

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18404

研究課題名(和文) その場診断実現へ向けた細胞外ベシクル裸眼検出・簡易解析用マイクロチップの開発

研究課題名(英文) Development of a microchip for extracellular vesicle naked-eye detection and easy analysis toward point-of-care diagnosis

研究代表者

石原 量 (ISHIHARA, Ryo)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：30633507

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、がんをその場で診断する手法の確立をめざした。がんのバイオマーカーとして、細胞外ベシクル(EV)が着目されているが、その検出手法は煩雑、長時間、高い費用であるためEVを利用したがんのその場診断は実現していない。我々は、これまでもEVを検出する表面機能化自律駆動マイクロチップの開発をしてきた。この助成期間でそのマイクロチップを更に発展させ以下の成果を得た。(1) マイクロチップ作製時の様々な知見を得ることができた。(2) 体内に存在する濃度程度のEVを高感度で検出することに成功した。助成期間を延長し、(3)生理食塩水中だけでなく、実際に血清中に存在するEVの検出にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請では、より実用化へ近づけるために、申請者の開発した表面機能化自律駆動マイクロチップを用いた細胞外ベシクル(EV)の検出を“裸眼”検出へと発展させることをめざした。また、細胞外ベシクルの解析手法は現在未確立であり、ラボレベルで提案されている手法は煩雑であることから、簡易解析も同時にめざした。これらは実現すれば、新規の手法・材料ということで分析化学・材料工学的な価値、疾患の早期発見という医学的な価値に加え、EVを誰もが容易に扱えるようになるためEV研究を前進させることが出来るという観点から生物学的な価値もあると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to develop a microchip that can diagnose cancer by point-of-care like a pregnancy test. Extracellular vesicles (EVs) have been attracted as a biomarker for cancer detection at early stage, but EV-based cancer point-of-care diagnosis has not been realized because the detection technique requires complicated operations, long detection time, and high cost. We have developed the surface-functionalized power-free microchip for EV detection and succeeded in EV detection of several hundred times higher concentration than in vivo. In this grant period, the microchip was further developed, and the following accomplishments were obtained. (1) Various knowledge in the microchip preparation was obtained. (2) We succeeded in detecting EV with high sensitivity. The grant period was extended, and (3) not only in physiological saline but also in serum EV was successfully detected on the microchip.

研究分野：材料工学

キーワード：表面機能化自律駆動マイクロチップ その場診断 バイオマーカー 胞外ベシクル 乳がん UVグラフト重合 血清

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんは2人に1人がかかる脅威の病である。5年生存率は、ステージⅠからⅣになるにつれ、92%から16%まで低下するため、がんの早期発見は非常に重要である。しかし、がんは種類も多く、その検査には数日という時間と数十万単位の金がかかるため、その受診率は高くない。もし短時間で安価に“がんをその場診断”する手法が確立されれば、受診率は向上し、がんの早期発見率が高まると期待される。そこで、本研究では、がんの新規バイオマーカーとして期待されている細胞外ベシクル(EV)、またEV内部に存在するmicroRNAに着目した。EVは細胞が体液中に分泌する小胞で、分泌した細胞の情報を持っていることから、(1)EVを高感度で簡便に検出し、また(2)EVの表面性状を簡便に解析することが出来ればがんのその場診断へつながる。しかし、EVはサイズが小さいこと、体液中の濃度が低いことから分析手法は確立していない。論文レベルで報告されている手法は、概して高価な装置、長い時間を必要とし作業にも熟練を要するため、その場診断には適さず、新規分析手法が必要である。

近年、申請者は新規分析手法確立のために持ち運び可能な「表面機能化自律駆動マイクロチップ」を開発してきた。表面機能化自律駆動マイクロチップは、マイクロチップであるために検出に必要な試料体積は1µLと少量で、検出に必要な時間も約20分と迅速である。さらに自律駆動であるためにポンプを必要とせず、望みの機能を容易に付与できることから、その場診断実現へ向けた有望な材料である。申請者はこれまでに、一定の条件下において、バイオマーカーであるmicroRNAおよびEVの検出に成功し、それぞれ論文を発表している(Ishihara et al., Anal. Sci., 2017, Ishihara et al., ACS Omega, 2017)。しかしながら、がんのその場診断確立のためには、表面機能化自律駆動マイクロチップの検出感度、解析手法、そして蛍光検出手法に課題が残されていた。

### 2. 研究の目的

本研究は、がんをはじめとするさまざまな疾患の新規その場診断法を確立するために、申請者が近年開発した、持ち運び可能なポリジメチルシロキサン製の自律駆動マイクロ流体チップの内表面に放射線グラフト重合法を利用して機能化した「表面機能化自律駆動マイクロチップ」を用いて、バイオマーカーを高感度、複数同時、および裸眼で検出する手法の確立をめざすものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 表面機能化自律駆動マイクロチップの作製

ポンプ不要の自律駆動マイクロチップの流路内表面に光開始剤(ベンゾフェノン)を担持し、流路内にモノマー(2-aminoethyl methacrylate)を満たした後に、UV光(365nm, 100W)を10分間照射することによって流路内表面を化学修飾した(UVグラフト重合法)。その後、EV捕捉のための抗体を固定し、脱気することで表面機能化自律駆動マイクロチップを得た。作製に際し、EV検出に適した高分子界面を設計するために、以下のパラメータの最適化した。光開始剤の濃度：グラフト鎖の密度制御、モノマーの濃度：グラフト鎖の密度および長さを制御、抗体の濃度：グラフト鎖に固定される抗体の固定量を制御

## (2) ビオチン化 DNA 修飾金ナノ粒子の調製

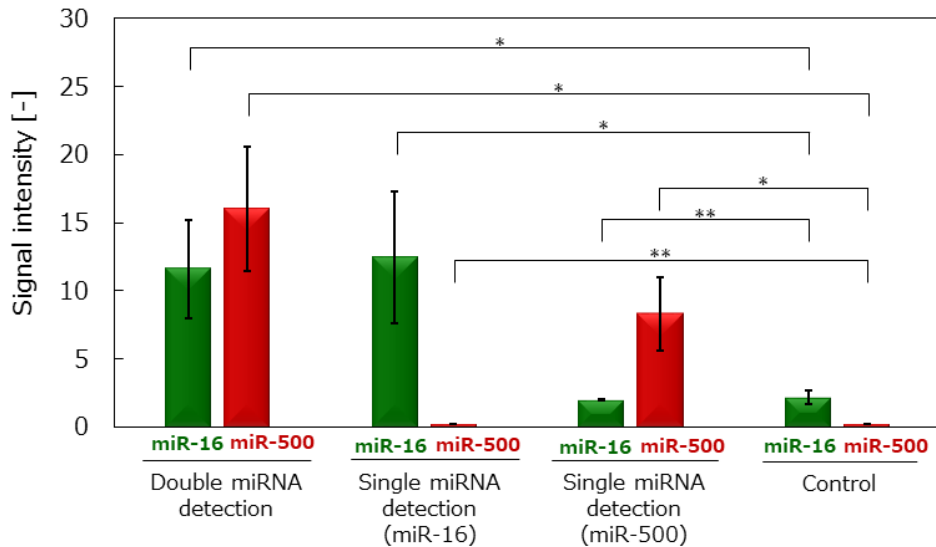
金ナノ粒子表面に、ビオチン化された DNA を高密度修飾することによって、増幅試薬としてのビオチン化 DNA 修飾金ナノ粒子を作製した。5 20 nm の金ナノ粒子に対して、末端にチオール(SH)基、反対側の末端にビオチン修飾してある DNA を、DNA 末端の SH と金の配位結合を介して固定した。金ナノ粒子の凝集に関する実験をチューブ内で行った。

## (3) 表面機能化自律駆動マイクロチップ上での EV 検出

EV を、ブロッキング、サンドイッチ構造形成、層流樹状増幅の 3 ステップによって検出した。ブロッキングには実用を見据え血清を用いた。EV は乳がん細胞および乳腺上皮細胞培養上清から超遠心法によって精製したものをを用いた。増幅試薬には蛍光標識されたアビジンおよびビオチン化された抗ストレプトアビジンを用いた。検出に必要であったサンプル体積は 1.0  $\mu\text{L}$ 、検出時間は 20 分以内であった。

