

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26750146

研究課題名(和文) DNAメチル化異常のナノ分解能1分子標本検査デバイスの開発

研究課題名(英文) Development of microscopic single-molecule pathological examination device for DNA methylation

研究代表者

小野島 大介 (ONOSHIMA, Daisuke)

名古屋大学・未来社会創造機構・特任講師

研究者番号：40510219

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)：本研究では、近年がん診断マーカーとしての有用性が報告されているDNAメチル化異常を検出対象として、DNAの病理検査デバイスの開発を実施した。実験的にメチル化を発生させたDNAを早期がん由来のメチル化異常を持つDNAのモデルとして使用し、DNAメチル化部位の染色、メチル化DNAの伸長、及び画像解析を行う微小流体デバイスを開発した結果、血液1mL中に数十ng程度含まれる腫瘍由来の血中遊離DNAに相当するサンプルからDNAを標本化し、DNAメチル化異常を画像検査する技術を確立することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Image analysis of methylated DNA has a great potential for exploring epigenomic change in cancer cells. In order to visualize signal variation caused by DNA methylation, it is crucial that the DNA molecules are arrayed in parallel direction inside the narrow microscopic field. Here we show that methylated DNA molecules can be trapped and stretched at the patterned grooves on the surface of microfluidic channel by flow. The demonstrated DNA aligning technique enables simultaneous molecular imaging and detection for cancer diagnosis at the single molecule level.

研究分野：ナノバイオデバイス工学

キーワード：1分子計測(SMD) 細胞・組織 マイクロ・ナノデバイス

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在のがん診断に関わる病理学では、病変部の組織を薄切・固定してプレパラート状とした標本を肉眼や顕微鏡を用いて検査するのが一般的である。近年は、がんの種類や診断目的によっては、擦過・穿刺吸引によって採取した細胞標本を用いた細胞診断(細胞診)も行われているが、1分子や1細胞を診る顕微鏡検査に向けて、がん細胞やがん細胞に含まれる生体分子の病理標本化が強く望まれている。

(2) 特に、DNAは紫外線・放射線照射による鎖の切断や、細胞のがん化に伴う遺伝子の変化・メチル化等の分子レベルの異常の重要性が指摘されており<sup>[引用文献①]</sup>、病理標本を用いてこれらの異常を精査する画像診断は、次世代のDNAシーケンサー等を用いる遺伝子検査に加えて、今後のがんを対象とした病理学及び病理診断の高度化に必須の要素である。

(3) 例えば、DNAの病理標本を使用すれば、分子レベルで異常を起こしているDNAを直接計測することが可能となり、がんの種類や進行状況を素早くかつ詳細に検査できるようになる。

(4) そこで、本研究では、申請者が持つ微小流体チップ技術によってがん細胞やがん細胞に含まれるDNAを標本化し、がんに関連したDNAメチル化異常を検出するための技術開発を実施した

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、がん細胞やがん細胞由来の診断マーカーを固定化(標本化)するデバイスを作製することにより、がん細胞が増殖を開始する前の段階から実施可能な細胞・分子計測技術を新たに構築し、早期がんに関連する病理検査学的進展を達成することである。

### 3. 研究の方法

(1) 実験的にメチル化を発生させたDNAを早期がん由来のメチル化異常を持つDNAのモデルとして使用し、DNAメチル化部位の染色技術、メチル化DNAの1分子伸長技術、及び1分子画像検出技術の開発を行った。

(2) (1)の研究実績の応用開発により、メチル化DNAの測長技術、メチル化DNAと非メチル化DNAの分離・同定技術、及びがん細胞の1細胞捕捉技術の開発を行った。

(3) (2)の研究実績の応用開発により、メチル化DNAを含むがん細胞を1細胞ずつ並べて捕捉するデバイスのプロトタイピング、1細胞捕捉したがん細胞の回収、がん細胞表面の染色技術の開発を行った。

