

学位申請論文

自律駆動マイクロ流体チップを用いた 核酸バイオマーカーの検出

平成 29 年 3 月

東京理科大学大学院

基礎工学研究科 材料工学専攻

松本研究室

長谷川 和貴

目次

第 1 章	序説	1
1.1	研究背景	2
1.1.1	DNA と RNA	2
1.1.2	バイオマーカー	5
1.1.2.1	マイクロ RNA	5
1.1.2.2	メチル化 DNA	9
1.1.3	マイクロ流体チップ	16
1.1.4	蛍光増幅剤による流路内での蛍光増幅	19
1.2	研究目的と本論文の概要	22
	参考文献	23
第 2 章	自律駆動マイクロ流体チップの作製方法	28
2.1	緒言	29
2.2	自律駆動マイクロ流体チップのデザインおよび作製方法	29
2.2.1	PDMS チップのデザインおよび作製方法	29
2.2.2	ガラス基板へのプローブ DNA の固定化方法	33
2.2.3	自律駆動マイクロ流体チップの組み立て	34
2.3	結論	34
	参考文献	34
第 3 章	自律駆動マイクロ流体チップを用いた生体試料由来 microRNA の 特異的な検出	35
3.1	緒言	36
3.2	実験方法	36
3.2.1	自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA の検出	36
3.2.1.1	層流樹状増幅法による miRNA の検出方法	36
3.2.1.2	miRNA の蛍光検出およびデータの解析	38
3.2.2	類似配列に対する標的 miRNA の特異的な検出	40
3.2.3	miRNA 前駆体に対する成熟型 miRNA の特異的な検出	41
3.2.4	白血球由来 total RNA 中の標的 miRNA の特異的な検出	42
3.2.4.1	自律駆動マイクロ流体チップを用いた total RNA 中の miRNA の 検出	42
3.2.4.2	定量逆転写 PCR を用いた total RNA 中の miRNA の検出	43

3.3	実験結果および考察	44
3.3.1	miRNA 高感度検出のためのプローブ DNA の長さの最適化	44
3.3.2	自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA の検出限界	47
3.3.3	類似配列に対する標的 miRNA の特異的な検出	48
3.3.4	miRNA 前駆体に対する成熟型 miRNA の特異的な検出	50
3.3.5	白血球由来 total RNA 中の標的 miRNA の特異的な検出	53
3.3.5.1	自律駆動マイクロ流体チップを用いた total RNA 中の miRNA の 検出	53
3.3.5.2	定量逆転写 PCR を用いた total RNA 中の miRNA の検出	54
3.3.5.3	自律駆動マイクロ流体チップと qRT-PCR の測定結果の比較	55
3.4	結論	56
	参考文献	57
第4章	自律駆動マイクロ流体チップを用いたメチル化 DNA の検出	58
4.1	緒言	59
4.2	実験方法	59
4.2.1	メチル化短鎖 DNA の検出	60
4.2.2	メチル化長鎖 DNA の検出	62
4.2.3	ヒドロキシメチル化短鎖 DNA の検出	63
4.3	実験結果および考察	65
4.3.1	メチル化短鎖 DNA の検出	65
4.3.1.1	抗 5mC 抗体の濃度の最適化	65
4.3.1.2	メチル化短鎖 DNA の検量線と検出限界	67
4.3.2	メチル化長鎖 DNA の検量線と検出限界	68
4.3.3	ヒドロキシメチル化短鎖 DNA の検出	68
4.3.1.1	抗 5hmC 抗体の濃度の最適化	69
4.3.1.2	ヒドロキシメチル化短鎖 DNA の検量線と検出限界	70
4.4	結論	71
	参考文献	71
第5章	本論文のまとめ	72
	謝辞	75
	論文リスト	76
	学会発表リスト	77

第 1 章

序説

1.1 研究背景

1.1.1 DNA と RNA

DNA の構造と特徴

生物の遺伝情報を保有する高分子生体物質として、デオキシリボ核酸 (deoxyribonucleic acid; DNA) がある。DNA は核酸の一種であり、デオキシリボースとリン酸、4 種類の核酸塩基 (Adenine (A), Thymine (T), Cytosine (C), Guanine (G)) から構成されている^[1]。DNA はデオキシリボースとリン酸エステルが交互に結合したリン酸骨格を持ち、デオキシリボースの 3' 位炭素はリン酸ジエステルを介して別のデオキシリボースの 5' 位炭素と結合している。また、各デオキシリボースには 1 つの核酸塩基が結合している。DNA を構成する 4 種類の塩基の構造式および DNA の一次構造を図 1-1 および図 1-2 に示す。

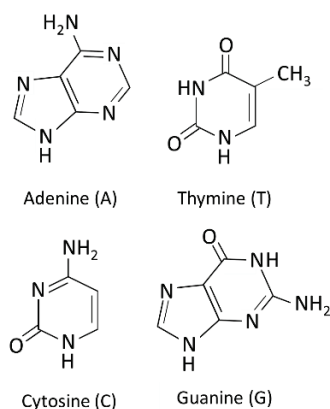


図 1-1 塩基の構造式

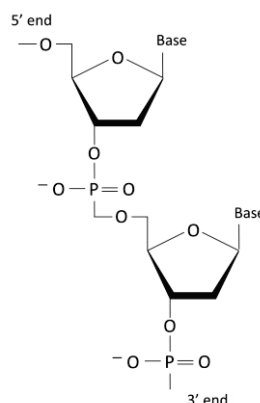


図 1-2 DNA の一次構造

DNA の二次構造：2 重らせん構造

1953 年に Watson と Crick が DNA 分子の 2 重らせん (double helix) 構造説を発表した^[2]。DNA 2 重らせんは、図 1-2 のような 1 本鎖 DNA が 2 本で 1 本の共通軸のまわりを巻いた構造をとっており、2 本の 1 本鎖 DNA が互いに逆向きに結合している。核酸塩基はらせんの内側に存在しており、A は T と、C は G と結合しながら、らせんの中心軸に対して垂直な平面内に配置されている。DNA 2 重らせんの直径は約 2 nm であり、らせん一回転分の長さは約 3.4 nm である。2 本の DNA が 2 重らせんを形成している場合、DNA の塩基は Watson-Crick 塩基対という塩基対を形成しており、A と T、G と C がそれぞれ水素結合によって結合している。この塩基対の結合によって安定な DNA の 2 重らせんが形成されるとき、2 本の DNA は互いに相補的な配列であるという^[3]。Watson-Crick 塩基対の構造式を図 1-3 に示す。

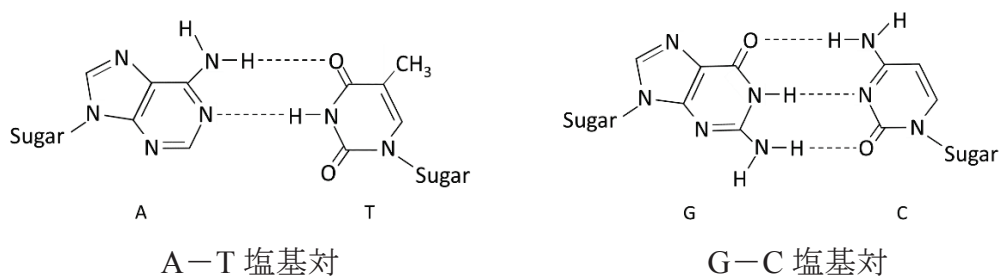


図 1 - 3 Watson-Crick 塩基対の構造式

図 1-3 のように、A-T 塩基対は 2 本の、G-C 塩基対は 3 本の水素結合によって形成される。この 2 つの塩基対は非常に似た平面構造を形成し、DNA が 2 重らせん構造をとることで、隣り合う塩基対同士が重なり合うように配置される。この状態での塩基間には分散力と疎水結合が生じており、お互いの塩基対を安定化させるため、2 重らせん構造は非常に安定になる。このような塩基の重なり合いによる相互作用をスタッキング (stacking) という^[3]。このスタッキングによる 2 本鎖の安定化を利用することで、核酸を高感度に検出する方法がこれまでに報告されている^[4]。

2 本鎖 DNA の熱的安定性

相補的な塩基配列を有する 2 本の DNA は、2 重鎖または 2 本鎖と呼ばれる塩基対合による 2 重らせん構造を形成する。このとき、2 本鎖は水素結合や疎水性相互作用といった比較的弱い相互作用で維持されているため、熱を加えることで簡単に 1 本鎖にすることができる。この現象を変性または融解といい、溶液中に 1 本鎖と 2 本鎖が等量存在する温度を融解温度 (melt temperature; T_m) という^[3]。 T_m は溶媒や pH, さらに溶液中のイオンの種類や濃度に強く依存し、2 本鎖を形成する DNA の塩基数が多いほど、DNA 中に G と C の含有量が多いほど高くなり、安定な 2 本鎖を形成する。また、DNA 中の塩基の誤対合や誤挿入、欠損などによってそれぞれの塩基に対応した塩基対ができないことをミスマッチといい、2 本鎖中にミスマッチが含まれている場合は A-T, G-C の結合点が減るため T_m は低下し、低温でも DNA が 1 本鎖に変性しやすくなる。

RNA の構造と特徴

核酸には DNA の他にリボ核酸 (ribonucleic acid; RNA) が存在する。RNA は DNA と非常に似た構造をしており、糖の部分はデオキシリボースの代わりにリ

ボースを，塩基の部分はチミンの代わりにウラシル (U) を持つことが知られている^[1]。DNA と RNA の構造の違いを図 1 - 4 に示す。

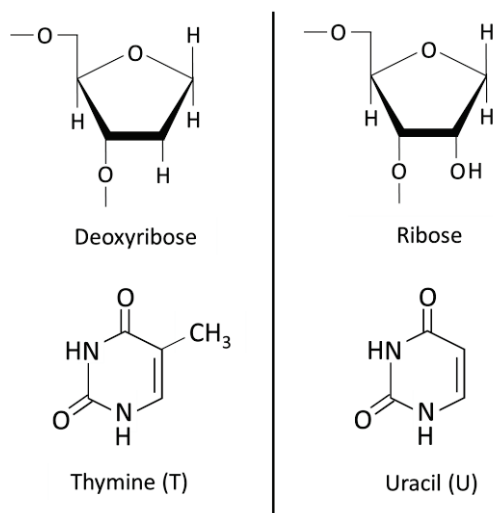


図 1 - 4 DNA と RNA の構造の違い (左 : DNA, 右 : RNA)

1958 年に，DNA から RNA への転写，そして RNA からの翻訳でタンパク質が合成されるという「セントラルドグマ」が提唱された^[5]。また，1990 年代には mRNA の選択的スプライシングによって 20-30 万種類ものタンパク質が生み出されることや，タンパク質の情報を持たない（コードしない）RNA (non-coding RNA : ncRNA) が存在することが明らかになった^[6]。当初はタンパク質をコードしない ncRNA は注目されなかったが，ncRNA の配列がヒトゲノム RNA の 98% を占めることが明らかになり，さまざまな遺伝発現や機能を調整する役割を持つことが考えられるようになった^[7]。

DNA と RNA の診断への利用

生体内における DNA および RNA を解析することは，生物学研究に不可欠なだけでなく，がん診断や創薬などのツールとして利用できることが期待されている。特に診断の分野では，血液中に含まれるマイクロ RNA や遊離 DNA を検出することで，患者に対して負担や痛みの少ないがんの早期診断を行うことが可能であることが期待されている^[8]。このような体内に存在する物質の中で病気の有無や進行度を表す物質を「バイオマーカー」といい，現在ではさまざまな病気に対応したバイオマーカーが発見されている^[9]。

1.1.2 バイオマーカー

バイオマーカーは「通常の生物学の過程や発病過程，または治療的介入に対する薬理的な反応の指標として客観的に測定および評価される特徴」と1998年にNIH（アメリカ国立衛生研究所）の研究グループによって定義されている^[10]。バイオマーカーを疾患の診断に用いる場合，疾患の存在およびその種類と進行度を反映する指標となり，その目的に応じてさまざまな種類が存在する^[9]。現在，疾患に関連したさまざまなバイオマーカーが発見されており，がんのバイオマーカーも積極的に研究されている。本章では，がんの早期診断のバイオマーカーとして近年注目されているマイクロ RNA やメチル化 DNA について述べる。

1.1.2.1 マイクロ RNA

マイクロ RNA の特徴

近年，がんの早期診断のため，血液中のマイクロ RNA（microRNA; miRNA）が注目されている。miRNA は 20-25 塩基から構成されるタンパク質を翻訳しない 1 本鎖 RNA（non-coding RNA ; ncRNA）であり，相補的な配列をもつ mRNA と結合することによって，翻訳の阻害や mRNA の分解による遺伝子の発現抑制を行っている^{[11],[12]}。ヒトでは約 2500 種類もの miRNA が確認されており，ゲノム中に存在する遺伝子の約 30~40%が miRNA の制御を受けていると考えられている^[11]。そのため，細胞増殖や分化などの様々な細胞機能において miRNA は重要な役割を果たしている。

miRNA の生合成過程とタンパク質の翻訳抑制

以下に細胞中の microRNA の生合成の過程^[12]について述べる。miRNA はゲノム中にコードされており，RNA ポリメラーゼ II によって数百~数千塩基長の 1 本鎖 RNA に転写される。この RNA は分子内の相補的な部分が 2 重鎖を形成しているため，ヘアピン構造を 1 つまたは複数有した構造をしており，Primary miRNA（pri-miRNA）と呼ばれている。核内に存在する RNaseIII 様の酵素である Drosha により pri-miRNA の一部は切断され，約 70 塩基長のヘアピン構造をもつ precursor miRNA（pre-miRNA, miRNA 前駆体）が作られる。pre-miRNA は Exportin-5 と呼ばれるキャリアタンパク質によって核内から細胞質に輸送された後，細胞質内で別の RNaseIII 様酵素である Dicer によって切断され，20 から 25 塩基長の 2 本鎖 mature miRNA となる。2 本鎖 mature miRNA は，Ago（Argonaute）タンパク質を中心とするタンパク質複合体“RISC（RNA-induced silencing complex）”に取り込まれた後，RISC 中で解かれて 2 つの 1 本鎖 miRNA（成熟型 miRNA）と

なり、より不安定な方の 1 本鎖 miRNA は分解される。2 つの成熟型 miRNA の内、発現量が顕著に高いものを"miR-xx", 顕著に低いものを"miR-xx*" と表記する。また, pre-miRNA の 5'末端側から生じるものを"miR-xx-5p", 3' 末端側から生じるものを"miR-xx-3p" と表記する。Ago/miRNA 複合体は RISC 複合体から解離した後, miRNA と部分的に相補的な塩基配列をもつ mRNA の 3'-UTR (untranslated region, 非翻訳領域) と結合し, 翻訳の阻害や mRNA の分解を行う。細胞内における miRNA の生合成の過程を図 1 - 5 に図示する。

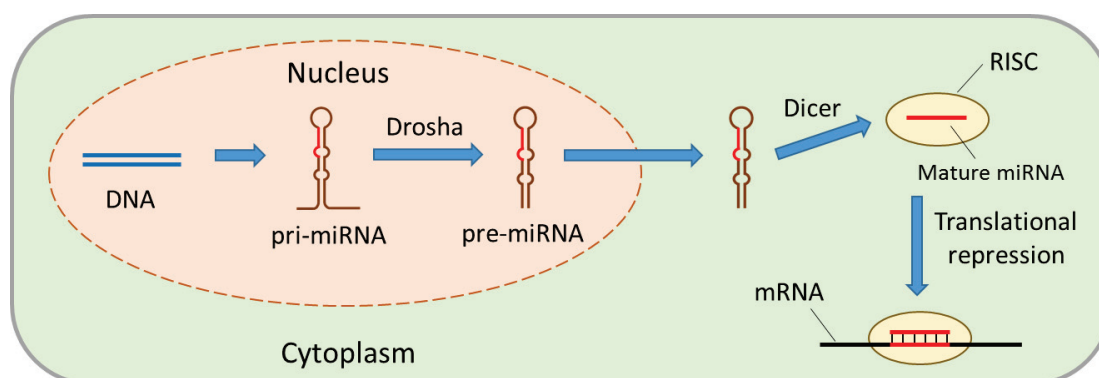


図 1 - 5 miRNA の生合成とタンパク質 の翻訳抑制。DNA から pri-miRNA が転写された後, Droshaによって pri-miRNA の一部が切断されて pre-miRNA となる。その後, 細胞質へ運ばれた pre-miRNA は Dicer によって二度目の切断が行われ, RISC タンパク質と結合した成熟型 miRNA が mRNA と結合してタンパク質への翻訳を抑制する。miRNA 前駆体 (pri-miRNA, pre-miRNA) は成熟型 miRNA と相同の塩基配列 (赤) を持つ。

miRNA のがん診断への利用

現在, 多様ながん種において miRNA の異常な発現が見出されており, がん抑制遺伝子の発現を抑制していることが明らかになってきている^[12]。がんにおける miRNA の関与は 2002 年に Croce らの研究グループの報告によって初めて確認されており, miR-15 および miR-16 が慢性リンパ性白血病に関わっていることを示した^[13]。また, 2008 年に miRNA が細胞内だけでなく体液中を循環していることが報告されてからは, miRNA は低侵襲性のバイオマーカーとして診断や予後予測への応用, 治療への利用が期待されてきた^[14]。実際に 2014 年度から, 我が国において経済産業省と日本医療研究開発機構 (AMED) のプロジェクトによる, 大規模な数の検体を対象とした患者体液中の miRNA の網羅的解析が行われている。

miRNA の検出技術

これまでに数多くの miRNA の検出法が報告されており、核酸増幅を利用して高感度に miRNA を検出する手法 (定量逆転写 PCR^{[15],[16]} など) や、標的の miRNA またはプローブ DNA に蛍光分子を標識して検出する手法 (マイクロアレイ^[17] や サンドイッチ法^[18] など) などが存在する。ここでは既存の miRNA 検出法の一例として定量逆転写 PCR とサンドイッチ法について簡潔に説明し、さらに既存の miRNA 検出法の検出限界や利点・欠点を表にまとめた。

定量逆転写 PCR (quantitative reverse transcription PCR; qRT-PCR)

定量逆転写 PCR とは、逆転写反応によって標的 RNA から complementary DNA (cDNA) を作製し、さらに cDNA をテンプレートとした PCR を行うことで増幅した DNA 量を測定して標的 RNA の検出を行う方法である。この手法は感度と定量性に優れており、サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した専用の装置を用いることで増幅量をリアルタイムでモニターすることができる。miRNA は配列が短いため、逆転写のプライマーの設計は長鎖 RNA の逆転写とは異なるものを用いる。増幅した DNA を測定する方法として、DNA の 2 重鎖中に結合した蛍光物質を検出する方法^[15] と、Taqman プローブと呼ばれる蛍光物質と消光物質を結合させたプローブ DNA を用いる方法^[16] の 2 種類がある。

サンドイッチ法

基板上に固定化したプローブ DNA と、蛍光物質などを標識したプローブ DNA の 2 種類のプローブ DNA を標的の核酸に結合させて特定の構造 (サンドイッチ構造) を形成させる核酸の検出法をサンドイッチ法という^[19]。この手法の利点は、標的の核酸への直接的な蛍光のラベリングが不要であることや、2 種類のプローブ DNA を利用することで配列特異性が高まることが挙げられる。一般的に DNA の鎖長が長くなると T_m は高くなるため、標的核酸と同じ長さの 1 本のプローブ DNA を用いた場合、少しの塩基の違いがあっても 2 本鎖を形成しやすくなる。一方、サンドイッチ法では標的配列を二つに区切って短い 2 本のプローブ DNA による 2 本鎖を形成させるため、検出の特異性が高まる。また、サンドイッチ法では 2 本のプローブ DNA 同士が隣接するように標的の miRNA と 2 本鎖を形成させることによって、プローブ DNA の末端同士でスタッキングの効果が働くようになり、高感度化な miRNA の検出が可能となることが報告されている^[18]。

一般的に使われる miRNA の検出法を表 1 - 1 にまとめる。

表 1 - 1 miRNA 検出法の特徴^[20]

miRNA 検出法	検出限界	利点と欠点
定量逆転写 PCR	fM-aM	利点：高感度，複数配列の検出が可能， 定量的な検出が可能 欠点：高価な酵素が必要，高コスト 検出時間：約 1 日
ノーザンブロッティング	nM-pM	利点：目視による検出が可能 欠点：低感度，長い検出時間 検出時間：1 日以上
分光分析	μM-fM	利点：目視による検出が可能 欠点：複雑な測定機器 検出時間：1 時間から 5 時間
マイクロアレイ	nM-pM	利点：網羅的な解析，シンプルな測定原理 欠点：低感度，検出が長時間 検出時間：1 日以上
サンドイッチ法	nM-fM	利点：簡便な操作 欠点：網羅的な解析は困難 検出時間：約 1 時間

表 1 - 1 から，定量逆転写 PCR やノーザンブロッティング，マイクロアレイは特に検出時間が長く，簡便な診断には向いていないことが考えられる。また，分光分析による検出は複雑な測定機器が必要であるため，上記の他の miRNA 検出法と同様，簡便な診断には向いていない。一方，サンドイッチ法は簡便な操作で検出が可能であるため，miRNA を用いた簡便な診断では，サンドイッチ法が有望であることが考えられる。

1.1.2.2 メチル化 DNA

遺伝子の発現調整では、DNA の塩基配列の変化を伴わずに遺伝子の転写を調整する機構が存在し、代表的な機構のひとつに DNA のメチル化がある。DNA メチル化とは、酵素によってゲノム上の CpG 部位（シトシン，グアニンの連続配列）中のシトシンの 5'位炭素原子にメチル基が付加される現象のことであり，メチル化したシトシンは 5-メチルシトシン（5-methylcytosine; 5mC）になる^[21]。図 1 - 6 にシトシンのメチル化反応を示す。

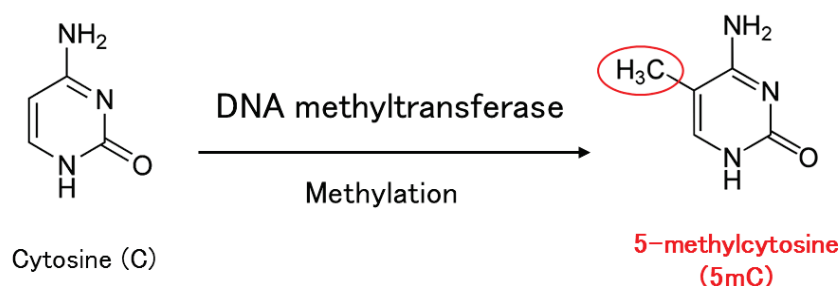


図 1 - 6 シトシンのメチル化

哺乳類のゲノム中における CpG 部位のメチル化は，レトロトランスポゾンや遺伝子間領域，さらに大部分の遺伝子の転写領域において行われており，哺乳類のゲノムでは全 CpG 部位の約 80%がメチル化されていることがわかっている^[22]。一方，およそ 70%の遺伝子のプロモーター領域（遺伝子の転写を開始する部位の上流領域）の周辺に見つかる CpG アイランド（シトシンとグアニンに富んだ 1000 base (1 kb) ほどの領域）中の CpG 配列は基本的に転写の有無に関係なくほぼメチル化していない^[23]。また，CpG アイランドに隣接した CpG 密度の低いおよそ 2 kb 以内の領域は CpG アイランドショアと呼ばれ，異なる組織間やがん細胞と正常細胞の間^[24]，造血前駆細胞の分化の過程^[25]，または iPS 細胞とその元になった線維芽細胞の間^[26]でメチル化を比較したときに高頻度で差が生じていることがわかっている。

生体内における DNA メチル化の役割

ある遺伝子のプロモーター領域中の CpG 配列のシトシンがメチル化されると，その遺伝子の転写活性は抑制される^[27]。DNA メチル化による転写の抑制は以下の 2 つの機構が存在していることが明らかになっている。1 つ目は，転写因子の認識配列部位のシトシンがメチル化されることによって，転写因子の結合阻害の結果として起こる転写の抑制である。2 つ目は，メチル化した DNA に対して

特異的に結合するメチル化 DNA 結合タンパク質による転写の抑制である。このメチル化 DNA 結合タンパク質は、ヒストン脱アセチル化酵素複合体やクロマチンリモデリング複合体、さらにヒストンメチル化酵素と結合することが報告されており、メチル化された DNA にこれらの複合体を誘導することによって、転写を抑制していることが考えられている^[28]。

シトシンのメチル化機構

生体内には、DNA 中のシトシンを新たにメチル化する *de novo* 型メチル化（新規メチル化）活性と、DNA 複製時に生じる片側の鎖のみがメチル化された（ヘミメチル化）状態を解消する維持型メチル化活性の 2 種類のメチル化活性が存在する^[21]。DNA メチル化模様はこの 2 種類のメチル化活性によって厳密に制御されており、DNA メチル化による遺伝子発現の制御に異常が生じると、さまざまな疾患の原因になることが明らかになっている^[29]。

DNA のメチル化を触媒する酵素として、DNA メチル基転移酵素（DNA methyltransferase; Dnmt）が知られている。哺乳類では、*de novo* 型メチル化の活性を担う酵素として Dnmt3a と Dnmt3b が同定されており、これらの Dnmt は非メチル化 DNA やヘミメチル化 DNA に対して同等なメチル化活性を示す。一方、DNA が複製される際、新しく作られた DNA 鎖（娘鎖）中の全てのシトシンはメチル化しておらず、娘鎖の生成後に複製の鋳型となった DNA のメチル化模様を Dnmt が認識して娘鎖のメチル化を行う。このような DNA 複製における維持型メチル化活性を担う酵素としては Dnmt1 が同定されており、Dnmt1 は非メチル化 DNA に比べてヘミメチル DNA に対するメチル化活性が高く、生体内の DNA のメチル化模様の維持に必須であることが明らかとなっている。以下に *de novo* 型メチル化と維持型メチル化の詳細を簡潔に述べる。

***de novo* 型メチル化機構による DNA のメチル化**

細胞が分化していく過程において、DNA 中ではその分化方向に応じた新しいメチル化模様を書き込まれる。このときの DNA のメチル化は、主に Dnmt3a および Dnmt3b によって行われる。哺乳類では初期胚発生と生殖細胞形成の時期において DNA のメチル化模様の大きな変化が起こっており、生殖細胞の形成過程ではゲノム全体のメチル化がいったん消去され、その後に新たなメチル化模様を書き込まれる^[30]。また、受精直後から着床するまでの間でもゲノム全体の脱メチル化が起こり、着床後に新たな DNA のメチル化が行われている^[31]。

