

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350581

研究課題名(和文)独自のマイクロチップによる疾患マーカータンパク質・核酸の同時かつ簡便な検出

研究課題名(英文) Facile and simultaneous detection of disease marker protein and nucleic acid using 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・前田バイオ工学研究室・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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、独自のマイクロチップと蛍光増幅法を活用して、血中の疾患マーカーとなるタンパク質およびマイクロRNAを同時かつ簡便に検出する技術の開発を目的としていた。まず抗体を固定化する基板材料を検討することにより、前立腺がんマーカータンパク質の高感度な検出を実現した。また、3種類のマイクロRNAを同時に検出できるマイクロチップの試作に成功した。さらに、ヒト白血球由来のトータルRNAから4種類のマイクロRNAを本マイクロチップにより測定したところ、それらの測定値は従来の定量PCRによる測定値とよく一致し、本マイクロチップが実試料に適用可能であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：This project aimed at development of a microfluidic chip (microchip) which enables facile and simultaneous detection of disease marker protein and nucleic acid by exploiting our original microchip technologies. First, we have succeeded in highly sensitive detection of a biomarker protein for prostate cancer by optimizing the antibody-supporting substrate. Second, we have developed a microchip for simultaneous detection of 3 different microRNAs. Finally, we tried measurements of 4 different microRNAs from a total RNA sample derived from human leucocytes. As a result, the measured values from the microchips well agreed with those from conventional quantitative polymerase chain reaction. These results indicate that the developed microchip is promising for application to real complex samples.

研究分野：分析化学

キーワード：検査・診断システム マイクロチップ

1. 研究開始当初の背景

血液、尿、唾液などに含まれる物質の中には、疾患と強い相関を持つものが多数発見されており、疾患マーカーと呼ばれる。そのほとんどはタンパク質である。中でも有名なものとして血中の前立腺特異抗原 (PSA) があり、前立腺がんの診断に役立っているが、疑陽性が多いという問題があった。

そうした中、2008年に血中のマイクロRNAが新たなカテゴリーの疾患マーカーになり得ることが示唆された。マイクロRNAは20塩基程度の非翻訳性RNAであり、がん細胞内では異常な発現パターンを示すことが既に知られていた。2008年に、それらの一部が血中に分泌され、安定に存在し続けることが判明したため、新たな疾患マーカーの候補として期待されている。例えば、miR-141と呼ばれる22塩基のマイクロRNAの血中濃度が、前立腺がんにより上昇することが示されている。興味深いのは、miR-141による前立腺がんの判定は、若干の偽陰性はあるものの、偽陽性が皆無だったことである。すなわち、PSA検査とmiR-141検査は相補的であり、これらを同時に行うことで、偽陽性・偽陰性ともにゼロの完全な診断ができる可能性が出てきた。

これまで、タンパク質と核酸を同時に検出する方法はほとんど研究されず、それぞれに全く異なる方法論が採られてきた。タンパク質の検出法と言えば抗体を使ったイムノアッセイ、RNAなど核酸にはPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)が定番とされ、PCRには抽出など前処理工程が必須というのが常識であった。しかし、血中マイクロRNAの存在が発見されて以降、前処理なしで検出した成功例が報告されており、これはイムノアッセイと両立可能と考えられる。研究代表者らは独自のマイクロ流体チップ(マイクロチップ)を用いたタンパク質および核酸の検出法を研究してきた。マイクロチップとは、内径0.1mm程度の流路を内蔵した数cm角の平板であり、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イムノアッセイや核酸のハイブリダイゼーションが迅速に行なえることが分かっていた。

2. 研究の目的

本研究ではタンパク質のイムノアッセイとRNAのハイブリダイゼーションアッセイを同時かつなるべく簡便に行えるデバイスを開発することを目的とした。そのために、研究代表者の独自技術である自律駆動マイクロチップと層流樹状増幅法(Laminar flow-assisted dendritic amplification, LFDA)を活用する方針とした。検出時間として20分程度を目標とした。具体的な検討項目としては、検出感度、多検体を同時に検出する方法、検出特異性などがあった。

3. 研究の方法

マイクロチップはガラス基板とポリジメチルシロキサン(PDMS)板からなる。ガラス基板の表面には目的のタンパク質を捕捉するための抗体または目的のマイクロRNA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。一部の実験ではガラス基板の代わりにナノポーラスシリコンを用いた。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DNAまたは抗体のライン状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ブロッキング剤を流した後、サンプル溶液を0.5μL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抗体または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。

4. 研究成果

(1) 検出感度の検討

タンパク質の検出に関しては、抗体を固定化する基板として3次元表面を持つナノポーラスシリコンを用い、2種類のタンパク質を同時に検出する実験を行った。今回は抗体を物理吸着により固定化することで、これまでの共有結合より固定化時間を短縮することができた。血清中の前立腺がんマーカーであるPSAとhK2を同時にイムノアッセイしたところ、検出限界は1pg/mLという高感度を達成し、ダイナミックレンジは5桁にわたった。

マイクロRNAの検出に関しては、検出限界が配列に依存する程度が予想外に大きいことが分かった。いくつかの配列で検出限界を例示するとmiR-16で13fM、miR-500a-3pで82fM、miR-21-5pで1.5pMのように2桁以上の違いが見られた。比較的検出限界の高いmiR-21-5pなどにおける検出感度の向上を目指し、プローブDNAをヘアピン型に変更する、増幅試薬の濃度を最適化する、などの試みを行ったが、検出感度を向上させることはできなかった。

(2) 多検体同時検出法の検討

マイクロRNAの検出において、3種類のプローブDNAを基板上に固定化し、それぞれに対応するマイクロRNA(miR-16、21-5p、500a-3p)を同時に検出する実験を行った。その結果、それぞれのマイクロRNAが迅速性を損なうことなく検出でき、異なる配列間では

とんど交差反応が見られないことがわかった。3種類のマイクロRNAの検出限界は、それぞれ単独で測定した実験の結果と整合する値であった。検出時間は単独で検出した場合と全く変わらず、20分で行うことができた。

(3) 検出特異性の検討

上記(1)(2)の検討を含めて、これまでマイクロRNA検出の実験では合成オリゴRNA標品を用いており、本手法が生体由来試料に適用できるほど特異性を持つか不明であったため、生体由来試料を用いて検出の特異性を検討した。市販のヒト白血球由来トータルRNAを本手法によって測定したところ、文献から高発現が予想されるmiR-16, 223は検出され、低発現が予想されるmiR-196b, 204, 211は検出されなかった。確認のためこれらの配列の合成オリゴRNAを測定したところ、本手法は全ての配列で正常に機能しており、上記結果は実際の発現状況を反映していると考えられる。また、トータルRNAに合成miR-204(上述のとおり内在性のものは不検出)をいろいろな濃度で添加し、本手法で測定したところ、濃度に依存した信号が得られた。以上から、本手法がマイクロRNA検出において高い特異性を持つことが定性的に確かめられた。

さらに検出特異性を定量的に確かめるため、まず配列が1塩基または2塩基だけ異なるmiRNAに対するマイクロチップの応答を調べたところ、2塩基異なるものに対しては全く応答せず、1塩基異なるものに対してはわずかに応答したが、応答量は目的配列のものに比べて数%に過ぎなかった。次に、目的配列をその一部として含む前駆体pre-miRNAに対するマイクロチップの応答を調べたところ、3種類の配列(miR-16, -21, -451)に対して非特異的な応答は全く見られず、良好な特異性が確認された。

次に、生体由来サンプルに対する特異性を定量的に評価するため、市販のヒト白血球トータルRNAからマイクロチップを用いて4種類のmiRNA(miR-16, -223, -451, cel-miR-39)濃度を測定し、定量PCRによる測定値と比較した。その結果、これら4組の測定値はよく一致し、マイクロチップによる検出が定量的にも良好な特異性を示すことが分かった。また、抗体を用いてメチル化DNA検出の実験を行い、核酸のハイブリダイゼーションと抗原抗体反応が本マイクロチップで同時に行えることを実証した。

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 8件)

1. Kazuki Hasegawa, Mutsuyoshi Matsumoto, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Detection of

Methylated DNA on a Power-Free Microfluidic Chip with Laminar Flow-Assisted Dendritic Amplification, *Analytical Sciences*, 掲載決定, 査読有

2. Eitaro Kondo, Ken-Ichi Wada, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Cryopreservation of adhered mammalian cells on a microfluidic device: toward ready-to-use cell-based experimental platforms, *Biotechnology and Bioengineering*, 113, 237-240, 2016, 査読有, doi: 10.1002/bit.25704

3. Ken-Ichi Wada, Kazuo Hosokawa, Yoshihiro Ito, Mizuo Maeda; Effects of ROCK inhibitor Y-27632 on cell fusion through a microslit, *Biotechnology and Bioengineering*, 112, 2334-2342, 2015, 査読有, doi: 10.1002/bit.25641

4. Sangwook Lee, Kazuo Hosokawa, Soyoun Kim, Thomas Laurell, Mizuo Maeda; Simple and robust antibody microarray based immunoassay platform for sensitive and selective detection of PSA and hK2 toward improving diagnosis accuracy of prostate cancer, *Sensing and BioSensing Research*, 3, 105-111, 2015, 査読有, doi: 10.1016/j.sbsr.2015.01.003

5. 石原量, 長谷川和貴, 細川和生, 前田瑞夫; 自律駆動マイクロ流体チップと層流樹状増幅法によるタンパク質と核酸の検出, 分析化学, 64, 319-328, 2015, 査読有

6. Eitaro Kondo, Ken-Ichi Wada, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Microfluidic perfusion cell culture system confined in 35 mm culture dish for standard biological laboratories, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118, 356-358, 2014, 査読有, doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.02.021

7. Ken-Ichi Wada, Kazuo Hosokawa, Eitaro Kondo, Yoshihiro Ito, Mizuo Maeda; Cell fusion through a microslit between adhered cells and observation of their nuclear behavior, *Biotechnology and Bioengineering*, 111, 1464-468, 2014, 査読有, doi: 10.1002/bit.25190

8. Hideyuki Arata, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Rapid sub-attomole microRNA detection on a portable microfluidic chip, *Analytical Sciences*, 30, 129-135, 2014, 査読有, doi: 10.2116/analsci.30.129

[学会発表](計 27件)

1. 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞

夫；マイクロチップによる高効率な生きた単一細胞間における直接的な細胞質移植, 第 38 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市), 12 月 1-4 日, 2015

2. Ryo Ishihara, Yoshitaka Uchino, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda, Akihiko Kikuchi; Surface modification of PDMS microchip for microRNA detection adopting electron beam-induced graft polymerization, microTAS 2015, Gyeongju (Korea), Oct. 25-29, 2015

3. Ken-Ichi Wada, Kazuo Hosokawa, Yoshihiro Ito, Mizuo Maeda; Prevention of nuclear mixing of fused cells interconnected through a microslit using ROCK inhibitor Y-27632 for direct cytoplasmic transfer between live single cells, microTAS 2015, Gyeongju (Korea), Oct. 25-29, 2015

4. 根岸里奈, 長谷川和貴, 細川和生, 養王田正文, 前田瑞夫; 自律駆動マイクロ流体チップを用いた total RNA 中のマイクロ RNA の検出, 第 67 回日本生物工学会大会, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市), 10 月 26-28 日, 2015

5. 根岸里奈, 長谷川和貴, 細川和生, 養王田正文, 前田瑞夫; 自律駆動マイクロ流体チップを用いたヒト由来 total RNA 中の microRNA 検出, 第 75 回分析化学討論会, 山梨大学 (山梨県甲府市), 5 月 24-25 日, 2015

6. 長谷川和貴, 細川和生, 松本睦良, 前田瑞夫; 自律駆動マイクロ流体チップを用いた microRNA 検出における検出限界の塩基配列依存性, 第 75 回分析化学討論会, 山梨大学 (山梨県甲府市), 5 月 24-25 日, 2015

7. 細川和生; マイクロチップを用いた簡便・迅速・高感度なマイクロ RNA 検出, 理化学研究所 新技術説明会, JST 東京本部別館 (東京都千代田区), 6 月 12 日, 2015

8. SangWook Lee, Kazuo Hosokawa, Soyoun Kim, Thomas Laurell, Mizuo Maeda; A high sensitive and cross reaction free antibody centric porous silicon PSA/hK2 duplex immunoassay platform for improving diagnostic accuracy of prostate cancer, microTAS 2014, San Antonio (USA), Oct. 29, 2014

9. Eitaro Kondo, Ken-Ichi Wada, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Microfluidic device is effective for keeping adhered cells intact during cryopreservation: toward ready-to-use cell assay platforms,

microTAS 2014, San Antonio (USA), Oct. 28, 2014

10. SangWook Lee, Ryo Ishihara, Kazuo Hosokawa, Soyoun Kim, Thomas Laurell, Mizuo Maeda; Porous silicon based multi-ligand and multiplex immunoassay platform for improving diagnosis accuracy of prostate cancer, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 30 回研究会, 北海道大学(北海道札幌市), 10 月 3 日, 2014

11. Kazuki Hasegawa, Ryo Ishihara, Mutsuyoshi Matsumoto, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Sensitive microRNA detection on power-free microfluidic chip using quantum dots, Royal Society of Chemistry Tokyo International Conference 2014, 幕張メッセ (千葉県千葉市), 9 月 5 日, 2014

12. Ryo Ishihara, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Multiplex miRNA detection on power-free microchip for point-of-care diagnosis, International Symposium on Smart Biomaterial, 物質材料研究機構 (茨城県つくば市), 3 月 24 日, 2014

13. 細川和生; マイクロチップによる簡便・迅速なマイクロ RNA 検出, 日本がん分子標的治療学会第 9 回トランスレーショナルリサーチワークショップ, 都市センターホテル (東京都千代田区), 1 月 17 日, 2014

14. 和田健一, 近藤栄太郎, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫; マイクロスリットによる伸展した融合細胞間における核の混合の回避, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 28 回研究会, イーグレひめじ (兵庫県姫路市), 12 月 6 日, 2013

15. 近藤栄太郎, 和田健一, 細川和生, 前田瑞夫; 外部の送液系が不要で 35 mm 培養皿に収まるマイクロ流体細胞培養システム, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 28 回研究会, イーグレひめじ (兵庫県姫路市), 12 月 6 日, 2013

16. 石原量, 細川和生, 前田瑞夫; 自律駆動マイクロ流体チップによるマイクロ RNA の高速同時検出, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 28 回研究会, イーグレひめじ (兵庫県姫路市), 12 月 5 日, 2013

17. 長谷川和貴, 石原量, 細川和生, 前田瑞夫; 自律駆動マイクロ流体チップと量子ドットを用いたマイクロ RNA の高感度検出, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 28 回研究会, イーグレひめじ (兵庫県姫路市), 12 月 5 日, 2013

18. 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫; マイクロデバイスを用いた細胞融合による直接的な細胞質移植技術, 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市), 12月4日, 2013

19. 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫; マイクロデバイスを用いた核の混合を伴わない細胞融合, 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会, タワーホール船堀(東京都江戸川区), 11月26日, 2013

20. 石原量, 長谷川和貴, 細川和生, 前田瑞夫; 自律駆動マイクロ流体チップを利用した microRNA の高速・高感度検出, 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会, タワーホール船堀(東京都江戸川区), 11月25日, 2013

21. 石原量, 細川和生, 前田瑞夫; その場診断のための自律駆動マイクロ流体チップによるマイクロ RNA の高速・高感度検出, 第 33 回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 日本女子大学(東京都文京区), 11月15日, 2013

22. Ken-Ichi Wada, Eitaro Kondo, Kazuo Hosokawa, Yoshihiro Ito, Mizuo Maeda; Cytoplasmic transfer between adhered cells by cell fusion through microslit, microTAS 2013, Freiburg (Germany), Oct. 30, 2013

23. 近藤栄太郎, 和田健一, 細川和生, 前田瑞夫; 重力を用いた受動的なかん流によるマイクロ流体チップ上での細胞培養, 第3回CSJ化学フェスタ 2013, タワーホール船堀(東京都江戸川区), 10月22日, 2013

24. 長谷川和貴, 石原量, 細川和生, 前田瑞夫; 自律駆動マイクロチップを用いたマイクロ RNA の高感度検出, 第 3 回 CSJ 化学フェスタ 2013, タワーホール船堀(東京都江戸川区), 10月21日, 2013

25. 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫; Cell fusion without nuclear mixing by using micro structured device, 第 86 回日本生化学会大会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 9月13日, 2013

26. 和田健一, 細川和生, 伊藤嘉浩, 前田瑞夫; 細胞質移植を可能にするマイクロデバイスを利用した新規細胞融合法の開発, 第 65 回日本細胞生物学会大会, ウィンクあいち(愛知県名古屋市), 6月19日, 2013

27. Ryo Ishihara, Hideyuki Arata, Kazuo Hosokawa, Mizuo Maeda; Rapid and sensitive microRNA detection on power-free microfluidic chip, 第 62 回高分子学会年次大会, 京都国際会館(京都府京都市), 5月

29日, 2013

〔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〕
該当項目なし

6. 研究組織

(1) 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・前田バイオ
工学研究室・専任研究員

研究者番号: 00373366

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし