

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19318

研究課題名（和文）マイクロポアを用いた染色体異常検出デバイスの開発

研究課題名（英文）Development of micropore device to detect chromosome aberrations

研究代表者

高田 英昭（Takata, Hideaki）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：20455207

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マイクロポアデバイスを用いた染色体の構造情報の高速・高感度取得を実現し、染色体異常を検出する新たな手法の開発に取り組んだ。ヒト培養細胞から単離した染色体を用い、染色体がポアを通過した際に観測される電流阻害波形のピーク幅と高さ（波形パターン）で染色体の構造を評価した。その結果、マイクロポアのサイズの減少やポアを通過させる粒子の方向の制御により、染色体の構造情報の効率的な取得が見込まれる結果が得られた。また、細胞老化を誘導することで、異常な構造を示す染色体を獲得することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体異常を伴う疾患には、ダウン症に代表される先天的な染色体異常だけでなく、がんで観察されるクロモソリプシスとして知られる加齢と関連した後天的な染色体異常が存在する。このため、超高齢化社会を迎えるにあたり、染色体異常を伴う疾患の発症メカニズムを解明する基礎研究だけでなく、染色体異常の早期発見を必要とする染色体診断の分野において、染色体検査の高精度化・高速化が必要とされる。本研究により、ポアデバイスを用いた染色体構造評価の可能性を示すことができたことから、従来法に代わってポアデバイスを利用することで染色体異常検出のハイスループット化が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a new method for detecting chromosome aberrations using a micropore device to obtain structural information of chromosomes with high speed and sensitivity. Chromosomes isolated from human cultured cells were used to evaluate chromosome structure by the peak width and height (waveform pattern) of the current blockade waveform observed when the chromosome passes through the pores. The results showed that efficient acquisition of chromosome structural information is expected by reducing the size of micropores and controlling the direction of particles passing through the pores. In addition, by inducing cellular senescence, chromosomes exhibiting abnormal structures were successfully obtained.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：染色体異常 ポアデバイス 細胞老化 染色体診断

1. 研究開始当初の背景

染色体は遺伝情報を記録した DNA を次世代の細胞へと受け渡すために必須の構造であり、染色体構造や染色体数の異常はがんやダウン症等の多くの疾患と関連する。このため、疾患診断においては、血球細胞等をスライドガラス上に展開した染色体標本を顕微鏡下で観察し、染色体形態や染色体数の異常を検出することが行われている。しかしながら、標本作製に時間がかかる、画像解析が煩雑、自動化が困難、観察後の試料の再利用が困難といった多くの問題点が挙げられている。また、基礎研究の分野においても、染色体異常の解析には染色体をスライドガラス上に展開した染色体標本を観察することが頻繁に行われており、より効率的に染色体構造を評価できる手法の開発により研究のスループット向上が期待できる。細胞当りの DNA 含量を調べる汎用的な手法であるフローサイトメトリーを染色体異常の検出に用いることも可能である。しかしながら、この場合、染色体数の倍加のような劇的な染色体数の変化であれば容易に検出できるが、染色体数の変化が少ない場合は検出が困難であり、染色体の転座は検出できない点が問題である。社会的背景としても、出産の高齢化とともに染色体異常を検出する出生前検査の需要が増加してきており、高感度かつ高速な染色体異常検出方法を開発する必要性が高まっている。一方で、近年、微小な 1 粒子の構造を検出することが可能なマイクロポアデバイスが開発され、微生物の識別が可能なが報告されている。ヒト染色体 1 本の長さは数 μm であり、微生物と同程度であるため、マイクロポアを利用した染色体形態変化や染色体数変化の検出に挑戦することで、高速・高感度で染色体構造を評価できる革新的な染色体異常の検出デバイスの開発につながる。

2. 研究の目的

染色体異常検出の現行法の問題点を解決し、染色体の構造情報の高速・高感度取得を実現するため、本研究ではマイクロポアを用いた新たな染色体異常の検出方法を開発することを目的とする(図 1)。マイクロポアデバイスを用いて染色体の電気的、形態的特徴に基づいて、既存の手法とは全く異なる観点から染色体の構造情報を取得する手法を開発する。

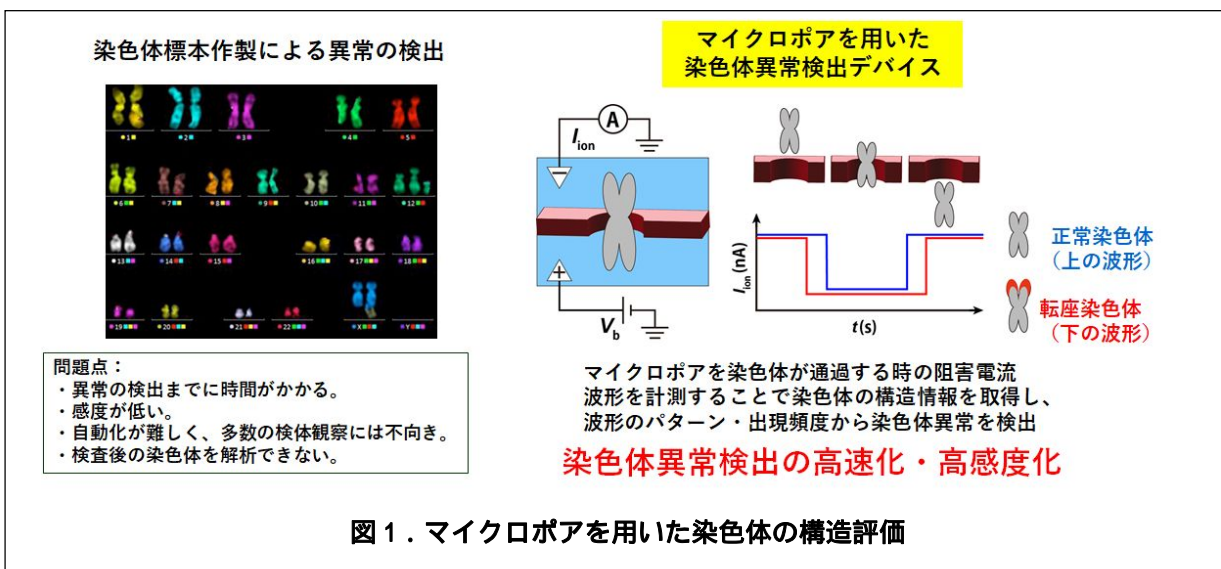


図 1. マイクロポアを用いた染色体の構造評価

3. 研究の方法

本研究では、ヒト子宮頸がん由来細胞(HeLa 細胞)及び不死化したヒト正常細胞(hTERT-RPE1 細胞)から染色体を単離し、フローサイトメトリーにより分取した染色体を用いる。個々の染色体(ヒトの場合 22 本 + XY 染色体の 24 種)がマイクロポアを通過する際に得られる特有の阻害電流波形をソースメジャメントユニット(SMU)によって計測する。ポアデバイスを用いた染色体構造情報の取得のために、以下の実験を実施した。

(1) ホアデバイスによる解析に適した染色体単離方法の検討

ポアデバイス表面への染色体の非特異的吸着が染色体のポア通過効率を低下させることが判明しており、原因として染色体表面の分子構造や物理的特性が影響することが予測されている。そこで、染色体の単離条件や解析の溶媒条件を検討し、静電相互作用や親水・疎水相互作用を制御することで解析に適した条件を決定した。

(2) 染色体解析に適したポアデバイスの検討

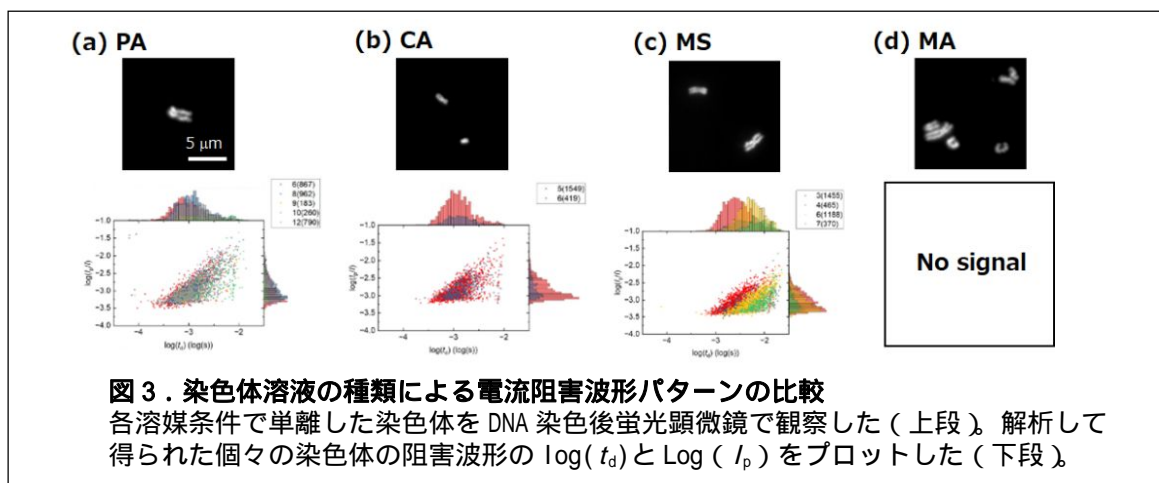
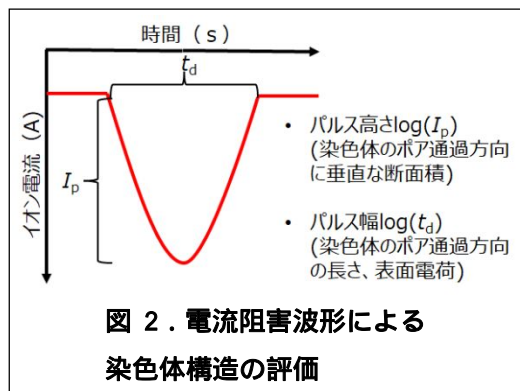
ポアデバイスを用いて染色体の構造情報を取得するためには、染色体の配向を制御し、構造に対する電流応答を最大化する必要がある。そのためにポア構造の最適化が最も重要であり、ポアの直径や厚み、染色体のポアの通過方向について検討を行った。

(3) ポアデバイスで解析する染色体異常を示す細胞の取得

染色体構造の異常をポアデバイスを用いて検出するために、染色体異常を示す細胞の調製方法を検討した。染色体異常が関係する細胞機能異常の一つに、細胞増殖が停止する細胞老化が挙げられる。細胞老化では、染色体のテロメアの短縮やセントロメア構造の崩壊が観察されることが知られている。そこで、DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤である 5-aza-2-deoxycytidine (5-Aza-dC)を用いて細胞老化を誘導し、染色体の構造異常を観察した。

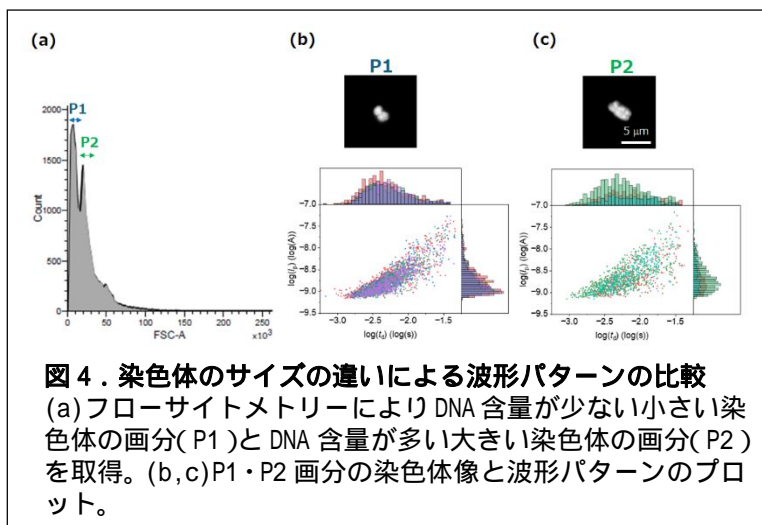
4. 研究成果

ポアデバイスを用いて染色体構造を評価するために、ヒト子宮頸がん由来細胞 (HeLa 細胞) から単離した染色体を用いて解析条件の検討を行った。染色体のポアデバイス表面への吸着を抑えて染色体の構造情報を効率よく取得する条件を決定するため、異なる溶媒条件で染色体の単離と測定を実施し、染色体がポアを通過した際に SMU により観測される電流阻害波形の出現頻度やピーク幅 (t_d 値) と高さ (I_p 値) で構造を評価した (図 2)。溶媒としてポリアミンバッファー (PA)、クエン酸溶液 (CA)、硫酸マグネシウムバッファー (MS)、メタノール・酢酸溶液 (MA) を用いて測定結果を比較した (図 3)。その結果、MA 以外の溶媒条件において染色体の構造を反映していると考えられる多数の波形パターンが観測された。DNA 染色で観察される染色体形態の違いを反映し、波形の出現パターンには溶媒間での違いが観察されるが、解析効率に大きな差は見られなかった。このため、一般的な染色体単離方法であり、単離後も形態を維持して長期保存が可能な PA を溶媒として本解析で用いることとした。



