

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360338

研究課題名(和文) アプタマーセットを用いた血液中極微量疾病マーカーの多数同時検出法の開発

研究課題名(英文) Simultaneous detection system for multiple disease markers in blood using aptamer set

研究代表者

池袋 一典 (ikebukuro, kazunori)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70251494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：血液中の多数の疾病マーカーを同時に検出するために、それに結合する複数のアプタマーを用意し、ビーズ等に血液中の複数の疾病マーカーを固定化する。これに複数のアプタマーを添加し、結合したアプタマーを回収・増幅し、塩基配列を決定することにより疾病マーカーを検出する方法の開発を目指した。本原理で検出できることは確認できたが、アプタマーの非特異的吸着に由来する、バックグラウンドシグナルが高く、現時点では、超高感度検出は難しいと考えられる。しかし、ボロン酸ビーズを用いると、タンパク質の立体構造をあまり損なうことなく固定化できる、という見込みを得ることができ、今後の開発の上で重要な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We developed the method to simultaneously detect multiple disease markers in blood using a set of aptamers against various disease markers in blood. We immobilized the various markers in blood onto the beads and added a set of aptamers onto that. We then extracted the bound aptamers from the beads and determined those sequences. We can estimate the concentration of the specific disease marker by counting the sequences of its specific aptamer. We checked our proposed detection system worked but the background signal from the unspecific binding of the aptamers to the beads or other proteins apart from the target protein is so high that it seemed hard to realize the highly sensitive detection at this time. We found the advantage of the use of boronic acid immobilized bead, which does not seem to affect the structure of proteins upon immobilization. That would become important tool for development of the detection system using aptamers.

研究分野：進化分子工学

キーワード：アプタマー 疾病マーカー 同時検出 バイオ関連機器 診断技術

## 1. 研究開始当初の背景

個別化医療の実現が強く要望されている現在、血液中の疾病マーカーの検出は、早期診断において極めて重要である。しかし疾病マーカーの血液中の濃度は、ほとんどが pM レベルであり、現在汎用されている ELISA でも検出が困難なものもある。更に疾病の重要なマーカーになりうると期待されているが、血液中の濃度が余りにも低いために疾病マーカーとして利用できない、あるいは疾病マーカーとなる可能性を看過されている蛋白質も多数存在する。

蛋白質の検出においては現在その検出下限は pM 程度であるが、感染性微生物のゲノム DNA 等の核酸は、PCR 増幅できるので数分子あれば検出でき、ナノテクノロジーに代表される微細加工技術の発達により、10 分程度で核酸を百万倍近く増幅することが可能になっており、迅速な高感度検出が可能になっている。

特定の分子に結合する核酸リガンド、アプタマーは、抗体と等しい親和性を持つものも数多く報告されており、優れた分子認識素子として診断・創薬での利用が期待されている。アプタマーは、核酸で構成されるので、1) *in vitro* selection 法により試験管内で探索できる、2) 合成・修飾が容易である、3) 熱変性しても、常温に戻せばまた元の構造をとる、など分子認識素子としての利用において優れた特長を持つ。それに加え、核酸なので PCR 増幅できる。

## 国内・国外の研究動向

上述したとおり、アプタマーは抗体に代わる分子認識素子として注目されており、これを用いた様々な検出は多数報告されている。申請者はトロンビンの異なる部位に結合する2つのアプタマーを用いてサンドイッチ法によりトロンビンを電気化学検出できることを 2004 年に Anal. Lett. 誌に報告しており、これがアプタマーを用いた初めてのバイオセンサーシステムだと多数の総説で評価されている。

しかしこれらは全てアプタマーと標的分子の結合を何らかの方法で直接検出しており、標的分子に結合したアプタマーを回収して、これらの配列を決定することにより標的分子を検出した例は、Turner らが 2011 年に Anal. Chem. 誌で発表したのみである。この論文もプロテオームの網羅的解析法としてごく簡単なモデル実験を行なったのみであり、この方法が極微量の標的分子の高感度検出に応用できることには言及されていないし、実際に高感度検出を行っていない。

現在、血液などの実試料中の標的蛋白質の検出下限は ELISA で数 pM であり、

これより高感度な実用的な方法は無いと言っ

てよい。

そこで、本検出手法の開発を行った。

## 2. 研究の目的

血液中に極微量しか存在しない多数の疾病マーカーを同時に検出するために、それに結合する複数のアプタマーを用意し、ビーズ等に血液中の複数の疾病マーカーである複数のタンパク質を固定化する。これに複数のアプタマーを含むアプタマーセットを添加し、結合したアプタマーを回収・増幅し、次世代シーケンサーにより塩基配列を決定する方法の開発を目的とした。

