

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 13 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K04915

研究課題名(和文) オンチップ免疫粒子電気泳動原理によるヒト乳がんエクソソームの1粒子解析

研究課題名(英文) Single particle analysis of exosomes shed from human breast cancer cells by on-chip particle immunoelectrophoresis

研究代表者

赤木 貴則 (AKAGI, TAKANORI)

東京工業大学・環境・社会理工学院・研究員

研究者番号：80401149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：免疫粒子電気泳動法のエクソソーム診断への応用可能性について検討するために、粒子の範囲を拡大するために、分析システムのシグナル/バックグラウンドを向上させ、従来の装置では容易ではない30 nmまでの検出を達成した。次に、乳がん悪性度の指標の1つである表面マーカーHER2をエクソソームで評価できることを確認した。また、粒径-ゼータ電位同時取得法を考案・実証するとともに、密度精製による粒子集団の違いを評価した。これらの成果は、従来のエクソソーム分析法では困難な、液中の微小な粒子のそれぞれを多項目で分析できる点で画期的であり、免疫粒子電気泳動法のエクソソーム診断への有用性を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞から分泌されるナノ粒子であるエクソソームは、がんなどの診断マーカーとして注目を集めている。しかし、エクソソームを対象にした診断や分析を実現するには、個々のエクソソームを分析する方法が必要とされていた。本研究では、これまで容易ではなかった30 nmの粒子の評価、個々のエクソソームの粒子径と表面タンパク質の情報の同時取得が可能になった。本研究で開発した技術により、エクソソームを対象にした医学や生物学の研究開発が今後ますます進み、エクソソームを用いる診断や薬の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Applicability of a particle immunoelectrophoresis to exosome diagnosis was studied using breast cancer-derived exosomes. First, to extend the particle size range, the signal/background of the analysis system was improved. The particles up to 30 nm, which is not easy with conventional instruments, can be analyzed. Next, to advance the analytical method, the sample purification and the simultaneous evaluation of particle size-zeta potential were examined. The difference in the expression of surface marker HER2, which is one of the indicators of malignancy of breast cancer, can be evaluated. This methodology is expected to make a substantial contribution to the ever-growing field of exosomal biomarker research.

研究分野：ナノマイクロ科学

キーワード：エクソソーム 乳がん 細胞外小胞 マイクロチップ 電気泳動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞から分泌される直径 30-100 nm の膜小胞であるエクソソームに高い注目が集まっている (Andaloussi、Nature Reviews Drug Discovery 2013; 日本細胞外小胞体学会が 2014 年設立)。図 1 に示すように、エクソソームは分泌細胞に由来するタンパク質や RNA 等で構成され、体液中に安定に存在する。エクソソームは別の細胞に取り込まれると、その細胞の遺伝子発現を調節することから、がん転移や免疫などの細胞間シグナル伝達の媒体として働くことが分かってきた (Li、Nature Immunology 2013; They、Nature Rev. Immunol. 2009; Skog、Nature Cell Biol. 2008; Taylor、Gynecol. Oncol. 2008)。また、エクソソームの構成成分が分泌元細胞に由来することは、体液中のエクソソームを分析することで異常細胞の存在が分かる可能性に繋がるため、新たなバイオマーカー候補としても期待されている。特に、エクソソームを分析マーカーとする場合、内包する核酸やタンパク質も重要であるが、エクソソームの分類や、標的指向性のメカニズム解明の観点からは、表面タンパク質の情報は極めて重要である。

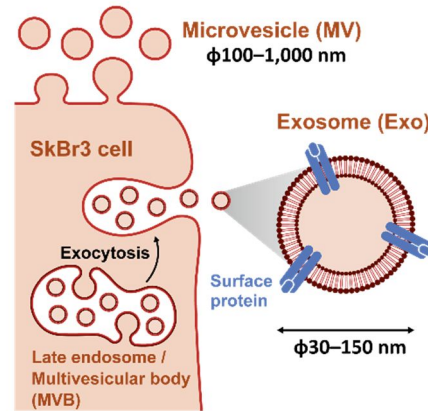


図 1 エクソソームの概要

しかしながら、エクソソームの表面タンパク質を分析するためには、技術的な課題があることが指摘されている。すなわち、体液には様々な細胞が分泌したエクソソームが混在するとともに、エクソソームとよく似た膜小胞が混在する。そして、体液試料に含まれる膜小胞はヘテロな集団であるため、体液試料の分析では個々の膜小胞を計測することが重要である。しかしながら、市販の蛍光フローサイトメトリーでは、直径数十 nm のエクソソームから得られる散乱光とノイズの判別がつかず検出トリガーをかけることが難しく、また、微弱な蛍光の検出および褪色が課題となっており、フローサイトメトリー法をエクソソーム解析に応用することは容易ではない (Vlist、Nature Protocols、2012)。したがって、新たな 1 粒子レベルで計測可能な表面タンパク質分析技術の必要性が指摘されている (Verderio、Frontiers in Physiology、2013)。

研究代表者は、マイクロ流体デバイス技術を応用した個々の粒子のゼータ電位計測手法について研究を進め、レーザ暗視野照明系および高感度観察系を組合せてナノ粒子を可視化し、個々のエクソソームのゼータ電位の計測法を提案し (Jpn. J. Appl. Phys.、2013)、簡単かつ再現性良く測定するための計測システムの開発を進めている。このシステムにより、エクソソームの表面の電気的な性質の情報を得ることができ、個々の表面マーカータンパク質の発現量についての情報を得ることはできない。一方、免疫反応と粒子電気泳動法を組合わせた免疫粒子電気泳動法をエクソソーム分析に応用し、免疫粒子電気泳動原理に基づくエクソソーム表面タンパク質の 1 粒子評価技術を提案した (Akagi、PLOS ONE、2015)。電位計測はサイズ効果を受けないため、ナノ粒子の計測において有利であるが、細胞の評価に応用するためには、解決すべき課題がある。そこで、本研究課題では、乳がん細胞から分泌されたエクソソームをモデルとして、当該エクソソーム分析技術の有用性について検討した。

2. 研究の目的

乳がん由来エクソソームを用いて、免疫粒子電気泳動法のエクソソーム診断への応用可能性について検討する。

3. 研究の方法

3 - 1. 粒子電気泳動システム

図 2 に、粒子電気泳動システムの概要を示す。本システムは、マイクロキャピラリーチップ、直流電源、光源および高感度検出器で構成される。ポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のマイクロキャピラリーチップは、試料に含まれる夾雑物の非特異吸着を抑制するため、流路内壁表面を 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) と 3-メタクリロイルエチルトリエトキシシラン (METESi) の共重合ポリマーでコーティングした。マイクロキャピラリーチップの流路内にエクソソーム試料を導入して、倒立顕微鏡のステージにチップを載置した。流路内のエクソソームの挙動を追跡するために、流路の側方からレーザ光を入射し、生じた散乱光を流路下方の対物レンズで集光し、高感度検出器で結像した。

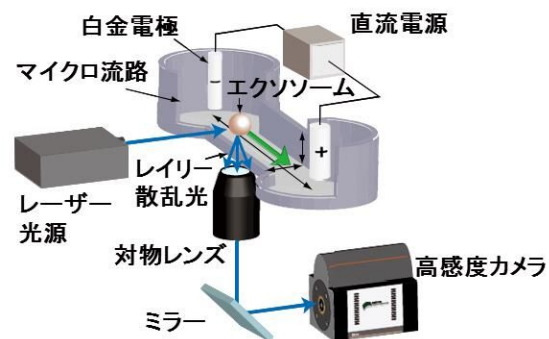


図 2 装置構成の概要

3 - 2 . エクソソーム試料の準備

80%コンフェルトになるまで培養した乳がん細胞 (MDA-MB-231 細胞および Sk-Br-3 細胞) の培地を交換して、無血清培地で 48 時間培養し、培地を回収した。培地に含まれるエクソソームは、超遠心機を用いる分画遠心法で精製した。さらに、多用途密度勾配遠心分離媒体 OptiPrep を用いる密度分画遠心法で密度分画を取得した。遠心後のペレットは、リン酸緩衝液(PBS、pH7.4)で懸濁し、マルバーン社のナノ粒子解析システム NanoSight で粒子濃度および粒度分布を確認した。免疫反応(抗原抗体反応)は、1 粒子あたりに抗原タンパク質が 20 個とした仮定、および、市販の抗体試薬の濃度から、粒子電気泳動実験において 80%以上の表面タンパク質に抗体が結合する濃度を見積り、実施した。

3 - 3 . エクソソームの計測実験

エクソソーム試料をマイクロ流路内に導入して、個々の粒子を追跡することで、エクソソームの 1 粒子計測実験を行った。はじめに、液の流れがない静止状態では、粒子はブラウン運動を行っている。このブラウン運動する粒子の重心を追跡し、平均自乗変位から拡散係数を見積もって、アインシュタイン・ストークスの式から水力学的直径を算出した。また、電圧を印加した際の移動を追跡して、ゼータ電位を見積もられる。電気泳動実験では、50 V/cm の電界を印加して電気泳動実験を行った。EV のゼータ電位(ζ)は、計測された EV の電気泳動速度(U_m)から、無電荷ビーズを用いて計測した電気浸透流速度(U_{e0})を差し引いて得られる EV の真の電気泳動速度(U_{ep})を算出し、Henry の式または Smoluchowski の式で算出した。

なお、これらのエクソソームの精製および測定実験は、東京大学大学院工学研究科マテリアル工学専攻一木研究室において行ったものである。

4 . 研究成果

エクソソームの粒径は、電子顕微鏡像などから 30-150 nm 程度とされているものの、液中の粒子の粒径ではない。液中の粒子の粒径を計測する装置は、いくつか市販されているが、個々の粒子のゼータ電位計測と組み合わせることが有利な方法は、ブラウン運動解析である。しかしながら、市販の装置では検出下限が 50-70 nm 程度とされ、粒径 50 nm 以下のエクソソームの粒径を解析することは容易ではなかった。そこで、レーザーの照射方法および分析チップのデザイン改良により、粒子電気泳動システムのシグナル/バックグラウンド比を向上させることを試みた、そして、既知の粒子を用いて粒径を測定し、検出下限を評価した。図 2 に、Thermo Fisher 社の粒子径標準粒子(Polystyrene beads) (3030A、3050A) を 10 mM HEPES 緩衝液に分散し、ブラウン運動解析を行って取得した粒径分布を示す。これらの水力学的直径の平均±標準偏差はそれぞれ、 38.7 ± 18.7 nm(3030A)、 51.4 ± 20.3 nm (3050A)であり、従来装置では困難な、直径 30 nm までの粒子の評価が可能であることを確認した。

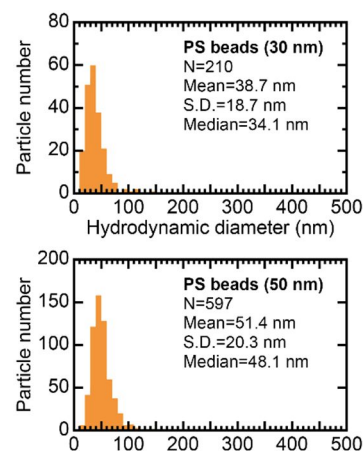


図 3 標準粒子の粒径分布

次に、当該システムを用いて、乳がん細胞 SkBr から分泌されたエクソソームの粒径分布を測定した。細胞を無血清培地で 48 時間培養した上清は、図 4 (左)に示す分画超遠心法で精製する。この工程中、10,000g で沈殿させて得たペレット(10k-pellet)と、10,000g では沈殿せずに 100,000g で沈殿させて得たペレット(100k-pellet)をそれぞれ懸濁し、ブラウン運動解析により粒径分布を測定し、比較した。図 4 (右)に両者の粒径分布を示す。10k-pellet および 100k-pellet の水力学的直径の平均±標準偏差はそれぞれ、 102 ± 54.5 nm および 49.0 ± 24.7 nm であった。この結果は、10,000g の条件で 100 nm を超える粒子が除去されていること、および、10,000g の条件で沈殿せずに 100,000g の条件で沈殿した粒子の粒径分布を、当該システムにより計測できることを示している。また、スパイクモデル作成に向けて体液試料から精製する方法として、ヒト血漿および唾液からの回収を試みたところ、血漿試料からの回収は培養上清からの精製法と同様に回収できたのに対し、唾液試料については高粘性のためそのまま用いることはできなかったが、pH を変えることによりムチンによる高粘性を回避できることを確認した。

細胞培養上清試料や体液試料には、エクソソームと良く似た性質をもつ膜ベシクルであるマイクロベシクルやエクソトーム、リポタンパク質などが含まれており、エクソソーム自体も多様な集団であるため、細胞培養上清試料や体液試料を分画遠心したサンプルについて、それぞれの粒子が、どの細胞に由来し、どのような内容物を含むのかについての情報を取得する方法が必要である。そこで、エクソソームの表面マーカータンパク質を分析する方法として、免疫粒子電気泳動法の応用可能性を検討した。免疫粒子電気泳動は、抗体が粒子に結合すると電気泳動移動度 (EPM) が変化することにより、粒子に対して抗体が結合したかどうか、すなわち表面抗原タンパク質が存在するかどうかについて知ることができる。図 5 左に示すように、通常エクソソームの表面は負に帯電しており、電界を印加すると陽極側へ移動する。一方、エクソソームの表面に抗体が結合すると、抗体の有する正電荷により抗体とエクソソームの複合体の表面電荷密度が変

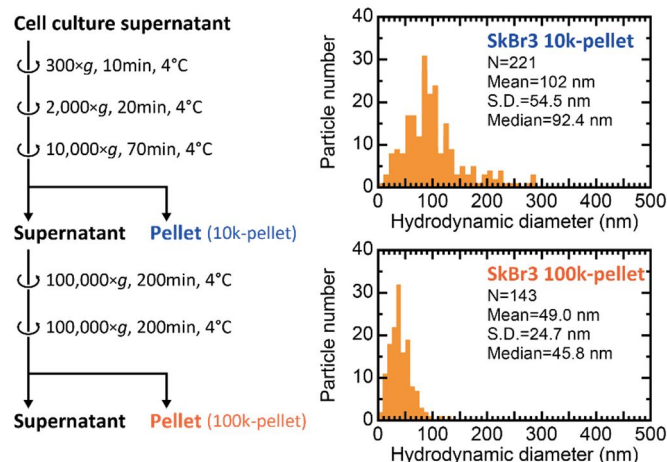


図4 乳がん細胞 Sk-Br-3 の培養上清から精製した粒子の粒径分布

化し、電圧を印加した際の移動度が変化し、この変化により抗体の結合が評価できる。粒子の輝点が追跡できれば計測できるので、エクソソームのような微小な粒子への応用に有利である。

ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 および Sk-Br-3 の培養上清から分画超遠心法を用いて回収したエクソソームサンプル(100k-pellet)に、抗 HER2 抗体(日本 BD)またはアイソタイプコントロール抗体(IgG; 日本 BD)を作用させ、電気泳動実験を行った。MDA-MB-231 細胞は細胞膜に HER2 発現量が少ないとされている細胞であり、Sk-Br-3 細胞は細胞膜に HER2 発現量が多いとされている細胞であり、両者を比較するためのモデルとして用いた。図5左に示すように、IgG を作用させたコントロール群では、MDA-MB-231 細胞由来エクソソームと Sk-Br-3 細胞由来エクソソームのゼータ電位に差は認められなかった。一方、抗 HER2 抗体を作用させた場合においては、MDA-MB-231 細胞由来エクソソームのゼータ電位は変化が認められなかったのに対し、Sk-Br-3 細胞由来エクソソームのゼータ電位は正電位の方向にシフトしていた。これにより、本方法が、エクソソーム試料の表面マーカー分析に有効であることを確認した。さらに、検出された粒子は、細胞膜の状態を大きく反映する粒子であることを示している。

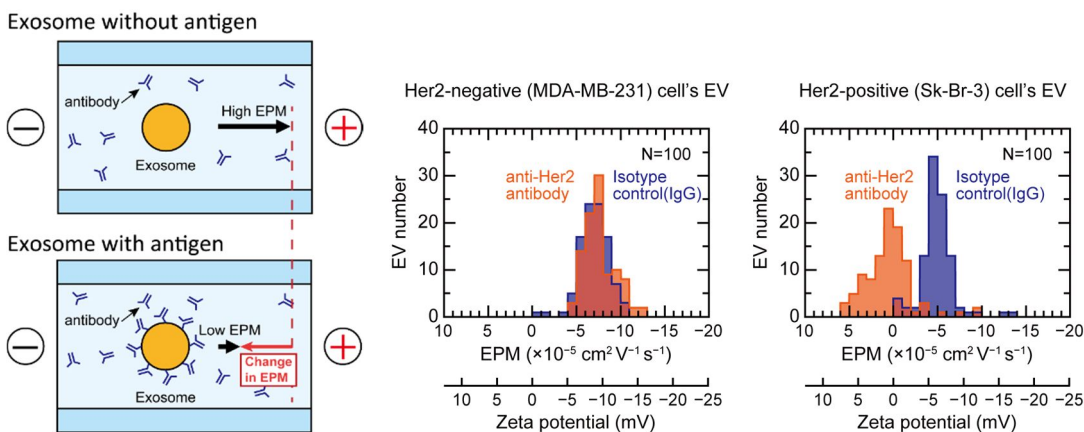


図5 乳がん細胞 MDA-MB-231 および Sk-Br-3 由来エクソソームの表面マーカー分析

細胞培養上清の遠心分画にはエクソソームに良く似た性状の粒子も含まれるため、試料をさらに精密に分析するには、遠心分画のさらなる精密精製および複数項目による粒子評価法が必要となる。そこで、前者については、密度勾配遠心法による精製法を検討し、後者については、同一粒子の粒径とゼータ電位の評価方法について検討した。その実験例を報告する。ヒト乳がん SkBr3 細胞の培養上清に対して、分画超遠心法に加えて、多用途密度勾配遠心分離媒体 OptiPrep を用いる密度勾配超遠心法で密度分画を調製し、10 mM HEPES に分散させた。ナノ粒子解析装置 NanoSight を用いてそれぞれの分画に含まれる粒子数を計数し、エクソソームマーカーである CD9 の量をウェスタンブロット法で確認した。CD9 の発現が認められたフラクションを用いて、免疫粒子電気泳動実験を行った。アイソタイプコントロール抗体として IgG を用いた。同一粒子の粒径とゼータ電位の評価は、ブラウン運動解析と電気泳動実験を連続して行うこと

により実施した。図6に示すように、分画超遠心法で精製したサンプルでは、CD9抗体およびアイソタイプコントロール抗体では明瞭な違いは認められなかった。一方、分画超遠心法に加えて OptiPrep 密度勾配超遠心法で精製したサンプルでは、CD9抗体を作用させるとゼータ電位が正の方向にシフトした。粒径には精製法による違いが認められず、電位シフトはCD9抗体のもつ正電荷の寄与によるものと考えられる。そして、粒径とゼータ電位の連続測定には長時間の追跡が必要であるため、検出される粒子に偏りがある可能性が示唆される。

以上の結果は、試料精製の精密化および粒径 - ゼータ電位同時取得による分析技術の高度化により、エクソソーム試料から従来以上の情報を得られることを示す点で画期的であり、今後、エクソソーム診断の精度向上に繋がると期待できる。

