

令和元年6月12日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17715

研究課題名(和文)がんの転移先臓器の決定機能の解明に向けたエクソソーム輸送経路可視化技術の開発

研究課題名(英文)Development of a visualization technique for exosome behavior to clarify cancer metastasis

研究代表者

茂木 克雄(Mogi, Katsuo)

東京工業大学・生命理工学院・研究員

研究者番号：20610950

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)：エクソソームの精製のため、イオン枯渇領域のフィルタ作用を利用したマイクロ流体デバイスを試作した。この試作デバイスを用いて、エクソソームに対するイオン枯渇領域のフィルタ作用の斥力を可視化すると共に、処理後のエクソソーム残存数が既存法よりも40%以上改善していることを確認した。また、生体内環境を模擬した観察用デバイスについては、3.5mmディッシュに納まるサイズの細胞整列用マイクロ流体デバイスを製作した。本マイクロ流体デバイスにより293Tを整列培養し、2週間の長期培養に成功した。さらに、培養に必要な試薬の自動調整装置として、微量液滴の操作のEWOD技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発したエクソソームの精製技術は、従来法では得られなかった良質なサンプルが精製できるため、当該研究分野のスタンダード技術として普及が期待できる。また、生体内環境を模擬した観察用デバイスも、簡便な操作で多種類の細胞をそれぞれに整列させて培養できることから、創薬や医療の分野での利用が期待できる。さらに、開発したEWOD技術は、液滴の操作に要する条件の厳密性を緩和できることから、多くの分野で試薬自動調整装置として利用できる。

研究成果の概要(英文)：In this research, a electrical method using an ion-depletion zone for handling exosomes was developed, which process the exosome particles with low damage. As proof-of-concept, we developed a prototype microfluidic device capable of generating an ion-depletion zone. Damage to the exosomes caused by the ion-depletion zone was evaluated, and compared with that caused by a conventional ultra-centrifugation method. The ion-depletion-zone-based method causes less damage than the centrifugation method. On the other hand, A prototype system based on microfluidic device for organ on a chip was fabricated in this study. The device is able to align cells in the microchannel for each size. Additionally, an Electro Wetting On Dielectric (EWOD) technique for microdroplet manipulation has been developed as an automatic reagent preparation device for cell culturing.

研究分野：ナノ・マイクロ工学

キーワード：エクソソーム マイクロ流体デバイス イオン濃度分極 イオン枯渇領域 単離濃縮 生体内環境模擬
デバイス エクソソーム精製技術

1. 研究開始当初の背景

がんの転移は、がん由来のエクソソームが正常な細胞組織へがんの情報を伝播して、血中循環腫瘍細胞が取り付け前転移ニッチという微小環境を誘導することで始まる(Kaplan et al., Nature, 2005)。エクソソームとは、細胞から分泌される小胞であり、がん細胞から分泌されるエクソソームにはがん固有の増大・転移に関与する核酸やタンパク質が内包されていることが明らかになっている(例えば Grange et al., Cancer Res, 2011)。そのため、転移の早期診断や治療への応用に向けて、がん由来のエクソソームの内包核酸や膜タンパク質の性質・機能に関する分子生物学的研究が急速に進められており、得られた情報を共有する大きな潮流も生まれている。

しかし、分子生物学的な知見が蓄えられつつある一方で、血管を流れるエクソソームがどのようにして血管内皮細胞の層を越えて特定の臓器に選択的に到達するかは明らかになっておらず、そこに起因するがんの臓器特異的転移については多くの謎に包まれている。この臓器特異的転移を明らかにするには、エクソソームが生体内でどのように働くかを直接観察することが最も有効な手段であるが、直径が1 μm に満たないエクソソームを光を通さない生体内で直接観察できる技術は現状では存在しない。

一方で、本研究代表者のグループは、マイクロ流体デバイスと超解像度顕微鏡の技術を融合させた手法により、生体内と同様の血流環境下で血管内皮細胞の物質輸送機能を捉えた成果を報告している(茂木 他, 日本機械学会論文集, 2016)。この報告では、細胞表面のグリコカリックス層近傍の微小空間で起こる動的現象を光の回折限界を超えた分解能で可視化することに成功している。また、本研究代表者は、エクソソームの研究分野で必要とされているエクソソームの濃縮サンプルを取得するため、独自の単離濃縮技術の開発を進めている。

2. 研究の目的

本研究では、血管内皮細胞近傍でのエクソソームの経時的な「動き」を捉えるために血管周辺の生体内環境を再現したエクソソーム経路可視化デバイスを開発する。さらに、開発したデバイスによりエクソソームと細胞組織との相互作用を可視化することで経路選択メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

