

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18112

研究課題名(和文) 定温増幅法および化学発光法を用いたPOCT技術によるmiRNA分析への挑戦

研究課題名(英文) Integration of an analytical system for point-of-care test of miRNA by combination of NASBA and chemiluminescence

研究代表者

唐沢 浩二 (Karasawa, Koji)

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号：90595951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、より簡便なNASBA(Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)法とルミノール化学発光法を組み合わせたmiRNA簡易分析法の開発を検討した。本研究により、膵臓がんで増加するmiR-196aをNASBA法により増幅することが可能になった。その後、イソルミノール化学発光法によりmiR-196aのNASBA増幅由来のピロリン酸を測定したところ、Positive(+miR-196a)とNegative(-)の判別が可能となった。本法は、将来の薬局や検体検査室での簡易遺伝子検査(POCT)技術としての応用に期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、簡便なmiRNAのPoint of care testing (POCT)システムを開発した。本法は、定温増幅法であるNASBA法によりターゲットmiRNAを増幅し、同時に生成するピロリン酸をイソルミノール化学発光法により検出する新たな方法である。使用する機器は、手のひらサイズにすることが可能であり、癌や感染症などの簡易検査法として利用することが出来る。さらに単一のmiRNAのみではなく様々なmiRNAに応用可能である。この分析技術を用いて、将来の薬局における薬剤師による受診勧奨の補助、病院や検査所の簡易検査室における定期健診や診断の補助にも利用されることが望まれる。

研究成果の概要(英文)：A compact, simple, quick, and high sensitive method is presently required in order to perform simple genetic analysis in a clinic or bedside (Point-of-care test; POCT). Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA) is a specifically amplify method of a single-stranded RNA fragment. The detection by chemiluminescence reaction (CL) is not required a light source. We developed a novel analytical system of miRNA for POCT by combination with NASBA and CL. In order to detect the NASBA product with high sensitivity, we developed a high sensitive determination method for PPI which amount is correlated with the amount of the NASBA product. We succeeded in the determination of PPI by the optimization of various conditions. Consequently, miR-196a was detected by combining NASBA and CL, and discriminated between negative and positive template. This combined miRNA detection method could be useful for compact POCT system in the future clinical field.

研究分野：臨床分析化学

キーワード：miRNA NASBA ピロリン酸 PPK イソルミノール化学発光 POCT

1. 研究開始当初の背景

将来の薬局や簡易検査室で簡単に利用できる miRNA のコンパクトな Point of care testing (POCT) システムの開発を目的とする。つまり、定温増幅法である NASBA 法によりターゲット miRNA を増幅し、同時に生成するピロリン酸をイソルミノール化学発光法により検出する新たな方法の開発を検討する。本法に使用する機器は、thermal cycler や光源を必要としないため、手のひらサイズにすることが可能であり、癌や感染症、冠動脈疾患などの簡易検査法として利用することが出来る。さらに本法は単一の miRNA のみではなく、primer を変えることで全 miRNA に応用可能である。この分析技術を用いて、将来の薬局における薬剤師による受診勧奨の補助、病院や検査所の簡易検査室における定期健診や診断の補助にも利用されることが望まれる。

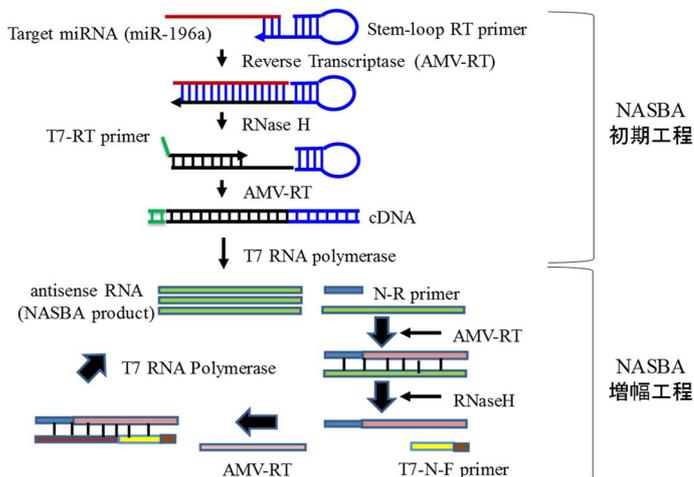
2. 研究の目的

microRNA(miRNA)は、疾患の進展や悪性度と密接に関連することから、診断や治療のためのバイオマーカーとして注目されている。miRNA の分析にはマイクロアレイや RT-PCR が主に用いられている。本研究では、より簡便な NASBA(Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)法とルミノール化学発光法を組み合わせた簡易分析法の開発を検討した。

