

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02094

研究課題名(和文) 癌早期診断のための血中microRNA分析用化学IC

研究課題名(英文) Exosomal miRNA analysis inside Biochemical IC chips for early detection of cancer

研究代表者

生田 幸士 (Ikuta, Koji)

東京大学・大学院情報理工学系研究科・教授

研究者番号：90212745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,700,000円

研究成果の概要(和文)：microRNA (miRNA) が、早期がん発見に使用できる可能性が指摘されている。しかし従来の解析装置は巨大で、設置場所が大病院等に制限される。そこで本研究では、代表の生田が体系的に開発してきた「化学ICチップ」を活用し、各家庭レベルで使える、がん早期診断システムの開発を目的とした。開発デバイスは手のひら程度の大きさでありながら、診断に必要な全反応を可能とする。また低コストでの作成、使い捨てが可能であり、実用性に優れている。更に従来装置の約1/100のサンプルで解析可能である。本デバイスでの解析実験では、正確な定量が可能であり、検出感度は早期段階のがんを検出するのに十分である事が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、日本人の死因の一位であるがんの早期診断が、各家庭レベルで可能となれば、日本人の健康寿命の向上に大きく貢献する。早期発見だけでなく、再発防止にも有用である。また、血中からのRNA精製からqRT-PCRによるRNA定量を行うプロセスは、がんのみならず、他の慢性疾患や感染症の早期発見にも応用できる。さらに、将来的には、定期的に自分のRNA発現解析データをクラウド上に保存し、発現の時系列変動をモニタするシステムまで構築することを視野に入れている。これにより、疾患の早期発見のみならず、適切な食事や運動の提案をするなど、疾患予防システムへ展開する。

研究成果の概要(英文)：Exosomal microRNA (miRNA) expression analysis is an important screening tool for the early detection of cancer. In this study, we developed two portable microdevices for multiple RNA expression analysis by miRNA purification and qRT-PCR for point-of-care testing. These microdevices are composed of several types of modules termed 'chemical IC chips'. The developed microdevice was the palm size, and improved the portability of all systems. For the practical use, the microdevice also improved the disposability. The microdevice could perform reactions for samples of small volume. We purified miRNA from the liver cancer cell line and confirmed the expression level of miRNA, which is a potential biomarker for liver cancer, by the microdevices. We observed an accurate reaction in the microdevice. We also demonstrated that our microdevice can detect miRNA cancer biomarkers at the early stage.

研究分野：医用マイクロマシン

キーワード：マイクロマシン POC ナノバイオシステム

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、血液中のエクソソームに含まれる miRNA が、早期がん発見用マーカーとして使用できることが明らかになってきた。エクソソームとは、細胞から放出される脂質二重膜で形成される直径 40 nm~100 nm 程度の小胞で、血流に乗って生体内を移動する。多くのがん患者において、血中エクソソーム量の増加が見られることが注目されている [1]。エクソソーム内 miRNA のうちの数種は、がんの早期段階から発現異常が生じる。さらに発現異常が生じる miRNA は、原発組織特異的であり、miRNA 解析によりがんが存在する組織の特定まで可能である。しかし、従来の RNA 抽出、解析装置は巨大で、設置場所が大病院等に制限されている。患者が病院等へ検査を受けに行くのは発症後であることが多く、寛解に繋がりにくい。

2. 研究の目的

上記の研究背景から、本研究は各家庭レベルで使える、がん早期診断・発見システムの開発を目的とした。がん早期発見のためには、(1) 血中、及び細胞内エクソソーム miRNA の精製、(2) qRT-PCR による miRNA の定量の 2 過程を達成する必要がある。更に、各家庭レベルで使えるようにするためには、上記 2 点を可能とするシステムが、(3) 簡単かつ低コストでの開発、反応が可能である必要がある。この(1)-(3)を達成するデバイスシステムの開発を行った。

3. 研究の方法

化学 IC チップ

目的達成のため、本研究は、生田が世界に先駆けて提唱し、各種実証チップを開発してきた「化学 IC チップ」のコンセプトを基に開発を行った [2]。これは反応を行うリアクタチップ、送液を行うポンプチップ、加熱を行うヒータチップ等、各々の反応に必要な機能を持つチップを 3 次的に積み重ねる事により、1 つの反応系を構築する手法である。この構造により、化学 IC チップは多様な反応系を構築できる。また、平面基板上に反応に必要な機能を付加する従来のマイクロデバイス作製手法と異なり、立体的にマイクロデバイスを構築することで、反応制御に必要な面積を最小限に抑える事ができる利点も有する。そのため、観察系、制御系など、反応に必要な全てのシステム系をポータブル化できるという特長がある。

4. 研究成果

(1) qRT-PCR 用デバイス

miRNA の定量発現解析を行うための、qRT-PCR 用マイクロデバイスを図 1 に示す。本マイクロデバイス、及び次節の miRNA 精製チップは化学 IC チップ構造に基づき、複数の機能的なチップから構築されている。本デバイスは 4 つのチップより構成されており、上部より、サンプルを添加し、実際に反応を行うリアクタチップ、リアクタチップ・ヒータ間の熱伝導率を向上させる金属スペーサ、サンプルの加熱制御を行うヒータチップ、及びサンプルへの励起光照射、観察を行う蛍光観察チップから成る。リアクタチップには、4 個のサンプルアプライ用のウェルがあり、1 実験での複数同時解析が可能である。構築後のマイクロデバイスは、5.5 cm × 2.5 cm × 2.5 cm の小型サイズであり、ポータブル性に優れる。

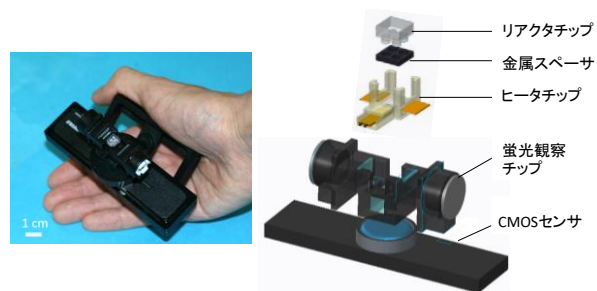


図 1 qRT-PCR マイクロデバイス

(2) miRNA 精製用マイクロデバイス

血液、あるいは細胞よりエクソソーム miRNA を精製するためのマイクロデバイスを図 2 に示す。デバイスの大きさは 1.4 cm × 1.2 cm × 0.7 cm の指先サイズである。本デバイ

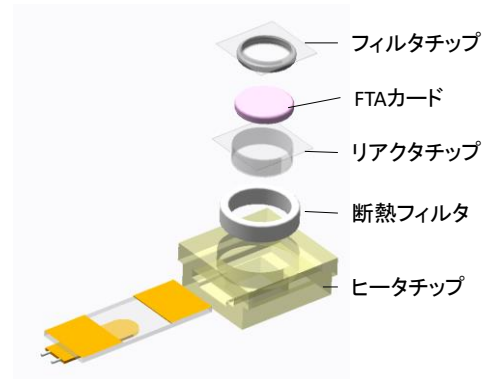
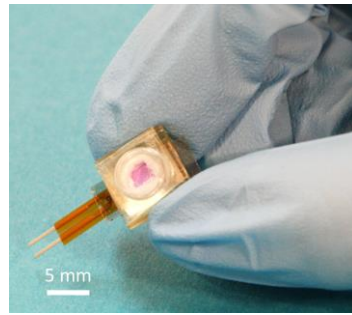


図 2 miRNA 精製用マイクロデバイス

スは FTA カードシステムを用いた精製を行っている。本手法は、添加されたサンプルに含まれるタンパク質成分を、FTA カード表面の薬剤により失活させ、核酸成分をその線維構造内に絡めとる。核酸を絡めとった FTA カードに MilliQ 水を添加し、加熱を行う事で線維構造が緩み、核酸が MilliQ 水内に放出される事で、精製が完了する。本デバイスは 3 つのチップより構成されており、上部より余剰サンプルの吸引を行うフィルタチップ、FTA カードを搭載し、実際にサンプルを添加、精製を行うリアクタチップ、加熱制御を行うヒータチップから成る。ヒータチップとリアクタチップの間には断熱フィルタを搭載し、放熱を防止している。

(3) ポリプロピレンフィルムリアクタ (PP フィルムリアクタ)

(1)、(2)のマイクロデバイスに搭載する、簡単かつ低コストで開発可能なリアクタチップとして、PP フィルムリアクタの開発を行った (図 3 (a))。本リアクタは、厚さ 100 μm の極めて薄い PP フィルムを、鋳型に沿って熱変形させる、ホットエンボス加工で作製した (図 3 (b))。2 種類の鋳型は、マイクロ光造形法により作製した。PP は従来の PCR チューブに用いられている素材であり、反応阻害が生じない。更に本チップの透過率は 80%を越え、蛍光観察時の検出感度の向上に貢献している。図 3 (b) に見られるように、PP フィルムリアクタは極めて簡単な手順での作製が可能である。以上より、使い捨てが可能で、実用的なリアクタチップの開発に成功した。

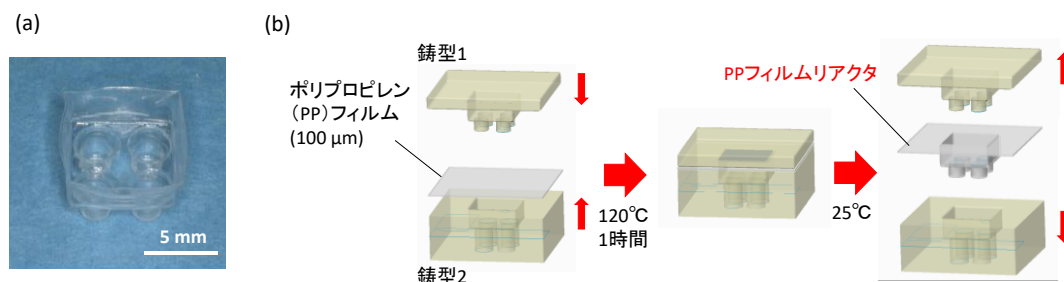


図 3 PP フィルムリアクタ

(a) 作製した PP フィルムリアクタ、(b) PP フィルムリアクタの作製手法

(4) 肝がんマーカー miRNA の検出

上記(1)-(3)で開発したマイクロデバイスを用い、肝がん細胞株 HepG2 より、miRNA の精製及び定量実験を行った。本実験では、miR-224 の定量実験を行った。miR-224 は肝がんマーカー

になりうる可能性を持つ miRNA である [3]。その結果を図 4 に示す。図 4 は、精製用マイクロデバイスを用いて肝臓がん細胞株 HepG2 より miRNA を精製し、精製後のサンプル内に含まれる miR-224 について、qRT-PCR マイクロデバイスを用いて定量解析を行った結果である。NC は MilliQ 水をサンプルとして添加した際の結果を示す。精製後サンプルの RNA 濃度を計測し、各々の濃度に希釈したサンプルを qRT-PCR マイクロデバイス上の各反応用ウェルに添加し、反応を行った。図 4(a)は、各サンプルの qRT-PCR 時の蛍光強度の増加の様子を示す。横軸は実施した温度サイクル数、縦軸は各温度サイクル終了時の各サンプルの蛍光強度を示す。図 4(a)より、サンプル内 RNA 濃度毎に蛍光強度が増加していく様子が観察された。図 4(b)に、34 サイクルにおける、リアクタの様子を示す。図 4(b)より、異なるサンプル RNA 濃度間での蛍光強度の違いを、目視でも観察できた。また、本実験ではサンプルの RNA 濃度が 50 pg/μl まで検出可能であった。これは早期がん段階における患者の血中エクソソーム内 miRNA 濃度を下回る事から、早期段階患者からの、miRNA 検出が可能である事が示された[4]。以上より、早期がん発見のための、サンプルの精製～miRNA 定量までを可能とする、極めて実用的なマイクロデバイス群の開発に成功した。

<引用文献>

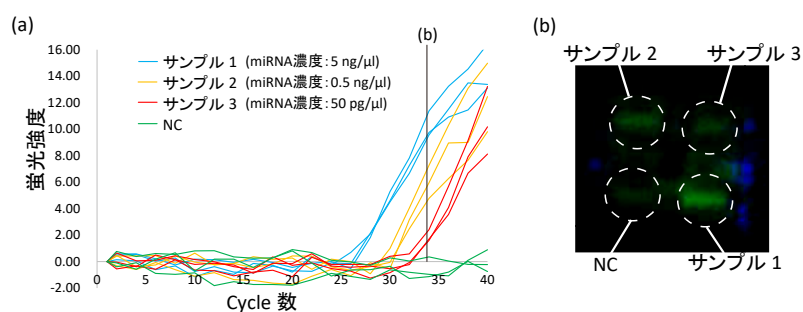


図 4 miRNA 発現解析試験

(a) 開発マイクロデバイスでの qRT-PCR の実施結果、(b) 34 サイクル時におけるリアクタの様子

- [1] Douglas D, Gerçel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 2008. Vol.110 13–21
- [2] Ikuta K, Hirowatari K. Real three-dimensional micro fabrication using stereo lithography and metal molding. *Proceedings of the IEEE International Workshop on Micro Electro Mechanical System (MEMS93)* 1993. 42–47
- [3] Wang Y, Toh HC, Chow P, Chung AY, Meyers DJ, Cole PA, Ooi LL, Lee CG. MicroRNA-224 is up-regulated in hepatocellular carcinoma through epigenetic mechanisms. *The FASEB Journal*. 2012. Vol.26. 3032-3041
- [4] Rabinowits G, Gerçel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin. Lung Cancer*. 2009. Vol.10. 42–46

5. 主な発表論文等

- [1] Miyamoto Y, Ikeuchi M, Noguchi H, Yagi T, Hayashi S, "Enhanced Adipogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells in an In Vitro Microenvironment: The Preparation of Adipose-Like Microtissues Using a Three-Dimensional Culture", *Cell Medicine* 9(1-2) 2016 pp35-44
- [2] M. Yasui, K. Ikuta, "Modeling and measurement of curing properties of photocurable polymer containing magnetic particles and microcapsules", *Microsystems &*

Nanoengineering 3 2017 17035

- [3] Keiichi Yoshida, Woojin Kang, Akihiro Nakamura, Natsuko Kawano, Maito Hanai, Mami Miyado, Yoshitaka Miyamoto, Maki Iwai, Toshio Hamatani, Hidekazu Saito, Kenji Miyado, Akihiro Umezawa, "①Ubiquitin-activating enzyme E1 inhibitor PYR-41 retards sperm enlargement after fusion to the egg", Reproductive Toxicology, 76 2018 pp71-77
- [4] Y. Kimura, M. Ikeuchi, Y. Inoue, K. Ikuta, "3D microdevices that perform sample purification and multiplex qRT-PCR for early cancer detection with confirmation of specific RNAs", Scientific Reports, 8 2018 17480
- [5] Maki Iwai, Toshio Hamatani, Akihiro Nakamura, Natsuko Kawano, Seiya Kanai, Woojin Kang, Noriko Yoshii, Yasushi Odawara, Mitsutoshi Yamada, Yoshitaka Miyamoto, Takakazu Saito, Hidekazu Saito, Mami Miyado, Akihiro Umezawa, Kenji Miyado & Mamoru Tanaka, "Membrane protein CD9 is repositioned and released to enhance uterine function" Laboratory Investigation, 99(2) 2019, pp200-209

[雑誌論文] (計 5 件)

- [1] Yusuke Kimura, Keigo Osada, Yoshinori Inoue, Masashi Ikeuchi, and Koji Ikuta, "The development of real-time PCR micro device with optical sensor for early detection of cancer", The 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC' 16) (国際学会) 2016
- [2] Hiroshi Sato, Yoshinori Inoue, Masashi Ikeuchi and Koji Ikuta, "World's first bio-degradable actuator for removal-free implantable MEMS", 2017 IEEE 30th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS) (国際学会)
- [3] Y Kimura, M Ikeuchi, K Ikuta, "Finger-tip Size Quantitative Real-time PCR Device for Early Detection of Cancer, 2nd Report: Detection of Cancer Specific MicroRNA", 29th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2016) (国際学会)
- [4] 木村雄亮, 池内真志, 生田幸士, "がん早期発見を可能とする、RNA 発現解析用マイクロデバイスの開発" 第 55 回日本生体医工学会大会, 2016
- [5] 木村雄亮, 池内真志, 生田幸士, "qRT-PCR 用化学 IC チップによる疾患早期発見デバイスの構築 (第 2 報) ナノリットルサンプルによる複数同時検出の実証", 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2016. 2016
- [6] 木村雄亮, 池内真志, 生田幸士, "MicroRNA Analysis 3D Chemical IC Chips for Early Detection of Cancer" The 13th IEEE TOWERS, 2016
- [7] 宮本義孝, 池内真志, 野口洋文, 八木透, 生田幸士, 林衆治, "三次元培養によるヒト脂肪由来幹細胞からマイクロティッシュの作製", 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017
- [8] 宮本義孝, 池内真志, 野口洋文, 鈴木聡, 八木透, 生田幸士, 林衆治, "培養デバイス TASCL を用いたヒト脂肪様細胞組織体の創製" シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来, 2017
- [9] 宮本義孝, 池内真志, 野口洋文, 八木透, 生田幸士, 林衆治, "ヒト脂肪由来幹細胞からマイクロティッシュの大量作製" 第 52 回日本移植学会総会, 2016
- [10] 宮本義孝, 池内真志, 野口洋文, 八木透, 生田幸士, 林衆治, "3 次元培養によるヒト脂肪由来幹細胞の脂肪への分化とマイクロティッシュの作製", 第 68 回日本生物工学会大会 2016
- [11] T. Kawaguchi, Y. Inoue, M. Ikeuchi, Koji Ikuta, "Independent actuation and master-slave control of multiple micro magnetic actuators", IEEE Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2018) (国際学会)
- [12] 佐藤 宏, 井上佳則, 生田幸士, "v 新原理生体埋め込みマイクロアクチュエータ" 第 26 回日本コンピュータ外科学会大会 2017
- [13] 宮本義孝, 池内真志, "三次元培養による神経細胞スフェロイドの創製", 第 17 回日本再生医療学会総会 2018
- [14] 井上佳則, 生田幸士, "水圧能動カテーテルの先端角度計測手法開発" 第 26 回日本コンピュータ外科学会大会 2017
- [15] 木村雄亮, 池内真志, 生田幸士, "MicroRNA 発現解析用マイクロデバイスの開発" 第 56 回日本生体医工学会大会 2017
- [16] Koji Ikuta, "Innovative Soft Robotic Micro Devices for Future Medicine", Hamlyn Symposium, Workshop on Soft Robotics Across Scale (招待講演) (国際学会) 2017
- [17] Koji Ikuta, "3D Micro/nano Fabrication and Theoretical Analysis for Advancing Micro Robotics" Hamlyn Symposium, Workshop on Micro Robotics and Micro Fabrication (招待講演) (国際学会), 2017
- [18] Koji Ikuta, "Micro/nano Robotics for Future Medicine", 2nd NRW-Fukushima Joint Symposium on Advanced Medicine (招待講演) (国際学会), 2017
- [19] M. Ikeuchi, M. Shibata, K. Ikuta, "Independently controllable microwell array with fluidic multiplexer for mass production of embryonic bodies", 19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS2017) (国

