



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	マイクロ抽出場によるヒト腫瘍細胞由来のマイクロRNA抽出法
Author(s)	岡本, 行広; 日比野, 理人; 加地, 範匡 他
Citation	分析化学, 64(1), 9-13 https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.64.9
Issue Date	2015-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71683
Type	journal article
File Information	bunseki.64.9.pdf



年間特集「生」：ノート

マイクロ抽出場によるヒト腫瘍細胞由来のマイクロ RNA 抽出法

岡本 行広^{*1,3}, 日比野理人², 加地 範匡^{2,3}, 渡慶次 学^{3,4}, 馬場 嘉信^{2,3}

1 緒 言

血液や組織及び細胞由来の生体分子解析には、一般的に前処理が必要である。この前処理は、目的とする生体分子が細胞内に含まれている場合は、細胞の分離・細胞溶解・生体分子の精製及び濃縮（抽出）・増幅などの過程からなり¹⁾、それぞれの過程は吸着・洗浄・溶出など複数の過程から成立している。このため、前処理操作は煩雑かつ多大な時間を要する。つまり細胞由来の生体分子解析を実施するためには簡便かつ短時間で実施可能な前処理法が重要となる。

近年、細胞やエクソソームに含まれる 18～25 塩基程度の長さの小さなマイクロリボ核酸（RNA）が注目されている。マイクロ RNA は遺伝子の発現を抑制する働きを行い、細胞増殖・分化・アポトーシス・発生などの多岐にわたる生理現象に関与していると報告されている²⁾³⁾。また、特定配列のマイクロ RNA の発現量の変化はがんの発症との関連が推定されるため、がん化のバイオマーカーとして重要性が増している⁴⁾。このようにマイクロ RNA の機能解明及び発現量の定量などマイクロ RNA の分析は重要となっている。しかし、現状ではマイクロ RNA 解析を簡便に実施する手法はなく、前述のとおり煩雑な前処理操作が必要である。さらにマイクロ RNA はサイズが小さく、配列も多岐にわたるためデオキシリボ核酸（DNA）やタンパク質の抽出と比較し、高度な技術を必要としている。

近年、マイクロチップ内での前処理操作が注目されている⁵⁾。サンプルをチューブに手動で出し入れする現行法と異なり、マイクロチップタイプの分析操作は各前処理操作を連続的に実施可能であり、試料のロス・コンタミを抑制し、操作時間の短縮が期待できる。またマイクロ空間の特性を活かして、マイクロ流路内での迅速な試薬の混合や効

率のよい固液あるいは液液相互作用が期待できるために、マイクロチップを利用した前処理操作は生体試料の前処理に適した手法の一つであると言える⁶⁾⁷⁾。

そこで本研究では、細胞由来のマイクロ RNA を解析するために必要な前処理操作の中で特に重要であるマイクロ RNA 抽出に焦点をあて、研究を実施したので報告する。

2 RNA 抽出理論⁸⁾⁹⁾

界面活性剤、変性剤などを含む細胞溶解液を用いて細胞を溶解し、細胞内成分を取り出す。続いて、フェノール/クロロホルム溶液にサンプルを加えると、酸性溶液中では RNA は水相に移り、DNA やタンパク質などの細胞構成成分と分離される。こうして得られた水相をシリカ表面に加えると、塩酸グアニジンやチオシアン酸グアニジンなどのカオトロピックイオン共存下では RNA がシリカ表面に吸着する。そしてシリカ表面を洗浄し、溶出液を加えることで RNA が回収される。

3 実 験

3.1 試薬及び細胞

ヒト非小細胞肺癌細胞株 H1299 は RPMI 1640 培地 (Sigma-Aldrich 製) にて 37℃ で 5 % CO₂ 濃度下で培養した。使用した RPMI 1640 培地は 10 % の fetal bovine serum (Equitech-Bio 製) と 1 % L-glutamine (コスモバイオ製)、1 % sodium pyruvate solution (Invitrogen 製)、1 % antibiotic-antimycotic (Invitrogen 製) を含有している。

3.2 マイクロ RNA 抽出用チップ

流路幅 1 mm, 流路長 15 mm, 流路深さ 50 µm のストレートチャネル型 poly(dimethyl siloxane) (PDMS) チップを既報の論文にしたがって作製した¹⁰⁾¹¹⁾。続いて、Fig. 1 に示すようにマイクロ RNA 抽出部であるシリカメンブレンを試料導入部に PDMS 同士の接着力にて固定化した。用いたシリカメンブレンは miRNeasy Mini Kit (QIAGEN 製) と同様の物を使用した。溶液導入部には内径 0.26 mm, 外径 0.5 mm の Poly(ether ether ketone) (PEEK) 製のキャピラリーチューブ（マイクロ技研製）を溶液回収部には内径 0.5 mm, 外径 1.0 mm のシリコンチューブ（As One 製）を差

* E-mail: okamoto@cheng.es.osaka-u.ac.jp

¹ 大阪大学大学院基礎工学研究科物質創成専攻: 560-8531 大阪府豊中市待兼山町 1-3

² 名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻: 464-8603 愛知県名古屋市中千種区不老町

³ 名古屋大学未来社会創造機構: 464-8603 愛知県名古屋市中千種区不老町

⁴ 北海道大学大学院工学研究院生物機能高分子部門: 060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目

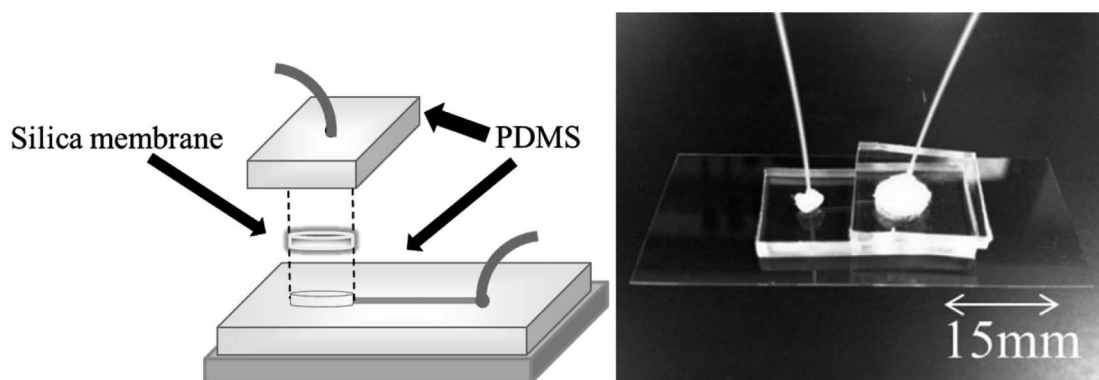


Fig. 1 (A) Graphic illustration and (B) a picture of a micro RNA extraction device

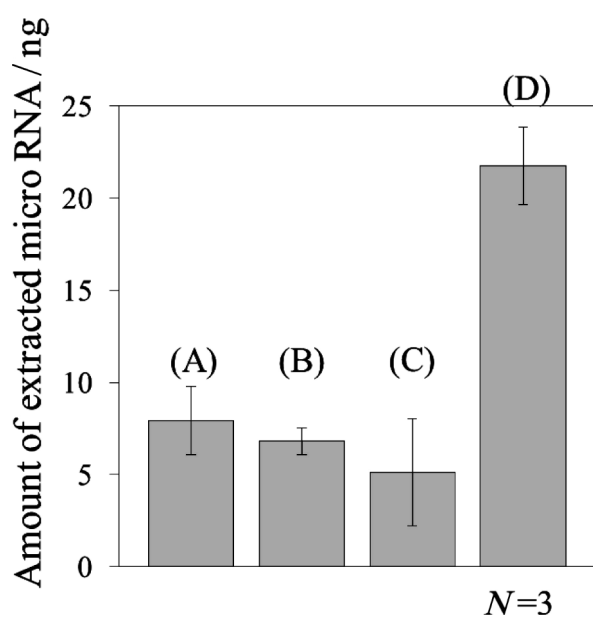


Fig. 2 Amount of extracted micro RNA with (A)–(C) silica membrane immobilized chip and (D) commercial kit

Flow rate conditions: (A) $45 \mu\text{L min}^{-1}$, (B) $60 \mu\text{L min}^{-1}$, (C) $75 \mu\text{L min}^{-1}$.

し込んで使用した。溶液導入には $500 \mu\text{L}$ のシリンジ (Hamilton 製) とシリンジポンプ (KD Scientific 製) を用いて実施した。

3.3 マイクロ RNA 抽出

市販のマイクロ RNA 抽出キット miRNeasy Mini Kit (QIAGEN 製) をマイクロ RNA 抽出チップとの性能比較のために使用した。

細胞溶解は H1299 細胞 (1.57×10^6 個) に細胞溶解液 QIAzol (QIAGEN 製) を $700 \mu\text{L}$ 加えて調製した。ここにクロロホルム (和光純薬工業製) $200 \mu\text{L}$ 加え、 4°C で 12000 g にて 15 分間遠心し、上澄みのマイクロ RNA を含

む水相を回収した。続いて、それぞれの流量 ($45 \mu\text{L min}^{-1}$, $60 \mu\text{L min}^{-1}$, $75 \mu\text{L min}^{-1}$) にて RNA を含む水相 ($275 \mu\text{L}$), wash buffer RWT ($233 \mu\text{L}$), wash buffer RPE ($333 \mu\text{L}$), 空気 ($300 \mu\text{L}$), RNase フリー水 ($17 \mu\text{L}$) の順序でシリンジポンプにて導入し、RNA の抽出を実施した。この抽出液中のマイクロ RNA 量はマイクロチップ電気泳動装置 Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent 製) と small RNA kit (Agilent 製) にて 18~25 塩基長の面積分より算出した。また流量 $45 \mu\text{L min}^{-1}$ でマイクロチップ利用によるマイクロ RNA の抽出を行い、そして miRNome Micro RNA Profilers (System Biosciences 製) を用いて cDNA 合成及び real time ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 解析によりマイクロ RNA の配列解析を実施した。real time PCR は PicoReal (Thermo Scientific 製) を用いて実施した。

4 結果及び考察

抽出原理から、マイクロ RNA 抽出にはガラスや石英の構造体を有するマイクロデバイスが有効であると考えられるが¹²⁾、作製コストやサンプルのキャリーオーバーの点で実用的ではない。一方で PDMS や poly(methylmethacrylate) (PMMA) などのプラスチックは、加工の容易さ及び廉価という点で使い捨て可能である。プラスチック製のマイクロチップの場合、ガラスビーズの充填やシリカモノリスの形成により抽出部を作製する手法が報告されている¹³⁾¹⁴⁾。この手法では、定量的抽出のために再現性よいビーズの充填・モノリス形成が課題となっている。そこで本研究では、マイクロ RNA 抽出場となるシリカメンブレンを PDMS 同士の自己接着力により固定化することで、簡便にマイクロ RNA 抽出チップを作製した。

作製したマイクロ RNA 抽出チップに、フェノール/クロロホルム溶液の水相から回収したサンプルを所定の流量で導入し、マイクロ RNA の抽出量をマイクロチップ電気泳動にて評価した結果を Fig. 2 に示す。得られた結果より、流量の増加につれて抽出量の低下が明らかとなった。これ

Table 1 Sequential analysis of extracted micro RNA sequences by real time PCR

Micro RNA	Sequence	Commercial kit	Silica membrane immobilized chip
hsa-miR-302f	UAAUUGCUUCCAUGUUU	○	
hsa-miR-324-3p	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG	○	
hsa-miR-409-3p	GAAUGUUGCUCGGUGAACCCCU	○	
hsa-miR-484	UCAGGCUCAGUCCCCUCCGAU	○	○
hsa-miR-548c-5p	AAAAGUAAUUGCGGUUUUUGCC	○	○
hsa-miR-548e	AAAACUGAGACUACUUUUGCA	○	
hsa-miR-548t	CAAAAGUGAUUCGUGGUUUUUG	○	
hsa-miR-548v	AGCUACAGUUACUUUUGCACCA	○	○
hsa-miR-548w	AAAAGUAAACUGCGGUUUUUGCCU	○	
hsa-miR-548x	UAAAAACUGCAAUACUUUCA	○	
hsa-miR-563	AGGUUGACAUACGUUUCCC	○	
hsa-miR-574-5p	UGAGUGUGUGUGUGAGUGUGU		○
hsa-miR-585	UGGGCGUAUCUGUAUGCUA	○	
hsa-miR-602	GACACGGGCGACAGCUGCGGCC	○	○
hsa-miR-608	AGGGGUGGUGUUGGGACAGCUCG	○	○
hsa-miR-614	GAACGCCUGUUCUUGCCAGGUGG	○	
hsa-miR-630	AGUAUUCUGUACCAGGGAAGGU	○	○
hsa-miR-636	UGUGCUUGCUCGUCCCGCCGCA	○	○
hsa-miR-641	AAAGACAUAGGAUAGAGUACCCUC	○	
hsa-miR-647	GUGGCUGCACUCACUCCCUUC	○	
hsa-miR-658	GGCGGAGGGAAGUAGGUCCGUUGGU	○	
hsa-miR-665	ACCAGGAGGCUGAGGCCCCCU	○	
hsa-miR-766	ACUCCAGCCCCACAGCCUCAGC	○	
hsa-miR-876-3p	UGGUGGUUUACAAAGUAAUUCA	○	
hsa-miR-933	UGUGCGCAGGGAGACCUCUCCC	○	
hsa-miR-938	UGCCCUUAAAGGUGAACCAGU	○	
hsa-miR-1200	CUCCUGAGCCAUUCUGAGCCUC	○	
hsa-miR-1269	CUGGACUGAGCCGUGCUACUGG	○	
hsa-miR-762	GGGGCUGGGGCCGGGCGGAGC	○	○
hsa-miR-711	GGGACCCAGGGAGAGACGUAAG	○	
hsa-miR-3139	UAGGAGCUCAACAGAUGCCUGUU	○	
hsa-miR-3154	CAGAAGGGGAGUUGGGAGCAGA	○	○
hsa-miR-3155	CCAGGCUCUGCAGUGGGAACU	○	
hsa-miR-3180-5p	CUUCCAGACGCUCGCCCCACGUCCG	○	○
hsa-miR-3186-5p	CAGGCGUCUGUCUACGUCCU	○	
hsa-miR-3189	CCCUUGGGUCUGAUGGGGUAG	○	○
hsa-miR-4288	UUGUCUGCUGAGUUUCC	○	
hsa-miR-4291	UUCAGCAGGAACAGCU	○	
hsa-miR-4300	UGGGAGCUGGACUACUUC	○	
hsa-let-7f-1	CUAUACAAUCUAUUGCCUCCCC	○	
hsa-miR-30a	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC	○	○
hsa-miR-431	CAGGUCGUCUUGCAGGGCUUCU	○	○

は流量の増加に伴い, シリカメンブレンとマイクロ RNA との相互作用時間が短くなったことに起因すると考えられる。

続いて, 抽出液中のマイクロ RNA の配列評価を real time PCR により実施した。今回用いたヒト由来のがん細胞ではキットの利用により 1152 種類の配列の有無を調べた結果, 41 種類の異なるマイクロ RNA の抽出が可能であった。一方で, Table 1 に示すように本マイクロチップを利用した場合では 14 種類に留まった。この原因として, Fig. 2 の結果からチップでの抽出量がキットより少ないことが原因と考えられる。さらに real time PCR の結果より代表的な配列の Ct 値を比較すると has-miR-630 ではキットが 28 に対してマイクロチップでは 53, has-miR-484 ではキットが 23 に対してマイクロチップが 35, has-miR-607 で

はキットが 27 に対してマイクロチップが 40 であった。この結果よりマイクロチップではキットと比較してマイクロ RNA の抽出量が少ないこと及びチューブとチップの接続部にグアニジウム塩など cDNA 合成や real time PCR を阻害する成分が残っており, これらが抽出液に混入したことが予想される。抽出量の増加を達成するためには (1) シリカメンブレンの有効接触面積の増大を実現する, (2) シリンジ, チューブ, チップへの非特異的吸着を抑制するとともに, 確実な試料導入を実現することが重要である。これらの課題対策として, 挟み込むシリカメンブレンの大面积化や吸着抑制のためのキャリアー¹⁵⁾の導入などにより, 吸着量の増大及び非特異的吸着の抑制が可能になると考えられる。また, グアニジウム塩などの混入防止のために著者らはすでにポンプやチューブを利用しない試料導入法を開

発しており¹⁶⁾, これを今後適用することで確実な試料導入が可能になると考えられる。

このように抽出効率は今後改善する必要があるが, 極めてシンプルなチップで簡便に RNA を抽出できることを示した。

以上, マイクロ RNA 抽出チップの作製及びその評価を実施した。現状の前処理法は, 細胞分離・細胞溶解・マイクロ RNA 抽出及びこれに伴う吸着, 洗浄, 溶出操作・増幅を手作業で, しかも RNase の混入しやすい環境下で実施する。一方で, マイクロチップでは外部からのコンタミを防止可能な閉鎖空間で各種前処理操作を統合し, 自動化かつ短時間操作が期待できる。しかし, 現状の粒子充填やシリカモノリス固定化チップでは各種前処理操作の統合は容易ではない。一方で, 本 RNA 抽出チップは作製が簡便であるために, 前後の前処理操作との接続は問題にならないと考えられ, すでに著者らが開発した細胞分離¹⁷⁾, ミキサー¹⁸⁾, PCR チップ¹⁹⁾, 電気泳動チップ²⁰⁾との接続を検討し, 前処理統合デバイスを作製する予定である。

5 結 言

使い捨て可能かつ簡便に作製可能なマイクロ RNA 抽出チップの開発に成功した。回収量や純度などに関して実験手技の点で改善すべき点はあるが, 今後は本報告を基にマイクロチップの特性を活かした細胞分離・細胞溶解・細胞内分子の抽出・増幅などを含んだ前処理統合デバイスを検討中であり, また, 血中のマイクロ RNA やエクソソーム内のマイクロ RNA への応用も期待できる。

謝 辞

本研究は JSPS 科研費 24710135 の助成, 文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「ナノメディシン分子科学」(No. 2306), 及び内閣府/日本学術振興会・最先端研究開発支援プログラムの支援により実施された。

文 献

- 1) 加地範匡, 岡本行広, 渡慶次学, 馬場嘉信: “DNA 前処理/PCR・チップ” 「バイオチップ実用化ハンドブック」, p. 125 (2010), (エヌ・ティー・エス)。

- 2) Y. Tomaru, Y. Hayashizaki: *Cancer Sci.*, **97**, 1285 (2006).
- 3) I. Alvarez-Garcia, E. A. Miska: *Development*, **132**, 4653 (2005).
- 4) G. A. Calin, C. M. Croce: *Cancer Res.*, **66**, 7390 (2006).
- 5) C. W. Price, D. C. Leslie, J. P. Landers: *Lab Chip*, **9**, 2484 (2009).
- 6) M. Tokeshi, T. Minagawa, K. Uchiyama, A. Hibara, K. Sato, H. Hisamoto, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **74**, 1565 (2002).
- 7) K. Sato, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **73**, 1213 (2001).
- 8) P. Chomczynski, N. Sacchi: *Nature protocols*, **1**, 581 (2006).
- 9) M. Höss, S. Pääbo: *Nucleic Acids Research*, **21**, 3913 (1993).
- 10) K. Kitazoe, J. Wang, N. Kaji, Y. Okamoto, M. Tokeshi, K. Kogure, H. Harashima, Y. Baba: *Lab Chip*, **11**, 3256 (2011).
- 11) K. Kitazoe, Y. S. Park, N. Kaji, Y. Okamoto, M. Tokeshi, K. Kogure, H. Harashima, Y. Baba: *PLoS ONE*, **7**, e39057-8, (2012).
- 12) N. Kaji, Y. Tezuka, Y. Takamura, M. Ueda, T. Nishimoto, H. Nakanishi, Y. Horiike, Y. Baba: *Anal. Chem.*, **76**, 15 (2004).
- 13) M. C. Breadmore, K. A. Wolfe, I. Arcibal, W. K. Leung, D. Dickson, B. C. Giordano, M. E. Power, J. P. Ferrance, S. H. Feldman, P. M. Norris, J. P. Landers: *Anal. Chem.*, **75**, 1880 (2003).
- 14) Q. Wu, J. M. Bienvenue, B. J. Hassan, Y. C. Kwok, B. C. Giordano, P. M. Norris, J. P. Landers, J. P. Ferrance: *Anal. Chem.*, **78**, 5704 (2006).
- 15) D. Andreassen, J. U. Fog, W. Biggs, J. Salomon, I. K. Dahlsveen, A. Baker, P. Mouritzen: *Methods*, **50**, S6 (2010).
- 16) M. Ikami, A. Kawakami, M. Kakuta, Y. Okamoto, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba: *Lab Chip*, **10**, 3335 (2010).
- 17) M. Murata, Y. Okamoto, Y. S. Park, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba: *Anal Bioanal Chem*, **394**, 277 (2009).
- 18) T. Yasui, Y. Omoto, K. Osato, N. Kaji, N. Suzuki, T. Naito, M. Watanabe, Y. Okamoto, M. Tokeshi, E. Shamoto, Y. Baba: *Lab Chip*, **11**, 3356 (2011).
- 19) Y. Hataoka, L. Zhang, Y. Mori, N. Tomita, T. Notomi, Y. Baba: *Anal. Chem.*, **76**, 3689 (2004).
- 20) L. Mahmoudian, N. Kaji, M. Tokeshi, M. Nilsson, Y. Baba: *Anal. Chem.*, **80**, 2483 (2008).

Development of a Micro RNA Extraction Chip from Human Tumor Cells

Yukihiro OKAMOTO^{*1,3}, Ayato HIBINO², Noritada KAJI^{2,3}, Manabu TOKESHI^{3,4} and Yoshinobu BABA^{2,3}

^{*} E-mail : okamoto@cheng.es.osaka-u.ac.jp

¹ Division of Chemical Engineering, Graduate School of Engineering Science, Osaka University, 1-3, Machikaneyama-cho, Toyonaka-shi, Osaka 560-8531

² Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi 464-8603

³ Institute of Innovation for Future Society, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi 464-8603

⁴ Division of Biotechnology and Macromolecular Chemistry, Faculty of Engineering, Hokkaido University, Kita 13 Nishi 8, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060-8628

(Received September 8, 2014; Accepted October 16, 2014)

The importance of micro RNA analysis has been significantly increasing because the role of micro RNA in the human body has been gradually revealed. Despite its importance, the analysis has suffered from several troublesome pretreatments, which hamper any easy analysis. Therefore, an easy and high-throughput pretreatment method has been demanded. In this paper, we focused on the great advantages of microchip pretreatments over conventional manual pretreatments and developed a microchip for micro RNA extraction. To simplify microchip fabrication, we adopted poly(dimethyl siloxane) (PDMS) microchip and a silica membrane, which has rolls in RNA extraction fields. With silica membranes and the adhesion nature of PDMS, we could easily fabricate RNA extraction fields in the microchip. With this microchip, we successfully extracted micro RNA from cancer tumor cells. Though this is a preliminary experiment, and still has many improvement points, our device is expected to be applied for easy and fast micro RNA extraction from biological samples.

Keywords: micro RNA; microchip; silica membrane.