

機関番号：34310

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21750080

研究課題名 (和文) 癌遺伝子診断マイクロ流体デバイスの開発

研究課題名 (英文) Development of Microfluidic Device for Detection of Oncogenes

研究代表者

橋本 雅彦 (HASHIMOTO MASAHIKO)

同志社大学・理工学部・准教授

研究者番号：20439251

研究成果の概要 (和文)：本研究では、癌遺伝子診断を高速かつ高感度に行うために、リガーゼ検出反応 (LDR) と機能性微粒子を利用したマイクロ流体分析システム“フロースルー型 LDR/サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ”を構築した。本アッセイを、正常型 DNA の分子集団に含まれる微量の変異型 DNA の検出に適用したところ、変異型と正常型のテンプレートの濃度比が 1:100 まで明確に識別できた。また、本アッセイにおける LDR 後のプロセスに要した時間はわずか 4.4 分であった。

研究成果の概要 (英文)：The author has developed a microfluidic analytical system, named “flow-through LDR/sandwich hybridization assay”, capable of detecting low abundant point mutations where ligase detection reaction (LDR) was employed in conjunction with functional particles of nano- to micro-scale. The author successfully demonstrated its ability to detect one mutant sequence in 100 normal sequences with the present system. In addition, the post-LDR procedures could be processed at a relatively high speed (total required time, ~4.4 min).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：チップ分析、機器分析、生体成分、バイオセンサー、試料処理、DNA、癌遺伝子、点突然変異

1. 研究開始当初の背景

K-ras 遺伝子は、これまで最も詳細に調べられてきた癌関連遺伝子で、わずか塩基 1 つの変異により、細胞分裂が異常に増大してしまうこと (すなわち発癌) が知られている。特に膵癌との相関が高く、膵癌患者の約 80～90% で *K-ras* 遺伝子における DNA の変異が確認されており、他にも消化器癌患者の

約 30～50% から変異が見つかっている。しかしながら、細胞癌化が最も進行している部位の組織片を採取できたとしても、変異が起きている細胞 (変異細胞) は全体の約 30% 程度であり、組織片採取の位置が癌組織の主要部位からわずかでも外れてしまうと、変異細胞の含有率は著しく低下してしまう。したがって、正常型が圧倒的多数を占める試

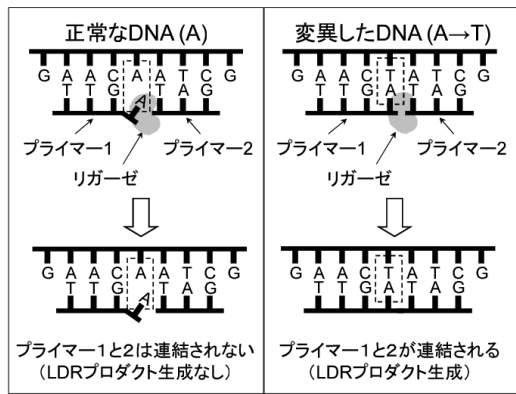


図1. LDRに基づく点突然変異検出の原理

料中に極微量含まれる変異型 DNA をいかに高感度かつ選択的に検出できるかということが、癌の早期発見にとって重要である。

2. 研究の目的

本申請課題では、癌関連遺伝子における DNA 変異の高速スクリーニングシステム構築のために、LDR アッセイ (図1) における様々な操作プロセスが一枚の微小基板上に高密度に集積化されたマイクロ流体バイオチップおよびバイオチップの制御ユニットより構成されるシステムデバイスを開発することを最終的な目標として研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

遺伝子診断に限らず、多くのバイオアッセイの特徴は、最終的な検出プロセスに達するまでに、資料の前処理を含めて実に様々なプロセスより構成されることである。突然変異した DNA のみを選択的に検出することができる LDR 反応を基本とした遺伝子アッセイは、大まかに区分すると、以下の7つの独立したプロセスより構成されている。

- (1) 生体試料からのゲノム DNA の抽出
- (2) 抽出されたゲノム DNA の精製
- (3) PCR による癌関連遺伝子の増幅
- (4) PCR プロダクトの精製
- (5) LDR 反応
- (6) LDR プロダクトの精製
- (7) 精製された LDR プロダクトの検出

研究代表者は、上記のプロセス (3) については独立したユニットとして既に開発済みであり、プロセス (5) および (7) についてもクレジットカード程度の大きさのポリマー基板上に集積化させることに成功している。また、これまで行った予備研究において、PCR プロダクトおよび LDR プロダクトの精製 (プロセス (4) および (6)) は必ずしも必要でないことを確認している。本研究課題では、LDR アッセイが要求するマルチプロセスを一つのシステムとして統合化す

るという最終目標に近づくために、上記の各プロセスをさらに高機能化していく検討に加え、アッセイ自体を改良することにも取り組んだ。

4. 研究成果

2009年度は、癌遺伝子診断マイクロ流体分析システムを開発するために、バイオチップ上に構築する多段階のアッセイプロセスを7つに分割し、個々について基礎的検討を行った。DNA 一塩基変異の検出を可能にする LDR における反応生成物 (LDR プロダクト) の精製プロセスには、ストレプトアビジンが表面にコートされた磁性ビーズを利用する新たな手法を取り入れた。本手法により、従来よりも、より簡便かつ迅速な LDR プロダクトの精製が可能となった。また、精製された LDR プロダクトの検出に、質量分析法、DNA ハイブリダイゼーションに基づく蛍光および化学発光検出法など様々な分析手法の利用を試みた。いずれの手法を用いた場合でも、DNA の一塩基変異を高感度に検出することが達成された。

さらに、バイオチップの幾何構造をより簡便にすることによって操作性を高めることを目的に、LDR プロダクトを精製することなく一塩基変異の選択的検出を可能にする新たな手法の開発に取り組んだ (図2)。具体的には、LDR に用いる2つのプライマー (識別プライマーおよび共通プライマー) の末端に、それぞれ蛍光色素 (Alexa647) およびビオチンを標識しておき、ストレプトアビジンが表面にコートされた量子ドット (QD605) を LDR 反応後の溶液に加えることによりプロダクトのビオチン末端へ量子ドットをタグした。プロダクト両末端の Alexa647 と QD605 との間で蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を誘起させプロダクトの検出を試みたところ、ポジティブコントロールではネガティブコントロールの4倍の FRET 強度が得られ、本手法により LDR プロダクトを精製することなく直接検出できることを実証した (図3)。以

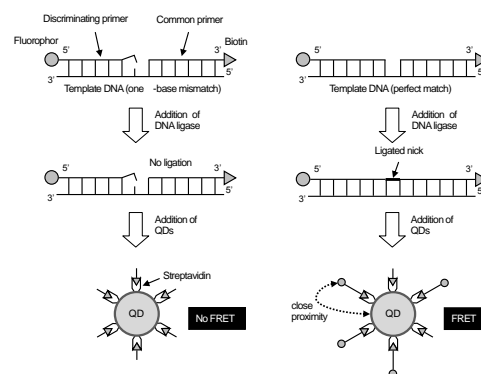


図2. LDR-FRET アッセイ

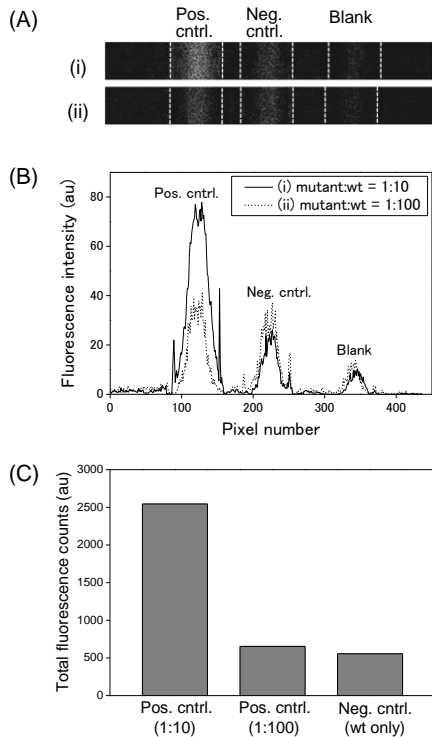


図3. LDR-FRET アッセイによる *K-ras* 遺伝子上の点突然変異検出結果

- (A) キャピラリー内に充填したサンプルの蛍光イメージ(i)変異型DNA: 正常型 DNA = 1:10; (ii) 変異型 DNA: 正常型 DNA = 1:100
 (B) 画像 (A) における蛍光強度の積算プロファイル
 (C) 積算された蛍光強度の比較

上のように、交付申請書に記した癌遺伝子診断マイクロ流体デバイスの開発を大幅に前進させる知見と成果を得ることができた。

2010年度は、機能性磁性ビーズを利用した新規のDNA変異検出法(フロースルー型LDR/サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ)を開発した(図4)。比表面積が大きな磁性ビーズをプローブの固相担体を利用することで検出感度が向上し、また、フローフォーマットではインチューブフォーマットと比較してより短時間での高効率なハイブリダイゼーションが達成された。Pos. cntrl. (1(変異型):10(正常型))のフローフォーマットとインチューブフォーマットにおける蛍光強度をそれぞれ I_{FP} , I_{IP} として比較すると、ハイブリダイゼーション時間が5分の場合には $I_{FP} / I_{IP} = 3.5$ であるのに対し、ハイブリダイゼーション時間が1分の場合には $I_{FP} / I_{IP} = 9.5$ となった。これはフローフォーマットのほうがハイブリダイゼ

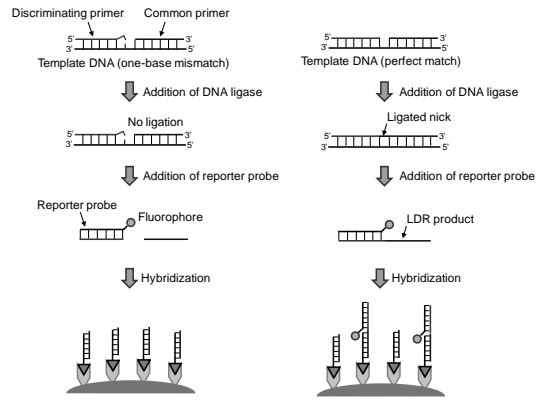


図4. LDR/sandwich hybridization アッセイの概念図

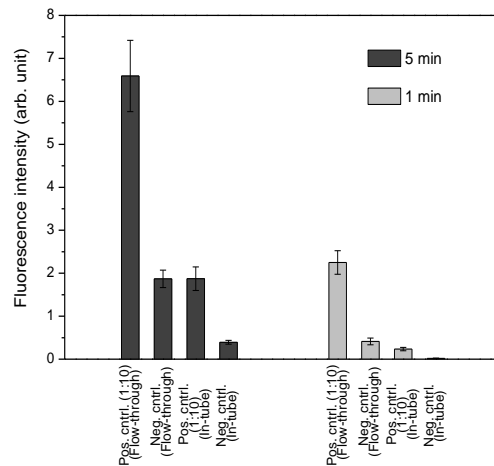


図5. Flow-through フォーマットと In-tube フォーマットにおけるハイブリダイゼーション効率の比較

ーションのキネティクスが大きいことを示す。本アッセイによって、正常型DNAの分子集団に含まれる微量の変異型DNAの検出を試みたところ、変異型と正常型のテンプレートの濃度比が1:100まで明確に識別可能であった(図5)。また、本アッセイにおけるLDRカクテルとレポータープローブ溶液のプリヒーティング、1分; (2) LDRプロダクト/レポータープローブのハイブリッド形成反応、1分; (3) ハイブリダイゼーション、1分; (4) 洗浄、1分; (5) 蛍光スキャニング(スキャニング速度, $\text{mm}^2/30 \text{ s}$), $21.6 \text{ s}/0.72 \text{ mm}^2$, $21.6 \text{ s}/120 \times 40 \text{ pixel} \times 6 \text{ capillaries}$)であった。本研究により、微粒子材料を導入した迅速な一塩基変異解析法が確立された。以上のように、交付申請書に記した癌遺

