

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17645

研究課題名(和文) マイクロ流体アプローチによる超並列1エキソソーム解析システムの構築

研究課題名(英文) A microfluidic approach for large-scale single-exosome analysis

研究代表者

Kim Soohyeon (Soo Hyeon, Kim)

東京大学・生産技術研究所・講師

研究者番号：80709189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、単一粒子を指定のマイクロウェルへ順番にトラップすることが可能な Addressable Electroactive Microwell Array (AEMA)を開発した。細胞を用いた実証実験の結果、90%の高い効率で単一細胞の組み合わせを作る事に成功した。また、エキソソームの単離と高感度エキソソームの定量化を実現するため、単一エキソソームELISA法を確立した。この方法ではエキソソームを単一粒子レベルで検出することにより、ヘテロな表面マーカーを持つエキソソームに対して、精度の高い定量化が可能であるため、エキソソームを用いた診断への応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単一エキソソームELISA法は、精度の高いエキソソームの定量化が可能であるため、エキソソームを用いた診断への応用が期待できる。また、インデックス配列を含むDNAライブラリープールを作成・シーケンシングすることで、エキソソームの量だけではなく、内部の情報を把握することが可能なエキソソーム解析法の確立が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, Addressable Electroactive Microwell Array (AEMA) has been developed for the highly efficient combination of multiple particles by sequentially trapping single particles into the designated microwells in an array. Highly efficient combination of multiple single cells has been successfully demonstrated. Moreover, single exosome ELISA has been developed for the quantitative detection of exosome. Each exosome was compartmentalized into tiny reactors with reporter enzymes and the signal emitting reactors were counted for the quantification of exosomes. The method can be used for the quantitative detection of exosomes having heterogeneous markers on their surfaces.

研究分野：マイクロ流体

キーワード：エキソソーム 単一細胞 組み合わせ 誘電泳動

1. 研究開始当初の背景

細胞間情報伝達は、表面タンパク質やサイトカインなどの分泌タンパク質が関与する機構だけではなく、エキソソームと呼ばれる直径 30~100nm の膜小胞の放出により遠く離れた細胞まで情報を伝達する機構もあり、近年注目を集めている。エキソソームは、その内部に存在する分泌細胞由来のタンパク質、mRNA、miRNA が細胞間の遺伝情報伝達や腫瘍細胞による免疫抑制誘導に関与している可能性が示唆されている。特に miRNA は細胞内で mRNA と結合してその転写を制御することで、発生、細胞増殖および細胞分化、アポトーシスまたは代謝といった広範な生物学的プロセスに重要な役割を担うことが知られている。

最近の次世代シーケンシング技術登場に伴い、エキソソーム内部に存在する mRNA、miRNA の網羅的な解析はすでに可能になったが、各エキソソームは様々な miRNA をもち、その内部物質も不均一であることが示唆されている。しかし単一エキソソームの詳細については解析が進んでない。なぜならば、従来のエキソソーム解析法では大量のエキソソームを一度に解析するため、複数のエキソソームからの情報が混在してしまい、エキソソーム集団中の個々のエキソソームが持つ特性や機能の解明は不可能だからである。

単一エキソソーム解析において、大きな問題点はそれぞれのエキソソームを標識する方法である。例えば次世代シーケンシング技術を用いて miRNA の網羅的な解析を行うには、各エキソソームに標識をつけて解析する必要があるが、そのためには 96 マイクロプレートに 96 個のエキソソームを 1 個ずつ分離し、その中の miRNA をそれぞれ標識してシーケンスしなければならぬ。この方法でも単一エキソソーム内の miRNA の網羅的な解析は可能であるが、大量のエキソソームを一度に解析することは非常に難しい。エキソソームは 1 μ L のサンプル中におよそ 1 億個存在することが知られているため、膨大な数のエキソソームを一粒子レベルで解析するには、各エキソソームの効率的な標識が極めて重要になる。本研究では、数百万個のエキソソームを一粒子レベルで効率よく標識することを可能とする Microfluidic Combinatorial Indexing (MCI) 法を確立し、個々のエキソソーム内の miRNA について網羅的な解析が可能な超並列 1 エキソソーム解析方法の構築を目指す。

2. 研究の目的

本計画では、2 種類のインデックス配列の組み合わせで標識した数百万個の単一エキソソーム中の miRNA を、網羅的に解析することを可能にする「超並列 1 エキソソーム解析法」の確立を目的とする。インデックス配列の組み合わせで各エキソソームを識別するため、数千種類のインデックスがあれば数百万個のエキソソームの識別が可能となる。これにより、エキソソーム集団中の個々のエキソソームが持つ特性や機能の理解が可能になるため、エキソソームの情報伝達メカニズムの解明などの基礎科学への寄与が期待される。さらに、このシステムを臨床サンプルのエキソソーム解析に応用することで、疾患メカニズムの理解を深めるとともに、新たなバイオマーカーとしてエキソソームを検討することで、診断法や治療法の開発にも資する。

3. 研究の方法

マイクロウェルアレイの底面部分に電極を配置することで、単一細胞を誘電泳動によって効率よくトラップし、解析が可能な Electroactive Microwell Array (EMA) を開発した。本計画では EMA をさらに高度化することで、3' インデックスビーズ、5' インデックスビーズ、エキソソームを捕捉したビーズを一粒子レベルで順番に各マイクロウェルにトラップすることで、各インデックスビーズの組み合わせを実現する。様々なビーズを効率よくトラップするため、数値シミュレーションを用いてマイクロウェルのサイズやトラッピング条件 (印加電圧、誘電泳動のためのバッファー、電極間距離など) を最適化する。

まずは培養細胞から分泌されたエキソソームの解析を行う。ターゲットエキソソームをマイクロビーズに捕捉するため、マイクロビーズの表面をエキソソームの膜表面に存在するタンパク質を抗原として反応する捕捉抗体で表面修飾する。マイクロビーズの個数がエキソソームの個数と比べて非常に高い場合、個々のマイクロビーズにはエキソソームが一粒子のみ結合しているか、全く結合していないかのどちらかになる。MCI を用いて、単一エキソソームを捕捉したビーズ、3' インデックスビーズ、5' インデックスビーズを封入したマイクロウェル内でアダプターライゲーションと RT-PCR を行う事により、3' 側アダプターと 5' 側アダプターのインデックス配列の組み合わせを持つ DNA ライブラリーを作成する。これによって、マイクロウェルごとに特定のインデックス配列の組み合わせを含む DNA ライブラリーを作成することが可能となり、様々なエキソソームからの DNA ライブラリーを識別することができる。問題点として、酵素などの非特異的な結合が予想されるが、ブロッキング剤や生体適合性素材などを用いたデバイスの表面処理やバッファー組成などの条件について詳細に検討する。

4. 研究成果

単一エキソソームを効率良く標識するための Microfluidic Combinatorial Indexing (MCI) 法を実現するため、反応用の Combinatorial Reactor (CR) の底面に、誘電泳動電極の個別制御が可能な Trap Well (TW) を配置した AEMA を設計・試作した。各マイクロウェルの誘電泳動電極を個別に制御可能な AEMA を用いて、順番に RNA 捕捉ビーズと、エキソソーム捕捉ビーズを指定の

マイクロウェルにトラップすることで、単一エクソソームを効率良く標識することが可能になる。

試作したデバイスの検証実験のため、まず単一細胞トラップを確認するため、緑蛍光色素で染色した PC3 細胞 (緑 PC3 細胞) をマイクロ流体デバイスへ流入させ、TW1 の電極へ電圧を印可することで、細胞を TW1 へトラップした。TW1 のみの電極へ電圧を印可するため、細胞は TW1 にトラップされる。本実験では 98% の高い single cell occupancy ratio (トラップされた単一細胞数 / TW1 の数) で単一細胞をトラップすることに成功した。TW の直径は 22 μm であり、細胞の平均直径である 15 μm より少し大きいので、1 つの細胞がトラップされると、同じ TW には 2 つ目の細胞はトラップされない。このように TW の直径が細胞のトラップされる場所を制限し、誘電泳動を用いた能動的な細胞トラップで、選択的に細胞 1 つをトラップすることが可能になる。

単一細胞の組み合わせを実現するため、TW1 に緑 PC3 細胞をトラップした後に、2 つ目の細胞となる赤蛍光色素で染色した PC3 細胞 (赤 PC3 細胞) をマイクロ流体デバイスに流入する。TW2 の誘電泳動電極へ誘電泳動電圧を印可することで、赤 PC3 細胞を TW2 へトラップした。この時 TW1 にトラップされた緑 PC3 細胞が流れないように、TW1 にも誘電泳動電圧を印可しつつ TW2 へ赤 PC3 細胞をトラップした。この時点で、TW1 には既に緑 PC3 細胞がトラップされているため、赤 PC3 細胞は TW1 へトラップされない。ただし、緑 PC3 細胞がトラップされなかった TW1 には赤 PC3 細胞がトラップされるので、効率な組み合わせを実現するためには高い single cell occupancy ratio を維持することが重要になる。最後に、3 つの単一細胞の組み合わせを実現するため、TW3 へ青蛍光色素で染色した 3 つ目の PC3 細胞 (青 PC3 細胞) をトラップさせる。デバイス中に残っている赤 PC3 細胞を流した後、マイクロ流体デバイスに青 PC3 細胞を流入させ、TW3 の電極に交流電圧を印可することで青 PC3 細胞をトラップした。3 つの単一細胞をトラップした後、適切な蛍光フィルタを選択しながら、同一 CR 内にトラップされた様々な細胞を撮影した。結果として 90% の効率で 3 つの単一細胞の組み合わせを実現することに成功した (図 1)。

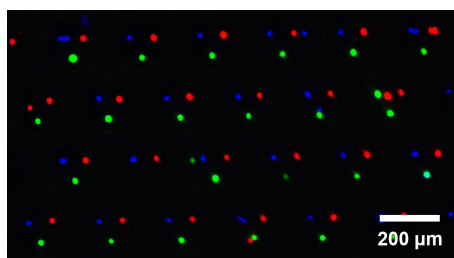


図 1. 単一細胞の組み合わせ。

一方、エクソソーム捕捉ビーズを用いたエクソソーム単離を検証するため、単一エクソソーム ELISA 法を確立した。具体的には、ターゲットエクソソームに対する捕捉抗体で表面修飾されたエクソソーム捕捉ビーズにエクソソームを捕捉した後、 β -gal で標識された検出抗体を結合させることで、マイクロビーズ上に捕捉抗体、エクソソーム、酵素標識検出抗体の 3 つの複合体を形成させる。ここでマイクロビーズの個数よりターゲットエクソソームの個数が十分に少ない場合、マイクロビーズ 1 個につき、3 つの複合体が 1 分子のみ結合しているか、全く結合していないかどちらかの状態になる。エクソソームを捕捉し複合体を形成したマイクロビーズに、酵素の蛍光基質を添加して懸濁液を作成し、疎水性材料で製作したマイクロウェルへ入れた後、オイルを入れることで自動的に微小液滴が形成される。これにより各マイクロビーズを油性液体でマイクロウェルに封入できる。3 つの複合体を結合したマイクロビーズを含む液滴のみが蛍光を発するので、蛍光信号を発する液滴の数をカウントすればエクソソームの数が得られる。これにより単一エクソソームの定量化を実現し、ELISA 法を確立した。

単一エクソソーム ELISA 法の検証実験のため、細胞培養上清由来 (COL01 細胞株) の凍結乾燥エクソソーム (コスモ・バイオ株式会社) をターゲットとした ELISA システムを構築した。具体的には、エクソソーム膜表面の CD9 に対する抗体で表面修飾したマイクロビーズを用いて様々な濃度のエクソソームを捕捉した後、 β -gal で標識された CD63 に対する抗体と反応させることで、捕捉抗体 - エクソソーム - 検出抗体の複合体をエクソソーム捕捉ビーズ上に形成した。オイルを用いてマイクロビーズが捕捉されたマイクロウェルを封入した後、蛍光信号を発するマイクロウェルの数と捕捉されたマイクロビーズの数をカウントし、その割合 (Fraction of exosome-beads) がエクソソームの濃度に依存することを確認した (図 2)。FEB が 10% 以下であることから、確率的にエクソソーム捕捉ビーズには単一のエクソソームのみを捕捉させるか、全く捕捉させないかのどちらかの状態になっていることが示された。これにより、単一エクソソーム ELISA 法を用いて、エクソソームの単離が検証できた。今後は、単一エクソソーム ELISA 法を用いて様々な抗体の組み合わせによるエクソソームの定量検出を行う予定である。

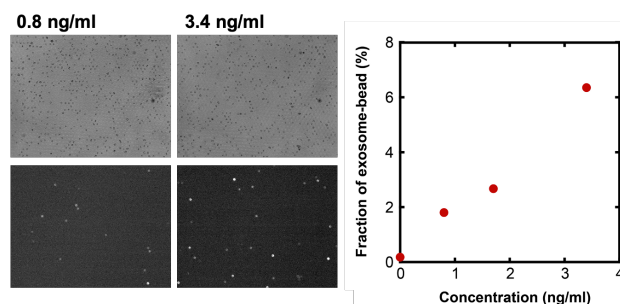


図 2. エクソソーム ELISA 法

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Kim Soo Hyeon, Ito Hiroshi, Kozuka Masahiro, Takagi Hidenori, Hirai Mitsuharu, Fujii Teruo | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Cancer marker-free enrichment and direct mutation detection in rare cancer cells by combining multi-property isolation and microfluidic concentration | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Lab on a Chip | 6. 最初と最後の頁 757 ~ 766 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8LC00772A | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Park Jongho, Komori Takayuki, Uda Toru, Miyajima Keiichi, Fujii Teruo, Kim Soo Hyeon | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Sequential Cell-Processing System by Integrating Hydrodynamic Purification and Dielectrophoretic Trapping for Analyses of Suspended Cancer Cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Micromachines | 6. 最初と最後の頁 47 ~ 47 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.3390/mi11010047 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Takeuchi Makoto, Nagasaka Kazunori, Yoshida Mina, Kawata Yoshiko, Miyagawa Yuko, Tago Saori, Hiraike Haruko, Wada-Hiraike Osamu, Oda Katsutoshi, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki, Ayabe Takuya, Kim Soo Hyeon, Fujii Teruo | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 On-chip immunofluorescence analysis of single cervical cells using an electroactive microwell array with barrier for cervical screening | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biomicrofluidics | 6. 最初と最後の頁 044107 ~ 044107 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1063/1.5089796 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 7件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Soo Hyeon Kim, Mina Yoshida, Saori Tago and Teruo Fujii |
| 2. 発表標題 Efficient pairing of single cells using trap-and-drop microwell array |
| 3. 学会等名 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Chi Je Park, Soo Hyeon Kim, Teruo Fujii |
| 2. 発表標題 Electroactive microwell array for separate trapping of single cells and clusters |
| 3. 学会等名 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Stephany Mai Nishikawa, Farad Khoystatee, Zhongyue Luo, Toshiharu Shiraishi, Kazuyuki Aihara, Yoshiho Ikeuchi, Soo Hyeon Kim, Teruo Fujii and Timothee Levi |
| 2. 発表標題 Neuro-hybrid system with spiking neural network and biomimetic ionic micro-stimulation |
| 3. 学会等名 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 金秀炫、吉田后那、田子沙織、藤井輝夫 |
| 2. 発表標題 Trap-and-dropマイクロウェルアレイを用いた単一細胞ペアリング |
| 3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第38回研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Soo Hyeon Kim, Mina Yoshida, Saori Tago and Teruo Fujii |
| 2. 発表標題 Trap-and-drop microfluidic device for efficient single cell culture |
| 3. 学会等名 The 10th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 金 秀炫 |
| 2. 発表標題 高効率一細胞解析を可能とするマイクロウェルアレイ技術の開発 |
| 3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第35回研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Soo Hyeon Kim |
| 2. 発表標題 Label-free selective trapping of single cancer cells using electroactive microwell array |
| 3. 学会等名 The 9th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 金 秀炫 |
| 2. 発表標題 Addressable Electroactive Microwell Arrayで実現する単一細胞の組み合わせ |
| 3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第36回研究会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Soo Hyeon Kim |
| 2. 発表標題 Addressable electroactive microwell array capable of deterministic combinatorial trapping of single cells |
| 3. 学会等名 International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2017) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Soo Hyeon Kim |
| 2. 発表標題 Highly efficient compartmentalization of multiple single cells using addressable electroactive microwell array |
| 3. 学会等名 2017 meeting on Single Cell Analyses, Cold Spring Harbor Laboratory (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 金 秀炫 |
| 2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いたCTC解析プラットフォームの構築 |
| 3. 学会等名 JBICバイオ関連基盤技術研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 金 秀炫 |
| 2. 発表標題 希少細胞の高効率1細胞解析を可能とする Electroactive Microwell Arrayの開発 |
| 3. 学会等名 第2回 Liquid Biopsy 研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計6件

| | | |
|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| 産業財産権の名称 生体粒子捕集装置 | 発明者 金 秀炫、藤井 輝夫、満仲 健、飯塚 邦彦、幡井 徹也 | 権利者 シャープ株式会社、国立大学法人 東京大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-049890 | 出願年 2019年 | 国内・外国の別 国内 |

| | | |
|---------------------------------|------------------------|-------------------|
| 産業財産権の名称 細胞捕捉装置 | 発明者 金 秀炫、藤井 輝夫、朴 致済 | 権利者 国立大学法人東京大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-210761 | 出願年 2018年 | 国内・外国の別 国内 |

| | | |
|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| 産業財産権の名称 粒子分別装置 | 発明者 金 秀炫、藤井 輝夫、満仲 健、飯塚 邦彦、佐藤 大紀 | 権利者 シャープ株式会社、国立大学法人 東京大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-131700 | 出願年 2018年 | 国内・外国の別 国内 |

| | | |
|------------------------------------|--|---------------|
| 産業財産権の名称 対象物捕捉装置、および対象物捕捉装置ユニット | 発明者 飯塚邦彦、満仲健、 藤本義久、藤井輝 夫、金秀 弦 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-085579 | 出願年 2017年 | 国内・外国の別 国内 |

| | | |
|---------------------------------------|--|---------------|
| 産業財産権の名称 液体中微粒子分析システムおよび液体中微粒子分析方法 | 発明者 飯塚邦彦、藤本義 久、満仲健、藤井輝 夫、金秀 弦 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-149018 | 出願年 2017年 | 国内・外国の別 国内 |

| | | |
|---------------------------------|--------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 細胞捕捉装置 | 発明者 小森隆幸、金秀炫、 藤井輝夫 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-193145 | 出願年 2017年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|