

新型マイクロアレイ MMV を利用した多因子対象医療診断キットの開発

西垣 功一 (理工学研究科・教授)

1 はじめに

最新のシステム生物学研究から、医療診断として、個別の因子（例えば前立腺がんマーカーの PSA など）だけをモニターするのではなく、同時に多くの因子をモニターするのが精確に病因を診断するのに有効であるとわかってきている。しかし、残念ながら、現在これを実現する技術的基盤が十分でない。例えば、既存のプロテインチップ（抗体などをアレイ状に配列したもの）は、感度は十分ではないことが多く、安定性に欠け、対象とするターゲット分子も限定されており、原理的に高額にならざるをえず、医療応用の段階には程遠い。とりわけ問題は、高感度に検出するためのプローブ分子の開発が困難であることである。

抗体法とは別のアプローチとして、筆者らはこれまで、ペプチドの高性能に着目し、超高感度かつ多並列検出系の開発をめざし、ペプチドアダプター（高速分子進化技術で取得した機能性ペプチド）の迅速取得技術（eRAPANSY 法）の開発や新型マイクロアレイ MMV 法の開発、および取得したペプチドを高感度検出ツールとするために“pep-ELISA”システムの開発などを進めてきた。これらの技術を総合して、病態に関連する多くのマーカー分子の血液中濃度を一斉にモニターして病状を把握することを可能とする「多因子対象医療診断薬キット」の開発をめざした。その際に、そのキットを迅速・低コストで作成するツールとして我々が開発した「新型マイクロアレイ（MMV）技術」を応用することを考えている。

2 研究の概要

開発を目指す技術の特色は、血液中の超微量成分を検出するために要請される 2 つの条件（① 標的分子に特異的かつ高親和性に結合する分子の存在と②増幅可能なタグ分子の存在）を満たしていることと、③多種の高額試薬を無駄なく、効率よく調製する技術（MMV 技術）を開発・使用することにある。①は「ペプチドアダプター開発」という。

今年度は、①については、せき髄液や血液中に微量に含有されることが想定されるアルツハイマー病関連因子 A β 42 の高親和性ペプチドの取得を行い、ペプチドアダプターの有用性実証実験とした（これとは別に、他のプロジェクト（地域イノベーションクラスタープログラム）の関連で、プロテアーゼカテプシン E に対して中性において高親和性を有するペプチドの取得実験が並列に行われ、こちらは独自に我々の提唱するペプチド取得法の有効性を支持する結果となっている）。

②については、仮に 256 種の因子を対象とする場合を想定し、それに必要なタグを作製する技術として 2N 法（下記論文；Kinoshita et al. *BMC Biotechnology* 2010 参照：簡略に言えば、2 進数 8 ケタの各桁に対応して MMV におけるそれぞれのウエルに 0 / 1 の 2 状態を発生させる“フィルター”を用いて最終的に 256 状態を生じるもの）を応用するために、現在開発中の新型マイクロアレイ MMV の金型調製副次産物をこれに適合させる工夫（“選択的ウエル閉塞方式”）をし、実用性を確認した（「2N フィルター作成法開発」）。

③については、先端計測分析機器開発事業で開発した MMV を用いて、多因子対象医療診断キットを構成する上で必要な素過程の確認を行い、システム全体を下記のように構築した。

3. 結果と考察

本研究は医学的に極めて重要な意味を持つ標題のテーマ「MMV を利用した多因子対象医療診断キットの

開発」のフィージビリティを検証し、その実践のための技術開発を行うことにある。その意味で、開発に必要な上述の条件①～③に関して、まず、①については、既に先行するプロジェクト(都市エリア事業(2007～2010年))において取得したAβ42親和性ペプチドを元に、今回、我々の開発した「発達ライブラリー法」によって、より親和性の高いペプチド(数10nMのKd)を取得することに成功し、大前提となる「高親和性ペプチドの取得容易性」を実証した。同時に関連する研究(カテプシンEの中性条件下高親和性ペプチドの高活性化)においても同様に“取得容易性”が実証され、それ以前の2例の結果と合わせて合計4例において、「(高機能ペプチド取得のための)発達ライブラリー法」の有効性が示されたことになり、これまで試みた4例すべてで成功しており、高い信頼性を築きつつある。従って、①の技術は完成したと考えていい。②については、新たに開発した全貫通型MMVに対して閉塞方式をとることが有効であることが示され、製法が確立した。その実用性については既に上記論文で実証済み。③のMMV操作素過程(移送、酵素反応、PCR反応、培養、吸引、試料添加、ロボット自動注入など)は、新しく作成したタイプのMMVでもほぼ定量的に実施可能であることが確認され、原理的に標題のテーマが実現可能であることが確認されるとともに、関連して必要な技術・器具の開発が実施された。

今後は、大規模な開発研究になるが、医療現場で必要とする分子標的のリストを整え(その中には、ここで開発したCEやAβ42などが含まれるはず)、それらの分子をMMV中で実際に揃え、診断キットに作り上げることになる。本研究はその道を拓いた。

4. 関連論文と外部資金

■ 関連論文業績

- K. Kitamura, M. Biyani, M. Futakami, S. Ueno-Tsuji, M. Suzuki, T. Kawakubo, K. Yamamoto and K. Nishigaki Peptide aptamer-based ELISA-like system for detection of cathepsin E in tissues and plasma *Journal of Molecular Biomarkers and Diagnosis* in press (2011)
- M. Biyanian,, M. Futakamia,, K. Kitamura,, T. Kawakuboe, M. Suzukia, K. Yamamoto and K. Nishigaki, In vitro selection of cathepsin E-activity-enhancing peptide aptamers at neutral pH *International Journal of Peptides* in press (2011)
- S. Tsuji-Ueno, M. Komatsu, K. Iguchi, M. Takahashi, S. Yoshino, M. Suzuki, N. Nemoto and K. Nishigaki, Novel high-affinity Aβ-binding peptides identified by an advanced in vitro evolution, progressive library method, *Protein and Peptide Letters* in press (2011)
- Y. Kinoshita, T. Tayama, K. Kitamura, M. Salimullah, H. Uchida, M. Suzuki, Y. Husimi, and K. Nishigaki Novel concept microarray enabling PCR and multistep reactions through pipette-free aperture-to-aperture parallel transfer, *BMC Biotechnology* , 10, 71 (2010)

■ 外部資金

2010年度に新たに採択された外部資金:

2010年度 受託研究・文科省・地域イノベーションクラスタープログラム(重点支援枠)「埼玉・圏央エリア・高速分子進化技術を核とするバイオ・ものづくりクラスターの形成」(財団法人埼玉県中小企業振興公社)・テーマ2「がんを始めとする難病の検査・治療に有効なペプチドアプタマーの開発と応用」(テーマリーダー;西垣) 2010年度 埼玉大配分;H22年度 1,299万円

継続中の外部資金:

2010年度 受託研究・科学技術振興機構・先端計測分析機器開発事業「超高速スクリーニングのための新型マイクロレイシステム開発」(リーダー;西垣) H22年度 1,380万円