

博士論文(要約)

論文題目 血中 cell-free DNA 回収用ナノ粒子の開発

氏名 高野 勝

## 【背景・目的】

がんは日本人の死因として最多で 2018 年時点で 27 %を占めており、発見の遅れから治療が困難となる場合が多いため、早期診断が必要とされている。DNA の損傷はがんや糖尿病など病気を引き起こすため、生体サンプル中の DNA は多くの病気に対するバイオマーカーとして用いることができる。ヒトの血液中にはアポトーシスやネクローシスなどで cell-free (cf)DNA が細胞から放出されており、がん患者の血液にはがん細胞に由来する cfDNA が存在し、糸球体膜を通過し尿からも排出される。がん細胞由来 cfDNA を用いて腫瘍ゲノムの再構成が可能であることが確認され、ヒトの血液中 cfDNA を用いて主要ながんの診断に成功[1]、がん患者の尿から抽出した cfDNA ががんの発見に有効であることが報告されるなど[2]、これを利用した診断が既に実施されているが、早期のがんではがん細胞由来 cfDNA の量が少なく、採取可能な検体の量が限られるため、確実な診断が難しい。

この問題を解決するための手法として、1)血中 cfDNA の回収効率を上げる、2)より微量の血中 cfDNA 検出を可能にする、3)cfDNA を採取する血液の量を増やすという 3 つの手法が考えられる。1)血中 cfDNA の回収効率については数多くの研究が行われており[3]、既に高効率に回収するキットが開発されている。2)また微量検出についても現在数多くの研究が進められている[4]。しかし、3)検査の際採取する血液の量については、そもそも採取した血液中にがん細胞由来 cfDNA が存在していなければ診断は不可能であるため重要な要素であるが、通常の採血を用いた検査では上限 20 mL と決まっているため、これに着目した検討は行われていない。そこで本研究では、従来の採血によらない手法で cfDNA を採取する血液の量を増やすことで、より多量の cfDNA 回収を目指す。

## 【方法】

ナノ粒子は比表面積が大きく、また機能性物質の内包や修飾によって、様々な機能を付与することが可能である。我々は、4 腕ポリエチレングリコール(PEG)モノマーの重合反応によって粒子径約 100 nm のナノ粒子の調製に成功した。この PEG ナノ粒子をマウスに投与すると、血流に乗り体内を循環した後、速やかに尿中に排泄されることが確認された(Fig. 1)[5]。

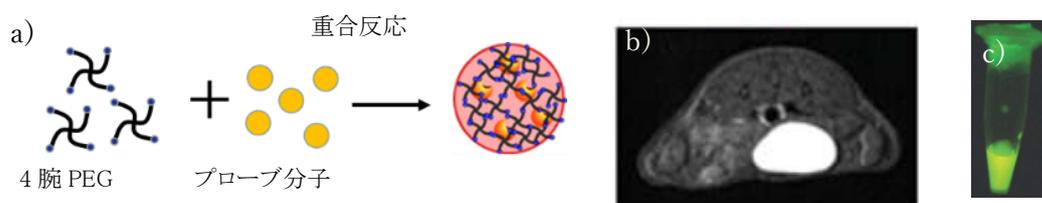


Fig. 1 PEG ナノ粒子のマウスへの投与実験 a)4 腕 PEG を用いたナノ粒子の調製、b)膀胱に蓄積したナノ粒子(MRI 像)、c)尿排泄されたナノ粒子(蛍光像)

そこで本研究では、PEG ナノ粒子の尿排泄される特性を維持したまま、標的物質である血中 cfDNA を捕捉する機能を付与し、血中 cfDNA 回収用ナノ粒子の開発を目指した。血液検査で採血することのできる血液量は基本的に 20 mL が上限だが、もしナノ粒子が血流にのって体内を循環し、成人の体内に存在する血液約 5 L 中に存在する全ての標的物質を回収した場合、その 250

倍もの cfDNA が回収される。つまりこれまでは微量なため検出が難しかった cfDNA の存在量が 250 倍になるので、容易に検出できるようになり、診断精度の向上や疾患の超早期発見につながると期待される。

**【結果】**

PEG ナノ粒子を調製し、その表面に DNA 捕捉部位として poly-Lys、または Hoechst 33258 を導入した。本ナノ粒子それぞれに DNA を混合し、複合体形成をアガロースゲル電気泳動により評価したところ、未修飾のナノ粒子は DNA と複合体を形成しなかったのに対し、2種の表面修飾粒子は共に DNA と複合体を形成した。さらに2種の表面修飾ナノ粒子を蛍光標識した後、マウスに尾静脈から投与したところ、poly-Lys 修飾蛍光 PEG ナノ粒子は尿中に排泄されなかった上に毒性が見られたが、Hoechst 修飾蛍光 PEG ナノ粒子では顕著な毒性は見られず尿中に排泄された。しかし、尿排泄の効率は投与後 3 時間以内の尿中から回収された本ナノ粒子の割合が

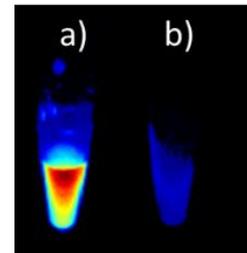


Fig. 2 マウスの尿(蛍光像) a)蛍光 PEG ナノ粒子、b)Hoechst 修飾蛍光 PEG ナノ粒子をそれぞれ投与

1.6 %と未修飾の蛍光 PEG ナノ粒子と比べ大幅に低下した(Fig. 2)。尿排泄の効率が低下した要因として多量の DNA によってナノ粒子が凝集したことを考え、修飾量と粒子径の最適化を行った結果、過剰な DNA が存在しても凝集しない Hoechst 修飾蛍光 PEG ナノ粒子の開発に成功し(Fig. 3)、マウスに投与したところ投与後 3 時間以内の尿中から回収された本ナノ粒子の割合が 81 %と尿排泄の効率が改善したことが確認された。

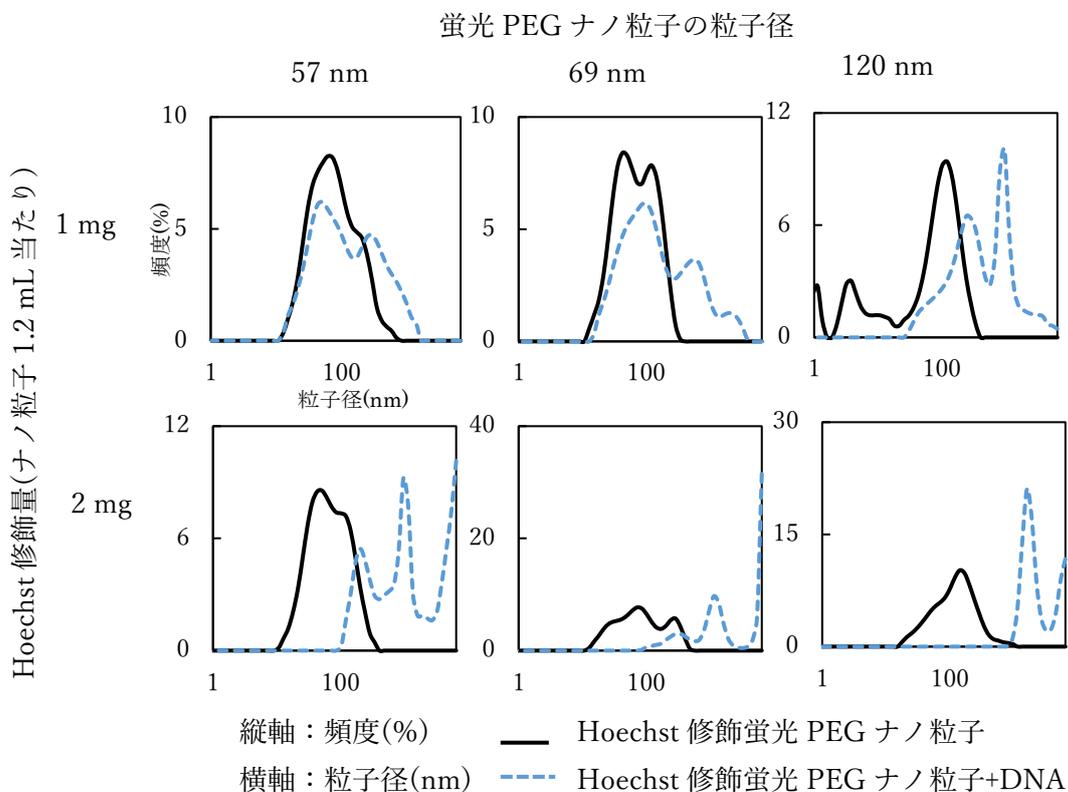


Fig. 3 異なった条件で作製した Hoechst 修飾蛍光 PEG ナノ粒子の DNA 捕捉前後の粒子径の変化

投与前と尿中に排泄された本ナノ粒子の形態を透過型電子顕微鏡(TEM)により確認したところ(Fig. 4)、投与前と尿排泄後で本ナノ粒子の形態が変化していることが確認された。また、投与前の本ナノ粒子は分画分子量 50000 の限外ろ過膜を通過しなかったのに対し、尿中に排泄された本ナノ粒子は通過したため、マウスに投与し尿中に排泄されるまでの過程で本ナノ粒子の性質が変化していることが確認された。

