

臨床現場での使用に向けた検査システムの開発
“RNAに特異的な核酸プローブを用いた
PCR不要miRNA測定システム”

アークレイ株式会社
国立大学法人 京都工芸繊維大学

体液中マイクロRNA測定 技術基盤開発プロジェクト

がん患者血清中のmiRNA 2500配列（知られている全て）を測定して
がんと配列の関係をはっきりさせる。**診断システム（試薬・装置）も開発する。**

「体液中マイクロRNA測定技術基盤開発」（2014～2018）



- 網羅的解析
 - ・ 国立がん研究センター
 - ・ 国立長寿研
 - ・ 東レ

- 診断システム開発
 - ・ **アークレイ株式会社**
 - ・ **京都工芸繊維大学**
 - ・ 東レ
 - ・ 東芝
 - ・ P S S

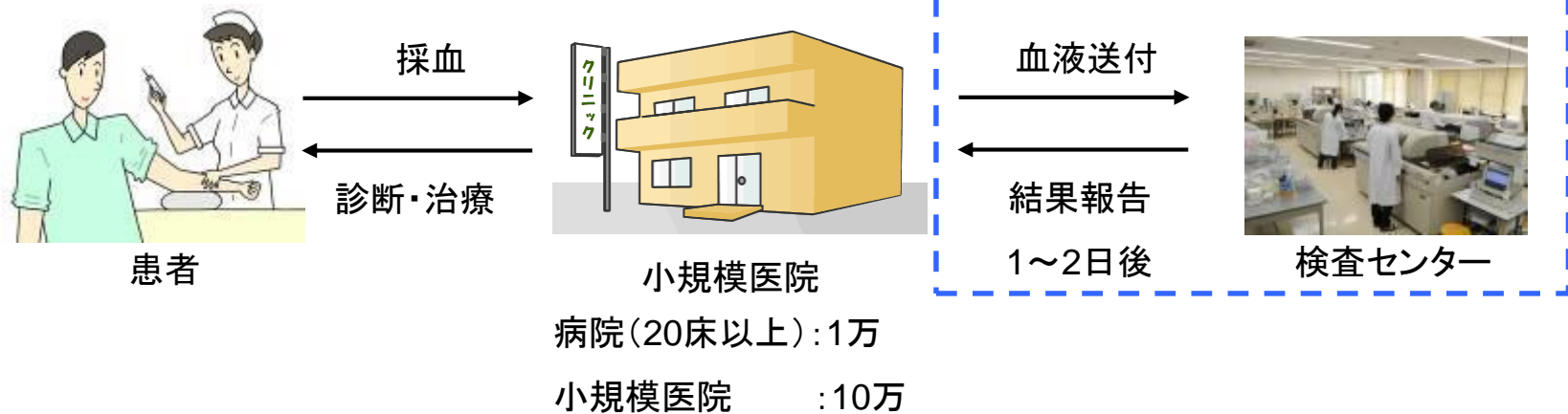
ユーザーフォーラムによるデータベース活用と創業、産業化

Table of contents

1. miRNA測定システムの特徴
2. システムの構成
3. miRNA測定結果
4. まとめ、今後の事業化目標および課題

1. miRNA測定システムの特徴

現行の血中核酸検査の流れ



利用されている技術

逆転写反応、qPCR、シーケンサー、マイクロアレイ
(すべて国外で開発された技術)

改善すべき点

- 検査結果が患者様の手元に届くまでにタイムラグが有る
- 安定したデータをえるためにトレーニングが必要

1. miRNA測定システムの特徴

プロジェクトの目標:

小規模医院でも導入可能な、miRNAを対象としたPOCT(Point of Care Testing)の開発。

再現性（信頼性）が高く安価・簡便・即時に測定可能

miRNA測定システムの技術的特徴： 酵素反応の排除

酵素反応を利用した遺伝子増幅、サンプルのラベル化
(逆転写反応、qPCR, シーケンサー、マイクロアレイ)



極少量の標的miRNAを
物理的に濃縮して蛍光測定

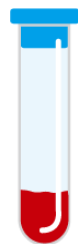
1. miRNA測定システムの特徴

プロジェクトの目標:

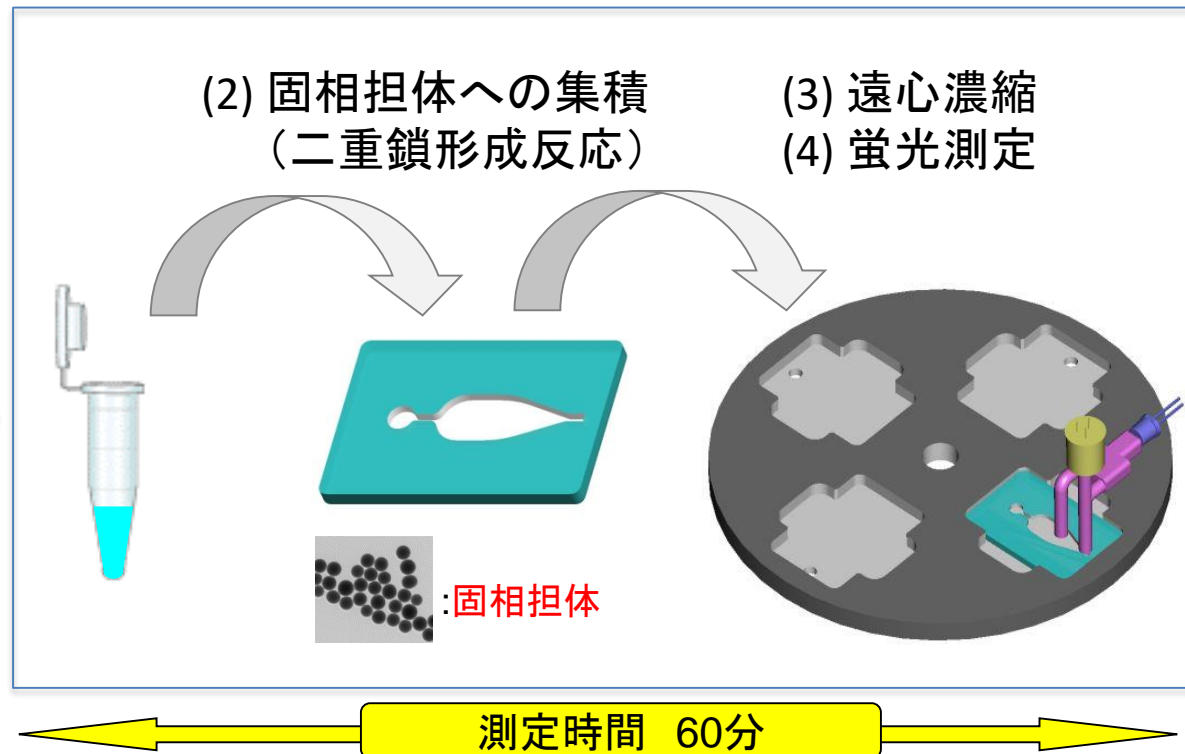
小規模医院でも導入可能な、miRNAを対象としたPOCT(Point of Care Testing)の開発。

miRNA測定システムの概要:

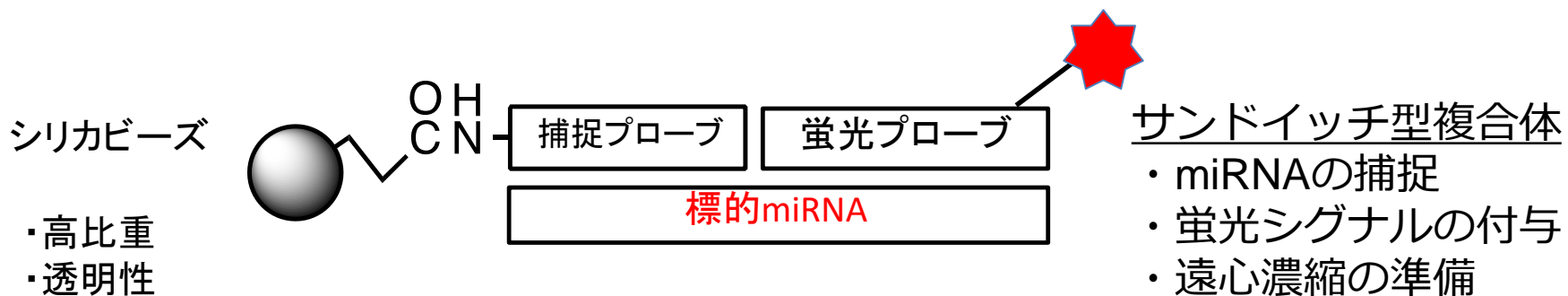
- ① (1)miRNAの抽出、(2)固相担体への集積、(3)濃縮、(4)蛍光測定
.....増幅過程がないため、操作が簡便、かつ安価。
- ② (2)から(4)までの工程は、検査機器内において全自動で行われる。



(1) 前処理



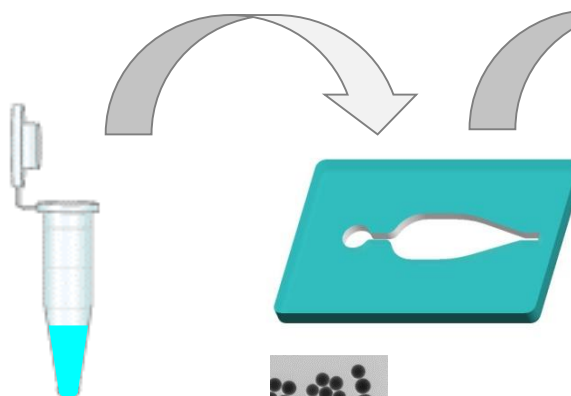
2. システムの構成; (1) 固相担体とプローブ



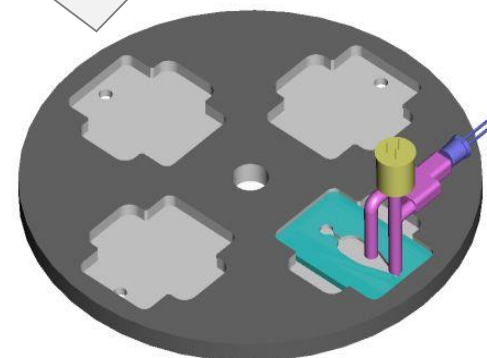
(1) 前処理



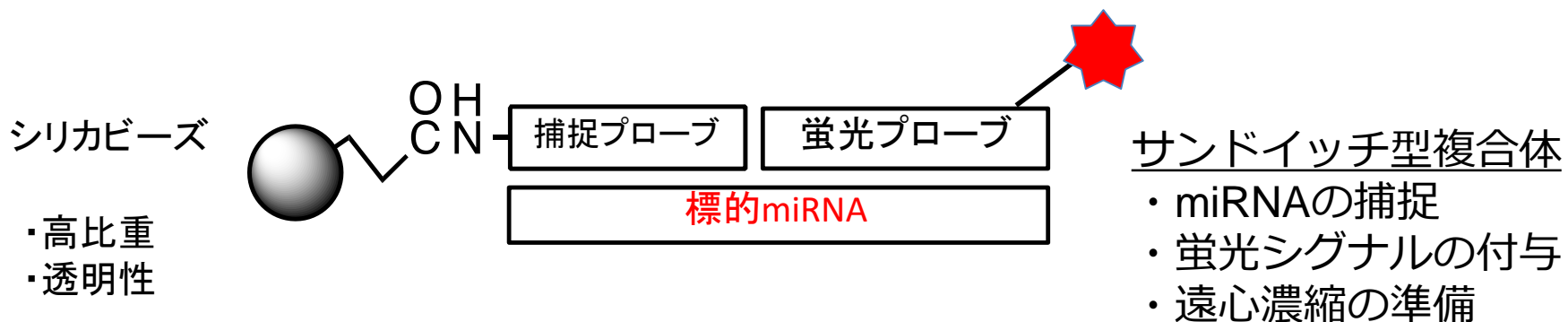
(2) 固相担体への集積
(二重鎖形成反応)



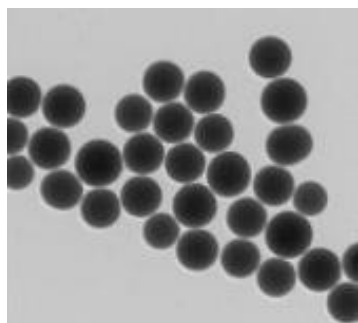
(3) 遠心濃縮
(4) 蛍光測定



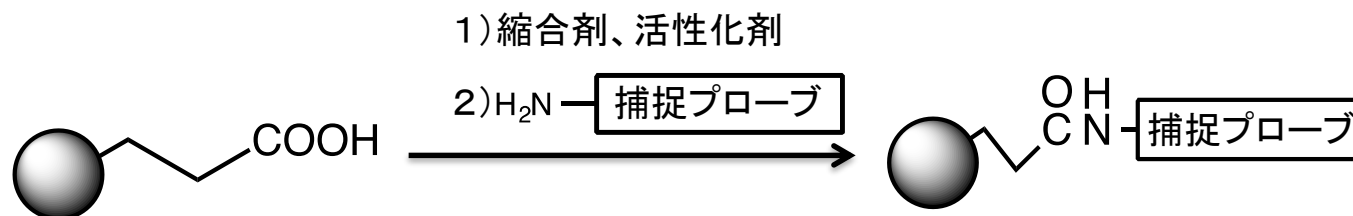
2. システムの構成; (1) 固相担体とプローブ



シリカビーズの作製

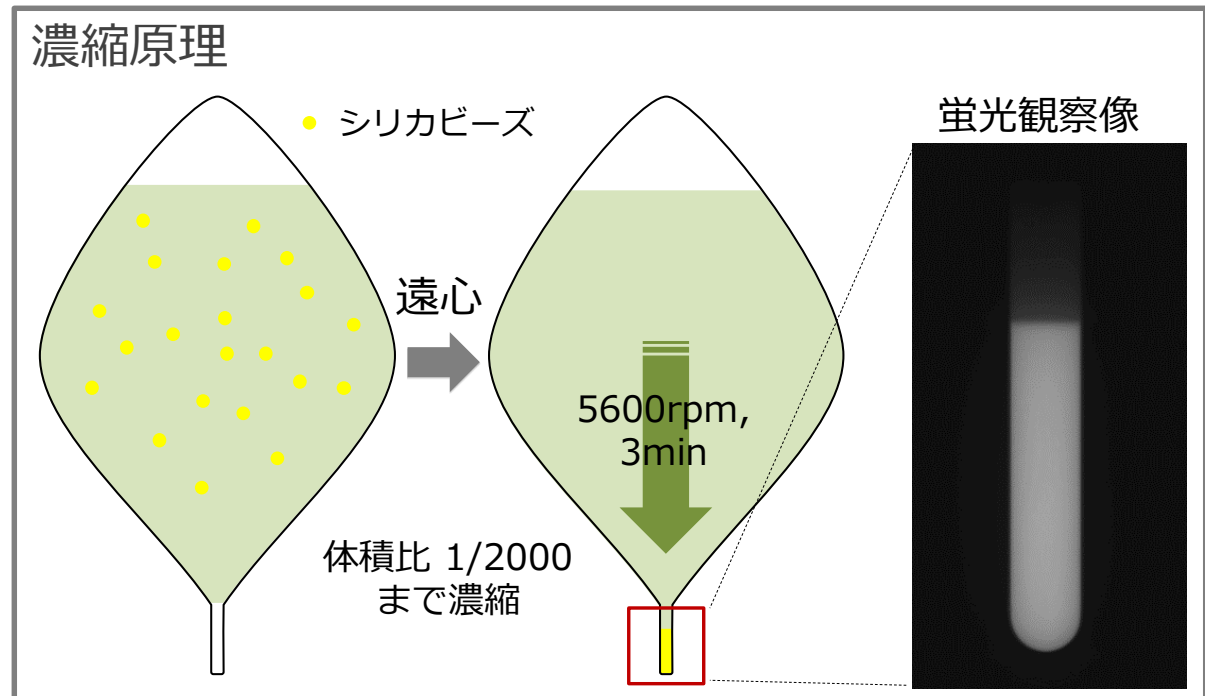
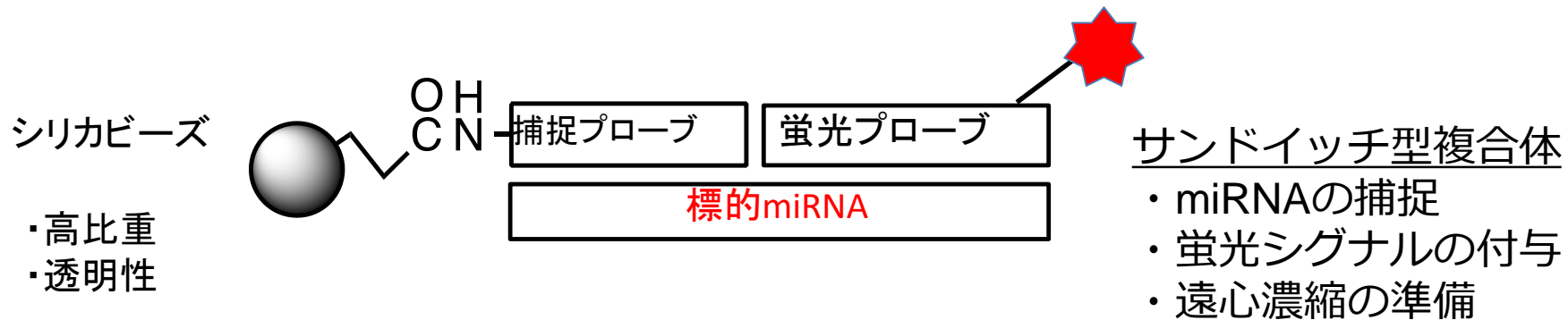


シリカゲルビーズ
(sicastar®)

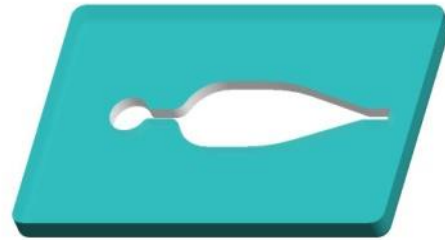


- ・化学合成品
(大量供給が可能、品質管理が容易)
- ・配列の多様性 (任意の配列を作製可能)

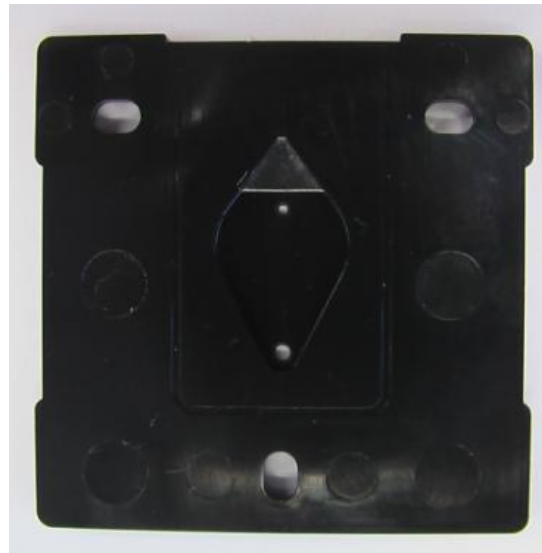
2. システムの構成; (2) 遠心濃縮と蛍光像



2. システムの構成; (3)測定用チップ



透明樹脂成形品



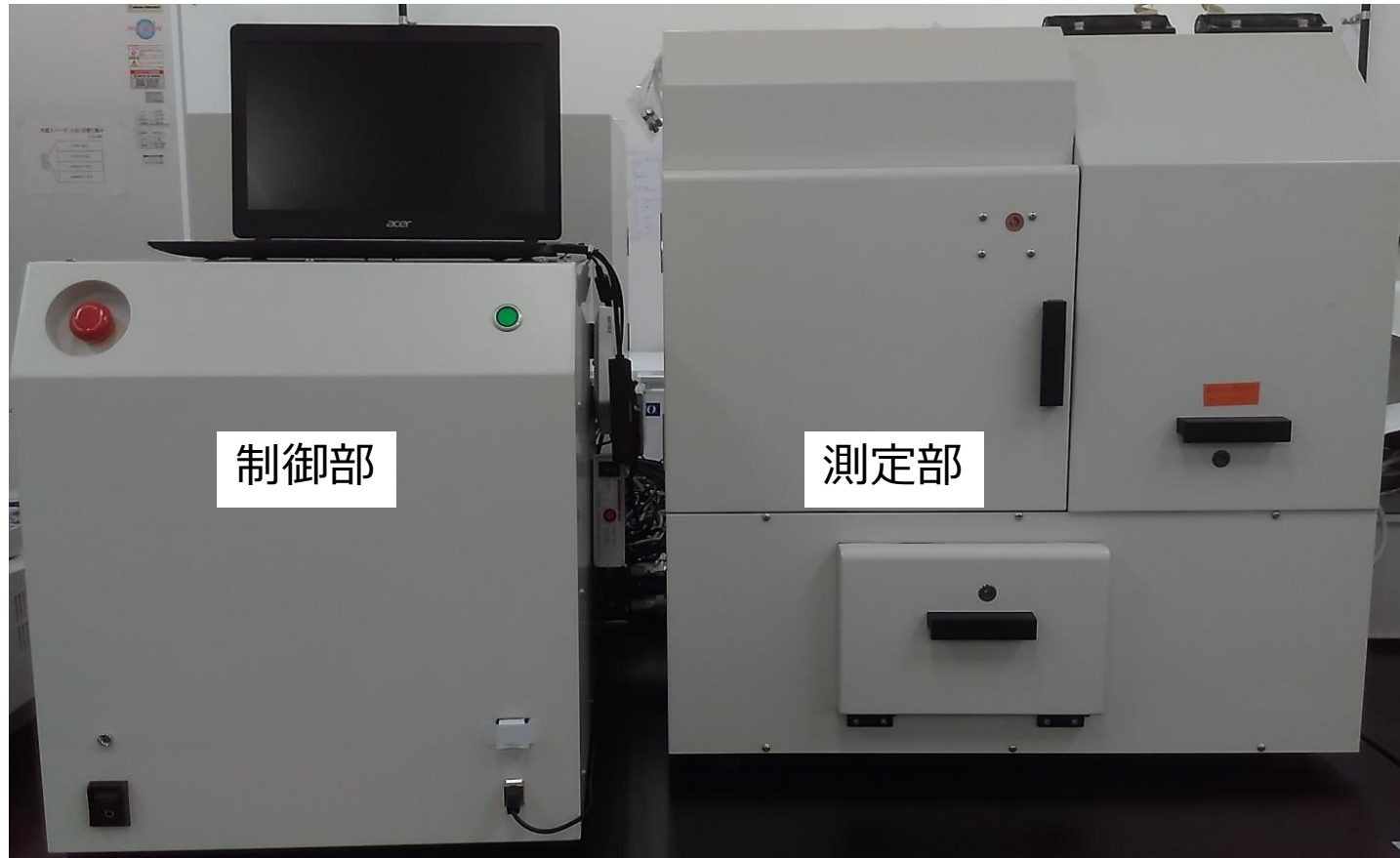
黒色成形品



4流路測定チップ

**透明樹脂に黒色添加剤を含有させることで
自家蛍光の低減に成功 (1-2%に抑制)**

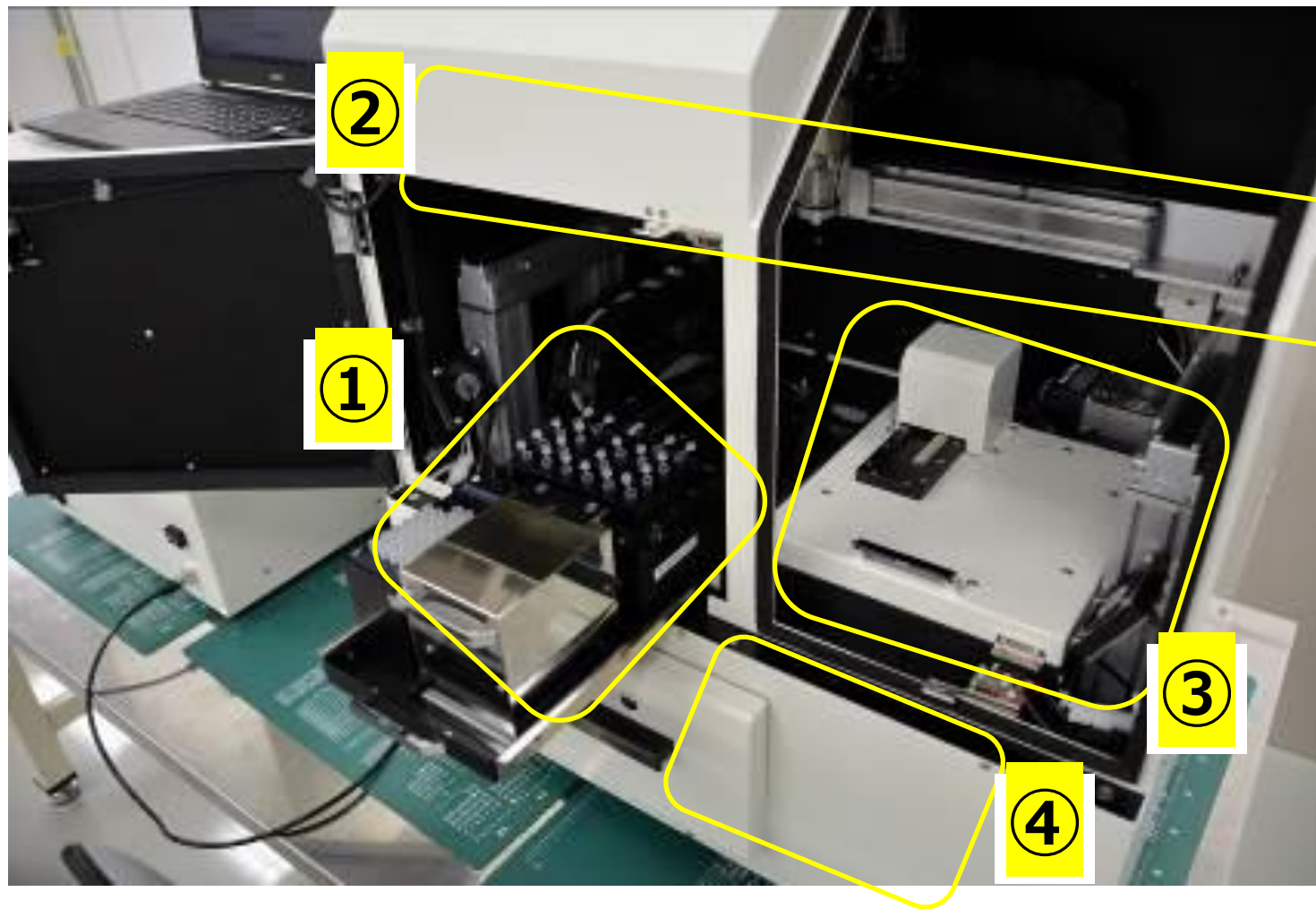
2. システムの構成; (4) 自動分析装置



プロトタイプ2号機

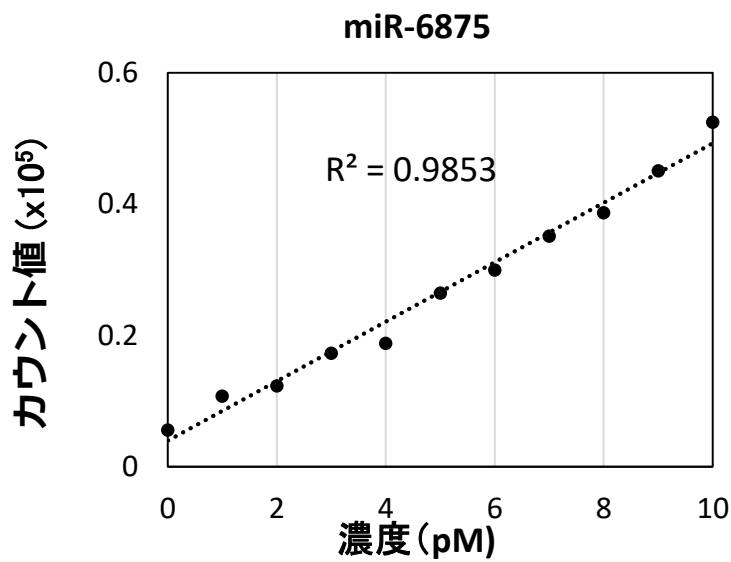
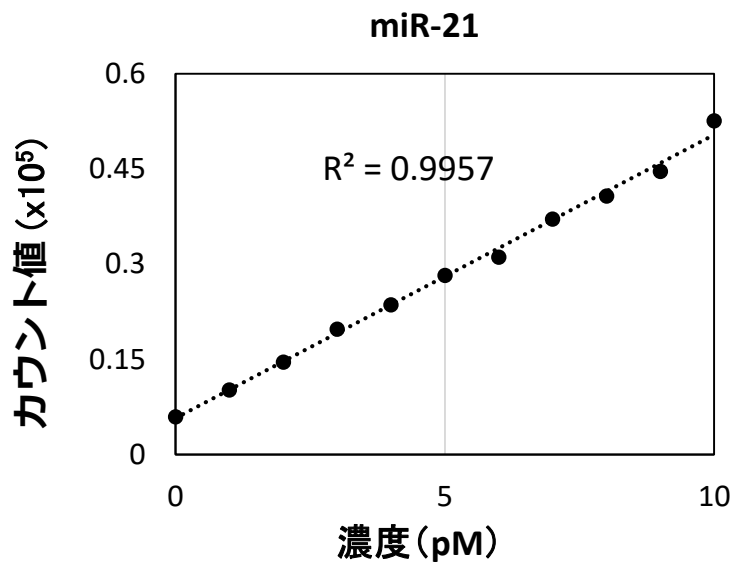
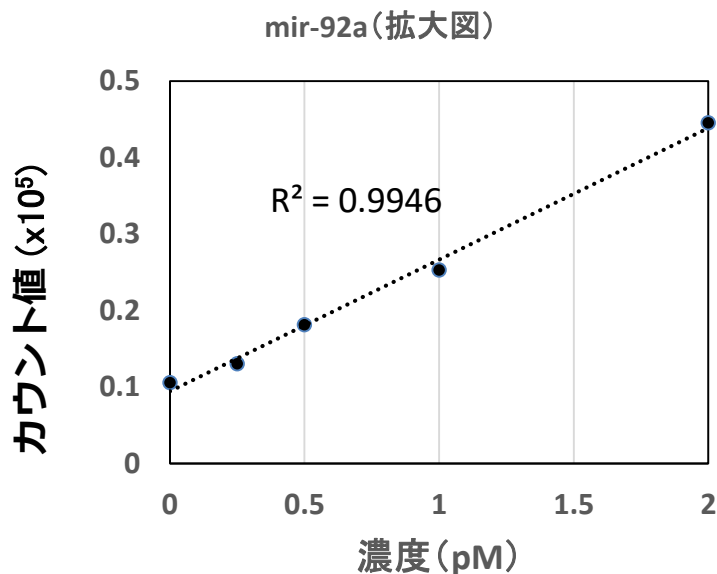
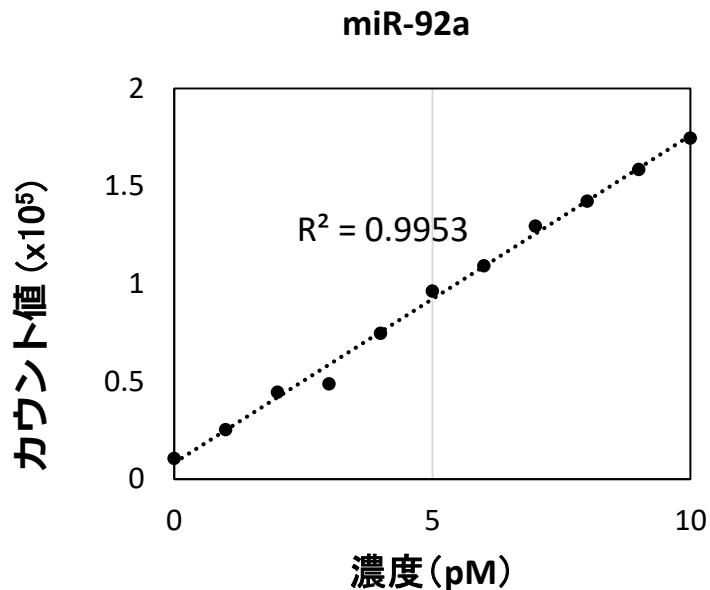
**試薬・試料室（反応・攪拌）、定量ノズル（分注）
遠心力濃縮、温調、蛍光測定部を併せ持つ試作装置**

2. システムの構成; (4) 自動分析装置



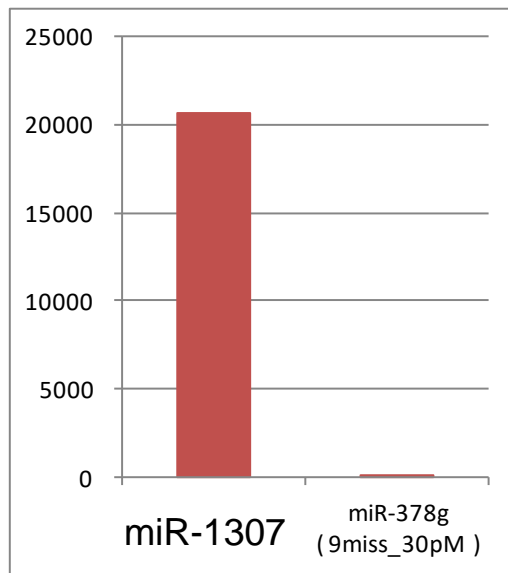
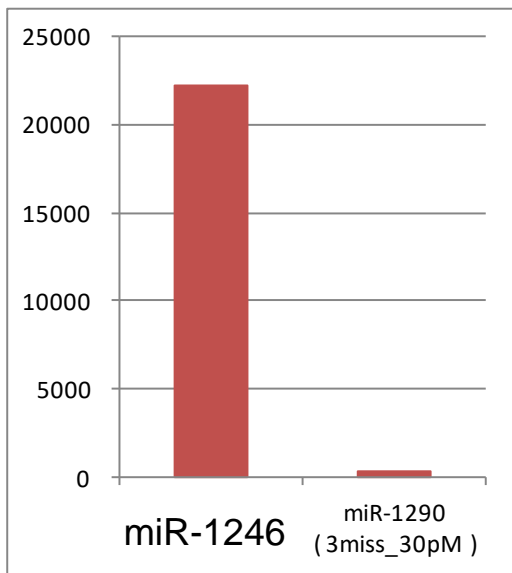
① 温調・攪拌部 ② 可動式ノズル ③ 遠心・検出部 ④ 光学系

3. miRNA測定結果__(miR92a,miR21,miR6875)



- ・ 優れた直線性
- ・ 高感度
- 最低検出感度
(200 zmol/ μ L)

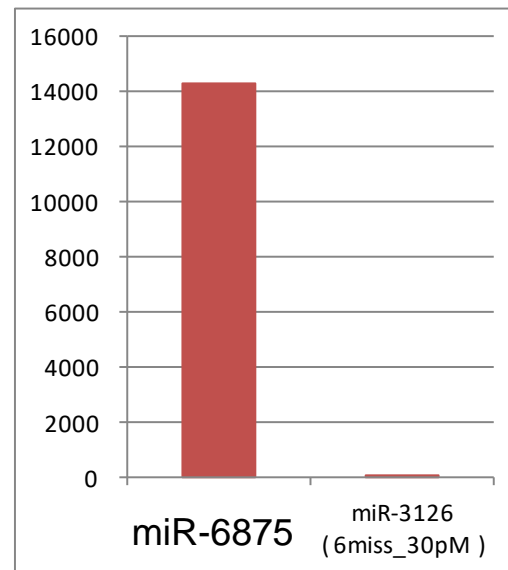
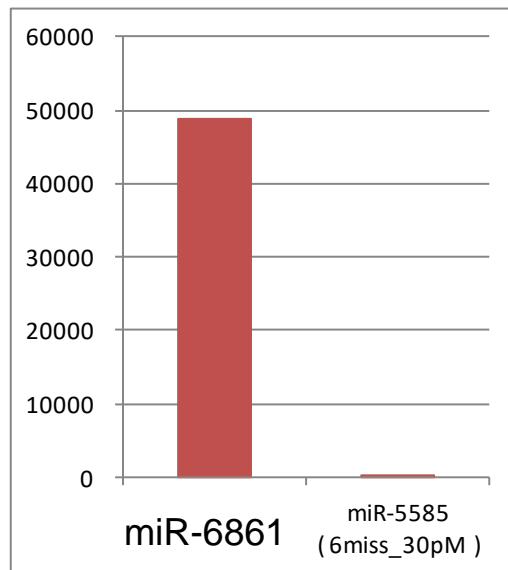
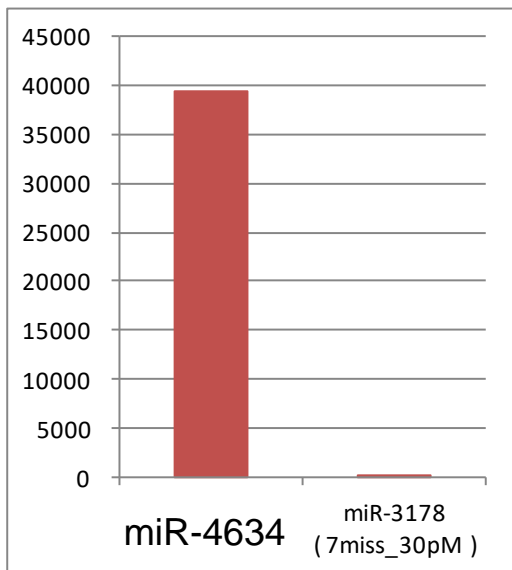
3. miRNA測定結果__ (乳がん測定用配列)



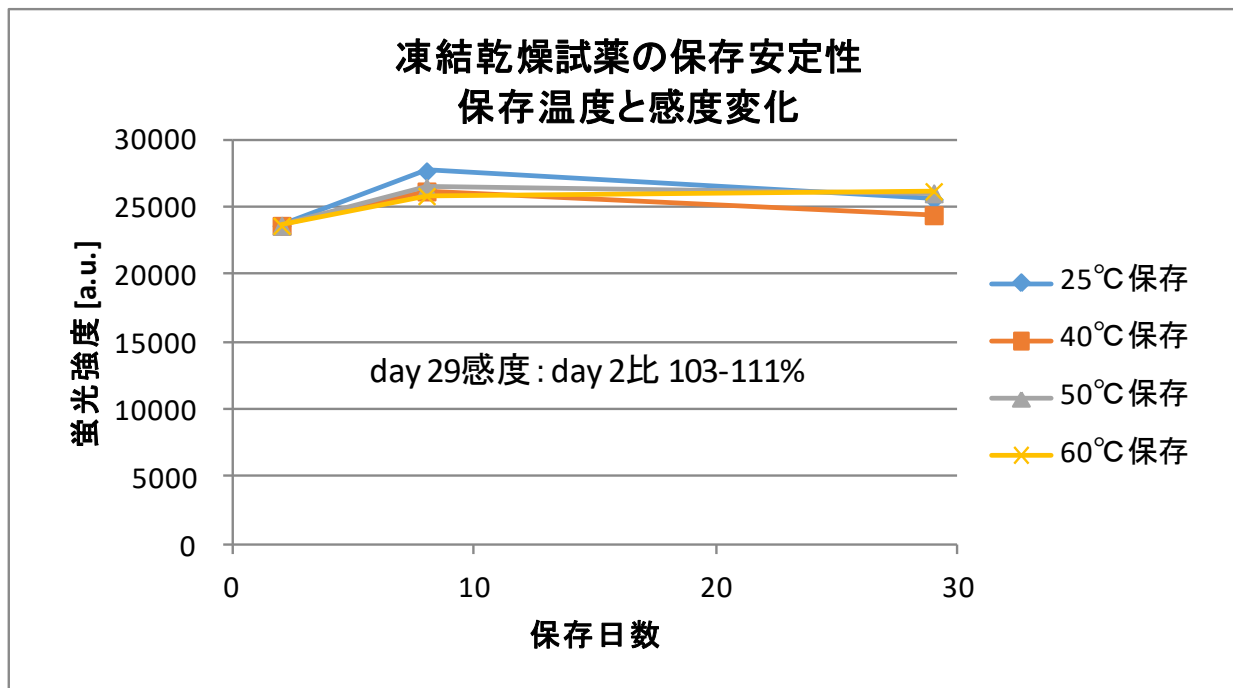
参考文献：

Cancer Sci. 2016, 107, 326-334.

類似配列 (3~9 miss)
では、perfect match の
1%未満の蛍光値



3. miRNA測定結果__試薬の安定性

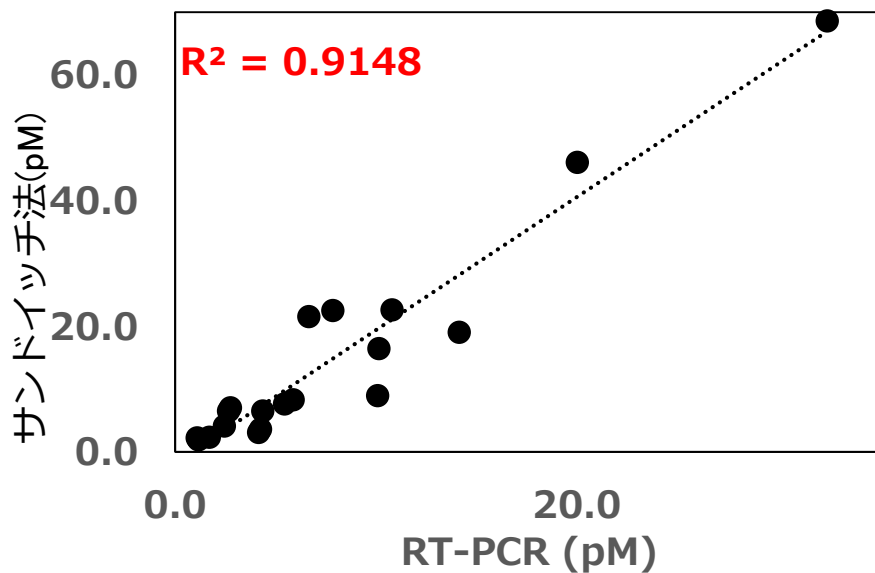


図：添加試薬の保存安定性試験

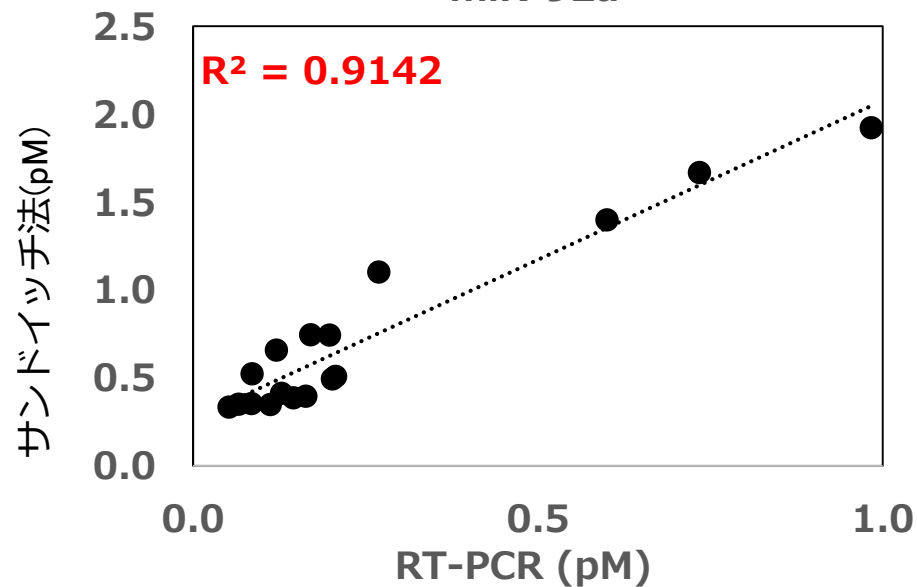
試薬の凍結乾燥により
保存安定性を確立
(室温 約4年相当)

3. miRNA測定結果__血清サンプルの測定

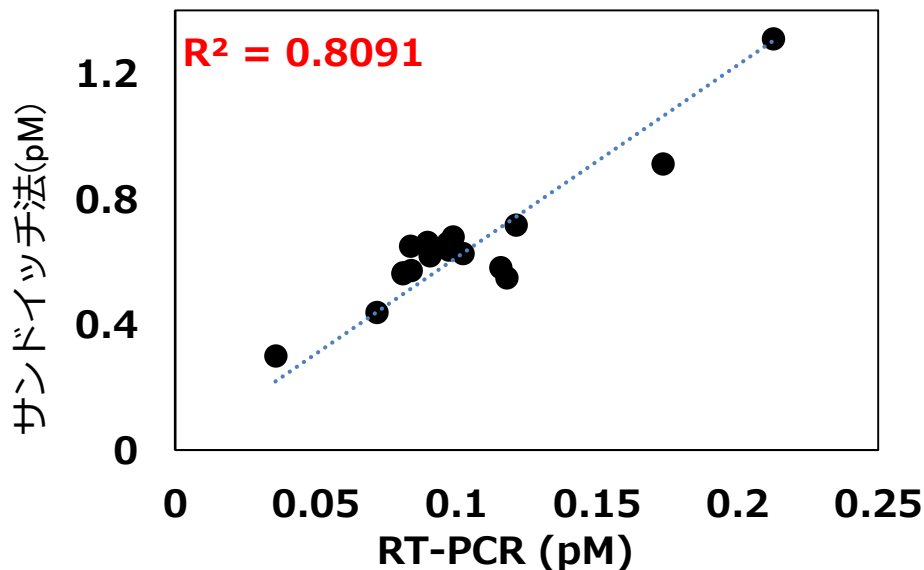
miR-451a



miR-92a



mir-20a



- ・ 血清抽出液サンプルの場合でも、サンドイッチ法とRT-PCR法のデータに高い相関性が見られる。


4. まとめ、今後の事業化目標および課題



- 全く酵素反応を用いないmiRNAの測定系の構築に成功した。
配列選択性、再現性、定量性の確保。試薬の長期保存OK。
- 新たに開発した測定系を用いることにより血清中のmiRNAの測定に成功した。
- 自動装置を開発したことにより、迅速・簡便なmiRNA測定を可能とした。
反応50分+濃縮/検出 192 tests/hour (16 tests/5 min)

4. まとめ、今後の事業化目標および課題

**確定したmiRNA診断マーカーを用いて、
測定試薬の項目開発等、事業化検討を開始する計画である**

	現在	H30年度末	H31年度～
AMED Project	網羅的解析（冷凍血清） がんマーカー候補の開示	新鮮血清での前向き臨床試験	miRNA診断マーカー
ARKRAY	試薬・機器の開発	・試薬の高感度化 ・血清での性能検証	 事業化へ

- 検査用試薬類、測定キットの開発
 - ・ 保存安定性検討
 - ・ 量産化検討
- 自動化測定装置の開発
 - ・ ユーザビリティ向上（誰でも簡単に使える全自動装置）
 - ・ システム評価