電気化学的なmiRNA検出技術の開発

TOSHIBA

(株)東芝　研究開発本部
研究開発センター　フロンティアリサーチラボラトリー
橋本幸二

© 2019 Toshiba Corporation

Contents

01 はじめに

02 miRNA検出技術

03 血清中miRNA測定結果

04 まとめ

© 2019 Toshiba Corporation

01

はじめに

© 2019 Toshiba Corporation

AMED国プロでの取り組み

miRNA 体液中マイクロRNA測定技術基盤開発プロジェクト

「体液中マイクロRNA測定技術基盤開発」に2014年から参画

○目的：

血液中のマイクロRNAの大規模な解析を行い、乳がんや大腸がんなど13種類のがんと認知症の早期診断マーカーを探索するとともに、医療現場で使用できる診断システムを開発する。

○開発内容：

1.患者体液中のmiRNAの網羅的解析
2.疾患横断的に解析可能なmiRNA発現データベースの構築
3.miRNA診断マーカーとmiRNA検査／診断技術の開発
4.臨床現場での使用に向けた検査システムの開発　← 東芝の担当

東芝は迅速、簡便、高感度にmiRNAを測定するシステムを開発

© 2019 Toshiba Corporation

02

miRNA検出技術

© 2019 Toshiba Corporation

開発したmiRNA検出技術

・**高感度化と短時間化**実現の為、等温増幅法であるLAMP※法を使った**miRNAの増幅技術**を開発。

※loop-mediated isothermal amplification

・**複数miRNAを簡便に同時検出**するため、複数のLAMP反応を同時に行う、電気化学的な検出原理の**miRNAチップ**を開発。

© 2019 Toshiba Corporation

miRNAのLAMP増幅

独自の長鎖化とLAMP反応でmiRNAを2時間以内に増幅

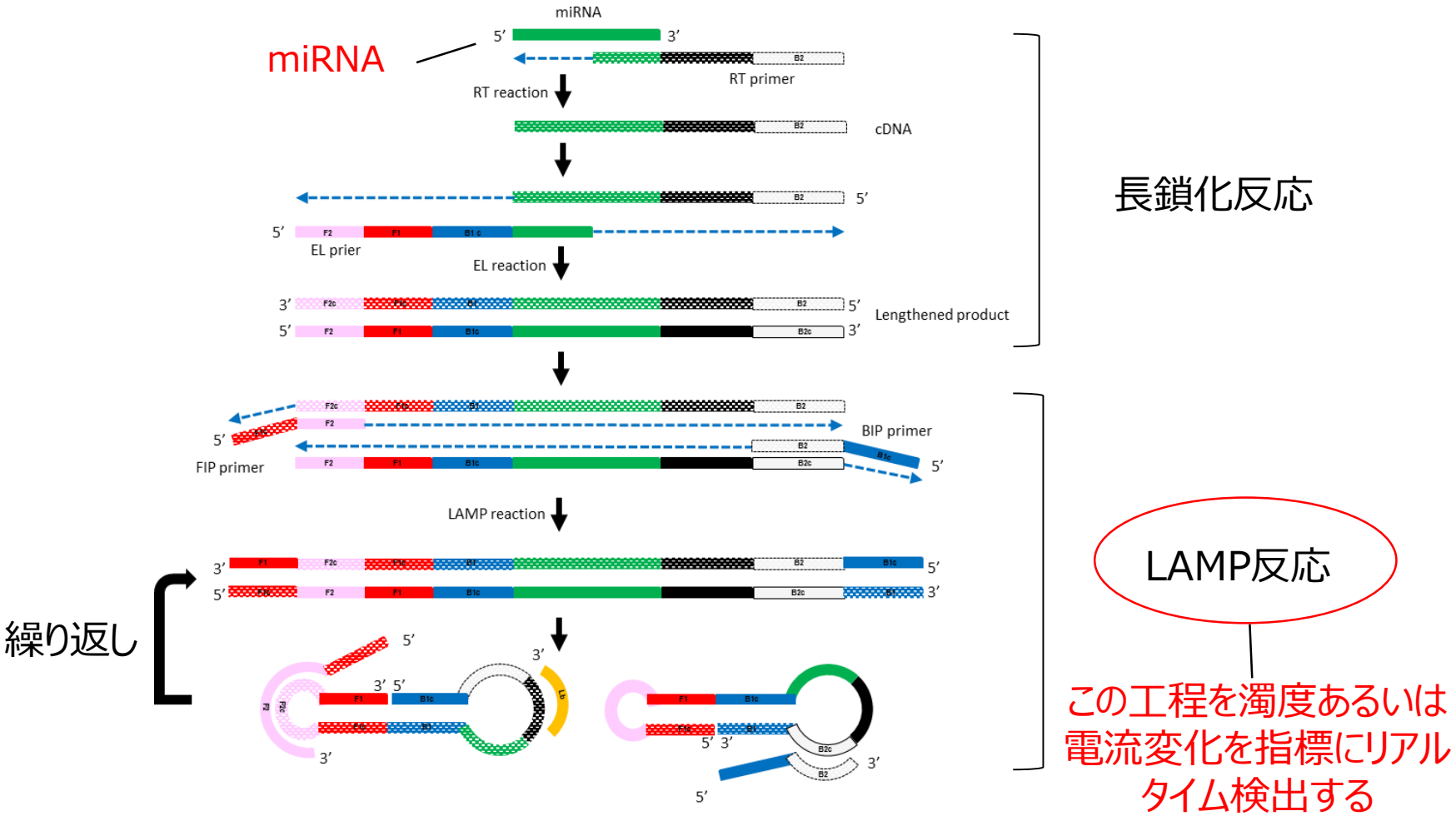


図　miRNAのLAMP増幅反応の模式図

© 2019 Toshiba Corporation

LAMP法を使ったmiRNAの簡易定量検出

- LAMP増幅反応を濁度のリアルタイム測定でモニタリング
- 初期miRNA濃度と増幅の立ち上がり時間に相関あり
- 10^3～10^6コピー/μLの範囲で定量検出できることを確認

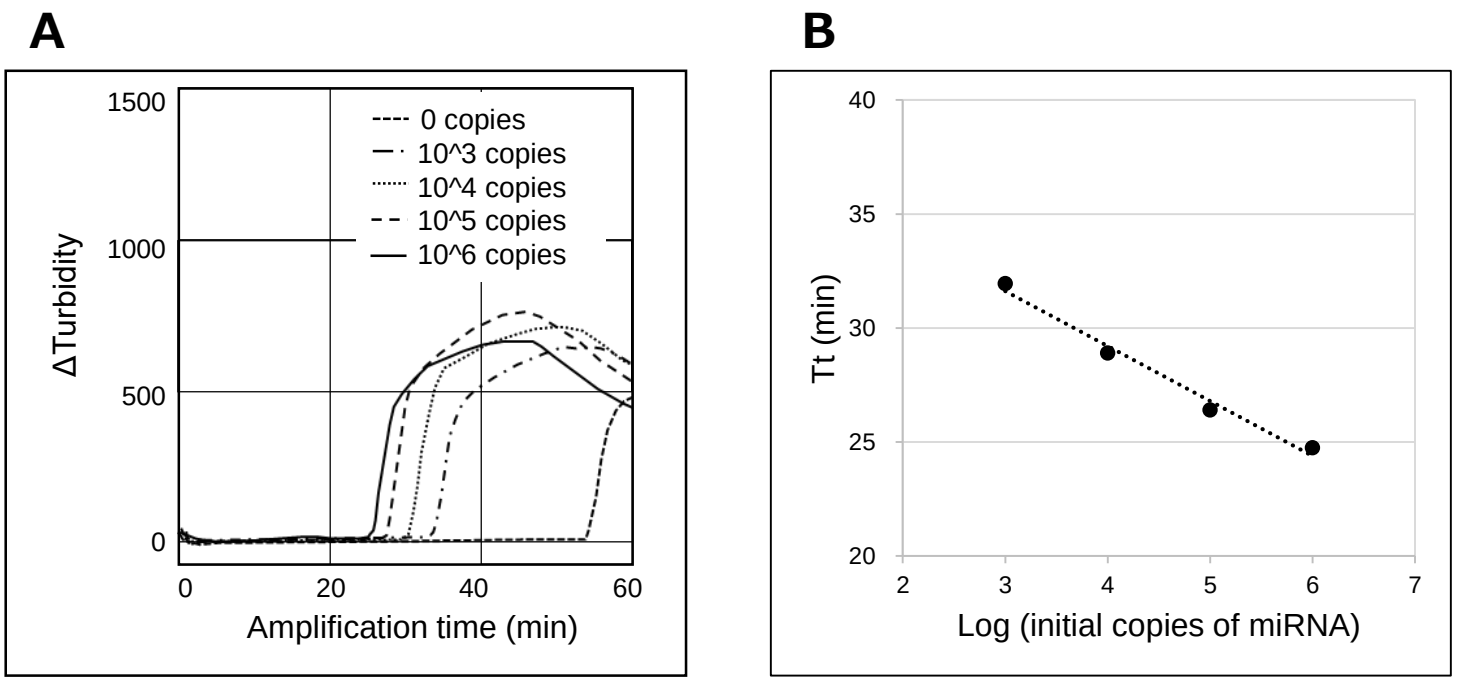


図　LAMP法を使ったmiRNA検出

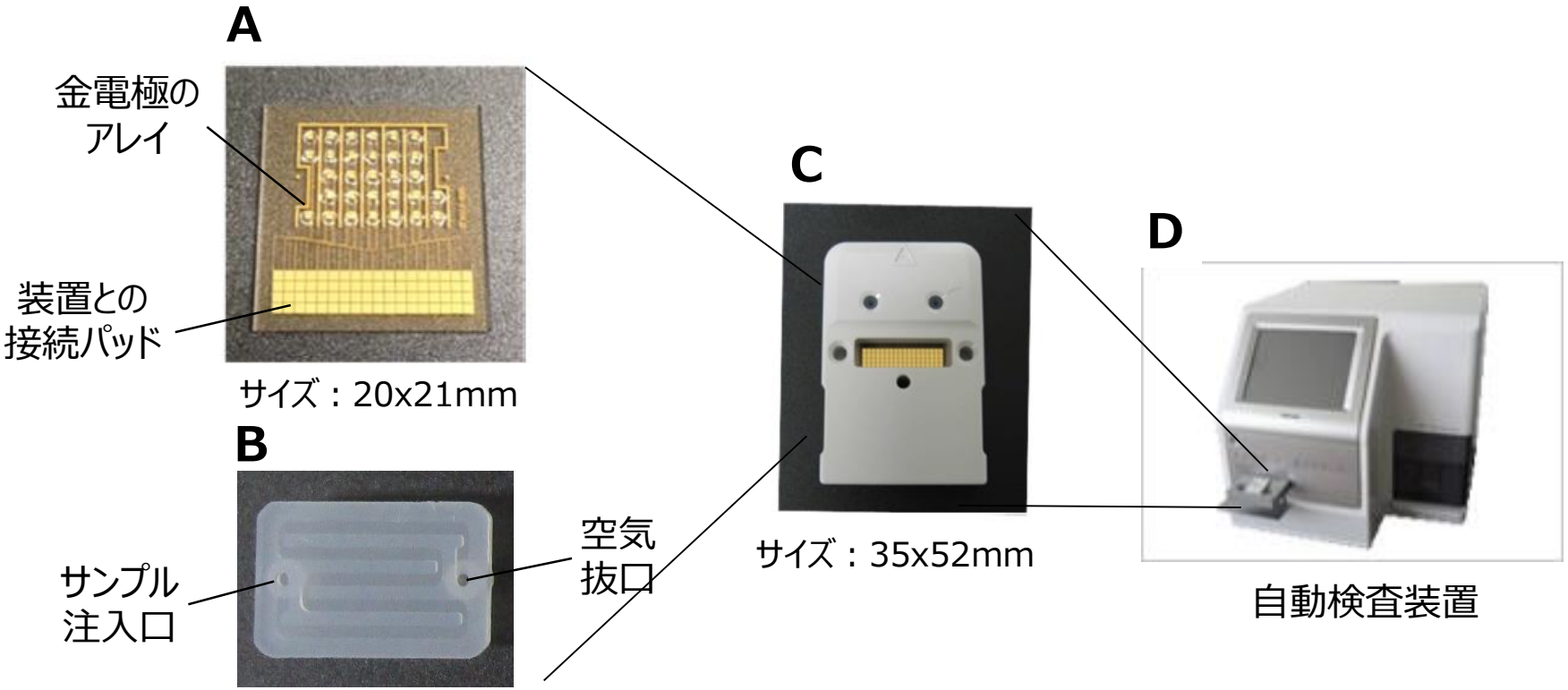
A：増幅反応中の濁度の変化

B：増幅時間と初期miRNA濃度の関係

© 2019 Toshiba Corporation

miRNAチップ

・測定簡便化と複数miRNA同時検出を実現するため専用のチップを開発
・東芝オリジナルの電気化学的検出技術を採用



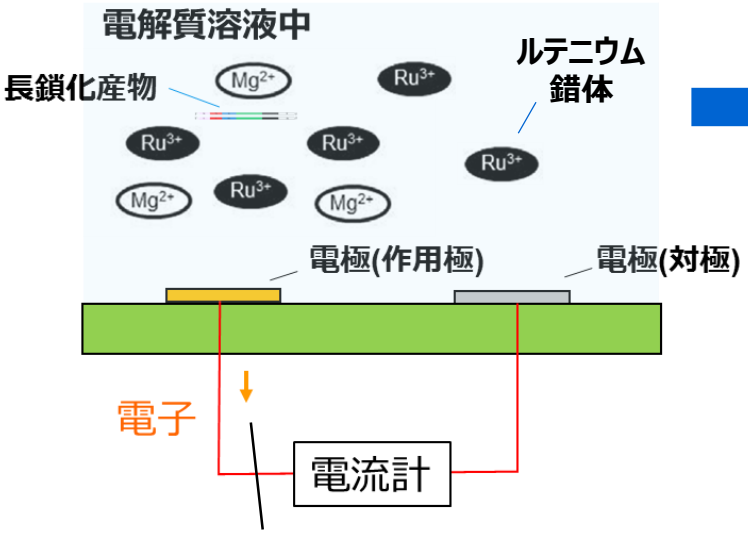
A：金電極をパターニングしたガラス基板。この上でmiRNAの検出を行う(miRNAチップ)
B：LAMP増幅を行うための流路パッキン
C：miRNAチップを保持するための使い捨てカセット
D：miRNAチップを測定するための自動検査装置

© 2019 Toshiba Corporation

電気化学的検出技術の原理

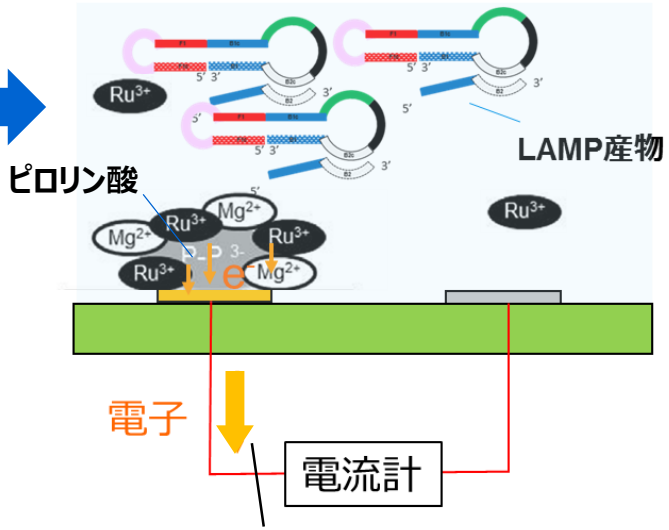
ルテニウム錯体を使用することで、LAMP反応の電気化学的なリアルタイム検出を実現

LAMP増幅前



電流はほとんど流れない

LAMP増幅中



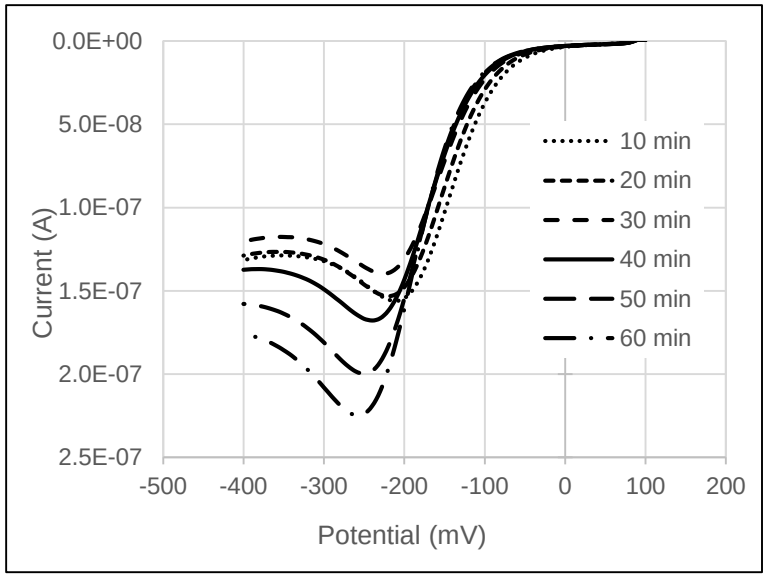
ﾙﾃﾆｳﾑ錯体が副生成物のﾋﾟﾛﾘﾝ酸と反応し電極上に蓄積⇒電流増加

© 2019 Toshiba Corporation

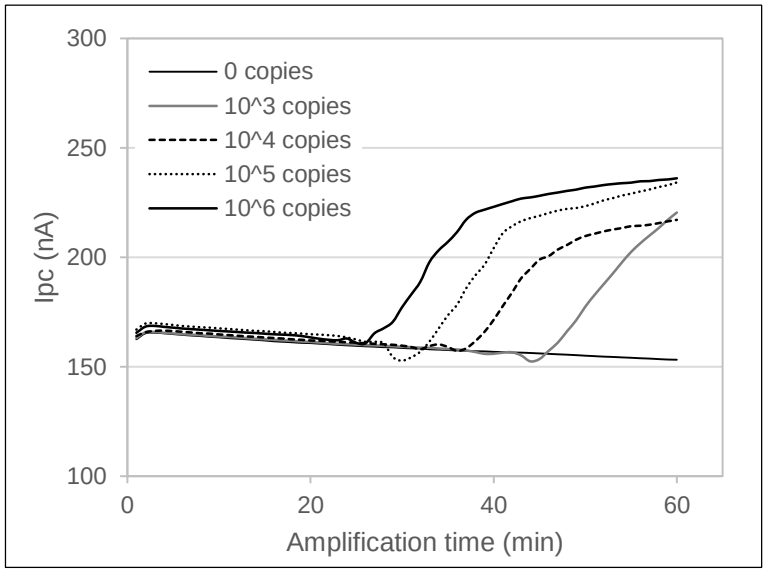
電気化学的なmiRNA検出

・LAMP増幅反応をRuHex※還元電流のリアルタイム測定でモニタリング
・初期miRNA濃度と増幅の立ち上がり時間に相関あり

A



B



※ルテニウムヘキサアミン

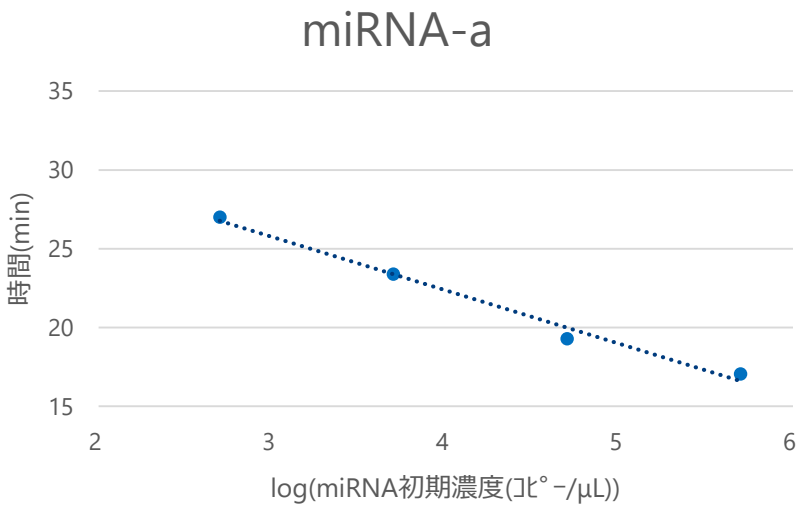
図　電気化学的なmiRNA検出

A：増幅反応中の電流-電位曲線の変化
B：増幅時間に対する電流値の変化

© 2019 Toshiba Corporation

チップを使った複数miRNAの定量検出

7種類のmiRNAを同時に定量検出できることを確認



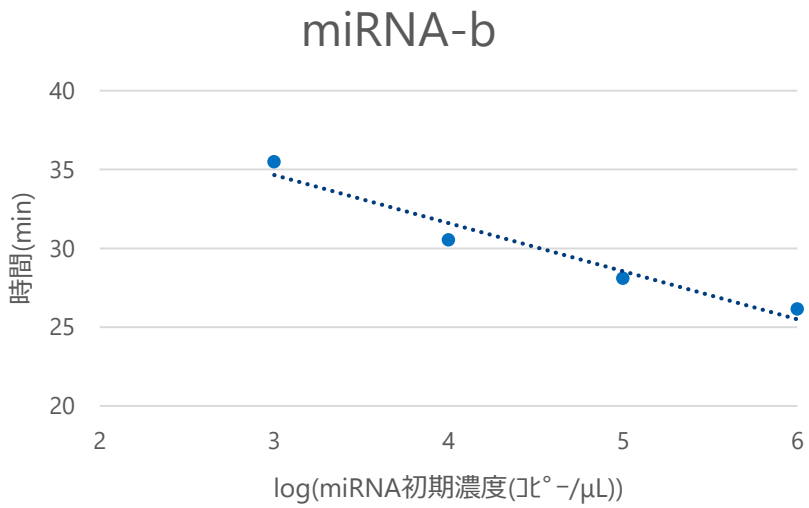


図　初期miRNA濃度と電流変化時間の関係

© 2019 Toshiba Corporation

03

血清中miRNA測定結果

© 2019 Toshiba Corporation

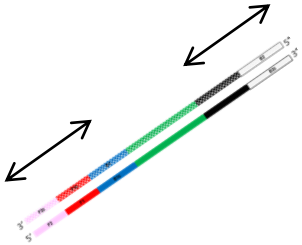
検査のフロー

トータルで2時間以内の検査を実現

サンプル準備 → RNA抽出 → 長鎖化 → LAMP増幅・検出

血液など

熱簡易抽出
キット抽出など



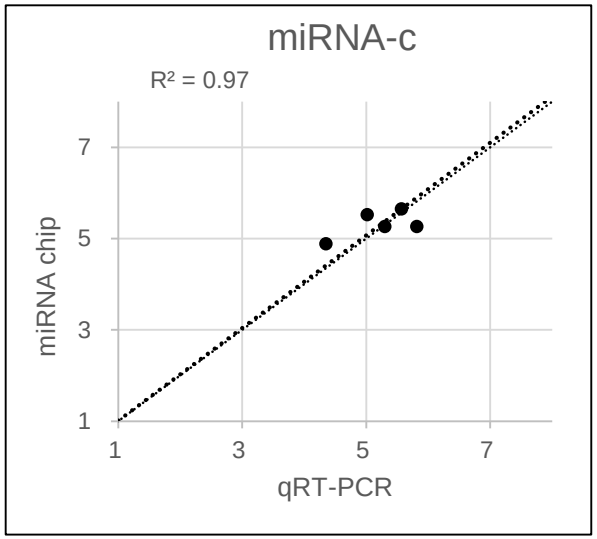
miRNAに
人工配列を付加

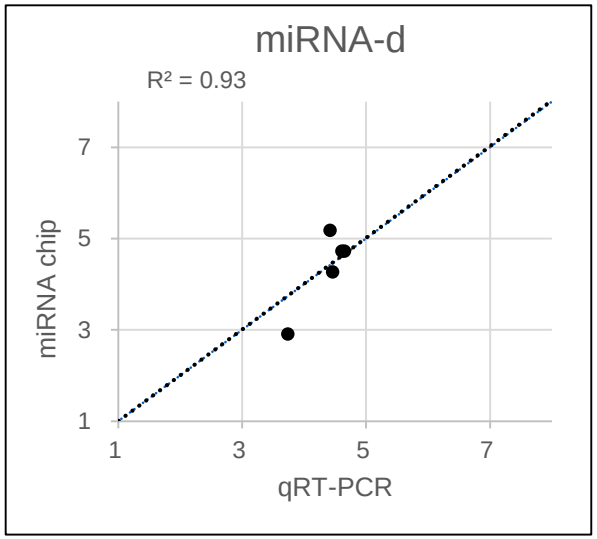
miRNAを定量検出

© 2019 Toshiba Corporation

リアルタイムPCR法の比較

miRNAチップの測定結果はqRT-PCRと良好な相関を示した





単位：log(miRNA初期濃度)

図　血清中miRNAの定量検出結果

© 2019 Toshiba Corporation

まとめ

・miRNAの簡便、迅速、高感度検出を可能にするLAMP増幅系を開発した。

・複数miRNAの同時検出を実現するmiRNAチップを開発した。

・血清中のmiRNAを測定した結果はリアルタイムPCRと良好な相関を示した。

© 2019 Toshiba Corporation

TOSHIBA

ご清聴ありがとうございました

© 2019 Toshiba Corporation