

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21491

研究課題名（和文）体液中cfDNA回収粒子の開発とがんの超早期診断への応用

研究課題名（英文）Development of analytical methods of cfDNA in body fluid for early cancer diagnosis

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、尿試料から簡便、安価に200bp程度のcfDNAを効率的に抽出・精製する手法を開発した。市販の精製キット（Monofas）を使用することで、500 μ L尿中に存在する6000コピー（12コピー/1 μ L）程度のDNAの抽出が5分程度で可能になった。さらに、粒子による精製と組み合わせることで、5mL尿中に存在する600コピー（1.2コピー/1 μ L）程度のDNAの抽出に成功した。本手法は、市販の尿中cfDNAの精製キットと比較して、短時間で簡便、安価な手法でありながら、DNAの精製効率も同等かより優れていた。本手法は、遺伝性疾患の早期発見や薬の効果の評価に利用可能であると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発したcfDNAの簡易精製法は、安価に短時間で効率的に尿中cfDNAの精製が可能であった。PCR法と組み合わせることで、遺伝性疾患の早期発見や薬の効果の評価に利用可能であると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a simple, inexpensive method to efficiently extract and purify cfDNA of about 200 bp from urine samples. By using a commercially available purification kit (Monofas), it became possible to extract about 6,000 copies (12 copies/1 μ L) of DNA present in 500 μ L of urine in about 5 minutes. Furthermore, by combining it with particle purification, we succeeded in extracting about 600 copies (1.2 copies/1 μ L) of DNA present in 5 mL of urine. Compared to commercially available urinary cfDNA purification kits, this method is a simple, inexpensive method that requires less time, yet has the same or better DNA purification efficiency. It is expected that this method can be used for the early detection of genetic diseases and evaluation of drug effects.

研究分野：分析化学

キーワード：疾患の早期発見 医薬品の効果の評価 遺伝性疾患 尿 cfDNA

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

優れた診断法と治療法の開発によって、人類は多くの疾患を克服し、日本人の平均寿命は男女とも 80 歳を超えるようになったが、未だに癌やアルツハイマー病のように完治しない疾患が数多く残されており、これらの疾患によって多くの患者や家族が苦しんでおり、有効な治療法の開発を人々は心待ちにしている。有効な治療法のない疾患の中には、疾患の発見が早ければ既存の治療法で完治するものもある。また完治しなくても、早期発見によって症状が現れる前に疾患の進行を抑えることで、患者が発症で苦しむことはなくなると期待される。つまり疾患をより早期に発見する手法は、現在、有効な治療法が存在しない難治疾患に対して、完治や発症を抑えることにつながり、新たに疾患で苦しむ人を増やさない、極めて有効な対策といえる。本研究では、尿及び循環血中に存在するバイオマーカー cfDNA (cell free DNA) の高感度な検出法を開発し、難治疾患の早期発見の実現を目指す。

2. 研究の目的

様々な疾患に関連する多数のバイオマーカーが既に発見され、がん、呼吸器や神経系などの疾患に精密医療を提供するために、バイオマーカーの測定が医療現場で行われている。初期段階のがん細胞が放出した微量のバイオマーカーを検出し、がんの場所、進行度、有効な医薬品を判定することができれば、これまで以上にバイオマーカーを活用した診断の利用が広まると期待される。また、生体の深部に存在する病変の状態をバイオマーカーで評価することができれば、個々の患者さんに適した薬物療法の提案につながると期待されている。

バイオマーカーの中でも cfDNA は、RT-PCR や NGS の利用により、今では、検体中に数コピー程度の cfDNA が存在すれば、標的 cfDNA の検出や配列解析が可能になっている。これまでに研究代表者は、生体内に存在する微量な cfDNA の検出を目指し、尿中 cfDNA の簡易精製法の開発を試み、PBS 溶液中に存在する数コピーの cfDNA の検出に成功した。また、試料中に 60 万コピー以上の DNA が存在すれば、100% 近い回収率で精製可能であることが分かった。本研究では、PBS 及び尿中に存在する 6 千コピー以下の DNA の精製効率を評価し、より微量な DNA の検出法を開発する。また、擬陽性の確率を抑えるために、増幅産物の分析法を確立し、臨床現場での使用に耐えうる測定法の開発を目指す。

3. 研究の方法

試薬

cfDNA のモデルとして、SARS-CoV-2 の N タンパク質の配列に M13 フォワードと M13 リバースプライマーを追加した 206bp の DNA を用いた。cfDNA を PBS 溶液や尿に添加し、回収される DNA 量を測定した。

