

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K04917

研究課題名（和文）独自のマイクロ流体チップによるマイクロRNAの高感度検出

研究課題名（英文）Sensitive microRNA detection on an original microfluidic chip

研究代表者

細川 和生（Hosokawa, Kazuo）

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員

研究者番号：00373366

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：マイクロRNA（miRNA）はがんなどを早期に診断するための次世代バイオマーカーとして期待されている。本研究では、研究代表者が独自に開発してきた「自律駆動マイクロ流体チップ」を活用することにより、短時間で高感度にmiRNAを検出できる方法を開発することが目的であった。すでにmiRNAを20分で検出することに成功していたので、本研究では感度の改善が主要な課題であった。まず反応液組成の最適化を行い、5種類のmiRNAで検出限界を10倍ないし100倍程度改善した。さらにこの反応液組成をヒト由来試料に適用し、3種類のmiRNAの発現量を測定したところ、従来法による測定結果と良く一致した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロRNA（miRNA）による遺伝子の発現制御は、細胞の分化・がん化・アポトーシスなど細胞活動の根幹に関わっており、これらの異常はがんやアルツハイマー病の発病・進行に直結するものである。miRNAはこれら疾病を早期診断するためのバイオマーカーとして期待されている。従来、miRNAの検出・定量には定量逆転写PCR、マイクロアレイなどが用いられてきたが、測定時間とコストに課題がある。本研究で得られたmiRNA測定法は従来法に比べて迅速・低コストであり、上記疾病の簡易診断の実現に近づいただけでなく、一般的な生物学研究にも有用なツールとなりうる。

研究成果の概要（英文）：MicroRNAs (miRNAs) are expected to be useful as a next-generation biomarker for early diagnosis of diseases including cancer. This study aimed at developing a rapid and sensitive detection method for miRNAs by utilizing the “power-free microfluidic chip”, which had been developed by our research group. We had already succeeded in detection of miRNAs in 20 min. Therefore, in this study, improvement of detection sensitivity was a major challenge. First, we have optimized the composition of the reaction buffer. The optimized reaction buffer was tested with 5 different miRNA sequences. As a result, the detection limits were improved 10- to 100-fold. Next, the optimized reaction buffer was applied to miRNA detection from a human sample. The amounts of 3 endogenous miRNAs, measured by the developed microfluidic chip, well agreed with those by conventional quantitative PCR.

研究分野：分析化学

キーワード：マイクロ流体チップ マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (miRNA) とは、長さ 22 塩基程度の非翻訳性 RNA であり、近年になり、ヒトを含む多くの生物で遺伝子の発現制御に大きな役割を果たしていることが分かってきた。miRNA による発現制御は、細胞の分化・がん化・アポトーシスなど細胞活動の根幹に関わっており、これらの異常はがんやアルツハイマー病の発病・進行に直結するものである。さらに、miRNA は細胞外にも放出されて、血液等の体液中に存在することが分かっており、これら細胞外分泌型 miRNA をバイオマーカーとして測定することにより、革新的な超早期非侵襲診断技術ができるのではないかと期待されている。

従来、miRNA の検出・測定には定量逆転写 PCR (qRT-PCR)、マイクロアレイ、次世代シーケンサーなどが用いられているが、測定時間、コスト(装置と消耗品)、感度、スループットなどにそれぞれ固有の長所と短所がある。現在のところ診断用途には qRT-PCR が測定時間やコストの点で最適と考えられるが、さらに時間やコストを圧縮する手法が開発されれば、point-of-care testing による診断の実現に近づくだけでなく、一般的な生物学研究にも革新的なツールとなりうる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者が独自に開発してきたマイクロ流体チップを活用することにより、短時間・低コストで実用上十分な感度と特異性を持つ miRNA 測定法を実現することであった。マイクロ流体チップとは、断面寸法 0.1 mm 程度以下の流路を内蔵した全体寸法数 cm の平板であり、半導体加工技術を応用して製作する。こうしたマイクロ流路を用いると、固相表面における核酸やタンパク質の結合反応が迅速化されることが分かっている。しかし一般のマイクロチップは外部ポンプを必要とするものが多く、周辺装置の大型化・高コスト化、つなぎこみ作業による時間のロス、死体積による試薬のロスなどといった問題があった。

こうした問題を解決するため、研究代表者らは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」を開発した(文献 1)。その原理は、マイクロ流体チップの素材 PDMS (ポリジメチルシロキサン) が流路内の空気を吸い込む、というユニークなものである。さらに研究代表者らはマイクロ流体チップに特化した信号増幅法 LFDA (laminar flow-assisted dendritic amplification) を開発して高感度なイムノアッセイを実現した(文献 2)。LFDA は酵素を必要としないため、試薬の低コスト化が期待できる。その後、自律駆動マイクロ流体チップと LFDA により、20 分で 0.5 μ L の試料から miRNA を検出することに成功した(文献 3)。しかしながら、この miRNA 検出法は感度が十分とは言えなかった。本研究では、本手法の感度を改善することを主な目的とした。

3. 研究の方法

マイクロ流体チップはガラス基板と PDMS 板からなる。ガラス基板の表面には目的の miRNA を捕捉するためのプローブ DNA をライン状の微細なパターンに従って固定化した。PDMS 板の表面にはマイクロ流路となる Y 字型の微細な溝が成型加工されており、ガラス基板に固定化したプローブ DNA のライン状パターンと流路が直交するように PDMS とガラスを接合した。その直交した交点で検出反応を行った。

自律駆動による送液を行うため、マイクロ流体チップを真空チャンバーに入れ、PDMS に溶解していた空気を取り除いた。これを大気中に戻したときに起こる空気の再溶解によりマイクロ流路内が減圧され、送液が可能となる。マイクロ流路にまず市販のプロッキング剤を流した後、miRNA サンプル溶液を 0.5 μ L 注入すると同時に、もう一つの入り口からビオチン化された検出プローブ DNA を注入した。最後に 2 種類の LFDA 試薬(蛍光標識アビジンとビオチン化抗アビジン抗体)をそれぞれ別の入り口から注入し、LFDA を行った。蛍光顕微鏡により流路内の蛍光強度を評価した。

本研究では以下のような実験条件について検討・最適化を行い、miRNA 検出の高感度化を試みた。(1) 反応液組成の最適化、(2) 反応手順の検討、(3) 人工核酸プローブの導入。

4. 研究成果

まず反応液の組成を最適化することにより、感度の改善に成功した。最適化前の反応溶液は saline-sodium citrate バッファを基本とし、市販のプロッキング試薬、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、および界面活性剤 tween 20 を添加したものであった。本研究では試行錯誤による最適化の結果、SDS の濃度を以前の 10 倍に上げて 0.2% とし、さらにホルムアミドとデキストラン硫酸ナトリウムを添加することにより、信号強度が増加し、かつバックグラウンドが抑えられることが判明した。この新しい組成の反応溶液を用いていくつかの miRNA を検出する実験を行ったところ、miR-196a の検出限界 (LOD) が 1.39 pM から 0.045 pM へ、miR-331 の LOD が 4.22 pM から 0.45 pM へ、miR-451a の LOD が 2.1 pM から 0.22 pM へそれぞれ改善された。

次に、この新しい反応液組成を用いて、生体由来の複雑な検体から目的の miRNA を検出でき

るかどうかを検証した。検体として市販のヒト白血球由来トータル RNA を使用し、そこに含まれる miR-16 の量をマイクロ流体チップによって測定した。その結果を従来法である qRT-PCR による結果と比較したところ、検体濃度が 0.1 ng/μL の場合はかなり良く一致したが、検体濃度を上げていくにつれてマイクロ流体チップによる結果の方が低くなる傾向が見られた。

さらに miR-451a と miR-223 で同様の検討を行い、miR-16 も再実験を行った。得られた検出限界は miR-451a, -16, -223 でそれぞれ 28 fM, 22 fM, 39 fM となり、以前の条件と比べてそれぞれ 136 倍、6.4 倍、3.1 倍の改善となった。また、これらの配列をヒト白血球由来トータル RNA 1 ng/μL から検出したところ、miR-451a, -16, -223 の濃度はそれぞれ 0.56 nM, 0.14 nM, 4.1 pM と算出され、これらは従来法である qRT-PCR による結果とよく一致した(図 1)。以上から、本研究で得られた新しい反応溶液組成が多様な miRNA 配列に適用でき、また、生体由来の複雑な試料に適用できることが示唆された。

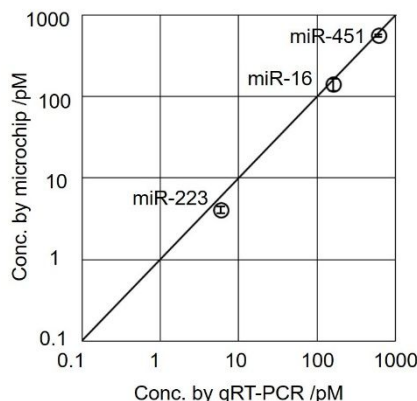


図 1 .マイクロ流体チップと qRT-PCR により測定したヒト白血球トータル RNA 1 ng/μL 中の内在性 miRNA 濃度

次に、反応手順の見直しを検討した。具体的には、これまでは標的 miRNA と検出プローブ (DP) をチップ上で混合・反応させ、その直後(計算上は約 1 秒後)にこの複合体をチップ上の固定プローブと反応させるという手順であったが、これを見直し、まず miRNA と DP をチップ外で混合し、5 分、15 分、または 30 分反応させた後にこの混合液をチップに注入して、それ以降はこれまでと同様の検出反応を行なった。標的配列は miR-451a、濃度は 1 pM と 10 pM の 2 種類で信号強度を評価した。その結果、信号強度はチップ外での反応時間(従来の 0 分を含む)と相関を示さず、この手順変更は高感度化に寄与しないことが示唆された。言い換えれば、miRNA と DP の反応時間は従来の 1 秒程度で十分であることが示唆された。

最後に、人工核酸プローブの導入を検討した。具体的には、これまで用いていた DNA プローブの塩基の一部をロックド核酸 (locked nucleic acid, LNA) に置き換えたキメラプローブを設計した。この種のキメラプローブを用いることで、標的 miRNA への結合力が上がることが報告されている。同時に非特異的な結合も増加することが予想されたため、結合力を調節する目的で、反応液中のホルムアミド濃度を最適化した。標的配列は miR-451a、濃度は 1 pM と 10 pM の 2 種類で信号強度を評価した。その結果、ホルムアミド濃度 5% の時に最大の信号強度が得られたが、従来の DNA プローブを用いた場合に比べて有意な違いはなく、実験した範囲内では感度が改善されそうな条件は発見されなかった。

< 引用文献 >

1. Kazuo Hosokawa, Kae Sato, Naoki Ichikawa, Mizuo Maeda; Power-free poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices for gold nanoparticle-based DNA analysis, *Lab on a Chip*, 4, 181-185, 2004
2. Kazuo Hosokawa, Masaki Omata, Mizuo Maeda; Immunoassay on a power-free microchip with laminar flow-assisted dendritic amplification, *Analytical Chemistry*, 79, 6000-6004, 2007
3. Hideyuki Arata, Hiroshi Komatsu, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Rapid and sensitive microRNA detection with laminar flow-assisted dendritic amplification on power-free microfluidic chip, *PLOS ONE*, 7, e48329, 2012

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ishihara Ryo, Katagiri Asuka, Nakajima Tadaaki, Matsui Ryo, Hosokawa Kazuo, Maeda Mizuo, Tomooka Yasuhiro, Kikuchi Akihiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Design of a Sensitive Extracellular Vesicle Detection Method Utilizing a Surface-Functionalized Power-Free Microchip	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 679 ~ 679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/membranes12070679	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Wada Ken-Ichi, Hosokawa Kazuo, Ito Yoshihiro, Maeda Mizuo, Harada Yui, Yonemitsu Yoshikazu	4. 巻 418
2. 論文標題 Generation of transimitchondrial cybrids using a microfluidic device	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 113233 ~ 113233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2022.113233	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 ISHIHARA Ryo, KITANE Ryoichi, AKIYAMA Yoshitsugu, INOMATA Shoko, HOSOKAWA Kazuo, MAEDA Mizuo, KIKUCHI Akihiko	4. 巻 37
2. 論文標題 Multiplex MicroRNA Detection on a Surface-Functionalized Power-Free Microfluidic Chip	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 747 ~ 751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20SCP17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 HOSOKAWA Kazuo	4. 巻 37
2. 論文標題 Biomarker Analysis on a Power-free Microfluidic Chip Driven by Degassed Poly(dimethylsiloxane)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 399 ~ 406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20SCR04	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 WADA Ken-Ichi、HOSOKAWA Kazuo、ITO Yoshihiro、MAEDA Mizuo	4. 巻 37
2. 論文標題 A Microfluidic Device for Modulation of Organelle Heterogeneity in Live Single Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 499 ~ 505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20SCP11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishihara Ryo、Tanabe Kanta、Inomata Shoko、Matsui Ryo、Kitane Ryoichi、Hosokawa Kazuo、Maeda Mizuo、Kikuchi Akihiko	4. 巻 59
2. 論文標題 Fabrication of Storable Surface-Functionalized Power-Free Microfluidic Chip for Sensitive MicroRNA Detection Utilizing Ultraviolet Grafting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Industrial & Engineering Chemistry Research	6. 最初と最後の頁 10464 ~ 10468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.iecr.0c00620	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 KIM Young-Jin、HOSOKAWA Kazuo、MAEDA Mizuo	4. 巻 35
2. 論文標題 Sensitivity Enhancement of MicroRNA Detection Using a Power-free Microfluidic Chip	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1227 ~ 1236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.19P211	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kim Seong Min、Wada Ken-Ichi、Ueki Masashi、Hosokawa Kazuo、Maeda Mizuo、Sakai Yasuyuki、Ito Yoshihiro	4. 巻 520
2. 論文標題 Cytoplasmic fusion between an enlarged embryonic stem cell and a somatic cell using a microtunnel device	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 257 ~ 262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Kae, Hosokawa Kazuo, Maeda Mizuo	4. 巻 144
2. 論文標題 Characterizing the non-crosslinked aggregation of DNA-modified gold nanoparticles: effects of DNA length and terminal base pair	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 5580 ~ 5588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9an00822e	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishihara R., Katagiri A., Nakajima T., Matsui R., Komatsu S., Hosokawa K., Maeda M., Tomooka Y., Kikuchi A.	4. 巻 142
2. 論文標題 Design of a surface-functionalized power-free microchip for extracellular vesicle detection utilizing UV grafting	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reactive and Functional Polymers	6. 最初と最後の頁 183 ~ 188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.06.017	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 細川和生, 大森整
2. 発表標題 独自のマイクロ流体チップを用いたデジタルPCR
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いたミトコンドリアゲノム置換
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第43回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上聖也, Young-Jin Kim, 武政誠, 細川和生, 前田瑞夫
2. 発表標題 自律駆動マイクロ流体チップを用いたマイクロRNA検出における検出限界の改善
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuo Hosokawa, Young-Jin Kim, Mizuo Maeda
2. 発表標題 MicroRNA detection on a power-free microfluidic chip
3. 学会等名 第6回COINSシンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上聖也, Young-Jin Kim, 武政誠, 細川和生, 前田瑞夫
2. 発表標題 自律駆動マイクロ流体チップを用いたマイクロRNAの高感度検出
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Young-Jin Kim, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda
2. 発表標題 Improved performance of a power-free microfluidic chip for a miRNA detection strategy
3. 学会等名 6th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken-Ichi Wada, Kazuo Hosokawa, Yoshihiro Ito, Mizuo Maeda
2. 発表標題 A novel method for quantitative organelles transfer using a microfluidic device
3. 学会等名 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫
2. 発表標題 マイクロデバイスを用いたオルガネラ移植の量的制御
3. 学会等名 第28回日本MRS年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫
2. 発表標題 シングルセル解析を目指したマイクロ流体デバイスを用いたオルガネラ組成の操作
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫
2. 発表標題 Quantitative control of mitochondria transfer between live single cells using a microfluidic device toward mtDNA editing
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------