

平成 30 年 4 月 23 日現在

機関番号：32670

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15199

研究課題名(和文)迅速・高精度な組織切片in situ遺伝子定量分析法の開発

研究課題名(英文)Development of microdevice-based high throughput and high sensitivity in situ mRNA analysis method

研究代表者

佐藤 香枝 (Sato, Kae)

日本女子大学・理学部・准教授

研究者番号：40373310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：微量な試料を扱うマイクロデバイスとPadlock/RCAという特異的な細胞内遺伝子定量分析法を組み合わせた方法を開発した。直線型の流路では10 μ Lの反応液が必要だったのに対し、円径の反応容器では導入量3.5 μ Lと微量の反応液で増幅産物が得られた。さらに超音波により溶液を攪拌することで蛍光プローブを作用させる時間を5分まで短縮することが出来た。ヒト妊娠性絨毛癌BeWo細胞でがん遺伝子Krasの転写産物を検出できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to improve the efficiency of padlock/RCA by determining the effects of microchannel shape and ultrasonic solution mixing. Using a circular-shaped microchamber and ultrasonic mixing, the efficiency of microfluidic padlock/RCA was improved, and the consumption of the expensive probe solution was reduced from 10 μ L to approximately 3.5 μ L. Moreover, the fluorescent probe hybridization time was reduced to 5 min, which is four times faster than that of the standard protocol. We used this method to successfully detect mitochondrial DNA and transcripts of α -actin and K-ras proto-oncogene codon 12 in cells.

研究分野：生物分析化学

キーワード：遺伝子分析 マイクロデバイス

1. 研究開始当初の背景

がんの病理診断において、現在の課題は病理標本からの癌遺伝子の変異解析である。現状では細胞形態を保持したままの DNA 解析は不可能で、抽出された試料を用い PCR 検査が施行される。これでは、組織形態と遺伝子変異の関係は不明である。また、固定化組織中では DNA が分解されやすいという問題もある。一方、遺伝子の変異や遺伝子発現量の変化を明瞭に測定できる原理を持つ DNA 検出法である Padlock rolling circle amplification (Padlock RCA)法が開発された (NatMethods 2004)。この方法は、細胞形態を保ったまま定量分析する方法であり、標的配列を正確に認識する Padlock probe と、酵素による増幅と蛍光 Probe の使用により S/N 比の高い検出が可能である。30 塩基ほどの短い標的配列を分析対象とするので、組織内で断片化した DNA も検出できる。有用な DNA 検出法であるが、病理標本での分析はこれからの課題である。さらに、手順は複数の酵素反応からなり、前処理を含めると 4 時間と分析時間は長く操作は煩雑である。また、酵素や Probe DNA は高価なため試薬量の少ない方法の開発が望まれている。そこで研究代表者らは、 μ TAS の技術で作製した操作性にすぐれたマイクロデバイスを用いて、病理標本上で少量の試薬から迅速な Padlock RCA 法を行うことを着想した。

2. 研究の目的

がんの病理診断において、病理標本からの形態を保ったままの癌遺伝子の変異解析は、革新的な診断ツールになり得る。研究代表者らは、マイクロデバイスという微量な試料を扱う容器と特異的な細胞内遺伝子定量分析法を組み合わせ、従来にない全く新しい、高速、高精度に細胞内の DNA 分子を定量的に検出するための先端的分析法を創出する。

3. 研究の方法

マイクロデバイスにより、少ない試薬量 (10 μ L 以下)で、効率良く、組織切片からがん遺伝子が検出できる方法を開発し、病理検査の新しい方法への適応可能性を探索する。病理診断の課題である「病理標本上で形態を保ったままの遺伝子変異の検出」「質的・量的に精度の高い検出」「迅速性」を持った方法論の確立を目的に、マイクロデバイスを用いた細胞内 Padlock RCA 法による遺伝子変異検出法の開発を行った。具体的な研究項目は以下のように設定した。