際学会) , 2017

- [20] Yusuke Kimura, Masashi Ikeuchi, Yoshinori Inoue Koji Ikuta, "Point of Care Testing Chip for Multiple Virus Infection Detection Using LAMP", IEEE MEMS2019 (国際学会) , 2019
 - [21] 木村雄亮、池内真志、井上佳則、生田幸士, "LAMP 法による早期感染症発見用マイクロデバイスの開発", 第 27 回日本コンピュータ外科学会大会, 2018
 - [22] 木村雄亮、池内真志、井上佳則、生田幸士, "LAMP 法によるウイルス遺伝子検出用化学 IC チップの開発", 第 36 回日本ロボット学会学術講演会, 2018
 - [23] 木村雄亮、池内真志、井上佳則、生田幸士, "早期ウイルス感染症検知マイクロデバイスの開発", 第 57 回日本生体医工学会大会, 2018
 - [24] 井上佳則 生田幸士, "水圧能動カテーテルの先端接触推定", 第 27 回日本コンピュータ外科学会大会, 2018
 - [25] Koji Ikuta, "Optically Driven Nano-Robots and Chemical IC Chip for Micro-RNA Detection and Tissue Engineering Based on 3D Micro/Nano Fabrication" MNC2018 (招待講演) (国際学会) , 2018
 - [26] Koji Ikuta, "Network Connected Micro Bio-robotics for Super Early Detection of Cancer" The first International Symposium on Bio- and Socio-inspired Networked Robotics (招待講演) (国際学会) , 2018
 - [27] Koji Ikuta, "Optically-driven Nano Robotics and Chemical IC Chips by 3D Micro/Nano Fabrication", Workshop on Medical Robotics, Shanghai, China, (招待講演) (国際学会) , 2018
 - [28] 生田幸士, "医療費削減と健康寿命延長に貢献する新概念マイクロナノマシン・ロボティクス", 第 2 回 KEC テクノフォーラム (招待講演) , 2018
 - [29] 宮本義孝、池内真志, "ヒト組織由来細胞・組織構築物の大量生産から凍結保存に向けて", 第 45 回日本臓器保存生物医学会学術集会, 2018
 - [30] 宮本義孝、池内真志, "神経細胞・組織構築物の大きさの均一化と大量生産", 第 54 回日本移植学会総会, 2018
 - [31] 宮本義孝、池内真志, "培養デバイス TASCL による神経細胞スフェロイドの構築", 第 70 回日本生物工学会大会, 2018
- [学会発表] (計 31 件)

生田幸士, "リキッドバイオプシー (落谷孝広) 内の"早期癌発見をめざすマイクロ RNA 分析用ポータブルデバイスの開発" (シーエムシー出版)2017, 288 のうち 9 ページ
[図書] (計 1 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.micro.rcast.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 宮本 義孝

ローマ字氏名 : Yoshitaka Miyamoto

所属研究機関名 : 国立研究開発法人国立成育医療研究センター

部局名 : 細胞医療研究部

職名 : 上級研究員

研究者番号 (8 桁) : 20425705

※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。