

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360114

研究課題名(和文) MEMS技術を利用した染色体ファイバ解析プラットフォームの構築

研究課題名(英文) Construction of chromosome fiber analysis platform using MEMS technology

研究代表者

鈴木 孝明 (Suzuki, Takaaki)

香川大学・工学部・准教授

研究者番号：10378797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円、(間接経費) 3,810,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞から取り出した染色体そのままの分子配向と形状を簡易に観察することを目的として、特殊な微細加工を施した樹脂製 Disposable マイクロチップ上で、遠心力により、細胞の固定から、染色体の抽出、伸張、懸架、解析する方法を開発、病理細胞を用いた評価実験を行った。提案技術によって、非常に簡単な操作で、取り出した染色体そのままを従来にない高分解能で高速観察できるため、遺伝性疾患などの臨床診断などに利用できる可能性を示し、操作者の負担軽減、診断時の患者の待機負担の軽減、テーラーメイド医療につながる技術となることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we propose a simple observation method of the shape and molecular orientation of the chromosomes extracted from cells. The proposed technique is composed of total preparation technique such as cell immobilization, chromosomes extraction, stretching, suspension and analysis using a disposable microchip controlled by centrifugal force only. It is experimentally confirmed that the chip having two kinds of microstructures arranged concentrically on a chip immobilizes cells and stretches chromosomes extracted from the immobilized cells for a sample-to-analysis system in clinical diagnosis.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学、知能機械学・機械システム

キーワード：情報機器・知能機械システム BioMEMS microTAS 三次元リソグラフィ 染色体 細胞固定

1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝病の臨床診断や、DNA の構造 - 動態 - 機能関連の生物学的解明を行う手法としては、DNA シーケンサや DNA アレイなどの染色体を断片化して分析する技術が主流であるが、断片化による情報の劣化が考えられ、これらの目的に対しては、インタクト (無傷の) 染色体をそのままの状態で見光顕微鏡を用いて可視化する方法が先端技術であると同時に常用手段である。しかし、この顕微鏡を用いた観察においては、染色体が複雑多様な糸鞠構造をもつ巨大 DNA であることから、いくつかの障害が生じる (ヒト細胞は直径 10 μ m 程度であるが、細胞一個あたり 23 対の染色体があり、一本に繋げると約 2m の長さが複雑な高次構造をもって糸鞠状になっている)。具体的には、1) 観察対象の DNA 部位の同定が過剰な非観察対象の DNA 部位によって阻害される、2) 糸鞠内部の DNA 部位を視野へ露出することが困難、3) 観察時の分解能が十分でないことである。これを解決するには、染色体の分子配向と形状を“観察しやすいように”することが可能な、染色体のサンプルプレパレーション技術が重要であり、DNA 伸張技術が注目されている。

染色体 DNA の伸張技術は、遺伝子を目視で確認できる強力な可視化技術であり、スライドガラス浸漬法、レーザートラッピング法、電気浸透流法などが提案されている。本応募技術は、特異的結合により遺伝子異常を判別する臨床診断技術として、細胞からの染色体抽出から、分析診断までのすべての動作をオンチップで実施することを目標に、複数のサンプルを同時に扱う処理能力と簡便な操作性、かつ、診断に必要な染色体伸張制御性を有する遠心法を提案し、伸張染色体の形状評価、病理モデル細胞を用いた染色体異常診断の精度評価を行う。

2. 研究の目的

本研究では、細胞から取り出した染色体そのままの分子配向と形状を簡易に観察することを目的として、特殊な微細加工を施した樹脂製ディスクポータブルマイクロチップ上で、遠心力により、細胞の固定から、染色体の抽出、伸張、懸架、解析する方法を開発、病理細胞を用いた評価実験を行う。提案技術によって、非常に簡単な操作で、取り出した染色体そのままを従来にない高分解能で高速観察できるため、ゲノム構造に起因する遺伝子多型、エピジェネティック制御などの基礎的研究から、遺伝性疾患などの臨床診断にまで幅広く利用できる可能性があり、操作者の負担軽減、診断時の患者の待機負担の軽減 (POCT)、テーラーメイド医療につながる技術となる。

3. 研究の方法

本研究は、高次構造を有する染色体をマイクロデバイス上で伸張懸架する、顕微鏡観察のためのプレパレーション技術の構築が目的であり、細胞懸濁液の播種、細胞の固定、染色体の取り出し、染色体の伸張固定、染色体の可視化までを一つのチップ上で実施可能なマイクロデバイスを提案する。

研究期間内では、1) マイクロデバイスの作製技術の高度化 (露光光源波長による加工構造の変化)、2) 遠心力を用いた細胞の固定技術の定量評価、3) 染色体伸張固定技術の定量評価を行い、さらに、最終的なデバイスについては、複数の病理モデル細胞株を用いて FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) 解析を行い、デバイスの実用性について検証を行った。

細胞懸濁液の播種から伸張染色体の可視化までを単一チップ上で簡便・高速に実施可能な遺伝子検査のためのマイクロデバイスを開発した (図 1)。

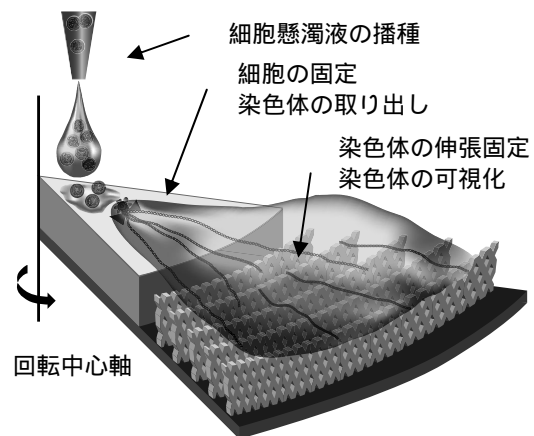


図 1 染色体伸張固定マイクロデバイス

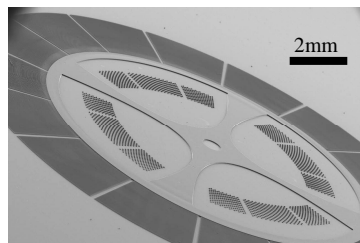
主な特長は、ポア径数 μ m 程度のマイクロメッシュ状の連続壁を同心円状に有するレコード盤型マイクロデバイス (試作済みのデバイスサイズは直径 20mm、最終目標は直径 100mm 程度) にあり、マイクロ橋脚構造上での染色体伸張に遠心力を用いる点にある。伸張原理は、チップの高速回転により染色体懸濁液に遠心力が働くと、流れ場の勾配により液中の染色体にせん断応力が作用し、糸鞠状の染色体がランダムにほぐされながら、メッシュ上部の V 溝構造 (橋脚) に、染色体が吊り橋状に懸架される。その後、染色体は V 溝構造への物理吸着により懸架状態で固定され、FISH 解析が可能である。研究期間では、メッシュ状橋脚構造による染色体の均等配置による個別認識性や、DNA プロブの染色効率向上などの検討を行うと共に、多項目同時測定の可能性などの実用性について検証し、病理モデル細胞数種を用いた FISH 解析により、検査技術としてのデバイスの有用性を検証した。

4. 研究成果

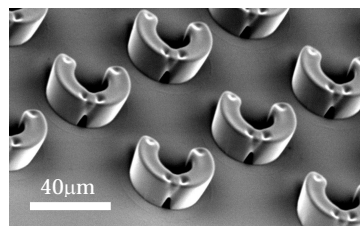
(1) 回転傾斜露光法を用いたデバイス作製

MEMS分野において微細3次元構造を作製する方法のひとつとして、紫外線露光によってレジストで複雑3次元形状を作製する方法がある。この方法は、作製期間が短く、真空装置などの高価な装置を必要としないという利点があり、傾斜露光法、回転マスク露光法、グレイマスク法、移動マスク法などが挙げられる。これらの方法は、真空装置などの高価な装置をほとんど必要とせず、作製期間が短いという特徴を持つ。我々は、回転傾斜露光法に、裏面露光、マスクの二重化と、特殊マスクパターンを設計を組み合わせることで、従来の方法では製作が非常に困難であった提案デバイスの形状を一括作製した。

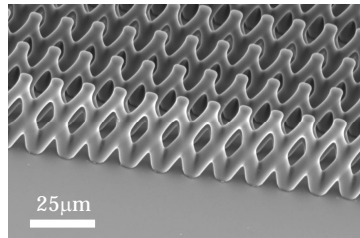
固定マスク付き回転傾斜露光を行った時の結果を示す。図2(a)は作製したデバイスの全体像であり構造外形は14mmである。図2(b)は細胞固定構造であり、開口径は24 μm 、同心円状に複数配置されている。各細胞固定構造には外周方向に小さな穴があり基板を回転させた際に流体による流れが通過する構造になっている。さらにその外周には、図2(c)に示すメッシュ構造が同心円状に配置されており、V字構造上に染色体を液中で伸張懸架することで、分析精度向上、分析時間短縮ができる。以上の結果から、提案する回転傾斜露光法により、これらの複雑微細構造をウエハレベルで一括作製できることが分かった。



a) Whole image



b) Opened cone structures trapping cells



c) Micro-bridges suspending fiber chromosomes

図2 作製したデバイスのSEM像

(2) 固定細胞からの染色体伸張

実験にはヒト子宮頸がん細胞 HeLa 細胞を用い、細胞固定時の回転数を 1000rpm で 5 秒回転させた後、500rpm で 200 秒回転とした。染色体伸張時の回転数は 4000 ~ 7000rpm の間で 500rpm ごとに行った。デバイスのメッシュ構造部に伸張固定した染色体を、染色体全長を染色する YO-PRO-1 (Invitrogen 社) を用いてデバイス上で蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡を用いてデバイス上の細胞固定構造近辺とメッシュ部分を走査した。一つのデバイス上で固定した細胞から伸張した染色体の蛍光像を図3に示す。図の左下方向から右上方向へ向かって細胞固定構造から緑色の直線状の染色体が伸張されている。また、図中の矢印は遠心力が働いている方向を示しており、遠心力が働いている方向へと染色体が伸張されている様子が分かる。

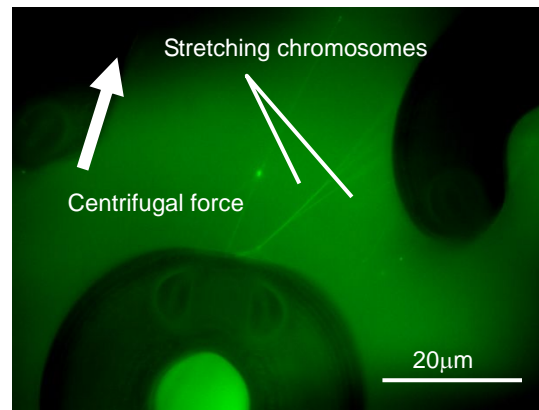


図3 固定細胞から伸張した染色体の蛍光像

(3) チップ上での FISH 解析

染色体の特定部位の観察については、蛍光 DNA プロブを用いた蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法 (Fluorescent In Situ Hybridization : FISH 法) が一般的である。提案したデバイス上で伸張染色体を FISH 解析し、蛍光顕微鏡で取得した複数の蛍光像をマージした画像を図4に示す。赤色プロブが直線状に連なっていることから伸張染色体の特定の部位にプロブが結合していることが分かる。

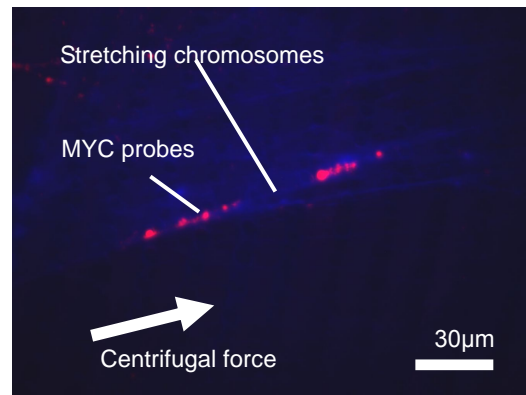


図4 伸張染色体の FISH 像 (1 時間放置)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

鈴木 孝明, 寺尾 京平, 鈴木 博之, 新田 祐幹, 高尾 英邦, 下川 房男, 大平文和, 平丸 大介, 小寺 秀俊, MEMS 技術を利用した高速 DNA ファイバ解析デバイスの開発, 電気学会論文誌 (E), 査読有, Vol.133, No.5, pp.139-146, 2013. DOI: 10.1541/ieejsmas.133.139

M. Inoue, A. Okonogi, K. Terao, H. Takao, F. Shimokawa, F. Oohira, H. Kotera, and T. Suzuki, Cell Culture on MEMS Materials in Micro-Environment Limited by a Physical Condition, Micro & Nano Letters, 査読有, Vol.7, No.8, pp.725-728, 2012.

DOI: 10.1049/mnl.2012.0216

Y. Noda, M. Hanafusa, A. Yamamoto, M. Ijuin, M. Hori, T. Osumi, T. Suzuki, I. Kanno, H. Kotera, Integrated blood cell counting device using a hydrophobic surface treatment, Sensors and Actuators B: Chemical, 査読有, Volume 171-172, PP.1321-1326, 2012.

DOI: 10.1016/j.sna.2010.11.010

〔学会発表〕(計36件)

鈴木 孝明, 3次元 UV リソグラフィを用いたバイオデバイス開発, 第44回国際電子回路産業展 (JPCAshow2014) 最先端実装技術シンポジウム (招待講演), 2014年06月04日, 東京ビッグサイト.

鈴木 孝明, 3次元 UV リソグラフィとそのバイオ応用, 第1回 HANAMIST (調和ナノマイクロシステム技術研究会) (招待講演), 2013年12月18日, キャンパスプラザ京都.

Takaaki Suzuki, Kyohei Terao, Hiroyuki Suzuki, Yuki Nitta, Hidekuni Takao, Fusao Shimokawa, Fumikazu Oohira, Daisuke Hiramaru, Hidetoshi Kotera, DNA Fiber Preparation Technique on a Chip for Clinical Diagnosis, The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences [microTAS2012], 2012年10月28日~11月01日, Okinawa, Japan.

Yuki Nitta, Hiroyuki Suzuki, Kyohei Terao, Hidekuni Takao, Fusao Shimokawa, Fumikazu Oohira, Takaaki Suzuki, Large Area 3D Microfabrication Technique by Multidirectional Photolithography for a Chromosome Extension Chip, The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences [microTAS2012],

2012年10月28日~11月01日, Okinawa, Japan.

鈴木 孝明, 寺尾 京平, 鈴木 博之, 新田 祐幹, 高尾 英邦, 下川 房男, 大平文和, 平丸 大介, 小寺 秀俊, MEMS 技術を利用した高速 DNA ファイバ解析デバイスの開発, 第29回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2012年10月22日~24日, 北九州国際会議場. (最優秀技術論文賞受賞)

鈴木博之, 平丸大介, 寺尾京平, 高尾英邦, 下川房男, 大平文和, 小寺秀俊, 鈴木孝明, 臨床診断向けオンチップ DNA ファイバプレパレーション技術の開発, 第28回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2011年9月26-27日, タワーホール船堀.

〔産業財産権〕

取得状況 (計1件)

名称: 微小構造体の作製方法

発明者: 鈴木 孝明, 小寺 秀俊, 神野 伊策, 平丸 大介

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許第 5458241 号

取得年月日: 2014年1月24日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.eng.kagawa-u.ac.jp/~suzuki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 孝明 (SUZUKI Takaaki)

香川大学・工学部・准教授

研究者番号: 10378797

(2) 研究分担者

寺尾 京平 (TERAO Kyohei)

香川大学・工学部・准教授

研究者番号: 80467448