維持型メチル化機構による DNA のメチル化

de novo 型メチル化機構によって行われた DNA メチル化のメチル化模様は、DNA が複製する際に維持型の DNA メチル基転移酵素である Dnmt1 により正確に受け継がれていき、生体内において約 99%の信頼度で受け継がれる^[32]。また、Dnmt3a および Dnmt3b の両方を持たないマウス ES 細胞は培養していくとメチル化したシトシンの量が徐々に減少していくことから、*de novo* 型の DNA メチル基転移酵素も DNA のメチル化模様の維持に働いていると考えられている^[33]。

がんと DNA メチル化の関係

がん組織は一つのがん細胞が増殖することで形成されたがん細胞集団であるため、組織中の細胞の種類によって異なる DNA の修飾パターンを持っており、エピジェネティック（DNA の塩基配列に依存しない遺伝子の発現制御機構）な解析および診断に適していると考えられている。がん細胞中の特徴的なエピジェネティック修飾の異常として、プロモーターなどに含まれる CpG アイランドの過剰なメチル化、およびゲノム全体の低メチル化が報告されている^{[34],[35]}。CpG アイランドの過剰なメチル化では、がん抑制遺伝子のプロモーター中の CpG 部位にあるシトシンがメチル化されることによって、がん抑制遺伝子が不活性化することでがんが発症する。一方、ゲノム全体の低メチル化では、ゲノム内の反復配列における低メチル化が染色体異常を誘発することで、がんを発症させることが考えられている。特に近年では、がんを発症すると非常に多くの CpG アイランドがメチル化されていることが明らかになっており^[36]、これらの多くはがん化に付随して起こったメチル化も含まれるものの、がんに特異的なメチル化異常であればがんの検出は可能であるため、がん診断に用いることができると考えられている。

がん診断において、DNA のメチル化異常を用いた診断は臨床試験の段階に入ってきている^[37]。DNA メチル化異常は突然変異と違って決まった遺伝子に起こりやすいこと、DNA は RNA よりも安定な分子であること、メチル化によって付加されたメチル基は非常に安定な修飾であることから、DNA メチル化解析はがん細胞の検出に適しているとされる。また、DNA メチル化解析を行うことで、ある部位の遺伝子の発現抑制の予測や、多数の遺伝子発現の異常を検出できることが考えられている。これらの特性を活かすことによって、DNA メチル化解析は、がんに対する薬剤の反応予測やがん患者の予後診断にも利用することが可能であり^[38]、健常な組織中に蓄積した異常な DNA メチル化の定量を行うことによって、発がんリスクの予測への利用も期待されている^[39]。

DNA の脱メチル化

DNA メチル化は、遺伝子の発現を制御するうえで必要不可欠な修飾である。DNA のメチル化は DNA メチル基転移酵素が CpG 配列内のシトシンにメチル基を付加することによって行われる。一方で、一度メチル化した DNA 中のメチル基を除去（脱メチル化）するための機構にはさまざまな説が提唱されており、完全には解明されていないものの、これまでに受動的な脱メチル化機構と能動的な脱メチル化機構が存在することが報告されている^[40]。受動的な脱メチル化では DNA の複製過程で維持メチル化活性が抑制され、娘鎖 DNA にシトシンが取り込まれてメチル化したシトシン (5mC) の量が減少することで行われる。一方、能動的な脱メチル化は DNA の複製に依存しない脱メチル化機構であり、始原生殖細胞のゲノム全体などにおいて観察されている^[41]。

メチル化シトシンの脱メチル化機構

DNA 中の 5-メチルシトシン (5mC) は ten-eleven-translocation (Tet) タンパク質によって酸化され、5-ヒドロキシメチルシトシン (5-hydroxymethylcytosine; 5hmC) になる^[40]。図 1 - 7 にシトシンから 5hmC までの合成の過程を示す。

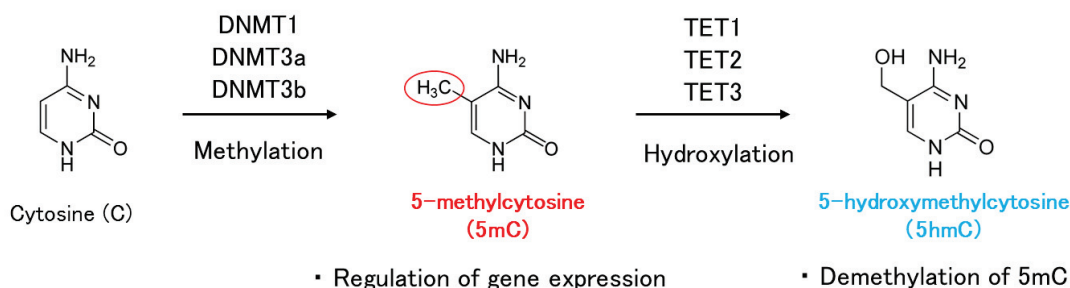


図 1 - 7 5hmC の合成過程

5hmC は 5mC の脱メチル化に大きく関係していることがわかっている^[40]。5hmC は 1953 年にバクテリオファージ中ではじめて同定され、1972 年には哺乳類のゲノム DNA 中にも存在することが報告された^[42]。また、5hmC はマウスの ES 細胞中に多く存在するが、細胞が分化すると著しく 5hmC のレベルが減少することも報告された^[43]。現在、ゲノム DNA 中の 5hmC は以下の二つの点から DNA の脱メチル化に関与していることが考えられている。

1. DNA 複製時の脱メチル化

5mC を認識して結合するメチル化 CpG 結合タンパク質は、5hmC を認識できないことが知られている。また、鋳型鎖側に 5hmC が存在する場合、維持メチル化酵素である Dnmt1 は娘鎖側にメチル化模様を効率よく保存することができな

いため、DNA 複製の際に 5hmC が鋳型鎖側に存在することによって、DNA 中の 5mC の数が減少することが考えられている。

2. 連続的な酸化と塩基修復による脱メチル化

Tet タンパク質は、5mC を酸化して得られた 5hmC をさらに酸化することで、5-ホルミルシトシン (5-formylcytosine; 5fC) と、5-カルボキシシトシン (5-carboxycytosine; 5caC) を合成する能力を持つ。これらの 5mC の酸化産物の含量を LC-MS/MS 解析によって定量すると、マウス ES 細胞中のすべてのシトシンのうち、5mC は約 3%、5hmC は 0.1%、5fC は 0.002%、5caC は 0.0003%ほど存在することが報告されている^[44]。DNA 中の 5fC および 5caC は、チミン DNA グリコシラーゼ (Thymine DNA Glycosylase; TDG) によって DNA 中から取り除かれることが証明されており、取り除かれた 5fC や 5caC の場所に形成される脱塩基部位を処理するために塩基除去修復経路が利用される^[45]。

メチル化 DNA の検出法

現在、ゲノム中のシトシンのメチル化を解析する技術は、①化学的反応性 (バイサルファイト処理) を利用した方法、②制限酵素を利用した方法、③5mC を特異的に認識する抗体やタンパク質などを用いる方法の 3 つに大別することができる^[46]。近年ではこれらのメチル化解析法を組み合わせたさまざまなメチル化 DNA の検出法が開発されており、ここでは上記のメチル化 DNA 解析技術についてそれぞれ簡潔に説明する。また、抗メチル化シトシン抗体をメチル化の識別として用いたメチル化 DNA の検出法をメチル化 DNA の検出法の一例として紹介する。

①バイサルファイト処理 (Bisulfite treatment) による塩基変換

DNA を重亜硫酸ナトリウムで処理することによって、非メチル化シトシンのみをウラシルに変換し、メチル化シトシンは別の塩基に変換させない手法をバイサルファイト法という。この手法は任意の CpG 部位のメチル化を解析することが可能であり、また CpG 密度が低い領域も解析できるため、特定の領域中のメチル化解析に優れている。近年では、マイクロアレイや次世代シーケンス法と組み合わせることで、ゲノム網羅的なメチル化レベルの解析が行われている。

②メチル化感受性制限酵素 (Methylation-sensitive restriction enzyme) による切断

制限酵素の中には CpG 部位を認識配列に含むものがあり、同じ認識配列でもメチル化されている部位は切断しない酵素がメチル化解析に利用されている。

この酵素を用いて特定の部位について切断された DNA 量と切断されていない DNA 量をサザンブロットや定量 PCR で測定することでメチル化の解析を行う。

③抗メチル化シトシン抗体やメチル化 DNA 結合タンパク質の結合

抗メチル化シトシン抗体（抗 5mC 抗体）とは、5mC を特異的に認識して結合する抗体である。抗 5mC 抗体は十分な感度と特異性を示し、メチル化 DNA の回収および濃縮に利用されている。抗 5mC 抗体の欠点として、2 本鎖中で塩基対を形成している 5mC は抗体が認識しないため 2 本鎖 DNA は 1 本鎖に変性させる必要があること、また、1 本鎖中に 5mC が多く存在すれば抗体の結合する確率が高くなるため、検出感度が CpG 密度に依存することが挙げられる。一方、メチル化 CpG 部位に高い親和性を示すタンパク質は、メチル化 DNA 結合領域（Methylated DNA binding domain; MBD）という領域を持っており、DNA 中のメチル化部位を認識して不活性なクロマチン構造を形成させる役割があるとされる。MBD は抗体と同様、メチル化 DNA を回収および濃縮する目的として使用されるが、一本鎖に変性させなくても DNA に結合させることが可能である。

抗メチルシトシン抗体を用いたメチル化の識別

一般的に、抗メチル化シトシン抗体をメチル化 DNA の検出に用いた場合、その抗体は免疫沈降によるメチル化 DNA 断片の回収または濃縮を行う目的で使われる。一方で、免疫沈降を行わずに、シトシンとメチル化シトシンを識別するために抗メチル化シトシン抗体を使用する例も報告されている^[47]。この検出法では、標的メチル化 DNA 中の検出したい部位のメチル化シトシンとは塩基対を形成しないようなプローブ DNA を設計し、標的メチル化 DNA と二重鎖を形成させている。標的メチル化 DNA 中の塩基対を形成していないメチル化シトシンに抗メチル化シトシン抗体を結合させた後、表面プラズモン共鳴分析を行うことで特定の部位のメチル化シトシンを検出する。塩基対を形成しているメチル化シトシンには抗体が結合しないため、部位特異性の高いメチル化 DNA の検出が可能であることがこの検出法の特徴として挙げられる。

メチル化 DNA の検出では、上記のメチル化 DNA 解析技術と、一般的な DNA の検出法を組み合わせで行う。例えば、バイサルファイト法とシーケンシングを組み合わせたバイサルファイトシーケンシング（Bisulfite sequencing）や、抗メチル化シトシン抗体による免疫沈降（Methylated DNA immunoprecipitation; MeDIP）とシーケンサーを組み合わせた MeDIP-seq などが主要な検出法として存在する。本章では、数多く存在するメチル化 DNA 検出法のうち、代表的なメチル化 DNA の検出法の利点および欠点を表 1-2 にまとめる。

表 1 - 2 メチル化 DNA 検出法の利点と欠点^{[46], [47]}

メチル化 DNA 検出法	利点	欠点
Bisulfite sequencing ^[46]	個々の CpG 部位のメチル化解析が可能	PCR の増幅に高いコスト・煩雑な操作・長い時間が必要
Methylation-specific PCR (MSP) ^[46]	低コスト, 短い検出時間, 単純な操作	PCR でのコンタミネーションや誤検出をしやすい
Combined bisulfite restriction analysis (COBRA) ^[46]	低コスト	定量的な測定には使用不可能, 酵素による切断箇所に依存
MeDIP combined with high-throughput sequencing (MeDIP-seq) ^[46]	広範囲な配列中の平均メチル化レベルを迅速かつ特異的に測定可能	抗体の品質および特異性に依存, 1 本鎖 DNA のみ測定可能
抗 5mC 抗体をメチル化の識別に用いた検出法 ^[47]	部位特異性の高いメチル化の検出が可能	サンプルを含んだ溶液の熱変性および冷却が必要

以下に表 1 - 2 中の検出法の簡単な詳細を述べる。**Bisulfite sequencing** : サンプルのバイサルファイト処理を行ったあと, シーケンシングを行うことで処理前後の塩基の変化を検出する。**Methylation-specific PCR (MSP)** : バイサルファイト処理後に, 塩基の変換前または変換後でそれぞれ特異的に結合するプライマーを用いて PCR による増幅を行う。**Combined bisulfite restriction analysis (COBRA)** : バイサルファイト処理後に PCR 増幅を行い, 塩基が変化した箇所を制限酵素で特異的に切断して測定する。**MeDIP combined with high-throughput sequencing (MeDIP-seq)** : 断片化した DNA に抗メチル化シトシン抗体を結合させて免疫沈降を行った後, シーケンシングによる測定を行う。

一般的にバイサルファイト処理を組み合わせた検出法は, 長い処理時間 (十数時間~数十時間) が必要であり, また, バイサルファイト処理を行うことでサンプル中の 99% の DNA が分解されることが報告されている^[48]。そのため, バイサルファイト法を用いたメチル化 DNA の検出法は, 簡便な診断には向いていないことが考えられる。一方, メチル化感受性制限酵素を用いた検出法は, 検出感度は優れているものの, 高価な酵素が必要であることや, 検出できる配列が制限酵素の認識部位に依存することが欠点として挙げられる。メチル化 DNA 免疫沈降法では, DNA の網羅的な解析には有望であるが, 検出には煩雑な操作が必要であるため, 診断には適さないことが考えられる。本研究では, 抗メチル化シトシン抗体をメチル化の識別に用いることで, 迅速かつ簡便なメチル化 DNA の検出を試みた。

1.1.3 マイクロ流体チップ

マイクロテクノロジーはコンピューターなど電気・電子分野のみならず、機械や流体の分野まで浸透してきており、さまざまな分野において小型化が試みられている。近年では分析装置のマイクロ化も行われており、特に分析化学におけるマイクロ流体チップの発展はめざましく、この分野は μ TAS (Micro-Total Analysis System) と呼ばれている。マイクロ流体チップは幅および高さが数 μm ～ 数百 μm のマイクロ流路内で起こる現象を利用したデバイスであり、一般的に以下の特徴を示す。

- ・装置の一部または全体が小型化できる
- ・効率的な溶液の混合が行える
- ・溶液の温度制御が効率よく行える
- ・滞留時間を短くできる
- ・界面での反応を効率よく行える

上記の特徴を持つマイクロ流体チップは、時間や場所を選ばない診断（その場診断）に利用できる技術として注目されている^[49]。近年では、マイクロ流体チップを SPR（表面プラズモン共鳴）、熱レンズ顕微鏡などの計測法と組み合わせることで、より効果的なデバイスの実現が期待されている^{[50],[51]}。また、マイクロ流体チップの材料に安価なポリマー：polycarbonate^[52], polydimethylsiloxane^[53]を用いることで、チップを使い捨てにすることも可能になった。その結果、試料の汚染（コンタミネーション）などの問題を簡単に解決できることから、その場診断での標準的なツールになることが期待されている。

従来の核酸検出法は、固定されている相補なプローブ DNA のところまで標的の核酸が拡散によって移動し、2 本鎖を形成する過程が必要である。しかし、DNA やタンパク質のような大きさの分子は拡散に多くの時間（例えばミリメートルスケールの距離を移動するだけでも数時間から数十時間）が必要になるため、従来の検出法では数時間から数日の反応時間が必要である。一方、マイクロ流路内では物質の拡散距離が格段に小さくなるので、マイクロ流体チップを用いることで反応時間を数分から数十分まで大幅に短縮することができる。

以下にマイクロスケール空間における流体の性質を述べる。一般に、流れのレイノルズ数 (Re) が小さいと液体の流れは層流になりやすいとされる。レイノルズ数は慣性力と粘性力の比で、次式で表される^[54]。

$$\text{Re} = \frac{Du\rho}{\mu}$$

ここで、 U は流速 (ms^{-1})、 D はマイクロ流路の代表寸法 (m)、 ρ は密度 (kgm^{-3})、 μ は粘度 ($\text{kgm}^{-1}\text{s}^{-1}$) である。一般に、レイノルズ数が 2000 以下では層流支配となり、乱流は起こらない。本研究で用いている自律駆動マイクロ流体チップ（流路幅：100

μm, 流路高さ: 25 μm) に水を流速 2 mm/s¹ で送液した場合, レイノルズ数は 0.2 となり, 流れは層流となる。

本研究では, 迅速に miRNA やメチル化 DNA を検出するために, 外部ポンプを使わずにマイクロ流路に溶液を引き込むことができる「自律駆動マイクロ流体チップ」を採用した。

自律駆動マイクロ流体チップ

一般的にマイクロ流体チップを作製する場合, 原料となる材質としてはガラスや石英の他, Polymethylmethacrylate (PMMA) や polydimethylsiloxane (PDMS), polycarbonate (PC) のようなポリマーも使用されている。これらのポリマー材質のチップは, 安価・簡便・短時間で製造できるといった利点があり, さまざまなデバイスの材料として用いられている。本研究では, 原材料としてガラスと PDMS を用いて自律駆動マイクロ流体チップを作製した。PDMS は上記のポリマーとしての特徴の他に以下の特徴を示す。

表 1-3 PDMS 製マイクロ流体チップの特徴

長所	短所
<ul style="list-style-type: none">・光透過性に優れており, 蛍光検出に都合がよい・湿気と温度に安定・柔軟な構造・微細加工が容易・ガス溶解性を利用した自律駆動送液が可能・可逆および非可逆的な接合が容易・生体試料に無害・安価で大量生産が可能	<ul style="list-style-type: none">・疎水性表面のため, タンパク質などの生体試料が非特異吸着しやすい・有機溶媒に弱いため, 反応系に制限がある・金属と比べて脆い

本研究は, マイクロ流路内に溶液を送り込む技術として, 理化学研究所の前田バイオ工学研究室が開発した送液法である「自律駆動送液法」を用いている^[55]。これは PDMS の特徴のひとつであるガス溶解性^[56]を利用したもので, シリンジポンプなどの外部動力や電源を使わずに流路内への送液が可能となる。PDMS のガス溶解度は液体と同じで, ヘンリーの法則に従う。PDMS 中のガス溶解量は環

境のガス分圧に比例し、大気中では PDMS 1 体積当たり標準状態換算で約 0.1 体積の空気が溶け込んでいる。本研究で用いた自律駆動送液法は、あらかじめ脱気した自律駆動マイクロ流体チップを大気中に取り出すことで、チップを構成している PDMS が周囲の空気を取り込む現象を利用して送液を行っている。自律駆動送液法の原理を図 1 - 8 に示す。

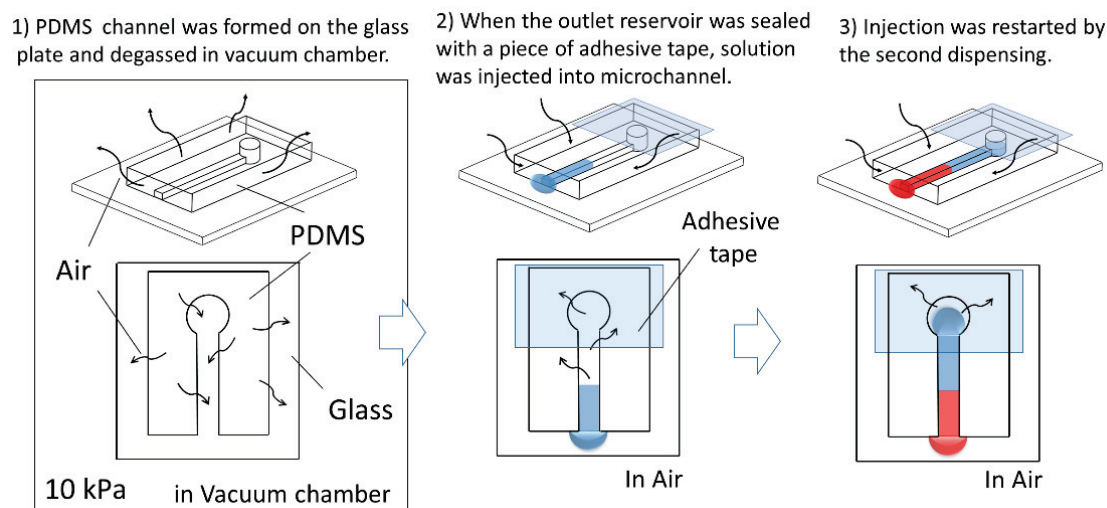


図 1 - 8 自律駆動マイクロ流体チップの送液原理^[55]

以下に自律駆動送液の詳細について述べる。PDMS を原材料としたマイクロ流体チップを真空チャンバー内に入れ、減圧下 (10 kPa) で 1 時間ほど放置すると、PDMS 内に溶け込んでいた空気が脱気される。脱気したチップを再び大気中に戻すと、脱気された PDMS が大気圧での状態に戻ろうとして、周囲の空気を徐々に取り込んでいく。一方、マイクロ流路内は空間であるので、大気中に戻すと同時に空気 (水色) で満たされる。その後、マイクロ流路の出口部一帯にメンディングテープを貼り、入り口部に液を滴下する。すると流路内に入り込んでいた空気は流路内に閉じ込められた状態になる。また、PDMS は徐々に周囲の空気を内部に溶解している状態にあり、外部の空気だけではなく、流路内に閉じ込められた空気も溶解する。閉鎖された流路内の空気が PDMS に溶解していくほど流路内が減圧されるので、入り口部に滴下した液が流路中に入り込むようになる。この現象を言い換えると、脱気状態にある PDMS 自身が送液のための動力源の役割を果たしており、マイクロ流体チップ自身に送液のためのエネルギーを蓄えていると考えることができる。

第一の液を入り口部に滴下すると、上記の原理で液が流路中に入りこんでいくが、入口の液がすべて流路内へ入ると液の流れが一時的に停止する。これは、

界面での表面張力が流路中の引圧に勝っているためである。液を一時的に停止させることによる利点は、次に入りに口に滴下した液と流路内の液の間に空気が入り込まないことである。マイクロ流体チップの実験において、マイクロ流路内で液と液の間に空気が入り込んでしまうと、空気の層が液の流れ道を狭めるため、液の流れが極端に遅くなる。また、流路内が乾くことによって、蛍光色素の機能低下や核酸またはタンパク質の高次構造が損なわれてしまうことも考えられる。自律駆動送液は液と液の間に空気を入れずに連続的な送液が可能であるため、上記の問題は生じないことが考えられる。

1.1.4 蛍光増幅剤による流路内での蛍光増幅

マイクロ流路中における既存の蛍光増幅法として、交互積層法および層流樹状増幅法が報告されている^[57]。これらはビオチンとストレプトアビジンによる連続的な結合を利用した蛍光増幅法である。ストレプトアビジンとは、細菌由来のアビジン類似タンパク質であり、ビオチンと特異的に結合する4つのサブユニットをもっている。ストレプトアビジンは中性では電荷を持たず、炭水化物を含まないことから、アビジンと比べ非特異吸着が抑えられるという利点がある。また、ビオチンはストレプトアビジンの各サブユニットに1つずつ結合することが知られており、その結合親和力は $K_d = 10^{-15} \text{ M}$ と桁違いに強い（抗原抗体反応の親和力は $K_d = 10^{-8} \sim 10^{-12} \text{ M}$ ）ため、ほぼ不可逆的な結合を形成する。そのため、免疫や細胞膜の研究などの生化学の分野において、ビオチンとストレプトアビジンの結合は広く用いられている。ビオチンとストレプトアビジンを用いてシグナルを増幅させる方法は、標的物質を含んだ反応に関わる全ての物質が基板に捕捉されるので、ビオチン標識部位から直接増幅したシグナルを検出可能である。以下に交互積層増幅法および層流樹状増幅法の詳細を簡潔に述べる。

交互積層法 (Layer-by-layer method; LBL 法)

交互積層法 (Layer-by-layer method; LBL 法) は、I字型流路を持つマイクロ流体チップまたはマイクロプレート中で行う蛍光増幅法である^{[57], [58]}。マイクロ流体チップでこの増幅を行う場合、蛍光増幅剤として FITC 修飾ストレプトアビジン (FITC-labeled streptavidin; F-SA) とビオチン標識ストレプトアビジン抗体 (Biotinylated anti-streptavidin antibody; B-anti-SA) を1種類ずつ交互に送液する。この操作を繰り返すことで、固相表面で2種類の蛍光増幅剤が連続的に供給されるためネットワーク形成反応が進行し、樹状構造を形成するためシグナルが増幅する。図1-9にLBL法の原理を図示した。

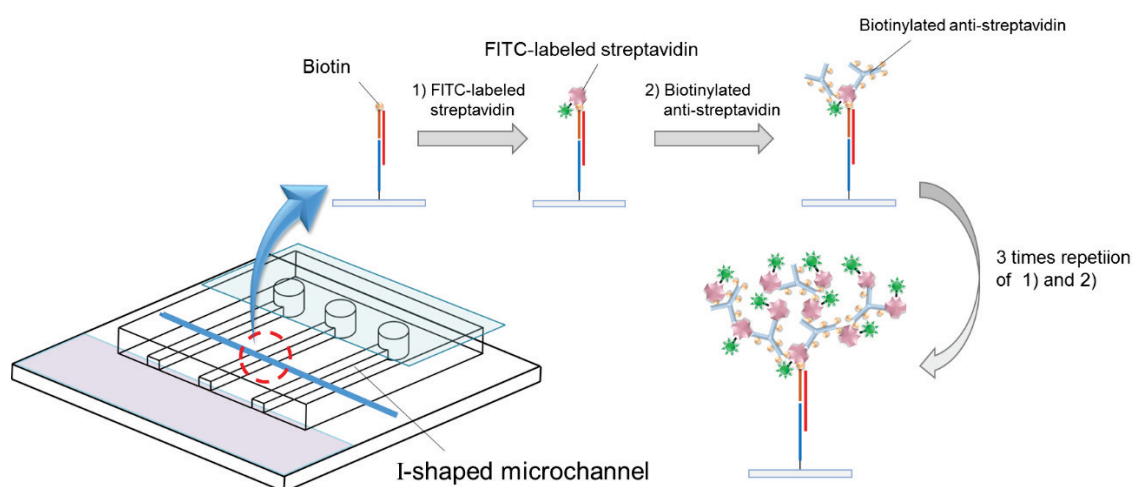


図 1 - 9 交互積層法（LBL 法）の原理^[57]

蛍光増幅剤による樹状構造の形成は、蛍光シグナルを大幅に増幅するため、標的物質を高感度に検出することが可能である。しかし、LBL 法で樹状構造を形成させる場合は、2 種類の蛍光増幅剤を交互に送液する操作を繰り返す必要があり、操作が非常に煩雑になるという欠点が存在する。

層流樹状増幅法（Laminar Flow-assisted Dendritic Amplification; LFDA）

LBL 法の欠点である煩雑な操作を減らすため、Y 字型マイクロ流体チップの層流を用いた層流樹状増幅法（Laminar Flow-assisted Dendritic Amplification; LFDA）が開発された^[57]。2 つの溶液を Y 字型流路の左右の入口から同時に送液すると、マイクロ流路内でそれぞれの溶液が層流（液体の流線が常に流路軸と平行である流れ）で流れる。流路が合流すると、2 液の境界層で FITC 修飾されたストレプトアビジン（F-SA）とビオチン標識ストレプトアビジン抗体（B-anti-SA）の間におけるビオチン-アビジン架橋反応が連続的に起こり、シグナルを増幅させる。Y 字型流路を用いた LFDA の原理を図 1 - 10 に図示した。

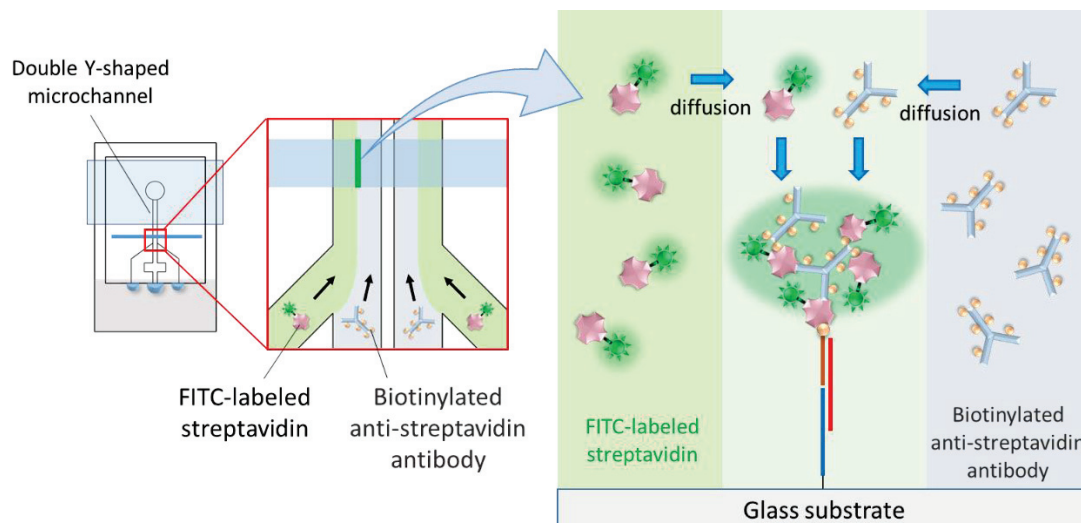


図 1 - 10 層流樹状増幅法 (LFDA) の原理

LFDA を行った際に 2 液の境界層でのみ反応が起こるのは、境界層内部での分子拡散による混合のためである。Y 字型流路の入口から左右に液を同時に流すと、流路が合流した先で 2 液は線形の層流を形成する (図 1 - 10 左)。層流間の境界層内部で一定の距離に渡って分子拡散による混合が起こるため、この過程において基板上の一部には F-SA と B-anti-SA が連続的に供給されてネットワーク形成反応が進行する (図 1 - 10 右)。その結果、シグナルが増幅される。

自律駆動マイクロ流体チップと LFDA を使用することで、これまでにタンパク質^[57]、DNA 中の SNP (一塩基多型)^[59]、miRNA^[60]が短時間かつ高感度に検出されてきた。図 1 - 11 に各標的物質の検出の概略図を示す。タンパク質の検出では、自律駆動マイクロ流体チップにキャプチャー抗体、ブロッキング剤、抗原、ビオチン標識抗体を送液し、抗原-抗体複合体を形成させる (図 1 - 11 a 中 1～2)。次に、層流を用いて F-SA と B-anti-SA を同時に送液することによって LFDA を行い、一つのキャプチャー抗体に結合する蛍光色素の絶対量を増やして蛍光強度が増幅される (図 1 - 11 a 中 3～6)。先行研究では CRP (炎症反応マーカー) を検出対象とし、LFDA を用いたイムノアッセイでは検出限界が 17 pg/mL と、増幅しない場合と比べ検出限界を 3 桁下げること成功している^[57]。DNA 中の一塩基多型 (SNP) の検出では、2 種類のプローブ DNA を用いて 56 塩基の標的 DNA 中の SNP がサンドイッチ法によって検出された (図 1 - 11 b)^[59]。また、miRNA も同じくサンドイッチ法によって検出を試みたところ、miRNA の一種である miR-21 が迅速かつ高感度に検出された (図 1 - 11 c)^[60]。

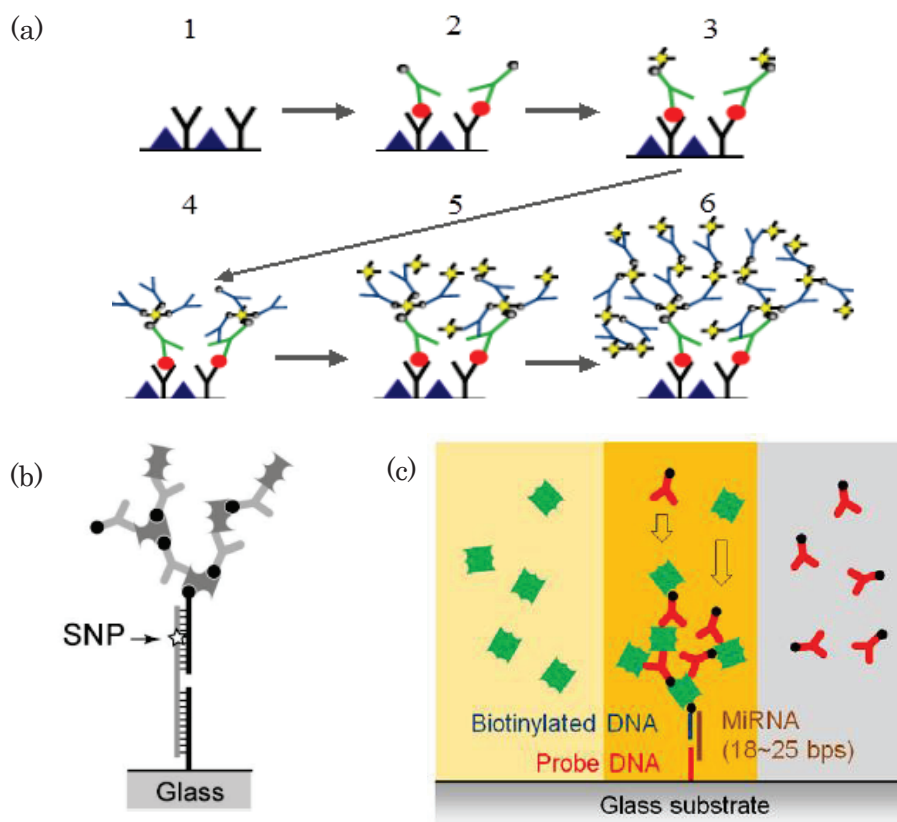


図 1 - 11 LFDA を使用した標的物質の検出。この図では LFDA を用いた(a) タンパク質^[57], (b) DNA 中の SNP^[59], (c) miRNA^[60]の検出の概略図を示した。

1.2 研究目的と本論文の概要

本研究は、がん等の疾患を早期に診断するため、血液などの生体試料中の核酸をマイクロ流体チップによって簡便・迅速・高感度に検出できる手法の開発を目標とした。先行研究では、チップ内への送液に外部ポンプが不要な「自律駆動マイクロ流体チップ」と、マイクロ流路内の蛍光増幅法である「層流樹状増幅法」を用いることで、合成miRNAを迅速かつ高感度に検出することが行われてきた。

本研究の目的は、自律駆動マイクロ流体チップを用いた核酸バイオマーカーの検出法の発展および実用化のため、自律駆動マイクロ流体チップによるmiRNA 検出の特異性の評価と、自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA 検出法を応用したメチル化 DNA の検出を行った。

本論文では、第 1 章は DNA および RNA の概要、核酸バイオマーカーである miRNA およびメチル化 DNA の特徴と検出の意義、マイクロ流体チップの技術およびシグナルの増幅法、さらに抗体について概観し、本研究の目的を述べた。第 2 章は、miRNA およびメチル化 DNA の検出に用いる自律駆動マイクロ流体

チップを作製するための PDMS マイクロチップ, および DNA 固定基板の作製法について述べる。第 3 章は, 自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA の検出法について説明し, 同手法による miRNA 検出の特異性の評価について述べる。第 4 章は, 自律駆動マイクロ流体チップを用いる miRNA の検出法を応用したメチル化 DNA の検出法の説明, およびその結果について述べる。第 5 章では本論文の結論をまとめる。

参考文献

- [1] H.Hart, L.E.Craigne, D.J.Hart 著, 秋葉欣哉, 奥彬訳 ハート 基礎有機化学, 培風館 (東京), 2004, pp.572, 580-582.
- [2] J. D. Watson and F. H. Crick, *Nature*, **1953**, 171, 737–738.
- [3] 小宮健, 瀧ノ上正浩, 田中文昭, 浜田省吾, 村田智 著, ナチュラルコンピューティング・シリーズ 第 2 巻 DNA ナノエンジニアリング, 近代科学社 (東京), 2011, pp. 12-21
- [4] S. Cai, C. Lau, and J. Lu, Sequence-specific detection of short-length DNA via template-dependent surface-hybridization events, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 7178.
- [5] F. H. C. Crick, On protein synthesis. Symp. Soc. Exp. Biol., 1958, **12**, 138–163.
- [6] N. Brockdorff, *et al.*, The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus, *Cell*, 1992, **71**, 515–526.
- [7] J. S. Mattick, Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity, *EMBO Rep.*, 2001, **2**, 986–991.
- [8] J. A. Ludwig and J. N. Weinstein, Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection., *Nat. Rev. Cancer*, 2005, **5**, 845–856.
- [9] H. Schwarzenbach, D. S. Hoon, and K. Pantel, Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer*, 2011, **11**, 426–437.
- [10] Biomarkers Definitions Working Group, Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework, *Clin Pharmacol Ther.*, 2001, **69**, 89-95.
- [11] S. Mukherji, M. Ebert, G. Zheng, J. S. Tsang, P. A. Sharp, *et al.*, MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression., *Nature Genetics*, 2011, **43**, 854–859.
- [12] N. Nohata, T. Hanazawa, T. Kinoshita, Y. Okamoto, and N. Seki, MicroRNAs function as tumor suppressors or oncogenes: aberrant expression of microRNAs in head and neck squamous cell carcinoma, *Auris Nasus Larynx*, 2013, **40**, 143-149.

- [13] A. Cimmino, *et al.*, miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2005, **102**, 13944–13949.
- [14] N. Kosaka, H. Iguchi, and T. Ochiya, Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis., *Cancer Sci.*, 2010, **101**, 2087–2092.
- [15] A. Git, *et al.*, Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA*, 2010, **16**, 991–1006.
- [16] K. Kang, *et al.*, A novel real-time PCR assay of microRNAs using S-Poly(T), a specific oligo(dT) reverse transcription primer with excellent sensitivity and specificity, *PLoS ONE*, 2012, **7**, e48536.
- [17] R. Q. Liang, *et al.*, An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, e17.
- [18] H. Arata, H. Komatsu, A. Han, K. Hosokawa and M. Maeda, Rapid microRNA detection using power-free microfluidic chip: coaxial stacking effect enhances the sandwich hybridization, *Analyst*, 2012, **137**, 3234–3237.
- [19] L. Zhang, D. Li, W. Meng, Q. Huang, Y. Su, L. Wang, S. Song, and C. Fan, Sequence-specific DNA detection by using biocatalyzed electrochemiluminescence and non-fouling surfaces, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **25**, 368–372.
- [20] B. N. Johnson, and R. Mutharasan, Biosensor-based microRNA detection: techniques, design, performance, and challenges, *Analyst*, 2014, **139**, 1576–1588.
- [21] Z. X. Chen, and A. D. Riggs, DNA methylation and demethylation in mammals, *J Biol Chem*, 2011, **286**, 18347–18353.
- [22] A. Rezin, and A. D. Riggs, DNA methylation and gene function, *Science*, 1980, **210**, 604–610.
- [23] A. M. Deaton, and A. Bird, CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.*, 2011, **25**, 1010–1022.
- [24] R. A. Irizarry, C. Ladd-Acosta, B. Wen, *et al.*, The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores, *Nat Genet*, 2009, **41**, 178–186.
- [25] H. Ji, L. I. Ehrlich, J. Seita, *et al.*, Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature*, 2010, **467**, 338–342.
- [26] A. Doi, I. H. Park, B. Wen, *et al.*, Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts, *Nat Genet*, 2009, **41**, 1350–1353.

- [27] P. A. Jones, and D. Takai, The role of DNA methylation in mammalian epigenetics, *Science*, 2001, **293**, 1068-1070.
- [28] R. Jaenisch, A. Bird, Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nat Genet*, 2003, **33**, 245–254.
- [29] K. D. Robertson, DNA methylation and human disease. *Nature Rev. Genet.*, 2005, **6**, 597–610.
- [30] H. Sasaki, and Y. Matsui, Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond, *Nat. Rev. Genet.*, 2008, **9**, 129–140.
- [31] K. Iqbal, S. G. Jin, G. P. Pfeifer, and P. E. Szabo, Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2011, **108**, 3642–3647.
- [32] A. Hermann, R. Goyal, and A. Jeltsch, The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 48350–48359.
- [33] T. Chen, Y. Ueda, J. E. Dodge, Z. Wang, and E. Li, Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b, *Mol. Cell. Biol.*, 2003, **23**, 5594–5605.
- [34] M. Toyota, N. Ahuja, H. Suzuki, F. Itoh, M. Ohe-Toyota, K. Imai, S. B. Baylin, and J. P. Issa, Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype, *Cancer Res.*, 1999, **59**, 5438–5442.
- [35] M. Cravo, R. Pinto, P. Fidalgo, P. Chaves, L. Gloria, C. Nobre-Leitao, and F. Costa Mira, Global DNA hypomethylation occurs in the early stages of intestinal type gastric carcinoma, *Gut*, 1996, **39**, 434–438.
- [36] M. Esteller, P. G. Corn, S. B. Baylin, and J. G. Herman, A gene hypermethylation profile of human cancer., *Cancer Res.*, 2001, **61**, 3225–3229.
- [37] Y. Delpu, P. Cordelier, W. C. Cho, and J. Torrisani, DNA methylation and cancer diagnosis., *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, **14**, 15029–15058.
- [38] M. Abe, *et al.*, CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas, *Cancer Res.*, 2005, **65**, 828-834.
- [39] T. Maekita, *et al.*, High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk, *Clin. Cancer Res.*, 2006, **12**, 989-995.
- [40] R. M. Kohli, and Y. Zhang, TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation., *Nature*, 2013, **502**, 472–479.
- [41] J. A. Hackett, *et al.*, Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine., *Science*, 2013, **339**, 448–452.

- [42] W. Penn, R. Suwalski, C. O'Riley, K. Bojanowski, and R. Yura, The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid, *Biochem J.*, 1972, **126**, 781.
- [43] M. Tahiliani, K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind, and A. Rao, Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1, *Science*, 2009, **324**, 930–935.
- [44] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He, and Y. Zhang, Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine, *Science*, 2011, **333**, 1300–1303.
- [45] A. Maiti, and A. C. Drohat, Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites, *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**, 35334–35338.
- [46] E. Olkhov-Mitsel, B. Bapat, Strategies for discovery and validation of methylated and hydroxymethylated DNA biomarkers, *Cancer Med.*, 2012, **1**, 237–260.
- [47] R. Kurita, H. Yanagisawa, K. Yoshioka, O. Niwa, Site-specific immunochemical methylation assessment from genome DNA utilizing a conformational difference between looped-out target and stacked-in nontarget methylcytosines, *Biosens. Bioelectron*, 2015, **70**, 366–371.
- [48] K. Tanaka, K. Tainaka, T. Umemoto, A. Nomura, and A. Okamoto, An Osmium–DNA Interstrand Complex: Application to Facile DNA Methylation Analysis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 14511.
- [49] A. J. Tüdös, G. A. J. Besselink and R. B. M. Schasfoort, Trends in miniaturized total analysis systems for point-of-care testing in clinical chemistry, *Lab Chip*, 2001, **1**, 83–95.
- [50] R. Kurita, Y. Yokota, S. Sato, F. Mizutani and O. Niwa, On-Chip Enzyme Immunoassay of a Cardiac Marker Using a Microfluidic Device Combined with a Portable Surface Plasmon Resonance System, *Anal Chem.*, 2006, **78**, 5525–5531.
- [51] S. Hiki, K. Mawatari, A. Hibara, M. Tokeshi and T. Kitamori, UV excitation thermal lens microscope for sensitive and nonlabeled detection of nonfluorescent molecules, *Anal Chem.*, 2006, **78**, 2859–2863.
- [52] M. B. Wabuye, S. M. Ford, W. Strykowski, J. Barrow, S. A. Soper, Single molecule detection of double - stranded DNA in poly(methylmethacrylate) and polycarbonate microfluidic devices, *Electrophoresis*, 2001, **22**, 3939–3948.
- [53] J. C. McDonald, and G. M. Whitesides, Poly (dimethylsiloxane) as a

- material for fabricating microfluidic devices, *Acc Chem Res.*, 2002, **35**, 491-499.
- [54] 草壁克己, 外輪健一郎 著, マイクロリアクタ入門 (千葉), 2008 年, pp. 46.
- [55] K. Hosokawa, K. Sato, N. Ichikawa, and M. Maeda, Power-free poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices for gold nanoparticle-based DNA analysis, *Lab Chip*, 2004, **4**, 563-569.
- [56] T. C. Merkel, et al., Gas sorption, diffusion, and permeation in poly(dimethylsiloxane), *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, 2000, **38**, 415-434.
- [57] K. Hosokawa, M. Omata, and M. Maeda, Immunoassay on a power-free microchip with laminar flow-assisted dendritic amplification, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 6000-6004.
- [58] Y. W. Chu, B. Y. Wang, H.-S. Lin, T.-Y. Lin, Y.-J. Hung, D. A. Engebretson, W. Lee and J. R. Carey, Layer by layer assembly of biotinylated protein networks for signal amplification, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 2397-2399.
- [59] K. Hosokawa, T. Sato, Y. Sato and M. Maeda, Rapid microRNA detection using power-free microfluidic chip: coaxial stacking effect enhances the sandwich hybridization, *Anal. Sci.*, 2010, **26**, 1053
- [60] H. Arata, H. Komatsu, K. Hosokawa, and M. Maeda, Rapid and sensitive microRNA detection with laminar flow-assisted dendritic amplification on power-free microfluidic chip, *PLoS ONE*, 2012, **7**, e48329.

第 2 章

自律駆動マイクロ流体チップの作製方法

2.1 緒言

自律駆動マイクロ流体チップは PDMS チップとガラス基板から構成される。ガラス基板にはマイクロ流路中で核酸を捕獲するためのプローブ DNA がバンド状に固定化されている。本章では、標的の核酸の検出を行うにあたり、PDMS チップの作製、プローブ DNA の固定化法、さらにそれらを組み合わせることで作製した自律駆動マイクロ流体チップの詳細について述べる。

2.2 自律駆動マイクロ流体チップのデザインおよび作製方法

2.2.1 PDMS チップのデザインおよび作製方法

PDMS チップのデザイン

図 2-1 に I 字型、図 2-2 に Y 字型の流路を持った自律駆動マイクロ流体チップの写真を示す。I 字型流路のマイクロ流体チップは直線の流路を持ち、流路の両末端に直径 3 mm の出口がある。Y 字型流路のマイクロ流体チップは二つの平行した Y 字型（ダブル Y 字型）流路からなり、二つの Y 字型流路には共通した直径 5 mm の出口がある。Y 字型流路のチップは、1 個の PDMS チップに 2 つのダブル Y 字型流路を持つため、1 枚のチップで 2 回の測定が可能である。PDMS チップの横幅は 30 mm、奥行きは 24 mm、高さは 2 mm として作製しており、また、流路のサイズは I 字型・ダブル Y 字型共に幅 100 μm 、高さ 25 μm として設計した。

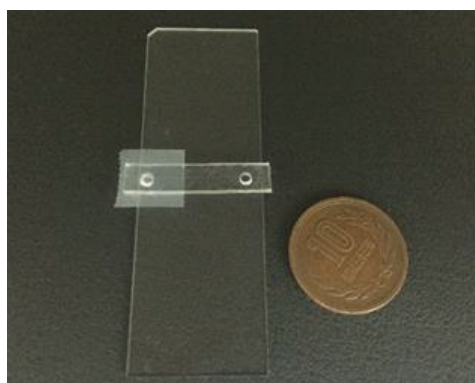


図 2-1 I 字型流路のチップ

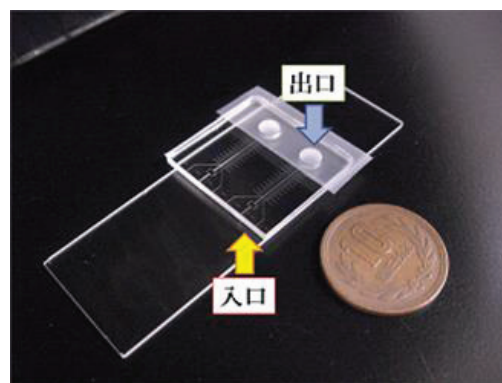


図 2-2 ダブル Y 字型流路のチップ

PDMS チップの作製

マイクロ流体チップの微細な流路内部に吸着したほこりなどは、溶液の流れを大きく変えるため反応系に多大な影響を及ぼすことが考えられる。流路の作製においては細心の注意を払う必要があるため、全ての作業は図 2 - 3 に示すクリーンルーム内で行った。クリーンルームはクラス 100 程度のもので、外界から隔離された部屋に設けている。



図 2 - 3 クリーンルーム

実験材料

- | | |
|----------------------------|---------------|
| ・シリコン基板 | (大阪特殊合金) |
| ・ネガティブフォトレジスト (SU8-25) | (MicroChem) |
| ・SU-8 現像液 | (MicroChem) |
| ・PDMS (Sylgard 184) とその硬化剤 | (Dow Corning) |
| ・ガラス基板 | (松浪硝子工業) |
| ・2-propanol (IPA) | (和光純薬工業) |
| ・脱イオン水 (Mill-Q SP system) | (メルクミリポア) |

PDMS に代表されるシリコーンゴム系エラストマーを型取りすることによってマイクロ構造を作製する方法は、従来のシリコンやガラスを用いた従来のリソグラフィーと対比して、ソフトグラフィーと称されている。本研究では、ソフトグラフィー法を用いて、PDMS チップを作製した。PDMS チップの作製手順を以下に示す^[1]。

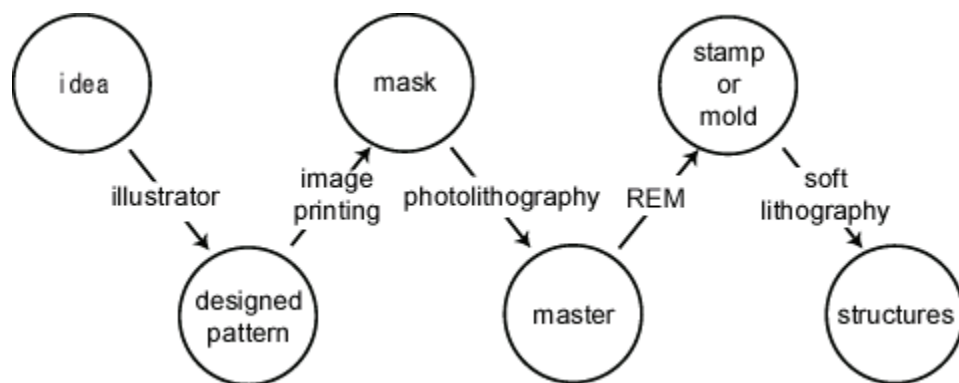


図 2 - 4 PDMS チップの作製手順

鋳型の作製

- ① 3.2 cm 角に切ったシリコン基板を IPA 及び脱イオン水でそれぞれ超音波洗浄 (1 min) し、恒温器 (ASAHI, AWC-2) を用いてシリコン基板を 140°C で乾燥させた (10 min)。その後、プラズマエッチング装置 (Samco International, RIE-10NR) を用いて O₂ プラズマ洗浄 (O₂=20 sccm, 20 Pa, 150 W, 10 min) を行い、シリコン基板の表面を洗浄した。
- ② シリコン基板上に、ネガティブフォトレジストである SU8-25 をスピンコーター (MIKASA, 11-1-DX2) で均一に塗布した (図 2-5 a)。スピンコート of の時間設定を以下に示す。(slope 5 sec, 500 rpm 10 sec, slope 10 sec, 2500 rpm 15 sec, slope 5 sec)
- ③ 恒温器にて 90°C でプリベイク (30 min) を行った。
- ④ マスクアライナー (Union, PEM-800) を用いてマスクに描かれたチャネルデザインを転写した (図 2-5 b)。転写に必要な UV の露光時間を以下に示す。(exposure time : 40 sec)
- ⑤ 転写後、SU-8 基板を 90°C でポストベイク (30 min) した後、室温になるまで恒温器の中で除冷した (2 hours)。
- ⑥ SU-8 現像液を用いて、露光されていないフォトレジストを取り除いた (10 min)。その後、IPA で基板を洗浄した (2 min) (図 2-5 c)。
- ⑦ 非接触型深度測定器 (Union, HisometII) を用いてデザイン通り作製されたかを確認し、流路の高さと幅を測定した。

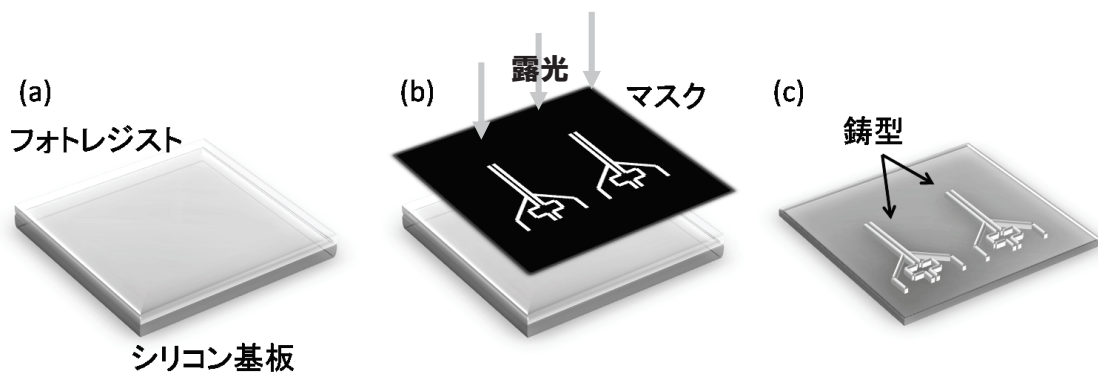


図 2 - 5 鋳型の作製

ソフトリソグラフィー

- ① 作製した鋳型（図 2 - 6 a）をプラズマエッチング装置（ $\text{CHF}_3 : \text{O}_2 = 45 : 5$ SCCM, 20 Pa, 200 W, 5 min）を用いて CHF_3 と O_2 で同時に表面を処理した。これにより、PDMS プレポリマーが鋳型表面に接着するのを防いだ。
- ② PDMS プレポリマーと硬化剤を 10:1（質量比）の割合で混ぜ合わせ、真空チャンバー中で脱泡した（15 min）。約 1.8 g の混合液を鋳型上に流し込み、15 分間さらに脱泡した（図 2 - 6 b）。
- ③ 65°C の恒温器で 1 時間加熱し、PDMS を固めた。
- ④ マイクロチップを鋳型からはがしとり、ガラス基板に張り合わせ、100°C の恒温器を用いて 1 時間加熱することでさらに硬化させた（図 2 - 6 c）。
- ⑤ 液の出口となるリザーバーを直径 5 mm のはとめで開け、入口はカッターで流路方法に対して垂直にカットした（図 2 - 6 d）。

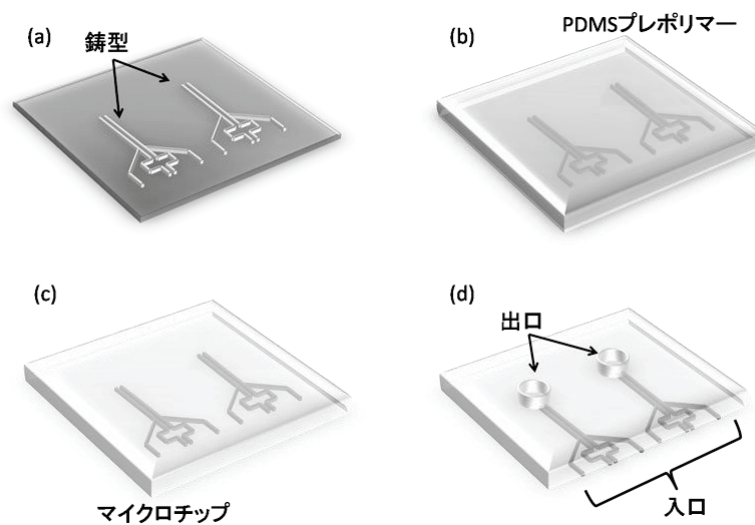


図 2 - 6 PDMS チップの作製方法

2.2.2 ガラス基板へのプローブ DNA の固定化方法

本実験は、高密度アミノ基修飾ガラスの表面上にグルタルアルデヒドをリンカーとして 5'末端アミノ化プローブ DNA を共有結合させた（図 2-7）。

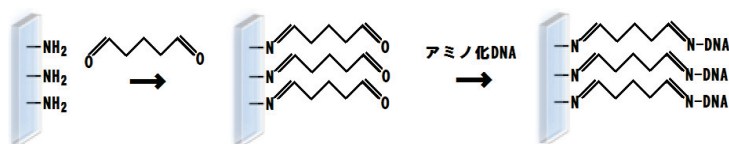


図 2-7 アミノ基を用いたプローブ DNA の固定化

固定化に使用した試薬およびガラスを表 2-1 に示す。また、固定化の手順を以下に示す^[2]。

表 2-1 使用した試薬および DNA の配列

製品名	メーカー	製品番号
DNA マイクロアレイ用コートスライドガラス (TCYPE I 高密度化アミノ基導入タイプ)	松浪硝子工業	SD00011
Tris Buffered Saline, with Tween20, pH 8.0	SIGMA	T9039
スタンダードオリゴ 5'アミノ化 HPLC 精製	ユーロフィン	
20% Glutaraldehyde Solution 電子顕微鏡用	和光純薬工業	072-02262
炭酸水素ナトリウム	和光純薬工業	191-01305
炭酸ナトリウム	和光純薬工業	196-01595

プローブ DNA の固定化手順

- ①表面アミノ基修飾ガラスを 1%グルタルアルデヒド溶液（10% 500mM 炭酸塩バッファー (pH9.4)）に浸して密閉し、37°Cで 2 時間反応させた。
- ②脱イオン水で洗浄したのち、さらに超音波で洗浄（5 分）し、遠心機で付着した水を除いた。
- ③I 字型の流路を持つ PDMS チップを貼りつけ、真空チャンバー（10 kPa）に 10 分間入れ、PDMS を脱気した。
- ④大気中に戻して、出口部にテープを貼った後、アミノ化プローブ DNA 溶液を 1.0 μ L 入口部に滴下し、流路内に溶液が浸入したことを確認したのちテープをはがし、予め高湿度にしておいた密閉容器に入れ、37°Cでプローブ DNA の固定化時間として 1 時間反応させた。
- ⑤反応停止剤として Tris buffer Tween 0.5%で洗浄し、同溶液で 5 分間超音波洗浄したのち、脱イオン水で洗浄、さらに脱イオン水で 5 分間超音波洗浄を行った。洗浄後は遠心機で付着した水を除き、得られたガラスをプローブ DNA 固定化ガラスとした。
- ⑥プローブ DNA 固定化ガラスはデシケータ内で遮光保存した。

2.2.3 自律駆動マイクロ流体チップの組み立て

PDMS チップをプローブ DNA 固定化ガラスに貼り付ける前に、流路の入口に滴下した溶液がガラス表面で広がらないようにするため、プローブ固定化ガラスの表面の一部に疎水化処理を行った。疎水化は市販の疎水化スプレーをガラス表面に吹き付けた後、エアスプレーでガラス表面を乾燥させることで行った。疎水化スプレーを吹き付ける範囲は、プローブ DNA 固定化バンドから流路の入口方向に 5 mm 以上離れた範囲で行った。プローブ DNA 固定化ガラスを疎水化処理した後、作製したダブル Y 字型流路を持つ PDMS チップをプローブ DNA 固定化ガラスに貼りつけることによって、自律駆動マイクロ流体チップを作製した。このとき、Y 字型流路の長い直線部分がガラス基板上のプローブ DNA の固定ラインと垂直になり、かつ、流路の入口とプローブ DNA の固定化バンドの間隔が 7 mm になるように PDMS チップをガラス基板上に配置した。1.1.3 で述べたように、自律駆動マイクロ流体チップは十分に PDMS チップの脱気を行うことで、流路内への自律駆動送液が行えるようになる。本研究は自律駆動送液を用いてサンプルおよび試薬の送液を行うため、実験前に自律駆動マイクロ流体チップを真空チャンバー中 (10 kPa) で 1 時間の脱気を行い、PDMS チップに含まれる空気を抜いた。以上の操作により、大気中においてこのチップの流路内への連続的な送液が可能である。本研究では自律駆動マイクロ流体チップの連続的な送液を核酸の検出に利用した。

2.3 結論

本章では、PDMS チップの作製法とガラス基板へのプローブ DNA の固定化法、さらに上記の二つを組み合わせた自律駆動マイクロ流体チップの作製法について述べた。自律駆動マイクロ流体チップを十分に脱気した後に再び大気中へ戻すことで、流路の入口に滴下した溶液を連続的に送液することが可能となる。

参考文献

- [1] K. Hosokawa, T. Fujii and I. Endo, Handling of picoliter liquid samples in a poly (dimethylsiloxane)-based microfluidic device, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 4781-4785.
- [2] H. Arata, H. Komatsu, K. Hosokawa, and M. Maeda, Rapid and sensitive microRNA detection with laminar flow-assisted dendritic amplification on power-free microfluidic chip, *PLoS ONE*, 2012, **7**, e48329.

第 3 章

自律駆動マイクロ流体チップを用いた生体 試料由来 microRNA の特異的な検出

3.1 緒言

先行研究^{[1],[2]}では、自律駆動マイクロ流体チップを用いた合成 miRNA の検出が行われてきたが、生体試料（組織、細胞など）中の miRNA の測定に適用可能であるかは不明であった。生体試料から標準的な方法で抽出した total RNA の中には、mRNA のような長鎖 RNA や miRNA の生成過程でつくられる miRNA 前駆体、標的 miRNA 以外の配列を持った miRNA 等、様々な RNA が含まれる。したがって、生体試料由来の total RNA に含まれる極微量の標的 miRNA を検出するには、高い特異性が求められた。

本章では、初めに自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA の検出法の詳細について説明した。また、本研究の成果として、プローブ DNA の長さの最適化や、様々な塩基配列の miRNA の検出限界（limit of detection; LOD）について述べた後、自律駆動マイクロ流体チップを用いた生体試料中の標的 miRNA の特異的な検出に向けた miRNA 検出の特異性の評価を行った。特異性の評価では、標的 miRNA の類似配列（1 塩基、または 2 塩基ミスマッチ配列）に対する特異性や、miRNA 前駆体 に対する成熟型 miRNA の特異性、さらに市販の白血球由来 total RNA を用いた total RNA に対する特異性の評価を行った。

3.2 実験方法

3.2.1 自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA の検出

3.2.1.1 層流樹状増幅法による miRNA の検出方法

自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA の検出では、1.1.2.1 で述べたサンドイッチ法、1.1.3 で述べた自律駆動マイクロ流体チップ、1.1.4 で述べた層流樹状増幅法（LFDA）をそれぞれ利用することで行った。本実験で使用した試薬と材料を表 3 - 1 に示す。

表 3 - 1 使用した試薬と材料

製品名	メーカー	製品番号
DIG Wash and Block Buffer Set Blocking solution, 10×conc.(BR)	Roche Diagnostics	11585762001
UltraPure 20×SSC Buffer	Thermo Fisher Scientific	15557-044
10% SDS Solution	和光純薬工業	311-90271
10% tween20	BETHYL	E108
Streptavidin-FITC from Streptomyces avidinii	Sigma-Aldrich	S3762-.5MG
Biotinylated Anti-Streptavidin	Vector Laboratories	BA-0500
スタンダードオリゴ 3'ビオチン化 HPLC 精製	ユーロフィン	

miRNA の測定には自律駆動送液を用いるため、測定の直前に自律駆動マイクロ流体チップを真空チャンバー（10 kPa）内で 1 時間脱気した。十分に脱気した

後、チップを大気中に取り出してすぐにチップの出口部にメンディングテープを貼り、ダブル Y 字型流路の 3 つの入口（実際の流路の入口は 4 つあるが、中央の 2 本の入口は共通の試薬を送液するため、実験では 3 つの入口として扱う）に以下の順番で試薬を送液した（図 3-1）。なお、全ての試薬はブロッキングバッファを用いて濃度調整を行った。

- ① 全ての入口にブロッキングバッファ（1% BR, 0.02% SDS, 5×SSC, 0.05% Tween20）を送液し、3 分間のブロッキングを行った（Step 1）。
- ② 左の入口から標的 miRNA 溶液を 0.5 μ L, 右の入口からはリファレンスとしてブロッキングバッファを 0.5 μ L, 中央の入口から 10 nM または 1 μ M のビオチン標識プローブ DNA（Detection Probe DNA; DP）を 1 μ L それぞれ送液し、5 分間のサンドイッチ構造の形成を行った（Step 2）。
- ③ 左右の入口から 5 ng/ μ L FITC 修飾ストレプトアビジン（F-SA）溶液を 3 μ L, 中央の入口からは 20 ng/ μ L ビオチン標識抗ストレプトアビジン抗体（B-anti-SA）を 6 μ L それぞれ送液し、1 分毎に蛍光画像を撮影した（Step 3）。蛍光観察には 100W の高圧水銀ランプ、10 倍の対物レンズ、CCD カメラ（CoolSNAP HQ2, 日本ローパー）が取り付けられた蛍光顕微鏡（ECLIPSE TE2000-U, Nikon）を用いた。カメラの露光時間は画像の輝度が飽和しない程度の時間（約 1 秒）とした。

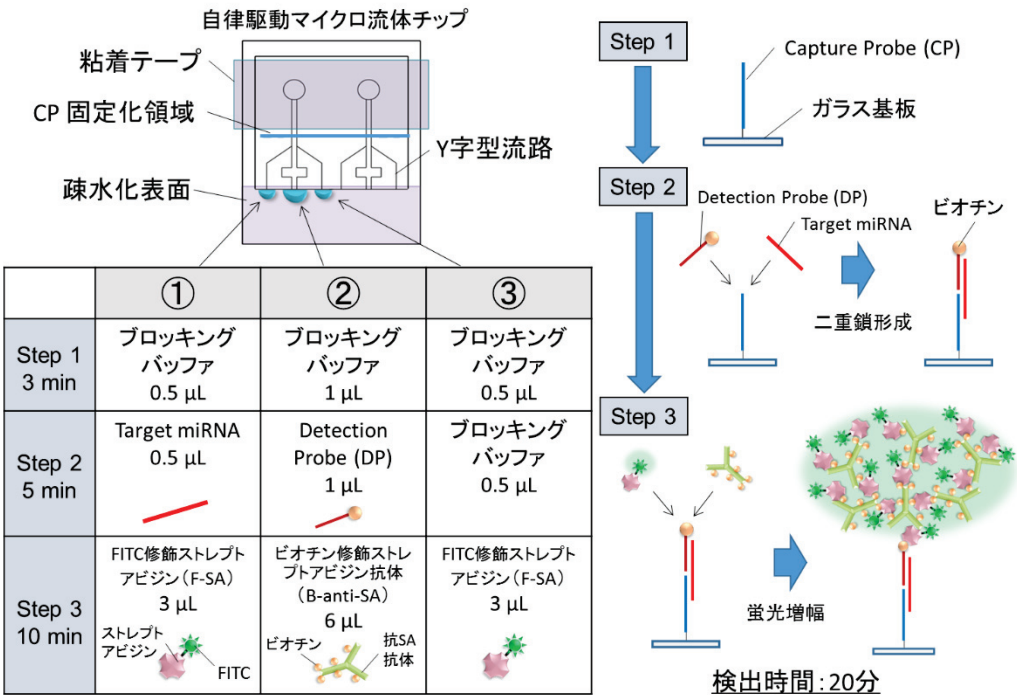


図 3-1 LFDA を利用した miRNA の検出方法^[2]

3.2.1.2 miRNA の蛍光検出およびデータの解析

画像の蛍光イメージの解析には、画像解析ソフト ImageJ (National Institutes of Health) を用いた。流路内の蛍光強度の測定は、一定の範囲のイメージを選択し、その中の輝度を測定した。蛍光強度は「流路内でシグナルが最も強い場所の輝度の値」を「流路内のシグナル部以外の領域（ビオチン標識抗体が流れている場所）の輝度の値」で引いた値として定義した（図 3 - 2）。

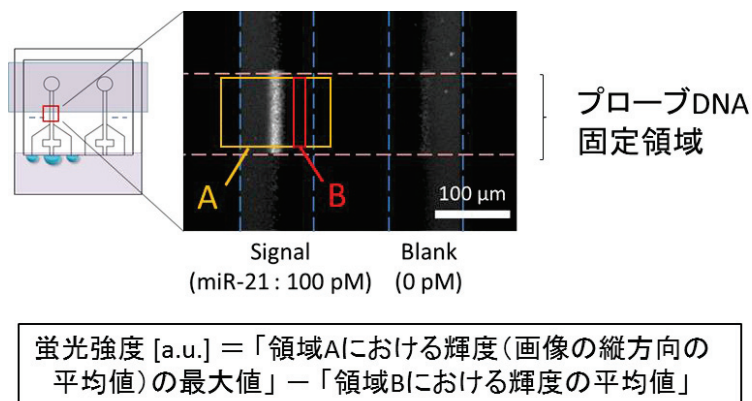


図 3 - 2 蛍光強度の計算法^[2]

流路内で蛍光増幅を行っている間（図 3 - 1 の Step 3）は、1 分毎に蛍光画像の撮影を行っており、増幅における蛍光強度の経時変化（タイムコース）を測定した（図 3 - 3, 左）。また、「核酸サンプルを流した左側の流路の蛍光強度（signal）」を「ブロッキングバッファを流した右側の流路の蛍光強度（reference）」で割った値を Signal-to-reference ratio (SRR) として計算した（図 3 - 3, 右）。

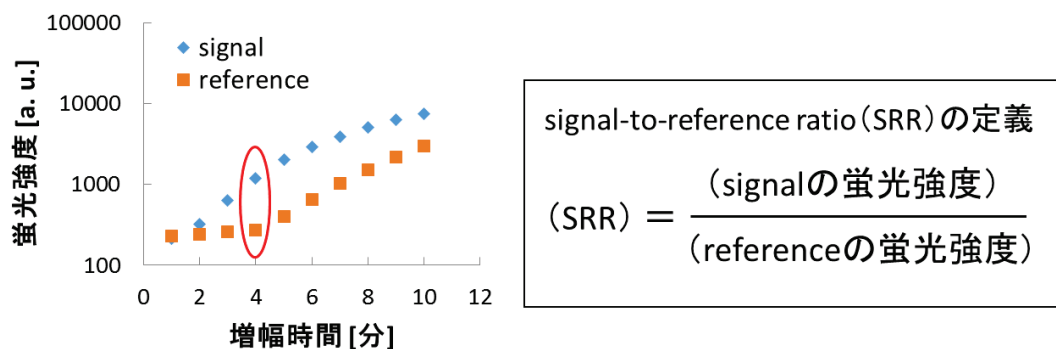


図 3 - 3 蛍光強度の経時変化（タイムコース）。reference 側が増幅を始める時刻の signal と reference の蛍光強度を赤線で囲っている。

さらに, reference 側の流路で蛍光増幅が始まった時刻における SRR の値を縦軸, miRNA の濃度を横軸としてグラフにプロットすることで, miRNA の検量線を作成した (図 3-4)。なお, miRNA の測定は濃度毎に 3 回 (n=3) 行い, 平均値の SRR の値をグラフ中にプロットした。検量線の作成には Microsoft Excel におけるソルバーアドインを用いた。ブランク (標的 miRNA の濃度がゼロ) および各濃度の miRNA によって得られた SRR とその標準偏差をグラフに入力し, 4 パラメータロジスティック関数にフィッティングさせることで, 各パラメーター(a, b, c, d) に最もフィットする曲線を計算した (図 3-4 のオレンジの線)。ここで用いた 4 パラメータロジスティック関数を以下に示す。

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}$$

ここで x は RNA の濃度, y は SRR, a は SRR の最小値, b は RNA の濃度の中央値における曲線の傾き, c は SRR の中央値に対応する x の値, d は SRR の最大値である^[3]。

LOD の定義は, 「ブランクの SRR (n=5) の平均値」に「ブランクの SRR の標準偏差」の 3 倍 (3 SD) を加えた値 (y) に対応する RNA 濃度 (x) と定義した。

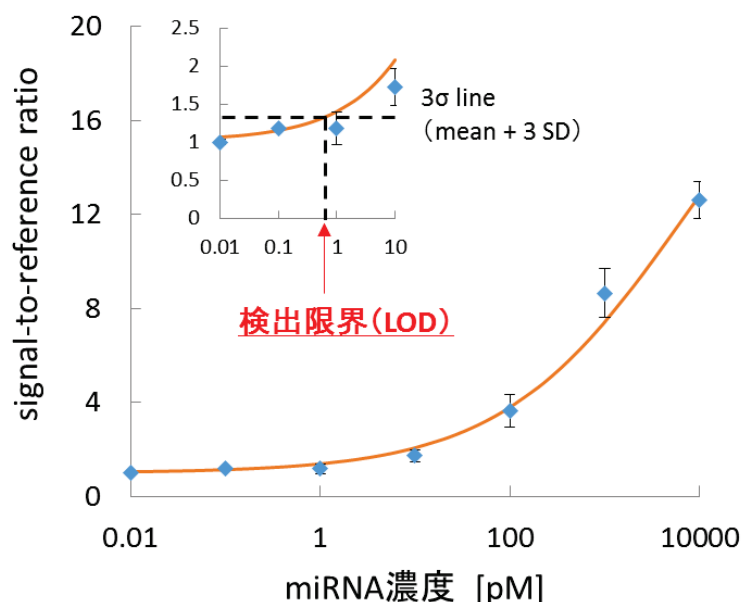


図 3-4 検量線の作成および検出限界の算出

3.2.2 類似配列に対する標的 miRNA の特異的な検出

同じファミリー間の miRNA は非常に似た配列を持ち、1 塩基から数塩基のみ互いに異なる配列も存在する。本実験では、類似配列に対する標的 miRNA の検出特異性を調べるため、hsa-miR-204 を標的配列として 2 つのプローブ DNA (Capture probe DNA; CP と Detection probe DNA; DP) の配列を設計し、これらのプローブを用いて 2 塩基ミスマッチの hsa-miR-211 および 1 塩基ミスマッチの mmu-miR-211 の検出を行った。本実験で用いたプローブ DNA と miRNA の配列を表 3 - 2 に示す。

表 3 - 2 miRNA とプローブ DNA の配列 (5' → 3')

名称	miRNA	Capture Probe※	Detection Probe
hsa-miR-204-5p	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU	NH ₂ -T ₁₅ -AGGCATAGGAT	GACAAAGGGAA-biotin
hsa-miR-211-5p	UUCCCUUUGUCAUCCU UC GCCU	-	-
mmu-miR-211-5p	UUCCCUUUGUCAUCCU U UGCCU	-	-

※T₁₅は TTT TTT TTT TTT TTT を指す。

表 3 - 2 中において赤字で示したように、1 塩基および 2 塩基ミスマッチ部位は各 miRNA の CP 側 (CP-204) に存在しており、DP 側 (DP-204) は hsa-miR-211 と mmu-miR-211 に対しても完全相補な配列である。本実験で用いた自律駆動マイクロ流体チップの概略図と miRNA の測定手順を図 3 - 5 に示す。

Inlet	left	middle	right
Step 1 3 min	Blockin buffer 0.5 μ L	Blockin buffer 1 μ L	Blockin buffer 0.5 μ L
Step 2 5 min	miRNA 0.5 μ L	B-DP-204 10 nM, 1 μ L	Blockin buffer 0.5 μ L
Step 3 10 min	F-SA 5 μ g/mL, 3 μ L	B-anti-SA 20 μ g/mL, 6 μ L	F-SA 5 μ g/mL, 3 μ L

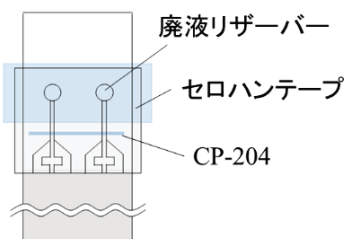


図 3 - 5 自律駆動マイクロ流体チップの概略図と miRNA の測定手順。実験の都合上、本実験のみ DP 濃度を 1 μ M ではなく 10 nM で測定を行った。

本実験では、初めに hsa-miR-204 (1 pM ~ 10 nM) を検出し、検量線の作成と LOD の計算を行った。次に、hsa-miR-211 および mmu-miR-211 (1 pM ~ 10 nM) を測定し、非特異的に検出される割合を調べた。また、類似配列が混合している RNA 溶液中では DP の結合が競合的になり、標的の miRNA の検出が阻害される可能性が考えられたため、最後に hsa-miR-204 と hsa-miR-211 の混合溶液中の hsa-miR-204 の特異的な検出を行った。

3.2.3 miRNA 前駆体に対する成熟型 miRNA の特異的な検出

1. 1. 2. 1 で述べたように、診断の標的となる成熟型 miRNA は miRNA 前駆体からつくられるため、miRNA 前駆体は成熟型 miRNA と共通の配列を部分的に有している。そのため、miRNA 前駆体を含んだ RNA 溶液中から成熟型 miRNA を検出するには高い特異性が必要であると考えられたため、本実験では miRNA 前駆体に対する成熟型 miRNA の検出特異性を調べた。

本実験では、4 種類の成熟型 miRNA を標的配列として CP および DP を設計し、miRNA 前駆体 (pre-miRNA) に対する検出特異性を調べた。本実験で用いた成熟型 miRNA とプローブ DNA の配列を表 3 - 3 に、miRNA 前駆体の配列を表 3 - 4 にそれぞれ示す。表 3 - 4 では、各 miRNA 前駆体に含まれる成熟型 miRNA に相当する配列は赤字で示した。

表 3 - 3 成熟型 miRNA とプローブの配列(5' → 3')

名称	成熟型 miRNA	Capture Probe(CP)	Detection Probe(DP)
hsa-miR-16-5p	UAGCAGCAGCGUAAAUAUUGGCG	NH ₂ -T ₁₅ - CGCCAATATTTAC	GTGCTGCTA -biotin
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	NH ₂ -T ₁₅ - TCAACATCAGT	CTGATAAGCTA -biotin
hsa-miR-451a	AAACCGUUACCAUACUGAGUU	NH ₂ -T ₁₅ - AACTCAGTAATG	GTAACGGTTT -biotin
hsa-miR-500a-3p	AUGCACCUGGGCAAGGAUUCUG	NH ₂ -T ₁₅ - CAGAATCCTTGC	CCAGGTGCAT-biotin

※T₁₅は TTTTTTTTTTTTTTTT を指す。

表 3 - 4 miRNA 前駆体の配列(5' - 3') ※

名称	塩基配列(5' → 3')
前駆体 miR-16	GUCAGCAGUGCCU UAGCAGCAGCGUAAAUAUUGGCG UUAAGAUUCUAAAUAUCUCCAGU AUUAACUGUGCUGCUGAAGUAAGGUUGAC
前駆体 miR-21	UGUCGGG UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA CUGUUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAUG GGCUGUCUGACA
前駆体 miR-451a	CUUGGGAAUGGCAAGG AAACCGUUACCAUACUGAGUU UAGUAAUGGUAAUGGUUCUCUU GCUAUACCCAGA
前駆体 miR-500a	GCUCUUUUUCUUAUCCUUGCUACCUUGGGUGAGAGUGCUGUCUGAAUGCA AUGCACCUG GGCAAGGAUUCUG AGAGCGAGAGC

※赤字の部分はその miRNA 前駆体からつくられる成熟型 miRNA の配列

なお、miRNA 前駆体は生体中において分子内で規則的な二重鎖構造を形成しているため、そのような構造体を形成している場合はプローブ DNA と結合せずに不検出となることが考えられた。そのため、本実験ではチップで検出する前に、miRNA 前駆体の溶液のみ加熱および冷却を行い、miRNA 前駆体に特定の構造を形成させた。本実験における成熟型 miRNA または加熱と冷却後の miRNA 前駆体の測定手順を図 3 - 6 に示す。

Inlet	left	middle	right
Step 1 3 min	Blockin buffer 0.5 μ L	Blockin buffer 1 μ L	Blockin buffer 0.5 μ L
Step 2 5 min	成熟miRNA or 前駆体miRNA 0.5 μ L	B-DP 1 μ M, 1 μ L	Blockin buffer 0.5 μ L
Step 3 10 min	F-SA 5 μ g/mL, 3 μ L	B-anti-SA 10 μ g/mL, 6 μ L	F-SA 5 μ g/mL, 3 μ L

図 3 - 6 成熟型 miRNA または miRNA 前駆体の測定手順。実験の都合上、本実験のみ B-anti-SA 濃度を 20 μ g/mL ではなく 10 μ g/mL で測定した。

3. 2. 4 白血球由来 total RNA 中の標的 miRNA の特異的な検出

miRNA の発現解析では、一般的に細胞や組織などの生体試料から抽出された total RNA を測定試料とする。標準的な方法で抽出した total RNA 中には、mRNA のような長鎖 RNA や miRNA 前駆体、標的 miRNA 以外の miRNA が含まれているため、total RNA を測定試料とした場合、total RNA 中に含まれる標的 miRNA の検出には高い特異性や感度が必要となる。そこで本実験では、自律駆動マイクロ流体チップを用いて、市販で売られているヒト白血球由来 total RNA 中から標的 miRNA の特異的な検出を試みた。また、自律駆動マイクロ流体チップで得られた miRNA の測定結果を、定量逆転写 PCR（以下、qRT-PCR）の結果と比較することで、チップによる miRNA 検出の精確性を評価した。

3. 2. 4. 1 自律駆動マイクロ流体チップを用いた total RNA 中の miRNA の検出

本実験では、初めにヒト白血球中のがんバイオマーカーとして報告されている miR-16, 451, 223 の測定を自律駆動マイクロ流体チップによって検出した。次に、ヒト白血球中では発現しない cel-miR-39（線虫の中で発現される miRNA）の測定することで、非特異的な検出の確認を行った。本実験で用いたプローブ DNA を表 3 - 5 に示す。

表 3 - 5 標的 RNA およびプローブ DNA の配列(5' \rightarrow 3')

標的 miRNA		Capture Probe (CP) [※]	Detection Probe (DP)
hsa-miR-16	UAGCAGCACGUAAAAUUGGCG	NH ₂ -T ₁₅ -CGCCAATATTTAC	GTGCTGCTA-biotin
hsa-miR-223	GUGUCAGUUUGUAAAAUACCCCA	NH ₂ -T ₁₅ -TGGGGTATTTG	ACAAACTGACAC-biotin
hsa-miR-451a	AAACCGUUAACCAUACUGAGUU	NH ₂ -T ₁₅ -AACTCAGTAATG	GTAACGGTTT-biotin
cel-miR-39	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG	NH ₂ -T ₁₅ -CAAGCTGATTTAC	ACCCGGTGA-biotin

※T₁₅ は TTTTTTTTTTTTTTTT を指す。

自律駆動マイクロ流体チップを用いた total RNA 中の標的 miRNA の検出手順を図 3 - 7 に示す。

Inlet	left	middle	right
Step 1 3 min	Blockin buffer 0.5 μ L	Blockin buffer 1 μ L	Blockin buffer 0.5 μ L
Step 2 5 min	ヒト白血球由来 total RNA 0.5 μ L	B-DP 1 μ M, 1 μ L	Blockin buffer 0.5 μ L
Step 3 10 min	F-SA 5 μ g/mL, 3 μ L	B-anti-SA 20 μ g/mL, 6 μ L	F-SA 5 μ g/mL, 3 μ L

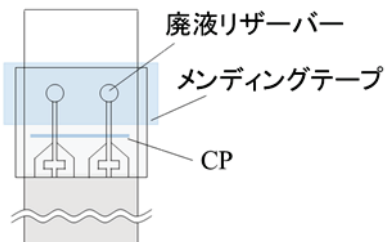


図 3 - 7 ヒト白血球由来 total RNA 中の miRNA の測定手順。

3.2.4.2 定量逆転写 PCR を用いた total RNA 中の miRNA の検出

以下に定量逆転写 PCR (qRT-PCR) による miRNA の測定手順を述べる。はじめに、標的 miRNA (合成 miRNA) をキャリア RNA (5 ng/ μ L MS2 RNA) 溶液で段階希釈 (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 コピー/ μ L) を行い, qRT-PCR を用いて標的 miRNA の検量線を作成した。次に, ヒト白血球由来 total RNA を Nuclease-free water で 50 ng/ μ L に調整し, 逆転写反応 (42°C 60 min, 95°C 5 min, 4°C ∞) を行った。最後に, 得られた cDNA を Nuclease-free water で 76 倍に希釈して定量 PCR (95°C 10 min, [95°C 10 sec, 60°C 1 min] \times 40 cycles ramp rate 100%) を行った。qRT-PCR の試薬は miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR (Exiqon) を使用した。測定機器は 7900HT Fast Real Time PCR System, 解析ソフトは SDS Software v2.4 (Applied Biosystems) をそれぞれ使用した。使用した試薬を表 3 - 6 に, 逆転写反応と qPCR の試薬組成を表 3 - 7 および表 3 - 8 それぞれ示した。

表 3 - 6 qRT-PCR の測定で使用した試薬

製品名	メーカー	製品番号
Human Blood, Peripheral Leukocytes Total RNA	Clontech	636592
Universal cDNA Synthesis Kit II	Exiqon	203301
ExiLENT SYBR Green master mix	Exiqon	203403
ROX Passive Reference	Eurogentec	315-80421
RNA, バクテリオファージ MS2 由来	Roche	101659480

表 3 - 7 逆転写反応の試薬組成

Reagent	Volume (μ L)
5X Reaction Buffer	2
Nuclease-free water	5
Enzyme mix	1
Template RNA	2
Total volume	10

表 3 - 8 qRT-PCR の試薬組成

Reagent	Volume (μ L)
PCR Master mix	5
10X PCR primer mix	1
ROX passive reference	0.2
76 倍希釈 cDNA template	3.8
Total volume	10

3.3 実験結果および考察

3.3.1 miRNA 高感度検出のためのプローブ DNA の長さの最適化

miRNA の検出感度はプローブ DNA の長さによって大きく変動することが過去に報告されている^[4]。そのため、本研究では miRNA を高感度に検出するための最適なプローブ DNA の長さを調べた。本実験では miRNA と完全相補な 2 つのプローブ DNA が二重鎖を形成したときの解離定数 (K_d) に着目することによって、最適なプローブ DNA の長さの設計を試みた。

一般的に、サンドイッチ法のように 1 本の DNA (または RNA) に対して 2 本のプローブ DNA を結合させる場合、2 ヶ所の結合親和性が近くなるようにそれぞれのプローブ DNA の長さを設計する。本実験では、ビオチン標識プローブ DNA (DP) 側よりも、miRNA を捕捉するプローブ DNA (CP) 側の方が、わずかに結合親和性が強くなる (解離定数がわずかに小さくなる) ようなプローブ DNA 長さの設計法を標準設計法とし、標準設計法で設計した長さから一塩基のみ長さを変化させた場合の検出感度の変化を調べた。

はじめに、標的 miRNA である miR-223 (22 塩基) を検出するために、標準設計法で設計したプローブ DNA (CP : 11 塩基, DP : 11 塩基) を用いた場合と、標準設計法から DP 側を 1 塩基長くしたプローブ DNA (CP : 10 塩基, DP : 12 塩基) を用いた場合の 2 つのパターンで miR-223 の検出を行い、それぞれの設計法で設計したプローブ DNA を用いて得られた検出結果から検量線の作成と LOD の算出を行った。本実験で用いた miR-223 およびプローブ DNA の塩基配列と、miR-223 とプローブ DNA の解離定数と融解温度を表 3-9 に示す。

表 3-9 miR-223 とプローブ DNA の解離定数 (K_d) および融解温度 (T_m)

名称※	塩基配列 (5' → 3')	K_d [nM]	T_m [°C]
miR-223	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	-	-
CP-223(11)	TGGGGTATTTG	0.50	46.2
DP-223(11)	ACAAACTGACA	6.77	37.4
CP-223(10)	TGGGGTATTT	6.23	40.7
DP-223(12)	GACAAACTGACA	0.41	42.8

※括弧内の数字はそのプローブ DNA が持つ塩基の数を示す。

標準設計法では miR-223 とプローブ DNA の解離定数は CP-223(11) : DP-223(11) = 0.50 : 6.77 となっており、CP 側の解離定数が DP 側よりもわずかに小さくなるように設計している。一方で、DP 側の塩基を 1 つ伸ばした場合、miR-223 とプローブ DNA の解離定数は CP-223(10) : DP-223(12) = 6.23 : 0.41 となり、DP 側の方が解離定数は小さくなった。それぞれの設計法で設計したプローブ DNA か

ら得られた miR-223 の検量線および検出限界を図 3 - 8 に示す。

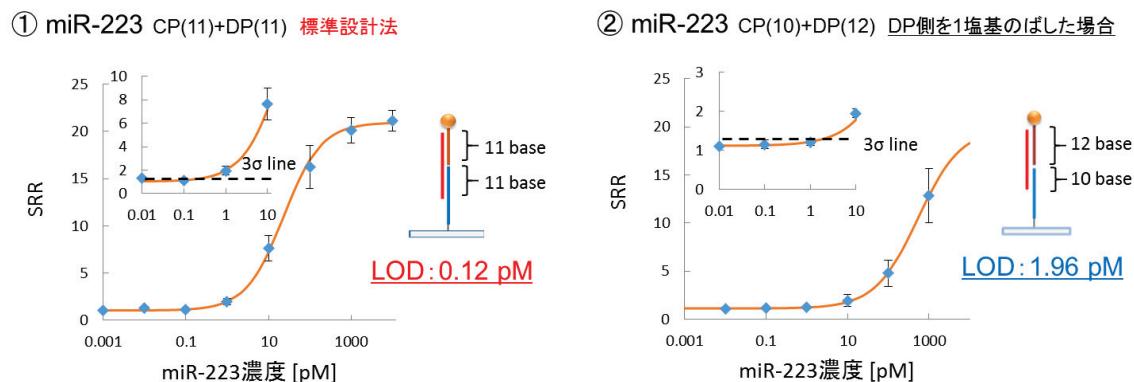


図 3 - 8 標準設計法および標準設計法から DP 側を 1 塩基分のみ伸ばした場合のプローブ DNA を用いた miRNA の検出結果の比較

図 3 - 8 から、標準設計法で設計したプローブ DNA を用いた場合は検出限界が 0.12 pM となったが、DP 側を 1 塩基長く設計したプローブ DNA を用いた場合は検出限界が 1.96 pM となり、標準設計法で設計したプローブ DNA を用いた方が低い検出限界を示したことがわかった。これは DP 側の塩基を増やすことで CP 側の塩基が減り、CP 側の解離定数が増加することで、流路内を流れてきた miR-223 を捕捉するための結合が弱くなったことが原因として考えられる。

次に、標的 miRNA である miR-21（塩基数：22）を検出するため、標準設計法で設計したプローブ DNA（CP：11 塩基，DP：11 塩基）と、標準設計法から CP 側を 1 塩基長くした場合のプローブ DNA（CP：12 塩基，DP：10 塩基）の 2 つのパターンで miR-21 の検出を行い、それぞれの設計法で設計したプローブ DNA を用いて得られた検出結果から検量線の作成と検出限界の算出を行った。本実験で用いた miR-21 およびプローブ DNA の塩基配列と、miR-21 とプローブ DNA 間の解離定数と融解温度を表 3 - 10 に示す。

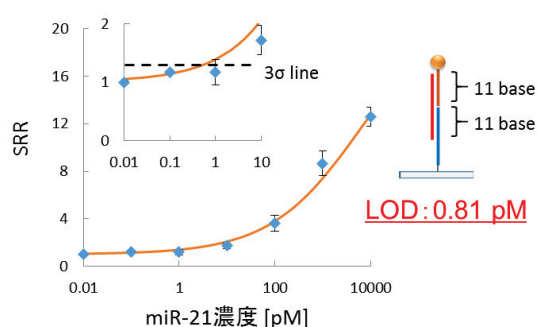
表 3 - 10 miR-21 とプローブ DNA の解離定数 (K_d) と融解温度 (T_m)

名称※	塩基配列 (5' → 3')	K_d [nM]	T_m [°C]
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	-	-
CP-21(11)	TCAACATCAGT	1.99	42.0
DP-21(11)	CTGATAAGCTA	8.16	37.6
CP-21(12)	TCAACATCAGTC	8.09×10^{-2}	48.7
DP-21(10)	TGATAAGCTA	1.85×10^2	30.0

※括弧内の数字はそのプローブ DNA が持つ塩基の数を示す。

標準設計法では miR-21 とプローブ DNA の解離定数は CP-21(11) : DP-21(11)=1.99 : 8.16 となっており，CP 側の解離定数が DP 側よりもわずかに小さくなるように設計している。一方で，CP 側の塩基を 1 つ伸ばした場合，miR-21 とプローブ DNA の解離定数は CP-21(12) : DP-21(10)= 8.09×10^{-2} : 1.85×10^2 となり，CP 側の解離定数は DP 側よりもさらに小さくなった。それぞれの設計法で設計したプローブ DNA から得られた miR-21 の検量線および検出限界を図 3 - 9 に示す。

① miR-21 CP(11)+DP(11) 標準設計法



② miR-21 CP(12)+DP(10) CP側を1塩基のばした場合

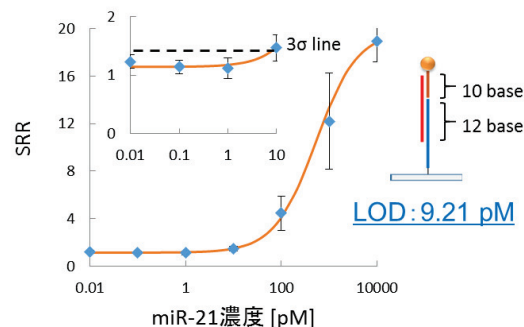


図 3 - 9 標準設計法および標準設計法から CP 側の塩基を 1 塩基分のみ伸ばした場合のプローブ DNA を用いた miRNA の検出結果の比較

図 3 - 9 から，標準設計法で設計したプローブ DNA を用いた場合の miR-21 の検出限界は 0.81 pM となったが，CP 側を 1 塩基長く設計したプローブ DNA を用いた場合の miR-21 の検出限界は 9.21 pM となり，標準設計法で設計したプローブ DNA を用いた方が低い検出限界を示した。これは CP 側を 1 塩基長くことで，流路内を流れてきた miR-21 を捕捉するための CP の結合親和性は大きくなったものの，DP 側の解離定数が非常に大きくなったため，検出感度が低下したと考えられる。

以上の結果から，2 本のプローブ DNA を用いて標的 miRNA を検出する場合，プローブ DNA の長さは CP 側が DP 側よりもわずかに解離定数が小さくなる標準設計法による設計が最適であることが示された。したがって，本研究では miRNA を検出するすべてのプローブ DNA の長さは標準設計法を用いて設計した。

3.3.2 自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA の検出限界

本実験では、miRNA の塩基配列の変化における検出感度の影響を確認するため、配列が異なる 6 種類の miRNA を自律駆動マイクロ流体チップによって検出した。本実験で得られた各塩基配列の検量線と LOD を図 3 - 10 に示す。

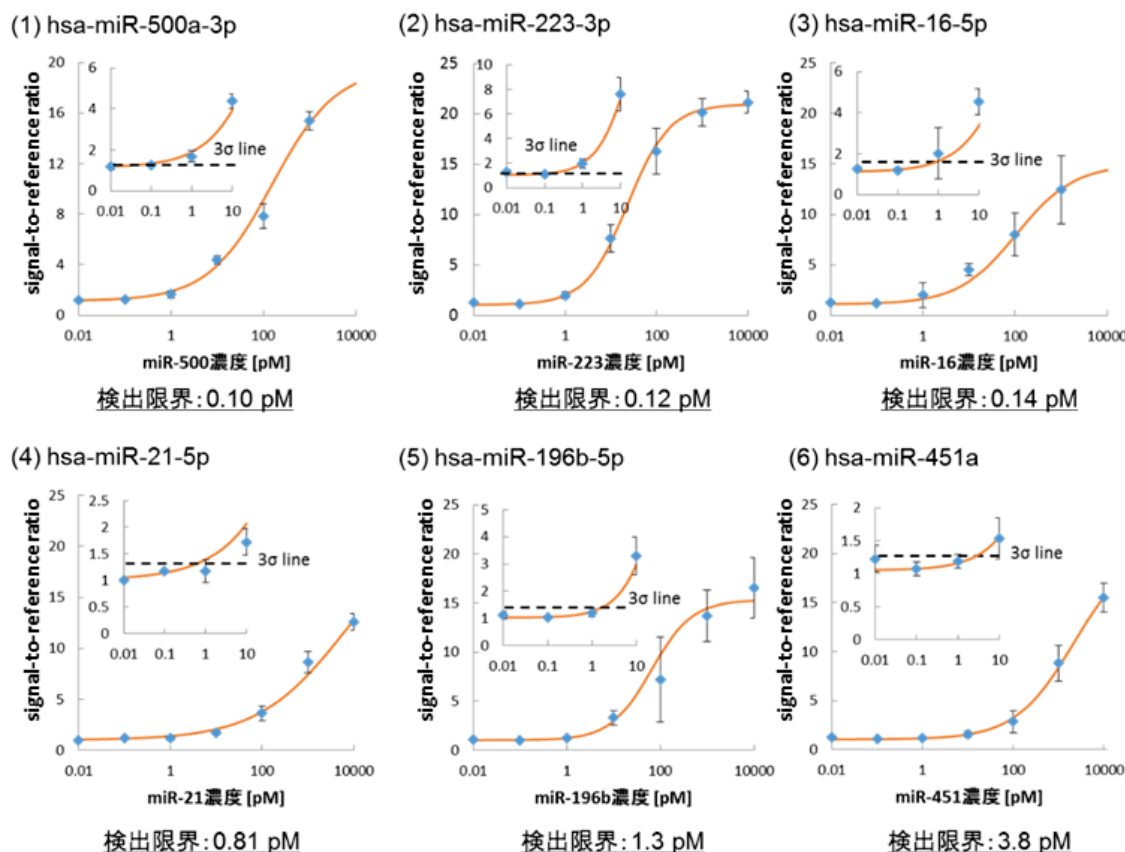


図 3 - 10 miRNA の検量線と検出限界

得られた検量線からそれぞれの配列の LOD を算出したところ、いずれの配列も 1 pM 付近の LOD を示した。一般的な miRNA 検出法のひとつであるマイクロアレイの LOD は 1 pM 付近であるため、本手法はマイクロアレイと同程度の検出感度ではあることがわかった。一方で、本手法は検出時間が 20 分、試料体積が 0.5 μ L であるため、マイクロアレイよりも短時間かつ少量の試料で miRNA を検出できることを示した。また、自律駆動マイクロ流体チップおよび層流樹状増幅法を用いた miRNA の検出では、流路の底面に 3 種類のプローブ DNA を固定することで 3 種類の miRNA を同時に検出する手法も報告されている^[5]。このように、一回の測定で検出できる配列の数はマイクロアレイに及ばないものの、複数配列の miRNA を標的としたがん診断にも利用できることが考えられる。

3.3.3 類似配列に対する標的 miRNA の特異的な検出

hsa-miR-204 と完全相補である CP-204, DP-204 を用いて hsa-miR-204 (フルマッチ), has-miR-211 (2 塩基ミスマッチ), mmu-miR-211 (1 塩基ミスマッチ) の計 3 種類の miRNA の検出を行った。各 miRNA の検出の結果を図 3 - 11 に示す。

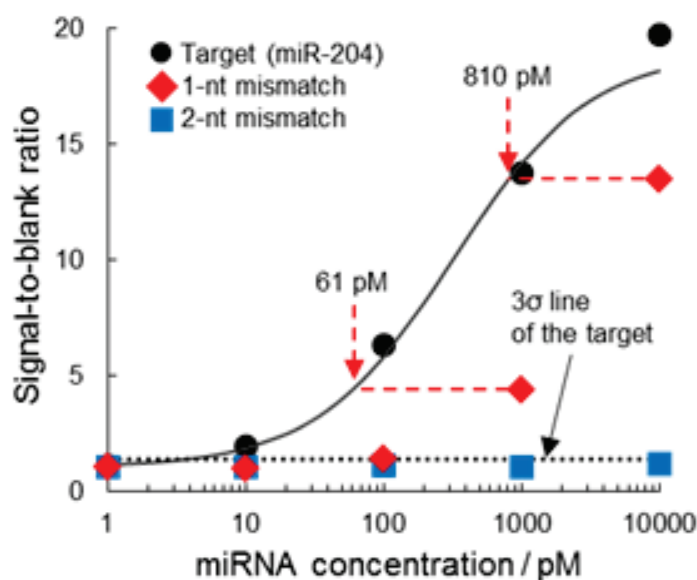


図 3 - 11 標的配列 (has-miR-204) および類似配列 (hsa-miR-211 と mmu-miR-211) の検出。標的配列検出用の CP と DP を用いて標的配列と類似配列の miRNA を測定した。mmu-miR-211 と hsa-miR-211 のプロットは $n=1$ の測定値を示す。

図 3 - 11 から、2 つのプローブ DNA (CP-204, DP-204) においてフルマッチである hsa-miR-204 は 10 pM まで十分に検出されることが示された。一方、CP 側で 2 塩基ミスマッチである hsa-miR-211 は 10 nM まで濃度を上げて検出されないことが明らかになった。一方、1 塩基ミスマッチである mmu-miR-211 は 100 pM 以上で SRR が増加し、非特異的な検出が生じた。hsa-miR-204 の検量線を用いて非特異的に検出された mmu-miR-211 の濃度を算出したところ、送液した mmu-miR-211 のうち非特異的に検出された mmu-miR-211 の割合は 4.0~8.1%とわずかであり、標的配列の検出に大きく影響しないことがわかった (表 3 - 11)。1 塩基ミスマッチ配列が多く存在するようなサンプルを用いる場合は、1 塩基ミスマッチの miRNA を標的 miRNA として設計したプローブ DNA による検出も行うことで、標的 miRNA の測定結果を補正することが可能であると考えられる。

表 3 - 11 類似配列の非特異的な検出の割合

添加濃度	mmu-miR-211		hsa-miR-211	
	検出濃度	割合	検出濃度	割合
1 pM	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
10 pM	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
100 pM	4.0 pM	4.0%	N.D.	N.D.
1 nM	61 pM	6.1%	N.D.	N.D.
10 nM	810 pM	8.1%	N.D.	N.D.

N.D. (not detected) は、LOD 以下であることを示す。

次に、標的配列と類似配列が混在している試料中の標的 miRNA の検出特異性を調べた。本実験では左流路に 100 pM hsa-miR-204 を、右流路に 100 pM hsa-miR-204 と 10 nM hsa-miR-211 の混合溶液をそれぞれ送液することで、左右の流路の蛍光強度を調べた。なお、2 塩基ミスマッチである has-miR-211 は、10 nM の濃度では不検出であることが示されている（表 3 - 11）。図 3 - 12 に左右の流路の蛍光増幅のタイムコースを示す。

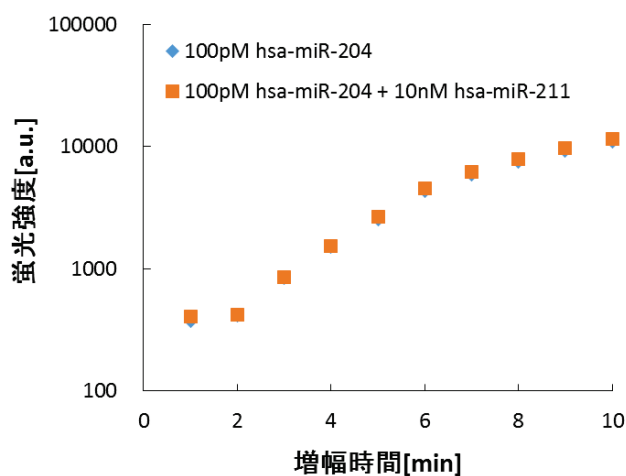


図 3 - 12 類似配列を含む混合試料中の hsa-miR-204 の特異検出。

図 3 - 12 から、10 nM hsa-miR-211 の有無に関係なく、左右の流路で同程度の蛍光強度が得られることがわかった。したがって、類似配列が混合しているサンプル中でも、DP (10 nM) の競合の影響を受けずに標的 miRNA を検出可能であることが示された。

以上の結果から、本チップは類似配列の miRNA に対して高い識別能を有することが示された。

3.3.4 miRNA 前駆体に対する成熟型 miRNA の特異的な検出

本実験では、チップによる測定の前に、miRNA 前駆体溶液の加熱と冷却を行った。加熱と冷却では、miRNA 前駆体溶液を 95°C（10 分）で加熱した後、2 通りの方法で冷却を行った。一つ目は、加熱した溶液を 90°C から 4°C まで 60 分かけてゆっくり冷却する緩慢冷却を行った。二つ目は、溶液を加熱してすぐに氷水で急速に冷却する急速冷却を行った。以上の 2 通りの冷却法で miRNA 前駆体を冷却することによって、緩慢冷却では規則的な二重鎖形成による安定な二次構造（ヘアピン構造）を、急速冷却では不規則な二重鎖形成による不安定な二次構造を miRNA 前駆体に形成させた。成熟型 miRNA および緩慢冷却後の miRNA 前駆体のチップによる検出結果を図 3 - 13 に示す。

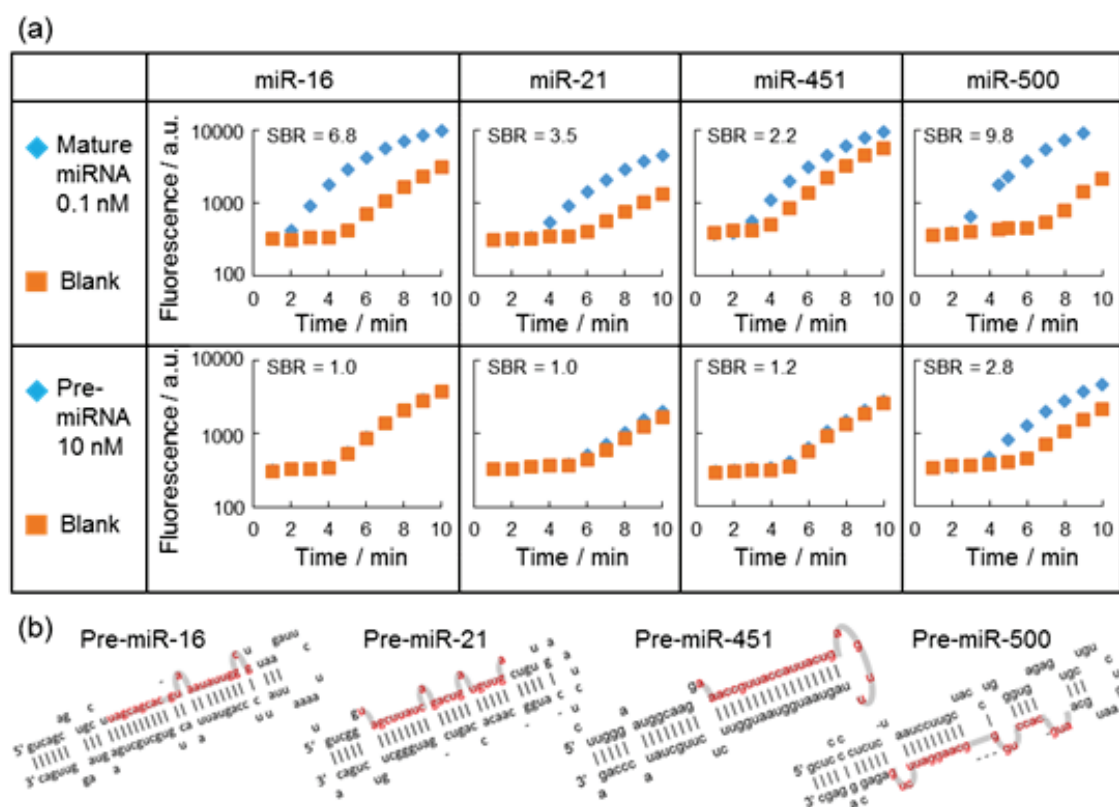


図 3 - 13 miRNA 前駆体（緩慢冷却）に対する成熟型 miRNA の検出特異性の評価。(a) RNA の蛍光タイムコース、(b) miRNA 前駆体の安定な二重鎖構造。

はじめに、成熟型 miRNA の miR-16, 21, 451a, 500a を検出したところ、100 pM の濃度で十分に検出されたことが図 1 - 13 から明らかになった。次に、成熟型 miRNA を検出したときと同じプローブ DNA を用いて、緩慢冷却を行った miRNA 前駆体を測定したところ、pre-miR-16, 21, 451a は成熟型 miRNA の 100

倍の濃度（10 nM）でも検出されなかった。一方、pre-miR-500a は 10 nM の濃度で reference よりも高いシグナルを示したが、pre-miR-500a の濃度を下げて測定したところ、成熟型 miRNA と同じ濃度である 100 pM では不検出であることがわかった（図 3 - 14）。

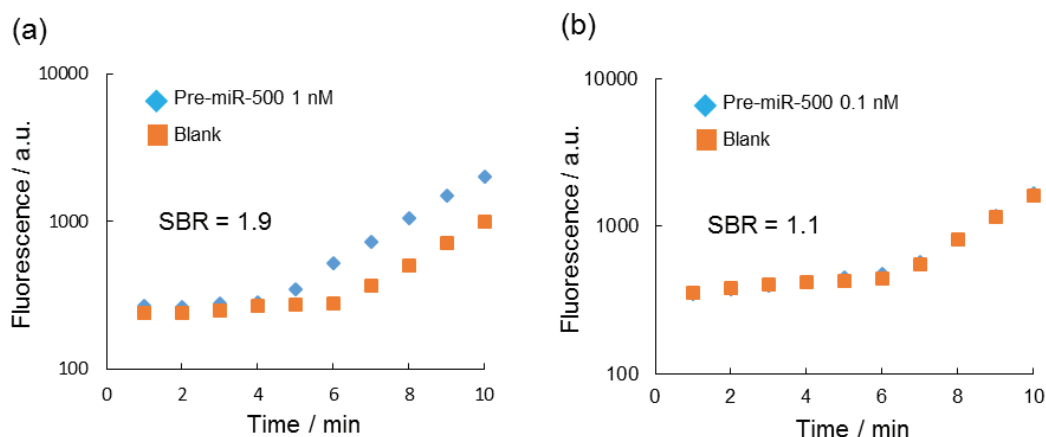


図 3 - 14 pre-miR-500a（緩慢冷却）の検出。pre-miR-500a の濃度はそれぞれ (a) 1 nM, (b) 0.1 nM である。

緩慢冷却後の pre-miR-500a が検出された理由として、pre-miR-500a は他の miRNA 前駆体と比べて分子内の相補性が低く、ヘアピン構造が不安定であることが考えられた（図 3 - 14 の(b)）。そのため、pre-miR-500a はプローブ DNA と結合しやすくなっており、非特異的に検出されることが考えられる。このように、分子内の相補性が低い miRNA 前駆体は非特異的に検出される可能性はあるものの、診断において検出対象である成熟型 miRNA の検出結果と比べた場合、明らかに miRNA 前駆体はシグナルが低いため、プローブとの結合性は低いと考えられる。

次に、急速冷却を行った miRNA 前駆体の検出結果を図 3 - 15 に示す。緩慢冷却をした pre-miR-16, 21, 451a はチップでは不検出であったのに対し、急速冷却をした miRNA 前駆体はいずれの配列でも reference より高いシグナルが検出された。また、急速冷却の pre-miR-500a の SRR は 4.7 であり、緩慢冷却をしたときの同配列の SRR である 2.8 に比べて高い結果となった。これは急速冷却を行うことで、すべての miRNA 前駆体は不安定な二重鎖を形成しており、プローブ DNA と結合しやすい構造となっていることが考えられる。

以上の結果から、miRNA 前駆体 は緩慢冷却によって安定なヘアピン構造を、急速冷却によって不規則な構造を取っていることが考えられた。また、緩慢冷却後の miRNA 前駆体は、ヘアピン構造を形成しているため、非特異的に検出されないことが考えられた。

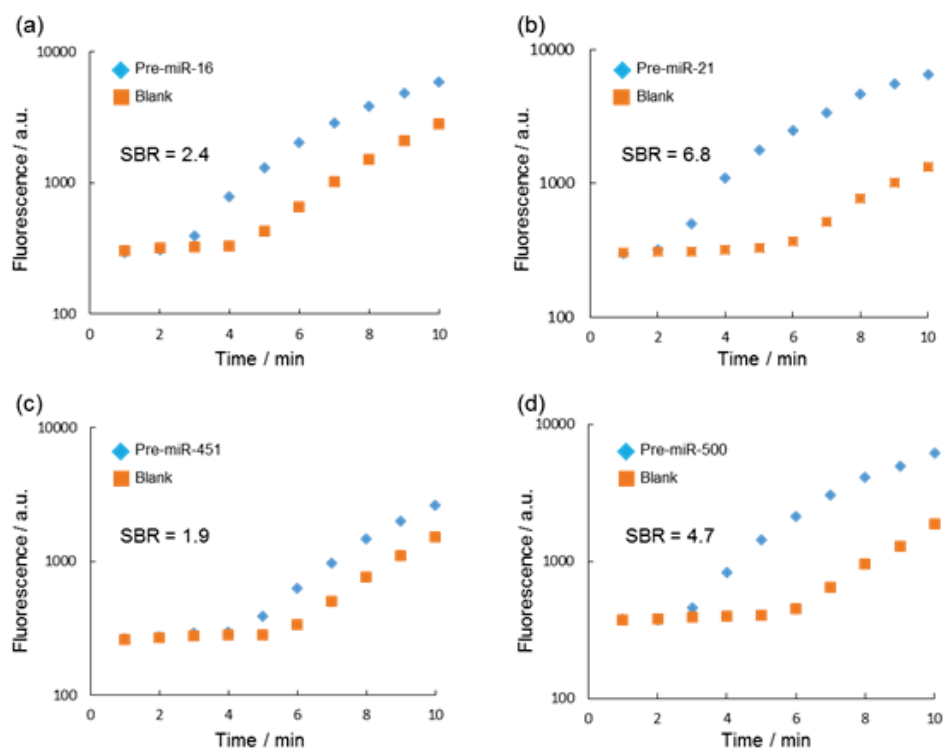


図 3-15 急速冷却後の miRNA 前駆体 の検出

最後に、miRNA 前駆体と成熟型 miRNA の混合試料から成熟型 miRNA を特異的な検出を試みた。本実験では、左流路に 100 pM 成熟型 miR-16 を、右流路に 100 pM 成熟型 miR-16 と 10 nM pre-miR-16 (ヘアピン構造) の混合溶液を注入し、左右の蛍光強度に差が生じるかを調べた。その結果、左右の流路で同じような蛍光の増幅の挙動であることが図 3-16 から示された。なお、10 nM の pre-miR-16 (ヘアピン構造) 自体は不検出であることはわかっている (図 3-13 a)。

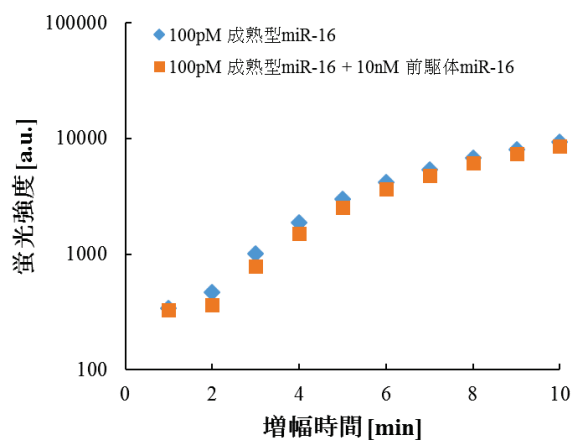


図 3-16 成熟型および前駆体の混合溶液中の成熟型 miR-16 の特異検出

この結果から、miRNA 前駆体が混合している試料でも、標的の成熟型 miRNA を特異的に検出することは十分に可能であることが示された。

以上より、自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA の検出においては、ヘアピン構造の miRNA 前駆体を検出せずに、成熟型 miRNA を特異的に検出できることが示された。

3.3.5 白血球由来 total RNA 中の標的 miRNA の特異的な検出

3.3.5.1 自律駆動マイクロ流体チップを用いた total RNA 中の miRNA の検出

自律駆動マイクロ流体チップを用いた合成 miRNA の検量線の作成と、チップによるヒト白血球由来 total RNA (1 ng/mL) 中の標的 miRNA の測定を行った。チップによる測定結果を図 3 - 17 に示す

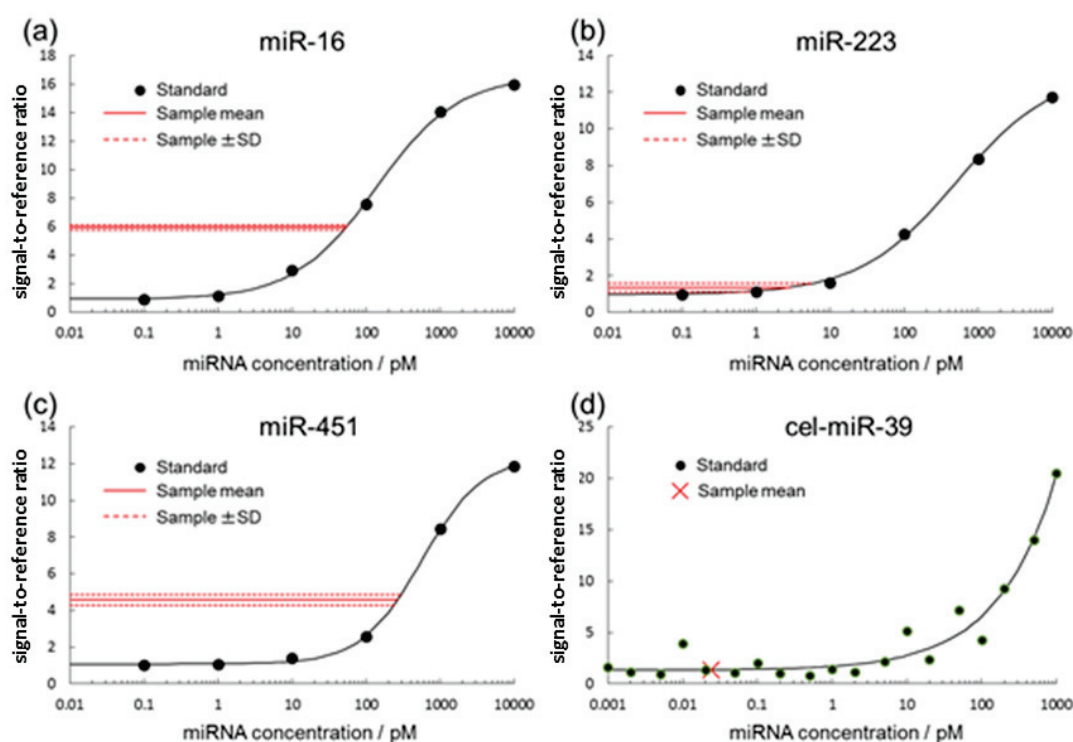


図 3 - 17 自律駆動マイクロ流体チップを用いて作成した合成 miRNA の検量線およびヒト白血球由来 total RNA 中の標的 miRNA の測定結果。ヒト白血球由来 total RNA から得られた SRR の値は赤線で示した。

図 3 - 17 の各グラフから、実験に用いた試料は miR-16, 451 が高発現であり、miR-223 は低発現であることが示された。また、線虫の体内で発現される cel-miR-39 を標的 miRNA としてチップで測定したところ、本サンプルであるヒト白血球由来 total RNA では不検出の結果となり、ヒト白血球中では発現していないことが示された。

3.3.5.2 定量逆転写 PCR を用いた total RNA 中の miRNA の検出

qRT-PCR を用いて作成した合成 miRNA の検量線と、白血球由来の total RNA (1 ng/mL) 中の標的 miRNA の測定結果を図 3 - 18 に示す。自律駆動マイクロ流体チップの測定結果と同様、ヒト白血球由来 total RNA は miR-16, 451 が高発現であり、miR-223 は低発現であることがわかった。また、線虫の体内で発現される cel-miR-39 は不検出であった。

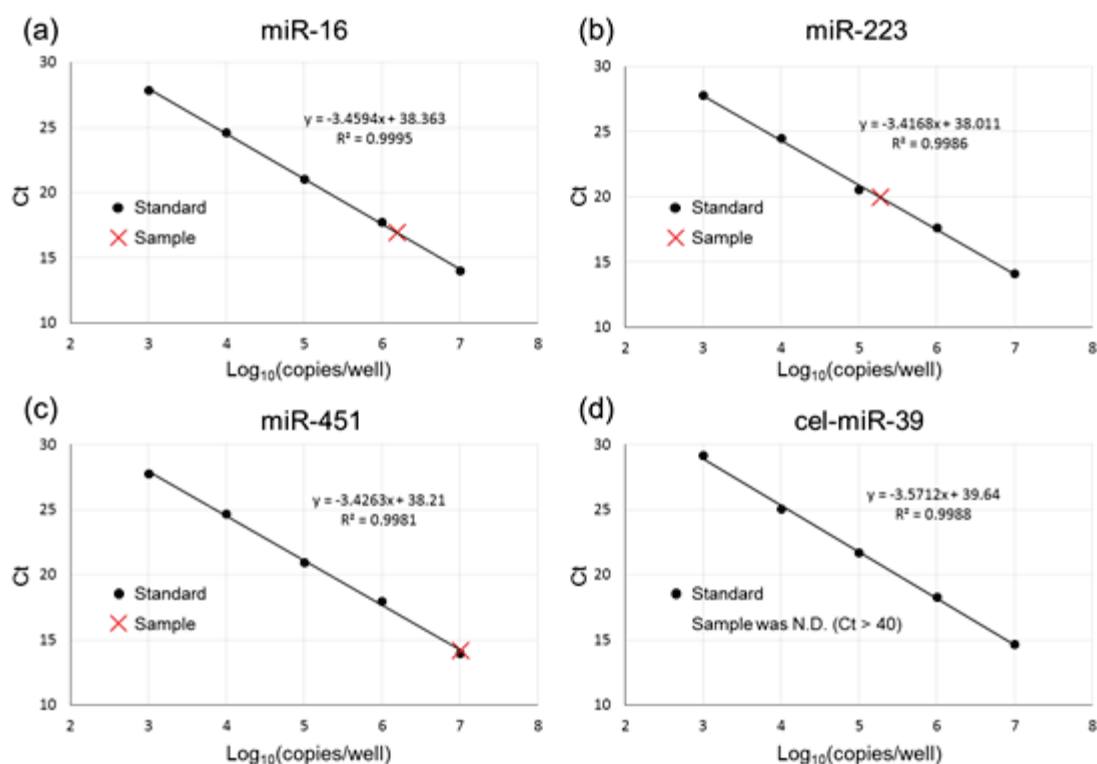


図 3 - 18 qRT-PCR を用いて作成した合成 miRNA の検量線およびヒト白血球由来 total RNA 中の標的 miRNA の測定結果。

3.3.5.3 自律駆動マイクロ流体チップと qRT-PCR の測定結果の比較

自律駆動マイクロ流体チップおよび qRT-PCR で得られたヒト白血球由来 total RNA 中の標的 miRNA の定量結果を図 3 - 19 および図 3 - 20 に示した。

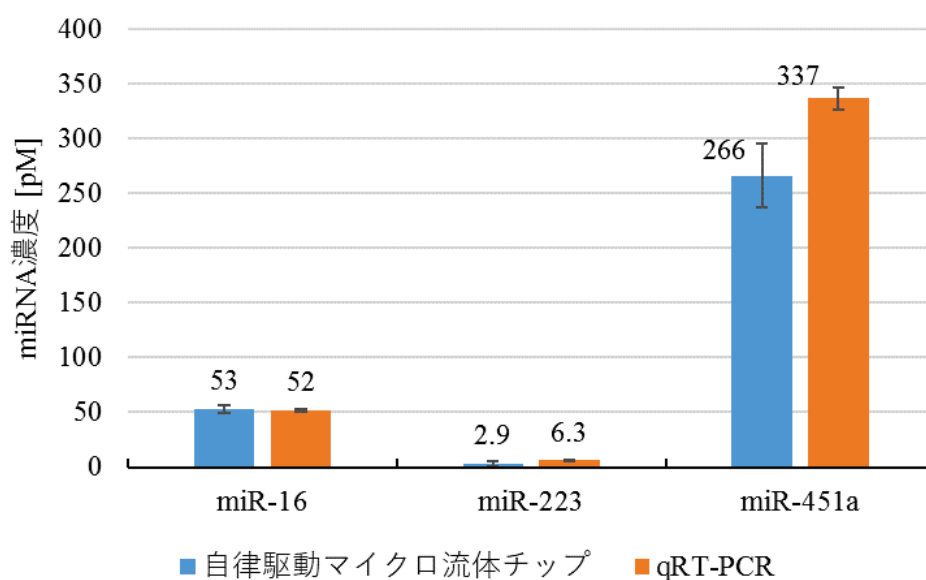


図 3 - 19 自律駆動マイクロ流体チップおよび qRT-PCR で得られたヒト白血球由来 total RNA (1 ng/mL) 中の標的 miRNA の定量結果。棒グラフの上の数字は miRNA 濃度を示す。

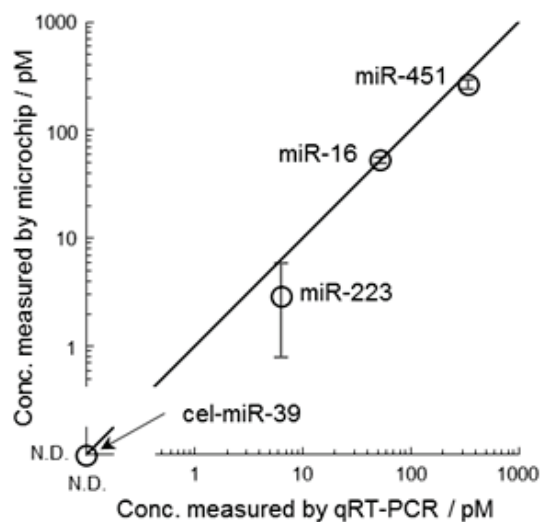


図 3 - 20 ヒト白血球由来 total RNA (1 ng/mL) を用いた自律駆動マイクロ流体チップと qRT-PCR の定量結果の相関。

図 3-19 から、miR-16, 223, 451a は自律駆動マイクロ流体チップおよび qRT-PCR の両方で定量できたが、cel-miR-39 はどちらの検出法においても不検出であることがわかった。また、qRT-PCR の定量結果を横軸、自律駆動マイクロ流体チップの定量結果を縦軸として 2 つの検出法の相関性を調べたところ、図 3-20 のような相関性が得られた。図 3-20 から、ヒト白血球中で発現している miR-16, 451a, 223 は、2 つの検出法の間において高い精度で一致していることがわかった。

以上の結果から、自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA の検出法では、生体試料由来 total RNA が十分な量の標的 miRNA をもつ場合において、特異性の高い標的 miRNA の検出が可能であることを示した。生体試料中で少ない量の標的 miRNA を検出するためには、自律駆動マイクロ流体チップを用いた検出の高感度化、または測定前の試料の予備濃縮を行う必要があることが考えられる。

3.4 結論

本章では、自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA 検出法の詳細の説明、同手法による miRNA の検量線の作成と LOD の算出、さらに自律駆動マイクロ流体による miRNA の検出の特異性評価を行った。

自律駆動マイクロ流体チップと LFDA を用いた miRNA の検出法では、標的 miRNA と相補的な 2 本のプローブ DNA を用いることによって、0.5 μ L の試料中に含まれる標的 miRNA を 20 分で検出が可能であることを説明した。また、miRNA を高感度に検出するために最適なプローブ DNA の長さを調べたところ、DP 側よりも CP 側の解離定数がわずかに小さくなるようにプローブ DNA の長さを設計する標準設計法が最適な設計法であることを示した。さらに、6 種類の miRNA を標準設計法によって設計したプローブ DNA を用いて検出し、検量線の作成および LOD の算出を行ったところ、いずれの配列の miRNA も約 1 pM の値を示し、一般的なマイクロアレイと同程度の検出感度を示した。

miRNA 検出の特異性評価では、以下の検証を行った。はじめに、miRNA 検出に対する類似配列の特異性について評価したところ、2 塩基ミスマッチ配列は 10 nM まで不検出であったが、1 塩基ミスマッチ配列では 100 pM 以上の濃度において非特異的な検出が確認された。このときの非特異的に検出された 1 塩基ミスマッチ配列の割合は 4.0 ~ 8.1% とわずかであり、類似配列に対する標的 miRNA の高い特異性が示された。次に、miRNA 前駆体を用いた特異性の評価を行ったところ、miR-16, 21, 451a の成熟型 miRNA と miRNA 前駆体を用いた検出では、成熟型 miRNA は 100 pM で十分に検出されたのに対し、ヘアピン構造を形成した miRNA 前駆体は 10 nM の濃度で不検出となった。一方、miR-500 の miRNA 前駆体は 10 nM の濃度において検出されたが、成熟型と同じ濃度である

100 pM まで濃度を下げた場合では不検出となった。そのため、miRNA 前駆体に対する成熟型 miRNA の高い特異性も示された。最後に、ヒト白血球由来の total RNA 中に含まれる標的 miRNA をマイクロ流体チップによって検出し、さらに定量逆転写 PCR で得られた結果と比較することで、自律駆動マイクロ流体チップで得られた結果の精確性について評価した。ヒト白血球由来 total RNA 中の miRNA をマイクロ流体チップで測定したところ、ヒト白血球中において miR-16 と miR-451a は高発現であり、miR-223 は低発現であることがわかった。また、検量線からそれぞれの miRNA の濃度を算出したところ、miR-16, 451a, 223 は定量逆転写 PCR の測定で得られた結果と高い精度で一致することがわかった。生体試料中のさらに低発現である miRNA を自律駆動マイクロ流体チップによって検出するには、自律駆動マイクロ流体チップの感度向上や測定前の試料の予備濃縮が必要であることが考えられた。また、ヒト白血球中では発現しない cel-miR-39 を自律駆動マイクロ流体チップで測定したところ、定量逆転写 PCR の結果と同様に不検出となった。以上より、自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA の検出では、生体試料由来 total RNA 中の標的 miRNA を高い精度で検出することが可能であることが確かめられた。

参考文献

- [1] H. Arata, H. Komatsu, A. Han, K. Hosokawa, and M. Maeda, Rapid microRNA detection using power-free microfluidic chip: coaxial stacking effect enhances the sandwich hybridization, *Analyst*, 2012, **137**, 3234–3237.
- [2] H. Arata, H. Komatsu, K. Hosokawa, and M. Maeda, Rapid and sensitive microRNA detection with laminar flow-assisted dendritic amplification on power-free microfluidic chip, *PLoS ONE*, 2012, **7**, e48329.
- [3] P. Diamandis and T. K. Christopoulos, *Immunoassay*, Academic Press, San Diego, 1996.
- [4] T. Ueno, and T. Funatsu, Label-free quantification of microRNAs using ligase-assisted sandwich hybridization on a DNA microarray, *PLoS One*, 2014, **3**, e90920.
- [5] R. Ishihara, K. Hasegawa, K. Hosokawa, and M. Maeda, Multiplex microRNA detection on a power-free microfluidic chip with laminar flow-assisted dendritic amplification, *Analytical Sciences*, 2015, **31**, 573-576.

第 4 章

自律駆動マイクロ流体チップを用いた メチル化 DNA の検出

4.1 緒言

本章では、自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA の検出法を応用することで、メチル化 DNA を迅速に検出する手法の開発を試みた。はじめに、5-メチルシトシン (5mC) を 1 つ持つ 22 塩基のメチル化 DNA (メチル化短鎖 DNA) を検出することで、抗 5mC 抗体濃度の最適化を行い、さらにメチル化短鎖 DNA の検量線の作成と LOD の算出を試みた。次に、血中の肺がんおよび大腸がんのバイオマーカーとして知られているメチル化 *SEPT9* 遺伝子^{[1], [2], [3]}を参考にして設計した、5mC を 5 つ持つ 60 塩基のメチル化 DNA (メチル化長鎖 DNA) の検量線の作成と LOD の算出を試みた。また、5mC の検出において最もよく使われているバイサルファイト処理は、5mC とその酸化物である 5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) の識別は不可能であることがわかっているため、本研究では最後に自律駆動マイクロ流体チップを用いたヒドロキシメチル化短鎖 DNA の検出を試みた。

4.2 実験方法

メチル化 DNA の検出には miRNA の検出と同形状のチップを採用した。ダブル Y 字流路のうち、左の Y 字流路はメチル化 DNA 用 (signal)、右の Y 字流路は非メチル化 DNA 用 (reference) として使用した。

メチル化 DNA の検出法に関して、第 3 章で述べた miRNA の検出法に対する変更点を以下に示す。1 つ目の変更点は、miRNA は DP を用いて検出したのに対し、メチル化 DNA は DNA 中の 5mC を特異的に検出するため、5mC を抗原として認識する抗 5mC 抗体を用いることによって DNA 中のシトシンと 5mC の識別を行った。2 つ目の変更点は、miRNA の検出では FITC 修飾ストレプトアビジン (F-SA) とビオチン標識抗ストレプトアビジン抗体 (B-anti-SA) を用いて LFDA を行ったが、メチル化 DNA の検出では B-anti-SA の代わりにビオチン標識抗 IgG 抗体 (B-anti-IgG) を用いて LFDA を行った。B-anti-IgG 抗体を用いた理由は、抗 5mC 抗体は抗体タイプが IgG であり、抗 IgG 抗体は IgG タイプの抗体を抗原として認識して結合するため、5mC に結合した抗 5mC 抗体に B-anti-IgG を結合させることで、メチル化 DNA/抗 5mC 抗体複合体に LFDA の起点となるビオチンを標識した。B-anti-IgG は LFDA の増幅剤としても利用しているため、メチル化 DNA/抗 5mC 抗体/B-anti-IgG 複合体上で F-SA と B-anti-IgG はビオチン-アビジン結合による連続的な結合が起こり、蛍光を増幅させた。なお、メチル化 DNA の検出において signal はメチル化 DNA 側の蛍光強度、reference は非メチル化 DNA 側 (DNA の配列および濃度は signal 側と同じ) の蛍光強度と定義した。また、SRR および LOD は miRNA を検出する場合と同じ方法で算出した。

4.2.1 メチル化短鎖 DNA の検出

本実験で用いた試薬および DNA 配列を表 4-1 および表 4-2 にそれぞれ示す。メチル化短鎖 DNA は 22 塩基中に 5mC を 1 つ含むように設計した。また、全ての試薬の濃度調整は miRNA の検出と同様、Blocking buffer を用いた。

表 4-1 メチル化短鎖 DNA の検出に使用した試薬

試薬名	メーカー	製品番号
DIG Wash and Block buffer set blocking solution	Roche Diagnostics	11585762001
Ultra Pure 20×SSC Buffer	invitrogen	15557-044
10% SDS solution	和光純薬工業	311-90271
10% Tween20	SIGMA Aldrich	E108
5-methylcytosine antibody (mAb) (Clone 33D3)	Active Motif	39649
FITC conjugated streptavidin (F-SA)	SIGMA Aldrich	S3762-5MG
Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody, Human Serum Adsorbed (B-anti-IgG)	KPL	16-18-06

表 4-2 短鎖 DNA とプローブの配列（メチル化短鎖 DNA）

名称	配列 (5'→3')	メーカー
Capture DNA M-1	NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTT CAGAAT CCTG C	ユーロフィン
メチル化短鎖 DNA (22 塩基)	TAC <u>G</u> TTATCAGACTGATGTTGA	ジーンデザイン
非メチル化短鎖 DNA (22 塩基)	TAC GTTATCAGACTGATGTTGA	ユーロフィン

※下線部のシトシンは 5mC

以下に測定の手順を示す。はじめに、流路内を Blocking buffer でブロッキングをした。次に、流路底面に固定しているプローブ DNA (Capture DNA M-1) と標的メチル化短鎖 DNA で 2 重鎖を形成し、標的メチル化短鎖 DNA を捕捉した。捕捉した標的メチル化短鎖 DNA は部分的に 2 重鎖を形成しているため、標的メチル化短鎖 DNA の二重鎖を形成していない部分に含まれる 5mC に対して抗 5mC 抗体を結合させた。さらに B-anti-IgG を抗 5mC 抗体に結合させた後、抗 5mC 抗体に結合した B-anti-IgG のビオチンを起点にして LFDA による蛍光の増幅を行った。メチル化短鎖 DNA の測定手順を図 4-1 に示す。なお、ブランクは Blocking buffer を左右の流路に送液することで測定を行った。

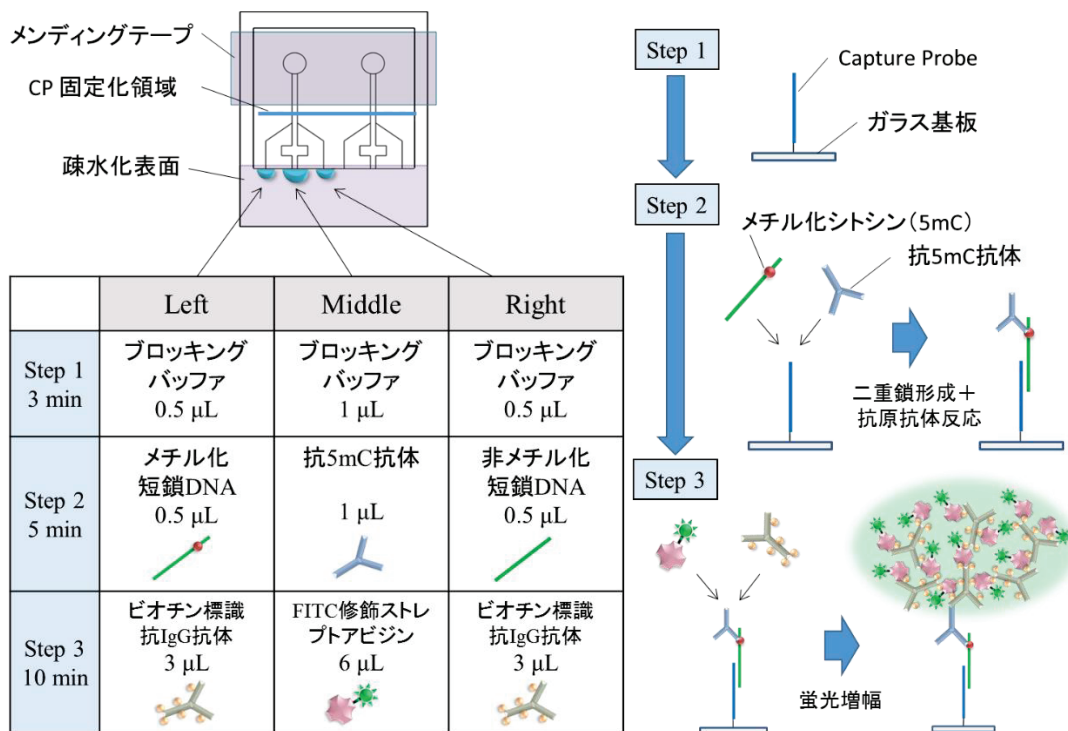


図 4 - 1 メチル化短鎖 DNA の検出

メチル化短鎖 DNA の測定手順

- ① すべての流路に Blocking buffer を送液し、流路内を Blocking buffer で満たすことで流路内のブロッキングを行った (Step 1)。
- ② 左の入口にメチル化短鎖 DNA を 0.5 μ L, 右の入口に非メチル化短鎖 DNA を 0.5 μ L, 中央の入口に抗 5mC 抗体を 1 μ L 送液した (Step 2)。流路内ではメチル化短鎖 DNA と Capture DNAM-1 によるハイブリダイゼーションと、メチル化短鎖 DNA 中の 5mC と抗 5mC 抗体による抗原抗体反応を行った。
- ③ 左右の流路の入口に 10 μ g/mL B-anti-IgG を 3 μ L, 中央の入口に 5 μ g/mL F-SA を 6 μ L 送液し、蛍光の増幅を行った (Step 3)。全ての流路の入口に試薬を滴下した後、1 分毎に蛍光の観察を行った。

4.2.2 メチル化長鎖 DNA の検出

本実験では、メチル化短鎖 DNA (22 塩基) よりも長い配列として設計したメチル化長鎖 DNA (60 塩基) 中の 5mC の検出を試みた。本実験で用いた DNA 配列を表 4 - 3 に示す。本実験で用いたメチル化長鎖 DNA は、大腸がんなどのバイオマーカーとして知られているメチル化 *SEPT9* 遺伝子配列の一部と同じ配列となるように設計し、60 塩基中に 5mC を 5 つ持つように設計した。また、メチル化長鎖 DNA の捕捉は表 4 - 3 中の Capture DNA M-2 を用いた。検出に用いた試薬はメチル化短鎖 DNA の検出と同じものを使用し、全ての試薬の濃度調整は Blocking buffer を用いた。メチル化長鎖 DNA の測定手順を図 4 - 2 に示す。なお、ブランクは Blocking buffer を左右の流路に送液することで測定を行った。

表 4 - 3 長鎖 DNA とプローブの配列

名称	配列 (5'→3') ,	メーカー
Capture DNA M-2 メチル化長鎖 DNA (60 塩基)	NH2-TTTTTTTTTTTTTTTT CAGAAT CCT TGC CGG ACC CCG CGG TCAACG CGC AGC TGG ATG GGATCATTT CGG ACT TCG AAG GTG GGT GCT	ユーロフィン ジーンデザイン
非メチル化長鎖 DNA (60 塩基)	CGG ACC CCG CGG TCAACG CGC AGC TGG ATG GGATCATTT CGG ACT TCG AAG GTG GGT GCT	ユーロフィン

※下線部のシトシンは 5mC

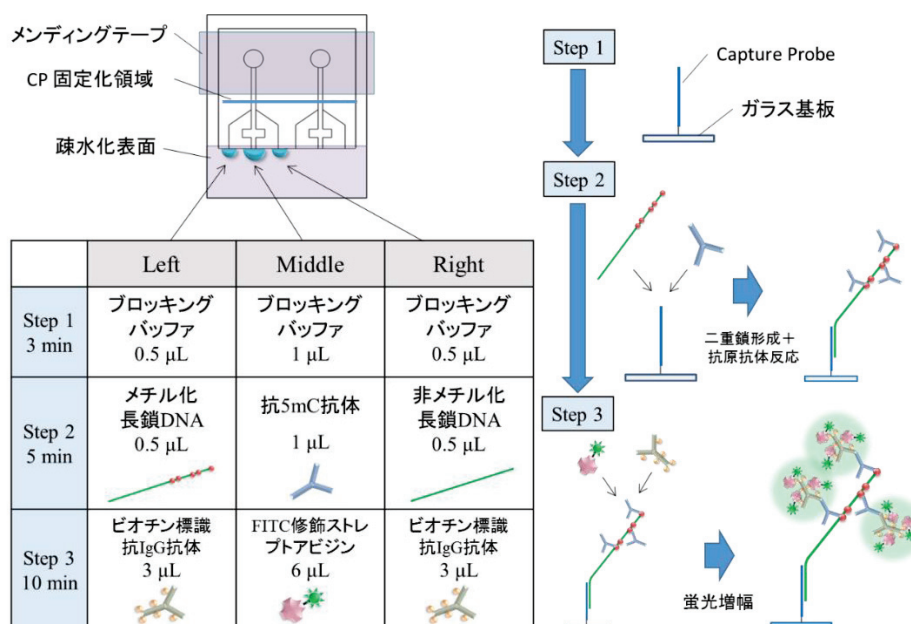


図 4 - 2 メチル化長鎖 DNA の検出

メチル化長鎖 DNA の測定手順

- ① すべての流路の入口に Blocking buffer を送液し、流路内を Blocking buffer で満たすことで流路内のブロッキングを行った (Step 1)。
- ② 左の入口にメチル化長鎖 DNA を 0.5 μ L, 右の入口に非メチル化長鎖 DNA を 0.5 μ L, 中央の入口に抗 5mC 抗体を 1 μ L 送液した (Step 2)。流路内ではメチル化長鎖 DNA と Capture DNA M-2 によるハイブリダイゼーションと、メチル化長鎖 DNA 中の 5mC と抗 5mC 抗体による抗原抗体反応を行った。
- ③ 左右の流路の入口に 5 μ g/mL B-anti-IgG を 3 μ L, 中央の入口に 2.5 μ g/mL F-SA を 6 μ L 送液し、蛍光の増幅を行った (Step 3)。この Step では全ての流路の入口に試薬を滴下した後、1 分毎に蛍光の観察を行った。

4.2.3 ヒドロキシメチル化短鎖 DNA の検出

本研究は、自律駆動マイクロ流体チップを用いることで、メチル化シトシンの脱メチル化の過程で生じる 5-hydroxymethylated cytosine (5hmC) を含んだ DNA (ヒドロキシメチル化 DNA) の特異的な検出を行った。本実験では、はじめに抗 5hmC 抗体の濃度最適化を行い、次に各濃度のヒドロキシメチル化 DNA の検量線の作成と LOD の算出を行った。

本実験では、22 塩基中に 5hmC を 1 つ含むように設計したヒドロキシメチル化短鎖 DNA を標的 DNA として検出した (表 4-4)。なお、標的 DNA として用いるヒドロキシメチル DNA はメチル化短鎖 DNA と同じ配列を採用しているため、Capture Probe DNA はメチル化短鎖 DNA の検出時と同じプローブ DNA を使用した。また、全ての試薬の濃度調整は Blocking buffer によって行われた。

表 4-4 短鎖 DNA とプローブの配列 (ヒドロキシメチル化短鎖 DNA)

名称	配列 (5'→3')	メーカー
Capture DNA M-1	NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTT CAGAAT CCTTGC	ユーロフィン
ヒドロキシメチル化短鎖 DNA	TAC <u>G</u> TTATCAGACTGATGTTGA	ジーンデザイン
非ヒドロキシメチル化短鎖 DNA	TAC GTTATCAGACTGATGTTGA	ユーロフィン

※下線部のシトシンは 5hmC

以下にヒドロキシメチル化短鎖 DNA の測定の手順を示す。はじめに、流路内を Blocking buffer でブロッキングをした。次に、Capture DNA M-1 と標的ヒドロキシメチル化短鎖 DNA で 2 重鎖を形成し、標的ヒドロキシメチル化短鎖 DNA を捕捉した。捕捉した標的ヒドロキシメチル化短鎖 DNA は部分的に 2 重鎖を形成しているため、標的ヒドロキシメチル化短鎖 DNA の残りの 1 本鎖部分に含ま

れる 5hmC に抗 5hmC 抗体を結合させてヒドロキシメチル化短鎖 DNA／抗 5hmC 抗体複合体を作製した。さらに B-anti-IgG をヒドロキシメチル化短鎖 DNA／抗 5hmC 抗体複合体中の抗 5hmC 抗体に結合させた後，結合した B-anti-IgG 中のビオチンを起点に LFDA を用いた蛍光の増幅を行った。ヒドロキシメチル化短鎖 DNA の測定手順を図 4 - 3 に示す。

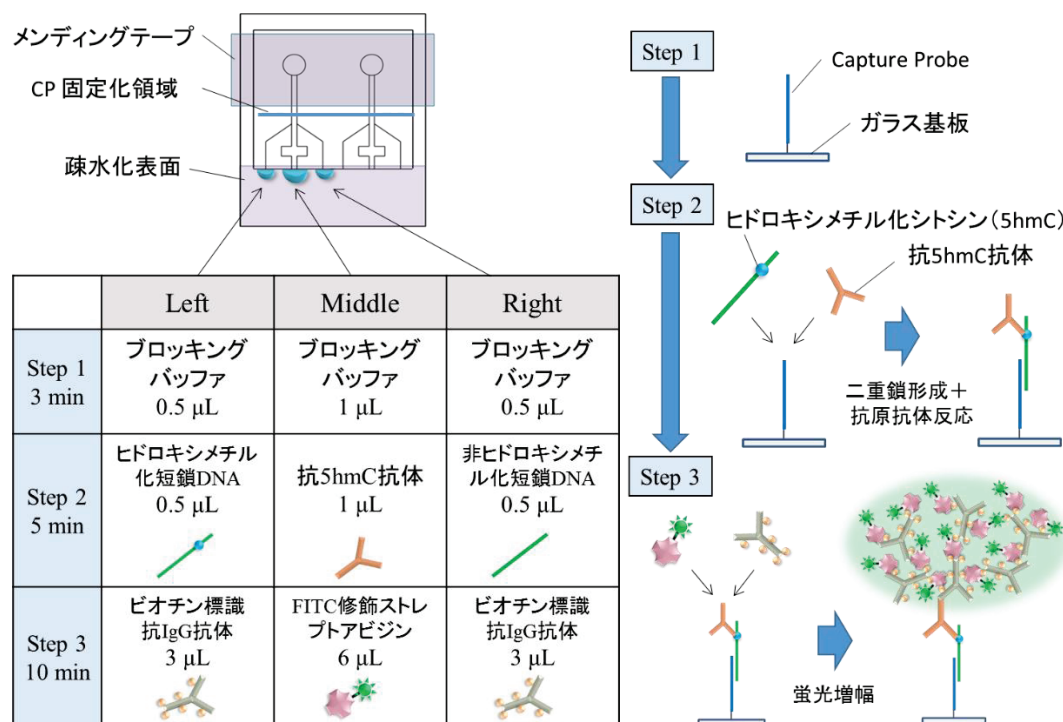


図 4 - 3 ヒドロキシメチル化短鎖 DNA の検出

ヒドロキシメチル化短鎖 DNA の測定手順

- ①すべての流路に Blocking buffer を送液し，流路内を Blocking buffer で満たすことで流路内のブロッキングを行った (Step 1)。
- ②左の入口にヒドロキシメチル化短鎖 DNA を 0.5 μ L，右の入口に非ヒドロキシメチル化短鎖 DNA を 0.5 μ L，中央の入口に抗 5hmC 抗体を 1 μ L 送液した (Step 2)。流路内ではヒドロキシメチル化短鎖 DNA と Capture DNAM-1 によるハイブリダイゼーションと，ヒドロキシメチル化短鎖 DNA 中の 5hmC と抗 5hmC 抗体による抗原抗体反応を行った。
- ③左右の流路の入口に 10 μ g/mL B-anti-IgG を 3 μ L，中央の入口に 5 μ g/mL F-SA を 6 μ L 送液し，蛍光の増幅を行った (Step 3)。すべての流路の入口に試薬を滴下した後，1 分毎に蛍光の観察を行った。

4.3 実験結果および考察

4.3.1 メチル化短鎖 DNA の検出

4.3.1.1 抗 5mC 抗体の濃度の最適化

本実験では、はじめにメチル化 DNA 中の 5mC を最も感度良く検出するため、メチル化短鎖 DNA を用いて抗 5mC 抗体濃度の最適化を行った。抗 5mC 抗体以外の試薬の濃度は、短鎖 DNA を 1000 nM, F-SA を 5 $\mu\text{g/mL}$, B-anti-IgG を 10 $\mu\text{g/mL}$ で一定とした。抗 5mC 抗体は 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ の 4 つの濃度でメチル化短鎖 DNA の検出を行ったところ、それぞれの抗 5mC 抗体濃度において、図 4-4 のような蛍光増幅のタイムコースが得られた。また、それぞれの抗 5mC 抗体濃度で得られた蛍光タイムコースから、miRNA の検出と同様の手法を用いて SRR を算出した。

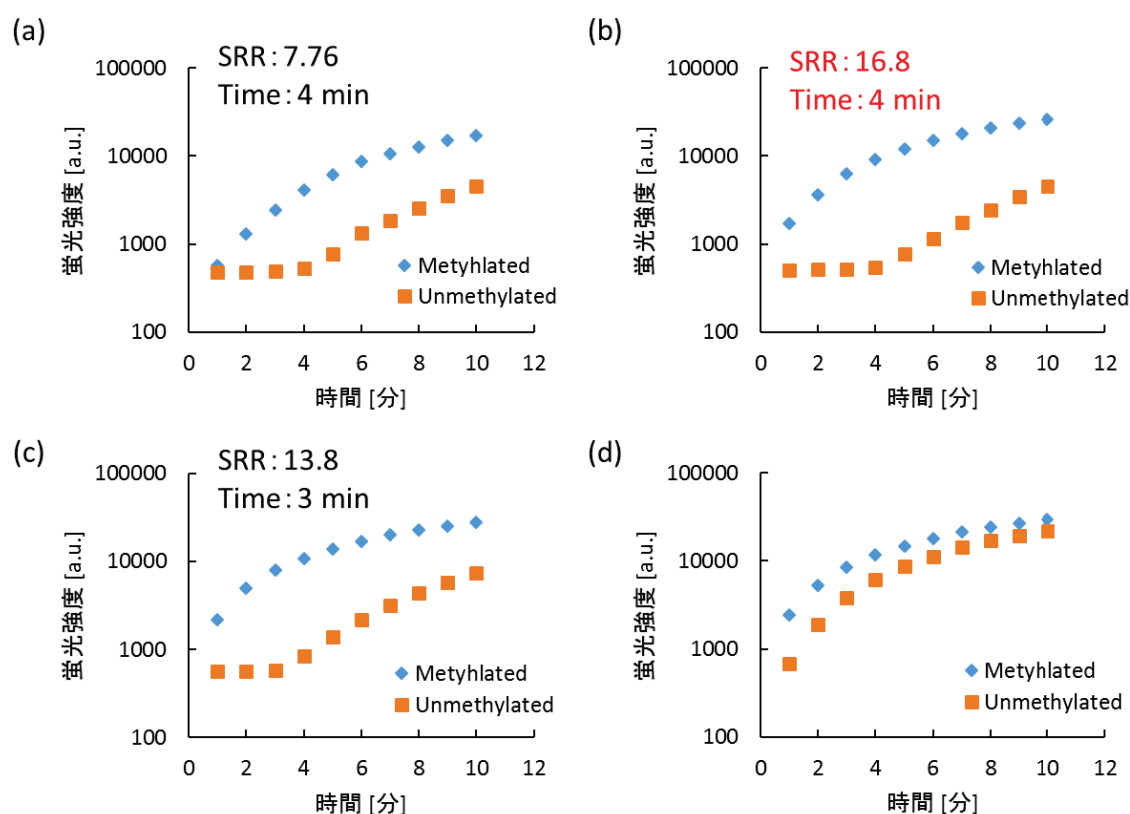


図 4 - 4 異なる濃度の抗 5mC 抗体でメチル化短鎖 DNA を検出したときの蛍光増幅のタイムコース。抗 5mC 抗体の濃度はそれぞれ(a) 0.1 $\mu\text{g/mL}$, (b) 1 $\mu\text{g/mL}$, (c) 10 $\mu\text{g/mL}$, (d) 100 $\mu\text{g/mL}$ を示す。また、各グラフ上には reference 側の蛍光増幅開始時間とその時間における SRR を示した。

図 4 - 4 の結果から、抗 5mC 抗体の濃度が増加するほど、signal 側の蛍光増幅が強くなることが明らかになった。しかし、抗 5mC 抗体の濃度が 10 $\mu\text{g/mL}$ の場合は reference 側の蛍光の増幅も強くなり、100 $\mu\text{g/mL}$ の場合では SRR を算出することができなくなった。したがって、本実験では SRR が最も大きい 1 $\mu\text{g/mL}$ が抗 5mC 抗体の最適な濃度となり、以降のメチル化 DNA の検出において抗 5mC 抗体の濃度はすべて 1 $\mu\text{g/mL}$ とした。また、本実験で得られた蛍光増幅時の蛍光画像を図 4 - 5 に示す。

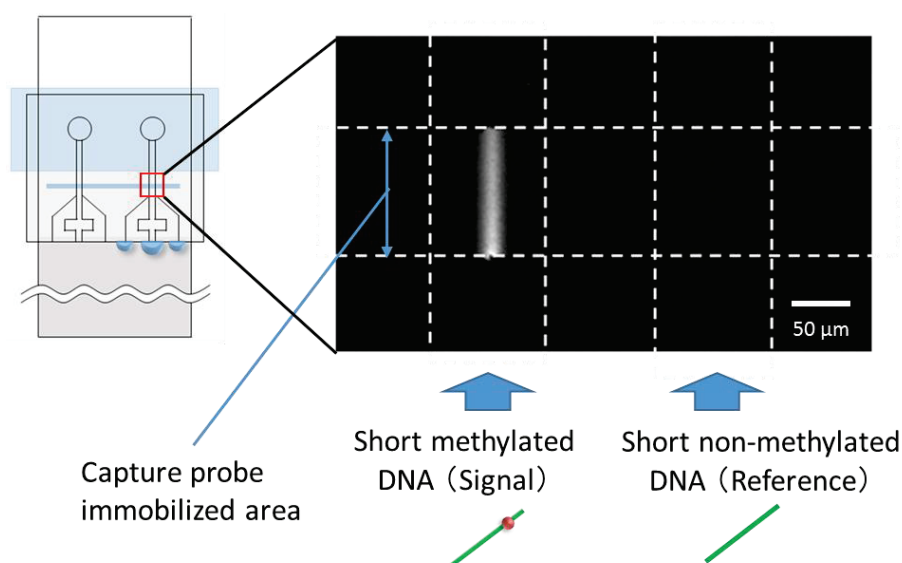


図 4 - 5 メチル化短鎖 DNA を検出したときの蛍光画像（DNA 濃度：100 nM，蛍光増幅時間：3 分）。左流路には 100 nM メチル化短鎖 DNA，右流路には 100 nM メチル化短鎖 DNA を送液した。

図 4 - 5 から、標的 DNA であるメチル化短鎖 DNA を流した左の流路中では、CP 固定領域と 2 つの層流の界面が交わる部分では蛍光が強く増幅しており、メチル化 DNA を検出していることがわかる。一方、非メチル化短鎖 DNA を流した右の流路中では、上記の領域で蛍光増幅していないことから、本手法を用いることで、メチル化 DNA の特異的な検出が可能であることがわかった。また、本手法におけるメチル化 DNA の検出時間は約 20 分となり、従来のメチル化 DNA 検出法よりも短時間でメチル化 DNA を検出することに成功した。さらに、先行研究における LFDA^[4]では、連続架橋のためにビオチン-アビジン結合以外に、ストレプトアビジンと抗ストレプトアビジン抗体による抗原抗体反応の効果を期待して B-anti-SA を用いていたが、本実験では F-SA と B-anti-IgG によるビオチン-アビジン結合だけで蛍光増幅を行えており、抗原抗体反応は LFDA において必須ではないことが初めて分かった。

4.3.1.2 メチル化短鎖 DNA の検量線と検出限界

各濃度のメチル化短鎖 DNA の検出を行ったところ、図 4 - 6 のような検量線が得られた。ブランクは Blocking buffer を左右の流路に流すことで測定した。

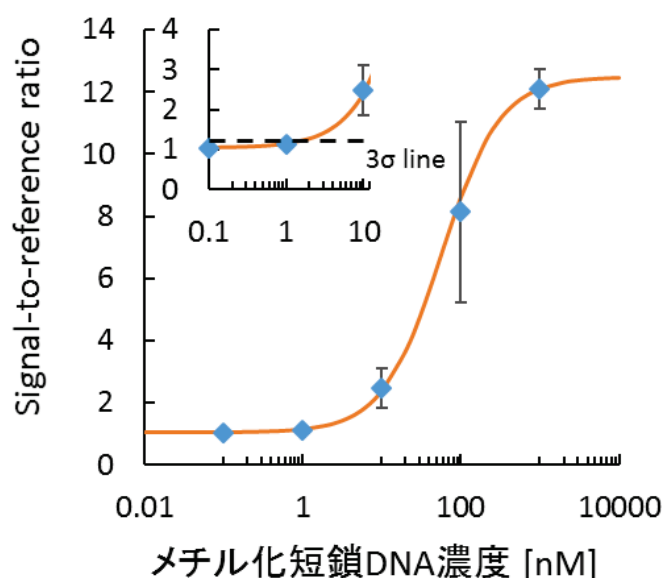


図 4 - 6 メチル化短鎖 DNA の検量線

図 4 - 6 からメチル化短鎖 DNA の LOD を算出したところ、LOD は 1.2 nM (= 8.1 $\mu\text{g/mL}$) となった。3.3.2 で示したように、自律駆動マイクロ流体チップを用いて miRNA を検出した場合では、LOD は約 1 pM を示した。それに対してメチル化 DNA の検出では感度が 3 桁ほど低下しており、この感度の違いは以下の違いが原因として考えられる。1 つ目は、miRNA は 2 ヲ所の RNA-DNA 結合 (miRNA と CP または DP の結合) で検出していたのに対して、メチル化 DNA の検出では 1 ヲ所の DNA-DNA 結合と 5mC と抗 5mC 抗体による抗原抗体反応に置き換わっている点である。2 つ目は、LFDA の起点となるビオチンの標識では抗 5mC 抗体と B-anti-IgG による抗原抗体反応を必ず行う必要があるため、LFDA のビオチン-アビジン結合の一部が抗原抗体反応に置き換わっている点である。これらの弱い結合への置き換わりが重なることによって、メチル化 DNA は miRNA よりも感度が低くなったことが考えられる。なお、血中に含まれる遊離 DNA 濃度は数 ng/mL であり、早期ステージのがんである場合、がん細胞由来の DNA は血中遊離 DNA 中の 0.1% 程度であると言われている^[5]。そのため、血中の遊離 DNA から標的メチル化 DNA のみを十分に検出するには感度の向上が求められる。この問題の解決策として、DNA との結合親和性が高い人工核酸を用いたプローブ DNA の使用や抗 5mC 抗体のビオチン標識化が考えられる。

4.3.2 メチル化長鎖 DNA の検量線と検出限界

自律駆動マイクロ流体チップを用いてメチル化長鎖 DNA を検出したところ、0.5 μL の試料中からメチル化長鎖 DNA を 20 分で検出することが可能だった。また、各濃度のメチル化長鎖 DNA の検出を行ったところ、図 4 - 7 のような検量線が得られた。

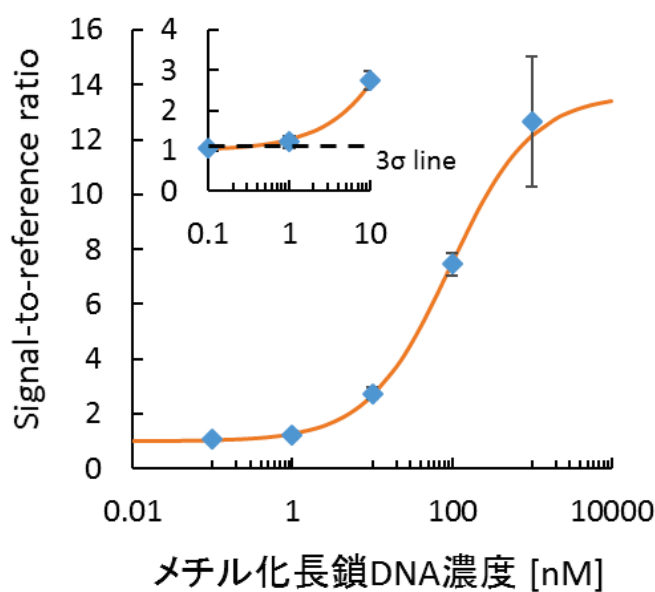


図 4 - 7 メチル化長鎖 DNA の検量線

図 4 - 7 からメチル化長鎖 DNA の LOD は 0.4 nM (=7.5 $\mu\text{g/mL}$) となった。この値はメチル化短鎖 DNA を検出したときと同様、血中の遊離 DNA から標的メチル化 DNA のみを十分に検出するには感度の向上が求められた。

以上より、自律駆動マイクロ流体チップを用いることで、少ない試料中のメチル化 DNA を短時間で検出することに成功した。しかし、本手法を診断で用いるためには、検出感度の改善が必要であることがわかった。

4.3.3 ヒドロキシメチル化短鎖 DNA の検出

ヒドロキシメチル化短鎖 DNA の検出において、signal はヒドロキシメチル化短鎖 DNA 側の蛍光強度、reference は非ヒドロキシメチル化短鎖 DNA 側 (DNA の配列および濃度は signal 側と同じ) の蛍光強度と定義した。また、SRR および LOD は miRNA 検出の場合と同じ方法で算出した。

4.3.1.1 抗 5hmC 抗体の濃度の最適化

本実験では、ヒドロキシメチル化短鎖 DNA 中の 5hmC を最も感度良く検出するため、初めに抗 5hmC 抗体の濃度の最適化を行った。抗 5hmC 抗体以外の試薬の濃度は短鎖 DNA を 1000 nM, F-SA を 5 $\mu\text{g/mL}$, B-anti-IgG を 10 $\mu\text{g/mL}$ で一定とした。抗 5mC 抗体は 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ の 4 種類の濃度としてヒドロキシメチル化短鎖 DNA の検出を行ったところ、それぞれの抗 5mC 抗体濃度において図 4 - 8 のような蛍光増幅のタイムコースが得られた。

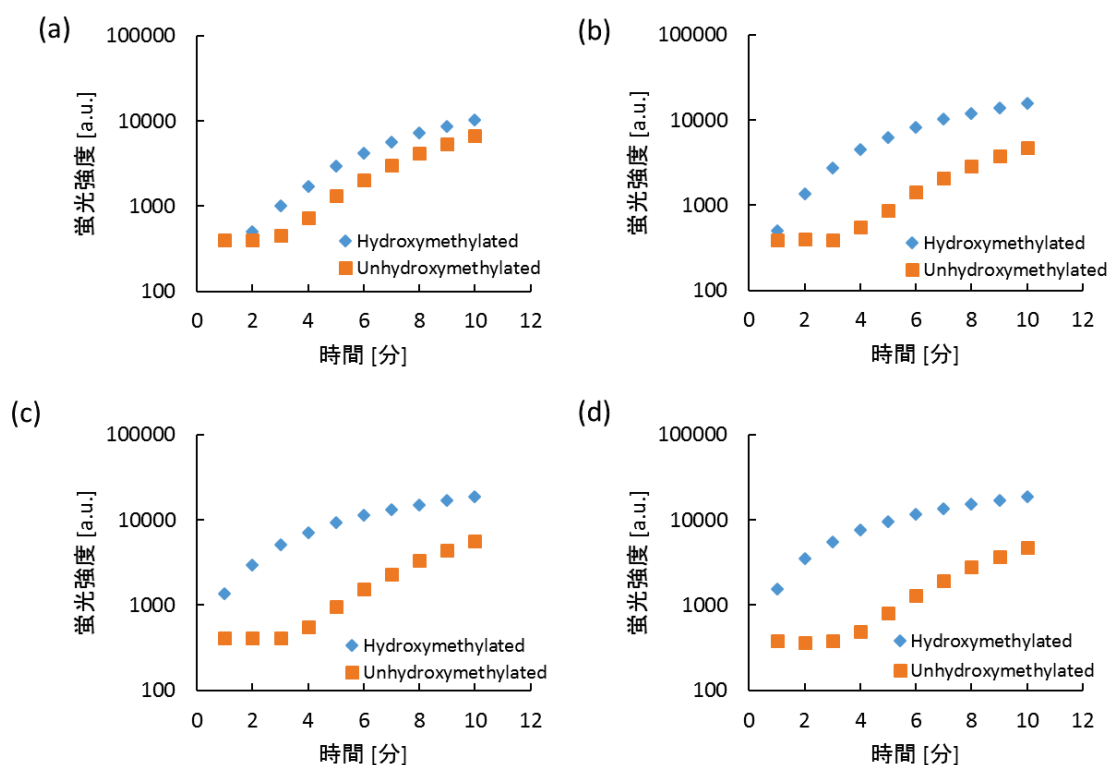


図 4 - 8 抗 5hmC 抗体の濃度変化による蛍光増幅タイムコース。抗 5hmC 抗体の濃度は (a) 0.1 $\mu\text{g/mL}$, (b) 1 $\mu\text{g/mL}$, (c) 10 $\mu\text{g/mL}$, (d) 100 $\mu\text{g/mL}$ とした。

図 4 - 8 の結果から、抗 5hmC 抗体の各濃度の SRR を算出したところ、0.1 $\mu\text{g/mL}$ は 2.21, 1 $\mu\text{g/mL}$ は 6.98, 10 $\mu\text{g/mL}$ は 12.3, 100 $\mu\text{g/mL}$ は 15.3 となり、抗 5hmC 抗体の濃度が増加するほど SRR は大きくなった。本実験で用意した抗 5hmC 抗体の原液濃度は 1000 $\mu\text{g/mL}$ であり、測定に用いる全ての試薬はブロッキングバッファで一度は希釈する必要があるため、原液を 1/10 に希釈した 100 $\mu\text{g/mL}$ が測定に使える最大濃度であると考えられる。したがって、本実験で使用できる抗 5hmC 抗体濃度の範囲では、SRR が最も大きい 100 $\mu\text{g/mL}$ が抗 5hmC 抗体の最適な濃度とした。また、本実験によってヒドロキシメチル化短鎖 DNA の検出時間

は約 20 分となり、本手法を用いることで、短時間でヒドロキシメチル化短鎖 DNA を検出することが可能であることが分かった。

4.3.1.2 ヒドロキシメチル化短鎖 DNA の検量線と検出限界

各濃度のヒドロキシメチル化短鎖 DNA の検出を行ったところ、図 4 - 9 のような検量線が得られた。ブランクは Blocking buffer を左右の流路に流すことで測定を行った。

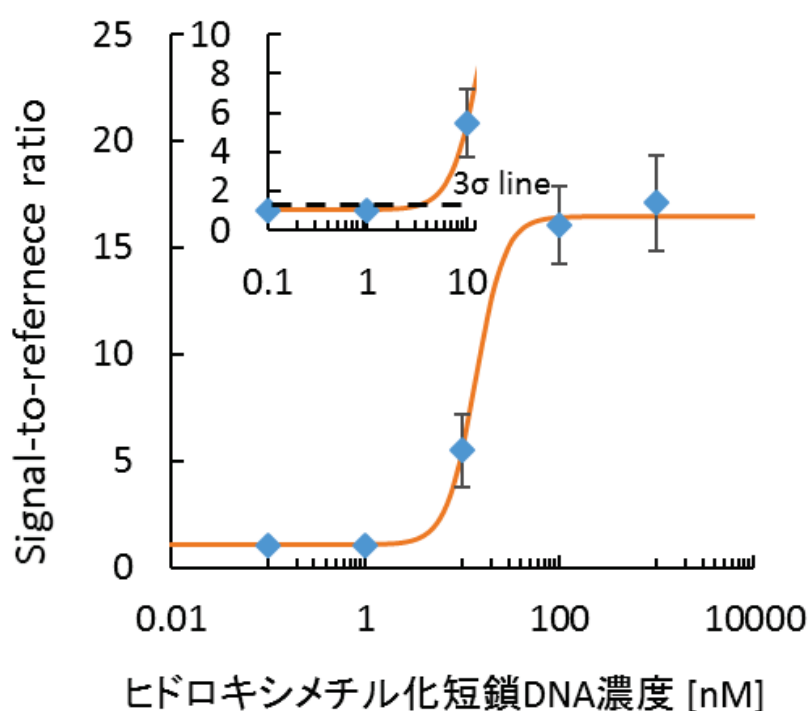


図 4 - 9 ヒドロキシメチル化短鎖 DNA の検量線

図 4 - 9 からヒドロキシメチル化短鎖 DNA の LOD は 3.0 nM (= 20 $\mu\text{g/mL}$) となり、メチル化 DNA と同程度の検出感度を示した。したがって、ヒドロキシメチル化短鎖 DNA はメチル化 DNA と同様、検出感度の向上が必要であることが考えられた。

以上より、自律駆動マイクロ流体チップを用いることで、ヒドロキシメチル化短鎖 DNA を短時間で検出することは可能であったが、メチル化 DNA と同様、検出感度の改善が必要であることがわかった。

4.4 結論

本章では、自律駆動マイクロ流体チップを用いたメチル化 DNA の検出について述べた。初めに、22 塩基中に 1 個の 5mC を含む短い DNA（メチル化短鎖 DNA）を用いて抗 5mC 抗体濃度の最適化を行ったところ、抗 5mC 抗体の最適な濃度は 1 $\mu\text{g/mL}$ であることがわかった。また、メチル化短鎖 DNA の検出時間は約 20 分であり、従来のメチル化 DNA 検出法（数時間～数十時間）よりも短時間でメチル化 DNA を検出することができた。次に、メチル化短鎖 DNA の LOD を求めたところ 1.2 nM (= 8.1 ng/mL) であった。血液中に含まれる DNA 濃度は数 ng/mL であり、診断のために血中から標的メチル化 DNA を精度良く検出するためには、検出感度の向上が必要であることが分かった。次に、大腸がんのバイオマーカーとして知られている *SEPT9* 遺伝子配列を参照して、60 塩基中に 5 個の 5mC を含む長い DNA（メチル化長鎖 DNA）を設計した。この配列の LOD は 0.4 nM (= 7.5 ng/mL) と求まり、メチル化短鎖 DNA と同程度の値を示した。最後に、DNA の脱メチル化において重要な役割を果たす 5hmC を含んだ DNA を検出したところ、LOD は 3.0 nM (= 20 ng/mL) となった。この LOD の値はメチル化 DNA と同程度の結果であり、メチル化 DNA と同様に感度の改善が必要であることがわかった。これらの検出感度の問題を解決するには、DNA との結合親和性が高い人工核酸（例えばロックド核酸 (Locked nucleic acid; LNA) など）を用いるなど、プローブ DNA を工夫することにより解決できると考えられる。

参考文献

- [1] T. Powrozek, P. Krawczyk, T. Kucharczyk, and J. Milanowski, Septin 9 promoter region methylation in free circulating DNA—potential role in noninvasive diagnosis of lung cancer: preliminary report, *Med. Oncol.*, 2014, **31**, 917.
- [2] T. R. Church, M. Wandell, C. Lofton-Day, S. J. Mongin, M. Burger, et al., Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer, *Gut*, 2014, **63**, 317.
- [3] T. deVos, et al., Circulating Methylated SEPT9 DNA in Plasma Is a Biomarker for Colorectal Cancer, *Clin. Chem.*, 2009, **55**, 1337–1346.
- [4] H. Arata, H. Komatsu, K. Hosokawa, and M. Maeda, Rapid and sensitive microRNA detection with laminar flow-assisted dendritic amplification on power-free microfluidic chip, *PLoS ONE*, 2012, **7**, e48329.
- [5] F. Diehl, M. Li, D. Dressman, Y. He, D. Shen, et al., Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**, 16368–16373.

第 5 章

本論文のまとめ

第1章では、本研究における序説を述べた。近年、血液のような体液中に含まれるバイオマーカーとして核酸、特にマイクロ RNA (miRNA) やメチル化した DNA が注目されている。体液中の微量の核酸を簡便・迅速に検出することで、将来的にがんを含んだ疾患の早期診断が可能になる。外部ポンプを必要としない「自律駆動マイクロ流体チップ」と、2種類の蛍光増幅剤を用いて流路中で蛍光を増幅させる「層流樹状増幅法」を組み合わせることにより、少ない試料 (0.5 μ L) 中の miRNA を簡便・迅速・高感度で検出することが可能であることが報告されている。本研究では、上記の技術を用いた miRNA 検出法が生体試料 (細胞や血液) 中の特定の miRNA を検出することが可能であることを明らかにするため、自律駆動マイクロ流体チップを用いて生体試料由来 miRNA の特異的な検出を行った。また、miRNA 検出法を応用することで、がんのバイオマーカーとして知られているメチル化 DNA の迅速な検出を行った。

第2章では、自律駆動マイクロ流体チップの作製法について述べた。自律駆動マイクロ流体チップの作製には、プローブ DNA を固定したガラス基板と、マイクロスケールの流路を持つ PDMS チップを組み合わせることで行った。

第3章では、初めに自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA の検出法の詳細について述べた。標的 miRNA を高感度に検出するためにプローブ DNA の長さの最適化を行ったところ、標準設計法が最適であることを示した。また、6種類の miRNA の検出限界 (limit of detection; LOD) を算出したところ、約 1 pM の値を示した。次に、自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA 検出の特異性について評価した。1つ目の評価では、類似配列の miRNA の検出の特異性を確認した。has-miR-204 と 2 塩基ミスマッチ (hsa-miR-211), 1 塩基ミスマッチ (mmu-miR-204) をそれぞれ検出したところ、has-miR-204 は 10 pM まで検出が可能であった。2 塩基ミスマッチでは 10 nM まで不検出であった。1 塩基ミスマッチでは 100 pM ~ 10 nM の濃度範囲において非特異的な検出が確認されたが、検量線から非特異的に検出された RNA の濃度を計算したところ、非特異的に検出された mmu-miR-204 の割合は 4.0 ~ 8.1% とわずかであり、類似配列中における miRNA の高い識別能が示された。2つ目の評価では、前駆体 RNA に対する成熟型 miRNA 検出の特異性を確認した。3種類の miRNA 前駆体とその成熟型 miRNA を検出したところ、成熟型 miRNA は 100 pM で十分に検出されたのに対し、ヘアピン構造をとっている miRNA 前駆体 は 10 nM でも不検出となり、成熟型 miRNA に対する特異性も示された。3つ目の評価では、自律駆動マイクロ流体チップを用いて白血球由来の total RNA 中に含まれる標的 miRNA を検出し、定量逆転写 PCR で得られた結果と比較することで、自律駆動マイクロ流体チップで得られた結果の精確性について評価した。白血球中で発現される miR-16, 451, 223 を自律駆動マイクロ流体チップで測定し、

それぞれの検量線から濃度を算出したところ、定量逆転写 PCR の測定で得られた結果と高い精度で一致した。また、線虫の体内で発現する cel-miR-39 を自律駆動マイクロ流体チップで測定したところ、定量逆転写 PCR の結果と同様にヒト白血球由来 total RNA 中では不検出となった。以上の結果から、自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA の検出では生体試料由来の total RNA に含まれている標的 miRNA に対する高い識別能を持つことが示された。

第4章では、自律駆動マイクロ流体チップを用いたメチル化 DNA の検出について述べた。メチル化 DNA の検出には miRNA の検出で使ったチップと同形状のものを採用し、5-メチルシトシン (5mC) の検出には抗 5mC 抗体を用いた。初めに、22 塩基中に 1 個の 5mC を含む短い DNA (メチル化短鎖 DNA) を用いて抗 5mC 抗体濃度の最適化を行ったところ、最適な濃度は 1 $\mu\text{g/mL}$ と判断した。また、メチル化短鎖 DNA の検出時間は約 20 分であり、従来のメチル化 DNA 検出法 (数時間~数十時間) よりも短時間でメチル化 DNA を検出することが可能であった。次に、メチル化短鎖 DNA の LOD を求めたところ 1.2 nM (= 8.1 ng/mL) であった。血中の DNA 濃度は数 ng/mL であるため、血中から標的メチル化 DNA のみを十分に検出するには感度の向上が必要であることが分かった。次に、大腸がんのバイオマーカーとして知られている SEPT9 遺伝子配列を参照して設計した 60 塩基中に 5 個の 5mC を含む長い DNA (メチル化長鎖 DNA) の LOD は 0.4 nM (= 7.5 ng/mL) と求まり、メチル化短鎖 DNA と同程度の値を示した。

本研究の成果は、自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA 検出法の特異性を評価することで、生体試料由来の total RNA 中でも精確に標的 miRNA を検出できることを示した。また、自律駆動マイクロ流体チップを用いた迅速なメチル化 DNA の検出法を開発した。miRNA 検出の特異性評価では、類似配列の miRNA や miRNA 前駆体 に対する高い識別能が明らかになり、多量の RNA を含む生体試料中から標的 miRNA のみを特異的に検出することが可能であることが分かった。今後は、がん細胞や血液中から抽出した miRNA を自律駆動マイクロ流体チップによって検出および定量されることが期待される。一方、自律駆動マイクロ流体チップによるメチル化 DNA の検出では、メチル化 DNA を約 20 分で検出することに成功した。また、メチル化短鎖 DNA およびメチル化長鎖 DNA の LOD を算出したところ、それぞれ 1.2 nM および 0.4 nM となり、実用化には感度の向上が必要であった。メチル化 DNA の検出感度を向上するためには、結合親和性の高い人工核酸を用いたプローブ DNA の使用や、抗 5mC 抗体のビオチン標識化を行うことによって達成されることが期待された。

謝辞

本研究を行うにあたり，論文添削や学位審査において多くの御助言および御指導頂きました東京理科大学の松本睦良教授に心から御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり，施設および測定機器の提供ならびに論文添削や研究に関する数多くの御助言と御指導を頂きました理化学研究所の前田瑞夫教授，細川和生専任研究員，和田健一博士に謹んで御礼申し上げます。数多くの御助言や研究者としての心構えを御指導頂いた東京理科大学の石原量博士，熊本大学の渡邊智博士に厚く御礼申し上げます。さらに，理化学研究所の前田バイオ工学研究室の研究員およびスタッフ，学生の皆様には御助言や多くのご支援を頂いたことを深く感謝致します。最後に，博士後期課程に進学する上でその機会と多大なる支援を頂いた両親に深く感謝致します。

平成 29 年 3 月
長谷川 和貴

論文リスト

本論文は、学術誌に収載された以下の論文を基礎とするものである。

1. Specificity of MicroRNA Detection on a Power-Free Microfluidic Chip with Laminar Flow-Assisted Dendritic Amplification
(自律駆動マイクロ流体チップ及び層流樹状増幅法を用いたマイクロRNA 検出の特異性)
Kazuki HASEGAWA, Rina NEGISHI, Mutsuyoshi MATSUMOTO, Masafumi YOHDA, Kazuo HOSOKAWA and Mizuo MAEDA
Analytical Sciences, 2016 年 9 月 5 日掲載決定
2. Detection of Methylated DNA on a Power-Free Microfluidic Chip with Laminar Flow-Assisted Dendritic Amplification
(自律駆動マイクロ流体チップ及び層流樹状増幅法を用いたメチル化 DNA の検出)
Kazuki HASEGAWA, Mutsuyoshi MATSUMOTO, Kazuo HOSOKAWA and Mizuo MAEDA
Analytical Sciences, 32, 603-606 (2016)
3. 自律駆動マイクロ流体チップと層流樹状増幅法によるタンパク質と核酸の検出
石原 量, 長谷川 和貴, 細川 和生, 前田 瑞夫
分析化学, 64, No. 5, 319-328 (2015)

参考論文

1. Multiplex MicroRNA Detection on a Power-free Microfluidic Chip with Laminar Flow-assisted Dendritic Amplification
(自律駆動マイクロ流体チップ及び層流樹状増幅法を用いた複数マイクロRNA の同時検出)
R. Ishihara, K. Hasegawa, K. Hosokawa, and M. Maeda
Analytical Sciences, 31, 573-576 (2015)

学会発表リスト

研究について発表した学会を以下に示す。

1. RSC Tokyo International Conference 2014

発表タイトル：Sensitive MicroRNA Detection on Power-Free Microfluidic Chip Using Quantum Dots

Kazuki Hasegawa^{1, 2}, Ryo Ishihara¹, Mutsuyoshi Matsumoto², Kazuo Hosokawa¹ and Mizuo Maeda^{1, 2}

1. RIKEN, 2. Tokyo University of Science

発表日：2014 年 9 月 4 日 開催場所：幕張メッセ国際会議場

2. 第 24 回 日本 MRS 年次大会

発表タイトル：MicroRNA Detection Using Quantum Dots on Power Free Microfluidic Chip

Kazuki Hasegawa^{1, 2}, Ryo Ishihara¹, Mutsuyoshi Matsumoto², Kazuo Hosokawa¹ and Mizuo Maeda^{1, 2}

1. RIKEN, 2. Tokyo University of Science

発表日：2014 年 12 月 10 日 開催場所：横浜市開港記念館

3. 第 75 回 分析化学討論会

発表タイトル：自律駆動マイクロ流体チップを用いた microRNA 検出における検出限界の塩基配列依存性

長谷川和貴^{1, 2}, 細川和生¹, 松本睦良², 前田瑞夫^{1, 2}

1. 理化学研究所, 2. 東京理科大学大学院

発表日：2015 年 5 月 23 日 開催場所：山梨大学甲府キャンパス

4. 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 34 回研究会

発表タイトル：自律駆動マイクロ流体チップを用いたメチル化 DNA の迅速な検出

長谷川 和貴^{1, 2}, 松本 睦良², 細川 和生¹, 前田 瑞夫¹

1. 理化学研究所, 2. 東京理科大学大学院基礎工学研究科

発表日：2016 年 9 月 7 日 開催場所：幕張メッセ国際会議場

5. 第 43 回 国際核酸化学シンポジウム

発表タイトル : Rapid Detection of Methylated DNA with Laminar Flow-
Assisted Dendritic Amplification on a Power-Free
Microfluidic Chip

Kazuki Hasegawa^{1, 2}, Mutsuyoshi Matsumoto², Kazuo Hosokawa¹
and Mizuo Maeda¹

1. RIKEN, 2. Tokyo University of Science

発表日 : 2016 年 9 月 28 日 開催場所 : 熊本大学工学部百周年記念館