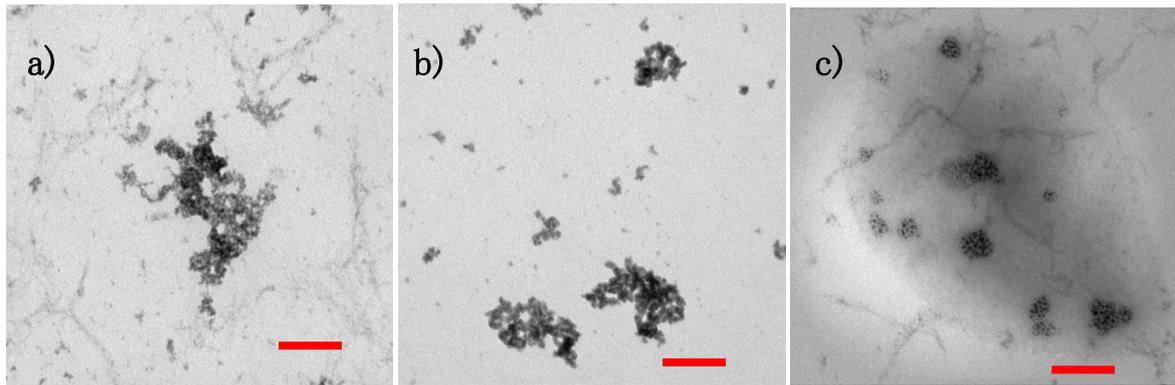


Fig. 4 ナノ粒子の形態(TEM 画像、スケールバー:100 nm) a)蛍光 PEG ナノ粒子、b)Hoechst 修飾蛍光 PEG ナノ粒子、c)尿排泄された Hoechst 修飾蛍光 PEG ナノ粒子

また、予め標的 DNA(GFPm[6]由来の 150 bp の DNA)と複合体を形成した本ナノ粒子を投与したマウスの尿から DNA を回収し、PCR により標的 DNA の配列を増幅した結果、標的 DNA の増幅が確認されたため、本ナノ粒子が血中で標的 DNA を捕捉することができれば PCR による検出が可能であると考えられる。

そこで、事前に標的 DNA を投与したマウスに Hoechst 修飾蛍光 PEG ナノ粒子を投与し、血中で標的 DNA を捕捉し尿中に排泄された本粒子を回収し、PCR により標的 DNA を増幅し検出した。同様に事前に標的 DNA を投与したマウスから従来の手法で尿、血液を回収し既存の cfDNA 回収キットにより DNA を回収、標的 DNA を検出し本手法と比較することで疑似的ながん診断モデルを検討した。その結果、本手法では 5 ng、従来法の採尿検査では 500 ng、従来の採血検査では 500 pg までの投与した標的 DNA が検出された。本粒子を用いた手法では従来の採尿検査と比較して 100 倍程度の微量 DNA を検出することが出来ているため、本研究で目標としていた投与後に血中で DNA を回収し尿排泄される血中 cfDNA 回収用ナノ粒子の開発に成功したことが確認された。しかし、従来の採血検査の結果には及ばなかったため更なる改善の余地があると考えられる。

#### 【結論】

血中 cfDNA 回収用ナノ粒子として Hoechst 修飾ナノ粒子を作製し、本ナノ粒子を用いて水溶液中及び血液中からの DNA 回収に成功し、マウスに投与したところ速やかに尿中に排泄されること

が確認されたため、本ナノ粒子が血中 cfDNA を捕捉し尿中に排泄されれば、血中の微量 cfDNA 検出に利用可能であると期待される。

また、疑似的ながん診断モデルを検討した結果、本粒子を投与したことで尿中から回収される標的 DNA の量が大きく増えているため、本粒子が投与後血液中で標的 DNA を回収し尿排泄されるという目的は達成されたと考えられる。しかし、理論上本粒子が全身の血液から全ての DNA を回収すれば、従来の血液検査の 25 倍もの血中 DNA を回収が可能であるはずだが、従来の採血を用いた検査には 10 倍程度及ばない結果となった。

#### 【今後の展望】

疑似的ながん診断モデルで期待していたほどの結果が得られなかった理由として、標的 DNA や本粒子を一度に投与しているため循環血液中で十分に拡散していない可能性を考えている。本粒子は DNA と接触しなければ捕捉することができないため、拡散が十分でなければ DNA の捕捉効率が大きく低下することが予想される。そのため、本粒子を複数回に分けて投与する、投与速度を遅くする、もしくは本粒子の粒子径を大きくし尿排泄されるまでの時間を長くすることで DNA 回収量が改善され、その結果従来の採血検査よりも多量の血中 cfDNA を回収可能な手法になると考えられる。

また、腫瘍を発現させたマウスに本粒子を投与し、血中腫瘍 cfDNA を捕捉し尿中に排泄された本粒子を回収し、PCR により腫瘍 cfDNA を増幅し検出する。これらの検討を通して、がん診断への応用を検討する。

#### 【文献】

- [1] Anker P, et al. Int. J. Cancer. 2003; 103:149-152.
- [2] Botezatu I, et al. Clin. Chem. 2000; 46:1078-1084.
- [3] Takano S, et al. Anal. Bioanal. Chem. 2017; 409:4021-4025.
- [4] Pratt ED, et al. Anal. Chem. 2019; 91(12):7516-7523.
- [5] Murayama S, et al. J. Mater. Chem. B 2013; 1:4932-4938.
- [6] Iizuka R, et al. Anal. Biochem. 2011; 414:173-178.