

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25790028

研究課題名(和文)がん早期診断のためのエクソソーム非標識カウンティングデバイス

研究課題名(英文)Label-free exosome counting for early diagnosis of cancer

研究代表者

安井 隆雄 (Yasui, Takao)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00630584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ナノ空間が生み出す回折光を利用したエクソソームの非破壊・非標識カウンティングデバイスの開発を行った。直径100 nm程度のエクソソームを1分子レベルで非標識に検出するために、高さ150 nm・幅150 nmのナノ空間や、直径数10～数100nmのナノ構造体を有する微小流路を作製した。その後、それら流路に参照試料として血漿・尿・細胞上清液等の生体サンプル(エクソソーム無し)を、検出試料としての血漿・尿・細胞上清液等の生体サンプル(エクソソーム有り)を導入することにより、参照信号と検出信号を測定し、エクソソームの高感度検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we developed a label-free counting device for exosomes using diffracted light derived from nanospaces. For the detection of exosomes with 100 nm in diameter, we fabricated nanospaces (150 nm in width and height), or nanostructures (10-100 nm in diameter) embedded in microchannels. After that, we introduced biological samples (with and without exosomes), such as plasma, urine, and cell supernatant, into the microchannels, and we compared label-free signals. Finally, we could achieve highly sensitive label-free detection of exosomes.

研究分野：ナノバイオテクノロジー

キーワード：エクソソーム 非標識カウンティング microRNA がん早期診断

1. 研究開始当初の背景

がんバイオマーカーはがん細胞自体、もしくはは発がんに応じて変化する細胞・組織に由来する分子であり、がんの発見、分類、診断、予後予測、治療効果の確認等のさまざまな目的で利用されている。近年、細胞が分泌する直径 50-100 nm の脂質二重膜で覆われたエンドソーム由来の小胞顆粒であるエクソソームの中に、生命の微調整役として機能する microRNA が発見され、エクソソーム内包 microRNA が新たながんバイオマーカーとして期待されている。microRNA は発がんとは密接な関係を有することが明らかとなり、近年、microRNA の発現量異常ががんの根本原因であると考えられている。

がん患者と健常者における microRNA の発現量の差によるがん解析の研究は国内外で進められ(*Proc. Natl. Sci. USA*, 2008, 105, 10513; *Cancer Genomics Proteomics*, 2009, 6, 281)、エクソソーム内包 microRNA 量の増減によるがん診断の可能性が示された。また、運搬役としてのエクソソーム解析により、がん細胞が血液中にエクソソームを介してメッセンジャーRNA や microRNA、血管新生促進タンパク質を放出し、がんの進行に関与している報告がされた(*Nature Cell Biol.*, 2008, 10, 1470)。しかし、これらの解析は、煩雑な操作が必要な上に長時間の測定が必要であり、エクソソームによっては抽出解析できず、測定条件設定が困難などの多くの課題がある。そこで、ナノ空間の特性を活かした超高性能生体分子解析デバイス (*ACS Nano*, 2011, 5, 7775; *Anal. Chem.*, 2011, 83, 6635; 特願 2010-222528)、インクジェットを利用した新規サンプル導入法開発(*Anal. Chem.*, 2012, 84, 9282)、マイクロ流路を用いた生体分子解析(*Biomicrofluidics*, 2011, 5, 044114; *Langmuir*, 2009, 25, 9296)、3次元微細流路開発(*Lab Chip*, 2011, 11, 3356)の研究を進めてきた。本研究においては、これまでの研究成果を融合・発展させることにより、エクソソーム内包 microRNA 量の増減の非破壊・非標識カウンティングデバイスを開発し、エクソソームに基づいたがん発症機構解明やがん診断応用に展開する。本研究成果は、医学・生物学・細胞のがん化研究に極めて大きな波及効果をもたらすと考えられる。

2. 研究の目的

ナノデバイスを用い、血液より抽出したエクソソームの非破壊・非標識カウンティングによる microRNA の増減量解析のために、(1)血液細胞とエクソソームの分離デバイスの開発;(2)エクソソームの非破壊・非標識カウンティングデバイスの開発を行う。抽出したエクソソームの非標識信号をハイスループット処理することで、microRNA の信号強度分布の変化より、内包された microRNA の発現量異常を解析する。従来法と、処理能力、解析時間、正確性などを比較検討し、ハイス

ループットなエクソソームの非破壊・非標識カウンティングデバイスを開発する。

本研究の特色は、現行のエクソソーム解析法の欠点を克服するために、ナノ空間でしかなし得ない非標識検出技術に基づいた非標識検出法による血液から抽出したエクソソームを非破壊・非標識・ハイスループットで正確・迅速に解析する方法を創出するとともに、臨床応用可能な新規デバイスや検出系を開発するところにある。従来のエクソソーム解析法は、エクソソーム遠心分離、エクソソーム抽出・洗浄、内包 microRNA の抽出、microRNA の分離分析を全て行う必要があり、煩雑な操作と1日以上に及ぶ時間を要する。本研究で実現するデバイス特色は、短時間(血液中より直接エクソソームを抽出する)、RNA の抽出・分離分析が不要(非破壊・非標識検出によるエクソソームの特性解析を行う)である。

これまでの研究において、ナノ空間内部における屈折率の変化による非標識検出法を開発し(*Anal. Chem.*, 2011, 83, 6635; 特願 2010-222528)、ナノ空間内部の屈折率変化に応じた非標識検出に成功した(*Micro Total Analysis Systems*, 2011, 1, 54)。本研究ではこの成果に基づき、エクソソームを高感度に非標識で検出するために、エクソソームの有無による参照信号と検出信号を同時に測定し、微弱信号を高感度に非標識検出する。本デバイスは、(1)血液中のエクソソームを直接抽出、(2)エクソソームの特性を非破壊・非標識で検出可能などの優れた特長を有し、がん発症機構解明やがん診断応用・細胞のがん化検出の発展に貢献する。

3. 研究の方法

エクソソーム内包 microRNA の非破壊・非標識カウンティングによる特性解析、解析したエクソソーム情報によるがん発症機構解明やがん診断応用等の臨床応用のために、研究代表者は(1)血液からのエクソソーム抽出デバイスの開発を進め、その後、(2)ナノ空間が生み出す回折光を利用したエクソソームの非破壊・非標識カウンティングデバイスの開発を行った。それぞれの研究開発項目は、これまでの予備研究成果(*Micro Total Analysis Systems*, 2012, 1, 1234; *Anal. Chem.*, 2011, 83, 6635; 特願 2010-222528)をより発展させることにより達成を目指した。

(1)血液からのエクソソーム抽出デバイスの開発

本研究開発では、まず、マイクロ流路内にピラー構造体を作製し、6 μm と 10 μm の擬似血球細胞の分離を試みた。その後、本デバイスを発展させ、直径 50-100 nm のエクソソームと赤血球・白血球・血小板(大きさ約 2-14 μm)の分離を試みた。100 nm 程度のエクソソームと 2 μm 以上の大きさを持つ血球細胞を分離するために、DNA 分離用に開発したナノ

ピラー構造体(*ACS Nano*, 2011, 5, 7775)の知見より、新規ナノデバイスの開発を行う。この際には、エクソソームと血球細胞のサイズに応じた分離に影響を及ぼすピラー直径、ピラー間隔、ピラーの幾何学的配置について検討を行った。また、マイクロ流路にポリマー製血球分離膜を組み込んだデバイスの開発を行った。血球細胞による膜の目詰まりの影響を考慮に入れ、幅広の流路を用いることによるエクソソームの抽出も行った。

(2)ナノ空間が生み出す回折光を利用したエクソソームの非破壊・非標識カウンティングデバイスの開発

本研究開発では、ナノ空間が生み出す回折光を利用した非標識検出法を開発し、200 nmのナノ空間を用いてわずか1分子レベルでのDNAの非標識検出を行った。さらに、本非標識検出法はナノ流路に導入された物質の屈折率変化に応じた非標識検出を行っていることを実証した。また、DNAの増幅過程の非標識検出も行った。次に、直径100 nm程度の粒子を1分子レベルで非標識に検出するために、粒子を導入した際の内部の屈折率変化が大きくなるように高さ・幅150が同一のナノ空間を作製した。また、エクソソーム内包microRNA量の増減の検出のための十分な感度が得られないことを想定し、参照流路と検出流路のナノ流路を2本もつデバイスを作製した。

また、エクソソームの高感度非標識検出後は、エクソソームに内包されるmicroRNA量の増減を非標識検出し、microRNAの発現量の差による信号強度の差をデータ処理することで信号強度に応じた分布図の作成を行った。この際、内包microRNAの発現量の差による信号強度の差に有意差が見られない場合に備え、内部のmicroRNAと相互作用する物質の導入も検討した。最終的には、正常細胞とがん細胞のエクソソーム内包microRNAを非破壊・非標識でカウンティングし、信号強度の分布の変化により、がん診断応用やがん発症機構解明・細胞のがん化検出まで研究を進展させる予定である。

4. 研究成果

マイクロ流路内にピラー構造体を有するデバイス(*Micro Total Analysis Systems* 2012, 2012, 1, 1234)にDNA分離用に開発したナノピラー構造体(*ACS Nano*, 2011, 5, 7775)やナノワイヤ構造体(*ACS Nano*, 2013, 7, 3029)の知見を加えることで、直径50-100 nmのエクソソームと赤血球・白血球・血小板(大きさ約2-14 μm)を分離することに成功した。また、この知見をさらに発展させることで、高分離能と大きな分離スピードを両立することができる分離技術を開発することに成功した。

また、エクソソーム回収率の向上のため、マイクロ流路内に直径100 nm・高さ2 μm のナノワイヤ構造体を組み込んだ新規ナノワイヤデバイスを開発することに成功した。本

ナノワイヤデバイスは、マイクロ流路内に10億本程度のナノワイヤ構造体を有しており、エクソソームを静電相互作用やナノワイヤ間のナノ空間にて捕捉することが可能であり、従来法と比べ、血液中エクソソームの高効率な回収を達成した。

本ナノワイヤデバイスは血液のみならず、1 mLのエクソソーム含有液(尿・唾液・細胞上清液等)をナノワイヤ構造体に送液するだけでエクソソームを高効率に分離を行うことが可能であることも見出した。特に、尿中エクソソーム由来microRNAの解析による効果的な未知のバイオマーカー探索や低侵襲診断を行うためには、少ない溶液量から得られる情報量の多さが重要であるが、既存の手法ではエクソソーム分離及びmicroRNA抽出に数Lの尿が必要であったのに対し、本デバイスでは1 mLの尿からエクソソームを高効率に分離・エクソソーム由来microRNAの高効率抽出に成功し、本デバイスの有用性を示すことができた。

ナノ空間が生み出す回折光を利用したエクソソームの非破壊・非標識カウンティングデバイスの開発においては、ナノ空間が生み出す回折光を利用した非標識検出法を開発し、200 nmのナノ空間を用いて1分子DNAを非標識検出することに成功した。さらに、本非標識検出法はナノ流路に導入された物質の屈折率変化に応じた非標識検出を行っていることを実証し、世界で初めてDNA増幅過程を非標識で検出することに成功した。また、直径100 nm程度の粒子を1分子レベルで非標識に検出するために、粒子を導入した際の内部の屈折率変化が大きくなるように高さ150 nm、幅150 nmのナノ空間や、直径数10~数100 nmのナノ構造体を有する微小流路を作製した。それら流路に参照試料として血漿や尿等の生体サンプル(エクソソーム無し)を、検出試料としての血漿や尿等の生体サンプル(エクソソーム有り)を導入することにより、参照信号と検出信号を測定し、エクソソームの高感度検出に成功した。また、屈折率変化による回折光の変化に基づいた非標識検出法だけでなく、電流値の変化による非標識検出法の開発も成功した。

正常細胞とがん細胞のエクソソームを非破壊・非標識でカウンティングし、信号強度の分布の変化により、正常細胞とがん細胞の違いを認識することに成功し、エクソソームの高感度非標識検出を達成した後、エクソソームに内包されるmicroRNA量の増減を検出し、microRNAの発現量の差による信号強度の差をデータ処理することで信号強度に応じた分布図の作成を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

1. T. Yasui, N. Kaji, R. Ogawa, S. Hashioka, M. Tokeshi, Y. Horiike and Y. Baba,

- Arrangement of a nanostructure array to control equilibrium and nonequilibrium transports of macromolecules, *Nano Letters*, **2015**, 15, 3445-3451 (査読有).
10.1021/acs.nanolett.5b00783
2. S. Rahong, T. Yasui, T. Yanagida, K. Nagashima, M. Kanai, G. Meng, Y. He, F. Zhuge, N. Kaji, T. Kawai and Y. Baba, Three-dimensional Nanowire Structures for Ultra-Fast Separation of DNA, Protein and RNA Molecules, *Scientific Reports*, **2015**, in press (査読有).
 3. S. Rahong, T. Yasui, T. Yanagida, K. Nagashima, M. Kanai, G. Meng, Y. He, F. Zhuge, N. Kaji, T. Kawai and Y. Baba, Self-assembled Nanowire Arrays as Three-dimensional Nanopores for Filtration of DNA Molecules, *Analytical Sciences*, **2015**, 31, 153-157 (査読有).
10.2116/analsci.31.153
 4. T. Yasui, S. Rahong, N. Kaji and Y. Baba, Nanopillar, Nanowall, and Nanowire Devices for Fast Separation of Biomolecules, *Israel Journal of Chemistry*, **2014**, 54, 1556-1563 (査読有).
10.1002/Ijch.201400102
 5. S. Rahong, T. Yasui, T. Yanagida, K. Nagashima, M. Kanai, A. Klamchuen, G. Meng, Y. He, F. Zhuge, N. Kaji, T. Kawai and Y. Baba, Ultrafast and wide range analysis of DNA molecules using rigid network structure of solid nanowires, *Scientific Reports*, **2014**, 4, 5252-5259 (査読有).
10.1038/srep05252
 6. H. Yasaki, T. Yasui, S. Rahong, T. Yanagida, N. Kaji, M. Kanai, K. Nagashima, T. Kawai and Y. Baba, Micropore channel-based simultaneous electrical and optical sensing from single biomolecules, single exosomes to single cells, *Micro Total Analysis Systems* **2014**, **2014**, 1, 2161-2163 (査読有).
 7. T. Yasui, K. Ogawa, N. Kaji, M. Nilsson, M. Tokeshi, Y. Horiike and Y. Baba, Label-free detection and quantification of real-time DNA amplification using one-dimensional photonic crystal, *Micro Total Analysis Systems* **2013**, **2013**, 1, 1123-1125 (査読有).
 8. S. Rahong, T. Yasui, T. Yanagida, M. Kanai, K. Nagashima, A. Klamchuen, M. Gang, H. Yong, F. Zhuge, N. Kaji, Y. Baba and T. Kawai, Christmas-tree nanowire chips for DNA separation, *Micro Total Analysis Systems* **2013**, **2013**, 1, 164-166 (査読有).
 9. S. Ito, T. Yasui, H. Yong, T. Yanagida, S. Rahong, M. Kanai, K. Nagashima, H. Yukawa, N. Kaji, T. Kawai and Y. Baba, Nanowire devices for exosomal microRNA extraction, *Micro Total Analysis Systems* **2013**, **2013**, 1, 1887-1889 (査読有).
- [学会発表](計13件)
1. 安井隆雄, 伊藤聡, 柳田剛, 加地範匡, Y. He, S. Rahong, 金井真樹, 長島一樹, 湯川博, 川合知二, 馬場嘉信, 尿中エクソソーム miRNA 解析のためのナノワイヤデバイス, 第29回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (29th CHEMINAS), 日本女子大学, 2014/05/22.
 2. T. Yasui, S. Ito, H. Yong, T. Yanagida, S. Rahong, M. Kanai, K. Nagashima, H. Yukawa, N. Kaji, T. Kawai, Y. Baba, Nanowire devices for exosomal microRNA detection, The 6th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2014), Singapore, 2014/07/31.
 3. 安井隆雄, 伊藤聡, 柳田剛, 加地範匡, H. Yong, S. Rahong, 金井真樹, 長島一樹, 渡慶次学, 川合知二, 馬場嘉信, ナノワイヤデバイスによるエクソソーム miRNA 解析, 日本分析化学会第63年会, 広島大学, 2014/09/19.
 4. (招待講演) 安井隆雄, ナノ構造体を用いた生体分子解析, 第29回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (29th CHEMINAS), 日本女子大学, 2014/05/22.
 5. (招待講演) 安井隆雄, ナノワイヤ構造体を用いた生体分子解析, 第33回分析化学中部夏期セミナー, 富山, 2014/09/05.
 6. 安井隆雄, 大塚康平, 竹内将城, 柳田剛, 加地範匡, S. Rahong, 金井真樹, 長島一樹, 川合知二, 馬場嘉信, 菌体検出のためのナノワイヤデバイス, 第30回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (30th CHEMINAS), 北海道大学, 2014/10/2.
 7. T. Yasui, K. Otsuka, M. Takeuchi, T. Yanagida, N. Kaji, S. Rahong, M. Kanai, K. Nagashima, T. Kawai and Y. Baba, DNA Extraction from Bacteria Using Nanowire Structures, 14th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE2014), Kyoto, 2014/12/09.
 8. 安井隆雄, 小中出侑樹, 伊藤聡, 柳田剛, 加地範匡, 金井真樹, 長島一樹, 川合知二, 馬場嘉信, ナノワイヤを用いた細胞

外小胞体の解析, 日本化学会 第 95 春季
年会(2015), 日本大学理工学部船橋キャン
パス / 薬学部, 2015/3/26.

研究者番号 : 00630584

9. (招待講演) T. Yasui, T. Yanagida, N. Kaji,
T. Kawai and Y. Baba, Nanowire devices for
biomolecule analysis, Pittcon Conference &
Expo 2014, Chicago, IL, 2014/3/3.
10. (招待講演) 安井隆雄, ナノバイオデバ
イスを用いた CTC、エクソソーム、細菌、
ウイルス内の生体分子分離・解析, JMAC
第 61 回ワーキンググループ会議, 東京都
新宿マインズタワー15階セミナールーム
2, 2013/11/18.
11. 安井隆雄, 小川謙亮, 加地範匡, 渡慶次
学, 堀池靖浩, M. Nilsson, 馬場嘉信, ナ
ノ構造体を用いた DNA 増幅のリアルタ
イム無標識検出, 第 73 回分析化学討論会
(2013), 函館・北海道大学, 2013/5/18.
12. T. Yasui, K. Ogawa, N. Kaji, M. Nilsson, M.
Tokeshi, Y. Horiike and Y. Baba, Label-free
detection and quantification of real-time
DNA amplification using one-dimensional
photonic crystal, The 17th international
conference on miniaturized systems for
chemistry and life sciences (uTAS2013),
Freiburg, Germany, 2013/10/28.
13. T. Yasui, S. Rahong, T. Yanagida, N. Kaji, M.
Kanai, K. Nagashima, A. Klamchuen, M.
Gang, H. Yong, F. Zhuge, T. Kawai and Y.
Baba, 3D Network Nanowires for DNA
Separation, Lab on a Chip Asia, Singapore,
2013/11/13.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称 : 電気測定用チップ、及び電気測定装置
発明者 : 矢崎啓寿、安井隆雄、加地範匡、馬
場嘉信、柳田剛、川合知二
権利者 : 名古屋大学、大阪大学
種類 : 同上
番号 : 特願 2014-214090
出願年月日 : 平成 26 年 10 月 20 日
国内外の別 : 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安井 隆雄 (YASUI, Takao)

名古屋大学・大学院工学研究科・助教