

# 第6回 JMACシンポジウム

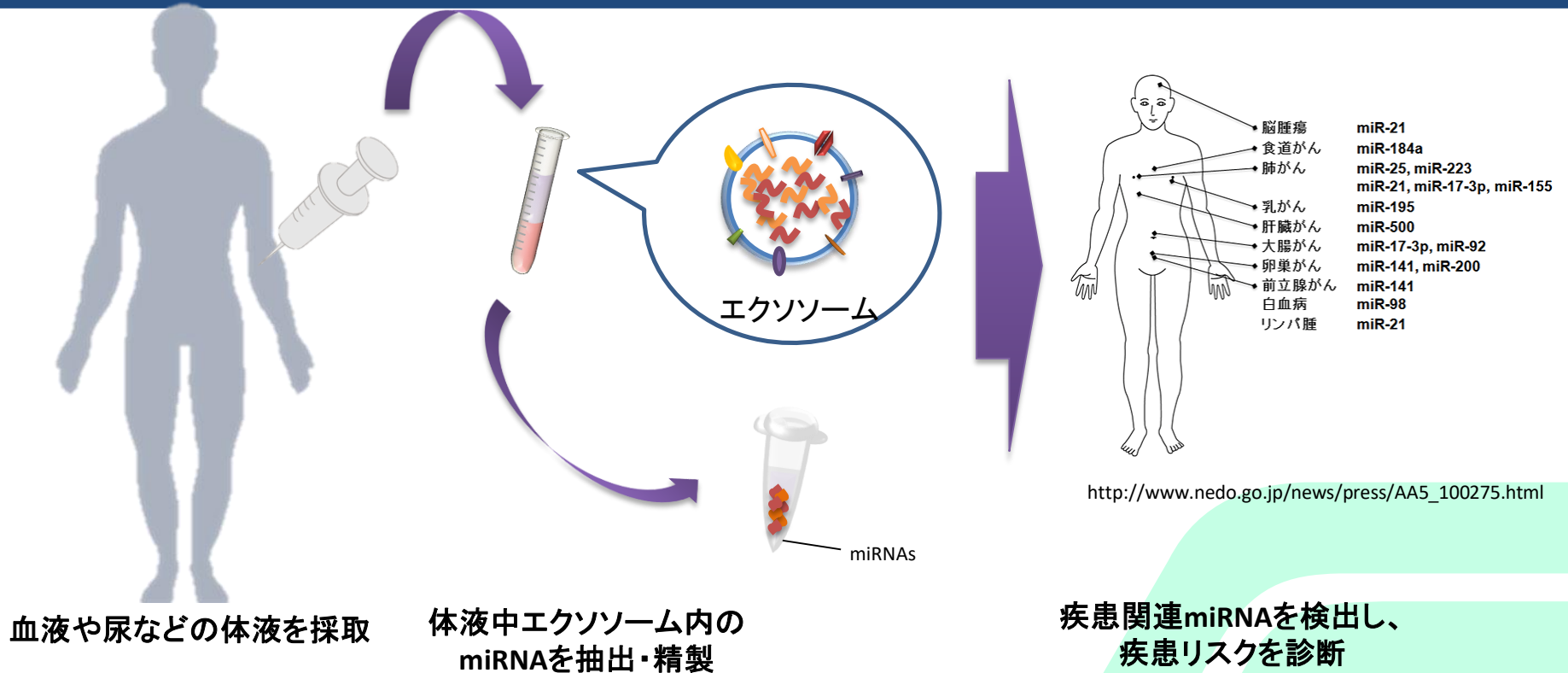
## AMED 体液中マイクロRNA測定技術基盤開発プロジェクト 成果報告会

～miRNA最新研究、国際標準化、リキッドバイオプシーのもたらす未来と展望～

臨床現場での検査実現に向けた  
体液からのエクソソーム及びmiRNA自動抽出精製装置の開発

プレジジョン・システム・サイエンス株式会社

# 本開発項目において実現する診断スキーム



ヒト体液サンプルをスタートとし、エクソソームの単離、miRNAの抽出、増幅・検出までの工程を全自動化可能なシステムの開発を目指す

# 本における開発項目

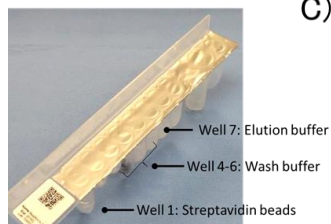
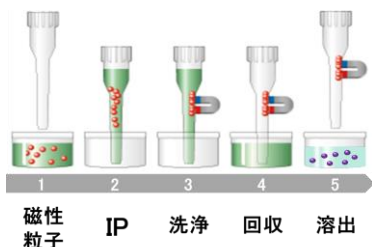


