

がん診断のための VEGF 簡易検出法の開発

Development of VEGF detection system for cancer diagnosis

坂元 幹弥¹⁾

指導教員 吉田 亘¹⁾²⁾

1) 東京工科大学大学院 バイオ・情報メディア研究科 バイオニクス専攻 エピジェネティック工学研究室

2) 東京工科大学 応用生物学部 応用生物学科 エピジェネティック工学研究室

キーワード：がん診断, VEGF, アプタマー, RPA

1. 背景・目的

日本人の主な死因はがんであり、4 人に 1 人はがんで死亡している。がんを治療するためには、早期診断する必要がある、がん診断として CT 検査などの他に血液を採取して行う腫瘍マーカー検査が利用されている。腫瘍マーカー検査では抗体を用いて行うため、洗浄操作などの煩雑な操作が必要である。そのため、誰でも日常的に使用可能ながん診断法の開発が期待されている。

がんのバイオマーカーとして、Vascular endothelial growth factor (VEGF) が着目されている。VEGF は、血管内皮細胞の増殖や運動を促進により、既存の血管から枝分れ・伸長することで新しい血管を形成させる因子である。がん細胞における新たな血管の形成は、VEGF の発現増加によって開始され、新たに形成された血管によって原発巣に酸素や栄養が供給されることで、がん細胞の増殖が促進される。そのため、VEGF を検出することは、がん診断・治療やがんの進行を評価するためのバイオマーカーとして重要である。既存の VEGF 検出法は抗体を用いた方法であるため、洗浄操作などの煩雑な操作が必要である。

本研究では洗浄操作を必要としない VEGF 検出法を開発するためにアプタマーに着目した。アプタマーとは、標的に対して特異的に結合する核酸のことであり、抗体の代わりとして使用されている。VEGF に結合するアプタマーは、グアニンに富んだ

配列が 4 つのグアニン塩基で平面構造を形成し、それが二つ以上重なり合っできる核酸の高次構造であるグアニン四重鎖 (G-quadruplex : G4) 構造を形成して、VEGF に結合する。また、VEGF アプタマーは核酸であることから、核酸増幅法によって増幅することが可能という特長を持つ。

本研究室では、Recombinase polymerase amplification (RPA) によって増幅される鋳型 DNA 中に G4 構造形成配列が存在すると、G4 構造の安定性に依存して RPA が阻害されることを報告している。RPA とは、等温かつ 30 分程度で核酸を増幅させる方法であり、簡便かつ迅速に核酸を増幅することが可能である。RPA の原理を Fig. 1 に示す。まず、リコンビナーゼとプライマーが複合体を形成し、プライマーが鋳型 DNA に結合する。その後、一本鎖 DNA 結合タンパク質によって鋳型 DNA が一本鎖になり、DNA ポリメラーゼが伸長反応を行うことで DNA が増幅される。

そこで、本研究では VEGF アプタマーを含む DNA 配列を RPA によって増幅することで VEGF を検出できると想定した。想定した原理図を Fig. 2 に示す。VEGF アプタマーを含む DNA は、DNA ポリメラーゼにより増幅されるが、VEGF アプタマーに数塩基だけ結合するプライマーを用いた場合、アプタマーに VEGF が結合すると、鋳型 DNA とプライマーの結合が阻害されるため、DNA ポリメラーゼによる増幅反応が阻害されると考えた。つまり、アプタマーを