3. 1. エクソソーム精製技術開発

本研究では、液中を浮遊するエクソソームを可視化するため、夾雑物から単離した観察に適したエクソソーム試料を精製する。精製には独自に開発したマイクロ流体デバイスを用いた手法を適用する。適用手法の機能評価は、マイクロ流体デバイス内のエクソソームを PKH26 で染色して蛍光観察することで行う。エクソソームが受ける斥力とその濃度分布については、可視化したエクソソームの蛍光輝度値と輝度分布から見積もる。さらに、処理後のエクソソーム試料の状態や、夾雑物の混入量について AFM を利用した画像解析で検証を進める。実験には、HUVEC、MCF-7、HEK293、A549 の細胞培養上清から抽出した4種類のエクソソームサンプルを使用する。

3. 2. 生体内環境模擬デバイス開発

エクソソーム試料調整と並行して、生体内環境を模擬した観察用デバイスを開発するため、新たな細胞培養技術と微量液体操作技術の開発を進める。細胞培養は現在、人の手によるディッシュ培養が一般に行われているが、個々の研究者のノウハウや人為ミスなどの多くの要因によって細胞の状態にばらつきが生じている。これに対し、人の手を介さずに均一条件を保つ細胞培養技術

を確立する。そのために、培養液の交換や微量試薬の混合を自動化できる微量液滴操作技術の開発を進める。

4. 研究成果

4. 1. エクソソーム精製技術開発

エクソソームの精製のため、独自に開発を進めているイオン枯渇領域のフィルタ作用を利用したマイクロ流体デバイスを試作した（図1）。

イオン枯渇領域を発生させるためにマイクロ流体デバイスに組み込むイオン交換膜については、液状イオン交換樹脂(Nafion)をPDMSの鋳型に流し込み加熱硬化させることで製作した。

図2は、イオン交換膜近傍の流路壁面での蛍光粒子の濃度分布を示している。電圧を印可することで、壁面近くの粒子がイオン枯渇領域の斥力を受ける様子が確認できる（文献2）。エクソソームがイオン枯渇領域から受ける斥力の検証実験の結果、4種類のエクソソームに対する、イオン枯渇領域のフィルタ作用の斥力を可視化することに成功した（文献3, 4）。これにより、エクソソームの種類に依存した斥力の差異を示唆する結果が得られた。

また、AFMを用いたエクソソームの破損検証では、超遠心機を用いた従来の手法と比較して、提案手法によりエクソソーム残存数が40%以上改善している結果が得られた。

4. 2. 生体内環境模擬デバイス開発

生体内環境を模擬した観察用デバイスについては、図3に示すような3.5mmディッシュに納まるサイズの細胞整列用マイクロ流体デバイスを製作した。本マイクロ流体デバイスにより293Tを整列培養し、2週間の長期培養に成功した。長期の安定した細胞培養に用いる培養液の送液方法についても、チューブポンプと組み合わせた密閉培養システムを開発し、その成果について国際誌で報告した（文献1）。

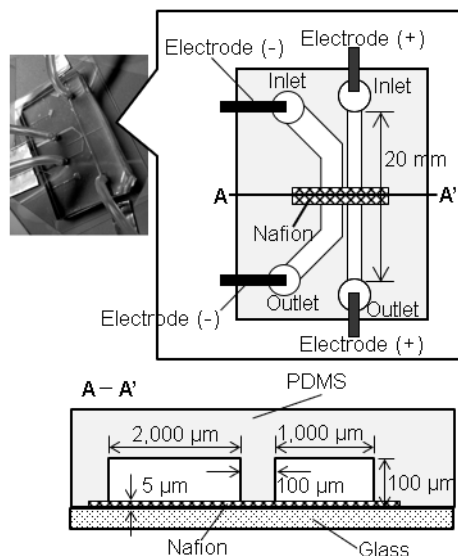


図1. 試作デバイス

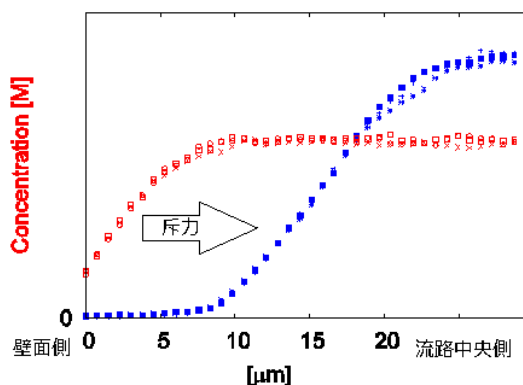


図2. イオン交換膜近傍の蛍光粒子濃度

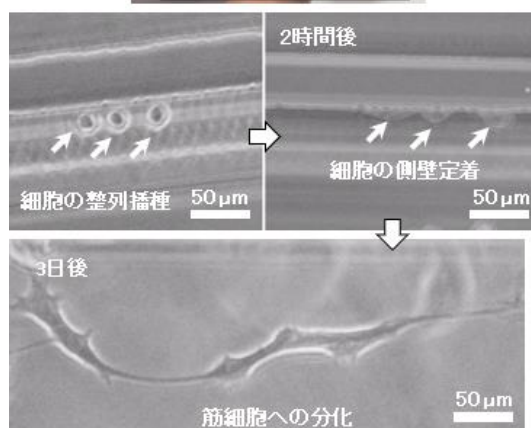


図3. 細胞整列用マイクロ流体デバイス

さらに、培養に必要となる試薬の自動調整装置として、1枚の基板の上で微量液体を電気信号のみで自在に操作できる開放型の Electro Wetting On Dielectric (EWOD) 技術に着目し、微量液滴の操作デバイスを試作した。EWOD 技術は、高い汎用性を備えている一方で、デバイス製作にかかるコスト面の課題が実用化の妨げになっていた。これに対し、本研究では安価な回路紙によってデバイスを製作することで、実用性の高い EWOD 技術を開発した。また、基板の傾きや、温度、気流変化などの様々な条件の違いにより、液滴の制御が不能になってしまう問題があったが、回路紙の特徴を利用してデンプル構造を組み

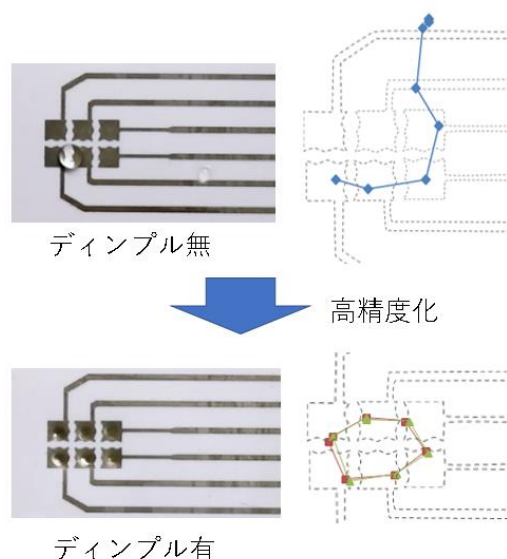


図 4. 試作 EWOD 基板とデンプル効果

込むことで、液滴の意図しない滑走を防ぐことに成功した。図 4 はデモ用の試作デバイスである。凹凸のある約 2mm^2 の電極タイルを 0.3mm 間隔で 6 枚配置した。

実際に液滴を操作することで EWOD による液滴の制御性を検証した。また、液滴のデンプル上での安定性を示すため、傾斜させた基板上の液滴の滑落角を計測して吸着エネルギーを Wolfram の実験式で見積もった。デンプル構造は、液滴の操作に要する条件の厳密性を緩和できることから、多くの分野で開放型 EWOD 技術を実用化するための一助として期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

- 1) Reiko Yasuda, Shungo Adachi, Atsuhito Okonogi, Youhei Anzai, Tadataka Kamiyama, Keiji Katano, Nobuhiko Hoshi, Tohru Natsume, **Katsuo Mogi(CA)**, "Fabrication of a novel culture dish adapter with a small recess structure for flow control in a closed environment" Applied Sciences 9(2), 269, 10 pages, 2019. 査読あり
- 2) **Katsuo Mogi**, "A Visualization Technique of a Unique pH Distribution around an Ion Depletion Zone in a Microchannel by Using a Dual-Excitation Ratiometric Method", Micromachines, 9(4), 8 pages, 2018. 査読あり
- 3) **Katsuo Mogi**, Kei Hayashida, Takatoki Yamamoto, "Damage-less Handling of Exosomes Using an Ion-depletion Zone in a Microchannel", Analytical sciences, 34(8) 875-880, 2018. 査読あり
- 4) **Katsuo Mogi**, Kei Hayashida, Ayae Honda, Takatoki Yamamoto, "Development of Virus Concentration Device by Controlling Ion Depletion Zone for Ultrasensitive Virus Sensing", ELECTRONICS AND COMMUNICATIONS IN JAPAN, 100(9) 56-63, 2017. 査読あり
- 5) Yuki Hashimoto, **Katsuo Mogi**, Takatoki Yamamoto, "Vacuum ultraviolet light assisted bonding and nanoscale pattern transfer method for

polydimethylsiloxane”, MICROELECTRONIC ENGINEERING, 176 116-120, 2017. 査読あり

- 6) 坂田健士郎, LU Yang, **茂木克雄**, 山本貴富喜, “親疎水性界面と多孔質膜を利用したリキッドゲートによる連続的サンプリング機構の初期評価” 電気学会論文誌 E, 137(6) 169-173(J-STAGE)-173, 2017. 査読あり

〔学会発表〕 (計 13 件)

