

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460656

研究課題名(和文) DNAアプタマーを用いた分析法の開発と臨床分析への適用

研究課題名(英文) Development of assay utilizing DNA aptamer and applying to a clinical examination

研究代表者

佐野 佳弘 (Sano, Yoshihiro)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：40338538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では自閉症スペクトラム関連因子として近年注目されているOxytocin (OXT)のアプタマーによる高感度測定法の確立と臨床応用について検討した。SELEX法によりOXT反応性アプタマー候補が得られたため、それらの塩基配列を解析した結果、相同性が高い塩基配列が確認できたことからアプタマーが得られたと考えられた。次に、本研究で使用する予定の臨床検体(ヒト血漿)中のOXTを免疫アッセイにより測定した結果、日本人血中OXTを測定した結果、成人男性では約30 pg/mLであり成人女性では約25 pg/mLであることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We studied to development assay utilizing aptamer for oxytocin (OXT), was shown to play important key roles in social interactions and social behavior and a series of studies investigated the relationship between autism spectrum disorder (ASD) and OXT, and applying to a clinical examination by using that assay.

As a result of SELEX, the aptamers (ssDNA) for OXT prepared in random ssDNA BANK and sequence of those were high homologous sequence. Therefore, we suggested that aptamer for OXT was selected from many ssDNA containing random sequence. Moreover, we made a measurement of OXT in Japanese human plasma on this study by using immunoassay for OXT. As a result, the average levels of males and females were 30 and 25 pg/mL respectively, here.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アプタマー オキシトシン アスペルガー 臨床分析化学

1. 研究開始当初の背景

オキシトシン (Oxytocin: OXT) は、人と人とのつながりに関連するホルモンとして近年、幸せホルモンや愛情ホルモンといった名称で呼ばれている。また、自閉症スペクトラム関連因子として精神医学領域においては、その病態と血中 OXT 量との相関やシグナル伝達などが注目されており勢力的に研究が進められている。しかし、OXT の測定は世界的に市販の OXT イムノアッセイキットが用いられているが生体試料 (血清または血漿など) の相違やそれらの前処理によって測定値が異なることが問題となっている。その問題点を解決するために、我々も抗 OXT 抗体や標識体の作製をはじめ市販の抗体を用いた OXT 競合イムノアッセイを構築したが特異性は良好なものの検量域は 5-500 pg/assay であり高感度化が難しい状況である。競合イムノアッセイで使用する抗体は親和性や特異性ばかりでなく競合反応に適する抗体を選択する必要があり、目的とする感度に適合する抗体は未だ得られていない。さらに、OXT は 9 つのアミノ酸からなるペプチドであり、C 末端のアミド化や 2 つの Cys による内部環状構造の形成といった独特な構造を有する (Fig. 1)。この構造は、抗利尿ペプチドホルモン Vasopressin (AVP) と酷似しており、臨床応用を行う上で非常に高い障害となる。そこで、イムノアッセイでは測定困難な標的分子の新たな測定法開発としてアプタマーに着目した。

0xytocin (OXT)

Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂

[Arg⁸]-Vasopressin (AVP)

Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂

Fig.1 0xytocin and Vasopressin

アプタマーは、1 本鎖 DNA または RNA で構成され、特異的な立体構造の形成により特

定の物質に親和性を示す。その親和性や特異性は高く抗体に匹敵するといわれている。また、その特徴として、幅広い温度、溶液下で安定、免疫動物を用いない、in vitro での合成が可能、免疫寛容がないなどの利点が挙げられる。さらに、イムノアッセイと比べ標的分子への親和性や特異性を核酸修飾でコントロールできる上、安価で大量に化学合成が可能であることから大規模スクリーニング検査にも有用である。

2. 研究の目的

本研究では自閉症スペクトラム関連因子として近年注目されているペプチドホルモンである OXT のアプタマーによる高感度測定法の確立と臨床応用への対応について検討する。

アプタマーの標的分子に対する特異性と親和性は、抗体に匹敵するといわれているが、このようなアプタマーの特性を活かした分析法の開発は未だ少ない。本研究は、イムノアッセイでは測定困難な標的分子に対するアプタマーを利用した新しい分析法の開発である。

3. 研究の方法

OXT 反応性 DNA アプタマーの創製

ランダムな 60 塩基の 5' 側に 18 塩基、3' 側に 18 塩基の primer 配列を持つ ssDNA を DNA BANK とする。ssDNA に立体構造を形成させた後、コントロールと反応させてその素通り画分を回収する。次に、OXT と反応させた後、洗浄後 OXT に結合している ssDNA を高温で遊離させて回収する (B/F 分離)。続いて、OXT に結合した ssDNA を PCR 増幅後、アクリルアミドゲル電気泳動により ssDNA として精製する。この一連の操作を 1 Round とし、繰り返し行いここで得られた ssDNA は TA クローニングにより塩基配列を決定した。尚、本研究の SELEX (FluMag-SELEX) は、長年 DNA アプタマー研究を行っている研究協力者 (海外共同研究者) Strehlitz Beate 博士グループ

(Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ), Germany) と共同研究により行った。

TA クローニングによる塩基配列の解析

FluMag-SELEX で得られた ssDNA は、単一ではなく様々な塩基配列を有するため TA クローニング (TOPO[®] TA Cloning[®] Kit for Sequencing : Life Technologies) して、それら aptamer (ssDNA) の塩基配列を決定し相同性比較を行った。

OXT 反応性アプタマーによる臨床応用

血液試料中の OXT 反応性アプタマーにより OXT 測定を検討するために、本研究で用いる臨床検体 (ヒト血漿) 中の OXT をイムノアッセイにより測定した。イムノアッセイは、競合イムノアッセイを原理としている Immunoassay Kit for Oxytocin (ENZO Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) を使用した。

4. 研究成果

OXT 反応性 DNA アプタマーの創製

FluMag-SELEX の結果を Fig. 2 に示す。この一連の操作を 1 Round とし、繰り返し 16 Round 行った。この SELEX 法により得られた ssDNA は TA クローニングにより塩基配列を決定した。

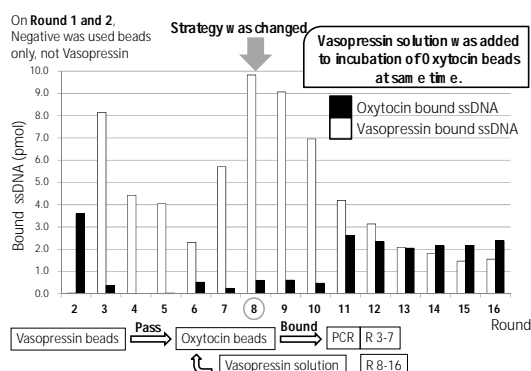


Fig. 2 Result of SELEX : Aptamer for Oxytocin

TA クローニングによる塩基配列の解析

FluMag-SELEX で得られた ssDNA を TA クローニング (TOPO[®] TA Cloning[®] Kit for Sequencing : Life Technologies) して、111 クローン (aptamer, ssDNA) の塩基配列を決定し相同性比較を行った結果、同一の塩基配列を示すクローンが多数存在した。(Table. 1)

| クローン数 | アプタマー塩基配列 | 頻 |
|-------|---|------|
| 13 | CGGAGCGAGCCTTATTTCTGGCTCGCTGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 11.7 |
| 12 | CGCCAGCGAGTGGTCTCTCTTTCTGGCTCGCTGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 10.8 |
| 12 | CCATCGATTCCATTCACTCCACTCTGTTTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 10.8 |
| 8 | GGGAGCGAGACTGGGCGGATCTTTGTAGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 7.2 |
| 8 | AXCGGCTGCTGATGATCTGTTTTGCGTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 7.2 |
| 8 | CGKATGGTGGCCACCGTTTTCTGTTCCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 7.2 |
| 7 | CACTGTGCTGCTGCTGCTTCACTTACCTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 6.3 |
| 6 | GKGGGGGGGAGGATAGTAAACGGTGGTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 5.4 |
| 4 | CCACAGGTGGGACATCTGTTTTCTTGCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 3.6 |
| 4 | GKGGAGTAACTGCTCCAGTCAACCGAAXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 3.6 |
| 4 | AXGTTGGGGTACAGAGGTTGAAAGATTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 3.6 |
| 2 | CGXAAATCCGGGGTGGTGGTGGTGAATTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 1.8 |
| 2 | GGGAGCGGAGTGGGCGGATCTTTGTAGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 1.8 |
| 2 | GGXAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 1.8 |
| 2 | AXGACACAGTGGGTTGGTGGTGGTGGTGGTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 1.8 |
| 2 | XACGCGACGCTTACCTTGCCATATCTTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 1.8 |
| 2 | XACGCGACGCTTCTCTTCTGCTAGTACTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 1.8 |
| 2 | AXCTCCAGCCCTTTTCACTTGCTTTGTTTTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 1.8 |
| 1 | CGAAGGGACTGGCCAGGTTTTTTTTTCTGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 0.9 |
| 1 | CGXACCGAGCTTATTTCTACTGGCTTGGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 0.9 |
| 1 | CGACCGCAGAGTGGGGAAGATTTTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 0.9 |
| 1 | GGGAAATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 0.9 |
| 1 | CAAGCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 0.9 |
| 1 | CAKGGGTAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 0.9 |
| 1 | CCCGGCTGCTGATGATCTGTTTTGCGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 0.9 |
| 1 | ACXGACCTGGGCACTCAACCTTCTTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 0.9 |
| 1 | GGGTAGCTGGGGTGGGCACTGGAATGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 0.9 |
| 1 | GTTGGGCACTAAGGTTGGGGTGGGGTGGGGTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 0.9 |
| 1 | CGGGXCAAGCTGGCAAGGCTGCGGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX | 0.9 |

Table. 1 アプタマーの塩基配列解析

OXT 反応性アプタマーによる臨床応用

ヒト血漿中の OXT を Immunoassay Kit for Oxytocin (ENZO Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) により測定した結果、成人男性では 31.7 ± 10.2 pg/mL であり成人女性では 25.3 ± 6.1 pg/mL であった。

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 3 件)

A cohort study of the level of plasma oxytocin associated with autism spectrum disorder in Japanese males, females, and pregnant females.

Yoshihiro Sano, Noriko Watanabe, Emiko Suzuki, Kazuhisa Shimodaira, Nobumasa Kato, and Hidetoshi Arakawa,

Clinical & Medical Biochemistry, March
2, 2016, doi:10.4172/cmbo.1000113
査読あり

Development of a highly specific
enzyme immunoassay for oxytocin and
its use in plasma samples.

Shiomi Haraya, Koji Karasawa, Yoshihiro
Sano, Kimiko Ozawa, Nobumasa Kato
and Hidetoshi Arakawa,

Annals of Clinical Biochemistry,
54(1):101-106, 2016

査読あり

バイオマーカーの高感度分析法の開発

荒川秀俊、佐野佳弘、唐沢浩二

昭和学会雑誌、第75巻、第2号、155-167,
2015

査読あり

〔学会発表〕(計 5件)

生物発光酵素イムノアッセイを用いた血
中オキシトシン測定法の開発

唐沢浩二、佐野佳弘、大熊博、荒川秀俊

日本薬学会 第136年会、2016年3月26日
~3月29日、横浜

血中に存在する高分子及び低分子オキシ
トシンの高感度イムノアッセイの開発

荒川秀俊、佐野佳弘、唐沢浩二

第29回バイオメディカル分析科学シンポ
ジウム 2016年9月2日~9月3日 京都

Novel assay for oxytocin using
bioluminescence enzyme immunoassay

Koji Karasawa, Yoshihiro Sano,
Hidetoshi Arakawa

68th AACCC Annual Scientific Meeting &
Clinical Lab Expo, Aug. 2016,
Philadelphia (USA) 2016年7月31日
~8月4日

酵素イムノアッセイによる血中オキシト
シン測定法の開発

唐沢浩二、原谷汐美、佐野佳弘、荒川秀俊

第28回バイオメディカル分析科学シンポ
ジウム 2015年8月21日~8月22日 長
崎

血中オキシトシン測定を目的とした高感
度酵素イムノアッセイ法の確立

唐沢浩二、原谷汐美、佐野佳弘、荒川秀俊

日本薬学会第135年会 2015年3月25~
3月28日 神戸

〔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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野佳弘 (SANO, Yoshihiro)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：40338538

(2) 研究分担者

荒川秀俊 (ARAKAWA, Hidetoshi)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：70129807

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()