

マイクロRNA検出紙の開発

東京大学大学院工学系研究科 准教授 森廣 邦彦 *

1. はじめに

悪性新生物（がん）は日本人の死亡原因の第一位であり、特に外科的切除が不可能な進行がんは予後不良の可能性が高い。がんの脅威に対抗するためには有効な治療法とともに、迅速・正確・簡便な診断技術の開発が不可欠である。しかし、既存のがんの診断は組織生検や内視鏡など侵襲的なものが多いため、患者への体力的・精神的負担が大きく技術的にも高い専門性が求められるといった問題点がある。そこで近年、侵襲性の低い疾病診断法としてリキッドバイオプシーが大いに注目を集めている^[1]。リキッドバイオプシーとは、患者の唾液や尿など液性検体に含まれるマーカー分子を検出することで疾病診断を行う技術であり、特にがんの早期発見に貢献すると期待され世界中で研究が進められている。しかし通常、早期がん患者の体液に含まれるマーカー分子は極めて微量であり、それらを高感度にセンシングして何らかのアウトプットを与えるデバイスの開発が強く求められている。

miRNA は短鎖（20-25 塩基長）の一本鎖ノンコーディングRNAであり、細胞死や分化など様々な生命現象に関わっていることが明らかにされつつある。特に、がん細胞や炎症細胞等で特定のmiRNA が異常発現していることが報告されており、病変細胞と正常細胞とを区別するマーカー分子として非常に魅力的である^[2]。しかし、miRNA は他の RNA 分子と比較して短鎖である上に細胞内濃度は最大でも数 nM であり^[3]、加えて RNA 結合タンパク質などの存在により miRNA に対するアクセシビリティはさらに減少していると考えられる。そのため、既存の技術では配列特異的

な miRNA の高感度検出や発現パターンの詳細な解析は非常に困難であった。即ち、がん患者の体液中に存在する miRNA を感度良く配列選択的に検出するためには、何らかの人工的なシステムによってアウトプットシグナルを増幅する必要があると考えられる。

本研究ではがん細胞内で発現している多種の miRNA を同時に検出するため、ターンオン型の DNA 蛍光プローブである ECHO プローブ^[4] (Fig. 1 A) と DNA ナノテクノロジーの 1 種であるハイブリダイゼーション連鎖反応 (HCR)^[5] (Fig. 1 B) を組み合わせた、高感度で拡張性の広いイメージング技術の開発に取り組んだ。

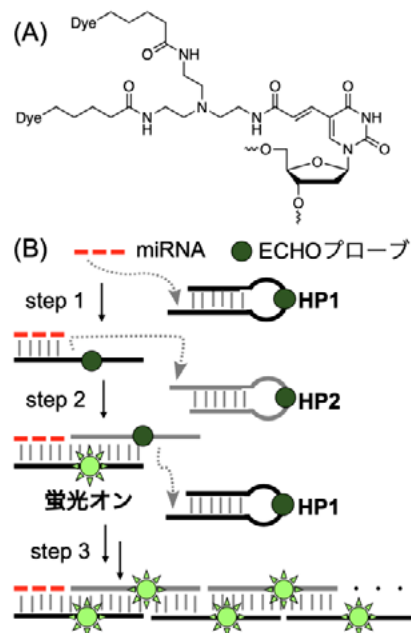


Fig. 1 本研究で開発するマイクロ RNA 検出技術の概要 (A) ECHO プローブの化学構造 (B) ECHO プローブと HCR を組み合わせた miRNA の蛍光検出

ECHO プローブの多色化と HCR のシグナル増幅効果により、複数の微量 miRNA を異なる蛍光

* (助成採択時) 東京大学大学院工学系研究科 助教

色によって同時に観察できると期待される。また、検出の場を紙媒体とすることで、pH 試験紙のような簡便に標的 miRNA の存在をセンシングできるツール開発につながることも期待できる。

2. 結果

2.1. ECHO-HCR プローブの設計と合成

HCR が細胞内 miRNA のイメージングに適用可能か検討するため、多くのがん細胞で過剰発現している miR-21 をトリガーとした HCR に用いるヘアピン型 DNA プローブセットを複数種設計・合成した。配列の設計には核酸高次構造の安定性予測に広く用いられているオンラインソフトウェア NUPACK^[6]を利用した。これらの配列は HCR の進行に最も大きな影響を与える一本鎖領域 (toehold と呼ばれる) の長さを種々変更している。また、ヌクレアーゼに対する抵抗性を高めるため、toehold 部分をホスホロチオエート化 (リン酸ジエステル結合の酸素原子の 1 つを硫黄原子に置換) している。まず、各プローブセットの HCR の進行効率をゲル電気泳動によって評価した (Fig. 2)。図中上部の 2 つの数字のうち、1 つ目の数字は HP1 の toehold の長さを、2 つ目の数字は HP2 の toehold の長さを表している。その結果、HP1 の toehold が 8 塩基長、HP2 の toehold が 6 塩基長の場合に最も選択的な HCR の進行が確認された。すなわち、miRNA を加えていない場合には HCR がほとんど進行せず、触媒量の miR-21 を加えた場合にのみ長鎖化が効率的に起こった。また、標的ではない miRNA を加えた場合は HCR が進行せず、標的である miR-21 に対する選択性が非常に高いことも明らかとなった。本実験の結果から今後の実験では全て、toehold が 8 および 6 塩基長の HP1 および HP2 を用いることとした。

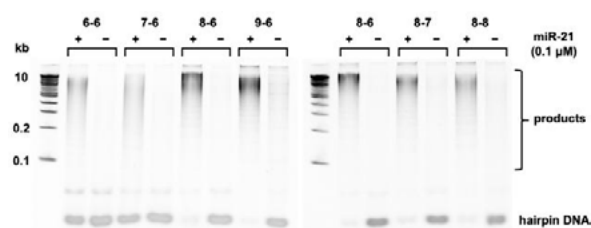


Fig. 2 HP1 および HP2 の toehold 長を様々に変えた際の miR-21 に応答した DNA 長鎖化のゲル電気泳動解析

2.2. 試験管内での miR-21 蛍光検出

続いて、非培養細胞系での miR-21 の蛍光検出を分光蛍光高度計を用いて実施した (Fig. 3)。HP1 と HP2 を同濃度 (各 1000 nM) で混合した緩衝液に対して様々な濃度の miR-21 を加え、一定時間経過後に蛍光スペクトルを測定した。その結果、加えた miR-21 の濃度の増加に伴い、ECHO-HCR プローブからの蛍光発光強度も増加することが明らかとなった。miR-21 濃度と蛍光発光強度には相関があり ($R^2 = 0.9899$)、優れた miRNA 検出システムであることが示された。

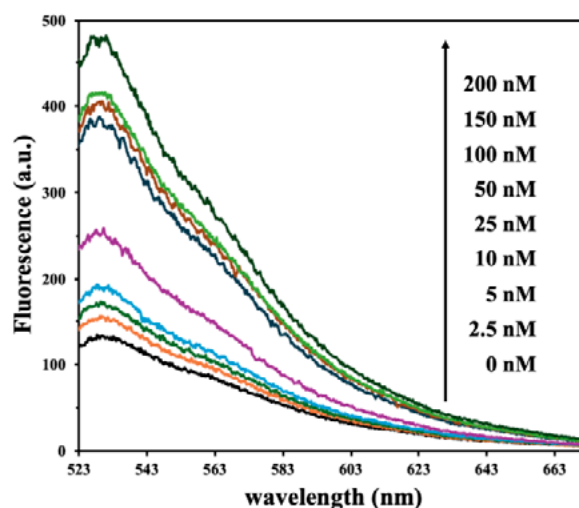


Fig. 3 HP1 および HP2 の混合溶液に miR-21 を加えた場合の蛍光発光強度の変化

2.3. 培養細胞系での miR-21 蛍光イメージング

さらに、生細胞中の miR-21 の蛍光イメージングを共焦点顕微鏡を用いて実施した (Fig. 4)。生

細胞へのプローブの導入法としてまずはリポフェクション法を検討した。まず、miR-21 を過剰発現していることが知られているヒト乳がん細胞 (MCF-7) に **HP1** と **HP2** をリポフェクションした結果、細胞内から ECHO プローブに由来する蛍光発光が観察された。この結果から、miR-21 をトリガーとした HCR が生きた細胞内でも進行することが分かった。一方、miR-21 をほとんど発現していないことがわかっている正常細胞 MCF-10A に同様に **HP1** と **HP2** をトランスフェクションした結果、HeLa 細胞と比較して蛍光発光強度の大幅な低下が見られ、HCR が miR-21 依存的に進行していることが示唆された。本実験から、HCR が細胞内の miR-21 濃度に依存して進行することが分かり、また選択的な miRNA 蛍光イメージングの可能を見出すことができた。

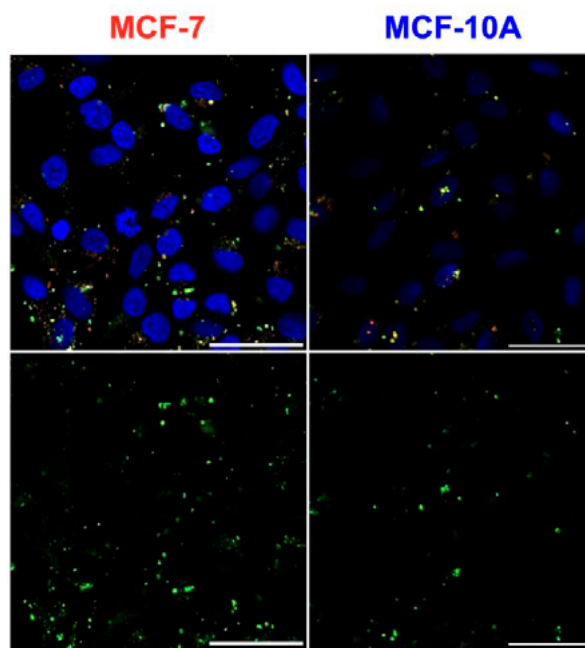


Fig. 4 共焦点顕微鏡による生細胞中の miR-21 の蛍光イメージング

2.4. Theragnostics としての応用

HCR によって生じる長鎖 DNA 二重鎖は細胞内で異物として認識され自然免疫を惹起するこ

とから^[7]、本技術は miR-21 を過剰発現しているがん細胞を選択的に検出かつ細胞死に導く、Theragnostics としての利用も期待される。実際に ECHO-HCR プローブを正常細胞である MCF-10A と HEK-293T およびがん細胞である MCF-7 と HeLa にトランスフェクションして細胞生存率を測定した結果、がん細胞選択的な細胞死が観察された (Fig. 5)。以上の結果から、本プローブが miRNA の検出のみならず、それに応答した細胞死を誘導する Theragnostics としても有用であることが分かった。

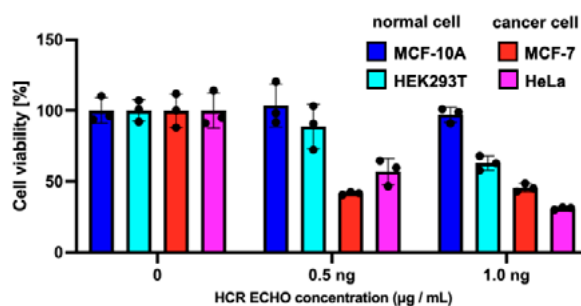


Fig. 5 各種細胞に ECHO-HCR プローブをトランスフェクションした際の細胞生存率

3. おわりに

本研究では、がんの早期発見および診断を目的としたターンオン型 DNA 蛍光プローブの開発に取り組んだ。開発した ECHO-HCR プローブは試験管内のみならず生細胞内でも効率的に標的 miRNA を蛍光検出できることが明らかとなった。また、検出のみならずがん細胞を選択的に細胞死に導く医薬としての機能も実証し、がんの診断と治療を同時に行う Theragnostics としての可能性を示すことができた。今後は蛍光発光の多色化による複数の miRNA の同時検出や、紙媒体による簡便ながん診断デバイスの開発を進めていく予定である。

4. 参考文献

- [1] M. Nikanjam, S. Kato, R. Kurzrock; Liquid

- biopsy: current technology and clinical applications, *J. Hematol. Oncol.*, **15**, (2022), 131.
- [2] G. A. Calin, C. M. Croce; MicroRNA signatures in human cancers, *Nat. Rev. Cancer*, **6**, (2006), 857.
- [3] S. Cermelli, A. Ruggieri, J. A. Marrero, G. N. Ioannou, L. Beretta; Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease, *PLoS One*, **6**, (2011), e23937.
- [4] A. Okamoto; ECHO probes: a concept of fluorescence control for practical nucleic acid sensing, *Chem. Soc. Rev.* **40**, (2011), 5815.
- [5] R. M. Dirks, N. A. Pierce; Triggered amplification by hybridization chain reaction, *PNAS*, **101**, (2004), 15275.
- [6] <https://www.nupack.org/>
- [7] K. Morihiro, H. Osumi, S. Morita, T. Hattori, M. Baba, N. Harada, R. Ohashi, A. Okamoto; Oncolytic hairpin DNA pair: Selective cytotoxic inducer through microRNA-triggered DNA self-assembly, *J. Am. Chem.*

Soc., **145**, (2023), 135.

5. その他成果発表等

- ・ 徐云嵩, 森廣邦彦, 岡本晃充, Simultaneous detection of multiple miRNAs in living cells, 日本化学会第 104 春季年会, 日本大学, 2024 年 3 月 18 日.
- ・ 徐云嵩, 森廣邦彦, 岡本晃充, Simultaneous detection of multiple miRNAs in cells through self-assembling on-off fluorescent DNA probes, XXV International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 東京理科大学, 2024 年 9 月 4 日.

6. 謝辞

本研究は島津科学技術振興財団の助成金によるご支援のもと遂行したものであり、財団のご関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。また、東京大学大学院工学系研究科 岡本晃充教授に終始有益など指導をいただきました。この場を借りて感謝申し上げます。さらに、共同研究者として日夜実験に取り組んでくれた徐云嵩さんに深謝いたします。