- 1) Reiko Yasuda, Reiko Yasuda, Shungo Adachi, Atsuhito Okonogi, Youhei Anzai, Tadataka Kamiyama, Keiji Katano, Nobuhiko Hoshi, Tohru Natsume, **Katsuo Mogi**, “Fabrication of a Novel Culture Dish Adapter with a Small Recess Structure for Flow Control in a Closed Environment”, International conference on PharmScience Reseach & Development, Paris, 2019. 3. 招待講演
- 2) **Katsuo Mogi**, Shungo Adachi, Reiko Yasuda, Naoki Goshima, Toru Natsume, “Relation between pH distribution within an ion depletion zone and the repulsive force to exosome” MNE 2018, Copenhagen, Denmark, 2018. 9. 査読あり
- 3) **Katsuo Mogi**, “VISUALIZATION TECHNIQUE OF PH DISTRIBUTION IN AN ION DEPLETION ZONE FOR **EXOSOME** CONCENTRATION”, MMB 2018 in Monterey, 2018. 3. 査読あり
- 4) **Katsuo Mogi**(invited speaker), Kei Hayashida, Takatoki Yamamoto, “A STUDY OF EFFECTS OF ION-DEPLETION ZONE ON BIO-SUBSTANCES FOR SMART HANDLING”, AIBBC2017 in Kenya, 2017. 9. 招待講演
- 5) **茂木克雄**, “マイクロ・ナノ粒子の分画分離手法 –浮遊粒子のハンドリング技術への取り組み–”, 4 大学ナノ・マイクロファブ리케이션コンソーシアム・10 周年記念シンポジウム, 2019. 3. 査読無し
- 6) 安田玲子, **茂木克雄**, 足達俊吾, 安西洋平, 小此木孝仁, 上山忠孝, 片野圭二, 星信彦, 夏目徹, “マイクロチューブポンプを用いたかけ流し培養装置の開発と培養細胞の機能評価”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会研究会講演要旨集 38th 103, 2018. 10. 査読あり
- 7) **茂木克雄**, 五島直樹, 久保泰, 夏目徹, “整列する浮遊粒子-微笑液滴や細胞、生体内小胞のハンドリング技術-”, テクノブリッジフェア 2018 in つくば, つくば産総研 2018. 10. 査読無し
- 8) **茂木 克雄**, 林田 佳, 山本 貴富喜, “Cell culture platform based on microfluidic device for exosome assay”, The 5th JSEV Annual Meeting, 2018. 8. 査読無し
- 9) 安田玲子, **茂木克雄**, 足達俊吾, 安西洋平, 小此木孝仁, 上山忠孝, 片野圭二, 夏目徹, “マイクロチューブポンプならびに微小流路を用いた ANSI/SBS 規格サイズの培養液交換システムの開発”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会研究会講演要旨集, 37th 99, 2018. 5. 査読あり
- 10) **茂木克雄**, 林田佳, 山本貴富喜, “イオン枯渇領域の斥力を用いたエクソソームのハンドリングとその負荷の検証”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会研究会講演要旨集, 36th 41, 2017. 10. 査読あり

- 11) **茂木 克雄**, 林田 佳, 山本 貴富喜, “原子間力顕微鏡を用いた細胞外小胞に対するイオン枯渇領域の斥力影響の評価手法の開発”, マイクロ・ナノ工学シンポジウム 2017(0) PN-32, 2017. 10. 査読あり
- 12) 鈴木 翔, 山本 貴富喜, **茂木 克雄**, “電気力学的操作による細菌細胞の単離と破碎の研究”, マイクロ・ナノ工学シンポジウム 2017(0) PN-100, 2017. 10. 査読あり
- 13) **茂木 克雄**, 林田 佳, 山本 貴富喜, “4 種類のエクソソームを用いたイオン枯渇領域による濃縮効果の検証”, The 4th JSEV Annual Meeting, 2017. 8. 査読無し

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

- 1) 名称：開放空間型の液体操作装置
発明者：**茂木克雄**, 足達俊吾, 井上朋也, 夏目徹
権利者：産業技術総合研究所
種類：特許
番号：特願 2019-031670
出願年：2019 年 2 月 25 日
国内外の別：国内特許
- 2) 名称：液体操作装置
発明者：**茂木克雄**, 足達俊吾, 井上朋也, 夏目徹
権利者：産業技術総合研究所
種類：特許
番号：特願 2018-217609
出願年：2018 年 11 月 20 日
国内外の別：国内特許
- 3) 名称：落とし蓋、クローズドチャンバ及び細胞培養装置
発明者：小此木孝仁, 安田玲子, 安西洋平, 上山忠孝, 片野圭二, 足達俊吾, **茂木克雄**, 夏目徹,
権利者：産業技術総合研究所、株式会社アイカムス・ラボ
種類：特許
番号：特願 2019-001807
出願年：2019 年 1 月 9 日
国内外の別：国内特許

6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。