

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 28 日現在

機関番号：12701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13361

研究課題名(和文) エクソソーム医療へ向けたナノ脂質ベシクルと固体表面との相互作用の解明

研究課題名(英文) Study on interactions between nanovesicles and solid surfaces toward new exosome medicine

研究代表者

荻野 俊郎 (Ogino, Toshio)

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：70361871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームとは細胞から放出されるナノスケールの小胞体であり、ホスト細胞の性質を引き継いでいるため、その解析はがんの早期診断に有力である。本研究ではエクソソームの特徴抽出に原子間力顕微鏡(AFM)を用い、固体基板への吸着様態とそれに伴う変形を定量化する新しい手法を提案した。がん細胞から抽出した3種類のエクソソームを用い、その特徴を高い信頼性で抽出する方法として機械学習を採用した。AFM画像から得られる個々のエクソソームのデータを14次元空間にプロットすることにより、高い正答率で識別が可能なことを示した。固体表面との相互作用に注目した本手法は、新たながん診断法として期待できる。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are nanovesicles with 30-150 nm in diameter and released from whole cells including cancer cells. In this study, we have developed a novel method to extract exosome properties using atomic force microscopy (AFM) for early diagnosis of cancer. When exosomes are immobilized on solid surfaces, they are deformed by interactions between biomolecules and solid surfaces. From this deformation, much information about exosome membranes and inclusions can be obtained. To precisely discriminate the deformation fashion of individual exosomes, we used machine learning, where 14 parameters are extracted from the individual AFM images and plotted in a 14-dimensional space. By plotting AFM data from unknown exosomes in the discriminator, we can assign those exosomes to the specific host cell. We have found that the correct assignment with probability from 65 to 85% can be achieved.

研究分野：表面界面科学

キーワード：エクソソーム がん診断 固体表面 脂質二分子膜 吸着 機械学習 原子間力顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

ガンの早期発見は、国民医療の中でも最重要視されている緊急の課題である。エクソソームとは、細胞から放出される 30~150nm 程度の小胞体(ベシクル)であり、あらゆる細胞から放出されて体液中に存在し、また細胞間の物質のやり取りにも関わっている[1]。さらにエクソソームには、放出元細胞(宿主細胞)の細胞膜等を構成する脂質二分子膜やタンパク質などの生体物質、さらにマイクロRNAなどの情報を担う分子が含まれる。したがって、その性質や内容物を調べることでより宿主細胞の性質を明らかにすることができる。ガン細胞もエクソソームを放出し、その性質や内容物はガン細胞の特徴を引き継ぐため、エクソソーム解析によりガンの早期発見が可能になると期待されている。また、エクソソームは細胞間コミュニケーションを担っているため、ガンの転移の主要な原因の一つであることが認識されてきた。すなわち、ガン細胞からのエクソソームの放出・循環を抑制することにより、ガンの転移も抑制できることが期待されている。エクソソームはあらゆる体液に含まれているので、検体を低侵襲で採取することが可能である。しかし、エクソソームはナノスケールのベシクルであり、生体計測分野で主として用いられてきた光学顕微鏡の分解能では検出できない。透過電子顕微鏡(transmission electron microscopy, 以下TEM)では大型の装置が必要だけでなく、真空中での観察のために試料作製が非常に煩雑である欠点をもつ。そのため、簡便迅速にエクソソームの特徴を抽出し、宿主細胞を特定できる手法の開拓が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、エクソソームの性質を簡便な手法で抽出し、宿主細胞を特定する手法を開拓することである。そのために、汎用的な道具のみを用い、宿主細胞を高い確率で特定する統計的な手法を開拓することを目標とした。

3. 研究の方法

本研究で用いた方法の要は、図1に示すように、採取したエクソソームを固体基板に吸着させ、その吸着様態と吸着に伴う変形を観察して特徴抽出を行うことである。エクソソームの膜構造は細胞と同じくタンパク質分子を含む脂質二分子膜であり、吸着と変形には、図1に示す膜の性質や埋め込みタンパク質の性質が関わるため、宿主細胞の性質が反映される。その特徴抽出に当たっては、近年きわめて一般に用いられる原子間力顕微鏡(atomic force microscopy, 以下AFM)を用いることとした。AFMは簡便に形状を計測することができる特徴をもつ反面、吸着により、例えばTEMと比較して真の形状を見ることができないという欠点が指摘されていた。しかし、あとで詳しく見るように、吸着と変形には溶液中に浮遊するエクソソームの形状・サイズよりもはるかに多くの情報が含まれるため、その形状の特徴抽出は宿主細胞の特徴抽出に非常に適している。

次に、エクソソームの大きさは30~150nmに分布しており、単に平均値を比較しても分散はるかに大きいため有意な比較は困難である。本研究では、データ解析に機械学習を適用した。AFMによって得られたエクソソーム一個一個の像から、形状すなわちエクソソームの膜の性質や内容物の状態を反映した変形を表す多変数の情報を抽出した。これらのパラメータを多次元空間にプロットすることにより、異なる宿主細胞から放出されたエクソソームを多次元空間で分離することができる。

本研究のもう一つの特徴は、固体基板表面とエクソソームの相互作用を利用することである。固体表面は単にエクソソームを吸着するという観察のための場ではなく、エクソソームの性質によって基板表面との相互作用が異なることを利用し、機械学習の特徴が発揮される環境を提供する場でもある。

本研究で用いたエクソソームは、連携研究者である公益財団法人・がん研究会の芝清隆氏から提供を受けた。培養ガン細胞から抽出し、密度勾配遠心法により精製した次の3種類のエクソソームを用いた。

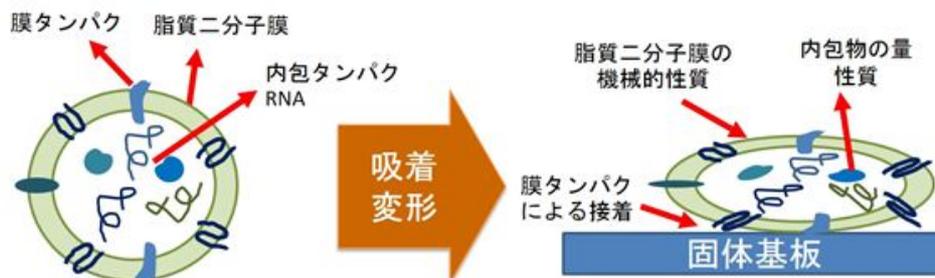


図1. 本研究におけるエクソソームの特徴抽出の手法

(1) 大腸ガン細胞 (HT-29)
 (2) 繊維肉腫細胞 (HT-1080)
 (3) 膵臓ガン細胞 (mia paca2)
 これらのエクソソーム溶液を SiO₂/Si、TiO₂、自己組織化単分子膜で修飾した SiO₂/Si などの基板に滴下し、吸着したエクソソームを AFM で液中観察した。

4. 研究成果

図 2 に、3 種類のエクソソームの液中 AFM 像を示す。個々のエクソソームの吸着様態を観察すると、図 3 に示す 4 タイプに分類される。半球状は、吸着によって変形するだけで内容は保持されていると考えられる。展開膜状は、吸着・破裂・展開を経て形成された脂質二分子膜である。つぶれた状態とは、吸着・内容物の流失を伴うが破裂・展開のない二層の脂質二分子膜形成である。目玉焼き状は、周辺のみつぶれているが内容物の流出はなく中央付近に集まって形成された複合構造である。脂質のみからなる人工脂質二分子膜を用いてベシクルを作製し、吸着様態を観

察すると、半球状と展開膜状は観察されるが、二層の脂質二分子膜と目玉焼き状は観察されない。すなわち、エクソソームは、脂質のみの二分子膜に比べてタンパク質などで強化されており、破裂展開しにくいことが判る。このことは、ホスト細胞によって機械的強度が異なることを示しており、吸着様態によってホスト細胞の性質が得られることを示す。

次に、AFM 観察像から一個一個の粒子の形状とサイズを求め、直径の平均値を算出すると次のようになる。ここで、エクソソームは液中ではほぼ球形であるという TEM 観察報告[2]を用いている。

- (1) HT-29 57±37 nm
- (2) HT-1080 78±71 nm
- (3) mia paca2 50±38 nm

である。ガン細胞から放出されるエクソソームが正常細胞より大きいとか、平均値としての報告は確かにあるが[3]、3 種類のエクソソームのサイズ分散をヒストグラムにすると、図 4 に示すように非常にばらついていて、平均値から個々のエクソソームのホスト細胞を推定することは全く不可能である。

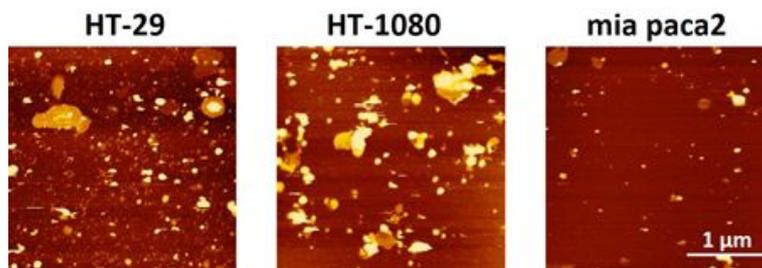


図 2. 3 種類のエクソソームの液中 AFM 像

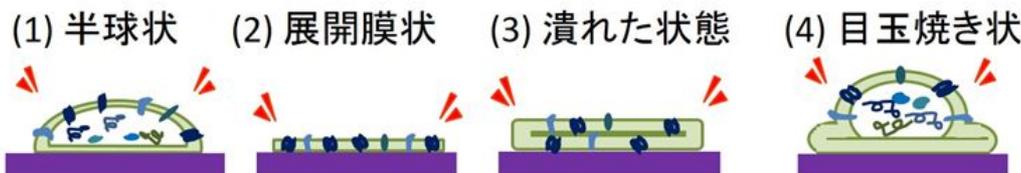


図 3. エクソソームの AFM 像から得られる 4 種類の吸着様態

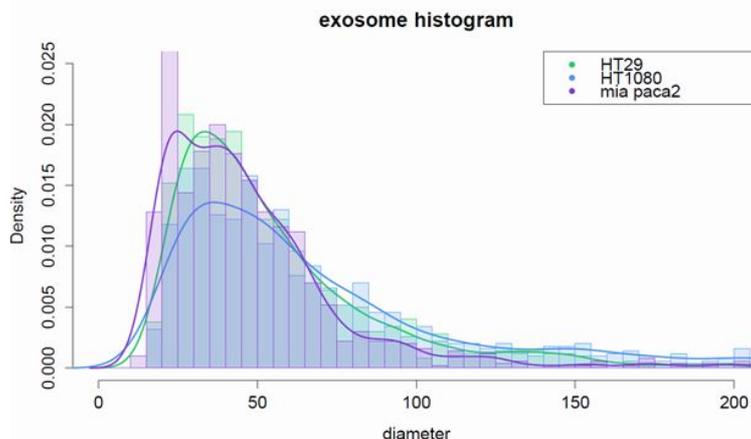


図 4. エクソソームの AFM 像から得られる直径の分布。

本研究では、個々のエクソソームを宿主細胞と関係づける方法として機械学習を採用した。図5にその手順を示す。まず、宿主細胞の分かっているエクソソームの AFM 像から、展開膜などになっている粒子を除き、すべての粒子から得られる形状のデータを抽出し、図5(a)に示すように一枚のチャートにプロットする。本研究では、14個のパラメータを抽出しているが、図5では高さで説明している。2種類または3種類のエクソソームについて、それぞれ数枚の AFM 像を用いて、全粒子のデータをプロットする。一つのパラメータだけでは図4に示すように重なり合っているエクソソームの種類も、高さで説明すると、図5(b)に示すように異なる領域にプロットされるとする。その場合、二次元空間で特徴量(高さ)に対応する点は、エクソソームの種類ごとに特定の領域を形成する。次に未知のエクソソームのデータを同様に抽出・プロットする。このとき、例えば有為な確率で特定の領域(この場合 mia paca2)にプロットされたら、未知のエクソソームは mia paca2 である確率が高いと言える。

実際の実験では、図6(a)に示す14個のパラメータを用いた。図6(b)に示すエクソソーム像を例にとると、面積と高さが等しい半球状の吸着に対して、高さが半分の面

積の面積は小さくなるため、14次元空間では異なる領域にプロットされる。

図5(b)に示すような特定のエクソソームがプロットされる確率の高い領域を示す図を判別器と呼ぶことにする。本手法の有用性を示す実験として、判別器を作成する際に使用しなかった既知のエクソソームの AFM 像を用い、粒子がどのくらいの確率で正しい領域内にプロットされるか(正答率と呼ぶ)を調べた。その結果を表1に示す。ここで、2サンプルとは、二種類のエクソソームのデータをプロットした判別器に、判別器作成で用いなかったどちらかの AFM 像の粒子をプロットしたときの正答率であり、3サンプルとは3種類を含む判別器に、判別器作成に使用しなかった3種類のどれかをプロットしたときの正答率である。また、APTESとは自己組織化単分子膜の一種である。表からわかるように、エクソソームのサンプル数や基板の種類にかかわらず有為な差で高い正答率が得られている。また、TiO₂基板では高い正答率が得られている。TiO₂基板ではサンプル数が他の場合より少ないが、すべての場合に250粒子あれば、それ以上の粒子数を用いたときと同様の結果が得られることは確認している。

以上のように、本手法を用いると、多くのパラメータによって吸着様態や変形を特徴づけるため、高い確率で宿主細胞と対応付

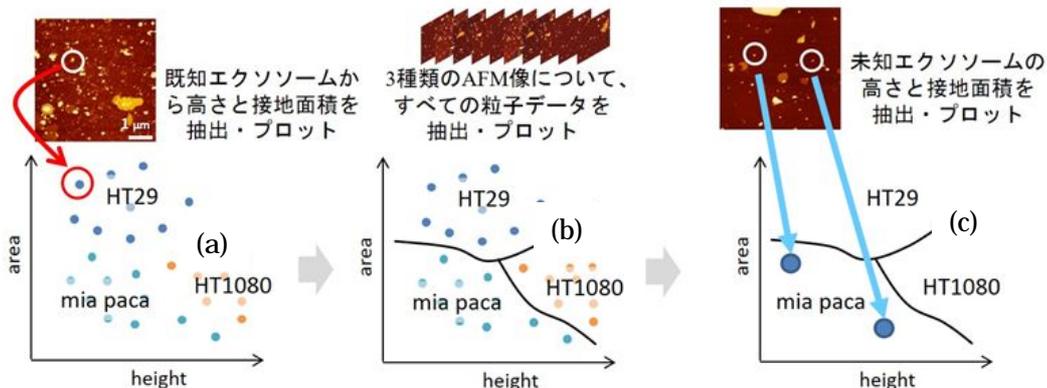


図5. 機械学習によるエクソソームの宿主細胞特定の方法(二次元モデル)

1	z_max	Maximum value	m
2	z_m	Mean value	m
3	z_med	Median value	m
4	b_max	Maximum value on boundary	m
5	A_0	Projected area	m ²
6	A_s	Surface area	m ²
7	A_h	Area above half-height	m ²
8	A_c	Area of convex hull	m ²
9	V_0	Zero basis volume	m ³
10	L_b0	Projected boundary length	m
11	D_min	Minimum boundary size	m
12	D_max	Maximum boundary size	m
13	R_i	Maximum inscribed disc radius	m
14	R_m	Mean radius	m

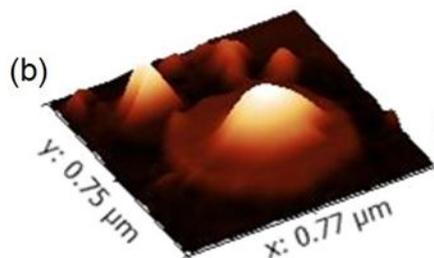


図6. 実際に用いた14次元パラメータと、AFM像の実例

エクソソームの種類	基板	粒子数	正答率 (%)
2 サンプル HT-1080/mia paca2	SiO ₂ /Si	444	77.9
	APTES/ SiO ₂ /Si	478	83.3
	TiO ₂	250	85.2
3 サンプル HT-29/HT-1080/mia paca2	SiO ₂ /Si	666	60.1
	TiO ₂	375	82.6

表 1. 機械学習を適用した宿主細胞の正答率

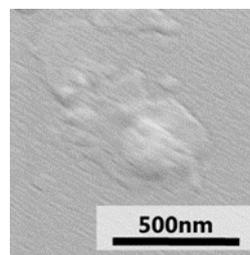


図 7. 乾燥エクソソームの SEM 像例

けが可能になる。本研究では、エクソソームと固体基板との相互作用を用いて、吸着エクソソームの変形のタイプ分けにより宿主細胞を特定するという新しい方法を提案した。この手法は、固体基板に吸着したのち乾燥させたエクソソームの特徴を用いる方法などへも適用できる。図 7 に、乾燥エクソソームの走査電子顕微鏡 scanning electron microscopy, SEM)像の例を示す。この乾燥試料を用いる方法は、内容物の特徴を抽出するのにより適していることが想定される。

参考文献

- [1] A. V. Vlassov et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1820 (2012) 940.
 [2] J. C-Vanells et al., *J. Proteome Res.*7 (2008) 5157.
 [3] S. Sharma et al., *Langmuir* 27 (2011) 14394.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

- [1] Kei Wakabayashi, Daichi Yamaura, Kazuki Ito, Naoya Kameda, Toshio Ogino, Fabrication of hollow core-shell type Si/C nanocomposites by a simple process, *e-J. Surf. Sci. Nanotechnol.*, 15 (2017) 69-73. DOI: 10.1380/ejsnt.2017.69 [査読付き]
 [2] Naotoshi Sakaguchi, Yasuo Kimura, Ayumi Hirano-Iwata, Toshio Ogino, Fabrication of Au-nanoparticle-embedded lipid bilayer membranes supported on solid substrates, *J. Phys. Chem. B*, 121 (2017) 4474-4481. DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b00500 [査読付き]
 [3] Tomoya Wada, Kenji Yamazaki, Toshinari Isono, Toshio Ogino, Characterization of local hydrophobicity on sapphire surfaces in aqueous environment by colloidal probe atomic force microscopy, *Appl. Surf. Sci.*, 396 (2017) 1206-1211. DOI: 10.1016/j.apsusc.2016.11.11 [査読付き]
 [4] Muhammad Zikri Bin Dzukarnain, Toshiyuki

Takami, Hibiki Imai, Toshio Ogino, Highly conductive, monolayer and large-area reduced graphene oxide films fabricated by electrical connection at the two-dimensional boundaries between the tiled graphene oxide flakes, *Thin Solid Films*, 615 (2016) 247-255. DOI: 10.1016/j.tsf.2016.07.029 [査読付き]

- [5] Kazuki Ito, Daichi Yamaura, Toshio Ogino, Chemical wet etching of germanium assisted with catalytic-metal-particles and electroless-metal-deposition, *Electrochimica Acta*, 214 (2016) 354-361. DOI: 10.1016/j.electacta.2016.08.016 [査読付き]
 [6] Tomoaki Nakayama, Akiko Isobe, Toshio Ogino, Observation of adsorption behavior of biomolecules on ferroelectric crystal surfaces with polarization domain patterns, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 55 (2016) 08NB17-1-5. DOI: 10.7567/JJAP.55.08NB17 [査読付き]
 [7] Daichi Yamaura, Toshio Ogino, Fabrication of Si-nanowires controlled by spontaneously formed nanoholes on annealed Au thin films, *Materials Science in Semiconductor Processing*, 53 (2016) 28-35. DOI: 10.1016/j.mssp.2016.05.018 [査読付き]
 [8] Keiji Yokota, Toshio Ogino, Phase separation in lipid bilayers induced by intermixing at a boundary of two phases with different components, *Chemistry and Physics of Lipids*, 191 (2015) 147-152. DOI: org/10.1016/j.chemphyslip.2015.09.001 [査読付き]
 [9] Daisuke Mashiyama, Tsubasa Tobe, Toshio Ogino, Nano-patterning of suspended graphene films by local catalytic etching using atomic force microscopy equipped with an Ag-coated probe, *J. Phys. Chem. C*, 119 (2015) 11914-11921. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b00884 [査読付き]
 [10] Daichi Yamaura, Koji Takeuchi, Zhiqiang

Lu, Yuki Arai, Toshio Ogino; Height reversal of Si micro-dot and well patterns during Si nanowire formation by Ag-assisted chemical etching, Jpn. J. Appl. Phys. 54 (2015) 055203-1-5. DOI: 10.7567/JJAP.54.055203 [査読付き]

〔学会発表〕(計 63 件)

- [1] Toshio Ogino, Kazuki Ito, Naotoshi Sakaguchi, Tamiko Minamisawa, Sachiko Matsumura, Kanako Suga, Kiyotaka Shiba, Yasuo Kimura, Ayumi Hirano-Iwata, Applications of biointerface control to bioelectronics and nanomedicine, The Int. Surfaces, Coatings and Interfaces Conference, (Incheon, Korea, 2017) [Keynote Speech]
- [2] Toshio Ogino, Kazuki Ito¹, Yuta Ogawa, Masaki Nakamura, Tamiko Minamisawa, Sachiko Matsumura, Kanako Suga, Kiyotaka Shiba, Yasuo Kimura, Ayumi Hirano-Iwata, Control of biointerfaces and its applications to exosome characterization, Japan-Taiwan Nanomedicine, (Taipei, Taiwan, 2017), [Invited Speech]
- [3] Toshio Ogino, Naotoshi Sakaguchi, Akiko Isobe, Ryosuke Kimura, Yosuke Nakamura, Yasuo Kimura, Ayumi Hirano-Iwata, Fabrication of nanopores on suspended graphene films for nanobiodevices, EMN Hong Kong Meeting & Collaborative Conference on Mobile Health, (Hong Kong, China, 2016) [Invited Talk]
- [4] Toshio Ogino, Control of solid-bio interfaces and its application to exosome analyses, The 6th Annual World Congress of Nano Science & Technology - 2016 (Singapore, 2016) [Invited Talk]
- [5] Toshio Ogino, Kazuki Ito, Keiji Yokota, Yuta Ogawa, Tamiko Minamisawa, Sachiko Matsumura, Kanako Suga, Kiyotaka Shiba, Yasuo Kimura, Ayumi Hirano-Iwata, Characterization of exosomes using atomic force microscopy and scanning electron microscopy, 13th Int. Conf. on Atomically Controlled Surfaces, Interfaces and Nanostructures, (Frascati, Italy, 2016) [Invited Talk]
- [6] Kazuki Ito, Keiji Yokota, Yuta Ogawa, Tamiko Minamisawa, Sachiko Matsumura, Kanako Suga, Kiyotaka Shiba, Yasuo Kimura, Ayumi Hirano-Iwata Toshio Ogino, Characterization of exosomes by atomic force microscopy and scanning electron microscopy, The Forth Japan-China Symposium on Nanomedicine, (Kitakyushu, Japan, 2016)

[6] Toshio Ogino, Daisuke Mashiyama, Yusuke Iida, Takahiro Tsukamoto, Yasuo Kimura, Ayumi Hirano-Iwata, Nanopatterning of graphene films by local catalytic etching using metal particles, Energy Materials Nanotechnology, Collaborative Conference on Crystal Growth, (Hong Kong, China, 2015) [Invited Talk]

[7] Toshio Ogino, Kazuki Ito, Keiji Yokota, Yuta Ogawa, Sachiko Matsumura, Kanako Suga, Kiyotaka Shiba, Yasuo Kimura, Ayumi Hirano-Iwata, Type classification of exosomes using atomic force microscopy and scanning electron microscopy, 9th Int. Symp. on Nanomedicine, (Mie, Japan, 2015) [Invited Talk]

[8] Toshio Ogino, Muhammad Zikri Bin Dzukarnain, Toshiyuki Takami, Yasuo Kimura, Ayumi Hirano-Iwata, Transfer-free fabrication of graphene thin films on insulating substrates, Energy Materials Nanotechnology Fall Meeting (Las Vegas, USA, 2015) [Invited Talk]

(他 55 件)

6 . 研究組織

- (1)研究代表者 荻野 俊郎 (Ogino, Toshio)
横浜国立大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：70361871
- (2)連携研究者 芝 清隆 (Shiba, Kiyotaka)
公益財団法人がん研究会・がん研究所・部長
研究者番号：40196415