

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

Development of the diagnosis kit for simultaneous multi-factor analysis based on the novel microarray MMV

西垣 功一^{1*}、木下 保則²、上野一辻 幸香¹、顧 然¹

Koichi NISHIGAKI^{1*}, Yasunori KINOSHITA², Sachika UENO-TSUJI¹, and Ran GU¹

¹ 埼玉大学大学院理工学研究科 Graduate School of Science and Technology, Saitama University

² 埼玉大学総合研究機構 Research Management Bureau, Saitama University

Abstract

The feasibility of simultaneous multi-factor diagnosis for the advanced medical approach and the necessary tools for this purpose were practically developed. The elementary problems to be cleared for the actual performance of this theme were denoted and each of them was demonstrated to be feasible through the experiments performed here and/or the related ones carried out for the relevant projects. As a result, the whole processes were shown to be practicable, providing the additional tools and methods needed for this purpose.

Key Words: Multi-factor diagnosis, MMV (microarray with manageable volumes), peptide aptamer

1 はじめに

病気の原因を真に捉え、その進展を精確にモニターすることは医学の基本である。そのために、同時に多くの因子(分子標的)をモニターするのが有効であることがわかってきている。しかし、現在においても、これを実現する技術的基盤は十分とはいえず、ひたすら研究の前線において分子標的の探索が続いている現状である。現在行われている抗体などをアレイ状に配列したプロテインチップは、一定の有効性を示しているが、多くの場合、感度は十分ではなく、安定性に欠け、対象とするターゲット分子も限定されている。抗体が高額であることも医療応用から遠ざけている原因の一つである。中でも、高感度検出用の抗体分子の開発が困難であることは深刻な弱点である。

ここにおいて、我々は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、ペプチドアプタマー(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た。

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

* 〒338-8570 さいたま市桜区下大久保 2 5 5

電話 : 048-858-3533 FAX : 048-858-3533

Email : koichi@fms.saitama-u.ac.jp

(原稿受付日 : 平成 23 年 6 月 30 日)

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。

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、ペプチドアプタマ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)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(“選択的ウェル閉塞方式”)を行い、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A β 42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良い。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A β 42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ことになる。

4. 参考文献

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) S. Tsuji-Ueno, M. Komatsu, K. Iguchi, M. Takahashi, S. Yoshino, M. Suzuki, N. Nemoto and K. Nishigaki, Novel high-affinity A β -binding peptides identified by an advanced in vitro evolution, progressive library method, *Protein and Peptide Letters* in press (2011)
- 4) 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*