

## 《シリーズ 診断》

# ナノポアを用いたマイクロ RNA の 迅速診断技術と応用展開

保 皓大 東京農工大学 工学部 生命工学科

平谷 萌恵 東京農工大学 工学府 生命工学専攻

川野 竜司 東京農工大学 工学研究院 生命機能科学工学部門 准教授

## 1 はじめに

マイクロ RNA (miRNA) は 20 塩基程度の短いノンコーディング RNA の一種であり、細胞の成長やアポトーシス、シグナル伝達などの制御を担っている<sup>1)</sup>。また癌細胞中のマイクロ RNA は癌の種類に応じ、特異的に異常な発現を示す<sup>2,3)</sup>。異常な発現は複数種類の miRNA で発生し、発現量が上昇するものもあれば減少するものもある。さらに miRNA の異常な発現は未成熟な癌細胞でも見られ、血液や尿などの体液中の miRNA 組成に反映する。体液を用いた検出は簡便かつ非侵襲で行うことができることから、癌の早期診断マーカーとして注目されている<sup>4,7)</sup>。

miRNA の検出には、マイクロアレイ法<sup>8)</sup> や定量的逆転写 PCR 法<sup>9)</sup> が主に用いられているが、迅速診断としての使用を考えた場合課題も多い。マイクロアレイ法は低濃度の miRNA に対しては感度が低いため miRNA の精製を追加で行わなければならないことや<sup>10)</sup>、プローブとなる核酸分子を標的 miRNA の種類分用意しなくてはならないという課題がある。定量的逆転写 PCR 法も、逆転写反応や PCR を行うため操作が煩雑であり検出に数時間程度かかる。迅速診断のためには新しい検出方法の開発が必要となってくる。本稿では、ナノポアと呼ばれるチャンネル膜タンパク質が有するナノスケールの孔を用いたセンシング技術<sup>11,12)</sup> を中心に、筆者らが最近取り組んでいる DNA コンピューティング技術<sup>13,14)</sup> とナノ

ポア計測を組み合わせた miRNA 迅速計測に関する幾つかの研究について紹介する。

## 2 ナノポアを用いた電気的核酸検出法

細胞膜表面には、細胞の内外の物質のやりとりを制御するチャンネルを持った膜タンパク質が多数存在する。膜タンパク質の中でもチャンネル型の膜タンパク質はイオン透過を担うイオンチャンネルや分子を輸送する膜輸送体、それ以外にも膜中にポアを形成し細胞死を誘導する毒素タンパクも存在する。これまで構造生物学や電気生理学といった分野において、チャンネル膜タンパク質の電気生理学的な性質やその構造を明らかにするために様々な研究が行われてきた。特にチャンネルの上下に電圧を印加し、チャンネルを流れる電流を観測するパッチクランプ法はチャンネル膜タンパク質一分子レベルでの信号が得られることから強力な研究ツールとなっている。またパッチクランプ法を応用し、平面状に作製した脂質二分子膜内に膜タンパク質を再構成し、チャンネル電流を計測する *in vitro* での計測系が知られている。ナノポア計測では、1 ~ 2 nm のポアを膜中に形成するチャンネル型膜タンパク質を平面脂質膜中に再構成し、パッチクランプ法での測定原理を利用しナノポア内を通過する一分子を電気的に検出する方法である。この方法では一分子を高速にかつ電気的に検出でき、主に用いられるナノポアのサイズと核酸分子のサイズが近いことから、ナノポアシーケン

スや核酸の一分子検出に応用されている。とくにシーケンスに関しては、2016年 Oxford nanopore 社が小型のナノポアシーケンサを \$1000 という価格で販売を開始し市場を驚かせた。また最近では miRNA や短鎖の DNA の迅速検出に向けて研究が進んでいる。次からは最近筆者らが取り組んでいるナノポア計測と情報科学を融合した一分子検出法、特に癌の超早期診断マーカーとして最近注目されている miRNA の検出に関して紹介する。

### 3 DNA コンピューティングによる自律的癌診断・薬剤放出システムの構築

DNA コンピューティングは元々 DNA を用いた並列計算を目的に研究されていた<sup>13,14)</sup>。しかし最近のシリコン型コンピュータのマシンパワーの向上から、並列の計算を行うよりも DNA が生体分子であることを利用した *in vivo* での診断・治療に応用する研究が行われている<sup>15)</sup>。DNA を用いた演算では、核酸分子を論理演算の入力および出力に対応させることで、特定の核酸分子の有無を二進数で表現することができ、核酸分子の反応結果として得られた出力を次の反応に用いることができる。この方法を用いれば、特定の組み合わせの miRNA が存在するときのみ蛍光を出力するシステム<sup>16)</sup> や、特定の mRNA の転写量が増加したときに治療効果のある薬剤を出力するシステム<sup>17)</sup> を構築することができる。しかし、従来の DNA コンピューティングの手法では、計算結果として出力される分子を確認するために、PCR での増幅、ゲル電気泳動をした後に蛍光により確認するなど多段階のステップを要し、結果を得るまでに長い時間がかかることが課題であった。また miRNA はがん細胞から複数種類の RNA が同時に発現増加、減少するようなパターンでの変化が起こることが知られ、このパターンをすべて調べる必要がある。

そこで筆者らは、DNA コンピューティング技術とナノポア計測を組み合わせることにより迅速に miRNA の発現パターンを診断し、また直接 DNA アンチセンス薬剤により治療する系の構築に取り組んでいる。具体的には、小細胞肺がんになると発現増加する 2 種の miRNA が同時に存在した時だけ出力分子を生成 (AND ゲート) し、ナノポア計測により検出可能なパターン

認識を行うシステム、さらに小細胞肺癌から分泌される miRNA-20a<sup>18)</sup> が存在すると認識し、小細胞肺がんの腫瘍抑制を行うアンチセンス核酸医薬のその場で自律的に放出する系の構築に成功している<sup>19)</sup>。今後これらのシステムは、point-of-care testing のような簡易癌診断への応用や、病気の診断と治療を同時に行う theranostics への展開を行う。

### 4 ナノポアセンシングと周波数解析による複数種類 miRNA の同時検出

1 種類の癌に対して異常に発現する miRNA は、複雑な組み合わせを持つ<sup>2,3)</sup>。そのため、体液中から miRNA を検出して癌を特異的に診断するためには、発現量が異常な複数種類の miRNA を組み合わせで認識する必要がある。しかしながら、すべての miRNA の塩基配列は短く、似たような長さであるため、ナノポアセンシングで複数種類の miRNA の同時検出を試みると、通過した分子の種類によらず非常によく似た通過信号が得られる<sup>20)</sup>。そのため、通過信号から分子の種類を識別することが困難であった。前項では DNA コンピューティングを用いた方法について紹介したが、本稿では通過信号に周波数解析を適用し、ナノポア計測からダイレクトに miRNA 種類を同定する取り組みについて紹介する。

周波数解析は信号処理手法の一種であり、近年のパーソナルコンピューターの発達により様々な分野の研究で用いられるようになった<sup>21)</sup>。詳しい原理などは専門書を参考にさせていただきたいが<sup>22,23)</sup>、周波数解析を用いることで時間あたりのデータを周波数あたりのデータへと変換することができる。生物学的な分野の研究でも、ウシの呼吸からケトン症を診断する研究<sup>24)</sup> や、動物に搭載したデバイスから動物の行動を解析する研究<sup>25)</sup> などで周波数解析が用いられている。筆者らの研究では、膀胱癌の診断マーカーとして尿中に放出される miRNA-126 と miRNA-182<sup>26)</sup> をナノポアセンシングにより同時に検出し、信号を識別することを目的とし、これらの通過信号に対して周波数解析を適応した。その結果どちらの miRNA にも固有の周波数成分が現れることが明らかになりつつある。周波数解析とナノポアセンシングの組み合わせにより複数種類の miRNA が同時に検

出可能になれば、体液中の miRNA を網羅的に検出できる癌の簡易診断デバイスの構築が可能になる。

## 5 おわりに

本稿では、miRNA の迅速診断のための新しい技術、ナノポア計測、に関して筆者らの最近の取り組みを中心に紹介してきた。miRNA は癌の診断マーカーだけではなく、最近では老化や体内の様々な変化を反映するマーカーとしての可能性が指摘されている。今後ナノポア計測をはじめ、この miRNA を迅速にかつ安価に検出する技術は幅広い応用展開が見込まれる。

### 参考文献

- 1) H. Dong, J. Lei, L. Ding, Y. Wen, H. Ju, X. Zhang, MicroRNA : Function, Detection, and Bioanalysis. *Chem. Rev.* 113 : 6207-6233, 2013
- 2) R. Garzon, G. A. Calin, C. M. Croce, MicroRNAs in Cancer. *Annu. Rev. Med.* 60 : 167-179, 2009
- 3) G. A. Calin, C. M. Croce, MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Rev.* 6 : 857-866, 2006
- 4) D. Zheng, S. Haddadin, Y. Wang, L. Q. Gu, M. C. Perry, C. E. Freter, M. X. Wang, Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol* 4 : 575-586, 2011
- 5) P. S. Mitchell, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 : 10513-10518, 2008
- 6) A. Gallo, M. Tandon, I. Alevizos, G. G. Illei, The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes. *Plos One* 7 : 1-5, 2012
- 7) G. Rabinwits, C. Gercel-Tayler, J. M. Day, D. D. Taylor, G. H. Kloecker, Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin. Lung Cancer* 10 : 42-46, 2009
- 8) J. M. Thomson, J. Parker, C. M. Perou, S. M. Hammond, A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat. Methods* 1 : 47-53, 2004
- 9) C. K. Raymond, B. S. Roberts, P. Garrett-Engele, L. P. Lim, J. M. Johnson, Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *RNA* 11 : 1737-1744, 2005
- 10) S. Dangwal, C. Bang, T. Thum, Novel techniques and targets in cardiovascular microRNA research. *Cardiovasc. Res.* 93 : 545-554, 2012
- 11) L. Q. Gu, O. Braha, S. Conlan, S. Cheley, H. Bayley, Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature* 398 : 686-690, 1999
- 12) J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton, D. W. Deamer, Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 : 13770-13773, 1996
- 13) Y. Benenson, T. Paz-Elizur, R. Adar, E. Keinan, Z. Livneh, E. Shapiro, Programmable and autonomous computing machine made of biomolecules. *Nature* 414 : 430-414, 2001
- 14) M. Hagiya, M. Arita, D. Kiga, K. Sakamoto, S. Yokoyama, Towards parallel evaluation and learning of boolean  $\mu$ -formulas with molecules. *DIMACS series in Discrete Mathematics and Theoretical Computer Science* 48 : 57-72, 1999
- 15) C. Jung, A. D. Ellington, Diagnostic Applications of Nucleic Acid Circuits. *Acc. Chem. Res.* 47 : 1825-1835, 2014
- 16) J. Hemphil, A. Deiters, DNA Computation in Mammalian Cells : MicroRNA Logic Operations. *J. Am. Chem. Soc.* 135 : 10512-10518, 2013
- 17) Y. Benenson, B. Gil, U. Ben-Dor, R. Adar, E. Shapiro, An autonomous molecular computer for logical control of gene expression. *Nature* 429 : 423-429, 2004
- 18) H. Ebi, T. Sato, N. Sugito, Y. Hosono, Y. Yatabe, Y. Matsuyama, T. Yamaguchi, H. Osada, M. Suzuki, T. Takahashi, Counterbalance between RB inactivation and miR-17-92 overexpression in reactive oxygen species and DNA damage induction in lung cancers. *Oncogene* 28 : 3371-3379, 2009
- 19) M. Hiratani, M. Ohara, R. Kawano, Amplification and quantification of an antisense oligonucleotide from target microRNA using programmable DNA and a biological nanopore. *Anal. Chem.*, accepted, 2017
- 20) Y. Wang, DL. Zheng, QL. Tan, M. X. Wang, L. Q. Gu, Nanopore-based detection of circulating microRNAs in lung cancer patients. *Nature Nanotechnology* 6 : 668-674, 2011

- 21) B.P. Marchant, Time-frequency Analysis for Biosystems Engineering. *Biosystems Engineering* 85 : 261-281, 2003
- 22) R. N. Bracewell, "The Fourier Transform and its Applications." McGraw Hill, 1999, 3rd ed., 640
- 23) J. W. Cooley, J. W. Tukey, An Algorithm for the Machine Calculation of Complex Fourier Series. *Math. of Comput.* 19 : 297-301, 1965
- 24) R. J. Elliott-Martin, T. T. Mottram, J. W. Gardner, P. J. Hobbs, P. N. Bartlett, Preliminary investigation of breath sampling as a monitor of health in dairy cattle. *J. Agric. Eng. Res.* 67 : 267-275, 1997
- 25) W. J. Eradus, M. B. Jansen, Animal identification and monitoring. *Comput. Electron. Agric.* 24 : 91 - 98, 1999
- 26) M. Hanke, et al., A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker : microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol. Oncol.* 28 : 655-661, 2010