簡便かつ全自動の検査工程を実現するために5項目の課題を設定

	検討・実施項目
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>対象とする疾患臓器由来の特定なエクソソームの分離・精製</li> <li>エクソソーム単離法の自動化及び標準化</li> </ul>
2	単離されたエクソソームからのmiRNA抽出
3	高感度なmiRNA検出を可能とし、低コピー数のmiRNA検出を目標とするPCR法の開発
4	多種類のmiRNAの同時検出及び解析を可能とする検出システムの開発
5	これらの工程の完全な自動化機器の開発、検査試薬のパッケージ化

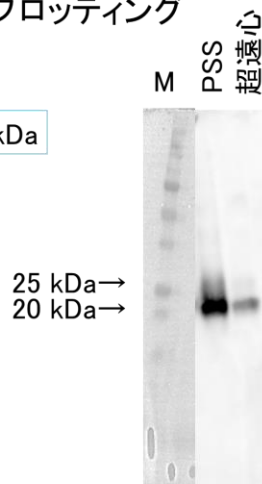
# 1. エクソソーム単離法の開発

## 脂質結合性ペプチドを使用した総エクソソーム単離法の開発

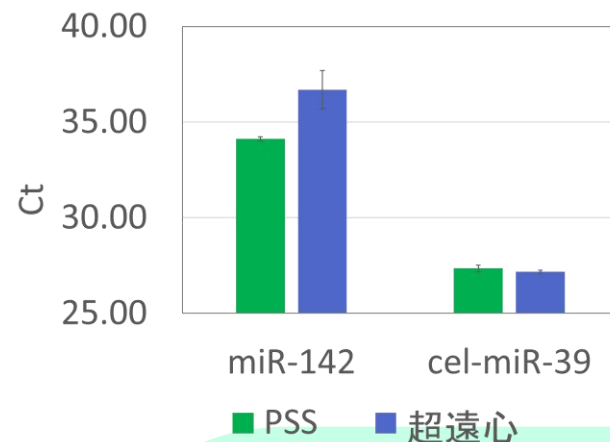


### A) ウェスタンブロッティング

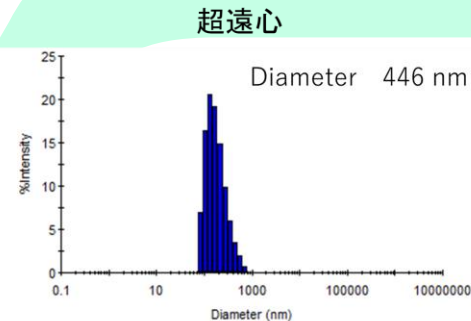
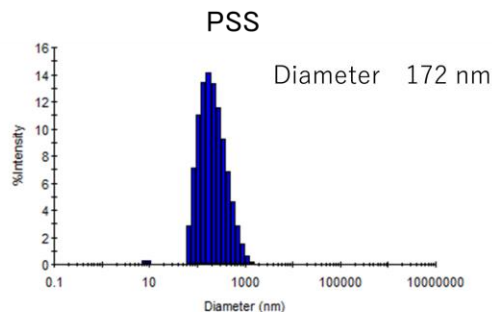
CD9 : 約24 kDa



### B) リアルタイムPCR



### C) 粒径測定



血清100  $\mu$ Lをサンプルとしてエクソソーム抽出をおこない、各評価に用いた。

A) 抽出エクソソーム9  $\mu$ L分を泳動し、CD9抗体により検出した。

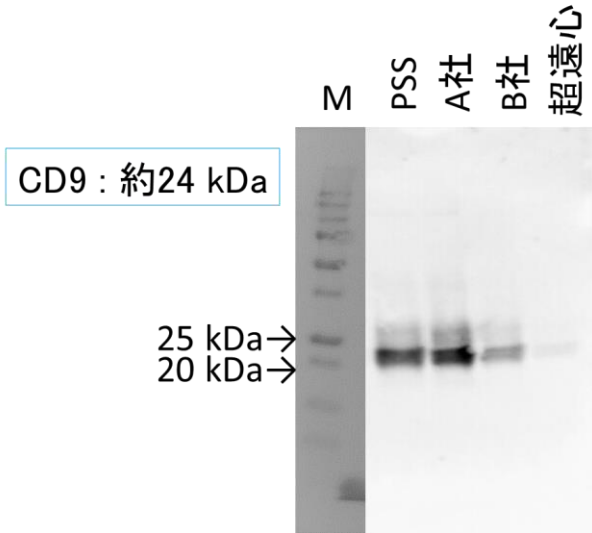
B) エクソソーム50  $\mu$ LからmiRNAを抽出し、7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いてリアルタイムPCRをおこなった。

C) エクソソーム45  $\mu$ Lを使用し、DelsaMax Pro (BECKMAN COULTER)を用いて粒径測定をおこなった。Western Blottingの評価結果から超遠心法と同等以上のエクソソームが回収できていることを確認した。

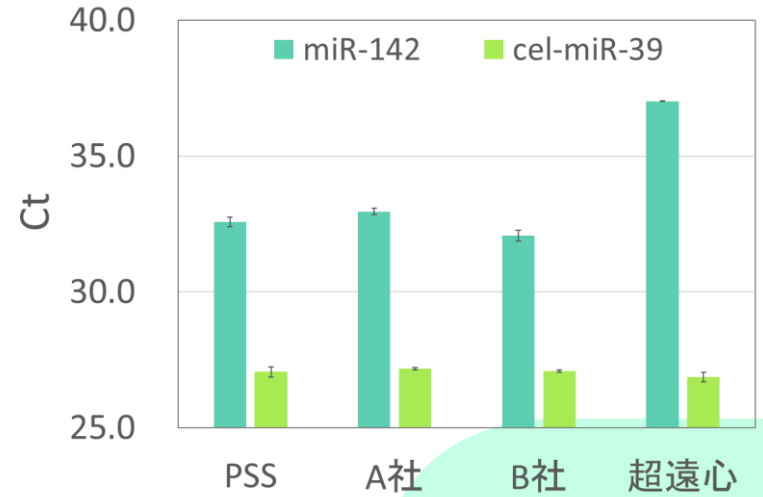
# 1. エクソソーム単離法の開発

## 脂質結合性ペプチドを使用した総エクソソーム単離法の開発

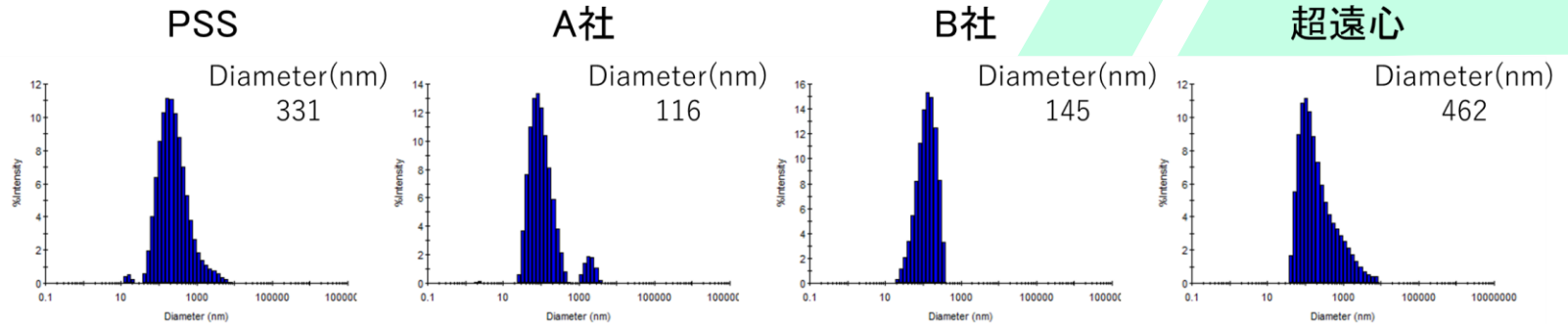
A) ウェスタンブロッティング



B) リアルタイムPCR



C) 粒径測定

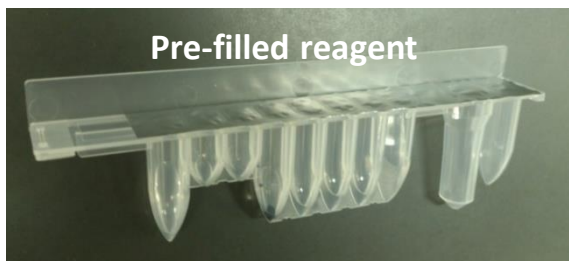


血清100  $\mu$ Lのサンプルからの抽出産物をWestern Blotting、リアルタイムPCR、粒形測定を実施した結果、超遠心法と同等以上のエクソソームが回収できていることを確認した。

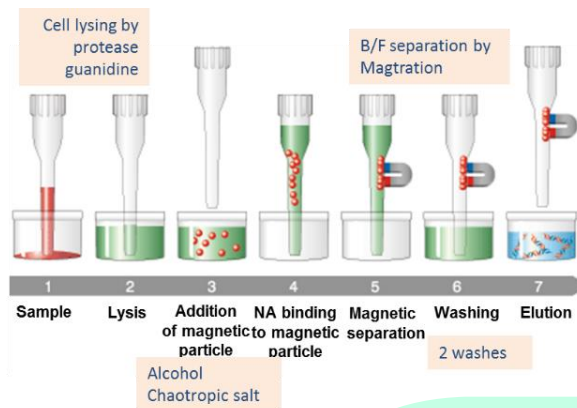
## 2. miRNA抽出試薬の開発

自社試薬をベースに他社試薬より効率よくmiRNA抽出ができる試薬を開発

### (1) プレパック試薬

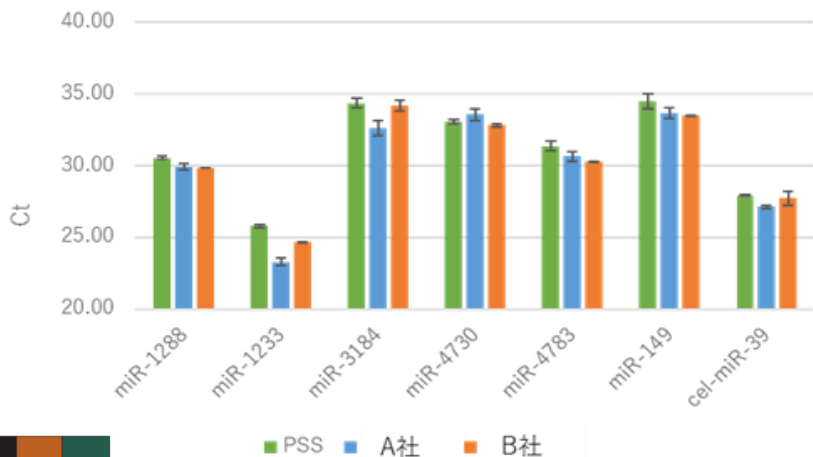


### (2) Magstrationによる抽出工程の自動化

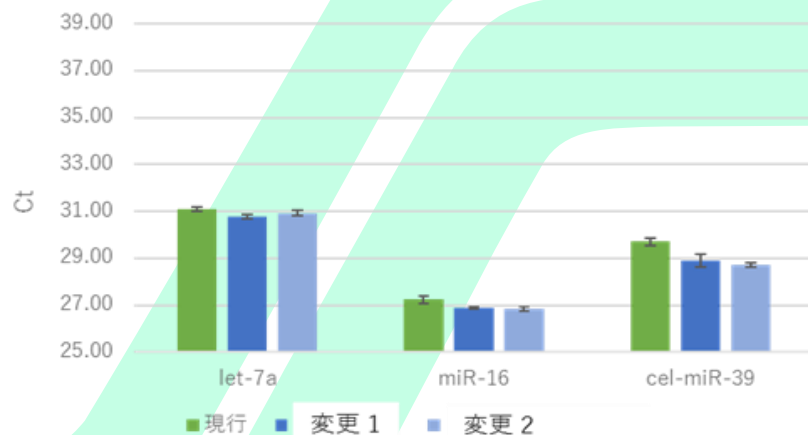


### (3) 抽出miRNAのリアルタイムPCR結果

#### A) 他社キットとの比較



#### B) Wash動作変更



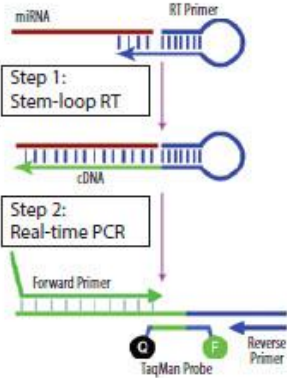
洗浄工程動作の変更により、miRNAの回収率が向上することを確認した。

# 3. miRNA検出用酵素の開発

## miRNAのOne Step PCRを実現するための酵素の開発

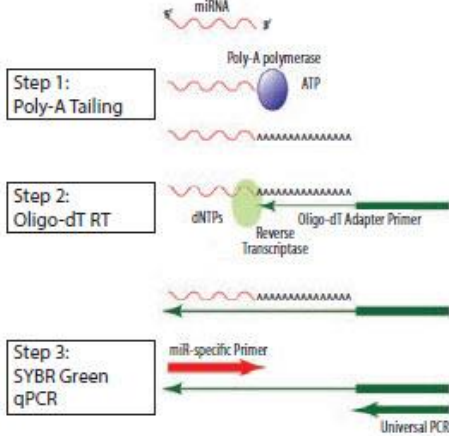
miRNA RT-qPCR

A. TaqMan/Stem-loop primer



Chen, et al, 2005<sup>3</sup>

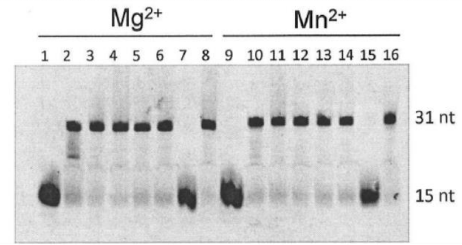
B. Sigma, et al./Poly-A Tailing



[http://www.quantabio.com/product\\_miRNA.php?base\\_id=95107](http://www.quantabio.com/product_miRNA.php?base_id=95107)

(A) DNAポリメラーゼ活性評価

DNA primer 5'Cy5- GGATACGACGCCAA  
DNA template 3'- CCTATGCTGGCGGTTATAAATGCACGCGAT-5'

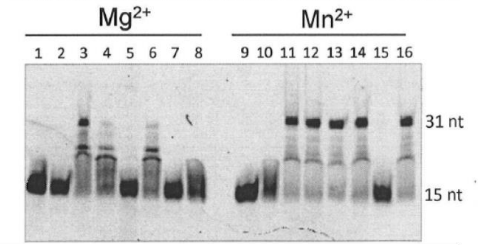


12% PAGE, 8M Urea/TBE

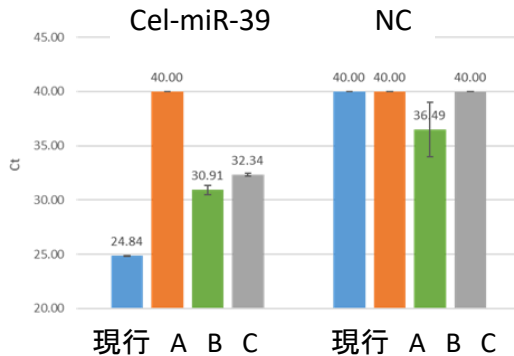
レーン	試料
1, 9	タンパクなし
2-16	評価中酵素

(B) 逆転写活性評価

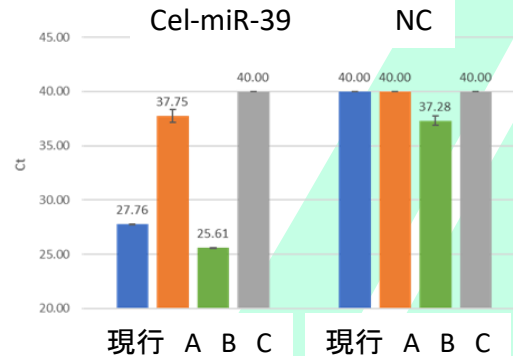
DNA primer 5'Cy5- GGATACGACGCCAA  
RNA template 3'- CUAUGCUGCGGUUAUAAUAGCAGCGAU-5'



RT酵素のみ変更



qPCR酵素のみ変更



- DNAポリメラーゼ活性、逆転写活性を持つ酵素の候補を見つけた。
- miRNA検出に使用可能かの検討を行い、特許申請を予定している。

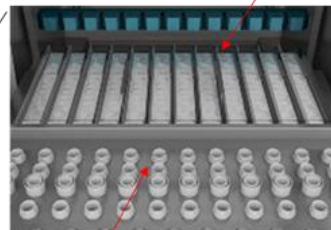
# 4. 全自動機用プロトコル開発

多種類のmiRNAの同時検出及び解析を可能とする検出システムの開発

(A)



試薬カートリッジ



1.5 mL tube  
 (血清+ビオチン化ペプチド)

核酸抽出装置"magLEAD series"

(B)



全自動遺伝子解析装置"geneLEAD VIII"

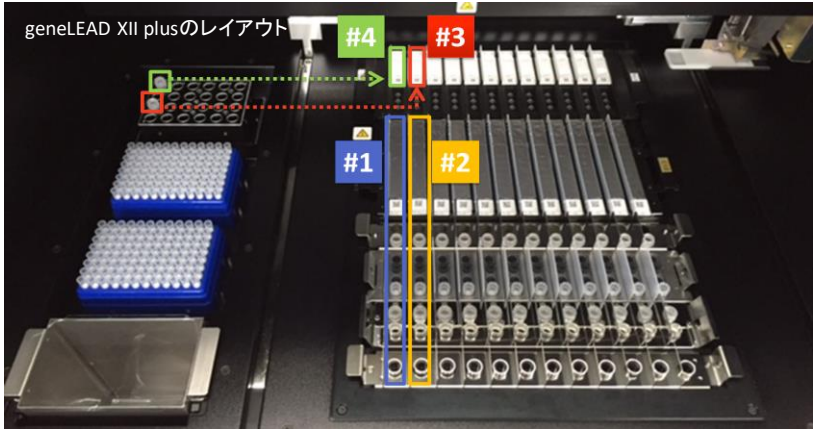


# 5. 全自動機用プロトコル開発

## 自動化機器の開発、検査試薬のパッケージ化



エクソソーム中miRNAの全自動解析



- Step #1 抗体および磁性ビーズを用いたエクソソームの単離
- Step #2 miRNAの抽出
- Step #3 miRNAのRT-PCR
- Step #4 miRNAのqPCR

既存装置を利用したエクソソーム精製、miRNA精製の自動化プロトコルを開発

# 本開発における成果



	検討・実施項目	実施状況
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>対象とする疾患臓器由来の特定なエクソソームの分離・精製</li> <li>エクソソーム単離法の自動化及び標準化</li> </ul>	△
2	単離されたエクソソームからのmiRNA抽出	○
3	高感度なmiRNA検出を可能とし、低コピー数のmiRNA検出を目標とするPCR法の開発	△
4	多種類のmiRNAの同時検出及び解析を可能とする検出システムの開発	○
5	これらの工程の完全な自動化機器の開発、検査試薬のパッケージ化	○

一部未達の課題 ⇒ 引き続き事業化に向け、開発を進める予定

## 今後の予定

- エクソソーム精製工程及びmiRNA抽出工程の自動化について、既に市販されている製品との比較や外部評価の実施
- 各種装置を用いた実用性評価の実施



**複数種類の自動化装置に搭載できる試薬を上市**



**エクソソーム、miRNA研究への貢献**



**臨床現場での検査実現**