伝子診断マイクロ流体デバイスの開発の前進につながる知見と成果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計17件)

①Masahiko Hashimoto, Kazuma Yoshida, and Kazuhiko Tsukagoshi, Direct Detection of Mutant DNA in a Mixed Population of Higher Copy Number Wild-Type DNA Based on Ligase Detection Reaction in Conjunction with Fluorescence Resonance Energy Transfer, *Analytical Sciences*, 査読有, Vol. 26, 1255-1299 (2010).

②橋本雅彦、上郡 純、塚越一彦、キャピラリーゲル電気泳動によるリガーゼ検出反応生成物の分析、同志社大学理工学研究報告、査読有、50、2010、164-170.

[学会発表] (計46件)

①萩原健太・橋本雅彦・塚越一彦、磁性ビーズを利用した一塩基変異の特定、日本化学会第90春季年会、2011年3月28日、神奈川大学横浜キャンパス.

②嶋瀬浩司、橋本雅彦、塚越一彦、ハイドロダイナミッククロマトグラフィーを利用した一塩基変異のスクリーニング、日本化学会第90春季年会、2011年3月28日、神奈川大学横浜キャンパス.

③鳥居真幸、橋本雅彦、塚越一彦、微小空間におけるPCR増幅のためのPLC制御温度サイクラーの開発、日本化学会第90春季年会、2011年3月28日、神奈川大学横浜キャンパス.

④柳本浩輔、橋本雅彦、塚越一彦、MALDI-TOF質量分析計によるオリゴヌクレオチドライゲーシオンプロダクトの検出、日本化学会第90春季年会、2011年3月27日、神奈川大学横浜キャンパス.

⑤ Masahiko Hashimoto, Kazuma Yoshida, Kazuhiko Tsukagoshi, Rapid detection of point mutations based on oligonucleotide ligation, 2010 international chemical congress of pacific basin societies December 19th, 2010, Honolulu.

⑥吉田一真、橋本雅彦、塚越一彦、LDR-FRET法によるDNA一塩基変異の検出、日本分析化学会第59年会、2010年9月16日、東北大学

⑦濱田真理子、橋本雅彦、塚越一彦、キャピラリーゲル電気泳動-レーザー励起蛍光2波長分析システムを用いたDNA突然変異の分析、化学工学会第42回秋季大会、2010年9月6日、同志社大学

⑧吉田一真、橋本雅彦、塚越一彦、蛍光共鳴

エネルギー移動を利用したDNA一塩基変異の検出、化学工学会第42回秋季大会、2010年9月7日、同志社大学

⑨藤田卓、橋本雅彦、塚越一彦、オリゴヌクレオチドのライゲーシオンを利用したDNA点突然変異の検出、日本化学会第89春季年会、2010年3月28日、近畿大学

⑩FRETを利用したDNA一塩基変異の検出

吉田一真、橋本雅彦、塚越一彦、日本化学会第89春季年会、2010年3月27日、近畿大学

⑪濱田真理子、橋本雅彦、塚越一彦、キャピラリーゲル電気泳動-レーザー励起蛍光2波長分析システムを用いたDNA点突然変異の高感度検出、日本化学会第89春季年会、2010年3月27日、近畿大学

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：管径方向分配クロマトグラフィーを用いた混合物の分離方法

発明者：塚越 一彦・橋本 雅彦・神野 直哉

権利者：同上

種類：特許権

番号：特願2011-049138号

出願年月日：平成23年3月7日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 雅彦 (HASHIMOTO MASAHIKO)

同志社大学・理工学部・准教授

研究者番号：20439251

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし