

博士論文（要約）

RNA 発現解析を用いた
疾患早期発見用マイクロデバイスの研究

木村 雄亮

本研究は、Point of care testing (POCT) による、あらゆる現場での疾患早期発見を可能とするポータブルマイクロデバイスの開発を目的とする。本論文ではそのための構成技術の1つである、RNA発現解析を可能とする2種類のマイクロデバイス開発に成功した。

POCTとは「あらゆる場所において、その場で行う検査」という手法を示す。POCTにより、従来検査では難しい、未症状段階での疾患早期発見も可能となると期待される。

POCTのための、疾患早期発見用マーカーとして期待されている物質に、RNAがある。RNAは核酸の1種であり、生体内の恒常性維持のため、様々な働きを行っている。そのためRNAの発現異常は、様々な疾患の原因になると考えられる。例えば、発がん時、microRNA (miRNA) の異常発現が、がんの早期段階より生じる。また、発現異常を示すmiRNAの種類は、発がん組織によって異なる。そのため、血中miRNA発現解析により、がんの早期発見だけでなく、がん発生組織まで検査できる。

また、ウイルス感染時、血中にはウイルス特異的RNAが早期段階より出現する。それらの発現解析により、未病段階でのウイルス感染発見も可能である。以上より、これらのRNAは、新たな診断マーカーになりうると考えられる。

本論文では、特に重要度の高い、これら2種類のRNAの発現解析を可能とする、

1. miRNA発現解析のための定量的逆転写反応ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) マイクロデバイス
2. ウイルスRNA発現解析のためのLoop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) マイクロデバイス

の2種類のマイクロデバイスの開発を行った。本マイクロデバイスは、生田らが世界に先駆けて提唱、開発を行ってきた「化学ICチップ」コンセプトを基に開発を行った。これにより従来手法では不可能であった、デバイス全系を含めたポータブル化に成功した。

本論文は8章で構成される。以下に本論文の詳細を述べると同時に各章の内容を述べる。第1章では、本論文の概要について論じた。POCTの重要性、及び従来装置でPOCTを行う際に生じる問題点を提示した。それを受け、本論文の目的を、POCTによる疾患早期発見に必要な技術の1つである、RNA発現解析を行うための、ポータブルマイクロデバイスの開発とした。

第2章では、RNA発現解析手法の1つであるqRT-PCRの原理、及び従来開発されてきたqRT-PCR用マイクロデバイスの特徴と、その問題点について述べた。qRT-PCRは一定の温度サイクルを繰り返すだけで標的遺伝子の定量を行える手法であるが、POCTに用いるためには、装置が巨大で設置個所が制限される問題がある。また、その問題解決のためにいくつかのqRT-PCR用マイクロデバイスが開発されているが、実用的なPOCT用マイクロデバイスに必要と考えられる、

1. 少量試薬での複数サンプル同時解析
2. 制御システム等を含めたデバイス全体のポータブル化
3. ディスポーザブル性

の3点を全て満たすデバイスは存在しない。そこでそれらの課題を解決できるマイクロデバイスとして、化学ICコンセプトに基づいた早期がん発見用マイクロデバイスのコンセプトモデルを提案した。本論文ではそのために必要なモジュールの中でも特に重要な、miRNA発現解析を可能とするqRT-PCR用マイクロデバイスの開発を行うこととした。

第3章では、逆転写反応を可能とするマイクロデバイスの開発を行った。本デバイスは化学ICコンセプトに沿って、反応に必要なモジュールを3次的に構築する事で作製した。各々のモジュールは、マイクロ光造形法により作製した。それにより、x、y軸方向の分解能10 μm 、z方向の分解能50 μm での、精密なモジュール作製に成功した。各モジュールの立体構築により、加熱制御に必要な面積を最小限に抑える事に成功した。これによりノートパソコン1台での全システム制御を可能とし、システム全系のポータブル性を改善した。本デバイスで逆転写反応を行ったところ、最大9サンプルの同時反応解析に成功した。また様々な遺伝子に対して、従来装置と同様の反応正確性を示した。

第4章では、前章で課題となったリアクタモジュールの改善のため、新たな基盤技術であるポリプロピレン (PP) フィルムリアクタの作製手法を確立した。化学ICコンセプトに基づき開発したリアクタモジュールは熱伝導率が悪く、サンプルがPCR温度サイクルに追従しない問題が生じた。またqRT-PCR、LAMPでは標的遺伝子の増幅確認のために蛍光観察を行う必要があるが、マイクロ光造形法に用いる光硬化性樹脂は励起光を反射するため、定量測定を行えない。最後に、リアクタモジュールを使いまわした場合、コンタミネーションによる誤検出が生じるため、ディスプレイポータブル性に優れたリアクタを開発する必要がある。これらの問題を解決するために確立したPPフィルムリアクタは、厚さ100 μm のPPフィルムを鋳型に沿って熱変形させる事で、低コストかつ簡単に作製する事ができ、ディスプレイポータブル性に優れる。リアクタは4つのウェルを持ち、少量試薬での4サンプル同時反応解析が可能である。また、熱伝導率も高く、qRT-PCRで実施される短時間での急激な温度変化にも十分追従できる。更に高い透明度を持ち、蛍光観察時に使用する励起光、蛍光を阻害しない。本リアクタを応用し、qRT-PCR用マイクロデバイス及びLAMP用マイクロデバイスを開発する事とした。

第5章では、開発したPPフィルムリアクタモジュールを用い、qRT-PCRを可能とするマイクロデバイスの開発を行った。qRT-PCR実行のため、新たに蛍光観察用モジュールを開発した。本モジュールを搭載しても、デバイスは手のひら程度の大きさである。また加熱制御、蛍光観察、及び解析は全て1台のノートパソコンで行うため、ポータブル性に優れる。作製したマイクロデバイスを用い、qRT-PCRを実行したところ、標的遺伝子を含むサンプルにおいて、有意な蛍光強度の増加を確認できた。また検出感度は、従来装置と同程度に維持する事に成功した。更に、実際にがん早期発見マーカーになりうるmiRNAの増幅にも成功した。

第6章ではLAMPの詳細な原理、及び従来開発されてきたLAMP用マイクロデバイスの特徴と、その問題点について述べた。LAMP法はサンプルを一定の温度で加熱するだけ

で標的遺伝子の増幅を行え、また蛍光試薬の導入により目視での増幅確認が可能な手法である。しかしPOCTに用いるためには、従来装置が巨大で、設置個所が制限される問題がある。また、その問題解決のために、いくつかのLAMP用マイクロデバイスが開発されているが、上述の、実用的なPOCTマイクロデバイスに必要と定義した3点を満たすマイクロデバイスは存在しない。そのため、化学ICコンセプトに基づいた早期感染症発見用マイクロデバイスのコンセプトモデルを提案した。本論文ではそのうち、LAMPによるウィルスRNA発現解析を可能とするマイクロデバイスの開発を行う事とした。

第7章では、LAMP法用マイクロデバイスの開発を行った。本デバイスも、化学ICコンセプトに基づき、反応に必要なモジュールを3次元構築することで開発した。本デバイスでは200 nl/wellのサンプルを用い、0.5 mm²以下の微小空間内において、最大16サンプルの解析を同時に行える。また毛細管現象を利用し、リアクタ上の全ウェルに、サンプルを同時にアプライできるシステムを開発した。これによりサブマイクロリットルスケールのサンプルを簡単に操作できる。標的遺伝子の増幅は、サンプル内の蛍光強度の増加を、目視で確認する事で行う。そのため解析装置などの必要が無く、反応中にデバイスを一定温度で加熱するシステムのみで実施できる。その結果、本デバイスはqRT-PCRマイクロデバイスよりも更に小型化する事に成功し、デバイス本体、及び制御システムを含めても手のひらサイズに収める事に成功した。本デバイスでLAMP法を実行したところ、リアクタ上での16サンプル同時発現解析が可能であった。また、その結果は目視で確認できるほど明瞭なものであり、小型デバイス、少量試薬での反応でありながら、従来の大型装置と同様の検出感度の維持に成功した。さらに、実際にヒトに感染するウィルスである、デングウィルスRNA検出実験を行ったところ、デングウィルスRNAを含むサンプルでのみ反応が生じ、反応特異性及び実用性を確認できた。

第8章では、開発した2種類のマイクロデバイスの特長をまとめ、今後の展望を述べた。2種類のRNA発現解析用マイクロデバイスの特長を以下に記載する。

qRT-PCR用マイクロデバイス

1. 微小空間内、少量試薬での4サンプル同時発現解析
2. 高い熱伝導率、透明性、ディスプレイザブル性を兼ね揃えた、実用性の高いリアクタ
3. デバイス本体とノートパソコン1台のみでの全反応制御、解析の実施
4. 小型デバイス、少量試薬での反応でありながら、従来装置と同様の感度を維持

LAMP用マイクロデバイス

1. 200 nlの微量試薬での、16サンプル同時発現解析
2. qRT-PCRと同様のリアクタ、及び微量サンプルを簡単に操作できるシステムの搭載
3. 手のひらサイズのデバイス上での、全反応制御、解析の実施
4. 小型デバイス、少量試薬での反応でありながら、従来装置と同様の感度を維持

本研究により、これまでにない実用性に富んだRNA発現解析用マイクロデバイスの開発に成功し、POCT分野の発展に甚大な貢献を行った。