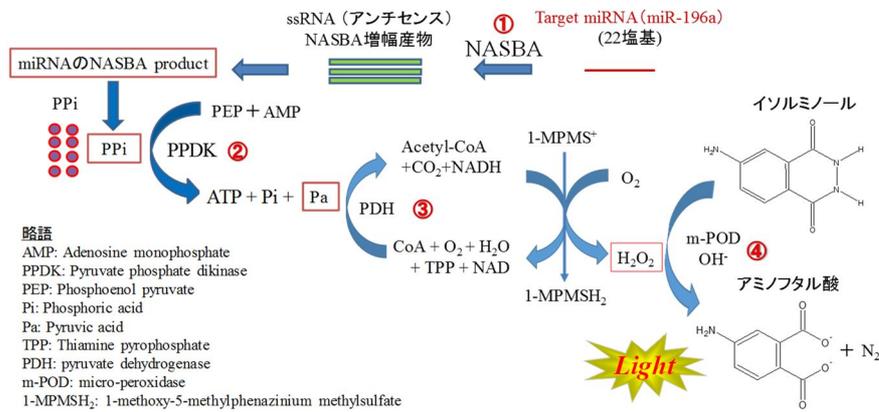
3. 研究の方法

miRNA は、膵臓がんで増加する miR-196a (5'-UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG; 22 塩基) を用いた。試薬は、template、4 種の primer、AMV-reverse transcriptase、RNase H、T7-RNA polymerase 等を混合し、41 °C で 10~90 分反応させた。次に、NASBA 増幅産物由来のピロリン酸 (PPi) に pyruvate phosphate dikinase (PPDK)、pyruvate dehydrogenase (PDH) を順次反応させ、生じる過酸化水素 (H₂O₂) をイソルミノール化学発光法で検出した。

NASBA 法による miRNA 増幅の原理

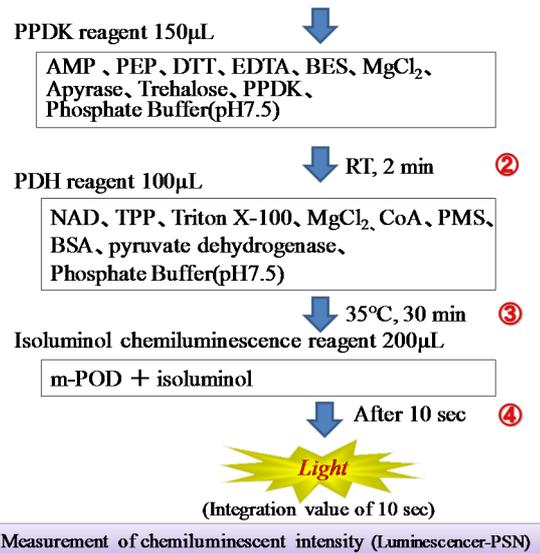
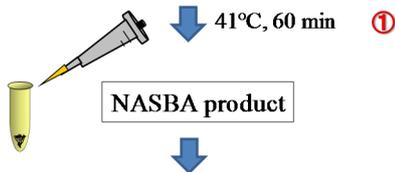


miRNA 簡易分析法の原理



miRNA 簡易分析法の方法

RNase free water	2 μl
NASBA Reaction Mix (NTPs, dNTPs, Tris buffer)	8 μl
500nmol/L T7-RT primer	1 μl
500nmol/L stem loop primer	1 μl
0.1mmol/L NASBA forward primer	1 μl
0.1mmol/L NASBA reverse primer	1 μl
100ng/μL miRNA	1 μl
NASBA Enzyme mixture (AMV-RT, RNase H, T7-RNA polymerase)	5 μl
Total	20 μl



