

# DNA 病理標本化・画像診断ナノデバイスの開発

名古屋大学革新ナノバイオデバイス研究センター

小野島 大介

## 要旨

本研究では、近年がん診断マーカーとしての有用性が報告されている DNA メチル化異常を検出対象として、DNA 分子の病理検査デバイスの開発を実施した。がん細胞ではがん抑制遺伝子の CpG サイト（シトシン-グアニン配列に富む 500-2,000 塩基対領域）に異常な DNA メチル化が発生し、遺伝子が不活性化した結果、細胞の無秩序な増殖等が引き起こされることが分かっている。そこで、実験的に CpG サイトにメチル化を発生させた DNA を早期がん由来のメチル化異常を持つ DNA のモデルとして使用し、DNA メチル化部位の染色、メチル化 DNA の伸長、及び画像解析を行う微小流体デバイスを開発した結果、血液 1mL 中に数十 ng 程度含まれる腫瘍由来の血中遊離 DNA に相当するサンプルから DNA 分子を標本化し、DNA メチル化異常を画像検査する技術を確立することに成功した。

## 1. 研究目的と成果

現在のがん診断に関わる病理学では、病変部の組織を薄切・固定してプレパラート状とした標本を肉眼や顕微鏡を用いて形態学的に検査するのが一般的である。近年はがんの種類や診断目的によっては擦過・穿刺吸引によって採取した細胞標本を用いた細胞診断（細胞診）も行われているが、分子そのものの形態像を診る顕微鏡検査はまだ実現しておらず、がん細胞に含まれる分子単体の病理標本化（分子標本）が強く望まれている。特に DNA は紫外線・放射線照射による鎖の切断や細胞のがん化に伴う遺伝子の変化・メチル化等の分子レベルの異常の重要性が指摘されており、分子標本を用いてこれらの異常を形態学的に精査する DNA 分子単体の画像診断は、次世代の DNA シーケンサー等を用いる非形態学的遺伝子検査に加えて今後のがんを対象とした病理学及び病理診断の高度化に必須の要素である。例えば、分子標本を使用すれば遺伝子異常を起こしている DNA 分子を直接観察することが可能となり、DNA 1 分子レベルの画像診断によってがんの種類や進行状況を素早くかつ詳細に検査できるようになる。そこで、本研究では、申請者が持つ微小流体チップ技術によって DNA を 1 分子レベルで標本化し、がんに関連した遺伝子異常を持つ DNA を 1 分子レベルで画像検出するための技術開発を実施した。

DNA 分子の病理検査デバイスは、DNA 溶液送液用流路チップと DNA 固定用ジグザグ溝構造チップの二種類のシリコン樹脂製チップを張り合わせたデバイスとして作製し、動作が確認された。本研究開発の結果、標本化に成功したメチル化 DNA の観察結果を図 1 に示す。ジグザグ型の溝構造の頂点から DNA 分子が伸長・固定され、分子長さの測定から、画像中に検出された蛍光像がそれぞれ使用したサンプル中に存在するサイズの 1 分子 DNA に相当することが確認された。本研究の過程では、標本化に使用する DNA 固定用の溝構造に関し

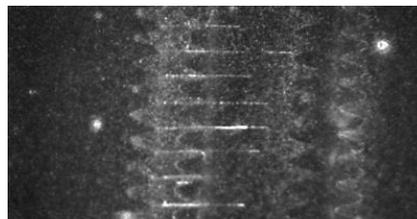


図 1. 標本化されたメチル化 DNA の蛍光像

てジグザグの形状・寸法を検討し、最も固定化率の高いパターンを実験的に求めた。また、Methyl Binding Domain Protein-Biotin (MBD) を介した Fluoronanogold-S

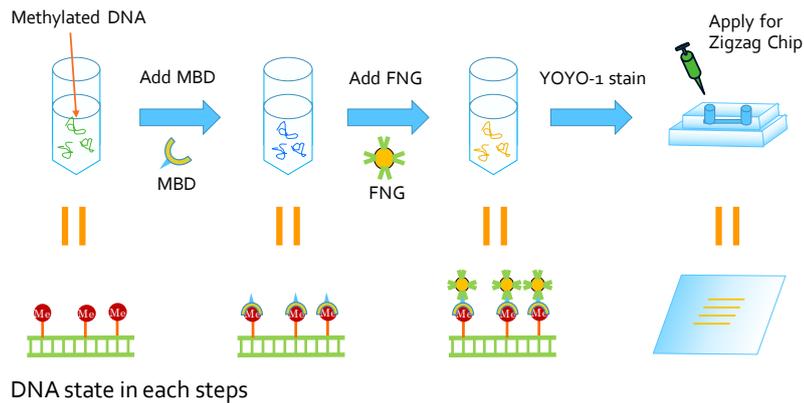


図 2. メチル化 DNA の染色と標本化プロセスの概要

treptavidin Alexa Fluor

546 (FNG) によるメチル化部位の標識に関して MBD と FNG の最適混合比を検討し、図 2 に示すメチル化 DNA の染色と標本化のプロセスを確立した。これにより、標本化された 1 分子 DNA の画像から、メチル化部位を含む DNA の存在を 1 分子レベルで検出可能となった。

## 2. まとめと今後の課題

実験的に CpG サイトにメチル化を発生させた DNA を早期がん由来のメチル化異常を持つ DNA のモデルとして使用し、DNA メチル化部位の染色、デバイスを用いたメチル化 DNA の 1 分子伸長、及び画像検出に成功した。本標本化デバイスの DNA 分子に対する捕捉率は約 70% であり、一度に約 1,500 本の DNA 分子を標本化できることが確認された。今後は当初目標とした 2 万本以上の DNA を観察窓の中に収める高密度化が課題である。本研究開発の結果、技術的には現在の DNA 溶液送液用の流路構造を約 1.5 倍まで拡大可能であり、また現在の DNA 固定用ジグザグ溝構造の頂点間距離を約 50 分の 1 まで微細化できる予測が得られている。そこで、本研究開発を継続し、測定サンプルに合わせたデバイスのナノ構造の最適化を進めることで、画像検査の精度向上に向けた DNA の高密度標本をいち早く実現する。

本研究開発の成果は国際会議  $\mu$ TAS 2013 及び 2014 において上位約 7% にランクされ、口頭発表 1 件と査読付き論文 3 報 [1] が採択された。また、英国王立化学会 (RSC) が出版する世界的権威のある学会誌の一つである *Lab on a Chip* 誌に本研究の成果をまとめた論文 [2] が採択された。さらに、本研究の学術的内容に関連する発展的研究提案が文部科学省科学研究費補助金 [3] に採択され、現在も研究が継続中である。

### 成果リスト (査読付き文献及び関連する研究費)

1. **D. Onoshima** et al., Sizing and sorting of single DNA molecules by microfluidic molecular combing device *Micro Total Analysis Systems*, in press, 他 2 報.
2. Yasaki and **D. Onoshima** et al., Microfluidic transfer of liquid interface for parallel stretching and stamping of terminal-unmodified single DNA molecules between zigzag-shaped microgrooves *Lab Chip*, in press.
3. 文部科学省科学研究費補助金若手研究 (B), DNA メチル化異常のナノ分解能 1 分子標本検査デバイスの開発 (2014 年 4 月~2017 年 3 月) .