特定のアプタマー配列の数は血液中の疾病マーカーの濃度に対応するはずであり、アプタマー配列を計数すれば、疾病マーカーを検出し、濃度を概算できる。添加するアプタマーセットは、それぞれの疾病マーカーを、検出時と同じようにビーズ等の固定化担体に共有結合させて、スクリーニングして取得する。マーカーが極微量しか存在しなくても、固定化した疾病マーカーに数個でもアプタマーが結合していれば、PCR 増幅によりその配列は読めるので、高感度検出できる。また、アプタマーセットと次世代シーケンサーを用いることにより、多数の疾病マーカーの同時検出が可能になる。

## 3. 研究の方法

Step 1 使用するアプタマーの結合能解析

使用するアプタマーが結合能を有し、次世代シーケンサーの必要な adapter 領域を付加しても結合能が低下しないことを確認。

Step 2 COOH 修飾ビーズでの結合解析

僅かな差しか認められない。濃度依存性がとれない。非特異吸着が多い？

Step 3 PBA (ボロン酸) 修飾ビーズで結合解析

ビーズに非特異結合しやすくバックグラウンドレベルが高いものの有意な差を確認。

同時検出すると高いに競合してしまいシグナルが下がり、弱い結合能のものが結合しづらくなる。

様々な検討をしたところを高いシグナルを保ちつつ、バックグラウンドを下げられた

より自然な形で固定化でき、アプタマーの結合能を損なわない可能性がある

## 4. 研究成果

(1) SPR によるアプタマーの結合能解析

次世代シーケンサーのアダプター領域を付加した VEGF 結合アダプター領域の解離定数の測定

VEGF 結合アダプターにイルミナ社の次世代シーケンサーのアダプター領域を付加した VEGF 結合アダプター (contVG, 2#19) およびその adapter 領域の相補鎖を等量添加して adapter 領域の影響を軽減した blocked contVG, blocked 2#19 の解離定数を SPR により解析した。

2#19 については adapter 領域を付加しても解離定数に大きな影響はなかったが、contVG については adapter 領域を付加することで構造が変化し結合能が低下したと考えられる。

## (2) カルボキシル基修飾磁性ビーズ (Compel™) を用いた結合能解析

### 2.1. アダプターの回収率を指標とした結合能解析

AFP については余剰カルボキシル基を 10%血清でブロッキングし、熱処理もしくはフェノールクロロホルム処理により溶出した DNA の定量を行った。VEGF については余剰カルボキシル基を 10%血清でブロッキングし、熱処理により溶出した DNA を定量した (Figure 3B)。PDGF-BB については、10%血清もしくは 4%スキムミルクによりブロッキングを行い、熱処理により溶出した DNA を定量した。トロンビンについては 4%スキムミルクで余剰カルボキシル基をブロッキングし、熱処理で溶出した DNA を定量した。AFP についてはいずれも差が見られなかった。VEGF については 2#19 で有意な差が見られた。PDGF-BB については PDGF-1 (21t) で有意な差が認められた。トロンビンについてはエラーバーが大きくなったが、外れ値処理をすると有意な差が認められた。以上より、以降の実験では VEGF, PDGF-BB, Thrombin を用いることとした。また、次世代シーケンサーのアダプター領域を付加した VEGF 結合アダプターで行ったところ、VEGF\_1 (contVG) 及び 2#19 で有意な差が認められたため、今後は VEGF 結合アダプターとしては 2#19 および contVG を用いることとした。しかし濃度依存性について再現性が得られなかった。

## (3) ボロン酸修飾ビーズ (Glycoprotein Enrichment Resin) を担体とした結合能評価

カルボキシル基とのアミンカップリング法を用いた固定化では結合能が上手く示せない可能性が示唆された。そこで、ボロン酸修飾ビーズを用いた糖鎖を介した固定化をすることによりタンパク質の構造を損なうことなく固定化することで結合能が示すようになることを期待してボロン酸修飾ビーズを用いることとした。

## VEGF アプター領域の回収率とその濃度依存性評価

アダプターを回収し、その回収率を算出した。VEGF の有無によって有意な差が見られたため、濃度依存性をみた (Figure 1)。その結果、濃度依存的に回収率が上昇する様子が見られたが、バックグラウンド値が高いという結果が得られ、ビーズへの非特異吸着が多いことが示唆され

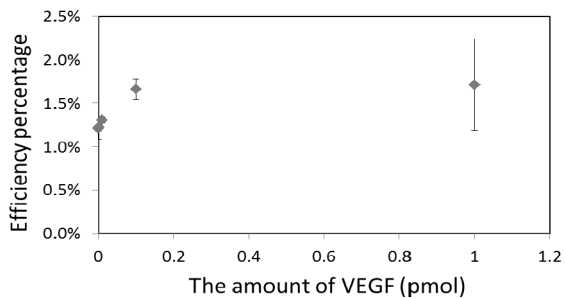


Figure 1. Percent recovery of VEGF binding aptamer from various amount VEGF immobilized beads

