

氏 名（本籍）	は せ が わ か ず き 長谷川 和 貴（東京都）
学 位 の 種 類	博士（工学）
学 位 記 番 号	甲第 955 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	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

論 文 審 査 委 員	（主査）教授 松本 睦良
	教授 石黒 孝      教授 菊池 明彦
	教授 曾我 公平      教授 田村 浩二
	理化学研究所 主任研究員 前田 瑞夫

## 論文内容の要旨

近年，がん等の疾患を早期に発見するための目印物質（バイオマーカー）として，血液中の核酸，特にマイクロ RNA（miRNA）やメチル化した DNA が注目されている。miRNA とは，20 ～ 25 塩基から構成されるタンパク質に翻訳されない 1 本鎖 RNA であり，増殖や分化のような細胞の様々な機能において重要な役割を果たしている。miRNA は相補的な配列を持つ伝令 RNA（messenger RNA; mRNA）と結合することで，mRNA のタンパク質への翻訳の阻害，または mRNA の分解によって遺伝子発現の抑制を行っている。また，多様ながん種において，特定の miRNA の異常発現はがん抑制遺伝子の発現を抑制する。miRNA が細胞内だけではなく体液中を循環していることが報告されてからは，低侵襲性のバイオマーカーとして早期診断や予後予測へ利用できることが期待されている。一方，DNA のメチル化とは，ゲノム上の CpG 部位（シトシン，グアニンの連続配列）のシトシン 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，塩基配列の変化を伴わずに遺伝子の転写を調節する役割を持つ。哺乳類のゲノム DNA では，全 CpG 部位中のシトシンの約 80%が「5-メチルシトシン（5mC）」で占められている。特に遺伝子のプロモーター領域（遺伝子の上流にある制御領域）周辺に存在する CpG アイランド（シトシンとグアニンに富んだ 1 kb ほどの領域）中の CpG 部位がメチル化されると，下流の遺伝子の発現が抑制される。がん

発生の一因として、プロモーター領域における異常なメチル化やゲノム全体の低メチル化が挙げられている。特にがん抑制遺伝子に関連したプロモーター領域の過剰なメチル化は、がん抑制遺伝子の発現を抑制するため、壊死やアポトーシスによって死んだ細胞から放出された血中の DNA のメチル化率を評価することで、発がんリスクの予測が可能である。以上のように、ヒトの体内で生成された核酸バイオマーカーの種類および量はがんと密接に関係しており、体液中に含まれる核酸を極微量の試料から検出することによって身体への負担が少ない診断が可能である。これまで様々な核酸の検出法（miRNA：マイクロアレイや定量逆転写 PCR など、メチル化 DNA：バイサルファイトシーケンス解析やメチル化特異的 PCR など）が開発されてきており、いずれも高感度な核酸の検出を可能にするが、長い検出時間や大きな解析装置、さらに煩雑な実験操作が必要である。

シリコーンゴムの一種であるポリジメチルシロキサン (PDMS) をマイクロ流体チップの材料として用いることによって、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」が開発されてきた。自律駆動マイクロ流体チップは PDMS の空気を取り込む性質を利用しており、予め PDMS を脱気することによって流路内への自律駆動送液を可能とする。さらに、蛍光増幅法である「層流樹状増幅法」を用いることで、高感度な核酸の検出が可能となった。上記の 2 つの技術を用いることで、少量のサンプル (0.5~1  $\mu\text{L}$ ) から短時間 (約 20 分) で高感度に miRNA の検出を行う手法が開発されてきた。本研究では、自律駆動マイクロ流体チップを用いた核酸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、miRNA 検出法を応用した DNA 中の 5mC の検出を研究の目的とした。

本論文の第 2 章では、本研究で用い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。本チップは、プローブ DNA を固定化したガラス基板と 2 本の Y 字型マイクロ流路を持つ PDMS チップから構成されている。PDMS チップ中の流路はソフトリソグラフィ法を用いて作製した。流路の幅および高さはそれぞれ 100  $\mu\text{m}$  および 25  $\mu\text{m}$  とした。アミノ基修飾ガラス基板の表面をグルタルアルデヒドでアルデヒド基に修飾した後、直線型の流路を持つ PDMS チップをガラスに貼り付けて末端アミノ基修飾プローブ DNA を送液し、インキュベーションすることでプローブ DNA を直線状に固定した。ガラス基板上に固定化されているプローブ DNA のラインと PDMS チップ中の流路が直交するようにガラスと PDMS を貼り合わせ、自律駆動マイクロ流体チップを作製した。本研究では測定に自律駆動送液を用いるため、測定前に本チップを 10 kPa 中で 1 時間の脱気を行った。この操作により、大気中においてチップ内への連続的な送液が可能となった。

第 3 章では、自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA 検出法の詳細と同検出法の

特異性評価について述べた。本研究における miRNA の検出は以下のステップで行った：

(1) ブロッキングバッファ (1% Blocking Reagent, 0.02% (w/v) SDS, 5X SSC, 0.05% Tween20) によるブロッキング, (2) ガラス基板に固定したプローブ DNA およびビオチン標識プローブ DNA を用いた標的 miRNA の 2 重鎖形成, (3) FITC 修飾ストレプトアビジンとビオチン標識抗ストレプトアビジン抗体による蛍光シグナルの増幅。シグナル比 (Signal-to-reference ratio; SRR) は標的 miRNA 側の流路の蛍光強度 (signal) をブロッキングバッファ側の流路の蛍光強度 (reference) で割ることによって算出した。また, 検出限界 (LOD) の計算には  $3\sigma$  法を採用した。

miRNA 検出の特異性評価では以下の検証を行った。最初に miRNA 検出に対する類似配列の特異性について評価した。hsa-miR-204 を標的 miRNA としてプローブ DNA を設計したところ, 10 pM の hsa-miR-204 の検出が可能であった。hsa-miR-204 とは 2 塩基のみ異なる hsa-miR-211 の検出を行ったところ, 10 nM まで不検出であった。また, hsa-miR-204 と 1 塩基のみ異なる mmu-miR-211 の検出では, 100 pM ~ 10 nM の濃度範囲において非特異的な検出が生じた。得られた SRR から miRNA 濃度を算出したところ, 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, miRNA 検出における配列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。標的 miRNA である成熟型 miRNA の生成過程でつくられる miRNA 前駆体は成熟型 miRNA と共通の配列を部分的に有しており, 成熟型 miRNA の検出に干渉することが懸念されたため, 本実験を行った。miR-16, 21, 451a の 3 種類の成熟型 miRNA と miRNA 前駆体を用いたところ, 成熟型 miRNA は 100 pM で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。最後に, 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, 223, 451a 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, 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標的 miRNA の検出は高い精度で特異性を持つことが分かった。

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 の検出で使用したチップと同形状のものを採用し, 以下のステップで測定を行った：(1) ブロッキングバッファによるブロッキング, (2) ガラ

ス基板に固定したプローブ DNA と標的 DNA の 2 重鎖形成, および標的 DNA 中の 5mC と抗 5mC 抗体の抗原抗体反応, (3) FITC 修飾ストレプトアビジンとビオチン標識抗 IgG 抗体による蛍光シグナルの増幅。本実験において, signal はメチル化 DNA 側の蛍光強度, reference は非メチル化 DNA (配列および濃度はメチル化 DNA と同じ) 側の蛍光強度とした。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。抗 5mC 抗体の濃度の増加と共に signal 側は強い蛍光増幅を示したが, 抗 5mC 抗体の濃度が 10  $\mu\text{g/mL}$  以上の場合は reference 側の増幅も強くなったため, 抗 5mC 抗体の最適濃度は 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 のみを精度良く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, 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。

第 5 章では本論文のまとめを述べた。miRNA 検出の特異性評価において, 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。また, メチル化 DNA の検出において, DNA 中の 5mC を約 20 分で検出することに成功した。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る。この問題は, 結合親和性の高い人工核酸を用いたプローブ DNA の使用により解決できると考えられる。今後, 血清または培養上清から抽出した total RNA 中の標的 miRNA の検出や, 生体試料を用いた十分な検体数による検出精度の評価, さらに蛍光顕微鏡の小型化に関する研究が進むことを期待する。

## 論文審査の結果の要旨

近年, がん等の疾患を早期に発見するためのバイオマーカーとして, 血液中の核酸, 特にマイクロ RNA (miRNA) 及びメチル化した DNA が注目されている。miRNA は相補的な配列を持つ伝令 RNA と結合することで, タンパク質への翻訳の阻害, 遺伝子発現の抑制を行う。また, 多様ながん種において, 特定の miRNA の異常発現はがん抑制遺伝子の発現を抑制する。一方, DNA のメチル化はゲノム上のシトシン 5 位炭素原子にメチル基が付加される現象であり, 塩基配列の変化を伴わずに遺伝子の転写を調節する役割を持つ。がん発生の一

因として、プロモーター領域における異常なメチル化やゲノム全体の低メチル化が挙げられている。このようにヒトの体内で生成された核酸バイオマーカーの種類および量はがんと密接に関係しており、体液中に含まれる核酸を極微量の試料から検出することによって身体への負担が少ない診断が可能である。これまで様々な核酸の検出法が開発されてきたが、長い検出時間や高価な解析装置、煩雑な実験操作が必要であった。ポリジメチルシロキサン (PDMS) をマイクロ流体チップの材料として用いる、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は、蛍光増幅法である層流樹状増幅法を併用することで、少量のサンプル (0.5 ~ 1  $\mu$ L) から短時間 (約 20 分) で高感度な核酸の検出が可能である。本研究では、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、miRNA 検出法を応用した DNA 中の 5mC の検出を研究の目的としている。

本論文は 5 章から構成されている。第 1 章は研究の背景や既往の研究、本研究の目的について述べている。

第 2 章では、本研究で用いた自律駆動マイクロ流体チップの作製法について述べている。本チップは、プローブ DNA を固定化したガラス基板と 2 本の Y 字型マイクロ流路を持つ PDMS チップから構成されている。アミノ基修飾ガラス基板の表面をグルタルアルデヒドでアルデヒド基に修飾した後、直線型の流路を持つ PDMS チップをガラスに貼り付けて末端アミノ基修飾プローブ DNA を送液し、プローブ DNA を直線状に固定している。ガラス基板上に固定化されているプローブ DNA のラインと PDMS チップ中の流路が直交するようにガラスと PDMS を貼り合わせ、自律駆動マイクロ流体チップを作製している。本研究では測定に自律駆動送液を用いるため、測定前に本チップを 10 kPa 中で 1 時間の脱気を行っている。この操作により、大気中においてチップ内への連続的な送液を可能としている。

第 3 章では、自律駆動マイクロ流体チップを用いた miRNA 検出法の詳細と同検出法の特異性評価について述べている。hsa-miR-204 を標的 miRNA としてプローブ DNA を設計すると、10 pM の hsa-miR-204 の検出が可能である。hsa-miR-204 とは 2 塩基のみ異なる hsa-miR-211 の検出を行うと、10 nM まで不検出である。また、hsa-miR-204 と 1 塩基のみ異なる mmu-miR-211 の検出では、100 pM ~ 10 nM の濃度範囲において非特異的な検出が生じるが、その割合は 4.0 ~ 8.1% とわずかであり、miRNA 検出における配列の高い特異性を示している。次に前駆体 miRNA を用いた特異性の評価を行っている。成熟型 miRNA は 100 pM で検出されたのに対し、ヘアピン構造をとっている前駆体 miRNA は 10 nM でも不検出となり、成熟型 miRNA に対する特異性も示している。最後に、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、高い精度で特異性を持つことを示している。

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ている。初めに、22 塩基中に 1 個の 5mC を含む短い DNA を用いて抗 5mC 抗体濃度の最適化を行い、最適な濃度は 1  $\mu$ g/mL と求めている。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 を検出している。次に、メチル化短鎖 DNA の LOD を 1.2 nM (= 8.1 ng/mL) と求めている。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 のみを精度良く検出するには感度の向上が必要であることが分かる。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、この配列の LOD を 0.4 nM (= 7.5 ng/mL) と求め、メチ

ル化短鎖 DNA と同程度の値を示すことを明らかにしている。

第 5 章では本論文のまとめを述べている。

以上のように本論文は miRNA 及びメチル化 DNA の検出における自律駆動マイクロ流体チップの有用性を示した上で、その検出の迅速性、特異性、感度を明らかにしたものであり、今後実用化が強く求められているバイオマーカーの低侵襲性検出に大きく貢献していると考えられる。よって本論文は、博士（工学）の学位論文として十分価値があるものと認められる。