染色体異常を示さないヒト培養細胞 (hTERT-RPE1 細胞) から単離した染色体を、直径 10 マイクロメートル、厚さ 0.5 マイクロメートルのポアデバイスを用いて解析すると、ポアを通過した染色体の形態を反映した多数の波形が観測された。しかしながら、波形パターンが複雑であり、得られた波形からポアを通過した染色体の種別 (1 番 ~ 22 番染色体 + X 染色体) を同定することはできなかった。そこで、波形パターンで染色体の大きさを区別できるかを判断するため、セルソーターにより単離染色体を DNA 含量が少ない小さい染色体 (P1) と多い大きい染色体 (P2) に分画し、ソーティング後の染色体を解析した (図 4)。その結果、小さい染色体画分では、電流阻害波形の t_d 値と I_p 値がともに大きい染色体画分よりも小さい結果となり、ポアデバイスにより染色体の大小を区別できることが示された。

ポアデバイスで染色体を解析した際に観察される複雑な波形パターンを単純化することで、構造解析の精度向上が見込ま



れる。波形パターンの複雑化の原因として、ポアの直径が染色体のサイズ(幅: 1 ~ 2 μm 、長さ: 1 ~ 10 μm) に対して大きいため、ポア通過時の染色体の方向がランダムである点、ポアデバイスを水平に設置しているため、水圧が波形に影響を与える点が考えられる。そこで、ポア直径の減少、デバイスの垂直設置が波形パターンに及ぼす影響を検討した。その結果、いずれの変更も波形パターンの複雑化の抑制に有効であることが示された。今後、ポアの直径や厚さを検討することで染色体解析に適したポアデバイスを作製できる可能性がある。

ポアデバイスを用いて解析する染色体異常として、細胞老化に伴う染色体構造の変化が挙げられる。細胞老化とともにテロメアが短縮することが知られているが、他の異常についての知見が少ない。そこで、本研究では、5-Aza-dC 処理により細胞老化を誘導し、染色体構造の変化を蛍光イメージングにより詳細に解析した。その結果、細胞老化を誘導した細胞では、セントロメア領域の DNA の動きが増加し、セントロメア構造の崩壊が引き起こされることが明らかとなった。また、5-Aza-dC 処理を行った細胞は、分裂期においてセントロメアタンパク質の減少を伴う異常な染色体構造を形成することが明らかとなった(図5)。このことから、異常な構造の染色体の形成により細胞周期が停止し、細胞老化が引き起こされることが考えられる。今後、ポアデバイスを利用した細胞老化に伴う染色体構造変化の検出を実現することで、ポアデバイスが細胞老化の定量評価のツールとしての利用が期待される。

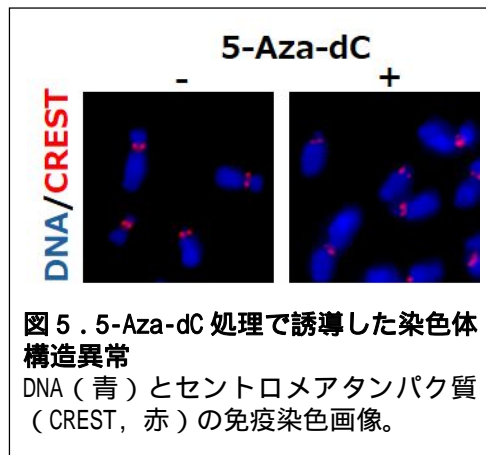


図5 . 5-Aza-dC 処理で誘導した染色体構造異常
DNA (青) とセントロメアタンパク質 (CREST, 赤) の免疫染色画像。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takata Hideaki, Masuda Yumena, Ohmido Nobuko	4. 巻 13
2. 論文標題 CRISPR imaging reveals chromatin fluctuation at the centromere region related to cellular senescence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14609
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-41770-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高田英昭
2. 発表標題 細胞老化におけるクロマチン動態可視化方法の開発
3. 学会等名 LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2024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
研究分担者	横田 一道 (Yokota Kazumichi) (50633179)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	

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