粒子による溶液中 cfDNA の抽出

100mg の粒子を試料溶液に添加し、2 時間攪拌をした。その後、粒子を回収し、300 μ L の PBS 溶液で 3 回洗浄後、100 μ L の 100mM 炭酸水素ナトリウム溶液 (pH11) によって粒子に捕捉された DNA を脱離させた。

Monofas による溶液中 cfDNA の精製

400 μ L の脱離溶液と溶液 A との混合液を Monofas にのせて、遠心を行った。500 μ L の溶液 B で Monofas を洗浄後、15 μ L の 10 倍希釈したアンモニア水を Monofas にのせ、DNA を回収した。回収液を、60 で 5 分間加熱した溶液を PCR に試料とした。

PCR 条件

PCR には、Applied Biosystems 製 StepOne を使用した。1 μ L の試料溶液に、4.5 μ L PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)、2.5 μ L 精製水、1 μ L フォワードプライマー、1 μ L リバースプライマーを加えた溶液を PCR 反応によって増幅した。PCR 条件は、42 で 5 分間、95 で 10 秒間維持した後に、95 で 1 秒、50 で 10 秒、55 で 10 秒行う PCR 反応を 50 回繰り返した。融解曲線は、60 ~ 95 まで 15 分間かけて昇温して作成した。

4. 研究成果

尿は簡便に入手できる生体試料であり、尿には血液と同濃度の cfDNA が存在することが知られている。そこで、尿からバイオマーカーである cfDNA を簡便に抽出・精製する手法を開発することで、疾患の早期発見や治療効果の迅速な評価が可能になると考えた。そこで、まず始めに尿中微量 cfDNA の簡易精製法の開発を試みた。DNA は、カオトロピック効果によってシリカに強い吸着能を示すことから、我々はシリカ製モノリスを利用した市販の DNA 精製キット (Monofas) に注目した。Monofas は、数 μ m の貫通孔を有しているため、尿試料が詰まることはなく、cfDNA が迅速に精製できると期待した。そこで、Monofas を用いて、200bp のモデル DNA を添加した

500 μ L の尿から DNA の精製を試みた。その結果、monofas によって精製し、RT-PCR で測定することで、500 μ L の尿に 6000 コピー（12 コピー/ μ L）以上存在する DNA であれば検出することができ、DNA の量がその 1/10 の 600 コピー（1.2 コピー/ μ L）程度でも検出できる場合があった。同じ尿検体を市販の cfDNA 精製キット（QIAmp MiniElute ccfDNA）で精製した結果、1mL の尿に 6000 コピー（6 コピー/ μ L）以上 DNA が存在しないと検出することが難しかった。開発した手法で利用している Monofas は、大きな空隙を有するシリカ製モノリスを利用して DNA を捕捉しているため、沈殿物などを除去した尿の上澄みをのせるだけで DNA の精製が可能であり、全作業の時間が 5 分程度と短時間で可能であり、また、1 検体あたりの精製費用も数 100 円程度であった。開発した手法は、市販の cfDNA 精製キットと比較して、同等かそれ以上の精製効率を示すと共に、作業時間や行程の大幅な短縮とコストの削減を実現した。

尿の採取は、通常医療従事者の補助が不要で、注射等の医療機器を用いないため、血液などの他の生体液と比較して、入手が容易である。さらに一般的に 1 回の排尿で 200 ~ 300mL の尿の採取が可能である。そこで、より多くの尿からの DNA の回収を試みる方法の開発を目指した。Monofas に直接導入可能な最大の体積量は約 600mL であり、それ以上の試料から DNA を精製するには、事前に濃縮して体積を減らす必要がある。そこで尿試料に存在する cfDNA を濃縮するために、予め粒子を用いて尿中 cfDNA を捕捉し、その後、粒子から脱離した溶液に存在する cfDNA を Monofas によってさらに精製することにした。尿には、様々な生体物質が含まれており、DNA に関しては鎖長の異なった多数の DNA が混在している。そのような中から、200bp 程度の短い鎖長の cfDNA を効率的に精製することが、大量な尿から cfDNA を精製する際に重要になる。そこで、粒子と Monofas による DNA の鎖長選択性について調べた。PBS 溶液に、100-10000bp の鎖長の異なった DNA を添加し、鎖長ごとの回収率を調べた。粒子は鎖長の長い DNA よりも鎖長の短い DNA の回収率が高かったのに対して、Monofas は鎖長の短い DNA よりも鎖長の長い DNA の回収率が高かった。これは、用いた粒子の表面には、大きさ 6nm の細孔が多数存在しており、粒子に捕捉されるには DNA が細孔内部に入る必要がある。細孔内部に入ることのできる短い DNA は粒子に容易に吸着するが、細孔内部に入ることのできない長い DNA は DNA に吸着されづらいため、回収率が低くなると考えられる。つまり、粒子の利用によって、尿中に存在する様々な生体物質から鎖長の短い DNA を効率的に濃縮することができた。さらに、粒子によって濃縮した cfDNA をさらに Monofas で精製することで、異なった鎖長の DNA が存在する尿から 200bp 程度の cfDNA が効率的に検出できると期待した。