項目 1: マイクロデバイス化、1-1 構築、1-2 反応の高速化 1-3 試薬の節減 に向けた検討

項目 2: がん遺伝子の分析、2-1 細胞内 mRNA 検出 2-2 組織切片の分析

4. 研究成果

[研究項目 1] Padlock/RCA 法のマイクロデバ

イス化

1-1 デバイスの構築

質的・量的に精度の高い検出を実現するためには、試薬を適切に導入するデバイスが必要である。培養細胞を入れるデバイスは、カバーガラスとシリコンゴムであるポリジメチルシロキサン PDMS で流路を型どりしたシートを貼り合わせて作製した。組織切片の場合は切片を貼り付けたスライドガラスの上に流路を持つシートを被せた。このとき、PDMS と組織切片、あるいはガラス表面への接合は、反応後にデバイスを容易に外すことのできるように、希釈した未硬化の PDMS を接着剤として塗布し熱硬化させた。この接合法法で送液時に漏れはなかった。

流路形状について、アクリル切削加工機を用いて同体積で長方形から円径までいくつかのパターンの流路の鋳型を作成し、これを型どり性能を比較した。直線型よりも円径の流路のほうが、反応液を入れ替えた際に残りやすく、気泡が抜けやすいことが示された。また、RCA 産物の数も円径流路のほうが多いことが示された。

1-2 反応の高速化に向けた検討

反応効率を向上させるためにデバイス内での溶液を攪拌することを検討した。または、1.6 MHz の超音波で溶液を攪拌した。Padlock probe のハイブリダイゼーションした後リガーゼによる連結する段階で超音波を処理した場合には通常の静置条件と効率は変わらなかった。一方、増幅産物に蛍光プローブをハイブリダイゼーションする段階で超音波処理した場合には、静置条件では産物数がほとんど得られなかった 5 分でも十分な産物数が得られた。このようにハイブリダイゼーションのみが行われている段階では溶液を混合することで産物への蛍光プローブの供給が増え、静置よりも短い反応時間で蛍光観察ができるようになったと考えている。また、超音波により増幅した DNA の凝集状態がゆるみ、蛍光プローブが結合しやすくなった可能性も考えられる。一方、Padlock プローブのハイブリダイゼーションに加え、リガーゼによる連結反応が起こる段階で効果が得られなかったのは、溶液混合により Padlock プローブの標的配列へのハイブリダイゼーションを上げることができたとしても、酵素反応の反応速度を上げることはできなかったため、短時間で十分な産物数が得られなかったと考えている。

一方、マイクロデバイスはウェルと比べ反応容器の体積が小さいので酵素の吸着の影響を受けやすいのではないかと考えた。RCA 反応の各反応液には酵素の安定化、吸着防止のため BSA が含まれている。そこで、BSA の濃度が産物数に影響を与えるかどうか調べた。ミトコンドリア DNA の検出のプローブを用いて、既報 (NatMethods 2004) の 0.02%

(0.2 µg/µL)の5倍である0.1% (1.0 µg/µL)にして実験した。1細胞あたりの産物数を比較したところ、0.02%のときに54.7±10.9だったのに対し、0.1%のときに、72.4±20.1個と産物数は上昇傾向を示しp = 0.0056と有意な差が得られ、産物の輝度は1.3倍明るくなった。

次にこのBSA濃度で、マイクロデバイス内で酵素の吸着による濃度低下が起きているのかを調べた。調製した各反応液を円径流路のデバイス内に満たし5分後に再び回収して新しいデバイス内に導入し反応を行った。もし吸着による濃度低下が起こっているのなら、デバイスから回収した反応液では反応効率が下がるはずである。調製した反応液をそのままデバイス内に導入し反応を行った条件で産物数が57.3±21.0個得られたのに対し、デバイス内から回収した反応液を用いた条件でも63.3±13.2個の産物数が得られ、p = 0.356と差がないことがわかった。どちらの条件でも有意差なく同程度の産物数が得られたことからデバイス内では酵素の吸着による反応液の濃度低下は起こっていない、または吸着は起こっているがRCA反応には影響を与えないほど酵素は十分量供給されていると考えられた。

1-3 試薬の節減に向けた検討

導入した試薬が希釈なく無駄なく組織切片に作用できるような流路形状は角がない形状であった。この流路の形状は、溶液交換の際に液残りや気泡の出来ないものであった。流路深さ200 µmのデバイスでは流路体積はわずか2.5 µLであり、反応液導入量としても3.5 µLであり、研究代表者らの過去に報告した結果 (AnalSci 2014) の4分の1量の体積になった。

[研究項目2] がん遺伝子の分析

2-1 細胞内 mRNA 検出

モデル実験として、分析対象はコピー数が多く安定なミトコンドリアDNAから着手し、β-アクチンのmRNAを行った後に、がん遺伝子のmRNAに取り組んだ。プローブの配列はNat Methods 2010およびOncotarget. 2013で報告されているK-rasのコドン12を認識するものを用いた。

これまでに最適化した円径の流路を用いることで産物数は少ないもののヒト妊娠性絨毛癌 BeWo 細胞でほとんどすべての細胞にK-rasのmRNA由来の産物を検出することができた。しかしながら、感度は十分ではないので、今後も反応条件の検討が必要である。

2-2 組織切片の分析

一般に固定した組織ではDNAやRNAの分解が起こり分析は困難である。そこでDNAやmRNAの保存が可能とされている新しい固定法であるPAXgene Tissue Systemで作製した標本を用いて検討した。モデル実験であ

るミトコンドリアDNAの検出に成功した。一方、K-rasのmRNAから得られた産物数は少なく、シグナルを増幅させるために、蛍光チラミドと西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) の触媒作用により蛍光シグナルを増感させるTSA Fluorescence Systemのキット (パーキンエルマージャパン) を使ったところシグナルは強くなるものの組織切片へ非特異吸着が見られ、良好な結果は得られなかった。今後もさらなる反応条件の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

"Molecular crowding improves bead-based padlock rolling circle amplification" Sasaki N, Gunji Y, Kase C, Sato K. *Anal Biochem*. Feb 15;519:15-18 (2017). 査読有り。 <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.002>.

"遺伝子転写量および遺伝子変異の細胞内蛍光検出技術" 佐藤香枝、パイオインダストリー、2017年4月号、1-8、(2017) 査読なし。

"Microdevice in Cellular Pathology: Microfluidic Platforms for Fluorescence in situ Hybridization and Analysis of Circulating Tumor Cells" Sato K. *Anal Sci*. 31(9):867-873 (2015). 査読有り。 doi: 10.2116/analsci.31.867.

[学会発表] (計 3 件)

"Microfluidic-based in situ padlock probe rolling-circle amplification for mRNA analysis" C. Kase, Y. Ishigaki, and K. Sato, Micro Total Analysis Systems 2017/10/22-26, Savannah, Georgia, USA.

マイクロチップを用いた細胞内 Padlock/RCA 法による遺伝子分析の効率化。○ 佐藤 香枝、石垣 有理、日本分析化学会第65年会、2016/09/16、北大キャンパス

"Optimization of microfluidic-based in situ padlock rolling circle amplification" Y. Ishigaki, K. Sato, Micro Total Analysis Systems, 2015/10/25-29, Gyeongju, South Korea.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

新聞報道記事

遺伝子変異光らせ検出 日本女子大 患者
のがん組織から、日経産業新聞 8 面 (2016 年
10 月 27 日)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 香枝 (SATO, Kae)

日本女子大学・理学部・准教授

研究者番号 : 40373310

(2)連携研究者

西原 広史 (NISHIHARA, Hiroshi)

北海道大学・医学研究科・教授

研究者番号 : 50322805