

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 20 日現在

機関番号：32660
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2013～2015
 課題番号：25871118
 研究課題名(和文) がんのその場診断のための体液前処理用グラフト型自律駆動マイクロチップの開発

 研究課題名(英文) Preparation of graft-type power-free microchip toward cancer point-of-care diagnosis

 研究代表者
 石原 量 (Ishihara, Ryo)

 東京理科大学・基礎工学部・助教

 研究者番号：30633507

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：放射線グラフト重合法を利用して、がんのその場診断を目指し、バイオマーカーとして知られるmicroRNAを小容量サンプルから高速かつ高感度に検出できる持ち運び可能なグラフト型自律駆動マイクロチップを作製した。放射線グラフト重合法は、基材の材質を選ばず、重合開始点の固定が必要なく、短時間で表面機能化できる手法である。チップ流路内表面にmicroRNAを捕捉するプローブDNAを3次元的かつ高密度に固定することに成功し、作製したグラフト型マイクロチップを用い、0.5 マイクロリットルのサンプル中から20分で市販のマイクロアレイと同程度の0.75 pMのmicroRNAを検出可能であることを実証した。

研究成果の概要(英文)：Toward cancer point-of-care (POC) diagnosis, a graft-type power-free microchip for microRNA, cancer biomarker, detection was prepared by radiation beam-induced graft polymerization (RIGP). The prepared portable microchip enables rapid and highly sensitive miRNA detection from small sample volume. Because RIGP is applicable to various polymers without initiator immobilization nor long irradiation time, RIGP is easy and rapid polymer surface modification method. Three dimensional high density capture probe DNA immobilization onto the microchannel inner surface of the microchip was achieved. Limit of detection of microRNA was 0.75 pM, which is same detection sensitivity as a commercially available standard microarray. The required sample volume was 0.5 microliter and assay time was 20 min. The microchip will contribute as a promising platform for POC cancer diagnosis.

研究分野：機能性高分子材料

キーワード：表面機能化自律駆動マイクロチップ 放射線グラフト重合法 マイクロRNA バイオマーカー その場診断

1. 研究開始当初の背景

病気の兆候を早い段階でとらえることは非常に重要である。2008年、体液を循環するmicroRNA (miRNA)が、がん早期発見のためのバイオマーカーとなる可能性が示され研究が盛んに行われるようになった。早期発見できる人を増やすためには、誰もがいつでもどこでも簡単に受けられる、安価、簡便、かつ信頼性の高い診断手法が求められる。これらの要求に応える診断方法として、妊娠検査薬に代表される“その場 (Point-of-care : POC)”診断が注目されている。マイクロチップは既存のmiRNA検出手法であるマイクロアレイと比較して、試料体積を1/100程度に縮減でき、測定時間を数時間から20分程度に短縮できるため、次世代のPOC診断を実現する材料として期待されている。

多くのマイクロチップは送液にポンプを用い、マイクロチップ部分は安価かつ小型でも、ポンプ部分は高価かつ大型であるため、POC診断に適さない。理化学研究所では、ポンプを用いることなく送液可能な“自律駆動PDMSマイクロチップ”を開発した。理化学研究所では、その自律駆動マイクロチップを利用して、microRNAの検出マイクロチップを開発してきたが、1~2桁の感度向上、また体液を直接導入するための技術が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、microRNAのさらなる高感度化および体液の前処理を目指し、自律駆動マイクロチップの流路内面に高分子鎖を付与したグラフト型の自律駆動マイクロチップを提案した。

(1) 付与した高分子鎖にプローブを3次的に固定することで、高密度な固定をめざした。

(2) また、付与した高分子鎖に抗体を固定することで、細胞外ベシクルの捕捉をめざした。

3. 研究の方法

本研究では、自律駆動マイクロチップ流路にモノマーを満たし、脱酸素状態で電子線を照射することによってPDMSマイクロチップの流路内面に高分子層を付与した(電子線グラフト重合法の1つである同時照射法)。これにより、化学的な機能の付与が容易な“グラフト型自律駆動マイクロチップ”を得ることができた(図1)。本研究では、モノマーにはエポキシ基を有するグリシジルメタクリレート(GMA)を選択した。ターゲットとなるmiRNAには、miR-500a-3p(肝臓がんのバイオマーカー)を選択した。

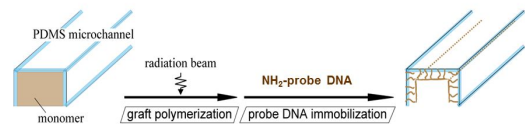


図1 グラフト型自律駆動マイクロチップ作製

(1) microRNA 検出：サンドイッチ法

miRNA検出は、まず、作製したグラフト型自律駆動マイクロチップにmiR-500a-3を捕捉するためのプローブDNAを固定し、固定したプローブDNA、とターゲットであるmiRNA、検出用の蛍光標識されたプローブDNAによってサンドイッチ構造を形成させ、蛍光により検出するシンプルな手法を採用した(図2)。

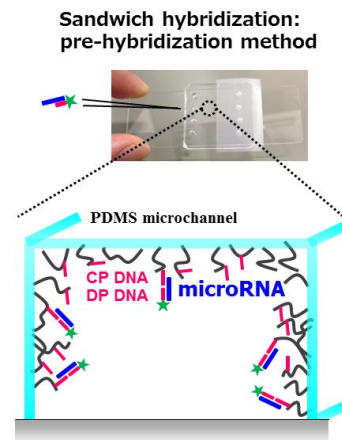


図2 サンドイッチ法

(2) microRNA 検出：層流樹状増幅法

つぎに、層流樹状増幅法(LFDA) を適用して miRNA 検出を試みた(図 3)。LFDA には Y 字型の流路を用いた。本法ではビオチン化プローブ DNA を用い、サンドイッチ法と同様にプローブ DNA を固定したのちに 2 つのプローブ DNA をターゲット miRNA でサンドイッチ構造を形成させ、次に二つの枝流路から増幅試薬を注入する。これらの溶液は層流となり、合流した後も二つの領域に分かれたまま進んでいく。この仮想的な境界面と壁面の交線に増幅試薬が同時かつ連続的に供給され、樹状構造が成長し、miRNA の蛍光シグナルが増幅する。

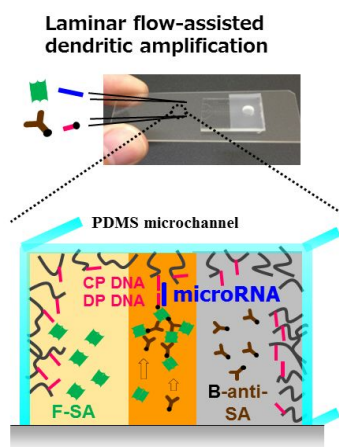


図3 層流樹状増幅法

(3) 細胞外ベシクルの捕捉

体液を直接導入する準備として、グラフト型の自律駆動マイクロチップに、microRNA を内包する細胞外ベシクルを選択的に捕捉する anti-CD63 antibody を固定し、層流樹状増幅法により、捕捉の確認をした。

4. 研究成果

(1) PDMS に電子線と照射した際に PDMS が照射線量に依存した自家蛍光を持つことを見出した(図 4)。

(2) 付与した高分子層を気体が透過し、自律駆動能を失わなかった。

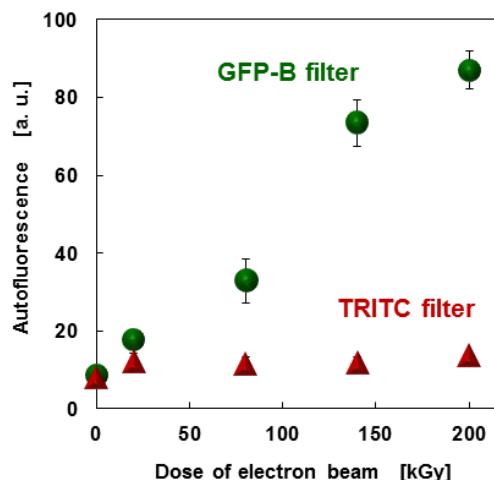


図4 電子線照射線量と自家蛍光の関係

(3) ターゲットとなるmiRNA (miR-500a-3p:

肝臓癌のバイオマーカー)を捕捉するプローブDNAは、流路内表面の高分子鎖に、5'末端のアミンとエポキシ基の開環反応を利用して3次元のかつ高密度に固定されていることを示した(図5)。

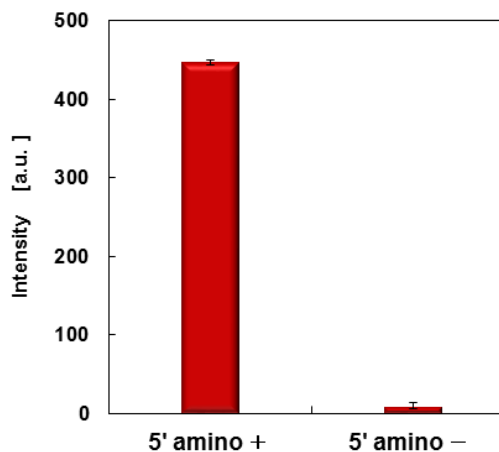


図5 捕捉用プローブDNAの固定

(4) サンドイッチ法によって検出にかかった時間は約15分であった。蛍光顕微鏡によってマイクロ流路を観察すると、ターゲットの miRNA 濃度に依存した蛍光強度が得られた。これより、miRNA 検出がグラフト型自律駆動マイクロチップ上で可能であることを実証できた。検量線を作製し検出下限値を3 σ 法によって算出すると、電子線グラフト重合の時に用いるGMAモノマー濃度の増加; 0.5 M ~ 3.0

Mとともに、検出下限値は8.6 nMから0.5 nMまで下がり17倍感度が向上した(図6)。またランダム配列のmicroRNAを検出に用いた際は、シグナルが出ないことからターゲットmicroRNAに対する特異性も確かめた(図7)。しかしながら、この値は血中に含まれるmiRNA濃度が数~数百fMレベルであることを考えると、検出下限値のさらなる改善が必要であった。

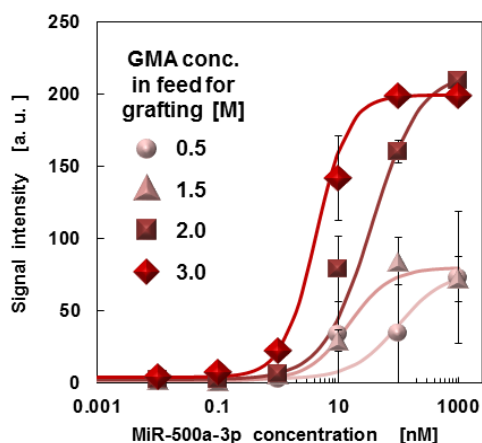


図6 サンドイッチ法によるmicroRNA検出の検量線

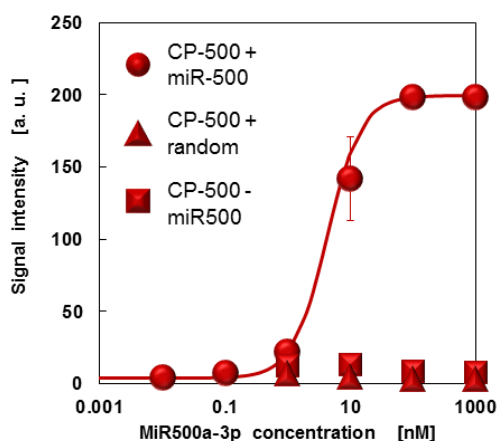


図7 microRNA検出用グラフト型マイクロチップの検出特異性

(5) 層流樹状法によってmiRNAを検出すると、測定に必要なサンプル体積は0.5 μ Lであり、検出にかかった時間は同じく約15分であった。同様にマイクロ流路を蛍光顕微鏡によって観察し算出した検出下限は750 fM = 2.3×10^5 copiesであり(図8)、これはサンドイッチ法と

比較すると約3桁検出下限を改善できた値であり、さらに、市販されている標準的なマイクロアレイと同程度である。血中のmiRNAレベルを網羅するにはあと1~2ケタ及ばないため、デバイスのさらなる感度の向上、または血中からの濃縮後の検出といった工夫が必要である。

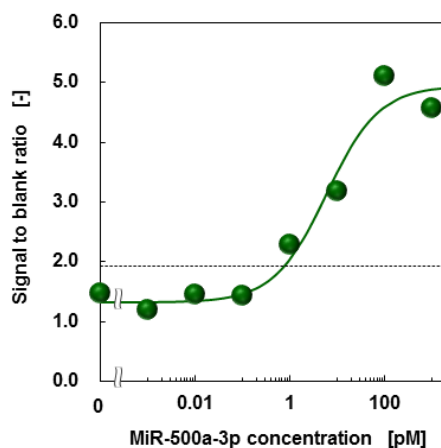


図8 層流樹状増幅法によるmicroRNA検出の検量線

(6) 細胞外ベシクル捕捉のグラフト型の自律駆動マイクロチップに層流樹状増幅法を適用することによって、細胞外ベシクルを捕捉できることを示せた(図9)。

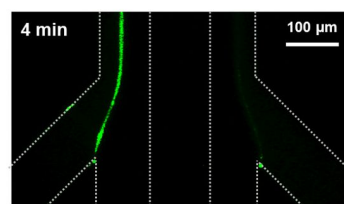


図9 細胞外ベシクルの捕捉

<引用文献>

- Mitchell et al.: PNAS 2008, 141: 672-675.
- K. Hosokawa, K. Sato, N. Ichikawa, M. Maeda: Lab Chip 2004, 4: 181-185.
- H. Arata, H. Komatsu, K. Hosokawa, M. Maeda: Analyst 2012, 137: 3234-3237.
- R. Ishihara, K. Hasegawa, K. Hosokawa, M. Maeda: Anal Sci 2015, 31: 573-576.
- K. Hosokawa, M. Omata, M. Maeda: Anal Chem 2007, 79: 6000-6004.

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

R. Ishihara, K. Hasegawa, K. Hosokawa, M. Maeda, Multiplex MicroRNA Detection on a Power-Free Microfluidic Chip with Laminar Flow-Assisted Dendritic Amplification, Anal. Sci., 査読有, vol. 31. No. 7, 2015, 573-576
DOI: 10.2116/analsci.31.573

石原量, 長谷川和貴, 細川和生, 前田瑞夫, 自律駆動マイクロ流体チップと層流樹状増幅法によるタンパク質と核酸の検出, 分析化学, 査読有, vol. 64, 2015, 319-328
DOI: 10.2116/bunsekikagaku.64.319

[学会発表](計 25件)

R. Ishihara, K. Hosokawa, M. Maeda, Multiplex MicroRNA Detection on Pump-Free Microfluidic Chip toward Point-of-Care Diagnosis, 2014 Japan-Taiwan Symposium on Polyscale Technologies for Biomedical Engineering and Environmental Sciences (PT-BMES 2014), 12-15 September 2014, Yilan County (Taiwan)

R. Ishihara, Y. Uchino, K. Hosokawa, M. Maeda, A. Kikuchi, Surface Modification of PDMS Microchip for MicroRNA Detection Adopting Electron Beam-Induced Graft Polymerization, μ TAS 2015, 25-29 October 2015, Hwabaek International Convention Center (HICO), Gyeongju (Korea)

R. Ishihara, Y. Uchino, K. Hosokawa, M. Maeda, A. Kikuchi, Preparation of MicroRNA detection power-free microchip utilizing electron beam-induced graft polymerization toward point-of-care

diagnosis, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 2015年11月9, 10日, 京都テルサ (京都)

石原量, 内野斐隆, 細川和生, 前田瑞夫, 菊池明彦, グラフト型自律駆動マイクロチップによる microRNA 検出, 第24回日本 MRS 年次大会, 2014年12月10-12日, 横浜市開港記念館 (横浜)

R. Ishihara, T. Nakajima, Y. Uchino, K. Tanabe, K. Hosokawa, M. Maeda, Y. Tomooka, A. Kikuchi, Simple Inner-Surface Modification of a PDMS Microchip by Radiation-Induced Graft Polymerization for Extracellular Vesicle Detection toward Point-of-Care Cancer Diagnosis, 10th World Biomaterials Congress (WBC 2016), 17-22 May 2016, Palais des Congres de Montreal, Montreal (Canada)

[その他]
受賞者紹介

石原量, 内野斐隆, 細川和生, 前田瑞夫, 菊池明彦, その場診断のための電子線グラフト重合法による microRNA 自律駆動マイクロチップの作製バイオマテリアル 生体材料, vol. 34, 2015, 26-27

ホームページ等

<http://kikuchilab.com/home/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原量 (ISHIHARA, Ryo)
東京理科大学・基礎工学部・助教
研究者番号: 30633507