

超高感度 DNA チップの開発

東レ株式会社 先端融合研究所
ナノバイオグループ

要旨

多数の遺伝子情報を一斉に解析できる DNA チップは、基礎研究用を中心に現在数百億円市場を形成しており、さらに今後テーラーメイド医療や創薬開発のキーツールとして、急激な市場の拡大が期待されている。そのため、多くの研究機関やメーカーで種々の DNA チップが開発され、製品化されている。しかし、感度が十分でないため、患者に負担が少ない低侵襲な微量検体による解析や、極僅かな遺伝子の存在に関する精度の高い解析が難しいという課題があった。この解決手段として、DNA チップ基板をこれまでの平板から凹凸形状にする画期的なアイデアと、解析のための反応を強制的に促進させる技術を開発し、従来の DNA チップに比べ最高で 100 倍の高感度化が達成できる技術を確立した。

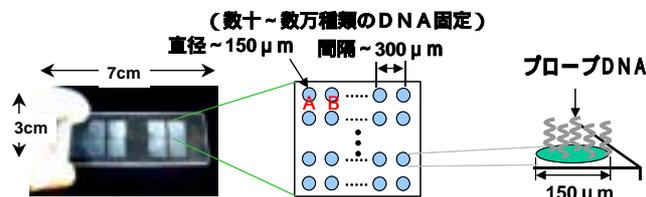
1. はじめに

人ゲノム解読がほぼ終了し、個々の遺伝子情報を基にしたテーラーメイド医療が現実のものとなろうとしている。テーラーメイド医療では患者から微量の検体を採取して速やかに遺伝子情報を得ることにより、検査や診断およびこれらに基づく治療が行われることになる。このような、遺伝子情報を微量の検体でハイスループットに検出できる代表的なツールとして近年注目されているのが DNA チップである。

DNA チップとは多数の検査用 DNA (プローブ DNA) を固体基板に固定化し、調べたい DNA (ターゲット DNA) と反応させて、その反応量からどのような遺伝子が検体中に含まれているかを調べることができるツールである。これまで多種多様な DNA チップが開発され、製品化されている。これらの多くは主に基礎研究用として使用され、ゲノム関連の基礎研究の発展に

大いに寄与している¹⁻⁴⁾。図1に DNA チップの一般的な構造と使用方法を示す。患者等から採取した検体から遺伝子を抽出し、蛍光色素で標識した後、DNA チップと反応(ハイブリ

DNAチップの構造



DNAチップの使用方法

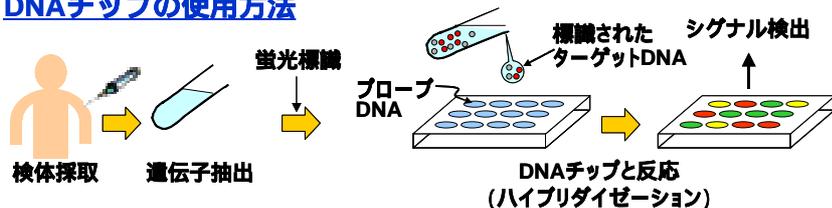


図1 一般的な DNA チップの構造および使用方法

ハイブリダイゼーション)させ、反応後のシグナル強度を調べることにより、どのような遺伝子がどの程度発現しているかを調べることができる。すなわち、DNAチップを用いた発現遺伝子の解析では、疾患時の発現遺伝子の変動を解析することにより、その疾患を遺伝子レベルで検査・診断することが可能となる。

しかし、既存のDNAチップでは、検査・診断への応用を考慮すると検出感度が十分とは言えない。例えば、耳搔き1杯程度の生検(針などを刺して組織を採取すること)で悪性腫瘍などの疾患部位の細胞を検体として用いる場合、0.1~1 μ g程度の極微量の発現遺伝子しか得られないため、1 μ g以上の発現遺伝子を必要とする従来のDNAチップの感度では検出が困難である。この課題を克服する手段として、極微量の発現遺伝子を増幅して検体量を増やす方法が挙げられるが、増幅により発現パターンが変化し、正確な診断ができない可能性がある。

筆者らは、チップ形状の検討、ターゲットDNAとの反応性向上、の2つを開発課題として掲げ、感度が従来のDNAチップと比較して10倍以上優れた性能を持つ、高感度DNAチップの開発に取り組み、最高で100倍の超高感度化に成功した^{5~8)}。このことは、例えば腫瘍の検査等において、手術をして疾患部位を採取しなくても胃カメラのような内視鏡技術で微量の検体を採取するだけで検査できる可能性を示唆するものであり、患者QOL(Quality of Life)の改善、医療費削減の観点から大幅な用途拡大につながると考えられる。

2. 超高感度DNAチップ開発の背景

従来、DNAチップの基板としてはガラス平板を用いるのが一般的であり、その基板の上にプローブDNAをスポットしている。ガラスのような平面基板を用いた場合、基板とプローブDNA溶液とのぬれ性からスポット形状が安定しなかったり、中心が抜けたような形状(ドーナツ化)になってしまったりする場合がある。これらの現象は、検出シグナルのバラツキ原因の一つとなっている。また、スポット以外の領域にターゲットDNAの非特異的吸着が起こるとノイズとなり、検出の精度を低下させる原因となる。超高感度DNAチップ開発のためには、感度を向上させるだけでなく、ノイズを低減させて検出精度を向上させることも重要な課題であり、スポット形状を安定化すること、基板表面への非特異的な吸着を抑制させることが高精度化へのポイントになると考え、開発に取り組んだ。

また、DNAチップに調べたいターゲットDNAを反応(ハイブリダイゼーション)させる際、この反応効率、反応に要する時間にも留意しなければならない。通常、ハイブリダイゼーションにおけるターゲットDNAの拡散が遅いため、この反応には12~18時間を要し、反応後においても必ずしも十分反応が進んでいるとは限らない。そこで、この反応を何等かの手段で促進することが、高感度化のポイントとなり、同時に反応時間の短縮にも効果が期待される。

3. 開発の経緯

3・1 チップ形状の検討

スポット形状安定性のため、一般的にはより平坦な基板を開発する方向が主流である。しかし筆者らは平面基板ではなく、検出部に凹凸構造を持たせた革新的な柱状構造チップを考案した。その柱の上部にプローブ DNA を固定化することにより、

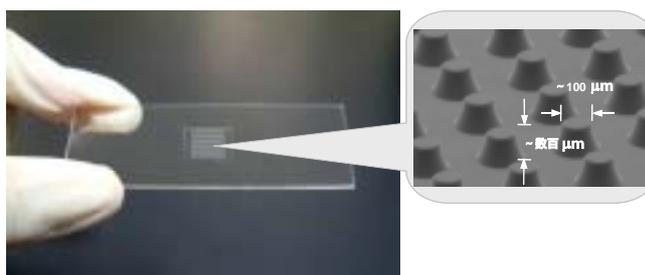


図2 柱状構造を持つ DNA チップ

スポット後の形状安定化が期待される。柱状構造チップの基材として、安価かつ加工が容易な合成樹脂を用いた。図2に樹脂基板を用いて作製した柱状構造チップの写真を示す。チップの中心部に直径、高さともに数十から数百マイクロンの凹凸構造が



従来のガラス製平板チップ

柱状構造チップ

図3 従来型および柱状構造を持つ DNA チップの反応後のスポット比較

図3に様々な種類のプローブ DNA を凹凸構造の上部にスポットし、ターゲット DNA と反応させた後のスポット形状の検出イメージを示す。このイメージから、安定したスポット形状でシグナルが観察され、柱の上部全体に DNA が固定されていることがわかる。一方、ガラス平面基板にスポットした場合、スポット形状にバラツキが観察され、いくつかのスポットではドーナツ化も観察された。また、合成樹脂

からなる凹凸構造を持つチップでは、表面加工・修飾の自由度が高く、今回の柱状構造チップにおいてもナノレベルの設計を行うことにより DNA との相互作用を制御する技術を開発できたことも含め、市販の従来型 DNA チップ (ガラス平板) の場合と比較して、スポットおよびスポット周辺のノイズが 1 桁近く減少できることが観察された。このように柱状構造チップを用いることにより、スポットの形状が安定化されるばかりでなく、ノイズも低減できることが確認されたことから、精度の高い検出が可能になると期待される。

3・2 ターゲット DNA との反応性向上

一般的な DNA チップでは反応時にターゲット DNA を含む溶液中の DNA の拡散が遅く ($\sim 200 \mu\text{m} / \text{時間}^9$)、希薄な溶液を用いた場合、十分な反応が期待できない。このことは、微量な検体や極微量しか発現しない遺伝子では十分な反応ができないことを意味する。そこで、反応時にターゲット DNA を強制的に攪拌するコンセプトで検討を進めた。柱状構造の柱間を移動するような、適度な攪拌手段を用いることにより、上部のプローブ DNA 固定化面に効果的に攪拌効果をもたらし、また、プローブ DNA 固定化面に障害を与えることなく反応溶液を攪拌することが可能となる。その結果、ターゲット DNA の拡散が格段に向上して反応促進が可能となり、高感度化が期待できる。

3・3 柱状構造 DNA チップの性能評価

上記2つの改良により作製した DNA チップの性能を評価した。図4にターゲット DNA の濃度を变化させたときのシグナル/ノイズ比 (S/N 比) の推移と 1.0 および 0.01 μg 相当

のターゲット DNA を用いたときの検出イメージを示す。従来の平板ガラス製 DNA チップと比較して、顕著なシグナルの上昇およびノイズを低減が観察された。特に検出限界において、ガラス製平面基板では 0.01 μg 相当以下ではシグナル検出が困難であるにもかかわらず、今回開発した柱状構造の高性能 DNA チップでは、市販の DNA チップと比較して、従来の約 1/100 のターゲット DNA 量でも十分にシグナルが検出できることが確認された。

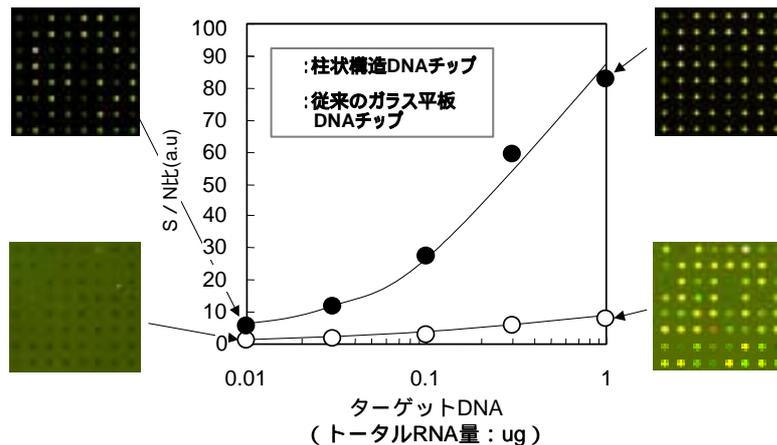


図4 従来のガラス平板 DNA チップおよび柱状構造を持つ DNA チップの感度曲線比較

今回開発した柱状構造の高性能 DNA チップでは、市販の DNA チップと比較して、従来の約 1/100 のターゲット DNA 量でも十分にシグナルが検出できることが確認された。

次に細胞数と検出感度の検討を行った。細胞数は血球計算盤を用いてカウントし、所望の数だけ取り出して遺伝子を抽出した。従来のガラス製 DNA チップでは細胞 100,000 個あたりからいくつかのスポット

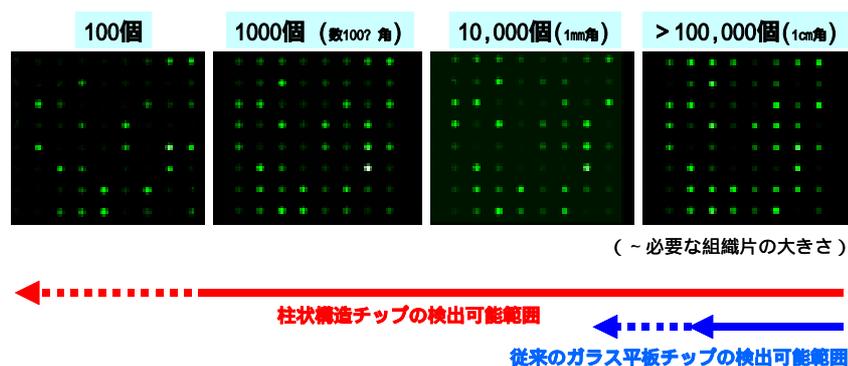


図5 柱状構造を持つ DNA チップの検出に必要な細胞数の検討

トのシグナルが不明瞭となり、細胞 10,000 個の場合シグナルは著しい低下を示し始めた。一方、柱状構造 DNA チップでは、図 5 に示すように細胞数 1,000 個でも明瞭なシグナルが検出され、100 個でも多くのシグナルが観察された。これらの結果から、目標である耳搔き 1 杯程の検体から得られる遺伝子量 (~0.1ug) でも十分に検出できることが確認された。また、この結果に基づき、再現性や低発現遺伝子の検出における定量性も従来のチップに比べ飛躍的に優れた DNA チップが開発に成功した。

4 . 将来の展望

現在、DNA チップの用途は多数のプロープ DNA (1,000 ~ 30,000 遺伝子) を搭載した網羅的解析用が主流である。今後、この網羅的解析用 DNA チップで疾患に関連した遺伝子を絞り込み、絞り込まれた遺伝子を搭載した検査・診断チップが市場に登場するのも時間の問題である。冒頭にも述べたように、検査・診断用の実現には感度・精度の大幅な改善が必要不可欠である。筆者らが開発した“超高感度 DNA チップ”はこれまで測定できなかった、極微量の遺伝子量での検出を可能とし、テーラーメイド医療やゲノム創薬を目指した

取り組みの急速な発展をサポートできるものと期待され、疾患に関係した遺伝子を絞り込む研究にさらに拍車が駆けられるであろう。また、遺伝子をターゲットにした検査・診断用 DNA チップは、すでに一部で承認が得られはじめており、今後、疾患の検査・診断や治療に関し遺伝子レベルでの情報解析がますます進展するであろうことは言うまでもない。

今回、超高感度の DNA チップが開発できたことにより、図 6 に示すとおり極微量検体での検査・診断が大いに期待される。生検による測定の可能性が得られたことから、患者への負担を軽減できるとともに、検体を増幅しなくても検出できることから解析工程の簡略と定量性確保が期待でき、ゲノム関連研究を大幅に加速するとともに、総合的にテーラーメイド医療の実現に大きく貢献するものと考えられる。この様に柱状構造 DNA チップをベースに様々な用途の開拓が期待され、DNA チップ市場の拡大に大きく貢献するものと考えられる。

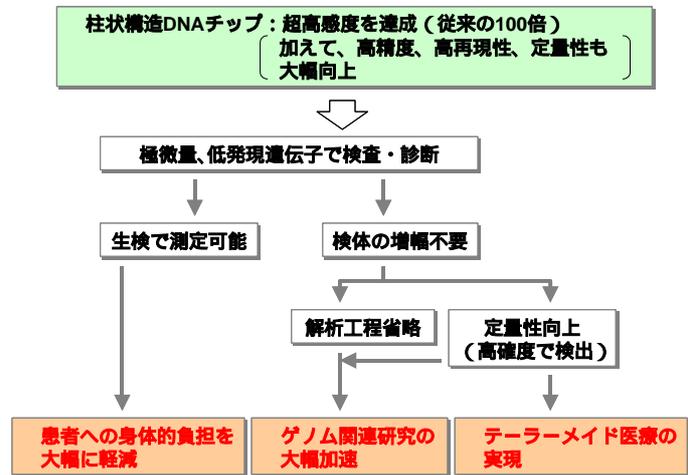


図 6 柱状構造を持つ DNA チップの特長と波及効果

5. まとめ

以上のように、通常の発想（平板）とは逆の斬新な形状（凹凸）と新規な反応促進技術を開発することにより、超高感度化技術を開発することに成功した。今後、この DNA チップ技術に様々な遺伝子情報を搭載し、本チップの特長を生かした領域で実用化に向けたさらなる実績を積み、医薬医療用等、世の中に貢献できるバイオツールの開発が期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導賜りました京都大学大学院薬学研究科ゲノム創薬科学分野 辻本豪三教授に感謝いたします。

なお、本開発の一部は N E D O（新エネルギー・産業技術総合開発機構）の「バイオ・IT 融合機器開発プロジェクト」の助成を受けて取り組んでいるものです。

6. 参考文献

- 1) S.P.A. Fordor, J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, D. Solas, Science 251 (1991) 767.
- 2) J.L. DeRisi, V.R. Iyer, P.O. Brown, Science 278 (1997) 680.
- 3) U. Landegren, M. Nilsson, P.Y. Kwok, Genome Res. 8 (1998) 769.

- 4) A.J. Thiel, A.G. Frutos, C.E. Jordan, R.M. Corn, L.M. Smith, Anal. Chem. 69 (1997) 4948.
 - 5) 2004年9月17日付 日本経済新聞朝刊.
 - 6) 2004年9月24日付 日本経済新聞朝刊.
 - 7) BOSS 2004年11月22日号.
 - 8) Biochemical and Biophysical Research Communications in preparation
 - 9) Joan C. Politz, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 1998, 6043-6048.
- 他 関連特許 52 件出願中