### 4. 研究成果

(1) DNAメチル化部位の染色、メチル化DNAの1分子伸長、及びメチル化DNAの1分子画像検出を行った。DNAメチル化部位の染色は、Methyl Binding Domain Protein-Biotin (MBD) を介して Fluoronanogold-Streptavidin Alexa Fluor 546 (FNG) を標識することで達成した(図1)。

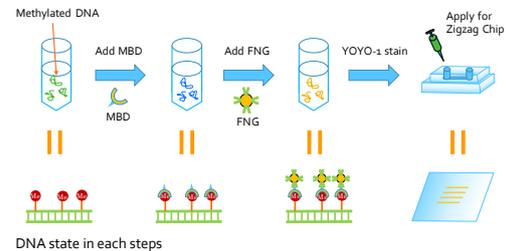


図1：メチル化DNAの染色と標本化プロセス

メチル化DNAの1分子伸長は、DNA溶液送液用マイクロ流路チップとDNA固定用ジグザグ溝構造チップの二種類のシリコーン樹脂製チップを張り合わせて作製したデバイスによって達成した。メチル化DNAの1分子画像検出は、メチル化部位を染色したDNA溶液をシリンジポンプによってデバイス中に流した後、ジグザグ形状の溝構造のパターン上に固定されたDNAを全反射蛍光顕微鏡で観察することで達成した(図2)。

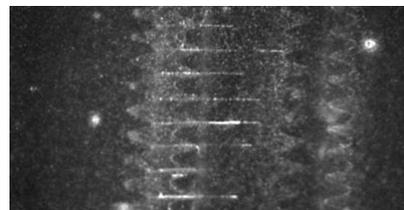


図2：標本化されたメチル化DNAの蛍光像

(2) DNA固定用の溝構造に関しては、ジグザグの形状・寸法を検討し、最も固定化率の高いパターンを実験的に求めることに成功した。MBDを介したFNGによる標識に関しては、MBDとFNGの最適混合比を検討し、メチル化DNAの染色のプロセスを確立した。デバイスのDNAに対する捕捉率は約70%を達成し、一度に約1,500本のDNAを伸長固定することに成功した。

(3) 本デバイスを用いた1分子レベルの測長によるメチル化DNAと非メチル化DNAの同定試験を行った。メチル化DNAと非メチル化DNAの測長は、インターカラー色素YOYO-1で染色したDNAをデバイス上で並列伸長し、全反射蛍光顕微鏡で観察することにより達成した。測長によるメチル化DNAの同定は、200分子の計測結果を統計解析することで達成した。

(4) メチル化 DNA は非メチル化 DNA に比べて分子の剛性がアップし、伸長が 20%程度抑制されることを明らかにした。同様の 1 分子レベルの測長を 48.5kbp と 17kbp の非メチル化 DNA に適用した実験により、非メチル化 DNA のサイズ分離検出を達成した。

(5) メチル化 DNA を伸長固定する本デバイスを細胞向けにカスタマイズし、メチル化 DNA を含むがん細胞を 1 細胞ずつ並べて捕捉する技術開発を進めた。がん細胞用の捕捉構造に関しては、溝構造の形状・寸法を検討し、単一細胞の捕捉率が最も高いパターンを実験的に求めることに成功した。

(6) がん細胞を含む懸濁液の導入に関しては、ピペッティングと重力沈降を組み合わせた手法を新たに検討し、従来のポンプを用いた手法を大幅に簡易化したプロトコルを確立した (図 3)。

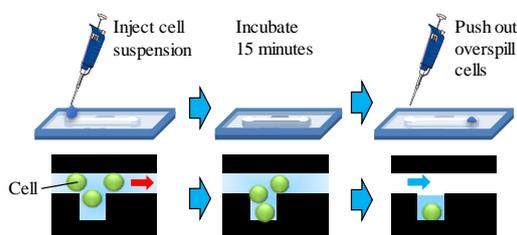


図 3：ピペッティングと重力沈降を組み合わせた捕捉プロトコル

(7) 本技術を市販の樹脂フィルムとシーリングチャンバーで実現する実用化デバイスのプロトタイプングを行った。樹脂フィルムにはフォトリソグラフィとドライエッチングにより数万から数十万の微細孔加工を施し、プラズマによる親水化処理を行うことで樹脂フィルム表面の濡れ性を向上させ、これをシーリングチャンバーと組み合わせて使用することで、ピペッティング操作のみにより細胞懸濁液を微細孔へほぼ 100%導入することを実現した (図 4)。

