

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月11日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501036

研究課題名（和文） ジアセチルポリアミンアプタマーを利用した簡便ながん診断方法の確立

研究課題名（英文） Development of cancer diagnostic system using anti-diacetylpolyamine RNA aptamer

研究代表者

小黑 明広 (OGURO AKIHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：00292508

研究成果の概要（和文）：

ポリアミンは細胞の増殖に関与しており、その生体内の含有量はがんのバイオマーカーとしても有用であることが知られている。本研究では、ポリアミンに結合する RNA アプタマー（核酸抗体）を取得し、尿中に排泄されるポリアミン量を高感度に検出する新規検出系の開発を行った。その結果、特定のポリアミンに対して特異的な結合活性を持つアプタマーが取得でき、さらに、このアプタマーを用いた検出系の有効性を確認できた。

研究成果の概要（英文）：

Polyamines are ubiquitous biogenic amines and essential for proliferation. Cancer cells generally contain elevated levels of polyamines. Anti-polyamine aptamers would discriminate each polyamine and be potential diagnostic and prognostic tools for malignant disorders. In this study, I isolated RNA aptamer against polyamine and analyzed its binding activity, specificity and polyamine-binding property. Furthermore, I indicated the sensing system with this aptamer was useful to detect polyamine in solution.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：機能性 RNA、アプタマー、がん診断、ジアセチルスペルミン、ポリアミン

1. 研究開始当初の背景

ポリアミンはアルキル鎖骨格に複数のアミノ基が結合した単純な構造を取る化合物で、細胞の増殖や分化に重要な役割を果たしている低分子生理活性物質である。ヒトの主要なポリアミンはプトレッシン・スペルミジン・スペルミンの3種類であり、すべての細胞に比較的高濃度 (mM オーダー) に存在し、余分なポリアミンはアセチル抱合型および遊離型として尿中に排泄される。ポリアミンは、核酸と相互作用することにより転写や翻訳反応に影響を及ぼし、生命活動を制御していると考えられている。そのため、細胞の活性状況により細胞内の濃度や存在比が大きく変化する。

尿中の微量成分であるジアセチルポリアミン (ジアセチルスペルミンとジアセチルスペルミジン) が、がん患者で4倍~70倍に増加し、腫瘍マーカーとなることが報告され (Sugimoto et al., J. Cancer. Res. Clin. Oncol. (1995) 121:317-9)、成人に関しては初期がん患者のスクリーニングに有用であることが複数の臨床試験を通して証明されつつある (Kawakita & Hiramatsu, J. Biochem. (2006) 139:315-22)。尿中ジアセチルポリアミンは特定のがんで特異的に増加するものではないが、この性質は逆に汎用性のある検査法に成り得ることを意味する。

一方、これまでジアセチルポリアミンの小児がんマーカーとしての有用性を検討した研究は見当たらない。これは、小児期には成人に比べてジアセチルポリアミンの生理的尿中排泄量が大きく、かつ成長に伴い変動するので、一定のカットオフ値を定めて初期がん患者を識別するという成人に用いた方法は小児に適用しにくいと考えられる。しかし、小児がん患者の再発や二次がんの発生の追跡検査には有効な可能性がある。このためには多くの検体数を対象に検討して有効性を示す必要がある。

ポリアミンの検出や解析のツールとして抗ポリアミン抗体があるが、現存のものでは特異性、親和性とも不十分である。その理由として、各種ポリアミン間の構造が似ていること、またその構造が抗体のエピトープには適していないことが挙げられる。しかし、上記のような理由より、ジアセチルポリアミンを高感度に検出する系の必要性は大きい。

近年、抗体と似た性質を持つ分子として

RNA アプタマーが注目されている。RNA アプタマーは、ランダムな配列を持つ RNA ライブラリーから、ある標的に高い親和性を持つ RNA 分子を分離する SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) と呼ばれる方法で作製される 25~80 nt ほどの機能性低分子 RNA である。RNA が高次構造を取ることによって機能するアプタマーは標的リガンドと結合することにより正しい高次構造を作るような調節も可能である。

RNA アプタマーを使ってジアセチルポリアミンの検出系を開発する利点を以下に挙げる。

- i) ポリアミンのような免疫獲得の困難な低分子化合物に対して有効。
- ii) 良く似た構造の各種ポリアミンを識別可能。
- iii) 標的との結合による構造変化が誘導でき、これを基にした検出機能付加が可能。
- iv) 化学合成できるので大量供給が可能、様々な修飾が容易。
- v) 乾燥させておけば室温で安定に保存可能。

