

令和 6 年 6 月 29 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05116

研究課題名（和文）神経細胞近傍のエクソソーム動態計測を目指した微小センサーの開発

研究課題名（英文）Development of a microsensor for measuring exosome dynamics in the vicinity of neurons

研究代表者

東海林 敦（Atsushi, Shoji）

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90459850

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）：細胞から分泌されるエクソソームをリアルタイムかつノンラベルで計測する方法を開発することで、化学的ないしは物理的な刺激後、どのようなタイミングで、どの程度の個数のエクソソームが分泌されるか明らかにできる。本申請課題では、無電解メッキ技術で作製した光ファイバー表面プラズモン共鳴センサーをキャピラリー内に挿入し、これを顕微鏡下において、電動マニピュレーターで操作する計測システムを開発した。エクソソームの計測にあたり、非特異的な吸着を抑制するとともに、多数の分子認識素子を固定化できる界面設計に成功した。また、キャピラリーとセンサーを一体化した計測システムの有用性を示し、エクソソームの検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームには分泌元の細胞由来のタンパク質、DNA および RNA などの生体分子が内包されており、遠く離れた細胞同士のコミュニケーションのツールであると認識されている。エクソソームの機能を理解する上で、その分泌量を把握しておくことは最も基本的なことである。エクソソームが柔らかく壊れやすいナノ粒子であることから、分析機器が高度化した現在においても、エクソソームの分泌量の増減を半定量的に評価するので精一杯である。こういった状況が改善されないまま、エクソソームの機能が議論されているため、時に誤った情報を発信してしまうことが懸念される。本申請課題では、こういった課題の克服に挑戦するものである。

研究成果の概要（英文）：By developing a method for real-time, non-labeled measurement of exosomes secreted from cells, it will be possible to determine the timing and number of exosomes secreted after chemical or physical stimuli. In this project, an optical fiber surface plasmon resonance sensor fabricated by electroless plating technology was inserted into a capillary, and a measurement system was developed to manipulate the sensor with a motorized manipulator under a microscope. For the measurement of exosomes, we have succeeded in designing an interface that can suppress nonspecific adsorption and immobilize a large number of molecular recognition elements. We also demonstrated the usefulness of a measurement system integrating a capillary and a sensor, and succeeded in detecting exosomes.

研究分野：バイオ分析化学

キーワード：エクソソーム 光ファイバー表面プラズモン共鳴

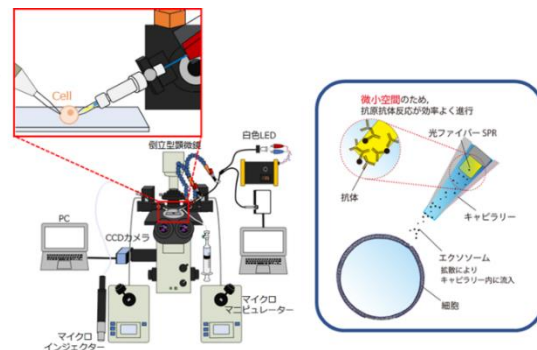
1. 研究開始当初の背景

エクソソームの機能を理解する上で、どのような刺激により、どのくらいの個数のエクソソームが分泌されるか把握することは重要である。細胞から分泌されるエクソソームを計測する際には、細胞を長時間、化学的あるいは電氣的に刺激し続けて、培養液に多量のエクソソームを分泌させる。分泌されたエクソソームを含む培養液上清を回収し、必要に応じてエクソソームを精製し、その後に個数を計測する。長時間の刺激が細胞の摂動になるばかりか、エクソソームの分泌が細胞刺激の直後なのか、もしくは刺激から一定時間経過してからなのかを明らかにすることもできない。エクソソームを計測する上で汎用される方法がイムノアッセイであり、その中でも ELISA 法 (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) はゴールドスタンダードになっている。この方法では、試料溶液中に含まれる目的の抗原あるいは抗体を、特異抗体あるいは抗原で捕捉するとともに、酵素反応を利用して検出・定量する方法であり、洗浄工程も含めて複雑な多段階の操作が必要となる。そのため、計測時間に数時間から半日を要してしまう。エクソソームの重要性が広く認識されてから、これまでに数多く、エクソソーム計測技術法が提案されてきたが、ほとんどの方法において、細胞が化学的ないしは物理的な刺激を受けてから、どのようなタイミングで、どの程度の個数のエクソソームが分泌されるか把握できない。

このような計測を可能にするには、リアルタイムかつノンラベルの計測技術が求められる。そこで、センサー界面に固定化された抗体に抗原が結合するだけで、SPR シグナルが変化する表面プラズモン共鳴センサー (SPR) に着目した。その中でも、プリズムを使用しないことから、センサーを微小化できる、光ファイバー SPR センサーに着目した。通常、光ファイバー SPR センサーを作製する際には、真空蒸着法やスパッタリングが汎用されている。一方、我々は、安価かつ大量に生産できることが期待されることから、光ファイバー SPR センサーを作製する手段として無電解メッキ技術に着目してきた。一般に、無電解メッキ技術では、金属薄膜の膜厚をナノメートルレベルでコントロールすることが難しいとされるが、膜厚をリアルタイムで測定しながら無電解メッキ反応を実施する独自技術を確立しており、これを利用して、光ファイバー SPR センサーを作製する方法の確立に成功している。

2. 研究の目的

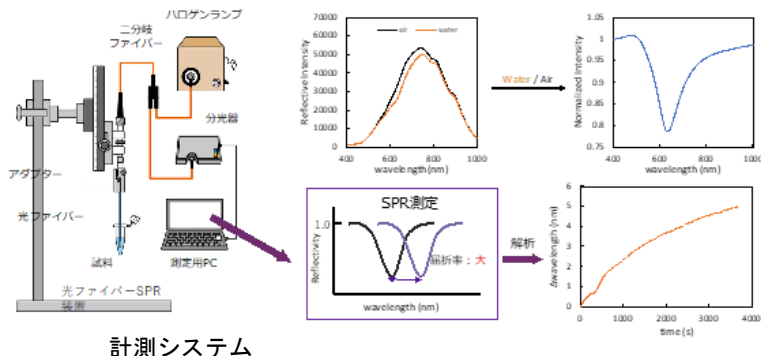
細胞から分泌されるエクソソームを拡散希釈させず、分泌された直後に計測できるようにすることが重要であり、これを実現するには、細胞の近傍で計測できるような微小センサーの設計が必要になる。ところが、光ファイバーの直径は細胞と比較してサイズが大きすぎる。そこで先端 $1\mu\text{m}$ の直径を有するガラスキャピラリー内に挿入すれば、 $1\mu\text{m}$ という微小空内の生体分子をノンラベルかつリアルタイムで計測できるようになると着想した。そこで本研究では、キャピラリーに光ファイバー SPR センサーを挿入した計測技術を確立する。このセンサーをコンピューターにより、マイクロメートルレベルで操作することで、細胞近傍にセンサーを設置できるようになり、単一細胞レベルで、刺激から、どのくらいのタイミングでどれだけのエクソソームを分泌されるか計測できるようになる。分泌されるエクソソームを計測できるようになる。本申請課題では、脱分極刺激から、どのくらいのタイミングでどれだけのエクソソームを分泌されるか計測することを目指す。



本研究で開発するエクソソームの計測技術

3. 研究の方法

両末端にエポキシ基を有する架橋剤により、ジアリルアミン-マレイン酸共重合体 (DAM) をセンサー表面に導入し、エクソソームを認識素子として、エクソソーム膜に特異的に発現しているテトラスパニンの抗体もしくは、安定性に優れた DNA アプタマーを導入した。センサー表面をエクソソーム溶液に浸漬させて計測した。その際、次のような計測システムにより、SPR シグナルを観測した。試料溶液中にセンサーを浸漬させて得られた反射光スペクトルを空气中に暴露して得られた反射光スペクトルにより規格化することで、SPR スペクトルが得られる。このシステムを顕微鏡下に搭載した。キャピラリーにセンサーを挿入し、これを電動マニピュレーターで捜査して、細胞近傍に接近させた。



計測システム

4. 研究成果

センサー界面の屈折率に応答する光ファイバーSPR センサーでは、夾雑物質が非特異的に吸着せず、できるだけ多くの分子認識素子を導入できるようなセンサー界面が理想的である。非特異的な吸着を抑制する目的で汎用されるポリエチレングリコール (PEG) では、本申請課題で作成した光ファイバーSPR センサーにおいて、非特異的な吸着を十分に抑制することはできなかった。真空蒸着やスパッタリングでは、製膜した金表面は非常に平滑であり、PEG による表面処理が非特異的な吸着の抑制に非常に有効であるものと考えられるが、無電解メッキ技術で金を被覆したセンサーは表面が粗いため、立体障害により PEG がまばらに固定化されるため、局所的に金表面が露出することで非特異的な吸着が生じると考えた (図1)。そこで、DAM をアミノ化したセンサー表面に静電相互作用で吸着させた後、架橋剤で化学修飾した。この方法では、DAM とアミノ基だけでなく、DAM 同士も架橋されることから、DAM でセンサー表面が覆われると期待され、実際に非特異的な吸着の抑制に成功した。設計したセンサー界面に抗体を導入し、これをキャピラリー内に挿入した。このキャピラリーでは、毛管現象を利用して試料溶液がサンプリングされることが分かった。また、キャピラリー内で対象となるアナライトをセンシングできることが示すために、発現系細胞 (HEK293-GFP) 内の 蛍光タンパク質 (GFP) を計測した (図2)。なお、このセンサーと一体化させたキャピラリーは顕微鏡下で電動マニピュレーターにより操作した。発現系細胞では、GFP に応答してシグナルが増大するが、HEK-293 細胞やセンサー界面に抗体を導入していない場合、このようなセンサー応答は観測されなかった。これらのことから、本申請課題で開発した計測システムやセンサーの性能や有用性を示すことができた。さらに、エクソソームのアプタマーを結合させると、図 2 b のように、光ファイバーSPR センサーで検出可能であることが示された。さらに、培養液成分によりシグナルが簡素付されないことも、以前の予試験で確認済である。

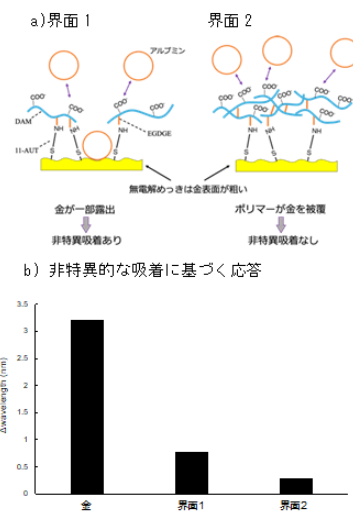


図1. a) センサー界面 b) モデルタンパク質の非特異的な吸着

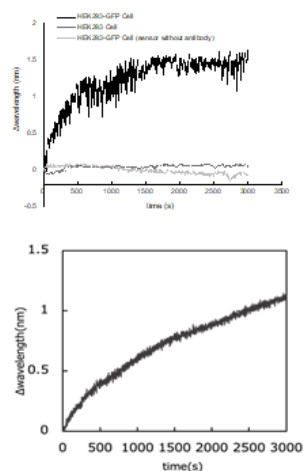


図2. センサーの応答例 a) 細胞内 GFP b) エクソソーム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 東海林敦
2. 発表標題 簡便かつ迅速な脂質二分子膜への膜タンパク質包埋法
3. 学会等名 第83回分析化学討論会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 東海林敦
2. 発表標題 生体微小空間内環境を視る分析法の開発を目指して
3. 学会等名 日本分析化学会第72年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 A. Shoji, A. Okino, Y. Moriiwa
2. 発表標題 Membrane fusion of exosome-artificial biomembrane by atmospheric pressure plasma
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Biomedical Engineering International Workshop on Nanodevice Technologies 2023 (ISBE2023/IWNT2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤本弥有希, 北谷菜津美, 守岩友紀子, 森岡和太, 井上嘉則, 柳田顕郎, 梅村知也, 東海林敦
2. 発表標題 光ファイバー SPRセンサーにおける非特異的吸着抑制のための界面設計
3. 学会等名 第83回分析化学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北谷菜津美, 藤本弥有希, 守岩友紀子, 森岡和大, 井上嘉則, 柳田顕郎, 東海林敦
2. 発表標題 エクソソームを検出するための光ファイバー表面プラズモン共鳴センサーの界面設計
3. 学会等名 令和5年度東日本分析化学若手交流会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北谷菜津美, 藤本弥有希, 守岩友紀子, 森岡和大, 井上嘉則, 柳田顕郎, 東海林敦
2. 発表標題 エクソソームを検出するための光ファイバー表面プラズモン共鳴センサーの界面設計
3. 学会等名 第35回バイオメディカル分析科学シンポジウム(BMAS 2023)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------