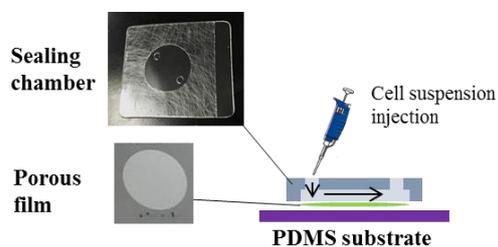


図 4：実用化デバイスのプロトタイプング

(8) プラズマによる親水化処理は、市販の高分子剤を用いたコーティング処理で代用可能なことを明らかにし、微細孔内にごん細胞を 1 細胞ずつ捕捉する確率を向上させた。コーティング処理後の表面上では、がん細胞を容易に操作することが可能となり、微小標的の吸引・採取システムを利用することで、

1 細胞捕捉したがん細胞の回収に成功した。

(9) 回収後のがん細胞に対する 1 細胞由来の DNA からメチル化異常を遺伝子解析し、1 細胞から培養する技術開発に向けて、がん細胞表面の染色技術の開発を進めた。染色液の希釈率や染色用抗体の条件を実験的に検証し、樹脂フィルムがもつバックグラウンドノイズと区別可能な染色プロトコルを確立した。

(10) リアルタイム PCR による核酸成分の微量検出と変異検出を通じて、がん細胞の DNA を遺伝子解析するプロトコルの開発を行った。微小標的の吸引・採取システムの利用に加え、がん細胞を捕捉した樹脂フィルムから直接 DNA 抽出と DNA 増幅を行った後に定量 PCR を行う試験を実施し、がんに関連した細胞株 (H1975) が持つ上皮成長因子に対応する二種の遺伝子 (T790M、L858R) を対象に PCR 条件を検証した結果、樹脂フィルム上に捕捉したがん細胞からターゲットの遺伝子変異を検出することに成功した。

(11) メチル化および非メチル化されている塩基を特異的に増幅してメチル化の状態を分析する MSP 解析を行った。CpG 配列のメチル化状態に応じて配列が変わる塩基部位に対して、メチル化 DNA 検出用プライマーと非メチル化 DNA 検出用プライマーを設計して PCR を行った結果、増幅の有無によりメチル化または非メチル化が識別できることを確認した。

#### <引用文献>

① S.P. Jackson and J. Bartek, The DNA-damage response in human biology and disease, *Nature*, 461, 2009, pp. 1071-1078

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① D. Onoshima, Y. Hattori, H. Yukawa, K. Ishikawa, M. Hori, and Y. Baba, Cell deposition microchip with micropipette control over liquid interface motion, 査読有、*Cell Med*, 2018, in press
- ② N. Kihara, H. Odaka, D. Kuboyama, D. Onoshima, K. Ishikawa, Y. Baba, M. Hori, Facile fabrication of a poly(ethylene terephthalate) membrane filter with precise arrangement of through-holes, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読有、57, 2018, 37001  
DOI: 10.7567/JJAP.57.037001
- ③ D. Onoshima Daisuke, Y. Baba, Microfluidic DNA Stretching Device for Single-Molecule Diagnostics, *Methods Mol. Biol.*, 査読有、1547, 2017, pp.

- 105-111  
DOI: 10.1007/978-1-4939-6734-6\_8
- ④ D. Onoshima, N. Kawakita, D. Takeshita, H. Niioka, H. Yukawa, J. Miyake, and Y. Baba, Measurement of DNA Length Changes upon CpG Hypermethylation by Microfluidic Molecular Stretching, 査読有、Cell Med., 9, 2017, pp. 61-66  
DOI: 10.3727/215517916X693087
- ⑤ D. Onoshima, Y. Baba, Microfluidic DNA stretching device for single-molecule diagnostics, 査読有、Methods Mol. Biol., 1547, 2016, pp. 105-111  
DOI: 10.1007/978-1-4939-6734-6\_8
- ⑥ D. Onoshima, H. Yukawa, Y. Baba, Multifunctional nanobiodevices in medical sciences, Adv. Drug Deliv. Rev., 査読有、95, 2015, 1  
DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.006
- ⑦ D. Onoshima, H. Yukawa, Y. Baba, Multifunctional quantum dots-based cancer diagnostics and stem cell therapeutics for regenerative Medicine, Adv. Drug Deliv. Rev., 査読有、95, 2015, pp. 2-14  
DOI: 10.1016/j.addr.2015.08.004
- ⑧ A. Yonese, D. Onoshima, H. Yukawa, K. Ishikawa, M. Hori, Y. Baba, Superhydrophilic Glass Membrane Device with Open-Microhole Array for Filtering and Counting Rare Tumor Cells, Micro Total Analysis Systems, 査読有、1, 2015, pp. 493-495,  
[http://www.rsc.org/images/LOC/2015/PDFs/Papers/0493\\_W.057a.pdf](http://www.rsc.org/images/LOC/2015/PDFs/Papers/0493_W.057a.pdf)
- ⑨ H. Yasaki, D. Onoshima (equally contributed first author), T. Yasui, H. Yukawa, N. Kaji, Y. Baba, Microfluidic transfer of liquid interface for parallel stretching and stamping of terminal-unmodified single DNA molecules between zigzag-shaped microgrooves, Lab Chip, 査読有、15, 2015, pp. 135-140  
DOI: 10.1039/c4lc00990h
- ⑩ H. Yukawa, S. Nakagawa, Y. Yoshizumi, M. Watanabe, H. Saito, Y. Miyamoto, H. Noguchi, K. Oishi, K. Ono, M. Sawada, I. Kato, D. Onoshima, M. Obayashi, Y. Hayashi, N. Kaji, T. Ishikawa, S. Hayashi, Y. Baba, Novel positively charged nanoparticle labeling for in vivo imaging of adipose tissue-derived stem cells, PLOS ONE, 査読有、9, 2014, e110142  
DOI: 10.1371/journal.pone.0110142
- ⑪ D. Onoshima, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, On-chip analysis of intermittent molecular encounters in nuclease digestion of specific DNA sequence, Biophys. J, 査読有、103, 2014, pp. 699a-700a  
DOI: 10.1016/j.bpj.2013.11.3869
- ⑫ D. Takeshita, D. Onoshima, H. Yukawa, T. Yasui, N. Kaji, Y. Baba, Microfluidic Stretching of DNA with fluorescent gold nanoparticle for optical/electron microscopic imaging of a single DNA methylation, Micro Total Analysis Systems, 査読有、1, 2014, pp. 2348-2350,  
[http://www.rsc.org/images/loc/2014/PDFs/Papers/779\\_0593.pdf](http://www.rsc.org/images/loc/2014/PDFs/Papers/779_0593.pdf)
- ⑬ D. Onoshima, N. Kawakita, D. Takeshita, H. Yukawa, Y. Baba, Sizing and sorting of single DNA molecules by microfluidic molecular combing device, Micro Total Analysis Systems, 査読有、1, 2014, pp. 1775-1777,  
[https://pdfs.semanticscholar.org/3e0a/80cec5306d9a1827ea36551cc5dbb376315c.pdf?\\_ga=2.233134174.1318272339.1526956027-1497545406.1526956027](https://pdfs.semanticscholar.org/3e0a/80cec5306d9a1827ea36551cc5dbb376315c.pdf?_ga=2.233134174.1318272339.1526956027-1497545406.1526956027)
- ⑭ 小野島大介、馬場嘉信、ここまで進んだがんの診断・血中マーカーによる診断と呼吸診断の最前線、ライフライン 21 がんの先進医療、査読無、15、2014、pp. 46-48
- [学会発表] (計 12 件)
- ① D. Onoshima, H. Yukawa, Y. Hattori, K. Ishikawa, M. Hori, and Y. Baba, Cell deposition and isolation with micropipette control over liquid interface motion in microfluidic channel, The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017) (国際学会), 2017
- ② D. Onoshima, A novel membrane separation technology for cancer cells in blood, International Symposium on Pure & Applied Chemistry (ISPAC) 2017 (招待講演) (国際学会), 2017
- ③ D. Onoshima, Applications of bioimaging devices for cell transplantation and tumorigenic analysis in regenerative medicine, International Symposium on Pure & Applied Chemistry (ISPAC) 2016 (招待講演) (国際学会), 2016
- ④ 小野島大介、ポータブル・メディカル・デバイスが実現する未来社会、第 12 回ブラズマ医療サイエンスの扉 (招待講演)、2016
- ⑤ D. Onoshima, Nanobiodevices for diagnostics, therapeutics, and future mobility, 6th International Conference

on Nanotechnology: Fundamentals and Applications (ICNFA' 15) (招待講演) (国際学会), 2015

- ⑥ D. Onoshima, H. Yukawa, Y. Baba, Single cancer cell isolation and visualization in microfluidic chip for cytoscreening of cancer stem cells, World Molecular Imaging Congress (WMIC) 2015 (国際学会), 2015
- ⑦ D. Onoshima, Bioimaging devices for cell transplantation therapy in regenerative medicine, 8th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials (ISPlasma2016) (招待講演) (国際学会), 2016
- ⑧ 小野島大介, モビリティと融合したナノバイオ計測技術開発への取り組み、MERRO「第1回次世代若手一医・理・工連携一研究会」in 蒲郡, 夢の医療技術構想(グランドチャレンジ) 再生医療と再生治療・がんの微小環境・地域産業との連携 (招待講演), 2015
- ⑨ D. Onoshima, Trapping, stretching, and separating single DNA molecules on a chip, EMN Summer Meeting 2014 (招待講演), 2014
- ⑩ D. Takeshita, D. Onoshima, H. Yukawa, T. Yasui, N. Kaji, Y. Baba, Microfluidic Stretching of DNA with fluorescent gold nanoparticle for optical/electron microscopic imaging of a single DNA methylation, The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2014), 2014
- ⑪ D. Onoshima, N. Kawakita, D. Takeshita, H. Yukawa, Y. Baba, Sizing and sorting of single DNA molecules by microfluidic molecular combing device, The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2014), 2014
- ⑫ 竹下大貴、小野島大介、湯川博、安井隆雄、加地範匡、馬場嘉信、金ナノ粒子-蛍光分子複合体を用いたメチル化DNAの1分子伸長・画像解析デバイス、化学とマイクロ・ナノシステム学会第29回研究会、2014

[図書] (計1件)

- ① 日本化学会 編、化学同人、医療・診断・創薬の化学、2017、208

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

- ① 名称: 細胞捕捉フィルター  
発明者: 小野島大介 他9名  
権利者: 旭硝子株式会社、  
国立大学法人 名古屋大学  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2016/078095  
出願年月日: 平成28年9月23日  
国内外の別: 国外
- ② 名称: 細胞外小胞の回収方法  
発明者: 馬場嘉信、小野島大介 他5名  
権利者: 旭硝子株式会社、  
国立大学法人 名古屋大学  
種類: 特許  
番号: 特願2016-46011  
取得年月日: 平成28年3月9日  
国内外の別: 国内
- ③ 名称: 細胞捕捉チップ及び細胞捕捉方法  
発明者: 龍腰健太郎、小野島大介  
他7名  
権利者: 旭硝子株式会社、  
国立大学法人 名古屋大学  
種類: 特許  
番号: 特願2015-45829  
取得年月日: 平成27年3月9日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.apchem.nagoya-u.ac.jp/III-2/baba-ken/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野島 大介 (ONOSHIMA, Daisuke)  
名古屋大学・未来社会創造機構・特任講師  
研究者番号: 40510219

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし