

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20989

研究課題名(和文) がんの超早期診断に向けた血中エクソソームの精良な単離・濃縮手法の開発

研究課題名(英文) Exosome isolation/concentration system by utilizing ion control techniques for early diagnosis of cancer

研究代表者

茂木 克雄 (Mogi, Katsuo)

東京工業大学・工学院・特任助教

研究者番号：20610950

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、“エクソソームのような微小な帯電粒子”を迅速かつ高効率で体液中から単離・濃縮するために、イオン濃度分極で発生するイオン枯渇領域の隔壁作用(斥力)を利用したマイクロ流体デバイスを開発した。人臍帯静脈由来血管内皮細胞株、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株、ヒト胎児腎細胞由来株および、乳がん細胞株の4つの細胞の培養液から取り出したエクソソームについて、イオン枯渇領域の斥力の検証実験を実施し、エクソソームが、単離・濃縮可能なことを示した。また、エクソソームの形状と密度を計測することで、本手法の処理がエクソソームの形状維持に影響をおよぼさないことを示した。

研究成果の概要(英文)：Exosome, one of circulated bio-substances, has an important role as a communication tool between cells in our body. To use them as a biomarker, preparation of high quality sample of exosome is required. However, complicated process of conventional preparations, e. g. ultracentrifugal fraction, hyperbaric filtering and antibody labeling, causes physical damage to the exosome. To resolve the challenge, we developed a novel system based on microfluidic device in which functions of an ion concentration polarization and an electrophoresis are incorporated to concentrate delicately bio-substances including exosome. In this system, an ion depletion zone formed by the ion concentration polarization was used for the concentrating of submicron substances. Additionally, the concentrated substances were sorted by the electrophoresis at once. For verification of the system, we demonstrated concentrating and sorting of exosomes with quick process.

研究分野：ナノ・マイクロ工学

キーワード：エクソソーム イオン濃度分極 イオン枯渇領域 イオン交換膜 マイクロ ナノ exosome ion depletion zone

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞間のコミュニケーションツールとして機能するエクソソームと呼ばれる細胞外小胞が、がん診断のバイオマーカーとして注目されている。がん細胞から分泌されるエクソソームは、がんの増大や転移に関与する核酸やタンパク質を内包しており、体内を循環して正常な細胞へと伝播していく(例えば Grange et al., *Cancer Res*, 2011)。そのため、血液や尿からがん細胞由来のエクソソームを検出することができれば、人体に負担のかからない早期診断を実現することができる。

しかし、最初期の小さながん組織から分泌される微量かつ低濃度のエクソソームを検出するためには、どうしても不要物質中からエクソソームだけを単離して 10^{12} 個/mL 程度まで濃縮する必要がある。これに対し、超遠心法やフィルタ濾過法、抗体法、限外濾過法といった既存の単離・濃縮手法では、処理中のデッドボリュームが多く、遠心力や濾過時の圧力、濃縮試薬の影響で大部分のエクソソームが変性したり破損して失われてしてしまうため、検出に必要な収量と濃度を得ることが困難であった。

一方で、本研究代表者のグループはイオン濃度分極と呼ばれる現象を利用した技術により、既存の煩雑な手法を用いずに、帯電粒子の流動を操作して緩やかに単離・濃縮することに成功している(林田 他, マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 2014)。

2. 研究の目的

本研究では、エクソソームの質量や帯電量などの物性とイオン濃度分極による隔壁作用との相関について精緻な検証を試みることで、がん由来のエクソソームに固有に機能する隔壁を形成し操作する技術を開発する。さらにこの技術を基に、全血中からダイレクトに効率良く緩やかにエクソソームを単離・濃縮できる手法を構築する。

3. 研究の方法

本研究を円滑に進めるため、初年度にイオン濃度分極の隔壁作用を利用した微粒子の操作技術を開発し、次年度にエクソソームを含む微粒子の単離・濃縮手法を構築する二段階の計画を立てた。

初年度の、「隔壁作用の操作技術の開発」では、隔壁作用の規模の制御条件を検証し、隔壁作用とその影響を受ける物質の物性との相関を明らかにして、精巧な隔壁作用の操作技術を開発した。

次年度の「単離・濃縮手法の構築」では、エクソソームの物性に適した隔壁作用の制御システムを開発して、隔壁操作による新たな単離・濃縮手法を構築した。この手法で単離・濃縮したエクソソームの回収率と濃縮率を検証し、がんの検出が可能な高濃度サンプルが得られることを実証した。

4. 研究成果

4. 1 初年度の成果

エクソソームの単離・濃縮を行うため、イオン濃度分極を発生させる初期評価用デバイスを試作した。試作デバイスには、図1に示すようなマイクロ流路がY字に分岐した箇所があり、その下にイオン交換膜が敷設されている。図の例では、流路に蛍光染色したアルブミン (BSA) が流し込まれている。流路の下方に黒く見えるのがイオン濃度分極によるイオン枯渇領域であり、その領域の隔壁作用により、BSA が流路上方に押し上げられて濃縮されていく。

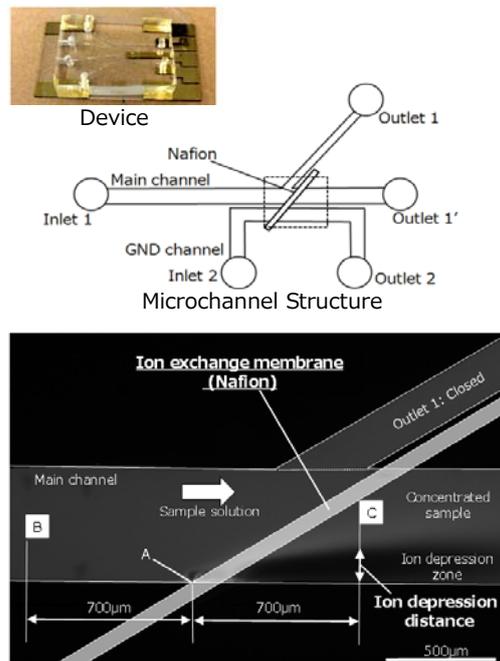


図1 試作デバイスおよび内部のマイクロ流路のY字分岐箇所

研究代表者は、イオン濃度分極の隔壁作用を定量的に見積もるために、イオン枯渇領域の起点となる図中の点Aから700µm下流でのイオン枯渇領域の幅を代表長さとして定義した。この長さを各条件で計測し、比較することで隔壁作用について検証した。

検証に用いるパラメータは印加電圧と送液流量であり、用いるサンプルは、サイズや帯電量などの異なる蛍光粒子6種類および、アルブミンやデキストランといった夾雑物のモデル物質、環境ウイルスの一例としてバキュロウイルスを用いた。図2に、アルブミン (BSA)、デキストラン (DEX)、バキュロウイルス (AcNPV) に対する隔壁作用の電圧依存性を示す。メイン流路の流量が $2.1 \mu\text{L}/\text{min}$ の際に、印加電圧を 0 V から 100 V まで変化させると、次第にイオン枯渇領域が大きくなっていくことが分かる。この結果からイオン枯渇領域の大きさは電圧で制御できることが明らかであり、今回評価したサンプル中で最もイオン枯渇領域が小さいAcNPVの場合で

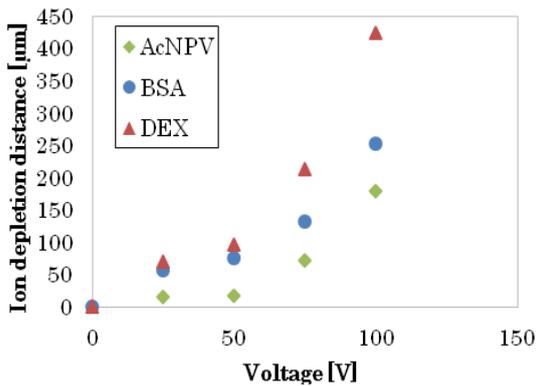


図2 バキュロウィル(AcNPV)、アルブミン(BSA)、デキストラン(DEX)に対する隔壁作用の電圧依存性

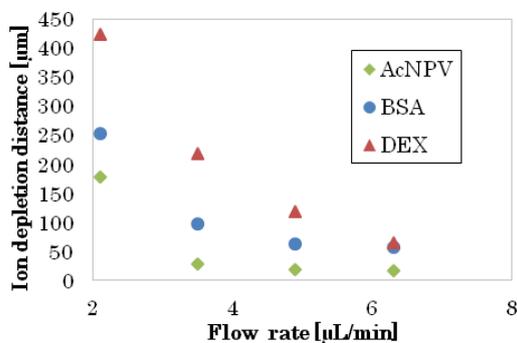


図3 バキュロウィル(AcNPV)、アルブミン(BSA)、デキストラン(DEX)に対する隔壁作用の流量依存性

も、200 μm 程の枯渇領域幅が得られることが判明した。

次に、イオン枯渇領域の流量依存性を図3に示す。印可電圧100 Vの際に、メイン流路の流量を2.1 μL/minから6.3 μL/minまで増加させると、AcNPV、BSA、DEXいずれのサンプルにおいても、流量の上昇に伴いイオン枯渇領域が小さくなる傾向が明らかとなった。特に6 μL/minを上回る流量では、3種類の溶液の全てにおいてイオン枯渇領域の幅は100 μm以下となり、500 μmの流路幅に対する占有率が20%以下となった。

以上の結果をまとめると、送液によって供給される陽イオンの供給量と、ナフィオンを介してメイン流路からGND流路に移動する陽イオン量とのバランスが、イオン枯渇領域の大きさを決定する重要な要因であることを示唆している。さらに図3によれば、同じ流量であっても粒子サイズが大きくなるにつれてイオン枯渇領域が小さくなっていることから、粒子自体に働く流体力学的な外力も影響していることが予想されるが、その詳細は現時点では不明である。一方、流量が増えてもイオン枯渇領域の幅が数10 μm程度で飽和する傾向が見られるので、メイン流路の流

路幅を数10 μm幅以下程度にすれば、高流量時でも流路を堰き止める位のイオン枯渇領域を発生できる可能性があり、すなわち、イオン枯渇領域の上流側で完全に帯電粒子を堰き止めて、サンプルを高濃縮できる可能性が示された。

また、隔壁作用によって流路の片側に濃縮された帯電粒子の濃縮率を、輝度値から定量解析した結果を表1に示す。濃縮率はサンプル間でばらつきが生じるものの、1.1倍から2.3倍までの濃縮率を得ることができた。粒子のサイズや帯電量で濃縮率の差異が生じる原因についての詳細は現時点では明らかでは無いが、少なくとも全てのサンプルにおいて濃縮が可能であることが実証された。

表1 試作デバイスによる濃縮率

	Diameter [nm]	Surface characteristic	Concentration rate
粒子1	25	COOH	1.5
粒子2	100	COOH	1.9
粒子3	250	COOH	1.8
粒子4	25	NH2	1.6
粒子5	100	NH2	2.3
粒子6	250	NH2	1.3
AcNPV	260 nm	Negative charge	1.2
BSA	68k Da	Negative charge	1.4
DEX	10k Da	Negative charge	1.1

4. 2 次年度の成果

初年度に得られたイオン濃度分極の隔壁作用の制御に関する知見を基に、エクソソームの濃縮実験を実施した。実験に用いたエクソソームは人臍帯静脈由来血管内皮細胞株、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株、ヒト胎児腎細胞由来株および、乳がん細胞株の4種類の細胞(HUVEC, MCF7, HEK549, 293)を培養した培養液から抽出したものであり、エクソソームの種類ごとの隔壁作用の違いについても明らかにしようと試みた。

図4は、マイクロチャネルにHUVEC由来のエクソソームを送液して、隔壁作用の検証実験を試みた結果を示している。図中のマイクロ流路の下方に黒く見えるのはイオン濃度分極によるイオン枯渇領域であり、その領域の隔壁作用により、エクソソームが流路上方に押し上げられていることが見て取れる。

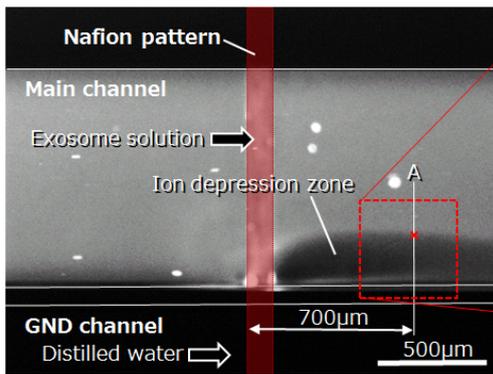


図4 HUVEC 由来のエクソソームに対するマイクロ流路内でのイオン濃度分極

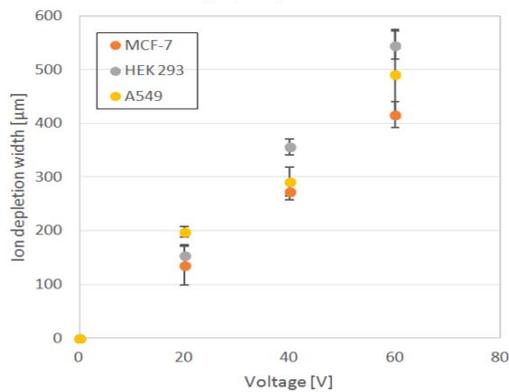


図5 HUVEC 由来のエクソソームに対する隔壁作用の電圧依存性

図5は MCF7, HEK549, 293 の3種類の細胞由来のエクソソームについて本手法を適用した時の結果をまとめたものであり、2.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ の送液条件下で印過電圧の依存性をイオン枯渇領域の幅で示している。イオン枯渇領域の幅は、図2, 3と同様に、イオン交換膜 (Nafion) から下流 700 μm の地点で計測した値である。グラフが示すように、印過電圧が 0V から 60V の範囲では枯渇領域の幅も線形増加していくことが分かる。また、この結果は、エクソソームの種類によって隔壁作用の強さに違いがあることも示唆している。

さらに、本手法の適用後にエクソソームの形状と密度について、原子間力顕微鏡を用いて計測した。図6は、実際に原子間力顕微鏡で計測したエクソソームの形状画像の一例と、処理の前後でのエクソソームの密度を示した結果である。密度のグラフが示すように、超遠心機での濃縮処理で、エクソソームが半分程度の量になってしまうのに対し、本手法を用いた場合ではほとんど損失が生じていない。エクソソームの形状も球状となっていることから、本手法によるエクソソームへのダメージが無いことが明らかになった。

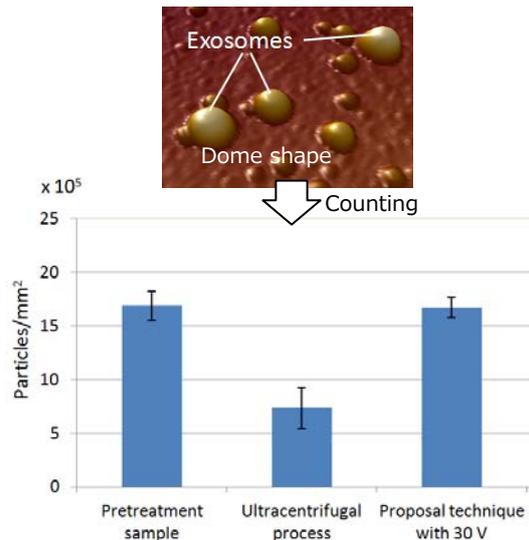


図6 原子間力顕微鏡によるエクソソームの形状および密度の計測結果

本研究の成果として、現時点での濃縮率は最大 2.3 倍程度と高くは無いものの、評価した全てのサンプルで濃縮が可能であることが明らかとなった。特にエクソソームを用いた評価結果からは、印過電圧による、種類ごとの単離の可能性が示唆されており、単離・濃縮技術として今後のさらなる発展が期待できる。

イオン枯渇領域の大きさは、動作電圧や流量に依存するため、例えば、流路の2つの出口の引き込み流量比を調節することで、濃縮率と濃縮量を制御することも可能であると考えられる。今後これらの詳細なメカニズムの解明による全体的最適化が重要となるが、少なくともイオン枯渇領域の幅が数 10 から数 100 μm 程度で維持できることが明らかとなったため、流路幅を数 10 μm まで狭くしつつ、一方、無数の流路の並列化で収量を確保すれば、大量サンプルの処理と濃縮効率を飛躍的に向上できる可能性があるなど、開発を進めるに当たっての設計指針を得ることが出来た。また、濃縮特性が流量や動作電圧に依存することを積極的に利用すれば、将来的にはマイクロ流路によって様々な強度のイオン枯渇領域をネットワーク化するなどして、多種多様な粒子を粒子サイズや帯電量などで分画しつつ濃縮するような技術への展開も可能となる。

今後の展望として、デバイス構造の改良を進めて行くことで、本研究が狙うエクソソームを用いた早期診断だけでなく、医療応用から、環境監視、食品安全、ライフサイエンス全般の基礎研究に至るまで、濃縮を必要とする様々な分野での応用を目指す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- 1) Katsuo Mogi, Chika Shirataki, Kumiko Kihara, Hirokazu Kuwahara, Yuich Hongoh and Takatoki Yamamoto, “Trapping and isolation of single prokaryotic cells in a micro-chamber array using dielectrophoresis” RSC Adv., 113000-113006, 2016. 査読有り
- 2) Katsuo Mogi, Kenshiro Sakata, Yuki Hashimoto, Takatoki Yamamoto, Materials, “A Novel Fabrication Technique for Liquid-Tight Microchannels by Combination of a Paraffin Polymer and a Photo-Curable Silicone Elastomer”, Materials, vol.9, No.8, pp.621-628, 2016. 査読有り
- 3) Katsuo Mogi, Yuki Hashimoto, Takehiko Tsukahara, Motoki Terano, Masahiko Yoshino, Takatoki Yamamoto, “Nanometer-level high-accuracy molding using a photo-curable silicone elastomer by suppressing thermal shrinkage”, RSC Advance, Vol. 5, 10172-10177, 2015. 査読有り
- 4) Yuki Hashimoto, Katsuo Mogi, Takatoki Yamamoto, “Fabrication method for moth-eye structure made of glass using vacuum ultraviolet light vitrification of silicone”, IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines, in press, 2016. 査読有り
- 5) Yuki Hashimoto, Katsuo Mogi, Takatoki Yamamoto, “Nanoscale Three-dimensional Optical Visualization Method for a Deformation of Elastomer Printing Plate to Realize Soft Nano-printing Technology”, Surface and Interface Analysis, John Wiley & Sons, vol.47, pp.723-727, 2015. 査読有り
- 6) 茂木 克雄, 林田 佳, 本田 文江, 山本 貴富喜, 「超高感度センシングに向けたイオン枯渇領域の制御による ウイルス濃縮デバイスの開発」, 日本電気学会論文誌 E 掲載巻号 Vol. 136 No. 9, IEEJ ID 16001320, 2016. 査読有り

[学会発表] (計24件)

- 1) Katsuo Mogi, Yuki Hashimoto, Takatoki Yamamoto “Three-dimensional microstructure fabrication by combination of a paraffin polymer and a photo-curable silicone elastomer”, MNST2016, Tokyo, 2016. 12

- 2) Gyounggeun Park, Yuki Hashimoto, Katsuo Mogi, Takatoki Yamamoto, “3D-printed sample concentrator based on ion concentration polarization”, MNST2016, Tokyo, 2016. 12
- 3) Takuya Honda, Kenya Fujimoto, Yuta Yoshimoto, Katsuo Mogi, Ikuya Kinefuchi, Yasuhiko Sugii, Shu Takagi, “Analysis of water microdroplet condensation on silicon surfaces by environmental scanning electron Microscopy”, MNST2016, Tokyo, 2016. 12
- 4) Katsuo Mogi, “Exosome Sorting System by Utilizing Ion Control Techniques”, Lab-on-a-chip asia, Singapore, 2016. 12 (招待講演)
- 5) Katsuo Mogi, Kei Hayashida, Takatoki Yamamoto, “A novel control system for concentration of bio-substances by utilizing combination technique of ion concentration polarization and electrophoresis”, MNE 2016, Vienna, Austria, 2016. 9
- 6) Katsuo Mogi, Norika Kanetaka, Yasuhiko Sugii, and Koichi Hishida, “Investigation of mass transfer in glycocalyx layer of endothelial cell using a super resolution LIF technique”, 11TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PARTICLE IMAGE VELOCIMETRY - PIV15 Santa Barbara, California, 2015. 9
- 7) Katsuo Mogi, Hashimoto Yuki, Tsukahara Takehiko, Yamamoto Takatoki, “Nano-pattern Molding Technique Using Photo-curable Silicone Elastomer”, IEEE NANO 2015, Rome, Italy, 2015. 7
- 8) Katsuo Mogi, Yasuhiko Sugii, “Visualization of Near Surface Flow of Endothelial Cells based on Confocal Micro-PIV and Super-resolution Microscopy”, 10th Pacific Symposium on Flow Visualization and Image Processing (PSFVIP2015) Naples, Italy, 2015. 6
- 9) Yuki Hashimoto, Katsuo Mogi, Takatoki Yamamoto, “Room Temperature Atmospheric Direct Bonding of Various Plastics by Vacuum Ultraviolet less than 160nm wavelength”, MicroTAS 2016, Dublin, Ireland, (MicroTAS 2016), pp. 1021-1022, Oct. 2016.
- 10) Yuki Hashimoto, Katsuo Mogi, Takatoki Yamamoto, “Vacuum ultraviolet light assisted nano-pattern transfer to fabricate nanostructure with heterogeneous materials”, MNE 2016,

- Vienna, Austria, 2016.9
- 11) Kei Hayashida, **Katsuo Mogi**, Takatoki Yamamoto, “Concentrate exosome using ion depletion zone in microfluidic device”, MNE 2016, Vienna, Austria, 2016.9
 - 12) Yuki Hashimoto, **Katsuo Mogi**, Takatoki Yamamoto, “Release Agent-Free Low-Cost Double Transfer Nanoimprint Lithography for Moth-Eye Structure”, IEEE NANO 2016, Sendai, Japan, (IEEE NANO 2016), pp. 318-320, Aug. 2016.
 - 13) Yuki Hashimoto, **Katsuo Mogi**, Takatoki Yamamoto, “Release Agent Free Ultraviolet Nanoimprint Lithography by Cyclic Olefin Polymer and Polydimethylsiloxane Made Mold”, APCOT 2016, Kanazawa, (APCOT 2016), pp. 167-169, Jun. 2016.
 - 14) Kenya Fujimoto, Takuya Honda, **Katsuo Mogi**, Ikuya Kinefuchi, Yasuhiko Sugii, Shu Takagi, “Condensation Growth of Sub-Micro meter Water Droplets on Silicon Surfaces with Different Nanoscale Roughness: an Environmental Scanning Electron Microscopy Study”, The First Pacific-Rim Thermal Engineering Conference (PRTEC) PRTEC-14652, Technical Sessions, Hawaii USA, 2016.3
 - 15) Yuki Hashimoto, **Mogi Katsuo**, Takatoki Yamamoto, “FABRICATION METHOD OF MOTH-EYE USING UV-CURABLE POLYDIMETHYLSILOXANE WITH VITRIFICATION BY VACUUM-ULTRAVIOLET LIGHT”, IEEE NANO 2015, Rome, Italy, 2015.7
 - 16) Yuki Hashimoto, **Mogi Katsuo**, Takatoki Yamamoto, “THREE-DIMENSIONAL VISUALIZING METHOD AT NANO-SCALE RESOLUTION FOR PRINTING BEHAVIOR”, IEEE NANO 2015, Rome, Italy, 2015.7
 - 17) Pungetmongkol Porpin, **Mogi Katsuo**, Yamamoto Takatoki, “Conformation dependent non-linear impedance response of DNA in nanofluidic device”, IEEE NANO 2015, Rome, Italy, 2015.7
 - 18) **茂木 克雄**, 兼高 紀香, 大萱 晃大, 杉井 康彦, 菱田 公一, 「超解像度法を用いた血管内皮細胞近傍の物質濃度分布計測」, 日本機械学会 第 93 期 流体工学部門 講演会, 東京, 日本, 2015.11
 - 19) **茂木 克雄**, 白瀧 千夏子, 本郷 裕一, 山本 貴富喜, 「マイクロ/ナノギャップ電極を用いた誘電泳動力トラッピングによる微生物単離」, 第 7 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 新潟, 日本, 2015.10
 - 20) **茂木 克雄**, 兼高 紀香, 杉井 康彦, 菱

- 田 公一, 「血管内皮細胞の物質輸送特性の解明に向けたグリコカリックス層内物質の超解像度濃度計測法の開発」, 第 43 回可視化情報シンポジウム, 東京, 日本, 2015.7
- 21) 林田 佳, **茂木 克雄**, 山本 貴富喜, 「マイクロ流体デバイス中でイオン枯渇領域を用いたエクソソームの濃縮」, SS33, 平戸, 日本, 2016.10
- 22) 坂田 健士郎, **茂木 克雄**, 林田 佳, 山本 貴富喜, 「イオン濃度分極によるエクソソームの高効率濃縮のための立体型マイクロ流体デバイスの開発」, JARI_JSEV, 広島, 日本, 2016.8
- 23) 林田 佳, **茂木 克雄**, 坂田 健士郎, 山本貴富喜, 「イオン枯渇領域によるエクソソーム簡易濃縮法の開発」, JARI_JSEV, 広島, 日本, 2016.8
- 24) 林田 佳, **茂木 克雄**, 山本 貴富喜, 「イオン枯渇効果を利用したバイオナノ粒子の分離・濃縮の検討」, 第 7 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム 新潟県, 朱鷺メッセ, 2015.10

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茂木 克雄 (Mogi, Katsuo)

東京工業大学・工学院・特任助教

研究者番号: 20610950

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()