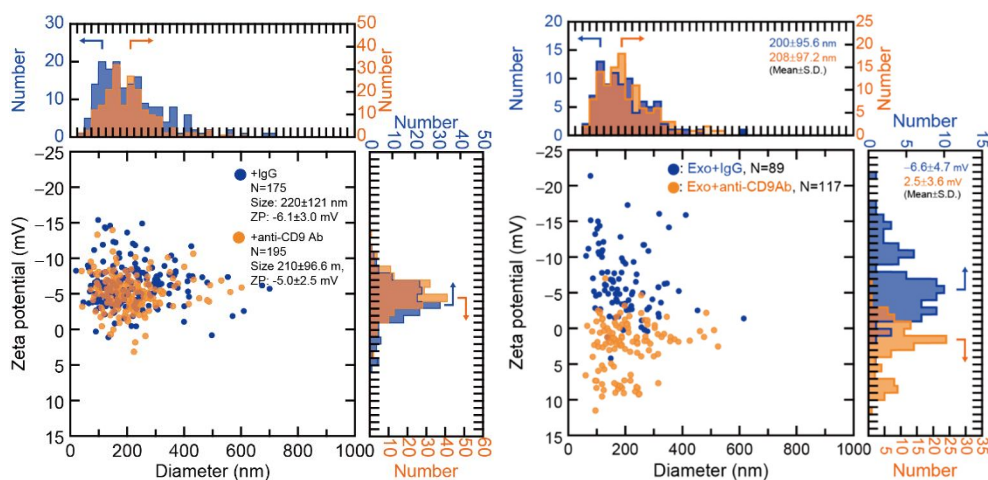


図6 免疫粒子電気泳動におけるゼータ電位変化に及ぼす精製方法の影響 (左)分画超遠心法のみで精製したサンプル、(右)分画超遠心法に加えて OptiPrep 密度勾配超遠心法で精製したサンプル

エクソソーム診断の有効性について別の視点からの検討を加えるために、社会科学的方法による研究を行った。具体的には、当該技術の位置付けを客観的に分析するために、国際特許機関が公開しているデータを教師データとして用いる学習モデルを用いて、公開済みの文献等の分類分けを行い、研究開発動向について評価した。基礎医学や細胞生物学におけるエクソソーム研究の分野において個々の粒子計測に着目した報告が増加しており、本研究の成果が基礎医学や細胞生物学の分野に波及する可能性が高いことを確認した。また、高校生に向けて本研究を紹介するなど、研究成果を社会に還元するよう努めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 S. Matsumura, T. Minamisawa, K. Suga, H. Kishita, T. Akagi, T. Ichiki, Y. Ichikawa, K. Shiba	4. 巻 8
2. 論文標題 Subtypes of tumour cell-derived small extracellular vesicles having differently externalized phosphatidylserine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Extracell. Vesicles	6. 最初と最後の頁 1579541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/20013078.2019.1579541	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 Takanori Akagi, Takanori Ichiki	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Characterization of EVs by on-chip Immunoelectrophoresis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-7253-1_17	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 -

1. 著者名 赤木 貴則	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 微粒子電気泳動の原理と応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 電気泳動学会誌	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計31件（うち招待講演 2件/うち国際学会 14件）

1. 発表者名 鹿谷真紀、松元亮、宮原裕二、合田達郎、田畑美幸、カブラルオラシオ、宮崎拓也、一木隆範、赤木貴則、木下ひろみ
2. 発表標題 エクソソーム電気泳動解析を効率化するシアル酸認識 高分子の設計と評価
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takanori Ichiki, Takanori Akagi
2. 発表標題 Microfluidic device provides a solution for a time-course analysis of EV secretion
3. 学会等名 Annual Meeting of ISEV2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤木貴則, 岡村怜, 木下ひろみ, 一木隆範
2. 発表標題 エクソソーム医療への応用を目指したナノパーティクル1粒子解析システム
3. 学会等名 第17回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Ichiki and T. Akagi
2. 発表標題 Microfluidic analysis of physicochemical properties of individual extracellular vesicles fractionated by OptiPrep density gradient
3. 学会等名 ISEV's 6th Annual Meeting (ISEV2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Akagi, R. Okamura and T. Ichiki
2. 発表標題 Multiparametric Evaluation of Individual Nanobio-particles on a Microfluidic Chip
3. 学会等名 The 34th International Conference of Photopolymer Science and Technology (ICPST-34) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤木貴則, 木下ひろみ, 末弘庸子, 岡村怜, 中久喜真理, 鬼柳知, 一木 隆範
2. 発表標題 マイクロ流路での直径30 nm以下のナノバイオ粒子の測定
3. 学会等名 電気学会E部門総合研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤木貴則
2. 発表標題 エクソソーム医療への応用を目指した単一ナノ粒子センシング
3. 学会等名 センシング技術応用セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤木貴則, 岡村怜, 一木隆範
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスによるヒト白血病細胞由来細胞外小胞の OptiPrep 密度分画の分析
3. 学会等名 第9回日本RNAi研究会/第4回日本細胞外小胞学会JSEV
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡村怜, 木下ひろみ, 中久喜真理, 赤木貴則, 一木隆範
2. 発表標題 密度分画超遠心により精製された細胞外微小粒子の性状評価
3. 学会等名 第78回応用物理学会 秋季学術講演会
4. 発表年 2017年