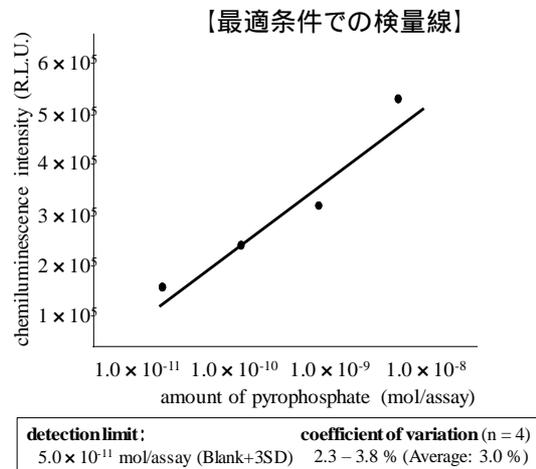
4. 研究成果

本研究により、miRNA は NASBA 法により増幅することが可能になった。60 分の増幅による miRNA の検出限界は、10 pg/assay であった。次に化学発光法により増幅産物を検出するため、各標準品の検量線を作成した。その結果、H₂O₂ およびピルビン酸はともに 1.0 × 10⁻⁸ mol/L ~ 1.0 × 10⁻³ mol/L で良好な検量線が得られた。また、PPi は 1.0 × 10⁻⁷ mol/L ~ 1.0 × 10⁻⁴ mol/L の検量域が得られた。本法を miR-196a の NASBA 増幅産物に応用したところ、Positive (+ miR-196a) と Negative (-) の判別が可能となった。

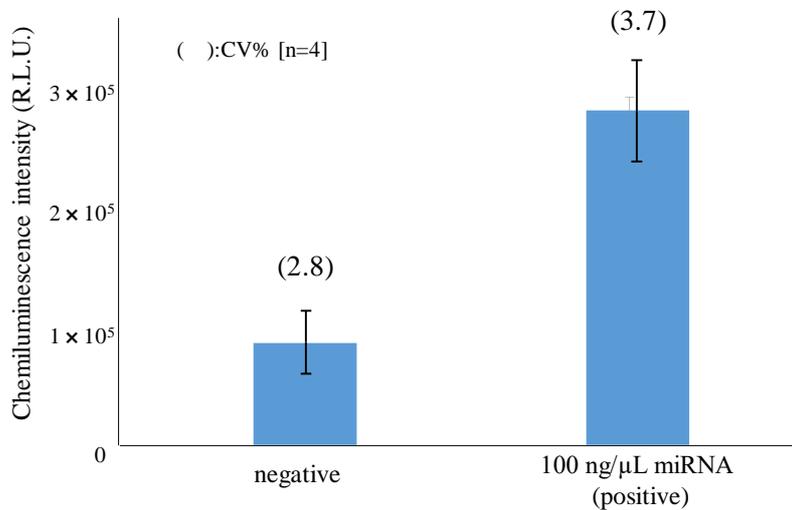
ピロリン酸の検量線

【条件検討】

試薬および反応条件	最適条件
AMP	0.125 mmol/L
PEP	0.4 mmol/L
DTT	0.05 mmol/L
EDTA	10 mmol/L
BES	300 mmol/L
Apyrase	10 U/mL
MgSO ₄	10 mmol/L
Treharose	50%
Pyruvate phosphate dikinase	30 U/mL
反応温度	RT
反応時間	2 min



簡易分析法による miR-196a の分析



【まとめ】

NASBA 法により、10 分で 100 ng/assay、60 分で 10 pg/assay の miRNA を検出することが可能となった。

miR-196a の NASBA 増幅産物に対して PPK、PDH、luminol 化学発光を順次反応させたとこ、Positive (+ miR-196a) と Negative (-) の判別が可能となった。

本法は、将来の薬局や検体検査室での簡易遺伝子検査 (Point of care testing (POCT)) 技術としての応用に期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koji Karasawa, Shuhei Murayama, Masaru Kato and Hidetoshi Arakawa
2. 発表標題 Integration of an analytical system for point-of-care test of miRNA by combination of NASBA and chemiluminescence
3. 学会等名 PITTCON conference & EXPO 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 船山武寛、唐沢浩二、斉田航一、村山周平、荒川秀俊、加藤大
2. 発表標題 NASBA法と化学発光法を組み合わせたmiRNA簡易分析法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 唐沢浩二、荒川秀俊
2. 発表標題 生物発光・化学発光検出を用いる生体成分の高感度分析法の開発とその臨床応用
3. 学会等名 第57回日本臨床化学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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