理が施されたのち、免疫検査やポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法による遺伝子解析などがなされ、最終的に診断がなされる。この方法を用いれば、pg/mL オーダーのバイオマーカーの検出も可能であるが、その煩雑な操作と検出時間、およびコスト面において多くの問題を抱えている。一方で、イムノクロマト法などの簡便なポイント・オブ・ケア(POC)検査を用いてのバイオマーカーの検出は安価で迅速であるが、その検出感度は $\mu\text{g/mL}$ と低い。こうした背景のもと、インフルエンザ、マラリア、HIV などによる感染初期の微量濃度(ng/mL)を、POC 診断で検出可能なレベル($\mu\text{g/mL}$)まで簡便に濃縮する技術の確立が急務となっている。

2. 研究の目的

本研究では、Global Health に向けた革新的技術の開発のため、安定した電気供給や清潔な飲料水などの入手が困難な低インフラ地域(途上国や被災地)などでも利用可能な早期診断システムの開発を目指す。具体的には、特殊な環境下でも駆動し(摩擦熱や太陽光) 利用者の手技によらず誰でも簡便に使用でき(唾液や尿をかけるだけ) 短時間・低コストで診断結果が得られる(1 ドル以下、20 分以内)診断技術の創生を目指す。このような条件を満たす方法で血中微量バイオマーカーを早期検出するため、POC で検出可能な $\text{ng} \sim \mu\text{g/mL}$ レベルまでバイオマーカー自体を濃縮させなければならない。そこで温度や光といった汎用なエネルギーによって機能制御可能な環境応答性ポリマーを用いることで、低インフラ地域でも微量バイオマーカーの濃縮が可能ではないかと考えた。本国際共同研究プロジェクトを通じて、日本側で作製したポリマーおよび検査キットを用いて、米国側から提供されたバイオマーカーとの複合化および濃縮精製を行い、POC 診断で検出可能なレベル($\mu\text{g/mL}$)までの濃縮を目指す。

3. 研究の方法

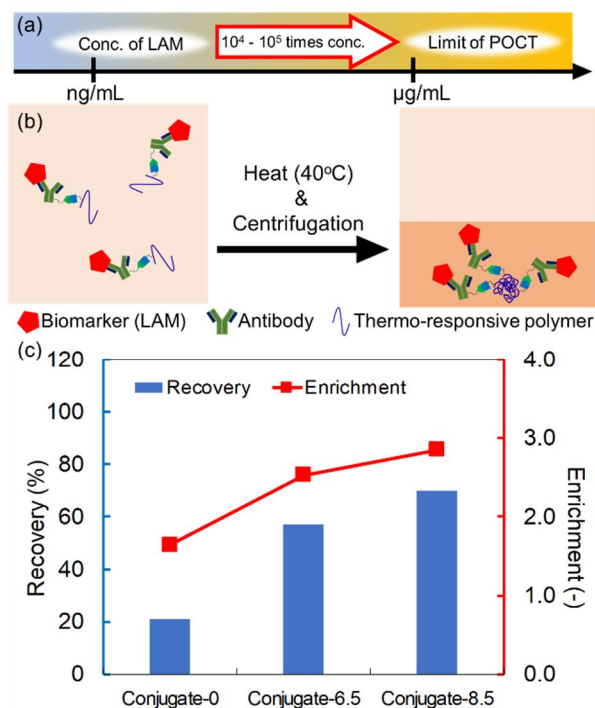
まず、抗体-ポリマー複合体を作製するため、シクロオクチンを側鎖に有する新規温度応答性ポリマーの合成を行う。このポリマーは、汚染水や夾雑物存在下でもアジド化した抗体とクリック反応により結合可能であり、実際に、尿、唾液、血液中での反応を試みる。ゲル電気泳動および動的光散乱法によって抗体-ポリマー複合体の作製を評価する。さらに、目的病原体である HIV のバイオマーカーを捕捉した後、体温付近に加温することによって温度応答性ポリマーが凝集し、捕捉バイオマーカーを沈殿回収可能なことを確認する。最終的には、バイオマーカーの捕捉、ポリマーとの結合、熱による濃縮・精製をすべてクロマトペーパー上で行う。

