

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21124

研究課題名(和文)人工リンパ節の創出

研究課題名(英文)Creation of artificial lymph node function

研究代表者

安井 隆雄 (Yasui, Takao)

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00630584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題においては、腫瘍由来エクソソームを効率よく捕捉し、かつ免疫細胞の培養可能なナノワイヤ空間(人工リンパ節)を開発すべく、以下の(1)～(5)の研究成果を得た。(1)脳腫瘍患者の尿中miRNA群に脳腫瘍特異的な核酸情報があることの確認した。(2)オボアルブミン抗原を強制発現させたC57BL/6マウス膠芽腫細胞株を培養した。(3)得られた培養液に含まれるエクソソームをナノワイヤ上に捕捉した。(4)OVA特異的受容体を持つC57BL/6マウス由来の免疫細胞のナノワイヤ上で培養した。(5)ナノワイヤ上での培養によってエクソソームを取り込む免疫細胞の抗原提示能を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本提案の達成により期待される社会に与えるインパクト・貢献は、身体的・精神的な負荷が低い尿を使った、脳腫瘍のリキッドバイオプシーや術後の再発モニタリングだけでなく、当該エクソソームを使った免疫細胞の活性化の場の創出と新たな治療法を提供し、エクソソームとナノワイヤに基づいた脳腫瘍の診断から治療に至る一貫通貫の研究を世界に先駆けて実現する点にある。さらに、本課題が対象とする脳腫瘍に対する「早期検知」や「再発検査」、「治す医療」に加え、社会的要請の多い「健康寿命の延伸」の視点を加えた研究展開も展望できる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we obtained the following research results (1)~(5) to develop a nanowire space (artificial lymph node) that can efficiently capture tumor-derived exosomes and culture immune cells. (1) We confirmed that urinary miRNAs from brain tumor patients contain brain tumor-specific nucleic acid information. (2) C57BL/6 mouse glioblastoma cells with highly expressed ovalbumin antigen were cultured. (3) Exosomes in the resulting culture medium were captured on nanowires. (4) Immune cells derived from C57BL/6 mice with OVA-specific receptors were cultured on nanowires. (5) The antigen-presenting ability of immune cells that captured exosomes by culture on nanowires was evaluated.

研究分野：分析化学

キーワード：ナノワイヤ エクソソーム 抗原提示細胞

1. 研究開始当初の背景

報告者は申請時の事前検討として、申自のエクソソームの網羅的捕捉・microRNA(miRNA)抽出技術(~99%・2500種)・機械学習技術を駆使し、脳腫瘍 vs.非がんドナーの尿中 miRNA 群より診断率・感度・特異度は96%・96%・97%を達成し、脳腫瘍に由来するエクソソームに脳腫瘍特異的な核酸情報が存在することを確認した。各ドナー100人ずつより抽出される miRNA をマイクロアレイにより発現量検出し、それぞれの miRNA プロファイルの交差検定を50回繰り返した結果、脳腫瘍関連 miRNA を2500種から50種程度を選び出した。これら50種は200人の共通発現 miRNA ではなく(例:Aさんは40種発現・Bさんは30種発現)、50種の中から組み合わせられる特定のアンサンブルが脳腫瘍/非がんの識別に関与していることが判明した。また、脳腫瘍患者の尿中 miRNA の半数以上が腫瘍細胞からも発見され、体液中の RNA 分解酵素の役割を考慮すれば、脳腫瘍関連 miRNA はエクソソームなどにより血液循環を経て尿中まで到達していること、特定の miRNA アンサンブル情報を保持するエクソソームが存在することは明らかであり、本研究提案「人工リンパ節創出」の着想に繋がった。

本研究の意義は、網羅的にエクソソームを捕捉可能な場を開発し、免疫細胞が対外で学習する場を創出することで、いわゆる「人工リンパ節」という概念を創造するという点に集約される。人工リンパ節の概念より、特に、所属リンパ節のない中枢神経系腫瘍に対する免疫療法の治療効果が大きいと期待される。また、世界トップレベルの工学研究より、網羅的エクソソーム捕捉と細胞培養を両立するデバイスを開発し、同デバイスを用いて、これまでアプローチ困難であった医学的課題の解決を目指す試みは当該助成事業が目指す高い挑戦性と一致する。本計画では、これらの強みを生かすことで、治療困難な悪性脳腫瘍に対する新たな治療法の開発へ繋げることを目指した。

本提案の達成により期待される社会に与えるインパクト・貢献は、身体的・精神的な負荷が低い尿を使った、脳腫瘍のリキッドバイオプシーや術後の再発モニタリングだけでなく、当該エクソソームを使った免疫細胞の活性化の場の創出と新たな治療法を提供し、エクソソームとナノワイヤに基づいた脳腫瘍の診断から治療に至る一気通貫の研究を世界に先駆けて実現する点にある。さらに、本課題が対象とする脳腫瘍に対する「早期検知」や「再発検査」、「治す医療」に加え、社会的要請の多い「健康寿命の延伸」の視点を加えた研究展開も展望できる。すでに、脳腫瘍の早期検知に関しては、診断率96%・感度96%・特異度97%であり、従来の検診法に比べても感度・特異度が十分な状況である。このことは、国民の健康寿命の延伸に貢献するだけでなく、健康・医療関連産業の振興や我が国発の革新的医薬品・医療機器等の開発を促進し、医薬品・医療機器産業の国際競争力の強化に大いに貢献する。これらにより、我が国の医薬品・医療機器産業が、国際競争力を持ち、リーディング・インダストリーとなる社会実現につながることを考えた。

2. 研究の目的

本研究は、エクソソームを捕捉するナノワイヤ上で免疫細胞を培養することにより、免疫細胞の腫瘍傷害性を活性化させる「人工リンパ節」の概念の創出を目的とした。将来的な治療困難な悪性脳腫瘍の新規治療法として大きなブレイクスルーをもたらすべく、斬新な免疫療法の実現を目指した。エクソソームは各種細胞から分泌され、細胞の各種情報となる核酸を内包している。特に、がん細胞が分泌するエクソソームは、がん由来の DNA、RNA、miRNA などの核酸情報が内包されており、その中にはがん特異的なネオアンチゲンをコードする核酸も含まれると考えられる。報告者はこれまでの研究において、ナノワイヤを用いることでエクソソームを濃縮捕捉することに成功している[論文: T. Yasui, *Sci. Adv.*, 2017, 3, e1701133]。本研究においては、ナノワイヤによるエクソソームの濃縮捕捉の特徴に着目し、ナノワイヤによるがん由来のエクソソーム内部情報の濃縮と、それら濃縮情報による体外での腫瘍特異的免疫細胞を効果的に活性化する「人工リンパ節」を着想した。中枢神経系には所属リンパ節がなく、免疫応答が起こりにくい環境であり、各種免疫療法の効果は限定的であるが、免疫細胞が免疫反応を学習することができる場「人工リンパ節」を体外でナノワイヤによって創造する発想より、斬新な免疫療法を創出し、治療困難な悪性脳腫瘍の新規治療法に大きなブレイクスルーをもたらす。

報告者は、これまでの研究支援のもと築いてきた、ナノ空間制御技術により、ナノワイヤとエクソソームの静電相互作用力を介した網羅的捕捉技術の開発に成功している。静電相互作用力は超遠心力に比べて1桁大きな力があり、また、エクソソームを近接させることにより捕捉回収が可能であるため、変形や破砕などの物理的な影響が考えられる超遠心力に比べ、より無傷な状態に近いエクソソームを99%以上捕捉することができ、従来手法を凌駕することに成功している[論文: T. Yasui, *Sci. Adv.*, 2017, 3, e1701133]。さらに、開発したナノワイヤデバイスを用いて抽出した miRNA をマイクロアレイ解析すると、尿1 mL から1300種類以上の miRNA の発見にも成功している[同論文]。最近の検討では、1300種類/ヒトの miRNA が個人差による種類差があること、その結果、200人の解析データから2500種類程度の miRNA が尿中に存在すること

(441種が200人共通)も発見しており、2500種以上の存在が確認されているヒト miRNA が全て尿中に存在することを明らかにしつつある。また、その2500種のうち、328種も p 値 <0.0005 であることも判明している。これら2500種の尿中 miRNA プロファイルの機械学習(人工知能)に基づいた解析により、脳腫瘍の診断率・感度・特異度は96%・96%・97%であった。これは従来妥当と考えられてきた300種類という数値では達成できなかった尿診断による健康な社会を実現するナノワイヤ技術の新展開であり、産業に変革をもたらす基盤技術である。2500種類以上の miRNA を尿 1 mL より回収できた研究成果はこれまでのところ確認されておらず、ナノワイヤを基盤とするエクソソームの捕捉技術とそれに伴う miRNA プロファイル解析技術は世界トップレベルの研究開発技術であると言える。本研究では、本技術をナノワイヤによるがん由来のエクソソーム内部情報の濃縮へと展開し、それら濃縮情報による腫瘍特異的免疫細胞を効果的に体外活性化する「人工リンパ節」の創出を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、ナノワイヤ上に網羅的に捕捉する脳腫瘍由来エクソソームによる免疫細胞の腫瘍傷害性の変化を、マウスの細胞を用いて解明する研究手法を用いた。報告者は、シリコーンゴム(PDMS)上にナノワイヤを配したデバイスを開発することで、尿中のエクソソームを通常法に比べ遥かに高効率に捕捉することを報告している[論文: T. Yasui, *Sci. Adv.*, 2017, 3, e1701133]。本課題においては、腫瘍由来エクソソームを効率よく捕捉し、かつ免疫細胞の培養可能なナノワイヤ空間(人工リンパ節)を開発すべく、以下の(1)~(5)の研究を行った。

- (1) 脳腫瘍患者の尿中 miRNA 群に脳腫瘍特異的な核酸情報があることの確認
- (2) オボアルブミン(OVA) 抗原を強制発現させた C57BL/6 マウス膠芽腫細胞株(GL261)の培養
- (3) 得られた培養液(conditioned medium)に含まれるエクソソームをナノワイヤ上に捕捉
- (4) OVA 特異的受容体を持つ C57BL/6 マウス (OT1) 由来の免疫細胞のナノワイヤ上で培養
- (5) ナノワイヤ上での培養によってエクソソームを取り込む免疫細胞の抗原提示能の評価

本研究においては概念検証を第一の目的とし、ナノワイヤ上で培養する or しない免疫細胞を用いて、抗原提示能力で比較検討することとした。また、免疫細胞へのエクソソームの取り込みについては超解像顕微鏡により確認した。

4. 研究成果

初年度は、以下の研究成果を得た。

- (1) 脳腫瘍患者の尿中 miRNA 群に脳腫瘍特異的な核酸情報があることの確認

本研究項目では、報告者独自の細胞外小胞の網羅的捕捉・miRNA 抽出技術・機械学習技術を駆使し、脳腫瘍 vs. 非がんドナーの尿中 miRNA 群より高い診断率・感度・特異度を達成し、脳腫瘍に由来する細胞外小胞に脳腫瘍特異的な核酸情報が存在することを確認した。まず、脳腫瘍ドナー・非がんドナー100人ずつより抽出される miRNA をマイクロアレイにより発現量検出し、それぞれの miRNA プロファイルの交差検定を50回繰り返した結果、脳腫瘍関連 miRNA を2500種から50種程度を選び出した。これら50種は200人の共通発現 miRNA ではなく(例: Aさんは40種発現・Bさんは30種発現)、50種の中から組み合わせられる特定のアンサンブルが脳腫瘍/非がんの識別に関与していることが判明した。さらに、腫瘍患者の尿中 miRNA が腫瘍細胞から発見され、体液中の RNA 分解酵素の役割を考慮すれば、腫瘍関連 miRNA は細胞外小胞などにより血液循環を経て尿中まで到達していること、特定の miRNA アンサンブル情報を保持する細胞外小胞が存在することを明らかとした。

- (2) オボアルブミン(OVA) 抗原を強制発現させた C57BL/6 マウス膠芽腫細胞株(GL261)の培養
本研究項目では、研究分担者と共同で、オボアルブミン(OVA) 抗原を強制発現させた C57BL/6 マウス膠芽腫細胞株(GL261)の培養、並びに、培養液(conditioned medium)の回収とエクソソームの回収を達成した。研究分担者のグループにて、C57BL/6 マウス膠芽腫細胞株(GL261)に OVA 抗原強制発現株を用意した。OVA 抗原の強制発現の有無については、flow cytometry にて確認した。その後、OVA 抗原強制発現 GL261 株を培養し、培養液(conditioned medium)の回収と、超遠心法によるエクソソームの回収を達成した。

- (3) 得られた培養液(conditioned medium)に含まれるエクソソームをナノワイヤ上に捕捉
本研究項目では、(2)で得られた培養液(conditioned medium)をナノワイヤ上に滴下することで培養液(conditioned medium)中のエクソソームをナノワイヤ上で捕捉することを達成した。まず、培養液(conditioned medium)を大量に回収し、超遠心法で精製したエクソソームがナノワイヤ上で捕捉されるかを検討した。ナノワイヤ上での捕捉の確認には、nanoparticle tracking analysis (NTA) を用い、ナノワイヤ上への滴下前と、滴下後に回収したエクソソームの濃度を比較した。超遠心法で精製したエクソソームを PBS に分散させ、PBS をナノワイヤ上に滴下し、前後で濃度を比較したところ、濃度の減少が確認された。その後、ナノワイヤ上に捕捉された粒子の抗原を CD63/CD9/CD81 抗体により染色し、捕捉された粒子がエクソソームであることを確認した。また、培養液(conditioned medium)を超遠心処理せずに直接ナノワイヤ上に滴下してエクソソームが捕捉されることも確認した。

- (4) OVA 特異的受容体を持つ C57BL/6 マウス (OT1) 由来の免疫細胞のナノワイヤ上で培養
本研究項目では、(3)で使用したナノワイヤ上で免疫細胞の培養を達成した。まず、OVA 特異

的受容体を持つ C57BL/6 マウス (OT1) の脾臓より、単核球を分離し、樹状細胞に分化させ、flow cytometry により確認を行った。次にナノワイヤ上に OVA を固定化し、ナノワイヤ上での樹状細胞による抗原提示を確認した。ガラス基板上の樹状細胞+OVA 溶液、ナノワイヤ上の樹状細胞+OVA 溶液、OVA 固定化ナノワイヤ上の樹状細胞、のどの樹状細胞でも抗原が提示されることを確認した。

(5) ナノワイヤ上での培養によってエクソソームを取り込む免疫細胞の抗原提示能の評価
本研究項目では、(3) でエクソソームを捕捉したナノワイヤの上に、(4) で用いた樹状細胞を培養し、樹状細胞にエクソソームが取り込まれたことを達成した。まず、GL261 を培養して得られる培養液(conditioned medium)をナノワイヤ上に滴下し、エクソソームをナノワイヤ上に捕捉した。次に、エクソソームを捕捉したナノワイヤの上に未成熟な樹状細胞を播種し、ナノワイヤ上で樹状細胞を成熟させた。超解像顕微鏡で観察したところ、樹状細胞の成熟とともに、樹状細胞がナノワイヤ上のエクソソームを取り込むことが確認された。

上述の (1) ~ (5) の成果を持ってして、ナノワイヤ上での、エクソソームの捕捉と抗原提示細胞の培養、抗原提示細胞によるエクソソームの取り込みを実証し、本研究が目標とする概念検証を達成した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Paisrisarn Piyawan, Yasui Takao, Zhu Zetao, Klamchuen Annop, Kasamechonchung Panita, Wutikhun Tuksadon, Yordsri Visittapong, Baba Yoshinobu	4. 巻 14
2. 論文標題 Tailoring ZnO nanowire crystallinity and morphology for label-free capturing of extracellular vesicles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 4484 ~ 4494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1nr07237d	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yasui Takao, Paisrisarn Piyawan, Yanagida Takeshi, Konakade Yuki, Nakamura Yuta, Nagashima Kazuki, Musa Marina, Thiodorus Ivan Adiyasa, Takahashi Hiromi, Naganawa Tsuyoshi, Shimada Taisuke, Kaji Noritada, Ochiya Takahiro, Kawai Tomoji, Baba Yoshinobu	4. 巻 194
2. 論文標題 Molecular profiling of extracellular vesicles via charge-based capture using oxide nanowire microfluidics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 113589 ~ 113589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2021.113589	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 MUSA Marina, YASUI Takao, ZHU Zetao, NAGASHIMA Kazuki, ONO Miki, LIU Quanli, TAKAHASHI Hiromi, SHIMADA Taisuke, ARIMA Akihide, YANAGIDA Takeshi, BABA Yoshinobu	4. 巻 37
2. 論文標題 Oxide Nanowire Microfluidic Devices for Capturing Single-stranded DNAs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1139 ~ 1145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20P421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Hiromi, Yasui Takao, Klamchuen Annop, Khemasiri Narathon, Wuthikhun Tuksadon, Paisrisarn Piyawan, Shinjo Keiko, Kitano Yotaro, Aoki Kosuke, Natsume Atsushi, Rahong Sakon, Baba Yoshinobu	4. 巻 11
2. 論文標題 Annealed ZnO/Al ₂ O ₃ Core-Shell Nanowire as a Platform to Capture RNA in Blood Plasma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 1768 ~ 1768
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nano11071768	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhu Zetao, Yasui Takao, Liu Quanli, Nagashima Kazuki, Takahashi Tsunaki, Shimada Taisuke, Yanagida Takeshi, Baba Yoshinobu	4. 巻 12
2. 論文標題 Fabrication of a Robust In2O3 Nanolines FET Device as a Biosensor Platform	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 642 ~ 642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi12060642	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitano Yotaro, Aoki Kosuke, Ohka Fumiharu, Yamazaki Shintaro, Motomura Kazuya, Tanahashi Kuniaki, Hirano Masaki, Naganawa Tsuyoshi, Iida Mikiko, Shiraki Yukihiko, Nishikawa Tomohide, Shimizu Hiroyuki, Yamaguchi Junya, Maeda Sachi, Suzuki Hidenori, Wakabayashi Toshihiko, Baba Yoshinobu, Yasui Takao, Natsume Atsushi	4. 巻 13
2. 論文標題 Urinary MicroRNA-Based Diagnostic Model for Central Nervous System Tumors Using Nanowire Scaffolds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 17316 ~ 17329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscami.1c01754	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Hiromi, Yasui Takao, Kashida Hiromu, Makino Koki, Shinjo Keiko, Liu Quanli, Shimada Taisuke, Rahong Sakon, Kaji Noritada, Asanuma Hiroyuki, Baba Yoshinobu	4. 巻 32
2. 論文標題 Microheater-integrated zinc oxide nanowire microfluidic device for hybridization-based detection of target single-stranded DNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanotechnology	6. 最初と最後の頁 255301 ~ 255301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1361-6528/abef2c	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 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 安井隆雄
2. 発表標題 尿中microRNA解析による早期がん検知
3. 学会等名 バイオインダストリー奨励賞受賞者セミナー～がん診断の最前線～ (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本核酸化学会、杉本 直己	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 576
3. 書名 核酸科学ハンドブック	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 セルフリーDNAの抽出方法	発明者 安井隆雄, 馬場嘉信, 篠田渉, 夏目敦至	権利者 名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-157294	出願年 2020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
研究 分 担 者	夏目 敦至 (Natsume Atsushi) (30362255)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------