

高感度DNAチップ *3D-Gene*[®]による 血中miRNAの網羅的測定

滝澤聡子

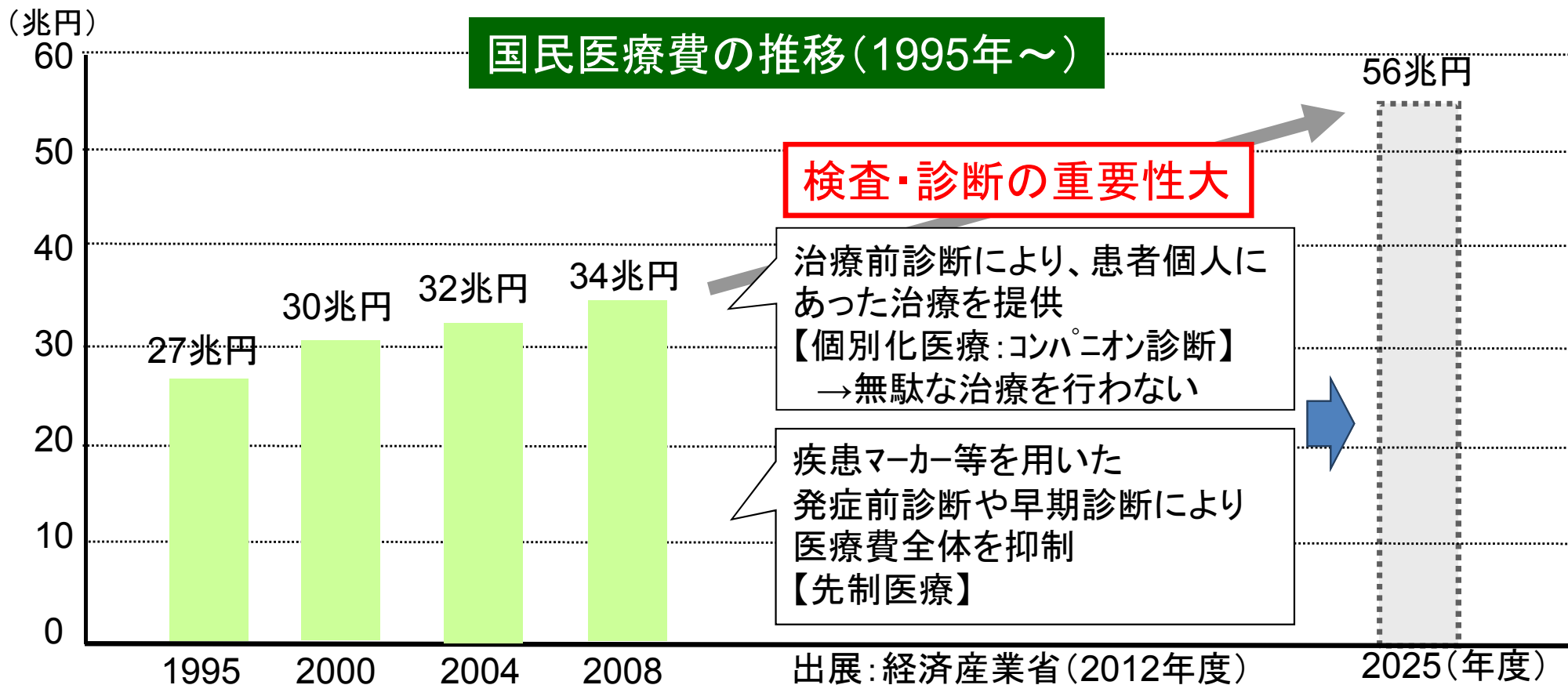
東レ株式会社・新事業開発部門DNAチップグループ GL

少子高齢化社会の到来：高騰する医療費

少子高齢化が急速に進展。2025年に国民医療費は56兆円（現在の1.5倍）



医療の質を落とさずに拡大する医療費を抑制するためには、
画期的治療法開発と革新的検査・診断技術が不可欠

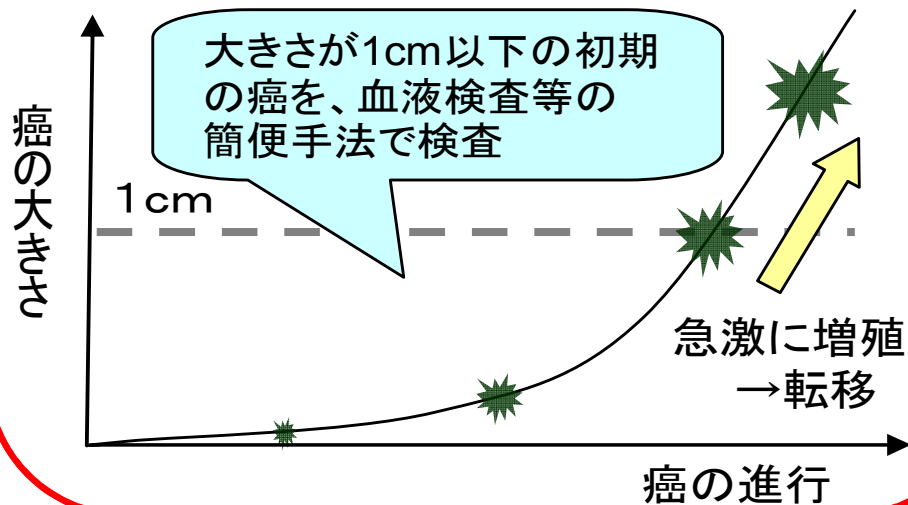


先制医療とコンパニオン診断



先制医療

発症前診断を行い、治療的介入を実施して発症を予防、早期に治療



コンパニオン診断

患者固有の特徴を踏まえて最適な治療を行うための事前診断

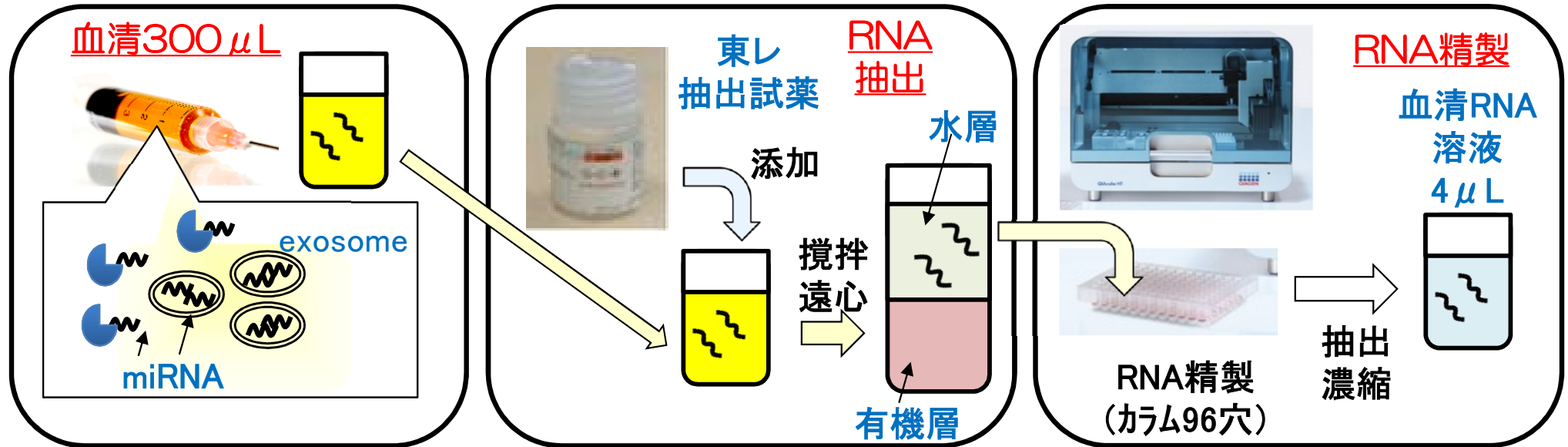
＜コンパニオン診断の例＞

- ・患者による効果/副作用の違いを判定し、薬が有効な患者にのみ投与
- ・感染症などの原因となるウイルスの型を判定し投薬・治療の要否判断

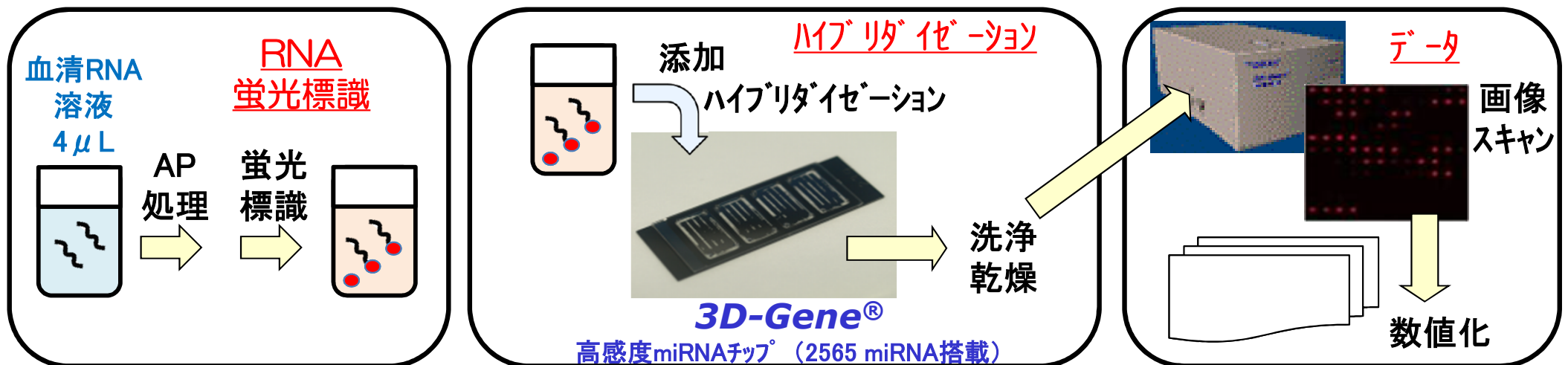
検査・診断のためのバイオマーカー開発及び
検査・診断システムの開発に注目が集まる

miRNAのDNAチップによる解析のステップ

1. 血清からのRNA抽出

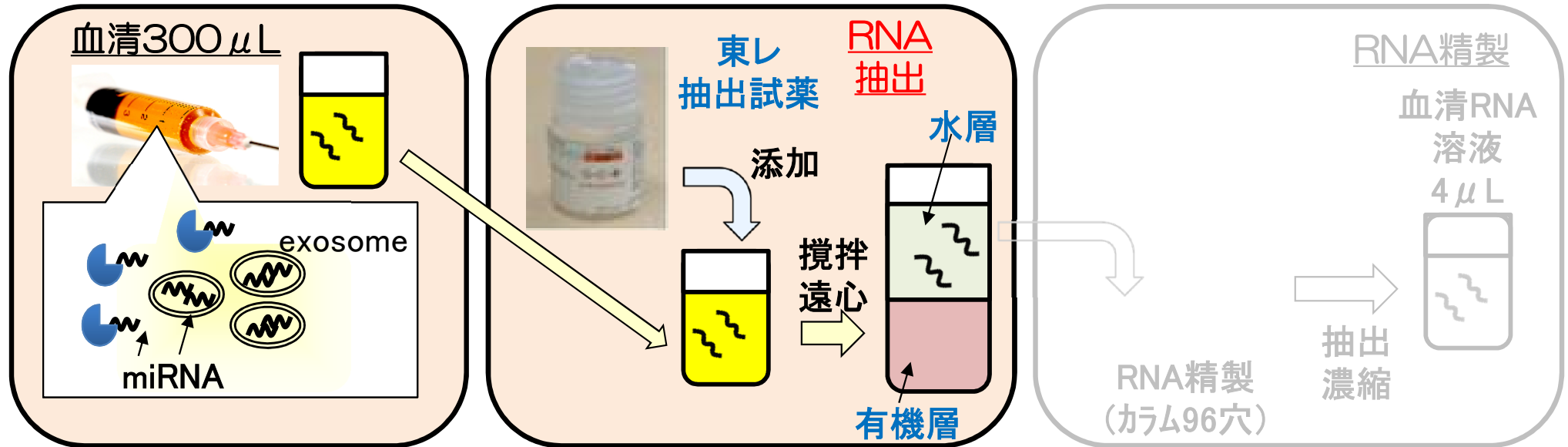


2. DNAチップによるmiRNAの網羅的検出

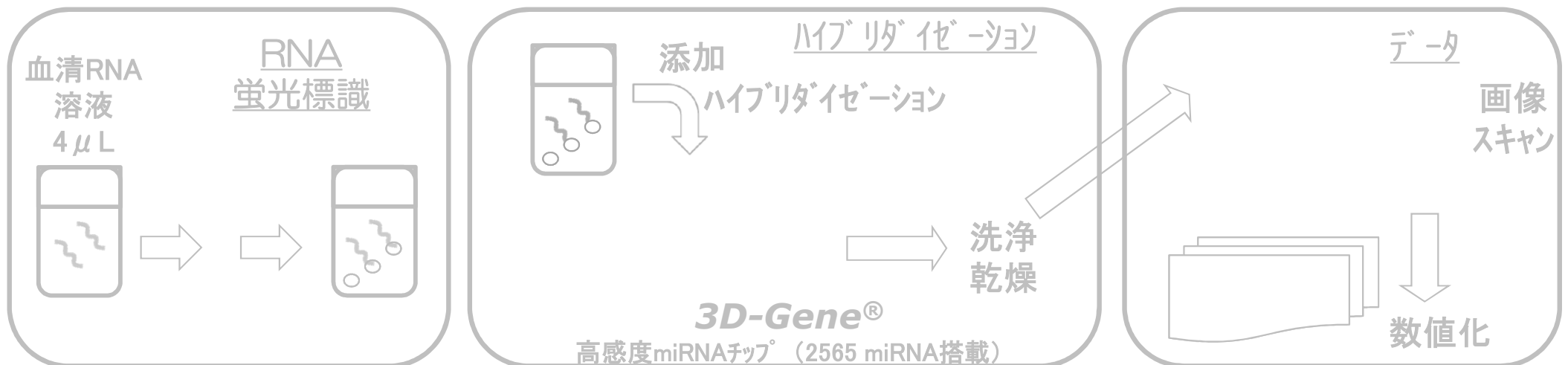


miRNAのDNAチップによる解析のステップ

1. 血清からのRNA抽出



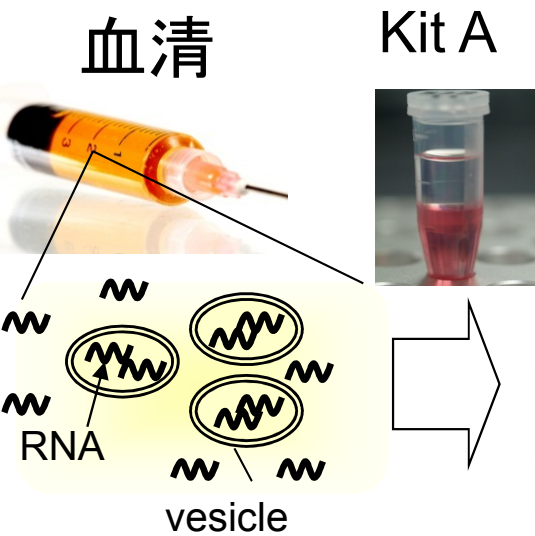
2. DNAチップによるmiRNAの網羅的検出



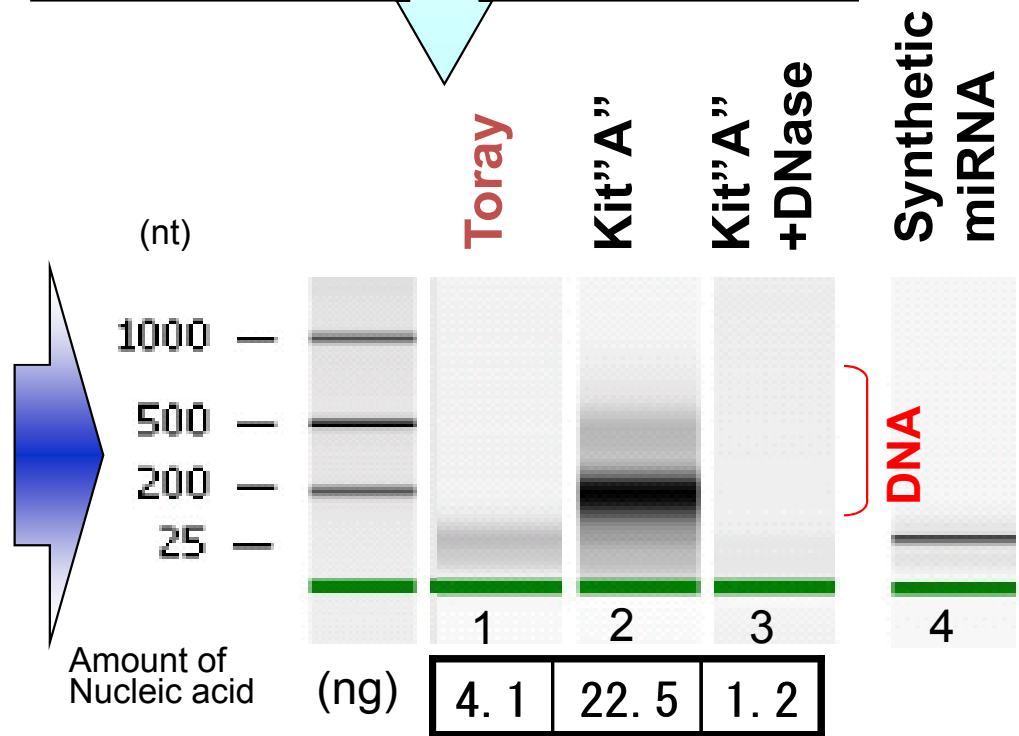
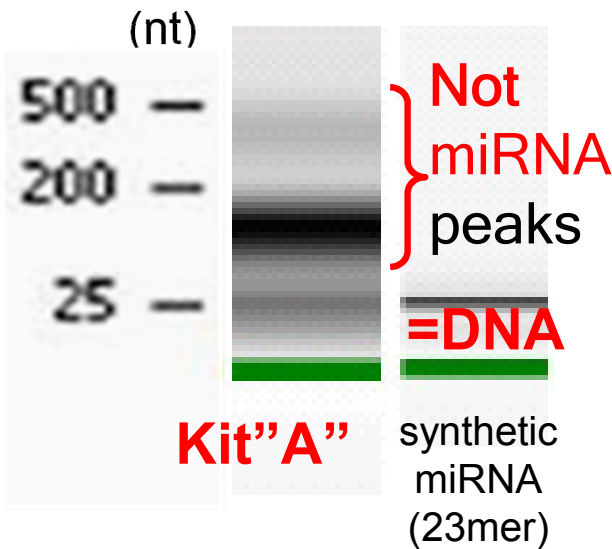
血清中RNAを抽出する際の問題

DNA がコンタミするケースがある
= 検出法によっては問題となる

新規抽出試薬を開発
(東レ/ NCC, 2011)
3D-Gene[®] RNA extraction
reagent from liquid sample



電気泳動の結果
(KitAで抽出)



高純度・高効率な抽出試薬の開発を実施し、安定的な検出を可能にした

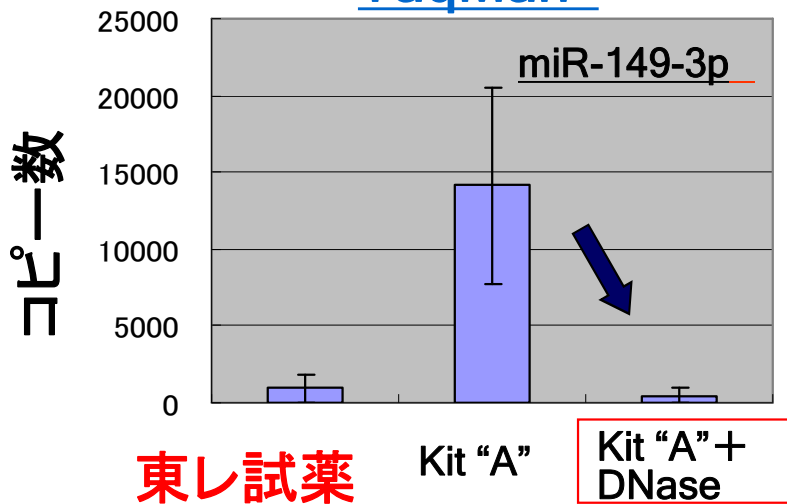
血清DNAの混入が検出に与える影響

3D-Gene[®] RNA extraction reagent from liquid sample

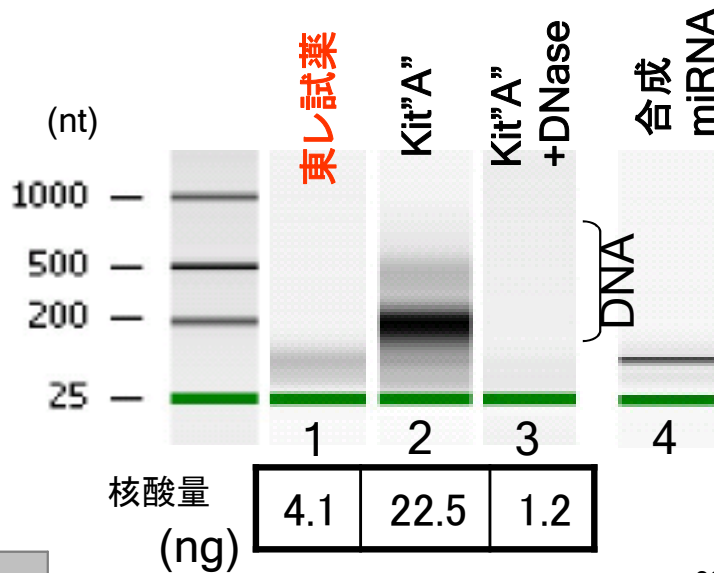


0.3ng each

TaqMan[®]

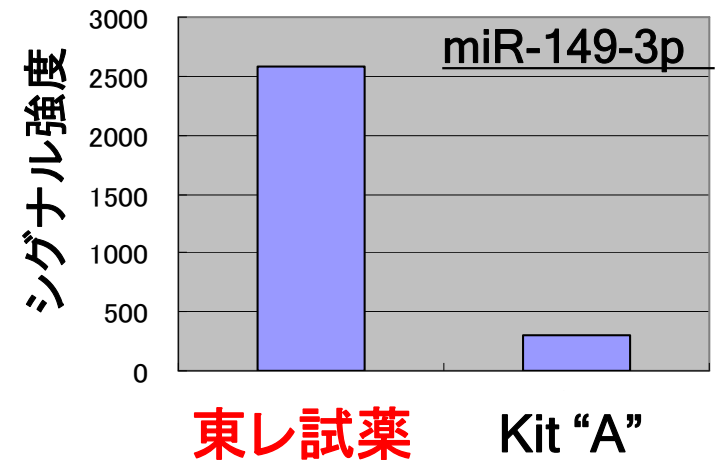


血清から抽出された核酸の電気泳動図



3.5ng each

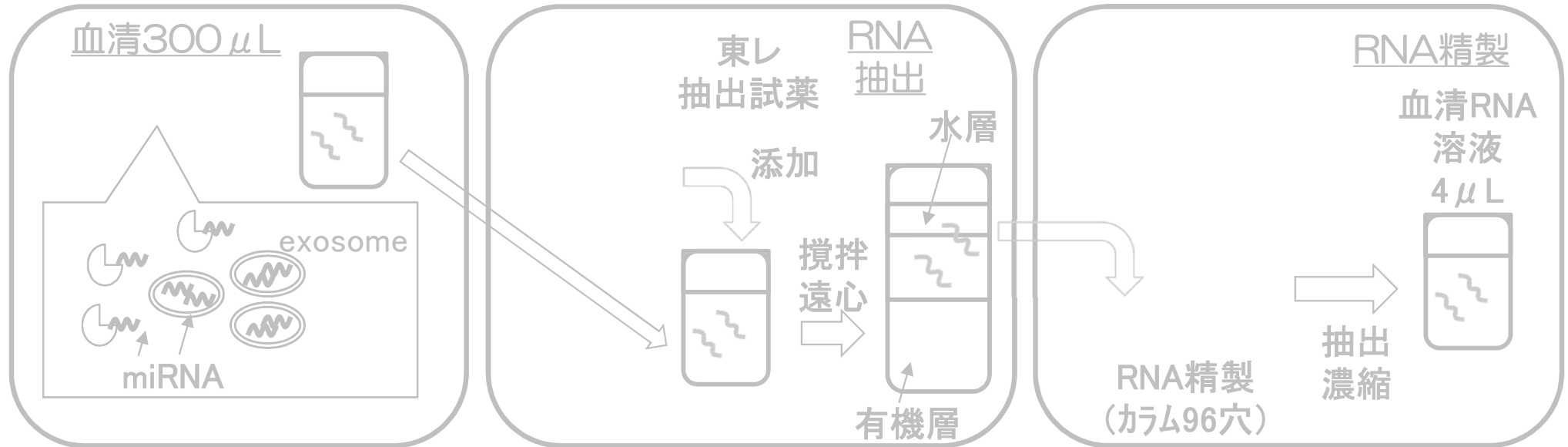
3D-Gene[®]



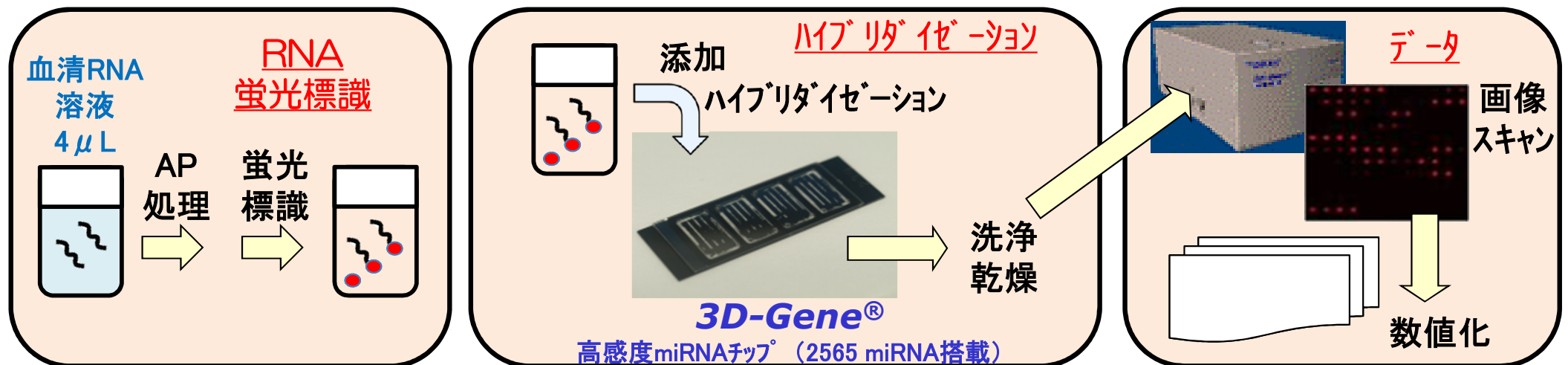
血清からのRNA抽出法が検出に大きな影響を与える

miRNAのDNAチップによる解析のステップ

1. 血清からのRNA抽出

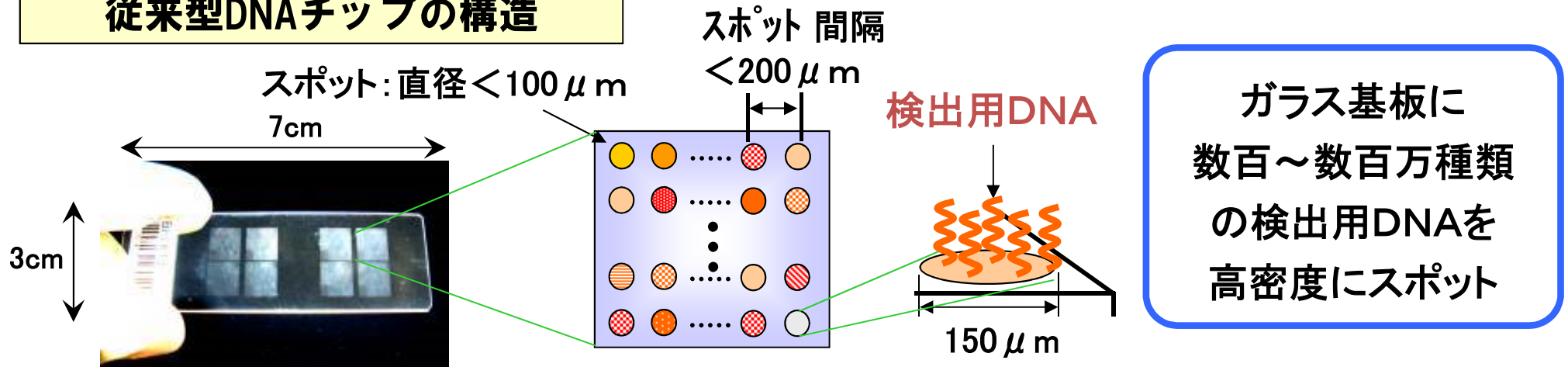


2. DNAチップによるmiRNAの網羅的検出

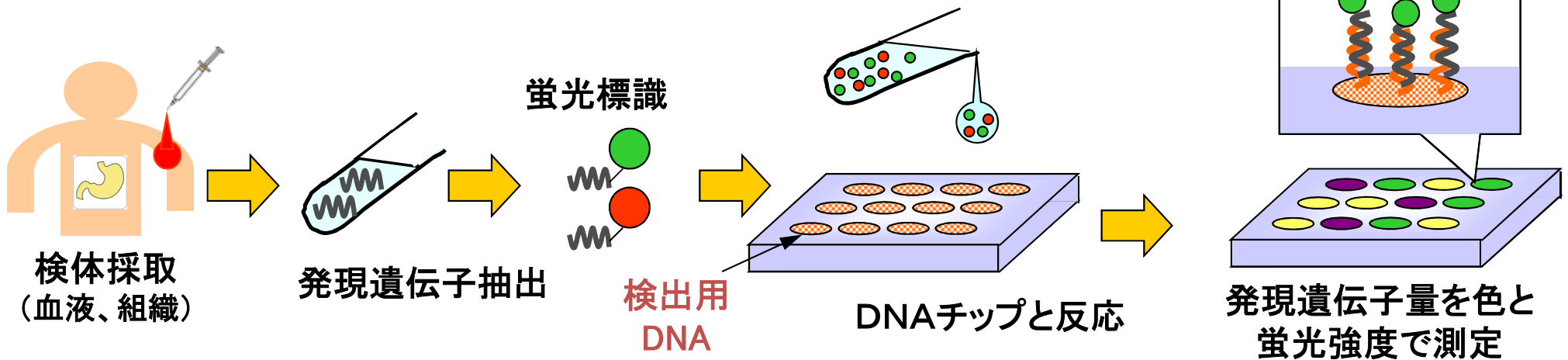


DNAチップの構造と検出方法

従来型DNAチップの構造

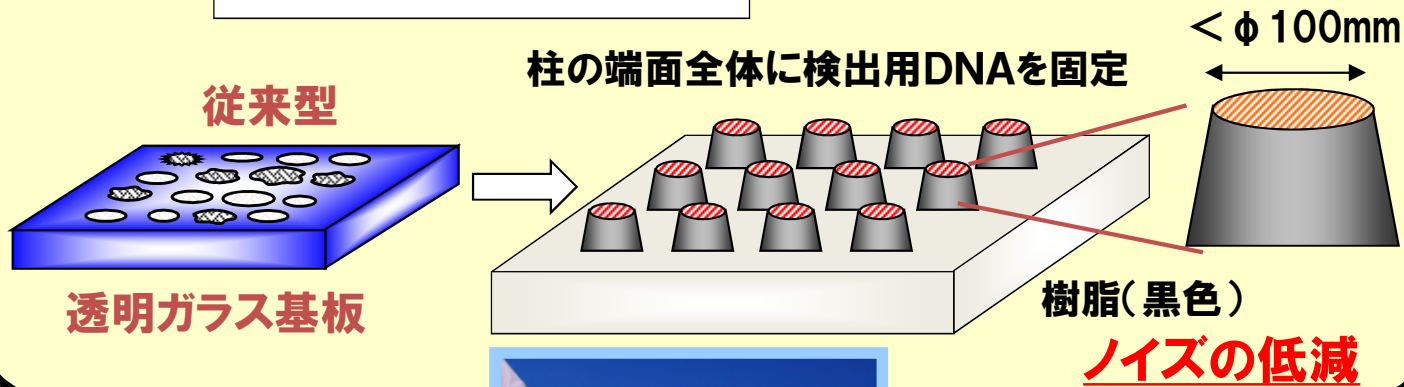


DNAチップによる発現遺伝子検出方法

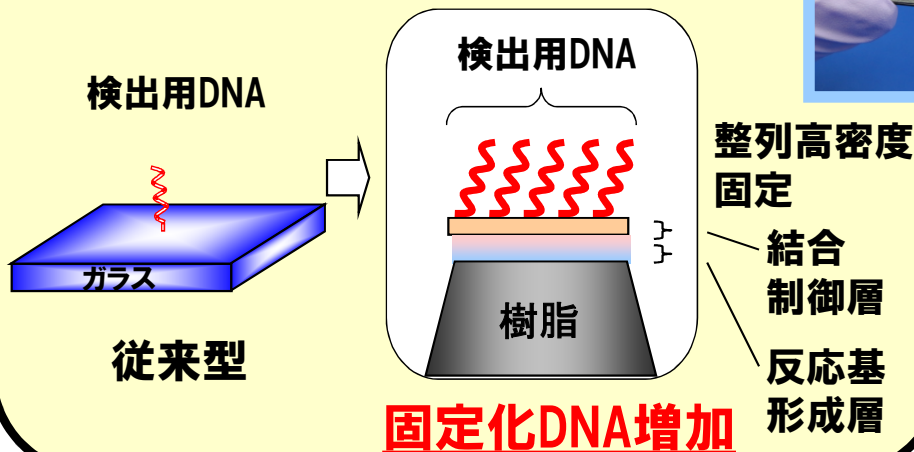


高感度DNAチップの特徴

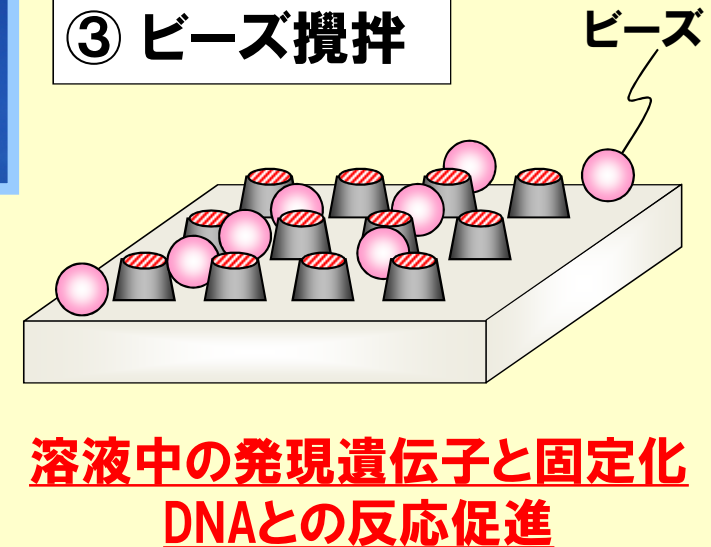
① 柱状構造配列体



② 高密度固定

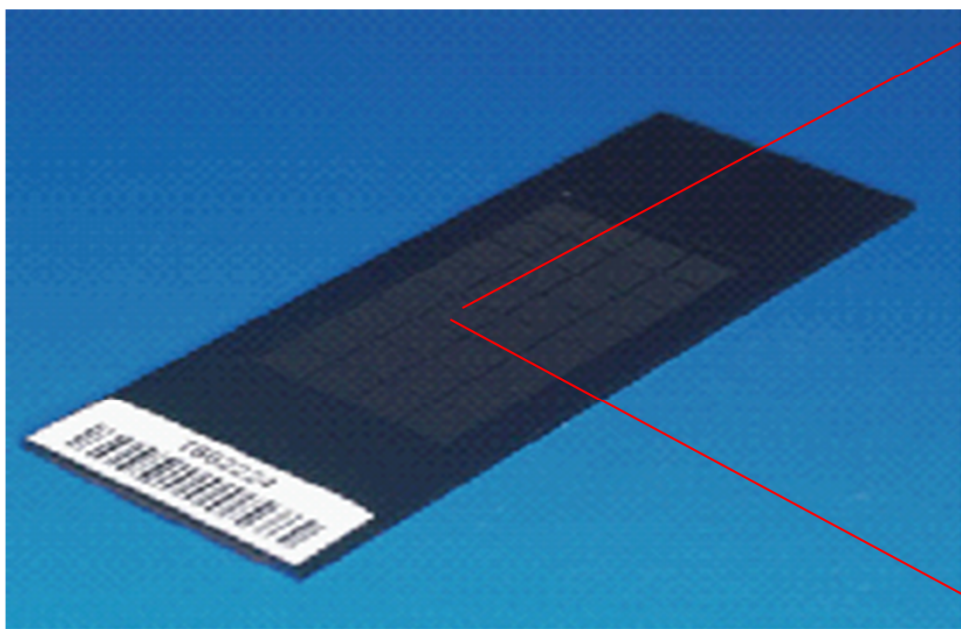


③ ビーズ攪拌

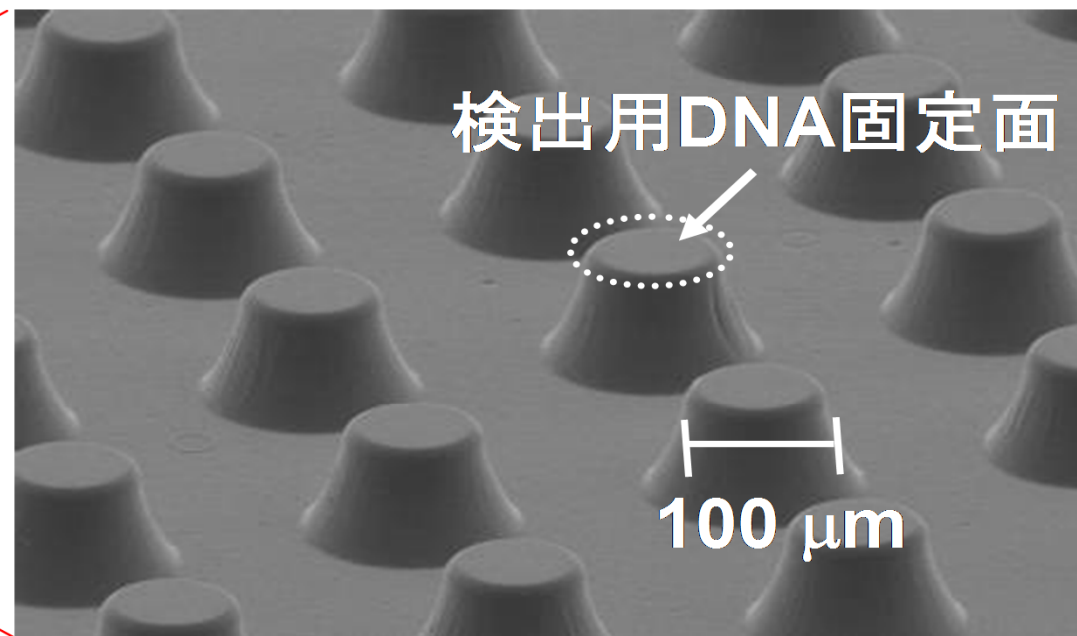


従来型に比べ最高100倍の高感度化に成功

3D-Gene[®] の外観

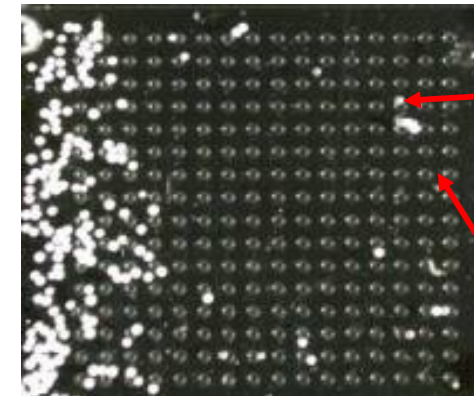
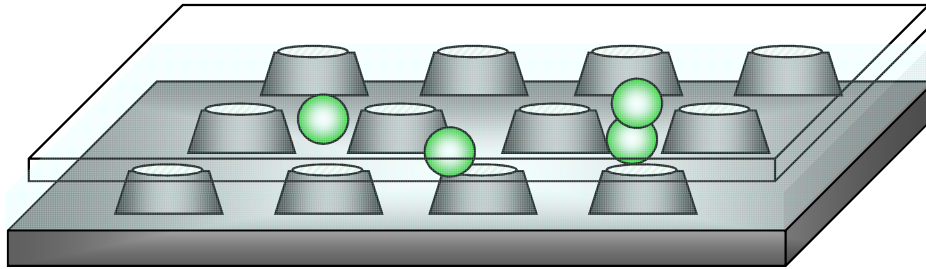


検出用DNAの固定部分 の独自構造

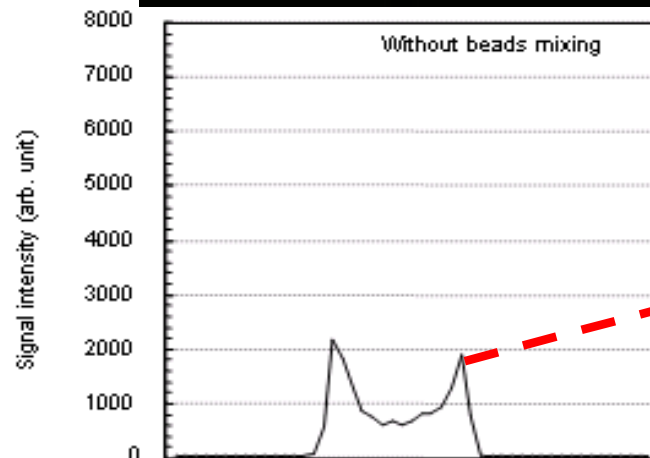


東レの樹脂・ナノテク技術とバイオ技術を融合

ビーズ攪拌効果による反応性向上

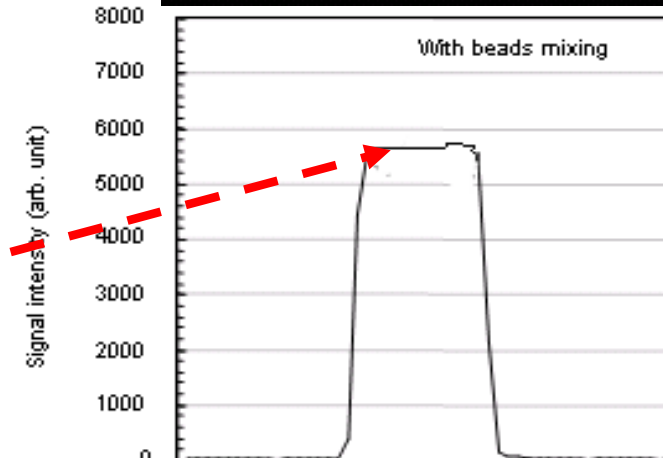


3D-Gene[®]
(攪拌なし)



Position

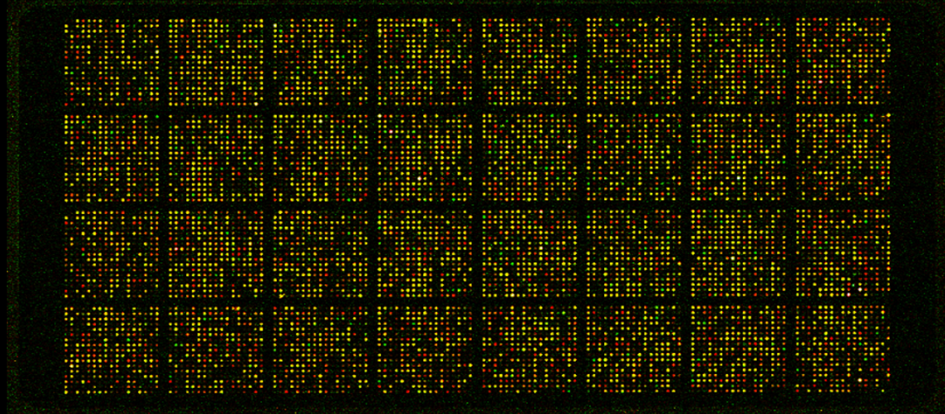
3D-Gene[®]
(攪拌あり)



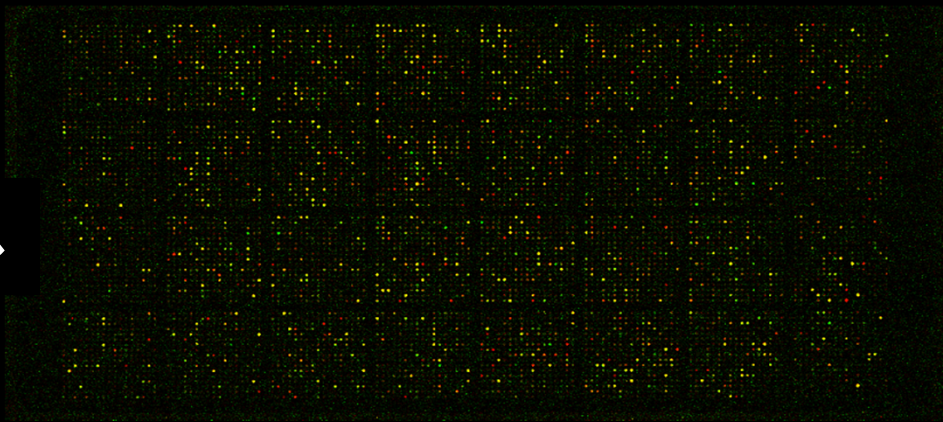
Position

ビーズ攪拌効果

攪拌あり



攪拌なし



ビーズ攪拌技術により
シグナル強度向上

3D-Gene[®] miRNA測定用チップの性能評価

Intra-Platform Repeatability and inter-Platform Comparability of MicroRNA Microarray Technology

F. Sato et. Al PlosOne

May 2009 | Volume 4 | Issue 5 | e5540

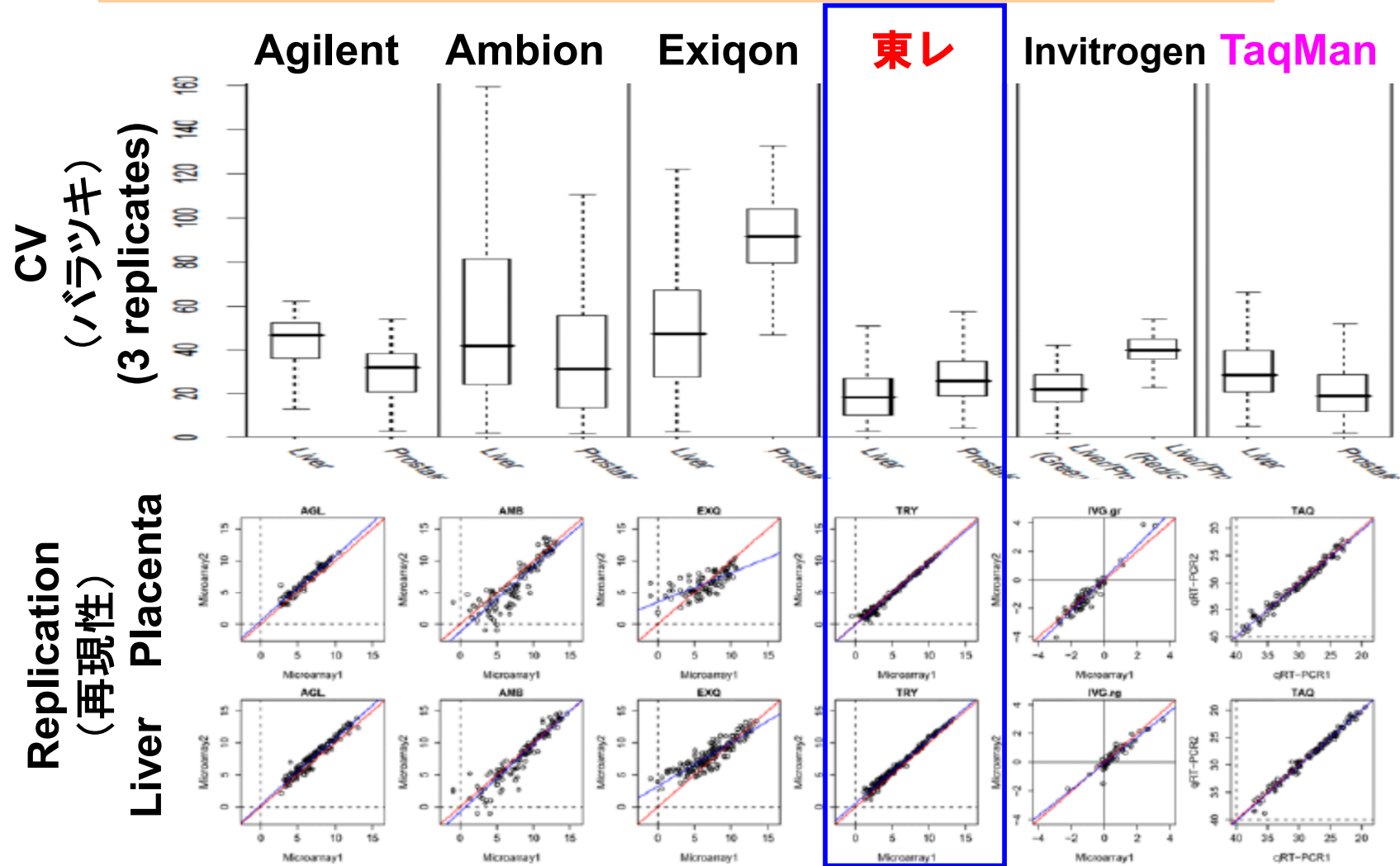
Abstract

Over the last decade, DNA microarray technology has provided a great contribution to the life sciences. The MicroArray Quality Control (MAQC) project demonstrated the way to analyze the expression microarray. Recently, microarray technology has been utilized to analyze a comprehensive microRNA expression profiling. Currently, several platforms of microRNA microarray chips are commercially available. Thus, we compared repeatability and comparability of five different microRNA microarray platforms (Agilent, Ambion, Exiqon, Invitrogen and Toray) using 309 microRNAs probes, and the Taqman microRNA system using 142 microRNA probes. This study demonstrated that microRNA microarray has high intra-platform repeatability and comparability to quantitative RT-PCR of microRNA. Among the five platforms, Agilent and Toray array showed relatively better performances than the others. However, the current lineup of commercially available microRNA microarray systems fails to show good inter-platform concordance, probably because of lack of an adequate normalization method and severe divergence in stringency of detection call criteria between different platforms. This study provided the basic information about the performance and the problems specific to the current microRNA microarray systems.

3D-Gene[®]を含む5種類のアレイ+Taqmanについて性能評価

実験の再現性

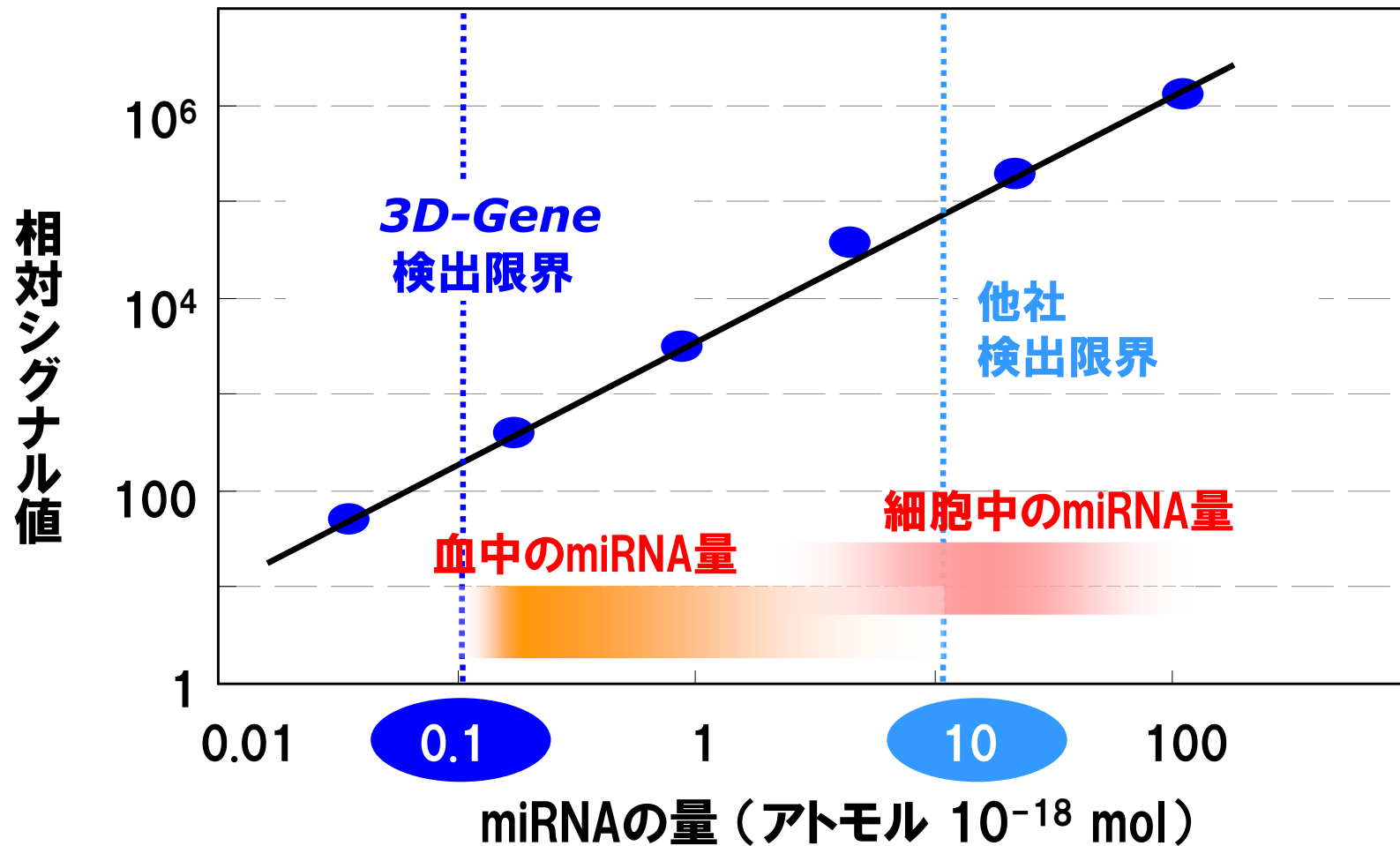
ヒトのLiverとProstateのサンプルをそれぞれ3回測定して解析



3D-Gene[®]は実験間の再現性が高く、バラツキが小さい

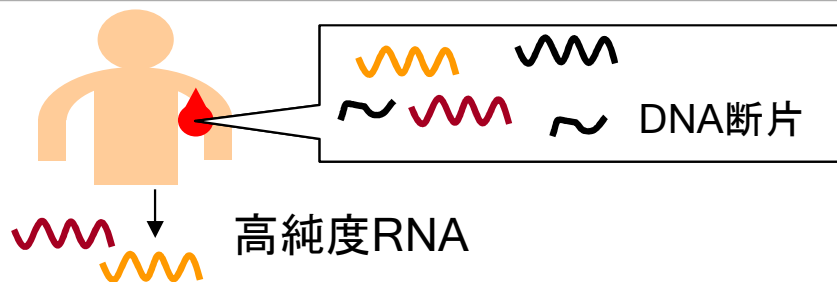
血中miRNA量と3D-Gene[®]の性能

3D-Gene[®]の検出感度



3D-Gene[®]は高い検出感度を有し、血中miRNAを検出

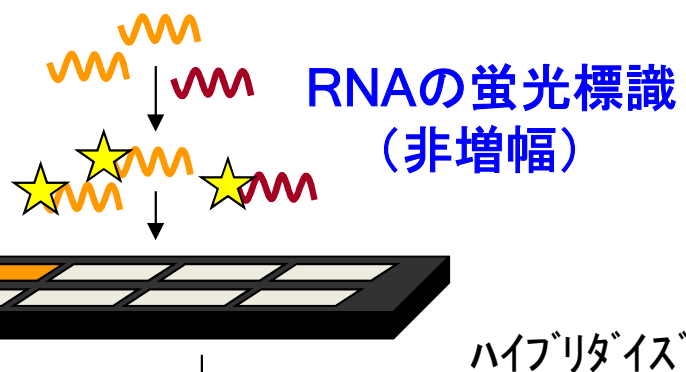
各種miRNA発現解析法の原理と特徴



DNAチップ 3D-Gene®

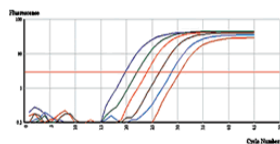
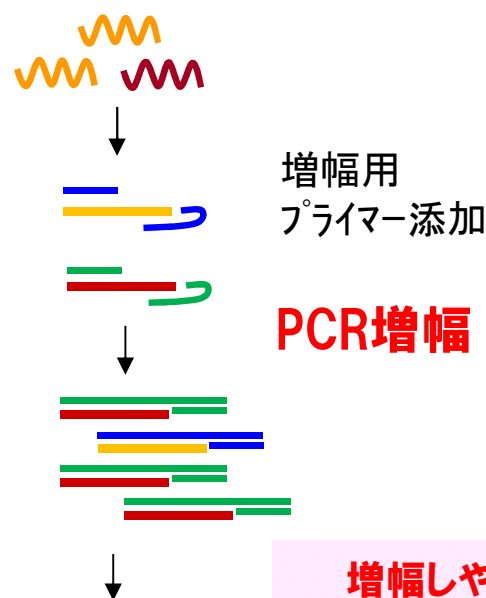
定量PCR (TaqMan®)

次世代シーケンサー

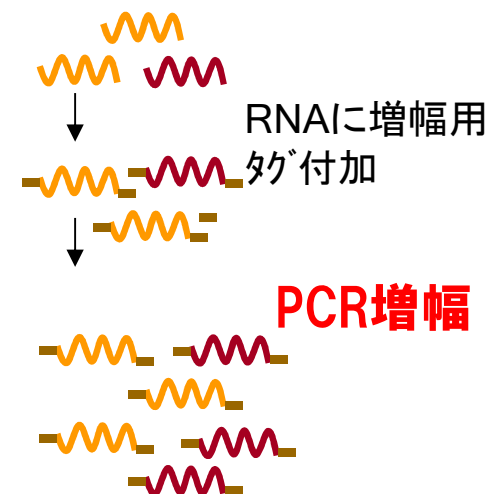


個々のmiRNAに
対応した検出プローブ上の
蛍光強度を測定

増幅バイアスはない



増幅しやすい配列 / 増幅
しにくい配列がある
⇒ 場合によっては、
発現量測定にバイアス



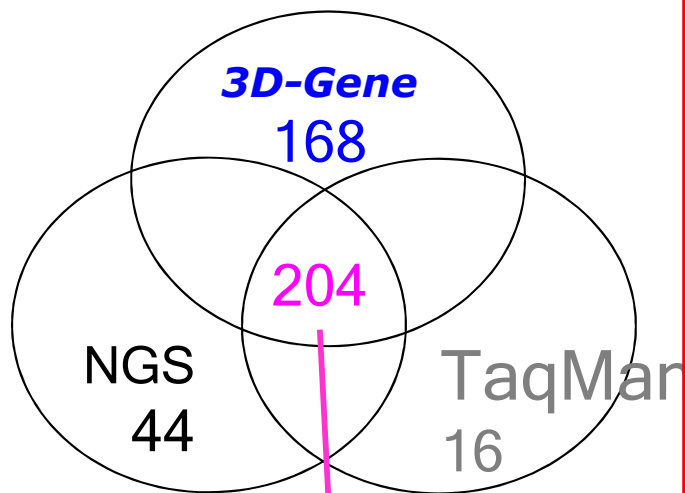
miRNA配列のGC含量が検出に与える影響

3D-Gene/TaqMan/NGS

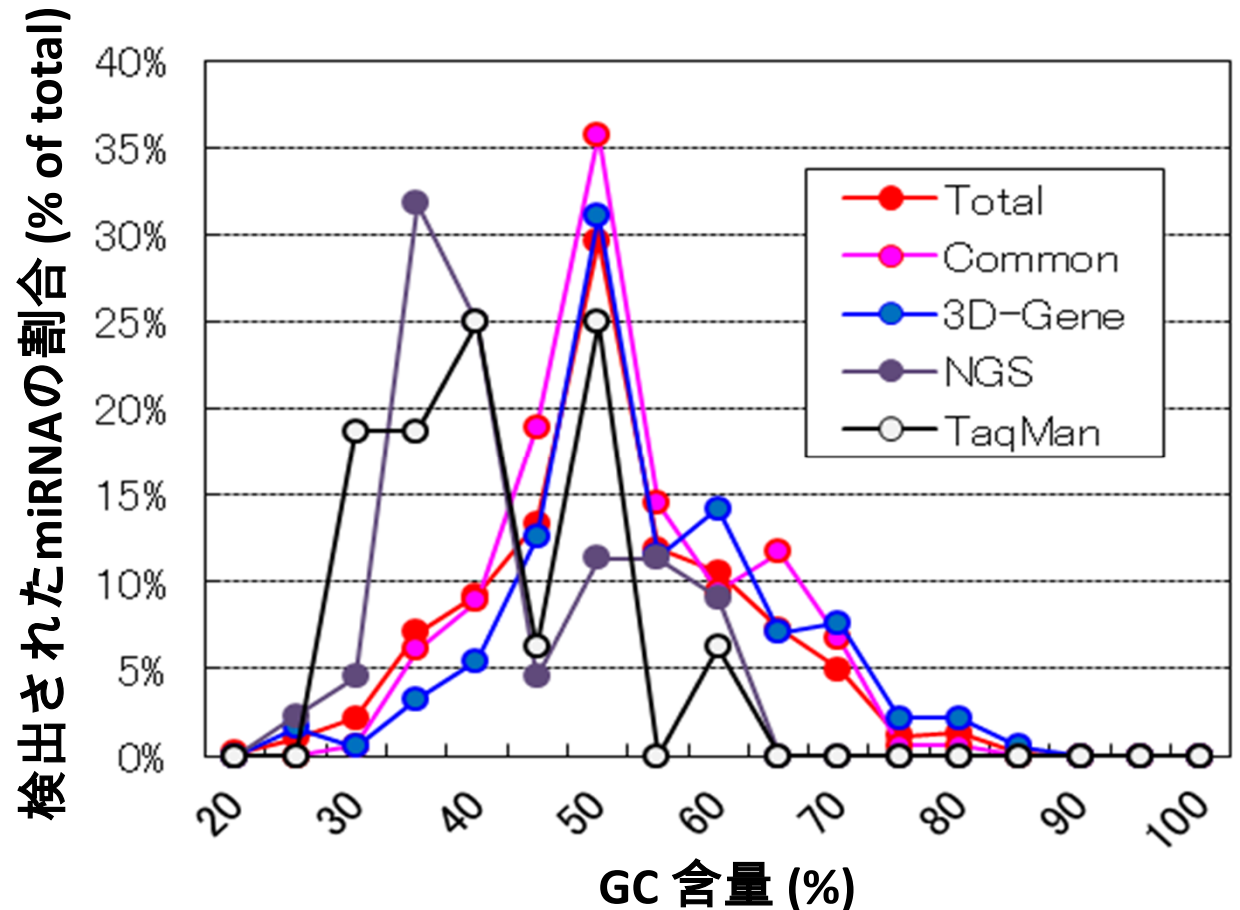
いずれかの方法で

検出されたmiRNAの数

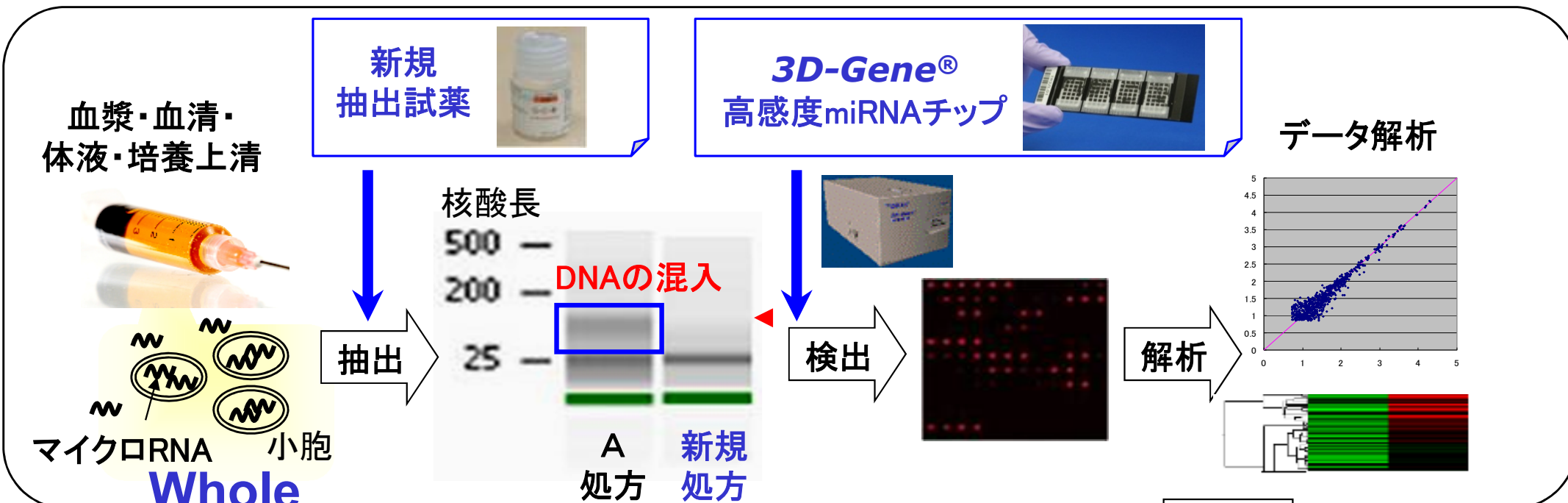
Total 607



すべての方法で
検出されたmiRNAの数
common



検出处方の開発と検査・診断への展開



検査用バイオマーカー探索

- 300 μ Lの血漿・血清で2回、検出可能
- 操作が単純
- 結果(データ)の高い再現性・安定性

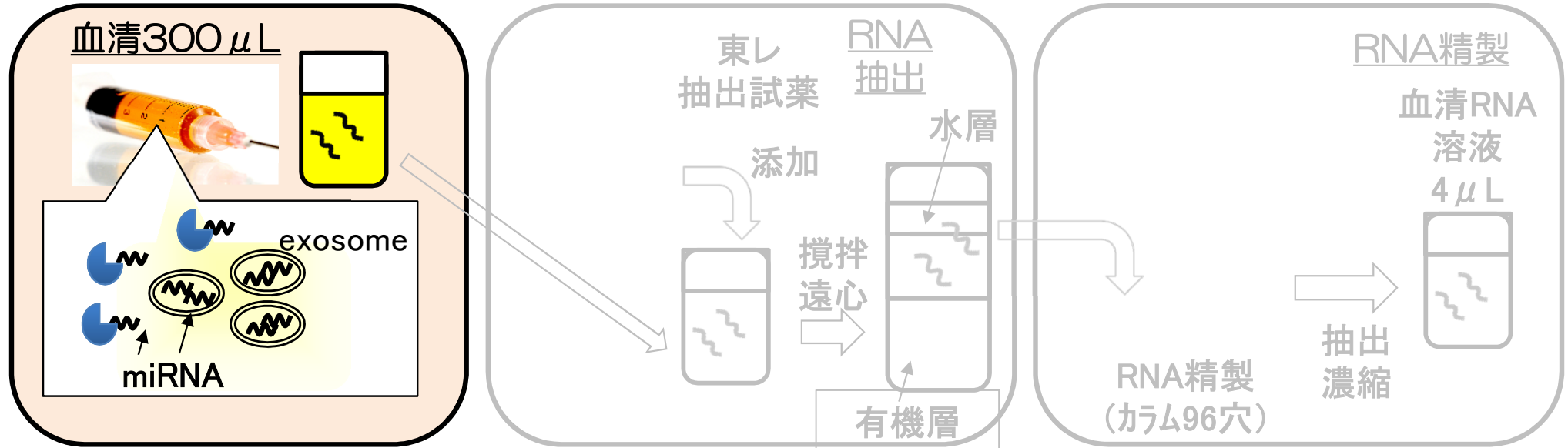
選定

バイオマーカー
(がん発見など)

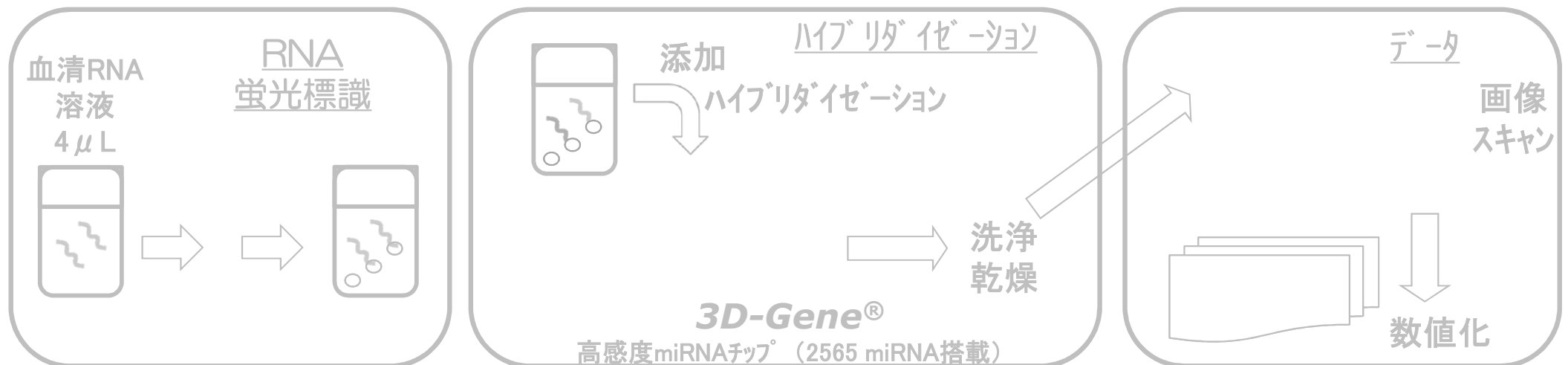
検査・診断用チップ搭載

miRNAのDNAチップによる解析のステップ

1. 血清からのRNA抽出



2. DNAチップによるmiRNAの網羅的検出



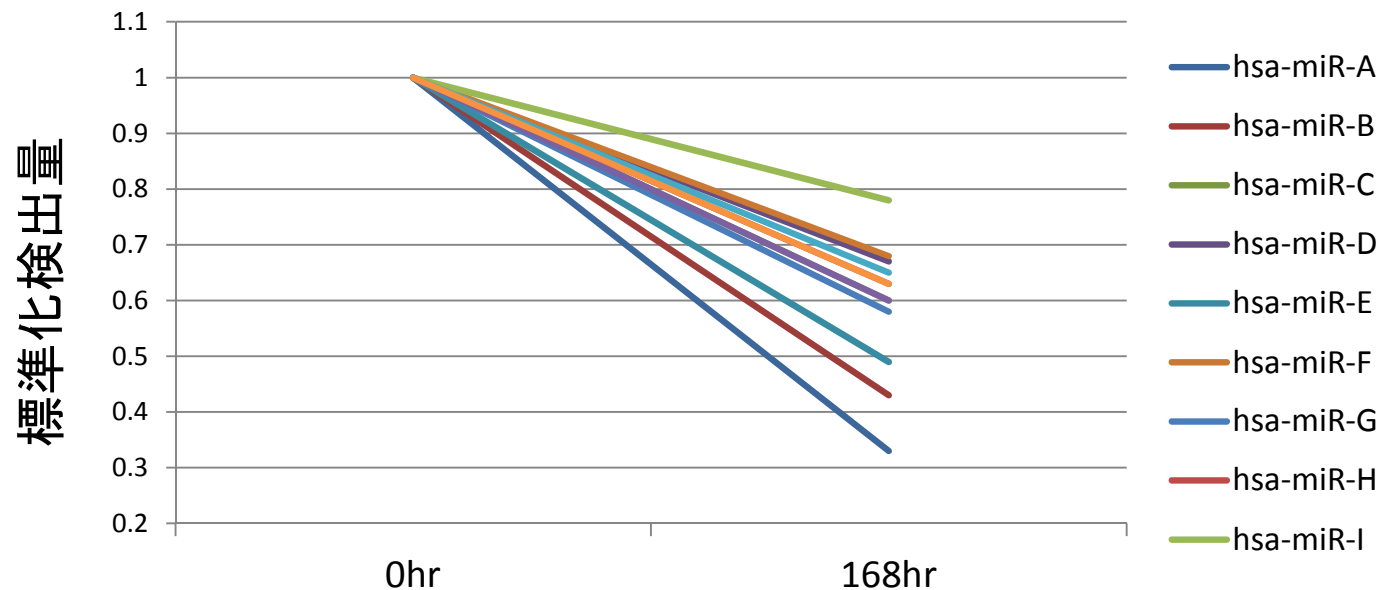
血清検体の品質評価

■ 体液検体のmiRNAの品質評価基準となるマーカー候補を選定

体液(血清)の品質低下に特徴的に依存するmiRNAを品質確認用マーカーとして取得。

■ 品質低下に特徴的なmiRNA候補の選定

miRNA強制劣化により、他の一般的なmiRNAに比べて測定値の減少が著しいmiRNAを選定(特許出願済み)



次世代シーケンサー解析でも検体の品質劣化がリード率に大きな影響を与えることが見出されており、検体の品質評価は安定的な検査の実施に大きく寄与する。

最後に

1. 感度特異度の高い早期診断マーカーはがんの死亡率を改善する可能性があり、実用化が強く待たれる
2. 東レは高感度DNAチップ3D-Gene®システムを開発し、その性能の強みを生かして、血中miRNAの正確な測定を可能にし、「体液中マイクロRNA測定技術基盤開発事業」に参加させていただいている。
3. 今後、得られた研究成果を元に、検査・診断用途への開発を急ぐ。

**体液中miRNAマーカーの開発・実用化により、
新しいがん検査・診断の時代へ**