4. 研究成果

(1) *N*-Isopropylacrylamide (NIPAAm) とヒドロキシ基を有する *N*-(2-hydroxyisopropyl)acrylamide (HIPAAm)の可逆的付加-開裂連鎖移動重合反応により poly(NIPAAm-co-HIPAAm)を合成した。この共重合体のヒドロキシ基に dibenzylcyclooctynic acid (DBCO acid)を導入した。IgG に azido-(ethylene glycol(EG))₄-NHS を反応させ、アジド化 IgG を得た。Poly(NIPAAm-co-HIPAAm)の合成および DBCO acid の導入を ¹H NMR により確認した。DBCO acid 修飾ポリマーとアジド化 IgG をクリック反応させて結合、IgG-polymer 複合体を調製した。得られた複合体は、IgG の物質質量に対するアジド基の導入物質質量が 0, 6.5, 8.5 のものを用いた(以下、Conjugate-0, Conjugate-6.5, Conjugate-8.5 とする)。Fluorescamine を用い、IgG へのアジド基の導入を定量し、azido-(EG)₄-NHS の仕込み量に応じてアジド基導入量の増加を確認した。

(2) クリック反応により高分子と結合後、40°C 雰囲気下においてメンブレンフィルターで濾過、濃縮を行い、励起波長 390 nm におけるそれぞれの試料の蛍光を評価した。IgG に対するポリマー導入量の異なる IgG-polymer 複合体を調製し、熱沈殿によって濃縮、回収率を評価したところ、アジド基の導入により IgG-polymer 複合体の濃縮率・回収率が増加したことが図 1 で確認された。また、アジド基の導入量の増加(温度応答性高分子の導入量の増加)に伴って回収効率も向上した。IgG へ温度応答性高分子が導入されたことから、熱沈殿していることが示唆される。最後に蛍光標識した抗原を IgG-polymer 複合体で捕捉し蛍光評価を行ったところ、メンブレンフィルターによる濃縮を確認した。以上の結果から、作製された IgG-polymer 複合体は温度変化に

応じて凝集し、回収可能であるため、バイオマーカーの濃縮・精製への応用が期待できる。



< 引用文献 >

C.K. Prahalad, Pearson Prentice Hall, 2009

G. Tao et al., J. Acquir. Immune. Defic. Syndr., 22, 395, 1999

Fig. 1 Increase of LAM concentration by thermo-responsive polymer and its evaluation (n=1).

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Koichiro Uto, Takao Aoyagi, Cole A. DeForest, Mitsuhiro Ebara, Dynamic Alterations of Hepatocellular Function by On-demand Elasticity and Roughness Modulation, *Biomaterials Science*, 6, 1002 (2018). (査読有)

10.1039/C8BM00047F

Rio Kurimoto, Koki Namekawa, Amanda V. Ellis, Masanobu Naito, Mitsuhiro Ebara, Selective Adsorption of Globulin on Nanofiber Meshes for Immunoabsorption Therapy, *New Journal of Chemistry*, 42, 2916 (2018). (査読有)

10.1039/C7NJ04672C

Yasuhiro Nakagawa, Hiroaki Tateno, Mitsuhiro Ebara, Selective Recognition of Sugars Using Lectin-inspired Temperature-responsive Polymers, *Chemistry Letters*, 47, 134 (2018). (査読有)

10.1246/cl.170967

Koichiro Uto, Takao Aoyagi, Deok-Ho Kim, Mitsuhiro Ebara, Free-standing Nanopatterned Poly(epsilon-caprolactone) Thin Films as a Multifunctional Scaffold, *IEEE Transactions on Nanotechnology*, 17, 389 (2018). (査読有)

10.1109/TNANO.2017.2770217

[学会発表] (計 5 件)

Mazaya Najmina, Sharmy Mano, Koichiro Uto, Mitsuhiro Ebara, Material-induced Senescence (MIS), 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, 2019

Yasuhiro Nakagawa, Yuto Yano, Jeonggyu Lee, Mitsuhiro Ebara, Apoptotic Cell-inspired Polymers For Controlling Inflammation Toward Neurodegenerative Disease Treatment, CSIRO Symposium on Materials and Technologies for Life Science Applications, 2019

Mitsuhiro Ebara, Photo-induced pH Jump Reactions for Biomedical Systems, The 35th International Conference of Photopolymer Science and Technology (招待講演), 2018

Mitsuhiro Ebara, Apoptotic Cell-inspired Polymers for Anti-inflammatory Therapy, The Polymer Society of Korea 2018 (招待講演), 2018

Mitsuhiro Ebara, Basics of Smart Polymers, 1st GLOWing Polymer Symposium in KANTO (招待講演), 2018

〔図書〕(計 1 件)

Katsuhiko Ariga, Mitsuhiro Ebara 編集, Materials Nanoarchitectonics (総ページ 336), Wiley, 2018

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.nims.go.jp/bmc/group/smartbiomaterials/>

6 . 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：パトリック・ステイトン

ローマ字氏名：Patrick S. Stayton

所属研究機関名：University of Washington

部局名：Department of Bioengineering

職名：Professor

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。