2. 研究の目的

本研究計画では、ポリアミン類、特に腫瘍マーカーとして有効であるジアセチルポリアミンに結合する RNA アプタマー (ジアセチルポリアミンアプタマー) を作製し、それらのアプタマーと標的の結合を発色で検出できるように改変し、尿中のポリアミンを測定機器を使わずに発色による簡便な検出方法を確立する。さらにジアセチルポリアミンアプタマーの検出系を用いて、小児がん患者のがんの再発や二次がんの追跡検査における腫瘍マーカーとしてジアセチルポリアミンが有効かどうかを検討し、これまで困難だった治療後の定量的追跡検査法を確立する。また得られたアプタマーよりアルキル鎖とアミンよりなる構造への結合配列を決定し、他の類似化合物に結合するアプタマーへの転用の可能性を示す。

3. 研究の方法

各種ポリアミンに結合する RNA アプタマーを、ポリアミンカラムを作製して取得する。得られたアプタマーを基にして、標的との結合による構造変化が誘導されるように改変し、発色による定量測定が行えるように改良

を加え、尿中ジアセチルポリアミンの検出系を確立する。さらに、この検出系を用いて小児がん患者の尿中ジアセチルポリアミン量の追跡検査を行い、小児がんにおけるジアセチルポリアミンの腫瘍マーカーとしての有用性を検討する。また、アダプターとポリアミン類の結合様式の解析を行い、アルキル鎖+アミン構造の結合配列を決定し、この構造を持つ化合物に結合するアダプター取得の可能性を示す。

(1) ジアセチルポリアミンに結合するアダプターの作製

RNA アダプターの作製は SELEX と呼ばれる既知の手法を一部改変して行う。一級アミンを持つポリアミンはアミンカップリングによってゲル担体と結合させることができる。ジアセチル体は 活性型 NHS 担体にモノアセチル体をカップリングさせることで擬似構造体を形成することが可能である。このジアセチルポリアミンカラムに結合する RNA を遊離ジアセチルポリアミンで溶出し、それを基に次の選択過程の核酸プールを作製する。これにより遊離型に結合する RNA 分子を確実に濃縮できる。このようにしてジアセチルスペルミンおよびジアセチルスペルミジンに結合する RNA アダプターを作製する。

(2) ジアセチルポリアミンアダプターを用いた検出系の確立

標的の結合量を発色により提示できるように、得られたジアセチルポリアミンアダプターを改良して、標的の結合により消光物質による蛍光の ON/OFF 切り替えできるようなアダプターや、標的と結合すると色素を放出するようなアダプターを作製する。これらの標的分子の結合量と発色強度の関連を生化学的に解析し、定量性を検討する。

(3) 尿中のジアセチルポリアミンの検出

尿中のジアセチルポリアミンを、アダプターを用いた発色検出系で定量測定できるか、尿にジアセチルポリアミンを加えた試料を用いて検討する。特に、尿は pH が酸性側に偏っているため、試料を中性化する必要があるかを検討する。試料中のジアセチルポリアミン濃度と発色強度の相関関係を調べ、その精度を検討する。

(4) がん患者の尿中のジアセチルポリアミンの測定

ジアセチルポリアミンアダプターを用いて尿中ジアセチルポリアミン量を測定する。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による測定結果とジアセチルポリアミンアダプターの検出系で得られた結果との相関関係を調べ、ジアセチルポリアミンアダプターの精度を検討する。

(5) 小児がんでのジアセチルポリアミン検出系の有用性の検証

小児がん患者の随時尿を使用し、ジアセチルポリアミンアダプターを用いて尿中ジアセチルポリアミン量を測定する。尿中ジアセチルポリアミン量は HPLC でも測定を行い、アダプター測定系のバックアップに用いる。

(6) ジアセチルポリアミンアダプターの機能配列の確定

得られたアダプター中の標的結合に重要な配列 (機能配列) を決定するために生化学的解析を行う。得られたアダプターの予測される二次構造配列を基に、様々な欠損変異体や配列置換変異体を作製し、それらの結合活性を測定し、機能配列を決定する。さらに標的分子のポリアミンをより小さい形の分子、例えばモノアセチルプトレッシンにして、それらと結合する配列を絞り込む。さらにこれまでに得られている他のポリアミンアダプターとの解析結果と併せて、アルキル鎖とアミンよりなる構造への結合配列・構造を決定する。

4. 研究成果

(1) RNA アダプターの取得

RNA アダプターは、ランダムな RNA プールより結合活性を指標に単離する SELEX 法により得られる機能性 RNA であり、抗体よりはるかに微細な構造の差異を認識できる特徴を持ち、生体内分子の新規検出・解析ツールとして注目されている。ポリアミン量は増殖の盛んな細胞内で増加するため、がんのバイオマーカーとして有用であることが報告されている。がんの診断系の開発を目標に、各種ポリアミンを高感度で識別・検出するツールとしてのアダプターの有効性を検証するために、まずスペルミンに結合する RNA アダプターを作製し、解析を行った。

① スペルミンアダプター

ジアセチルスペルミンに先立ち、まずはスペルミンを標的にして取得した (図 1)。得られたアダプターは、スペルミン、ホモスペルミン、ノルスペルミンといった直鎖状で 4 つのアミンを持つテトラアミン類に対して

強い結合活性を持ち、アミン間の炭素数に対してある程度許容をもつことが分かった。また、このテトラアミンの両端が一級アミン(-NH₂)であることが結合には重要であることを明らかにした(図2)。



図1、スperlミンアプター

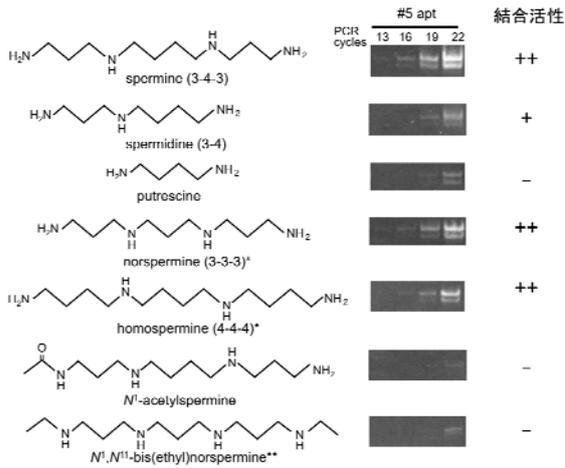


図2、RNAアプターへのポリアミン結合特異性

② ジアセチルスperlミンアプター

ジアセチルスperlミンに結合するアプターの選択を行なったところ、当初、その取得に苦労し、多くの取得条件を試すこととなった。最終的に幾つかのアプター候補を得ることができたが、その結合活性はスperlミンアプターに比べると低いものであったり、結合活性が比較的高くても特異性の低いものであった。より良いRNAアプターを得るためには選択時のポリアミンのカップリング方法やRNAライブラリーのプライマーの設定方法に改良の余地があることが分かった。

(2) RNAアプターの機能配列の解析

得られたスperlミンアプターは2つのステムループ構造を持つことが予測され、この構造を基にポリアミン結合部位を調べたところ、3'側のステムループ構造がスperlミンに対して高い親和性を持っていた。この3'ステムループは、stem1、bulge、stem2、loop構造という4つの領域に区別できる(図3)。

また、このbulge outはA/Cの組み合わせにおいて結合活性が高いことが分かった。

また、stem1とstem2はそれぞれ単独でもスperlミン結合活性を有しているが、この2つの領域が共存した時に強い結合活性を持ち、さらに、bulgeがstem1の結合活性に必須であることが分かった。このstem1とstem2の結合活性の独立性を検証するために、stem1およびstem2内の塩基対を置換した変異体を作成し、これらの結合活性を調べたところ、ある特定の塩基対の置換は、属するstemの結合活性を低下させるだけでなく、アプター全体の結合活性を低下させた。このことは、それぞれのstem領域は単独で機能しているのではなく、互いに相互作用することで強い結合活性を与えていることを示唆している。

さらに、表面プラズモン共鳴(SPR)装置でスperlミンとアプターの相互作用解析を行なったところ、両者間の結合比は約1:1であることが推定された。以上のことより、このアプターは3'ステムループのstem1とstem2が相互作用して1分子のアプターと結合するモデルが提唱された。

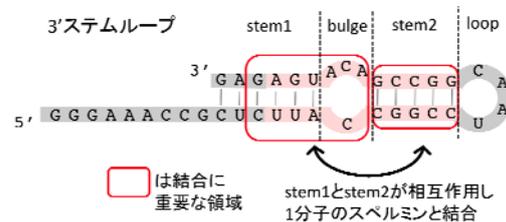


図3 アプターのスperlミン結合様式

(3) アプターを用いたポリアミン検出系

スperlミンアプターをあらかじめ結合させたスperlミン親和性カラムを用いて、溶液中のスperlミンの検出する系を作製した。この系において、10 μMから3 mMのスperlミンを定量的に検出することが可能であった。さらに核酸に結合する蛍光物質であるGel Red (Biotium社)を使い、溶液中のスperlミンの検出を紫外光下で可視化することができ(図4)、アプターを用いたポリアミン検出系の有効性を示せた。また、RNAアプターの5'末端を蛍光色素やビオチンなどでラベルする系を確立した。これにより、検出方法のバリエーションを広げることができ

た。

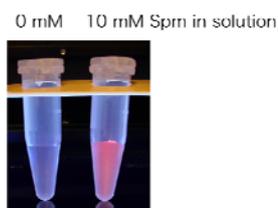


図4 溶液中のスペルミンの検出

(4)まとめと今後の展望

今回得られたスペルミンアプタマーの研究成果から、アミノ基の構造や数の異なるポリアミン間はアプタマーで識別することが可能であることが分かった。また、アプタマーを使った溶液中のポリアミンの検出系の有用性も示すことができた。一方で、常に同じ条件で種々のポリアミンに結合するアプタマーを取得することが、当初考えていたよりも難しいことが分かった。今回の研究期間でも幾つかの取得方法を試したが、今後、体系的に取得方法を選択できるようにすることが課題として残った。また、今後早急に、得られたアプタマーを基に、より結合活性の強いアプタマーへと変換させる手法の開発や、尿中でのアプタマーの作用機序を解析しなければならない。

今回の研究では、ポジティブな面、ネガティブな面を合わせて、今後のこの研究の発展につなげられる成果を得られたと考える。

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 0 件)

[学会発表] (計 12 件)

- ① 小黒明広、RNA アプタマーの解析から明らかにされたスペルミンに結合する RNA 構造、第 35 回 日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡国際会議場(福岡県)
- ② 小黒明広、Identification of spermine binding RNA sequence/structure on anti-spermine aptamer、International Congress on Polyamines、2012 年 9 月 3 日～5 日、Istanbul Kultur Univ., Turkey
- ③ 小黒明広、スペルミン結合 RNA アプタマーのバルジ構造の重要性、第 14 回日本 RNA

学会年会、2012 年 7 月 18 日、東北大学(宮城県)

- ④ 小黒明広、RNA アプタマーを用いたスペルミン結合モチーフの解明、日本ポリアミン学会 第 3 回年会、2012 年 1 月 26 日、さいたま市民会館 (埼玉県)
- ⑤ 小黒明広、Binding manner of anti-spermine aptamer reveals a preferential RNA structure for spermine、第 34 回 日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑥ 小黒明広、Isolation and evaluation of anti-polyamine aptamer as a diagnostic tool、Cold Spring Harbor Lab. Meeting, RNA and Oligonucleotide Therapeutics、2011 年 12 月 5 日、Cold Spring Harbor, USA
- ⑦ 小黒明広、Binding Manner of *in vitro* Selected RNA against Spermine、Gordon Research Conference on Polyamines、2011 年 6 月 22 日、23 日、Waterville Valley, USA
- ⑧ 小黒明広、Analyses of the Binding Manner of *in vitro* Selected RNA to Polyamine、RNA 2011 Meeting、2011 年 6 月 15 日、国立京都国際会館 (京都府)
- ⑨ 小黒明広、RNA アプタマーを用いたポリアミン検出系の開発、日本ポリアミン学会 第 2 回年会、2011 年 1 月 27 日、帝京大学宇都宮キャンパス (栃木県)
- ⑩ 小黒明広、RNA アプタマーを用いたスペルミン検出系の開発、第 33 回 日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 8 日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ⑪ 小黒明広、Detection of polyamine by RNA aptamer、第 37 回 国際核酸化学シンポジウム、2010 年 11 月 10 日、はまぎんホール ヴィアマーレ (神奈川県)
- ⑫ 小黒明広、Isolation and evaluation of anti-spermine aptamer、2010 国際ポリアミン会議、2010 年 6 月 15 日、御殿場高原リゾート 時之栖 (静岡県)

[図書] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小黒 明広 (OGURO AKIHIRO)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：00292508

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし