

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 10 月 15 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06043

研究課題名(和文) DNA演算技術による癌腫瘍マーカーmiRNAの自律的検出と治療

研究課題名(英文) Autonomous theranostics of miRNA from tumor using DNA computing

研究代表者

川野 竜司 (Kawano, Ryuji)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90401702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では癌腫瘍由来miRNAをDNA演算技術により認識、ナノポア計測によりその結果を自律検出することを目的とする。本研究は当初4年計画であったが、想定よりも研究が進展し4年目からは基盤研究に移行した。3年間の研究で得られた主な成果について記す。マイクロデバイス中に形成した微小液滴を利用したナノポア計測により、DNA演算で得られた超低濃度出力分子を迅速にデコードすることに成功した。小細胞肺癌由来の2種のmiRNAをANDゲートと見立て迅速検出した。胆管癌由来5種のmiRNAを癌患者の体液サンプルから迅速検出に成功した。これらの成果をAnal.Chem.誌を含む複数の雑誌に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では二つの学術的意義と一つの社会的意義があると考えている。学術的意義の一つ目は、これまで主に情報学や数学的観点から研究が進められてきたDNA演算技術を腫瘍細胞由来のmiRNA検出に応用した点である。miRNAは複数種類のRNAが発現上昇低下するといった複雑なパターンで変動する。この変動をDNA演算技術により迅速検出を可能とした。二つ目の学術的意義は、このDNA演算で出力される核酸分子を非標識かつ電気的に検出可能としたことである。最後に社会的意義としては、実際の癌患者の血液から癌腫瘍由来miRNAの検出に成功した点である。これによりコンセプトの実証に留まらず、社会実装を目指す。

研究成果の概要(英文)：In this project, miRNAs from tumor cells are recognized by DNA computation technology and the nanopores. The purpose of this study is to detect the results of recognition by the nanopore measurement combined with DNA computation. This study was originally planned as a four-year project, but it was shifted to the basic research in the fourth year because the research progressed more than as we planned initially. The following is a summary of the main results obtained during the three years of research. The nanopore measurement using microdroplets is developed in a microdevice, and we succeeded in label-free and rapid decoding of the output molecule. We detected two different miRNAs with enhanced expression from small cell lung cancer as AND gates for rapid detection. After that, we also detected five different miRNAs from cholangiocarcinoma in body fluid from cancer patients. These results were published in several publications including Analytical Chemistry in the ACS.

研究分野：分析化学

キーワード：ナノポア DNAコンピューティング microRNA リキッドバイオプシー マイクロデバイス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

癌の早期診断は医療分野において非常にニーズの高い技術である。特に癌の種類により早期診断が困難な癌が問題になっている。例えば任天堂の岩田社長が早逝したことで話題になった胆管癌など診断の困難さゆえ発見が遅れるケースがある。最近血中や尿など体液に存在する microRNA (miRNA) を調べることで、どこの部分に癌腫瘍が存在するのかを早期診断に応用する研究が加速度的に進んできている。しかしながら、miRNA は腫瘍から分泌されるだけではなく様々な種類のものが体内に数多く存在する。その中でマーカーとなる特定の miRNA のみを簡便に診断する方法が重要である。また癌由来 miRNA は単体で分泌されるわけではなく、複雑な発現パターンを示す。

そこで本研究では、DNA コンピューティングの技術を用いて miRNA のパターン診断を目指す。DNA コンピューティングは DNA 分子を用いた並列計算に関して主に研究されてきたが、最近その技術を活かし *in vivo* での活用、例えば遺伝子治療など、に応用できるのではないかと期待されている。Shapiro らは肺癌による mRNA 転写量の変化を自律的に検知し診断する DNA コンピュータを報告した (E. Shapiro, *Science* 2008)。この方法では多種の DNA、RNA の中に診断に必要な特定の核酸分子が存在する場合、存在しない場合の二状態に二進数の演算を適用し、特定分子を認識した結果を出力として次の反応に用いることができる。例えば最近では、特定の組み合わせの mRNA が分泌された時のみ蛍光を出力するシステムや、治療効果のある薬剤そのものを出力するシステムについても報告され始めている。

これまで DNA コンピューティングの出力を確認する場合、PCR で増幅しゲル電気泳動後、蛍光発光により確認するのが一般的であった。これには多段階のステップを要し、結果を得るまでに長い時間が必要となる。本研究ではナノポアと呼ばれるチャネル膜タンパク質を用いて、出力される DNA のリアルタイム検出を試みる。これまで申請者は、マイクロデバイス中に形成した脂質二分子膜中に約 1.4 nm のナノポアを有す  $\alpha$ -hemolysin ( $\alpha$ HL) を再構成し、その電気シグナルの計測を行ってきた。例えば、ナノポアシーケンスに応用するため、DNA 一分子のチャネル通過挙動を拡散係数や拡散の活性化エネルギーの算出から明らかにした (*JACS* 2010)。また DNA アプタマーがターゲット分子と三次元複合体を形成することから、コカインアプタマーを用い、その迅速検出を行った。コカインアプタマー形成前はチャネル通過、形成後はチャネルをブロックすることから、この変化をチャネルシグナルとしてコカイン一分子を計測することに初めて成功した (*JACS* 2011)。また最近では並列二分子膜計測システムの開発 (*Sci. Rep.* 2013)、DNA による 2 進数の論理ゲートを設計・構築し、ナノポアによりその出力を得ることに成功している。本提案では、これらの知見を基盤とし、小細胞肺癌から分泌され次世代の早期診断マーカーとして期待される miRNA の特異的検出を行う。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、MEMS 技術を用いマイクロデバイス中に構築したドロップレット内で miRNA の診断と検出をオンチップで行う。ドロップレット中でプログラムされた DNA 分子が標的となる miRNA を診断し、その結果出力される DNA 分子をナノポアで検出する。これまで小細胞肺癌から分泌される miRNA (miR-20a) を選択的に認識し、任意の配列の DNA を出力しナノポアで検出するシステムの開発に成功している。このシステムを基盤とし、1) 低濃度 (<pM) 領域の miRNA を認識し、自律的に出力分子を

増幅することによる高感度検出、2) 癌のマーカーmiRNA を検出診断と治療薬放出システムの開発、2) 多種の miRNA 群の高選択的検出、に関し詳細な検討を行い、DNA 演算技術とナノポアデコーディングを組み合わせたリキッドバイオプシーへの展開を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究の目的である、腫瘍マーカーmiRNA の自律的診断・治療システムの構築、を行うため、以下の3つの課題について検討を行う。

1. DNA コンピューティング技術による低濃度 miRNA 検出
2. 癌のマーカーmiRNA を検出診断と治療薬放出システムの開発
3. 多種の miRNA 群の miRNA の高選択的検出

### 4. 研究成果

#### 1. DNA コンピューティング技術による低濃度 miRNA 検出<sup>(1,2)</sup>

本課題では、酵素反応を使って出力分子の増幅を行う DNA コンピューティング技術に着目し、小細胞肺癌の次世代早期診断マーカーである少量のマイクロ RNA (miR-20a) を、分子反応により等温条件 (37°C) で増幅し、ナノポアを用いることで迅速に検出することに成功した。具体的には、マイクロ加工技術で作製したデバイス中の微小液滴中 (約 5 $\mu$ L) で超低濃度 1 fM (7.5 x 10<sup>-15</sup> g/mL) の miRNA を等温状態で化学的に安定な DNA 分子に変換・増幅し、その DNA がナノポアを通過する電気信号を検出することで高速・簡易診断を実現した。

#### 2. 癌のマーカーmiRNA を検出診断と治療薬放出システムの開発<sup>(3-5)</sup>

本課題では、酵素反応を使って出力分子の増幅を行う DNA コンピューティング技術に着目し、小細胞肺癌の次世代早期診断マーカーである少量の miRNA (miR-20a) から、小細胞肺癌の治療薬となるアンチセンス DNA を自律的に合成・増幅するシステムの構築を行った。さらにナノポアを用いることで、合成されたアンチセンス DNA の迅速・ラベルフリー検出と定量を行った。ナノポアを用いた計測では、ナノポア内を流れるイオン電流値の変化を観測した。例えば、溶液中に出力分子であるアンチセンス DNA が存在した場合は、DNA のナノポア内の通過に伴ってイオン電流値が一時的に減少する。miR-20a の存在下で 30 分間の酵素反応を行った後に実際にナノポア計測を行うと、ナノポア内を流れるイオン電流の阻害が確認できた。これはアンチセンス DNA が合成され、ナノポアを通過したことを示していると考えた。また、ナノポア計測で得られたデータからアンチセンス DNA の合成量を定量した結果、小細胞肺癌の治療を行うのに十分な量まで増幅されていることを明らかとした。

次に口腔癌、特に口腔扁平上皮癌 (OSCC) の診断や予後治療に資する技術開発を行った。まず唾液から十分量の miRNA 抽出を行うために出種条件の最適化を行った。次に OSCC ではマーカーとなる miRNA が特定されていないため、既報の論文のメタ解析を行い、3種の miRNA の同定を行った。

#### 3. 多種の miRNA 群の中にある特定の miRNA の高選択的検出<sup>(6,7)</sup>

上記 2) で構築したシステムを基盤に、より多種の miRNA 検出を試みた。具体的には、胆管癌腫瘍細胞から分泌される miRNA のうち、培養細胞において発現上昇が報告されている 5 種の miRNA に対してその発現パターンを識別可能な診断用 DNA を設計

した。In vitro のナノポア計測において、設計した診断用 DNA により 5 種の発現パターンを識別可能であることを確認できた。そこで実際の胆管癌患者の血漿サンプルを用いた同様の計測を行ったところ、健常者のサンプルと有意な差を得ることが出来た。現在この成果に関しての特許出願および論文執筆を行っている。

#### 公表論文

1. H. L. Zhang, M. Hiratani, K. Nagaoka, R. Kawano, MicroRNA detection at femtomolar concentrations with isothermal amplification and a biological nanopore. *Nanoscale* **9**, 16124-16127 (2017).
2. M. Ohara, M. Takinoue, R. Kawano, Nanopore Logic Operation with DNA to RNA Transcription in a Droplet System. *ACS Synth. Biol.* **6**, 1427-1432 (2017).
3. M. Hiratani, R. Kawano, DNA Logic Operation with Nanopore Decoding To Recognize MicroRNA Patterns in Small Cell Lung Cancer. *Anal. Chem.* **90**, 8531-8537 (2018).
4. H. Watanabe *et al.*, Analysis of Pore Formation and Protein Translocation Using Large Biological Nanopores. *Anal. Chem.* **89**, 11269-11277 (2017).
5. M. Hiratani, M. Ohara, R. Kawano, Amplification and Quantification of an Antisense Oligonucleotide from Target microRNA Using Programmable DNA and a Biological Nanopore. *Anal. Chem.* **89**, 2312-2317 (2017).
6. R. Kawano, Synthetic Ion Channels and DNA Logic Gates as Components of Molecular Robots. *ChemPhysChem* **19**, 359-366 (2018).
7. R. Kawano, Nanopore Decoding of Oligonucleotides in DNA Computing. *Biotechnol. J.* **13**, 1800091 (2018).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiratani Moe, Ohara Masayuki, Kawano Ryuji	4. 巻 89
2. 論文標題 Amplification and Quantification of an Antisense Oligonucleotide from Target microRNA Using Programmable DNA and a Biological Nanopore	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 2312 ~ 2317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.6b03830	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 Watanabe Hirokazu, Gubbiotti Alberto, Chinappi Mauro, Takai Natsumi, Tanaka Koji, Tsumoto Kouhei, Kawano Ryuji	4. 巻 89
2. 論文標題 Analysis of Pore Formation and Protein Translocation Using Large Biological Nanopores	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 11269 ~ 11277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.7b01550	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 該当する
1. 著者名 Ohara Masayuki, Takinoue Masahiro, Kawano Ryuji	4. 巻 6
2. 論文標題 Nanopore Logic Operation with DNA to RNA Transcription in a Droplet System	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 1427 ~ 1432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.7b00101	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 保皓大、平谷萌恵、川野竜司	4. 巻 17
2. 論文標題 ナノポアを用いたマイクロRNAの迅速診断技術と応用展開	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PHARMSTAGE	6. 最初と最後の頁 62-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 M. Hiratani, M. Ohara and R. Kawano	4. 巻 89
2. 論文標題 Amplification and quantification of an antisense oligonucleotide from target microRNA using programmable DNA and a biological nanopore	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 2312-2317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.6b03830	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 M. Ohara, M. Takinoue, R. Kawano	4. 巻 -
2. 論文標題 Nanopore Logic Operation with DNA to RNA Transcription in a Droplet System	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.7b00101	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 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 M. Hiratani and R. Kawano
2. 発表標題 MicroRNA Pattern Recognition for Bile Duct Cancer Using Programmable DNA and Biological Nanopore
3. 学会等名 MicroTAS2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 M. Hiratani and R. Kawano
2. 発表標題 MicroRNA pattern recognition for cholangiocarcinoma using barcode-like DNA and biological nanopore
3. 学会等名 2nd Japan-Korea International Symposium on Cyborgnics: Integration between cell and electronics (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川野竜司
2. 発表標題 人工細胞膜システムを用いたナノ・マイクロ化学分析
3. 学会等名 第66回日本分析化学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川野竜司
2. 発表標題 人工細胞膜システムの医療診断技術への展開
3. 学会等名 2017年電気化学秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 M. Ohara and R. Kawano
2. 発表標題 A Single Molecular Logic Gate: "AND" Operation Using DNA Immobilized in Biological Nanopore
3. 学会等名 MicroTAS2016（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 M. Hiratani, M. Ohara and R. Kawano
2. 発表標題 Recognition of microRNA Expression Pattern in Serum Using Programmable Droplet System for Cancer Diagnosis
3. 学会等名 MicroTAS2016（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 R. Kawano
2. 発表標題 Nanopore sensing with a stable lipid bilayer in microfabricated devices
3. 学会等名 PRiME2016 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 落谷孝広 (分担執筆: 保皓大、平谷萌恵、川野竜司)	4. 発行年 2017年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 288
3. 書名 リキッドバイオブシー 体液中腫瘍マーカーの検出・解析技術	

1. 著者名 保皓大、平谷萌恵、川野竜司	4. 発行年 2017年
2. 出版社 情報技術協会	5. 総ページ数 -
3. 書名 PharmStage	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京農工大学 川野研究室  <a href="http://web.tuat.ac.jp/~rjkawano/">http://web.tuat.ac.jp/~rjkawano/</a></p>
--

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
---------	---------