1 . 発表者名 T. Akagi, H. Kishita, Y. Suehiro, M. Nakakuki, and T. Ichiki
2 . 発表標題 Analysis of individual extracellular vesicles down to thirty nanometer with small sample volume toward exosomal biomarker applications
3 . 学会等名 The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (uTAS 2017) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 R. Okamura, T. Akagi and T. Ichiki
2 . 発表標題 Evaluation of individual exosomes from human leukemia cells fractionated by optiprep density gradient ultracentrifugation using microfluidic chip-based platform
3 . 学会等名 The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (uTAS 2017) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 T. Akagi, R. Okamura, H. Kishita, M. Nakakuki and T. Ichiki
2 . 発表標題 Single particle tracking analysis of extracellular vesicles down to 30 nm in a microfluidic chip
3 . 学会等名 The 30th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2017) (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 T. Akagi, R. Okamura and T. Ichiki
2 . 発表標題 Development of an analytical platform for evaluating nanoparticles down to 30 nm toward exosomal-medicine and -diagnostics
3 . 学会等名 4th COINS International Symposium (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1. 発表者名 岡村 怜, 木下ひろみ, 中島佑, 赤木貴則, 一木隆範
2. 発表標題 ナノベシクルの高信頼性測定方法の確立
3. 学会等名 第65回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Ichiki, S. Oniyangi and T. Akagi
2. 発表標題 A microfluidic chip system for profiling individual extracellular vesicles
3. 学会等名 5th Annual Meeting of the Int ' l Society for Extracellular Vesicles (ISEV2016) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 赤木 貴則, 久保田 涼介, 鬼柳 知, 一木 隆範
2. 発表標題 細胞外小胞の選択的分離に向けたマイクロ流体デバイスの開発
3. 学会等名 平成28年電気学会E部門総合研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 T. Akagi, M. Kobayashi, M. Sasaki, M. Sumikawa, H. Kuramochi, and T. Ichiki
2. 発表標題 Atomic force microscopy observation of extracellular vesicles immobilized on polyethylene glycol-lipid-modified surface in a microfluidic channel
3. 学会等名 33rd Int ' l Conf. of Photopolymer Science and Technology (ICPST-33) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 赤木 貴則、木下 ひろみ、末弘 庸子、鬼柳 知、一木 隆範
2. 発表標題 細胞外小胞のサブタイピングを実現する1粒子表面タンパク質計測法の開発
3. 学会等名 第8回日本RNAi研究会、第3回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 岡村 怜、木下 ひろみ、末弘 庸子、赤木 貴則、一木 隆範
2. 発表標題 ヒト胎児腎HEK293細胞の細胞外小胞分泌に及ぼす培養条件の影響
3. 学会等名 第77回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 T. Akagi, H. Kishita, Y. Suehiro, and T. Ichiki
2. 発表標題 Simultaneous evaluation of diameter and protein expression of individual exosomes using a microcapillary chips towards exosomal biomarker research
3. 学会等名 The 20th Int ' l Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life sciences (Micro Total Analysis Systems 2016) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 S. Oniyangi, R. Kubota, T. Akagi, and T. Ichiki
2. 発表標題 Extracellular vesicle separation based on surface proteins using a micro free-flow electrophoresis device
