

# 医療診断用DNAチップ

## DNA Chips for Diagnostic Applications

源間 信弘  
GEMMA Nobuhiro

橋本 幸二  
HASHIMOTO Kouji

石森 義雄  
ISHIMORI Yoshio

DNA(デオキシリボ核酸)チップは、個人個人の薬剤感受性、疾患のかかりやすさなどを簡便に調べることができるツールであり、テーラーメイド医療に必要不可欠なキーデバイスとして期待されている。既に市場に登場している蛍光検出方式のDNAチップが高価格であるのに対し、当社オリジナルの電流検出方式によるDNAチップは、低コストで短時間計測が可能のため、特に医療診断用のDNAチップとしての期待が大きい。当社では、現在、C型肝炎患者に対するインターフェロンの効果を予測する診断チップを最初のターゲットとして、電流検出方式の事業化を進めている。

DNA chips can easily evaluate responses to or side effects of drugs in individuals, and are therefore expected to become indispensable devices for tailor-made medical care. Compared with conventional DNA chips employing detection of fluorescence, the electrochemical DNA chip originally proposed by Toshiba has the advantages of both low cost and rapid detection, which will lead to further diagnostic applications. At present, we are developing an electrochemical DNA chip to predict response to interferon in patients with the hepatitis C virus (HCV).

### 1 まえがき

ヒトゲノムの解読が終了し飛躍的な成長が期待されるポストゲノム市場の中で、ハードウェア面でのキーデバイスがDNAチップである。個人個人の遺伝子の情報を基に体質の違いに応じた医薬品や治療法を選ぶテーラーメイド医療実現に向け、個人の遺伝子配列や体内での遺伝子発現状況を簡便に調べるツールとして、大きな期待を集めている。DNAは、直径2.37nm、螺旋(らせん)一巻きが3.4nmの右巻き螺旋構造をとり、螺旋一巻きに約10個の塩基が含まれている。4種の塩基は必ず決まった相手と対をなす、というナノメートルスケールでの完全な物質選択性が、DNAの多彩な機能や特性と結びついている。また、わずか一つのDNAの置換えや消失が生体機能に大きな影響を与えることも知られている。DNAチップは、ナノ領域での塩基選択性を利用して、わずか1塩基だけのDNAの違いまで容易に検出するデバイスであり、ナノテクノロジーとバイオテクノロジーの接点に位置する新しいデバイスと考えられる。

ここでは、医療診断、特にC型肝炎の診断を目指したDNAチップの開発状況を紹介する。

### 2 DNAチップ

DNAチップは、DNAを構成する4種の塩基が、G-C、A-Tという必ず決まった対になって、DNAの主構造である二本鎖を形成することを利用している。基板上に、ある配列の一本鎖DNA(プローブ)を固定しておく。調べたい

DNA(ターゲット)も一本鎖状態にした試料を反応させたとき、プローブと相補的な配列を持ったターゲットが存在すれば二本鎖を形成する。二本鎖形成を光学的、電氣的に検出する、というのがDNAチップの原理である(図1)。

既に、米国のDNAチップメーカーであるAffymetrix社などが製品開発を行っている蛍光検出方式が市場に出回っている。蛍光検出方式は、ターゲットDNAをあらかじめ色素で標識しておき、二本鎖の形成を色素の蛍光を検出することによりモニタする。この方式では、DNAプローブの高密度化が容易であり一度に数多くのDNA配列を調べることができる。しかし、標識する色素が高価であるうえに、検出に高感度の光学系を必要とするため検出システムも高額にな

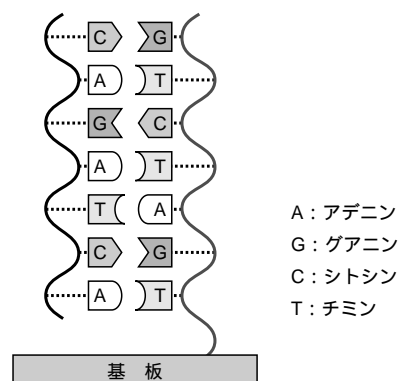


図1. DNAチップの原理 基板上に固定した一本鎖DNAと完全に相補的な配列を持った一本鎖DNAだけが二本鎖を形成する。この二本鎖形成を光学的、電氣的に検出する。

Principle of DNA sequence detection by DNA chip

る。こういったことから、応用としてはまだ研究支援用に限定されており、大きな市場の形成には至っていない。

### 3 当社オリジナルの電流検出方式のDNAチップ

当社研究開発センターでは、世の中でDNAチップが騒がれ始めるかなり前の1990年頃から、遺伝子配列を調べる遺伝子センサとして研究を進めていた。そのときに提案したのが、現在DNAチップの基本原則となっている電流検出方式である。この電流検出方式とは、プローブDNAは金(Au)電極の上に固定し、二本鎖部位に特異的に結合する挿入剤という分子を添加し、電圧印加による挿入剤の酸化還元電流を検出するという原理である(図2)。

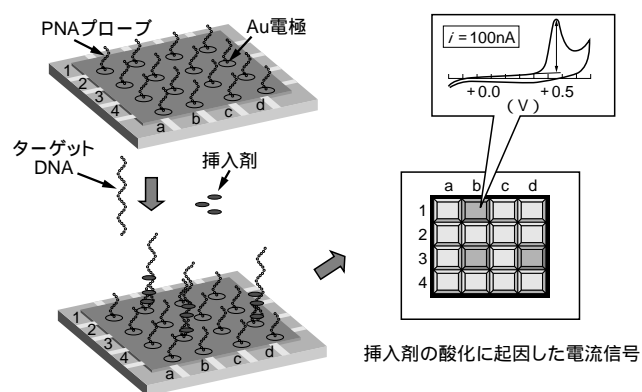


図2. 電流検出方式 挿入剤の酸化に起因した電流信号を検出する。  
Electrochemical detection method of DNA chip

遺伝子センサは単一電極であり、当初は大腸菌やB型肝炎ウイルスの感染を調べるためのセンサを目指して研究開発を行った<sup>(1)</sup>。ウイルスや菌の濃度と電流値に相関があるなど、ある程度の定量評価ができることは確認されたが、問題は感度であった。当時要求されたスペックは、感染の初期から感染がチェックできるセンサということで、PCR (Polymerase Chain Reaction) による遺伝子数増加は利用せず、極めて低濃度のDNAを検出できる高感度センサが望まれた。最初からハイスぺックのものが要求されたわけで、残念ながらそのスペックは満たすことができず、事業化は断念した。

事業化を断念した遺伝子センサ技術であるが、社外からは注目される技術として評価され始めていた。96年には、日経BP社から日経BP技術賞を受賞した。受賞理由は、欧米に遅れがちなDNA分野で独自の優れた技術を開発したというものであった<sup>(2)</sup>。

97 - 98年ころから、DNAチップが登場し、遺伝子センサの原理がもう一度注目されるに至った。単一電極からマル

チ電極への移行は、なんら技術的障害がなかったからである。DNAチップとして見たときの電流検出方式は、以下のような利点を持っている。まず、標識色素や光学検出系を必要とせず、チップとしても検出システムとしても低コストのものが期待できる。また、色素標識のような煩雑な試料準備が必要でないため、短時間計測が可能である。更に、電圧を印加することにより mismatches の二本鎖を分離可能なため、次章で述べる SNPs (Single Nucleotide Polymorphism: 一塩基多型) の識別に向いている点である。

### 4 SNPsと薬剤感受性

30億塩基対から構成されるヒトゲノムの中で、100 ~ 1,000 か所に一つの割合で個人ごとによる配列の違いが存在する。SNPs と呼ばれるこのわずかに1塩基の違いが、疾患に対するかかりやすさ、薬の応答性、薬の副作用の有無などに関する個人差と密接な関係にあると考えられており、医療の観点から注目されている。欧米では、99年に大手製薬会社を中心にコンソーシアムが作られ、SNPs がゲノムのどこに存在するかを網羅的に調べていった。その結果、当初30万という目標値を大幅に上回る85万のSNPsが見いだされ、データベースに公開されている。

ゲノムの中でのSNPs位置がわかったとなると、その次の課題は各々のSNPsがどんな機能を担っているかということである。コンソーシアムに参加している製薬企業は、特に薬剤の効き方や薬剤の副作用の有無とSNPsとの因果関係の解明に取りかかっている。例えば、Abbott社が開発したZyfloという喘息(ぜんそく)治療薬は、投与された患者の約5%に副作用として肝臓障害が現れることが知られていた。そこで、肝臓障害が現れた患者と現れなかった患者の遺伝子を調べた結果、2種のSNPsがこの副作用に関与していることが見いだされた<sup>(3)</sup>。ほかに、アルツハイマー病、白血病、アレルギー、がんなどの疾患に対する治療薬の応答性や副作用と関連のあるSNPsが見いだされつつある。今後、SNPs解析が更に進むにつれ、効果がありかつ副作用のまったくない薬剤が個人ごとに調合されて投与されていくことはまちがいないであろう。

### 5 電流検出方式によるSNPs識別

電流検出方式により、SNPsの識別が可能かどうかを確かめる実験として、がん遺伝子を用いた予備実験を行った<sup>(4)</sup>。チップとしては、ガラス基板上に20のAu電極を形成したチップを使った。個々の電極径は200 μmである(図3)。

プローブとしては、通常のDNAではなく、ペプチド核酸(PNA)を用いた。DNAが水溶液中で電荷を持っているので挿入剤が二本鎖形成部以外にも非特異吸着し、その結果

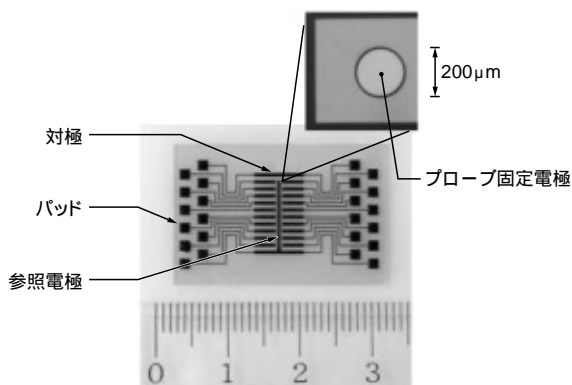


図3 . DNAチップの構造 特性評価実験で用いている20電極系を示す。  
Structure of DNA chip

電流のバックグラウンド値が増加してしまう。一方, PNAは水溶液中で中性なため, 挿入剤の非特異吸着が起きにくいからである(図4)。

図4の塩基配列部に, 今回はマウス肉腫(にくしゅ)ウィルスのがん遺伝子を用いた。用いたプローブは, がん遺伝子正常配列と, 正常配列とは1塩基だけ異なる異常配列2種, ネガティブコントロールとして大腸菌のリボゾームDNAの4種類である。図4, 及び図5に示すように, 各プローブは

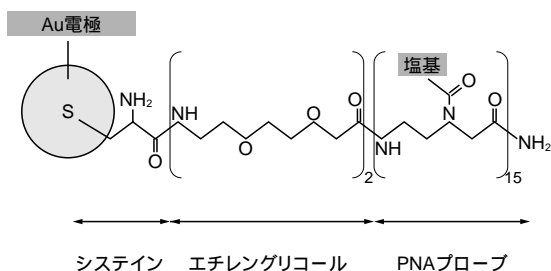


図4 . PNAプローブ システイン末端のS原子と基板のAu原子とが化学結合することにより, プローブが固定化される。  
Peptide nucleic acid (PNA) probe

プローブ	配列
がん遺伝子正常配列-G型	Cys-O-O-CTCCTCTTGACCTGC
がん遺伝子異常配列-T型	Cys-O-O-CTCCTCTTTACCTGC
がん遺伝子異常配列-C型	Cys-O-O-CTCCTCTTCACCTGC
ネガティブコントロール	Cys-O-O-GACCTGCTTCTGACT

Cys : システイン  
O : エチレングリコール(-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CO-)  
ネガティブコントロール : 大腸菌のリボゾームDNA

図5 . プローブ配列 正常配列と, 1塩基だけ異なる異常配列2種, 及びネガティブコントロールを示す。  
PNA probe sequence used in experiments

