

令和元年6月28日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15334

研究課題名（和文）迅速核酸絶対定量診断実現に向けたデジタル等温増幅法の開発

研究課題名（英文）Development of Digital Isothermal Nucleic Acid Amplification for Rapid Quantification

研究代表者

田中 佑治（Tanaka, Yuji）

山梨大学・大学院総合研究部・特任准教授

研究者番号：40625513

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、逆転写を伴うデジタル核酸定量法と、融解曲線解析によって増幅した核酸を識別してそれぞれ定量するデジタル核酸定量法という2つの新たな検出方法を検討した。等温増幅法は、70℃近辺で維持するだけで核酸を増幅することができるが、10倍ほど濃度差がなければ判別できないという問題点があったが、逆転写を伴う等温増幅キットのデジタル化により2倍程度の濃度差でも検出できる様になることが分かった。また、網膜の再生医療に活用される細胞の品質管理に用いられるゲノム変異を検出するため、等温増幅用のプライマーを新規設計し、デジタル核酸増幅で融解曲線解析で生型と変異型の核酸を識別して定量できることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノムをあらかじめ調べた上でその患者に適した薬剤を処方する「個別化医療」の実用化が始まり、より簡易的に、より正確に、より迅速に、より低価格で、より多様な核酸の差異を識別するための技術開発の重要性が高まっている。本研究でRNAの迅速簡易定量とゲノム変異の融解曲線解析による定量という2つの新たな検出方法の可能性を見出した。既存の核酸検出の改良や、新たな個別化医療や再生医療の創出に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined two new detection methods: digital nucleic acid quantification method with reverse transcription and digital nucleic acid quantification method of identifying and quantifying nucleic acid amplified by melting curve analysis. The isothermal amplification method can amplify a nucleic acid only by maintaining it at around 70 °C, but there is a problem that it can not be determined unless there is a 10-fold concentration difference, but digitization of the isothermal amplification kit with reverse transcription It has been found that it becomes possible to detect even a concentration difference of about 2 times. In addition, in order to detect genomic mutations used for quality control of cells utilized for regenerative medicine of retina, newly designed primers for isothermal amplification, digital nucleic acid amplification, and biotyped and mutated nucleic acid by melting curve analysis. It turned out that it can be identified and quantified.

研究分野：トランスレショナルリサーチ

キーワード：等温核酸増幅 デジタル 逆転写 ゲノム変異 融解曲線解析 再生医療 網膜再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサー等の技術革新により、核酸解読の規模の拡大と制度の精密化が進んでいる。それに伴い、核酸配列と病気との関係性もより緻密に明らかになりつつあり、近年癌の個別化医療等が実用化されつつある。研究代表者らも癌等の診断に活用できる核酸マーカーの候補を見出してきたが、その一方でこれらを実用化するには、実際に活用する臨床現場に即した簡易な検出を実現必要がある。

最も汎用的で簡易的な核酸検出方法として、温度変化を繰り返して標的核酸を増幅する PCR 法がある。PCR 法は、デジタル化による高感度絶対定量や、検出プローブの工夫による感度の改善が行われているが、迅速性に課題が残されていた。一方、温度を 60-70 に維持するだけで標的とする核酸を増幅できる等温増幅法は、PCR を凌ぐ迅速な検出が可能であるが、定量制や感度に課題があった。この様に迅速性、定量性、感度、特異度を同時に充足する簡易的な核酸検出法は存在しない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、迅速で簡易的なデジタル等温増幅法をデジタル化することにより、定量性と感度を改善し、プローブ等の工夫により検出の特異度と定量性を改善し、複数の標的核酸を迅速に検出するための核酸検出の要素技術を導出することとした。

本研究では、RNA の逆転写を伴うデジタル等温増幅と、デジタル等温増幅後に融解曲線解析することにより、混合状態の野生型と変異型の核酸溶液中に含まれるそれぞれ核酸を定量する技術を検証することとした。

3. 研究の方法

RNA の逆転写を伴うデジタル等温増幅法の検証では、インフルエンザ検出用の等温増幅用のプライマー・プローブセットを活用した。デジタル検出するために、約 2 万個の well に分けることができるチップタイプの市販の検出システム (Applied Biosystems QuantStudio 3D デジタル PCR システム) を使用した。

融解曲線解析を伴うデジタル等温増幅法の検証では、網膜再生医療の細胞の品質管理に活用する核酸変異マーカーを標的とした等温増幅検出用のプライマーとプローブを新たに設計した。検出には、温度制御をしながら顕微鏡観察する新たな検出システムが必要であるため、温度制御ユニットを自作した。また、代替となる検出システムとして、マイクロ流路を用いて溶液を分画するタイプの方法 (フリューダ임、Biomark HD、Digital PCR) についても検証した。

4. 研究成果

4.1. RNA の逆転写を伴うデジタル等温増幅法の検証

逆転写を伴う等温増幅法にて、フルオロジェニックプローブの導入とデジタル化による定量性の改善効果を評価した。まず通常のチューブ反応による検出時間を用いた評価方法にて、一般的な蛍光インターカレーターとフルオロジェニックプローブを比較した。すると一般的な蛍光インターカレーターは、1 万コピーを下回るとコピー数が変化しても検出時間は変わらず定量ができなかっただけでなく、テンプレートなしでもシグナルが検出された。これに対して、後者は 1 万コピー以下でも 10 倍程度の差であれば検出時間に統計学的有意差が認められ、テンプレートなしではシグナルが検出されなかった。次にデジタル定量プラットフォームを用いて両者のプローブの効果を検証した。このデジタル定量においても通常の蛍光インターカレーターでは、バックグラウンドが大きく上昇し、定量が困難であるのに対し、フルオロジェニックプローブはバックグラウンドの上昇が抑制されていることも分かった。また、定量に適した反応時間が存在するため、最適化が必要であることが分かった。フルオロジェニックプローブを用いて、最適な反応時間で定量すれば、一般的なチューブ反応では困難であった 1 万コピー以下であっても 2 倍程度の差を識別できることが分かった。当初、最終年度に実用例として検証する対象の候補として、汎用がん RNA マーカーや、子宮体癌リンパ節転移予測 RNA マーカーの候補から、検出対象とするがんマーカーの絞り込みを行い、子宮体癌リンパ節転移予測マーカー 2 つを絞り込んだ。しかし、異動に伴う研究環境の変化により、がんマーカーに関する研究については、中止して、網膜再生医療の品質管理に関わるマーカーを対象とすることとした。

4.2. 融解曲線解析を伴うデジタル等温増幅法の検証

網膜再生医療の品質管理に関わるマーカーの1つとして、ゲノム変異を検出するものがある。このマーカーを用いることで、iPS細胞から移植に活用するRPE細胞を誘導する過程で、不適切な細胞を除去して大幅にコストカットを実現できる可能性がある。このマーカーを用いて品質管理を行うには、核酸の変異を検出可能で、さらに、簡易的な検出方法で、迅速に定量できた方が好ましい。本研究において検討しているデジタル等温核酸増幅法によりこれらを実現し、iPS細胞由来RPE細胞移植技術に貢献できる可能性があることが分かった。

この核酸マーカーは複数存在するが、初期標的として品質管理マーカーとして最も適している対象1つに絞り込み、等温核酸増幅法による核酸増幅を実現できるか検討することとした。等温核酸増幅法で使用するプライマーとプローブを3セット分設計・合成し、陽性対照核酸配列もしくは陰性対照配列を含む条件、および核酸を含まない条件(NTC)にて等温核酸増幅反応を行った。いずれのプライマー/プローブセットにおいても、陽性対照、陰性対象、およびNTCを判別することは可能であったが、3つのうち2つはNTCであっても蛍光シグナルが強い傾向にあったため、プライマー/プローブセットを1つに絞り混んだ。また、核酸の濃度を10倍変動させても、その濃度差を判別することはできないことが明らかとなり、RNAの逆転写を伴う等温増幅法と同様に、デジタル化しない限り定量が困難であることを再度確認した。

次に、絞り込んだiPS細胞由来RPE細胞の移植用品質管理マーカー検出用のプライマーを高純度で作成して、デジタル検出の有効性を確認した。まず、通常チューブによる検出方法のスペックを検証した。昨年度増殖曲線の解析から標的分子の有無と、融解曲線解析から野生型/変異型であるかの判別が可能であることを確認したが、定量性はなく核酸濃度が10倍異なってもその差異を判別できないことが明らかになった。今年度は、新たに濃度が標的分子の濃度が薄くなると検出できないこと、野生型に変異型が混在する場合に両者を定量可能か検証したところ、シグナルが融合して両者を判別・定量できないことを確認した。マイクロ流路を活用してデジタル化するプラットフォームを活用して上記の改良を試みた。すると、通常の方法では検出できない低濃度の標的であっても検出可能になり、さらに2倍程度の小さい濃度差を判別できることが分かった。また、野生型と変異型が混合したサンプルであっても、デジタル化した個々のwellの融解曲線は、野生型、変異型、全くない、のいずれかで、wellをカウントして得た定量値は仕込み量に相関しており、上記と同様に2倍程度の小さい濃度差であっても判別可能であった。マイクロ流路を用いたプラットフォームは高価であるため、より低価格でデジタル化することが見込めるチップタイプの測定系の構築を検討した。温度制御しながら蛍光顕微鏡観察するための簡易的な温度制御装置を自作して、一般的な蛍光顕微鏡でも温度制御しながらデジタルチップのwellを評価できることを確認した。また、この検査方法の解析データを安定化させるために、検査対象であるiPS細胞由来RPE細胞の検査前の細胞の状態を維持するために保存方法に関して検討し、最適な温度条件も見出した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Shohei Kitahata, [Yuji Tanaka](#), Hori Kanji, C Kime, Sunao Sugita, Masayo Takahashi, Critical Functionality Effects from Storage Temperature on Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Suspensions. Scientific Reports, 9: 2891, 2019, 1-15

Yoshida Emiko, [Terao Yasuhisa](#), Hayashi Noriko, Mogushi Kaoru, Arakawa Atsushi, [Tanaka Yuji](#), Ito Yosuke, Ohmiya Hiroko, Hayashizaki Yoshihide, Takeda Satoru, Itoh Masayoshi, Kawaji Hideya, Promoter-level transcriptome in primary lesions of endometrial cancer identified biomarkers associated with lymph node metastasis, Scientific Reports, 7, 2017, 1-15

Bogumil Kaczkowski, [Yuji Tanaka](#), Hideya Kawaji, Albin Sandelin, Robin Andersson, Masayoshi Itoh, Timo Lassmann, Yoshihide Hayashizaki, Piero Carninci, Alistair R.R. Forrest, Abstract 2897: Recurrent transcriptome alterations across multiple cancer types, Cancer Research, 76, 2016, 2897-2897

〔学会発表〕(計9件)

田中佑治、iPS細胞由来網膜色素上皮細胞懸濁液の非凍結状態での保存における温度選択の重要性、日本再生医療学会、シンポジウム、2019年

北畑将平、田中佑治、高橋政代、ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞懸濁液に与える温度の影響、日本再生医療学会、2019年

北畑将平、田中佑治、高橋政代、ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞懸濁液の未凍結条件下における保存の検討、日本組織培養学会、2018年

Kaczkowski Bogumil, Tanaka Yuji, Kawaji Hideya, Andersson Robin, Albin Sandelin, Itoh Masayoshi, Lassmann Timo, the FANTOM5 consortium, Hayashizaki Yoshihide, Carninci Piero, Forrest Alistair Raymond Russel. RIKEN Symposium: CAGE as a tool for cancer research and biomarker discovery RIKEN Symposium : Cancer research by CAGE method 2016年09月13日

Kaczkowski Bogumil, Tanaka Yuji, Kawaji Hideya, Andersson Robin, Albin Sandelin, Itoh Masayoshi, Lassmann Timo, the FANTOM5 consortium, Hayashizaki Yoshihide, Carninci Piero, Forrest Alistair Raymond Russel CLST Educational Program: Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) and cancer biology CLST Educational Program 2016年07月05日

Kaczkowski Bogumil, Tanaka Yuji, Kawaji Hideya, Andersson Robin, Albin Sandelin, Itoh Masayoshi, Lassmann Timo, the FANTOM5 consortium, Hayashizaki Yoshihide, Carninci Piero, Forrest Alistair Raymond Russel Transcriptome analysis of recurrently deregulated genes across multiple cancers identifies new pan-cancer biomarkers., American Association for Cancer Research Annual Meeting 2016, 2016年04月16日

Emiko Yoshida, Yasuhisa Terao, Noriko Hayashi, Yosuke Ito, Kazunari Fujino, Takafumi Ujihira, Soshi Kusunoki, Miki Kimura, Hiroshi Kaneda, Tsuyoshi Ota, Daiki Ogishima, Kiyoko Kato, Yuji Tanaka, Masayoshi Ito, Hideya Kawaji, Atsuo Itakura, Satoru Takeda Novel approach to predict lymph node metastatic state of uterine endometrial cancer, toward reduction of lymphedema by detection of irrelevant lymphadenectomy 第58回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 2016年07月08日~ 2016年07月10日

吉田恵美子、寺尾泰久、伊藤陽介、田中佑治、伊藤昌可、川路英哉、竹田省 子宮体癌リンパ節転移バイオマーカーのCAGE法を用いた探索と同定 理研シンポジウム 2016年09月13日

吉田恵美子、寺尾泰久、伊藤陽介、田中佑治、伊藤昌可、川路英哉、竹田省 子宮体癌リンパ節転移バイオマーカーのCAGE法を用いた探索と同定 第15回日本婦人科がん分子標的研究会 2016年08月19日~ 2016年08月20日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：鋳型核酸の分析方法、標的物質の分析方法、鋳型核酸 または標的物質の 分析用キット、および 鋳型核酸または標的物質の分析用装置

発明者：田中佑治、林崎 良英、辻丸光一 郎

種類：特許

番号：PCT/JP/2016/074976

出願年：2017年05月13日

国内外の別：外国

名称：BIOMARKER FOR CANCER AND USE THEREOF

発明者：K Bogumil, 田中佑治、他4人

種類：特許

番号：PCT/JP2016/004260

出願年：2016年09月16日

国内外の別：外国

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：寺尾泰久

ローマ字氏名：Terao Yasuhisa

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00348997

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。