

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12901

研究課題名(和文)がん診断のための細胞外ベシクル捕捉・破砕用マイクロチップ開発

研究課題名(英文)Development of a microchip for capture and disruption of extracellular vesicles toward cancer point-of-care diagnosis

研究代表者

石原 量 (Ishihara, Ryo)

東京理科大学・基礎工学部材料工学科・助教

研究者番号：30633507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞が体液中に分泌する小胞である細胞外ベシクル(EV)は、分泌した細胞の情報を持っていることから、新規バイオマーカーになると期待されている。本研究ではその情報をがんのその場診断に利用するために、EVを捕捉・破砕するマイクロチップの開発を試みた。EV(特にエクソソーム)に一般的に発現している抗原と特異的に結合する抗体をマイクロチップ固定することで、簡便かつ迅速なEVの捕捉に成功した。これらの成果は、学会、学術雑誌、新聞によって発表し、学会賞も受賞した。また、EV破砕する高分子鎖修飾表面の作製にも成功した。今後は上記技術を改良し、統合することでがんのその場診断実現へ繋がると考えている。

研究成果の概要(英文)：Extracellular vesicles (EVs), which are secreted from cells to body fluids, are expected as new biomarkers because they have information of the parent cells. In this study, to use the information of the EVs for a cancer point-of-care diagnosis, we have been developed microchips for capture and disruption of the EVs. We immobilized antibody, which specifically binds to membrane protein on EVs, to inner surfaces of microchannels of a microchip modified by radiation-induced graft polymerization. Thus, a surface-functionalized power-free (SF-PF) microchip for EV capture was obtained. On the SF-PF microchip, easy and rapid EV capture was demonstrated. These results were published in journals and newspapers. In addition, we also received conference awards. Furthermore, EV disruption on a polymer chain grafted microchannel inner surfaces was also demonstrated. Improvements and integration of the above technologies would contribute to the establishment of a cancer point-of-care diagnosis.

研究分野：機能性高分子材料

キーワード：表面機能化自律駆動マイクロチップ 放射線グラフト重合法 捕捉 その場診断 がん

1. 研究開始当初の背景

血液、唾液、尿といった体液中に、細胞が分泌する小胞である細胞外ベシクル(EV)は、分泌した細胞の情報を持っていることからその「濃度」、「表面性状」、「内部分子」などが、がんの新規バイオマーカーになると期待されている。そのため、それら情報を簡便に得る手法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では EV のそれらの情報を利用し、がんのその場診断法を確立するために、EV の捕捉・破碎を可能とするマイクロチップの開発を試みた。

3. 研究の方法

マイクロ流体チップは、その細く (25 × 100 μm) 長い (2 cm) 寸法比をもつマイクロ流路を利用するため、少ない試料体積中の標的分子を高効率で捕捉するのに適している。本研究では、ポンプを必要としない自律駆動マイクロチップの流路表面に放射線グラフト重合を適用しグラフト鎖を付与し、そこに EV を捕捉するための抗体を固定することによって表面機能化自律駆動マイクロチップを作製し、簡便かつ迅速な EV の捕捉をめざした。

また、4 級アミンが細胞膜を破碎し細胞を殺すという既存の研究に着目し、マイクロ流路内表面に放射線グラフト重合法を利用して 4 級アミンを有する高分子鎖を固定し、EV 破碎表面の開発を試みた。

4. 研究成果

(1) 電子線グラフト重合法によって PDMS マイクロ流路内表面にエポキシ基を有するポリグリシジルメタクリレート鎖をグラフトし、エポキシ基の開環反応を利用して、EV を捕捉するための抗体を高密度固定することに成功した。

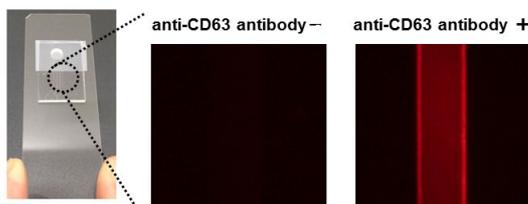


図 1 流路内表面への EV 捕捉用抗体固定

(2) 乳がん細胞および乳腺上皮細胞の培養上清から、EV (特にエクソソーム) を超遠心法によって分離・精製し、その細部分布を NanoSight® によって評価した。またこの実験を様々な細胞培養条件によって検討することによって、細胞の培養条件と EV 分泌に関する知見を得た。

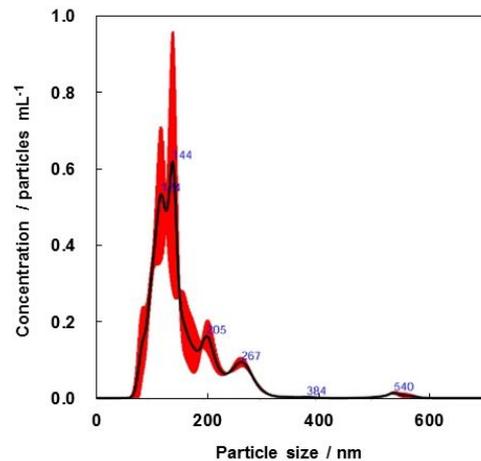


図 2 乳がん細胞由来 EV のサイズ分布

(3) EV 捕捉用抗体およびコントロールのための Normal mouse IgG 抗体を固定した表面機能化自律駆動マイクロチップを作製し、それぞれのマイクロチップに層流樹状増幅法を適用することによって EV を検出した。優位差検定の結果、表面機能化自律駆動マイクロチップが EV を特異的に検出できていることを実証できた。また放射線グラフト重合を適用していない bare の PDMS 流路に抗体を固定しただけでは、EV を検出できないことも同時に確認した。これらの成果は、学会、学術雑誌、新聞によって発表し、研究代表者が 1 件、学生が 2 件の学会賞を受賞をした。

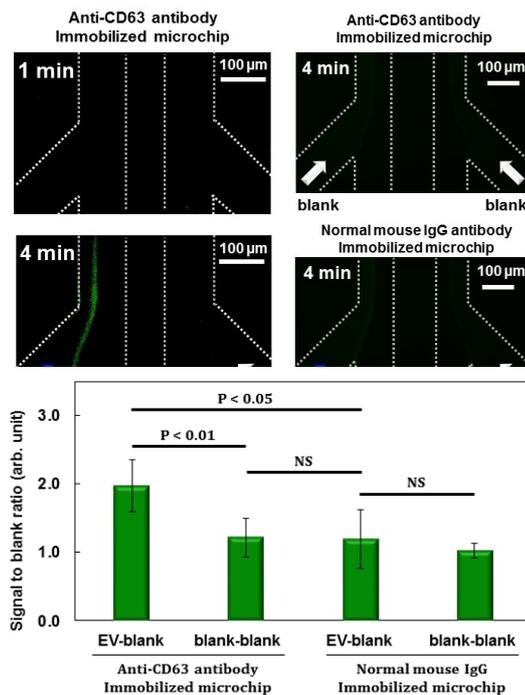


図 3 表面機能化自律駆動マイクロチップによる EV 検出 (error bars indicate SD, n>=3).

(4) チップの作製をより簡便にするために、電子線グラフト重合法から UV グラフト重合法へ変更し、アミノ基を有するグラフト鎖を介して同様に EV 捕捉用の抗体を固定したマイクロチップを用いた場合でも EV を検出できることを実証できた。

(5) EV の「表面性状」の情報を得るという目的で、がん細胞が分泌した EV のみを特異的に捕捉する固体を固定したマイクロチップを新たに作製し、本チップにおいても同様に EV を検出できることを実証した。本成果は先の高分子学会において発表した。

(6) EV の「内部分子」の情報を得るために、UV グラフト重合法を利用して EV を破碎する表面を作製し、ある特定の条件では EV が破碎されているという結果を得ることができた。今後は、精密グラフト重合法など複数の方法でアプローチし、最適な破碎表面の作製条件を見つけ、上記の捕捉表面と組み合わせるべく必要があると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

R. Ishihara, T. Nakajima, Y. Uchino, A. Katagiri, K. Hosokawa, M. Maeda, Y. Tomooka, A. Kikuchi, ACS Omega, 査読有, vol. 2, 2017, pp. 6703-6707.

R. Ishihara, Y. Uchino, K. Hosokawa, M. Maeda, A. Kikuchi, Anal. Sci., 査読有, vol. 33, No. 2, 2017, pp. 197-202.

〔学会発表〕(計 27 件)

片桐明日香, 石原量, 中島忠章, 細川和生, 前田瑞夫, 友岡康弘, 菊池明彦, 表面機能化自律駆動マイクロチップを用いた細胞外ベシクルの高感度検出, 第 35 回高分子学会千葉地域活動若手セミナー, 千葉・日本大学津田沼キャンパス, 2018 年 3 月 14 日
猪股祥子, 石原量, 細川和生, 前田瑞夫, 菊池明彦, UV グラフト重合を利用した表面機能化自律駆動マイクロチップによる miRNA の特異検出, 第 35 回高分子学会千葉地域活動若手セミナー, 千葉・日本大学津田沼キャンパス, 2018 年 3 月 14 日
松井峻, 石原量, 中島忠章, 片桐明日香, 細川和生, 前田瑞夫, 友岡康弘, 菊池明彦, がん特異的な細胞外ベシクル検出のための表面機能化自律駆動マイクロ

チップの作製, 第 35 回高分子学会千葉地域活動若手セミナー, 千葉・日本大学津田沼キャンパス, 2018 年 3 月 14 日
喜種棕一, 石原量, 秋山好嗣, 猪股祥子, 細川和生, 前田瑞夫, 菊池明彦, 表面機能化自律駆動マイクロ流体チップを用いた MicroRNA の複数種類同時検出, 第 35 回高分子学会千葉地域活動若手セミナー, 千葉・日本大学津田沼キャンパス, 2018 年 3 月 14 日
猪股祥子, 石原量, 内野斐隆, 細川和生, 前田瑞夫, 菊池明彦, miRNA 検出のための UV グラフト重合を利用した表面機能化自律駆動マイクロチップの作製, 第 27 回日本 MRS 年次大会, 横浜・横浜市開港記念館, 2017 年 12 月 5-7 日
片桐明日香, 石原量, 中島忠章, 細川和生, 前田瑞夫, 友岡康弘, 菊池明彦, 細胞外ベシクル検出用の表面機能化自律駆動マイクロチップの高感度化, 第 27 回日本 MRS 年次大会, 横浜・横浜市開港記念館, 2017 年 12 月 5-7 日
石原量, 中島忠章, 片桐明日香, 細川和生, 前田瑞夫, 友岡康弘, 菊池明彦, UV グラフト重合法を利用して機能化した自律駆動マイクロチップによる細胞外ベシクルの高感度検出, 第 27 回日本 MRS 年次大会, 横浜・横浜市開港記念館, 2017 年 12 月 5-7 日
石原量, 中島忠章, 片桐明日香, 細川和生, 前田瑞夫, 友岡康弘, 菊池明彦, 細胞外ベシクルの高感度検出のための表面機能化自律駆動マイクロチップの作製, 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会, 東京・タワーホール船堀, 2017 年 11 月 20-21 日
R. Ishihara, T. Nakajima, A. Katagiri, Y. Uchino, K. Hosokawa, M. Maeda, Y. Tomooka, A. Kikuchi, Simple Extracellular Vesicle Detection on a Portable Microfluidic Chip toward Point-of-Care Diagnosis, IUMRS-ICAM 2017, Kyoto University, Kyoto, Japan (27 August -1 September 2017).
A. Katagiri, R. Ishihara, T. Nakajima, Y. Uchino, K. Hosokawa, M. Maeda, A. Kikuchi, Preparation of a Surface-Functionalized Power-Free Microchip for Extracellular Vesicle Detection, IUMRS-ICAM 2017, Kyoto, Japan (27 August -1 September 2017).
S. Inomata, R. Ishihara, Y. Uchino, K. Hosokawa, M. Maeda, A. Kikuchi, Sensitive MicroRNA Detection on a Power-Free Microfluidic Chip Prepared by UV-Induced Graft Polymerization, IUMRS-ICAM 2017, Kyoto, Japan (27 August -1 September 2017).
猪股祥子, 石原量, 内野斐隆, 細川和

生, 前田瑞夫, 菊池明彦, UV グラフト重合によって機能化した自律駆動マイクロチップによる microRNA の検出 第 66 回高分子学会年次大会, 千葉・幕張メッセ, 2017 年 5 月 29-31 日
片桐明日香, 石原 量, 中島忠章, 内野斐隆, 細川和生, 前田瑞夫, 友岡康弘, 菊池明彦, 表面機能化自律駆動マイクロチップを用いた細胞外ベシクルの簡易検出, 第 66 回高分子学会年次大会, 千葉・幕張メッセ, 2017 年 5 月 29-31 日
R. Ishihara, T. Nakajima, A. Katagiri, Y. Uchino, K. Hosokawa, M. Maeda, Y. Tomooka, A. Kikuchi, Easy Extracellular Vesicle Detection on a Surface-Functionalized Power-Free Microchip, ISEV2017-Annual Meeting, Tronto, Canada (18-21 May 2017)
猪股祥子, 石原量, 内野斐隆, 細川和生, 前田瑞夫, 菊池明彦, UV グラフト重合を利用して作製した自律駆動マイクロチップによる miR-21-5p の高感度検出, 第 34 回高分子学会千葉地域活動若手セミナー, 東京・東京理科大学葛飾キャンパス, 2017 年 3 月 7 日
片桐明日香, 石原量, 中島忠章, 内野斐隆, 細川和生, 前田瑞夫, 友岡康弘, 菊池明彦, 表面機能化自律駆動マイクロチップを用いた細胞外ベシクルの簡易検出, 第 34 回高分子学会千葉地域活動若手セミナー, 東京・東京理科大学葛飾キャンパス, 2017 年 3 月 7 日
R. Ishihara, K. Tanabe, S. Inomata, Y. Uchino, K. Hosokawa, M. Maeda, A. Kikuchi, Rapid and Sensitive MicroRNA Detection on a Surface-Functionalized Power-Free Microchip Utilizing UV-induced Graft Polymerization, IPC2016, Fukuoka, Japan (13-16 December 2016)
R. Ishihara, K. Tanabe, S. Inomata, Y. Uchino, K. Hosokawa, M. Maeda, A. Kikuchi, MicroRNA Detection on a Surface-Functionalized Power-Free Microchip Using Radiation Beam-Induced Graft Polymerization, ICBS2016, Tokyo, Japan (28-30 November 2016)
Y. Uchino, R. Ishihara, T. Nakajima, K. Hosokawa, M. Maeda, Y. Tomooka, A. Kikuchi, Extracellular Vesicle Detection on a Power-Free Microchip Functionalized by Electron Beam Grafting, 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo (ICBS2016), Tokyo, Japan (28-30 November 2016)
内野斐隆, 石原 量, 中島忠章, 細川和生, 前田瑞夫, 友岡康弘, 菊池明彦, 電子線重合により表面機能化した自律駆動マイクロチップによる細胞外ベシク

ルの検出, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 福岡・福岡国際会議場, 2016 年 11 月 21-22 日

- ⑲ 石原 量, 中島忠章, 片桐明日香, 内野斐隆, 細川和生, 前田瑞夫, 友岡康弘, 菊池明彦, その場診断のための表面機能化自律駆動マイクロチップによる細胞外ベシクルの検出, 日本バイオマテリアル学会 シンポジウム 2016, 福岡・福岡国際会議場, 2016 年 11 月 21-22 日
- ⑳ R. Ishihara, K. Tanabe, Y. Uchino, K. Hosokawa, M. Maeda, A. Kikuchi, Surface Functionalization of Power-Free PDMS Microchip for MicroRNA Detection Utilizing UV-Induced Graft Polymerization, μ TAS 2016, Dublin, Ireland (9-13 October 2016)
- ㉑ R. Ishihara, T. Nakajima, Y. Uchino, K. Hosokawa, M. Maeda, Y. Tomooka, A. Kikuchi, Extracellular Vesicle Detection on a Surface-Functionalized Power-Free Microchip toward Point-of-Care Cancer Diagnosis, Liquid Biopsies and Minimally-Invasive Diagnostics 2016, San Diego, California, USA (29-30 September 2016)
- ㉒ 田辺貫太, 石原 量, 内野斐隆, 細川和生, 前田瑞夫, 菊池明彦, マイクロ RNA 検出のための UV グラフト重合法を利用した流路内面修飾自律駆動マイクロ流体チップの作製, 第 65 回高分子学会年次大会, 神戸・神戸国際会議場・展示場, 2016 年 5 月 25-27 日
- ㉓ R. Ishihara, T. Nakajima, Y. Uchino, K. Tanabe, K. Hosokawa, M. Maeda, Y. Tomooka, A. Kikuchi, Simple Inner-Surface Modification of a PDMS Microchip by Radiation-Induced Graft Polymerization for Extracellular Vesicle Detection toward Point-of-Care Cancer Diagnosis, WBC 2016, Montreal, Canada (17th-22nd May 2016).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕(計 5 件)

総説

*石原量, 猪股祥子, 菊池明彦, ぶんせき, 査読有, vol. 1, 2018, pp. 21-27.

*石原量, 猪股祥子, 菊池明彦, *Colloid & Interface Communication*, 査読無, 42(3) (2017) 30-33.

査読付きプロシーディングス

R. Ishihara, T. Nakajima, Y. Uchino, K. Tanabe, K. Hosokawa, M. Maeda, Y. Tomooka, A. Kikuchi, *Front. Bioeng. Biotechnol. Conference Abstract: 10th World Biomaterials Congress*, 2016, 査読有, 2016.

R. Ishihara, K. Tanabe, Y. Uchino, K. Hosokawa, M. Maeda, A. Kikuchi, *Proceedings of Micro Total Analysis Systems 2016*, 査読有, 2016, pp. 1144-1145.

新聞

「細胞分泌粒子高感度で検出」流路に抗体，蛍光物質流す がん診断に活用へ，2017年12月22日 日経産業新聞006ページ.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 量 (ISHIHARA Ryo)
東京理科大学 基礎工学部 材料工学科・助教
研究者番号：30633507

(2) 研究分担者

中島 忠章 (NAKAJIMA Tadaaki)
東京理科大学 基礎工学部 生物工学科・助教
研究者番号：40631213

(3) 連携研究者

菊地 明彦 (KIKUCHI Akihiko)
東京理科大学 基礎工学部 材料工学科・教授
研究者番号：40266820

友岡 康弘 (TOMOOKA Yasuhiro)
東京理科大学 基礎工学部 生物工学科・教授
研究者番号：10197949

前田 瑞夫 (MAEDA Mizuo)
理化学研究所 前田バイオ工学研究室・主任研究員
研究者番号：10165657

細川 和生 (HOSOKAWA Kazuo)
理化学研究所 前田バイオ工学研究室・専任研究員
研究者番号：00373366

(4) 研究協力者