今回は、粒子によって捕捉可能な DNA 量を求めた。5mL の PBS 溶液に 600、6000、60000 コピーのモデル cfDNA を加えた溶液に、異なった量の粒子（50, 75, 100, 150mg）を添加し、回収率を比較した。粒子の添加量で回収率に大きな変化は見られなかった。つまり、検討した粒子量は、数 100 ~ 数万コピーの DNA の捕捉には十分量であった。一方で、添加する DNA のコピー数が減少するほど、回収率が低下した。これは、粒子による捕捉操作で一部の DNA が消失しているためと予想している。DNA 捕収操作の際に、不可逆的な吸着などにより同量の DNA が消失した場合、コピー数が少ないほどその影響が大きくなり、回収率は低下する。そのため、今回の実験では添加するコピー数が少なくなるほど、回収率が低下した。

最後に 600、6000、60000 コピーのモデル cfDNA を添加した 5mL の尿から 100mg の粒子を用いて cfDNA の抽出・精製を試みた。その結果、600 コピー（1.2 コピー/ μ L）以上の cfDNA が存在すれば検出できることが分かった。PCR によって増幅された DNA の融解温度は 85 °C であり、目的の配列が増幅されたことが確認された。

本研究では、尿試料から簡便、安価に 200bp 程度の cfDNA を効率的に抽出・精製する手法を開発した。市販の精製キット（Monofas）を使用することで、500mL 尿中に存在する 6000 コピー（12 コピー/ μ L）程度の DNA の抽出が 5 分程度で可能になった。さらに、粒子による精製と組み合わせることで、5mL 尿中に存在する 600 コピー（1.2 コピー/ μ L）程度の DNA の抽出に成功した。本手法は、市販の尿中 cfDNA の精製キットと比較して、短時間で簡便、安価な手法でありながら、DNA の精製効率は同等かより優れていた。このような簡便で、安価な手法は、尿からの cfDNA の精製が容易になるため、遺伝性疾患の早期発見や薬の効果の評価に利用可能であると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oshima Yuki, Hori Mizuki, Matsumoto Miyu, Kato Masaru	4. 巻 9
2. 論文標題 Simple and rapid method for analysis of urinary vancomycin using solid phase extraction and fluorescence spectroscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 AAPS Open	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41120-023-00071-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kato Masaru, Fujita Yumi, Iizuka Takuya, Nozaki Kyohei, Takano Sho, Funatsu Takashi, Sano Yoshihiro, Murayama Shuhei, Karasawa Koji	4. 巻 412
2. 論文標題 Extraction of urinary cell-free DNA by using triamine-modified silica particles for liquid biopsy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 5647 ~ 5652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00216-020-02784-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福島 諒、中野 愛吹、小倉 唯奈、加藤 大
2. 発表標題 尿中cfDNAの効率的な精製法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中野 愛吹、小倉 唯奈、細川知佳子、福島 諒、加藤 大
2. 発表標題 尿中 cfDNAの効率的な精製法の開発
3. 学会等名 第67回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大島 有貴、堀 瑞季、松本 未結、加藤 大
2. 発表標題 蛍光法による尿中VCM濃度簡易測定法の開発
3. 学会等名 第42回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細川 知佳子、小倉 唯奈、加藤 大
2. 発表標題 尿中 cell free DNAの簡易精製法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小倉 唯奈、加藤 大
2. 発表標題 尿中 cfDNA の高効率な精製法の開発
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 大
2. 発表標題 尿中 cfDNA の高効率な 精製法の開発
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第11回学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小倉 唯奈、渡辺倫子、加藤 大
2. 発表標題 尿中 cfDNA の高効率な 精製法の開発
3. 学会等名 第32回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 大
2. 発表標題 医療貢献を目指した分析化学
3. 学会等名 第33回 バイオメディカル分析科学シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大学薬学部基礎薬学講座生体分析化学部門 https://www.showa-u.ac.jp/education/pharm/major/bachem.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------