種々の条件の最適化  
タンパク質の固定化時間、DNA をフォールディングし、インキュベートする際の buffer 及び洗浄バッファの Tween 20 の有無について、アダプター濃度およびフォールディングの有無、ボロン酸ビーズ量、ブロッキング剤、等を検討し最適な条件を見つけた。

③ アプターセットを用いた同時検出  
タンパク質共存下における結合量を標的タンパク質単独存在下の結合量と同程度に上げるためにはビーズ量を増加させ、より多くのタンパク質を固定化できる状況にし、固定化時間も増やす必要があると考えられた。しかし、ビーズ量を増加させることでバックグラウンド値が上昇し、結合量の差が認められない可能性が高い。従って、ブロッキング剤を検討することによりビーズへの非特異が減少することを期待した。今回は 4.3. で用いた Ig G1 の他に、4%スキムミルク、10%血清およびデキストリンを用いて実験を行った。その結果を Figure 2 に示す。図において、- は非添加、S は標的タンパク質と同時に添加、L は標的タンパク質を添加した後に上清を取り除き、ブロッキング剤を添加する操作を示す。この結果より、デキストリンを用いることで最もバックグラウンド値を下げ on-off が見やすくなることが分かった。

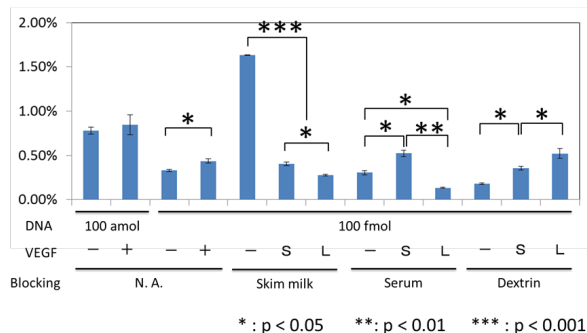


Figure 2 Percent recovery of VEGF aptamer (2#19) eluted from VEGF immobilized beads.

- : not add VEGF, + : add VEGF, S: add VEGF and blocking agent at the same time, L: add VEGF and remove the supernatant, and then add blocking agent

### 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 2 件)

1. Savory N, Nzakizwanayo J, Abe K, Yoshida W, Ferri S, Dedi C, Jones BV, Ikebukuro K, "Selection of DNA aptamers against uropathogenic Escherichia coli NSM59 by quantitative PCR controlled Cell-SELEX", J. Microbiol. Methods, 104, p94-100, 2014, doi: 10.1016/j.mimet.2014.06.016, 査読有
2. Yoshida W, Abe K, Ikebukuro K, "Emerging techniques employed in aptamer-based diagnostic tests", Expert Rev. Mol. Diagn., 14(2), p143-151, 2014, doi: 10.1586 /14737159.2014.868307, 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 池袋一典, 「in silico maturation 法を用いたアプタマーの機能改良」, 第10回理研「バイオものづくり」シンポジウム, 2015年3月6日, 理化学研究所, 和光市, 招待講演
2. Savory N, J Yokoyama T, Saito T, Nonaka Y, Fukaya T, Yoshida W, Abe K, Ikebukuro K, "in silico maturation; Improvement of aptamer function based on genetic algorithm employing in vitro functional screening process", The 41th international Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 11<sup>th</sup> Nov. 2014, Konan

Univ, Kobe

3. Savory N, Jones BV, Abe K, Ikebukuro K, "in silico maturation; Advanced aptamer development for biosensing application", Biosensors 2014, 25<sup>th</sup> May, 2014, Melbourne, Australia
4. Yokoyama T, Saito T, Yoshida W, Ikebukuro K, "Screening and improvement of aptamers by in silico approaches", Biosensors 2014, 25<sup>th</sup> May, 2014, Melbourne, Australia

〔図書〕(計 2 件)

1. 池袋一典, セーボレー那沙, 阿部公一, 「核酸リガンド“アプタマー”のリプログラミング」, 高分子, 公益社団法人高分子学会, p718-720, 2014年10月号
2. Savory N, Abe K, Yoshida W, Ikebukuro K, "in silico maturation; Processing Sequences to Improve Biopolymer Functions Based on Genetic Algorithm", in "Application of Metaheuristics in Process Engineering", Springer, p271-288, 2014

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~kakusan/news2/0140418.html>

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

池袋 一典

(IKEBUKURO KAZUNORI)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号： 70251494

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし