

シングルセル解析に向けた DNA 増幅マイクロデバイスの構築

Development of the microdevice for DNA amplification toward single cell analysis

精密工学専攻 48号 増田有行
Tomoyuki Masuda

1. 研究背景

人のゲノムには約 2 万の遺伝子が存在するが、塩基配列の違いや、どの遺伝子がどれだけ発現するかによって細胞の性質や機能が大きく変化する⁽¹⁾。そのため、1 細胞レベルで遺伝子やその発現量を調べることができれば、細胞のがん化メカニズムの解明や、それに関連する診断・治療法の開発に貢献することができるかと期待されている。

1 細胞レベルで遺伝子解析を行うには、微小な区画に 1 つずつ細胞を封入し、個別に分析するのが最もシンプル且つ効果的である。この際に、細胞に含まれる DNA 量は少ないため、解析には多くの場合増幅反応を行う必要がある。これを行える 1 細胞解析装置は既に市販されているが、専用のプラットフォームを必要とするため解析コストが高くなるという問題がある。我々は、一般的な研究室が所有する汎用機器だけで 1 細胞解析を行える手法を提案・開発している。これまでに、直径 400 μm 、深さ 100 μm の微小区画を備えたマイクロチャンバーデバイスを用い、その内部で DNA 増幅が可能であることを示してきた⁽²⁾。このデバイスでは、1 cm^2 辺りに 100 個程度のチャンバーが配置されているが、1 チャンバーに 1 細胞の封入を担保するためには平均で 0.1 細胞/チャンバーの濃度に希釈する必要があり、多数の細胞を同時に解析することに難がある。一方、解析する細胞密度を上げるためにチャンバー体積を小さくすると、分析液の導入が困難になることに加え、チャンバー内壁への分子の吸着などによって反応阻害が引き起こされる懸念がある⁽³⁾。本研究では、細胞と同程度の直径を有するマイクロチャンバー内へ分析試薬を簡便に導入する方法を検討し、加えて、チャンバー内でゲノム増幅反応を行うことを試みた。

2. デバイスの作製

チャンバー内に 1 細胞を効率よく捕捉するためには、チャンバーと細胞の体積が同程度であることが望ましい。しかし、その場合、分析に必要な十分な量の試薬をチャンバー内に充填できなくなる。一方で、チャンバー体積を大きくすれば、複数の細胞が補足されてしまう。このトレードオフを解消するため、細胞と同程度の体積を有する捕捉区画と試薬を充填する区画を、細いネック構造を介して接続したデザインのマイクロチャンバーを作製した。マイクロ光造形装置 (ACCULAS SI-C1000, D-MEC 社) を用いて、直径 10 μm 、長さ 10 μm のネック部をもつ直径 30 μm の円筒構造を格子状に配置した鋳型を作製した。試薬充填区画と細胞捕捉区画の高さはそれぞれ 60 μm 、30 μm とし、チャンバー間の間隔は 100 μm とした (Fig. 1 a)。作製した鋳型の電子顕微鏡を Fig. 1 (b) に示す。次に、型取りプロセスでの離型を容易にするため、鋳型表面にパリレン樹脂を 1.5 μm の厚さで蒸着した (Fig. 1 c)。シリコンゴム (PDMS) のポリマーと硬化剤を重量比 10 : 1 で混合したものを鋳型に流し込み、60 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間加熱し硬化させた。硬化後、鋳型から PDMS を離型すること

でマイクロチャンバーデバイスを得た (Fig. 2 a, b)。PDMS に転写されたチャンバーの断面形状を詳しく観察すると、ネック構造が作られていないことが分かった (Fig. 2 c)。これはチャンバー形状をデザインする際、光造形法において設計寸法以上の樹脂硬化が z 軸方向に生じる現象 (余剰成長) を考慮しなかったためと考えられる⁽⁴⁾。余剰成長を考慮し作製した鋳型およびチャンバー断面を Fig. 2 d, e に示す。鋳型および、PDMS に転写した際にネック部分が構成されていることが確認された。

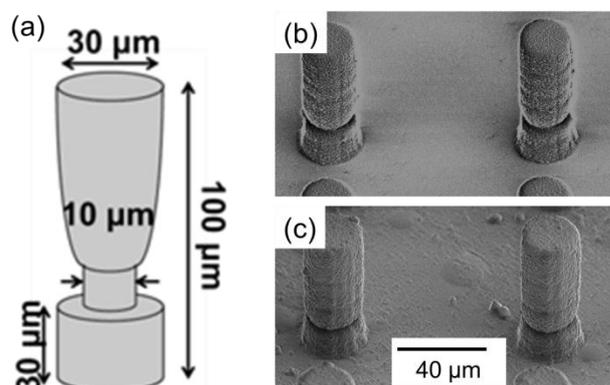


Fig. 1 (a) Dimension of the chamber design. (b) SEM image of the microchamber mold fabricated by stereolithography. (c) SEM image of the mold after parylene deposition.

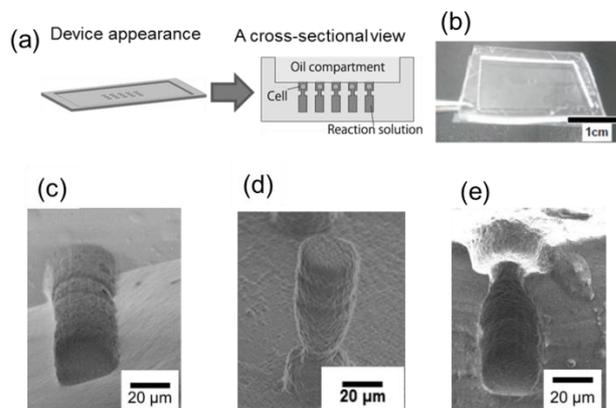


Fig. 2 (a) Schematic of the microchamber device. (b) PDMS replica obtained by releasing the cured PDMS from the mold. (c) SEM image of the cross section of the chamber after demolding. (d, e) SEM image of the mold and chamber cross section after redesigning.

3. 溶液の封入・保持の確認

3.1 溶液封入

マイクロチャンバーのサイズが小さくなると、表面張力の影響で反応液の封入が困難になる。そこで、蛍光色素 (カルセイン) の水溶液を用いて、チャンバー内に溶液をどの程度封入できるのかを調べた。PDMS 製デバイスの表面は疎水性であるため^(5, 6)、酸素プラズマを 3 分間照射し親水化処理を

行った (Fig. 3 a). その後, カルセイン水溶液を滴下して 10 分間静置し, チャンバー内へ溶液を導入した (Fig. 3 b). 続いて, 余剰なカルセイン水溶液を取り除き, ミネラルオイルを重層することでチャンバーを封止した (Fig. 3 c). 35°C に設定したホットガラスの上にデバイスを置いて加温し, 蛍光顕微鏡で蛍光観察を行った (Fig. 3 d). 溶液封入後のチャンバーの蛍光顕微鏡写真を Fig. 4 (a) に示す. ほとんどのチャンバーにカルセイン水溶液が封入されているが, 一部のチャンバーには水溶液が封入できておらず, また, 気泡が残留している様子も観察された. これは, 水溶液の表面張力が大きいために, チャンバー内に溶液が十分入らなかったことが原因だと考えられる. そこで, カルセイン水溶液に界面活性剤 Triton X-100 を 1 wt% になるように加え, 溶液の表面張力を低下させた. これを用いて封入実験を行ったところ, 全てのチャンバーにカルセイン水溶液を封入させることに成功した (Fig. 4 b). このとき, 気泡の残留も見られなかった. 以上の結果から, マイクロチャンバーに効率よく溶液を封入するには, 界面活性剤を添加するのが有効な方法であることが分かった. ネック構造を持つチャンバーを使用して溶液を封入し共焦点顕微鏡を使用して 3 次元的に撮影した写真を Fig. 4 (c) に示す. ネック構造を持つデバイスでは, 溶液がチャンバー全体に封入されている割合は 58%, ネックより下に封入されている割合が 42% であることが確認された. 実験効率を考え, 今後は, シンプルなチャンバーを用いて条件確認を行った.

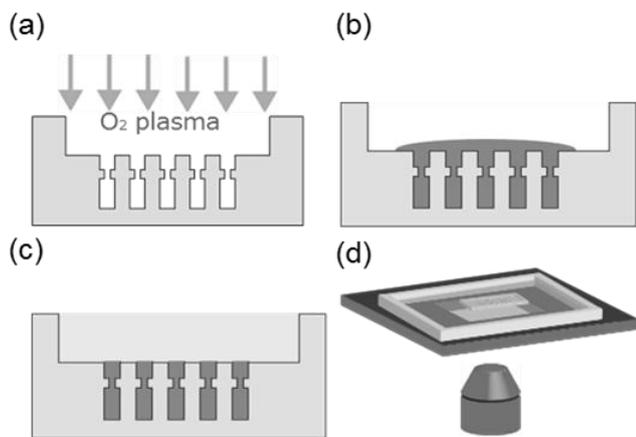


Fig. 3 Procedure for enclosing solution in microchambers.

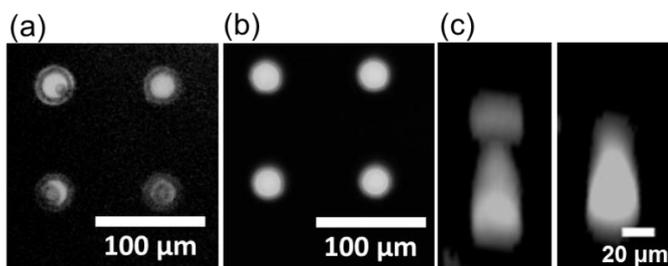


Fig. 4 Fluorescent images of microchamber. (a) Bubbles were trapped in some chambers. (b) The wettability was improved by surfactant, and bubbles were not trapped in chambers. (c) Three dimensional observation of a chamber with a neck.

3.2 溶液の保持

PDMS は多孔質材料であるため, PDMS と接触している液体は次第にその内部へ浸透していくことが知られている⁽⁷⁾. そのため, ゲノム増幅反応を観察している間に, チャンバー内の反応液が PDMS に吸収されることが予想された. そこで, 表面に物質透過性が低いパリレン樹脂を蒸着したデバイスと, 純水に一晩浸漬して水分を飽和させたデバイスの 2 種類を準備して, 溶液を長時間チャンバー内に保持できるのかを検証した. 目的とするゲノム増幅反応は, 30 °C の恒温条件下で 2 時間以上の反応時間を必要とする. そこで, 3.1 節の方法でカルセイン水溶液を封入したマイクロチャンバードバイスをガラスヒーター上に置き, 蛍光輝度の経時変化を 2 時間観察した. 各デバイスで行った実験結果を Fig. 5 に示す. パリレンを蒸着したデバイスでは, 時間の経過とともに蛍光輝度が減少する様子が観察された (Fig. 5 a, c). これは, チャンバーの構造が微細なために蒸着が不十分になり, チャンバー内部をパリレン樹脂で被覆できていなかったことが原因だと考えられる⁽⁷⁾. 即ち, チャンバー内のカルセイン水溶液が PDMS に吸収されたため, 蛍光輝度が減少した. 一方, 純水に浸漬させたデバイスでは, 蛍光輝度がほとんど変化しなかった. (Fig. 5 b, c) このことから, 純水に一晩浸したデバイスを用いることで, 封入した溶液を 2 時間以上保持できることが分かった.

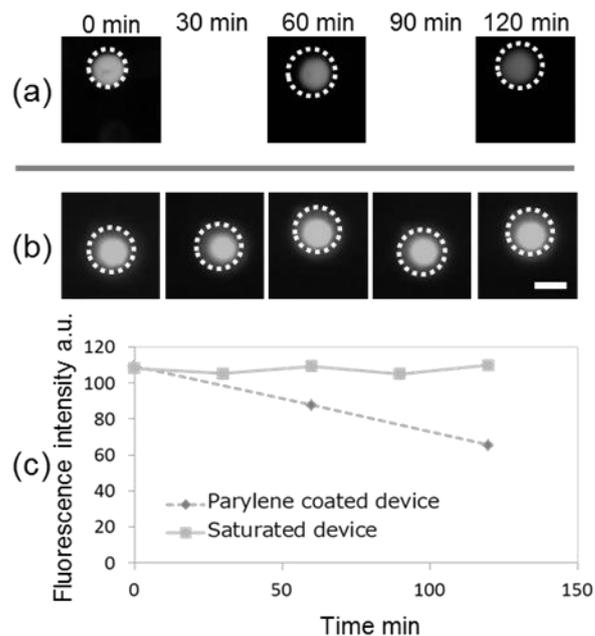


Fig. 5 Time lapse images of calcein solution trapped in a microchamber. Scale bar 30 μ m. (a) Device on which parylene was vapor-deposited. (b) Water-saturated device. (c) Time-variation of the fluorescence intensity.

4. チャンバー内での DNA 定量法の検討

4.1 デバイス表面への分子の吸着

PDMS の表面にはタンパク質などの生体分子が吸着することが知られている⁽³⁾. そこで, 蛍光標識した DNA をチャンバーに封入し蛍光輝度を経時観察することで, PDMS 表面への DNA の吸着の可能性を調べた. DNA 溶液のマイクロ

チャンパーへの封入は、3.1 節と同様の方法で行った。DNA 溶液の組成は、5 ng/μl DNA, 5× SYBR Green I, 1 wt% Triton X-100 とした。SYBR Green I は単体では蛍光を示さないが、二本鎖 DNA と結合することで緑色蛍光を呈する。30 分毎に撮影したチャンパーの蛍光画像を Fig. 6 に示す。溶液封入後 30 分まではチャンパー内が明るく光っており、輝度値にほとんど変化は見られなかった。即ち、チャンパーに DNA 溶液を問題なく維持できていることが確認された。しかし 60 分以降は蛍光輝度が減少する様子が観察された。試験管内で同様の計測をしても蛍光輝度は変化しなかったことから、これは PDMS 製マイクロチャンパーに由来する問題だと考えられる。

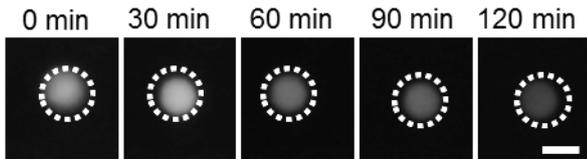


Fig. 6 Time lapse of fluorescent image in chamber. Scale bar 30 μm.

4.2 デバイスの表面ブロッキング

ゲノム増幅反応では、DNA の蛍光シグナルを長時間計測する必要があるが、4.1 節の結果はそれが難しいことを示している。その原因として DNA や SYBR Green I の PDMS 表面への吸着し、変性した可能性が疑われた。試験管や基板表面への分子吸着を抑える目的で、ウシ血清アルブミン (BSA) を用いた表面ブロッキング処理が一般的に広く行われている⁽⁹⁾。そこで、PDMS をブロッキング処理することで、DNA の蛍光シグナルを長時間に渡って一定輝度に維持できるのかを調べた。ブロッキング剤として、0.5 mg/ml BSA 水溶液、または、DNA の構成成分である 2 mM のデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) 水溶液を用いた。ブロッキング処理は、酸素プラズマを 2 分間照射したマイクロデバイスにブロッキング剤を滴下し、30 分間室温で静置することで行った。このデバイスに 3.1 節の方法で DNA 溶液 (組成は 4.1 節に同じ) を封入し、30 分毎に蛍光画像を取得した。BSA でブロッキングしたデバイスでは、Fig. 7 (a) に示したように DNA 溶液以外が明るく光る様子が観察された。この原因の詳細は明らかでないが、DNA の蛍光シグナルの検出に影響が出るため、BSA ブロッキングは本研究には適していないと結論付けた。これに対して、dNTP でブロッキングしたデバイスでは、2 時間にわたり DNA の蛍光シグナルが一定に保たれていた (Fig. 7 b, c)。このことから、dNTP でブロッキングしたデバイスを用いることで、DNA の蛍光シグナルを長時間安定して計測できることが分かった。

5. 全ゲノム DNA 増幅反応

DNA 配列解析技術の急速な発展により、1 細胞毎のゲノム配列を読み、その多様性を網羅的に解析することが可能になってきた。このとき、細胞内にゲノムは 2 コピーしかないため、配列を読むためには千倍以上に増幅する必要がある。本研究では、φ29 DNA ポリメラーゼを用いた等温全ゲノム増幅反応を用い、マイクロデバイスの微小区画内で DNA 増幅が効率的に起こる条件検討を行った。

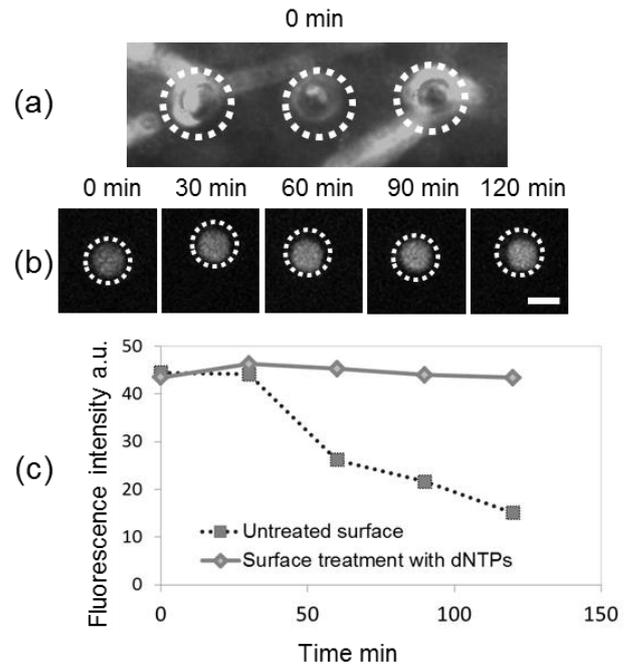


Fig. 7 (a) Fluorescent image of the microchamber with BSA blocking enclosing DNA. (b). Time lapse of fluorescence image of the microchamber with dNTP blocking. Scale bar 30 μm. (c) Time variation of the fluorescence intensity in the microchamber.

5.1 等温全ゲノム増幅反応の原理

等温全ゲノム増幅反応の原理を Fig. 8 に示す。鋳型となる一本鎖 DNA の複数箇所に、DNA 複製の開始点となる核酸の断片 (プライマー) が結合すると、ここを起点として DNA ポリメラーゼによって相補鎖が合成され二本鎖 DNA が作られていく。この反応が進むと、ポリメラーゼは他のポリメラーゼによって合成された二本鎖部分に行き当たるが、その二本鎖を解離させながら更に合成が進められる。このとき解離した一本鎖 DNA にプライマーが新たに結合することで DNA 合成が繰り返され、鋳型 DNA 全体が増幅される。一般的な DNA 増幅法であるポリメラーゼ連鎖反応では反応温度を約 90 °C と 60 °C の間で上下させる必要があるが、等温全ゲノム増幅反応では 30 °C の恒温条件下で反応が進行する。

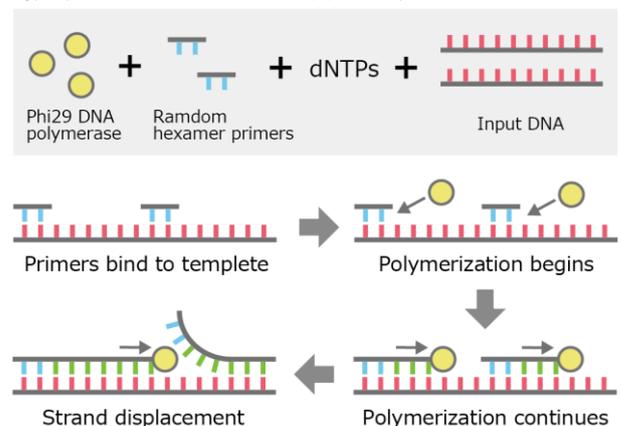


Fig. 8 Schematic of the whole genome amplification (WGA) reaction.

5.2 実験方法

ゲノム増幅反応の試薬として、illustra GenomiPhi DNA Amplification Kit (GE Healthcare 社) を用いた。これにはプライマーや DNA ポリメラーゼ、dNTP などの反応に必要な試薬類が全て含まれており、規定の分量で混合することで反応液を調製できる。ここに、鋳型 DNA として T4 ファージのゲノム DNA を 10 ng/ μ l の濃度に加え、更に、10 \times SYBR Green I、1 wt% Triton X-100、100 nM 蛍光標識トランスフェリンを添加した。蛍光標識トランスフェリンは増幅反応には関与せず、溶液の体積に応じて一定輝度の赤色蛍光を示すため、封入反応液の体積指標として用いた。デバイスは、純水に一晩浸漬し dNTP ブロッキングを施したものを使用した。このデバイスに 3.1 節の方法で反応液を封入し、30 $^{\circ}$ C で反応させた。比較のため同じ反応を試験管内 (液量 20 μ l) でも行い、2 時間反応させた反応液をデバイスに移し替えて蛍光輝度を観察した。

5.3 実験結果

反応液の封入直後 (反応開始後 0 分) と反応開始後 120 分のデバイスの蛍光画像を Fig. 9 に示す。この画像から、120 分反応させたデバイスでは、チャンバー内の蛍光輝度が上昇したことが分かる。更に、30 分毎にチャンバーを観察すると、蛍光輝度は単調に増加したことが分かった (Fig. 10)。以上の結果は、チャンバー内でゲノム増幅反応が進行したことを示している。一方、試験管内で反応させた反応液をチャンバーに封入しその蛍光輝度を調べたところ、デバイスで反応させたもの比べて 1.3 倍高い輝度を示した。蛍光輝度はチャンバーに含まれる DNA の総量に比例することから、デバイスでのゲノム増幅の反応効率はチューブ内反応に比べて 76.4% であることが分かった。

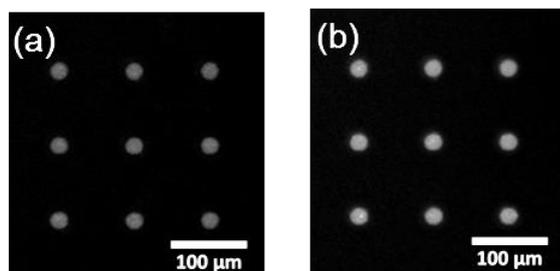


Fig. 9 Fluorescent image of microchambers containing WGA reaction. (a) 0 min and (b) 120 min after introduction.

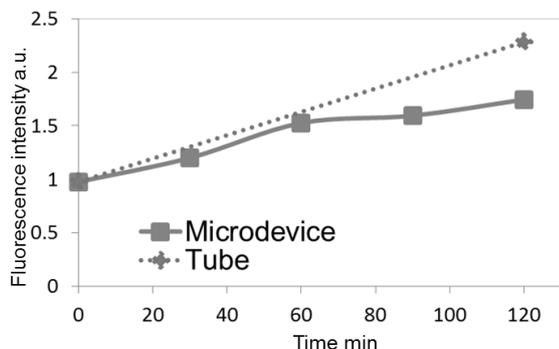


Fig. 10 Comparison of the fluorescence intensity of WGA reaction conducted in microchambers and a test tube.

6. 結論

本研究では、試薬の充填区画と細胞の補足区画を備えたマイクロチャンバーデバイスを用いて、その内部でゲノム増幅反応を行った。チャンバーへの溶液の封入は、1 wt% の Triton X-100 を溶液に添加することで高効率化できることが分かった。また、純水に一晩浸漬したデバイスを用いると、チャンバー内に封入された溶液の PDMS 内部への浸透を防げること、また、デバイスを dNTP でブロッキングすることで、PDMS 表面への DNA の吸着を抑えられることが分かった。以上の結果を踏まえ、チャンバー内で等温全ゲノム増幅反応を行った。その結果、本研究で開発したマイクロチャンバーデバイスを用いると、試験管内反応に比べて遜色ない効率 (76.4%) で DNA を増幅できることが明らかになった。

このデバイスを用いて 1 細胞解析を行うためには、チャンバー内で細胞破碎・DNA 抽出を行う必要がある。そのため検討事項として、チャンバーへの効率的な細胞封入法の確立、反応系への影響を極力抑えた細胞破碎・DNA 抽出技術の開発が挙げられる。今後はこれらの点について研究を進め、1 細胞解析デバイスの構築を目指す。

参考文献

- (1) Raj, A. *et al.*, "Nature, Nurture, or Chance: Stochastic Gene Expression and Its Consequences," *Cell*, **135** (2008) pp. 216-226.
- (2) 羽生正知, 細胞から抽出した全ゲノム DNA のマイクロチャンバー内増幅, 卒業論文, 中央大学, (2015)
- (3) Qin, K. *et al.*, "A BSA coated NOA81 PCR chip for gene amplification," *The Royal Society of Chemistry*, **8** (2016) pp. 2584-2591.
- (4) 神村明哉, 村上存, 中島尚正, "光造形法における硬化物余剰成長の理論的解析および実験による評価," *精密工学会誌* **66-7** (2000) pp. 1053-1058.
- (5) Bodas, D. and Malek, C. K., "Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment," *Sensors and Actuators B*, **123** (2007) pp. 368-373.
- (6) Calcagnile, P. *et al.*, "A 2D approach to surface-tension-confined fluidics on parylene C," *RSC Advances*, **7** (2017) pp. 15964-15970.
- (7) Sasaki, H. *et al.*, "Parylene-coating in PDMS microfluidic channels prevents the absorption of fluorescent dyes," *Sensors and Actuators B*, **150** (2010) pp. 478-482.