RPAで増幅し、その増幅効率を測定すれば VEGF を簡便に検出できると想定した。

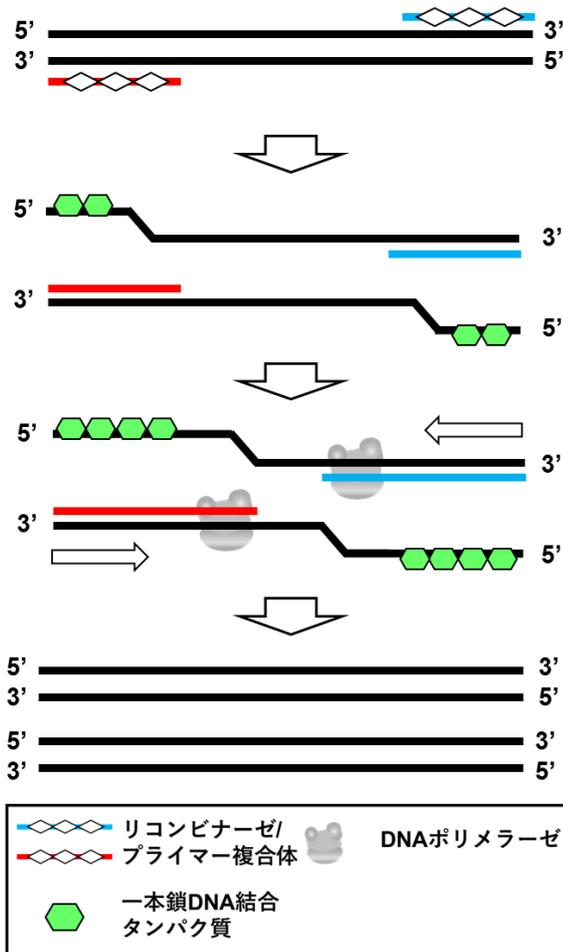


Fig. 1 RPA の原理図

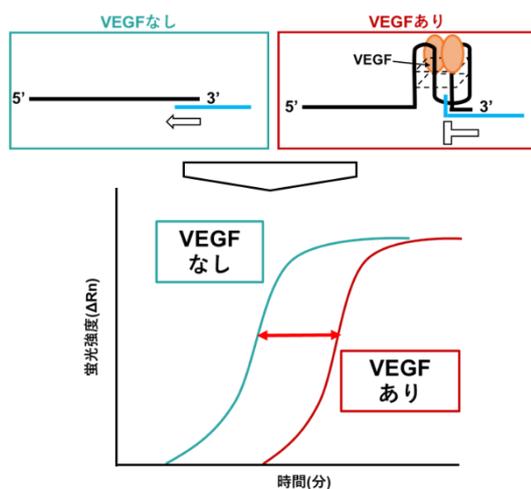


Fig. 2 RPA による VEGF 検出法の原理

2. 方法

鋳型DNAのVEGFアプタマー配列に5, 6, 7塩基ず

つ結合する3種類のプライマーを設計し、化学合成した。また、RPAに用いる鋳型DNAとして1つの VEGFアプタマーを含む鋳型DNAを設計し、化学合成した。次に、RPA酵素溶液[終濃度50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 200 μM dNTP mix, 50 mM Sodium Creatine Phosphate Hydrate, 3 mM ATP, 2 mM DTT, 14 mM Magnesium acetate, 5% w/v PEG20000, 40000-fold diluted SYBR Green I, 500-fold diluted Rox Reference Dye]を調製した。その後、RPA鋳型溶液[1.0×10^8 copies VEGF template DNA, 50 mM KCl, 140 nM RPA primer, $0.1 \times$ PBS or 500 nM VEGF]を調製し、RPA酵素溶液にTwistDX社のRPA試薬を加え、RPA鋳型溶液と混合した。その後、39°Cで30分間反応させ、QuantStudio1によりSYBR Green Iの蛍光強度を20秒ごとに測定した。

3. 結果

VEGFアプタマー配列に5, 6, 7塩基結合するプライマーを用い、VEGF存在下または非存在下における VEGF 鋳型 DNA を RPA により増幅した結果、SYBR Green I の蛍光強度が一定の強度に達するまでの時間は、それぞれ約 1.6 分、約 1.3 分、約 2.4 分増加した。つまり、VEGF が VEGF 鋳型 DNA のアプタマー部位に結合すると、プライマーとの結合が阻害され、RPA による DNA 増幅効率が減少することが示された。

4. 結論

VEGFアプタマー配列に5, 6, 7塩基結合するプライマーを用いて RPA を実施すると、VEGF 存在下では RPA の増幅効率が減少することが示された。その中で、VEGFアプタマー配列に7塩基結合するプライマーを使用した時に RPA 増幅効率の差が最も大きかった。すなわち、VEGFアプタマー配列に7塩基結合するプライマーを使用して RPA を行うことで VEGF を簡便に検出することができることが示された。今後、本手法を用いることで、検体と試薬を混ぜるだけの簡便ながん診断法が開発できると期待される。