15塩基であり, 末端にあるシステインの中の硫黄(S)原子がAu基板とチオール結合という強い化学結合を形成することにより基板に固定される。プローブを基板に固定後, 検体DNAを一本鎖化してハイブリダイゼーション(二本鎖形成)を行う。その後, 挿入剤を添加して電流を測定する。なお, 挿入剤は, ヘキスト33258である。

電流は, -300 mVから+800 mVの間を, 掃引速度100 mV/sという条件でプローブ電極の電位を変化させながら測定する。電位が700 mV付近のところで, ヘキストの酸化に起因した電流ピークが観測される(図6)。ハイブリダイゼーションの過程を経ずに測定したピーク電流値と, ハイブリダイゼーションの過程を経た後に測定したピーク電流値の差  $i$  を, ハイブリダイゼーションに起因した信号値とみなす。

図5に示した4種類のプローブを用い, ターゲットとしてはがん遺伝子正常配列を用いたときの  $i$  に関する測定結果を図7に示す。

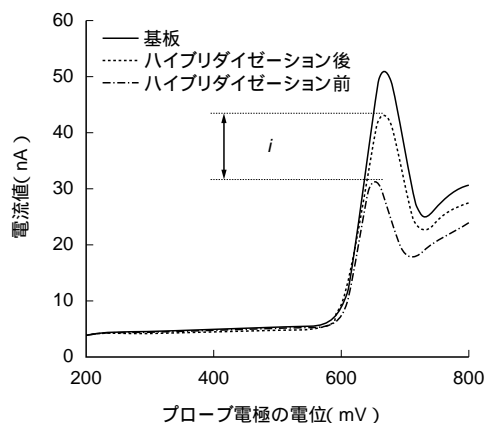


図6 . 観測される電流値 ハイブリダイゼーション前後の電流値  $i$  を信号とする。  
Examples of observed electric currents before and after hybridization

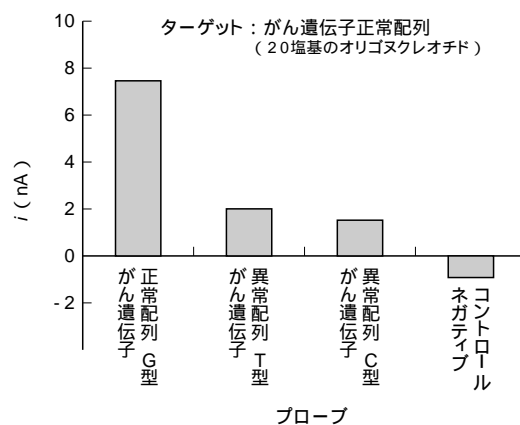


図7 . SNPsの判定結果 図5 . に示されたプローブと, がん遺伝子正常配列のターゲットを用いた結果を示す。  
Results of single nucleotide polymorphism (SNP) detection

図7からわかるように、たった一つの塩基配列の違いを検出できることが確認されている。この実験では試していないが、ハイブリダイゼーションの後に負の電位をプローブ電極に印加することにより、ミスマッチの結合だけを分離させることも可能であるという報告もある。電流測定方式が、SNPs識別に今後おおいに活用されていくことが期待される。

## 6 C型肝炎診断用SNPsチップ

現在、C型肝炎の患者は日本で200万人、世界では1億7,000万人と言われている。C型肝炎に感染すると、20～30年程度で肝硬変を経て肝臓がんになる。もっとも効果的な治療薬はインターフェロン(IFN)であり、完全にC型肝炎ウイルスが消失する患者も存在するが、問題は30%程度の患者に対してしか効果が認められない点である。残り70%の患者には効果がないにもかかわらず、半年の治療で数百万円程度と費用負担は重く、また、投与による副作用も深刻な問題である。

IFNが効くのか効かないのかということは、これまで、主にC型肝炎ウイルスの種類や血液中の濃度によりある程度の差があることが調べられてきた。更に、最近になって宿主側のヒトの遺伝子によっても、IFN投与効果に違いがあることが判明してきた。

東芝病院研究部では、C型肝炎患者に対する遺伝子配列解析から、インターフェロンの薬剤効果を判定する遺伝子として、MxA、MBLという二種類のSNPsを見いだした<sup>(5)-(7)</sup>。SNPs箇所の塩基を調べれば、IFNが効くかどうか予測できるわけである。

現在、これら東芝病院で見いだした遺伝子を搭載したDNAチップの開発を進めている。このチップが実用化されれば、非常に安いコストでIFN投与前に効果が予測できるわけであり、IFNの無意味な投与を抑制するとともに、効かない患者を悩ませていた副作用の苦痛から解放するという、医療的にたいへん意義ある効果をもたらすものと期待される。

既に、プラスミドのDNAを用いた予備実験により、MxAのSNPsを識別できることが確認されている。次のステップは、実際の検体を用いた確認実験、つまりヒト遺伝子を扱った実験である。ヒト遺伝子を扱う場合には、国の出した倫理指針に基づき倫理審査委員会の承認を必要とする。既に、当社では、社内・社外の委員から構成された東芝研究開発センター遺伝子解析倫理審査委員会を開き、C型肝炎診断用DNAチップの研究計画は承認されており、DNAチップ実用化に向け評価実験に取り組んでいる。

## 7 あとがき

ここでは、現在開発中の医療診断用DNAチップの開発状況を説明した。疾患関連あるいは薬剤感受性のSNPsに関する知見は、ここ数年で飛躍的に増加するものと思われる。そのような状況のなかで、簡便に個人個人のSNPsを判定できるDNAチップの重要性は非常に高くなると期待される。また、現在のDNAチップはデバイス構造も単純であるが、今後半導体技術を更に導入することにより、高度な機能を持った次世代DNAチップが生まれるものと期待される。

DNAチップ開発と並行して、プロテインチップやラボオンチップなどの基礎研究も進んでいる。これらのデバイスは、生体内で起きている分子レベルの現象を工学的な手段で検出し、更には制御することを目指している。今後、このようなアプローチにより、ナノテクノロジーとバイオテクノロジーの融合領域は更に多様な技術を生み出していくものと考えられる。

## 文 献

- (1) K. Hashimoto, et al. " Microfabricated Disposable DNA Sensor for Detection of Hepatitis B Virus DNA ". Sensors and Actuators B, 46, 1998, p.220 - 225.
- (2) 日経バイオテク バイオインテリジェンス . 349, 4月8日号, 1996, p.1 - 3 .
- (3) Bioベンチャー 1 . 羊土社 . 2001, p.74 - 79 .
- (4) K. Hashimoto, et al. " Preliminary Evaluation of Electrochemical PNA Array for Detection of Single Base Mismatch Mutations ". Lab on a Chip . 1, 2001, p.61 - 63.
- (5) 三代俊治. " ウィルス肝炎研究の今日的展望 ". 臨床化学 . 30, 2001, p.35 - 42.
- (6) M. Hijikata, et al. " Identification of a Single Nucleotide Polymorphism in the MxA Gene Promoter (G/T at nt-88) Correlated with the Response of Hepatitis C Patients to Interferon ". Intervirology . 43, 2000, p.124 - 127.
- (7) M. Matsushita, et al. " Association of Mannose-binding Lectine Gene Haplotype LXPA and LYPB with Interferon-resistant Hepatitis C Virus Infection in Japanese Patients ". J. Hepatology . 29, 1998, p.695 - 700.



源間 信弘 GEMMA Nobuhiro, D.Sc.  
研究開発センター 事業開発室グループ長, 理博。  
DNAチップの開発に従事。応用物理学会, 日本物理学会  
会員。



橋本 幸二 HASHIMOTO Kouji, D.Eng.  
研究開発センター 事業開発室研究主務, 工博。  
DNAチップの開発に従事。日本化学会会員。  
Corporate Research & Development Center



石森 義雄 ISHIMORI Yoshio, D.Eng.  
研究開発センター 事業開発室参事, 工博。  
DNAチップの開発に従事。日本化学会, 日本生化学会, 農芸  
化学会, 日本技術士会, 生物工学会, 電気化学会会員。  
Corporate Research & Development Center