

1 分子がん診断に向けた DNA の病理学的顕微鏡検査チップの開発

小野島 大介*

Development of DNA pathological examination chip for microscopic single-molecule cancer diagnosis

Daisuke Onoshima*

Image analysis of methylated DNA has a great potential for exploring epigenomic change in cancer cells. In order to visualize signal variation caused by DNA methylation, it is crucial that the DNA molecules are arrayed in parallel direction inside the narrow microscopic field. Here we show that methylated DNA molecules can be trapped and stretched at the patterned grooves on the surface of microfluidic channel by flow. The demonstrated DNA aligning technique enables simultaneous molecular imaging and detection for cancer diagnosis at the single molecule level.

1. はじめに

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⁽¹⁾、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、一部の悪性リンパ腫や肺がんでは特徴的 ALK 遺伝子の異常が分かっており、従来の病理標本では ALK タンパク質の染色と転座を起こした染色体像の観察までが確認されている⁽²⁾。これに加えて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(図 1)、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、申請者が持つマイクロ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。

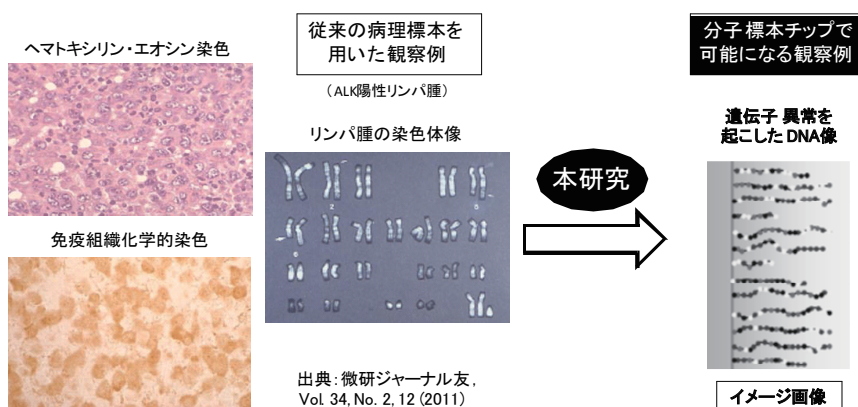


図 1. 従来の標本を用いた観察例と本研究で可能になる観察例の比較

2. 実験方法

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⁽³⁾を検出対象として DNA 分子の標本化と画像検出を実施した。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⁽⁴⁾。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

2014年3月13日 受理

* 豊田理研スカラー (名古屋大学革新ナノバイオデバイス研究センター)

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、及び画像検出を行った。

CpG サイトがメチル化した DNA は、 λ DNA (New England Bio labs) に M. SssI CpG Methylase (Zymo Research) を作用させて調製した。調製の結果は、制限酵素 BstUI (New England Biolabs) による酵素反応とアガロースゲル電気泳動 (Cosmo Bio) によって確認した。DNA メチル化部位の染色は、Methyl Binding Domain Protein-Biotin (MBD) (Life Technologies) を介して Fluoronanogold-Streptavidin Alexa Fluor 546 (FNG) (Nanoprobes) を標識することで行った。標識の結果は、アガロースゲル電気泳動 (Cosmo Bio) によって確認した。DNA の 1 分子伸長デバイスは、DNA 溶液送液用マイクロ流路チップと 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て作製した。二種類のチップ上のマイクロ構造は、まずフォトレジスト (SU-8 3050, SU-8 3005, Micro Chem) を用いて Si 基板 (Ferrotec) 上に作製し、その後、Polydimethylsiloxane (PDMS) (SILPOT 184, Dow Corning) に転写した。DNA の画像検出は、メチル化部位を染色した DNA 溶液 10 μ L を、シリンジポンプ (Kd Scientific) によって 1 分子伸長デバイス中に 1 μ L/min の流速で流した後、ジグザグ形状の溝構造のパターン上に固定された DNA を全反射蛍光顕微鏡 (Olympus) で観察して行った。DNA 分子全体の染色は、YOYO-1 (Life Technologies) で行った。

3. 結果・考察

標本化に使用する DNA 固定用の溝構造に関してジグザグの形状・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、MBD を介した FNG による標識に関して 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。

上記の検討を踏まえて標本化したメチル化 DNA の観察結果を図 3 に示す。ジグザグ構造の頂点に DNA 分子が固定され、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 1 分子の λ DNA に相当することが確認された。また、本標本化デバイスの λ 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。試算では、現在の DNA 溶液送液用のマイクロ流路構造を今後約 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今後約 50 分の 1 まで微細化できる見込みが得られたため、将来的には DNA がさらに高密度に固定された分子標本が作製可能と考えられる。

4. おわりに

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。本成果は国際会議 The 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2013) において上位約 7% にランクされ、口頭発表 (Yasaki H and Onoshima D et al) に選出された。また、本発表に関連した国際会議論文⁽⁵⁾ が採択された。

REFERENCES

- (1) Jackson SP and Bartek J, The DNA-damage response in human biology and disease, *Nature*, 2009, Vol. 461, 1071-1078.
- (2) 森茂郎, 今日の分子病理診断, 微研ジャーナル友, 2011, Vol. 34, No. 2, 10-15.
- (3) Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K, Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients, *Nature Rev. Cancer*, Vol. 11, 426-437.
- (4) 近藤豊, エピジェネティクスから迫るがん診断, 現代化学三月号, 2013, No. 504, 46-50.
- (5) Yasaki H and Onoshima D et al, Microfluidic parallel stretching and stamping of single DNA molecules for super resolution microscope imaging, *Micro Total Analysis Systems*, 2013, 88-90.

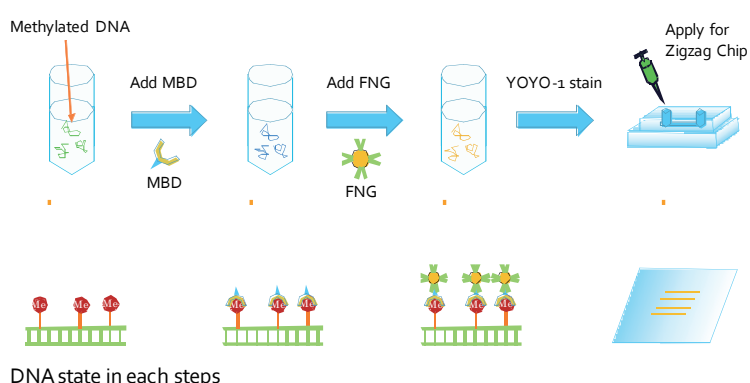


図 2. メチル化 DNA の染色と標本化プロセスの概要

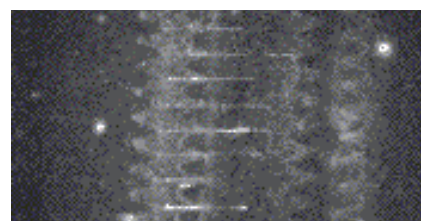


図 3. 標本化されたメチル化 DNA の蛍光像