3. 学会等名 The 20th Int ' l Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life sciences (Micro Total Analysis Systems 2016) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 T. Akagi, H. Kishita, Y. Suehiro, S. Oniyanagi and T. Ichiki
2. 発表標題 Measurement of the surface protein level and diameter of individual extracellular vesicles of human breast cancer cells on a microfluidic chip
3. 学会等名 29th Int ' I Microprocesses and Nanotechnology Conf. (MNC2016) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 赤木 貴則、木下 ひろみ、末弘 庸子、一木 隆範
2. 発表標題 マイクロ流路チップを用いるヒト乳がんSkBr3細胞由来エクソソームの1粒子解析
3. 学会等名 第29回日本動物実験代替法学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 T. Akagi, H. Kishita, Y. Suehiro, S. Oniyanagi and T. Ichiki
2. 発表標題 Evaluation of diameter and surface proteins of individual extracellular vesicles using microcapillary chips
3. 学会等名 3rd COINS Int ' I Symp., Towards Smart Health Society -Challenge of Kawasaki based Medical Innovation- December 15, 2016 (p.36, P-14, December 15, 2016, (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 鬼柳 知、赤木 貴則、一木 隆範
2. 発表標題 エクソソーム計測システムの評価
3. 学会等名 第26回日本MRS年次大会、D5-020-009、年月、口頭発表
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 岡村 怜、赤木 貴則、一木 隆範
2. 発表標題 オンチップ電気泳動システムを用いた三種類の培地での培養後のヒト胎児腎細胞の細胞外小胞のゼータ電位の評価
3. 学会等名 第26回日本MRS年次大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 赤木貴則、一木隆範
2. 発表標題 バイオマーカー探索に向けたチップ型エクソソーム解析装置の開発
3. 学会等名 東京大学医学部附属病院先端医療シーズ開発フォーラム2017 - 新しい医療制度におけるイノベーションの推進
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Akagi, and T. Ichiki
2. 発表標題 Single exosome analysis based on microfluidic chip technology
3. 学会等名 11th Annual Symposium on Nanobiotechnology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鬼柳 知、赤木 貴則、一木 隆範
2. 発表標題 生体ナノ粒子の1粒子解析法の開発ー迅速測定に向けてー
3. 学会等名 第64回応用物理学会春季学術講演会、16p-F205-2、年3月16日
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡村 怜、木下 ひろみ、末弘 庸子、赤木 貴則、一木 隆範
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた50 nm以下のナノ粒子の測定
3. 学会等名 第64回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤木 貴則
2. 発表標題 粒子電気泳動の原理とエクソソーム分析への応用
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会 第70回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 赤木貴則	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 10
3. 書名 エクソソーム関連技術の研究開発状況と1 粒子表面分析法の立ち位置(分担執筆)「早期発見・予防に向けた次世代がん検査技術の最前線 第18章」	

1. 著者名 T. Akagi and T. Ichiki	4. 発行年 2016年
2. 出版社 John Wiley & Sons, Inc.	5. 総ページ数 5
3. 書名 Evaluation of zeta-potential of individual exosomes secreted from biological cells" in Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science (Edited by H. Ohshima), Vol. 1, Chapter 37	

1. 著者名 T. Akagi and T. Ichiki	4. 発行年 2016年
2. 出版社 John Wiley & Sons, Inc.	5. 総ページ数 4
3. 書名 "On-chip electrophoresis for evaluating zeta-potential of nanoliposomes" in Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science (Edited by H. Ohshima), Vol. 1, Chapter 67	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>【受賞】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・優秀ポスター賞、赤木貴則、岡村怜、一木隆範、第9回日本RNAi研究会 / 第4回日本細胞外小胞学会JSEV、2017年9月1日 ・Best Poster Award、T. Akagi, R. Okamura and T. Ichiki, 第4回COINS国際シンポジウム、2017年12月8日
--

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