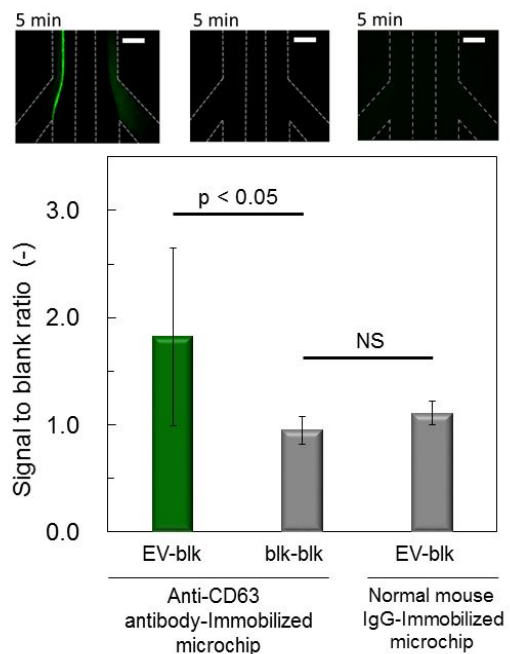
## 研究成果

- (1) ポリジメチルシロキサン製のマイクロチップのマイクロ流路内表面における UV グラフト重合に関する基礎的な知見(重合の条件や、付与したグラフト高分子鎖の安定性など)を得ることができ、本成果は 2019 MRS Fall Meeting という国際学会において口頭発表した。また、UV グラフト重合法を利用して固定マイクロ流路内表面に付与したポリアミノエチルメタクリレート鎖が存在することを、全反射フーリエ変換赤外分光光度計を用いて実証することができ、本成果の一部は、*Reactive and Functional Polymers* に論文発表した。
- (2) ポリジメチルシロキサン製のマイクロチップの流路内表面に、UV グラフト重合法を利用して高分子グラフト鎖を付与する際の基礎的な知見である、開始剤の濃度、モノマー濃度、UV ライトの照射時間などの種々の実験条件が、グラフトされた高分子鎖の密度や保存安定性などに与える影響に関する成果を第 69 回高分子学会年次大会において発表した。
- (3) 電子線グラフト重合法を利用して作製した表面機能化自律駆動マイクロチップを用いて、バイオマーカーにひとつであるマイクロ RNA の“異なる位置(異なる流路)による”複数同時検出、および同一流路内における“異なる色(異なる蛍光分子)による”複数同時検出に成功している。これらの成果は、第 40 回日本バイオマテリアル学会大会、および第 35 回高分子学会千葉地域活動若手セミナーにおいて学会発表をし、2021 年に *Analytical Science* 誌へ論文発表した。今後の課題として、検出感度の向上があり、今後も研究を進めてゆく予定である。



(4) 裸眼検出に関しては、裸眼検出に利用するための DNA 修飾金ナノ粒子の調製に成功し、チューブ内においては金ナノ粒子が凝集し、色による変化が裸眼で確認できた。一方で、金ナノ粒子の保存安定性が悪く、安定した金ナノ粒子の調製が課題として残った。

(5) 固定を確認した高分子鎖に、バイオマーカーの一つである細胞外ベシクルを捕捉する抗体を固定し、蛍光を用いて細胞外ベシクルの選択的かつ高感度な検出に成功した。その際の検出下限値は 35 pmol/L となり、これは血液中に存在している全細胞外ベシクルの濃度 200 1000 pmol/L よりも低い値であった。この成果の一部は、Reactive and Functional Polymers に論文発表した。



(6) 作製したマイクロチップを利用して、2 マイクロリットルの試料溶液を用いて 20 分で、乳がん細胞由来の細胞外ベシクルと乳腺上皮細胞(正常細胞)由来の細胞外ベシクルを区別することに成功した。細胞外ベシクルの検出に関する成果の一部は、GPS-K2019 という国際学会においてポスター発表した。

(7) 期間延長の目的であった、より実際の系に近い、血清中に存在するがんのバイオマーカーである細胞外ベシクル(乳がん細胞由来)の検出に成功した。しかし、実際にがん患者の血液に本マイクロチップを適用するには検出感度の向上が必要であることも分かった。本研究課題は今年度で終了となるが、今後もバイオマーカーの裸眼検出および高感度検出をめざし研究を進めてゆく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 R. Ishihara, A. Katagiri, T. Nakajima, R. Matsui, S. Komatsu, K. Hosokawa, M. Maeda, Y. Tomooka, A. Kikuchi	4. 巻 142
2. 論文標題 Design of a Surface-Functionalized Power-Free Microchip for Extracellular Vesicle Detection Utilizing UV grafting	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reactive and Functional Polymers	6. 最初と最後の頁 183-188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.06.017	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 石原 量	4. 巻 75
2. 論文標題 放射線グラフト重合法を利用した標的物質捕捉のための材料設計	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 KOBUNSHI RONBUNSHU	6. 最初と最後の頁 456-467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1295/koron.2018-0015	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 R. Ishihara, Y. Yamaguchi, K. Tanabe, Y. Makino, K. Nishio	4. 巻 226
2. 論文標題 Preparation of Pt/WO <sub>3</sub> -Coated Polydimethylsiloxane Membrane for Transparent/Flexible Hydrogen Gas Sensors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials Chemistry and Physics	6. 最初と最後の頁 226-229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.matchemphys.2018.12.052	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 R. Ishihara, K. Tanabe, S. Inomata, R. Matsui, R. Kitane, K. Hosokawa, M. Maeda, A. Kikuchi	4. 巻 59
2. 論文標題 Fabrication of Storable Surface-Functionalized Power-Free Microfluidic Chip for Sensitive MicroRNA Detection Utilizing UV Grafting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Industrial & Engineering Chemistry Research	6. 最初と最後の頁 10464-10468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.iecr.0c00620	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 R. Ishihara, R. Kitane, Y. Akiyama, S. Inomata, K. Hosokawa, M. Maeda, A. Kikuchi	4. 巻 37
2. 論文標題 Multiplex MicroRNA Detection on a Surface-Functionalized Power-Free Microfluidic Chip	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 747-751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.20SCP17	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16件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 R. Matsui, R. Ishihara, A. Katagiri, T. Nakajima, K. Hosokawa, M. Maeda, A. Kikuchi
2. 発表標題 Design of a Microchip for Cancer Cell-Derived Extracellular Vesicle Detection toward Cancer Point-of-Care Diagnosis
3. 学会等名 2nd Glowing Polymer Symposium in KANTO (GPS-K2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Kitane, R. Ishihara, Y. Akiyama, K. Hosokawa, M. Maeda, A. Kikuchi
2. 発表標題 Development of a Surface-Functionalized Power-Free Microchip for microRNAs Multiplex Detection
3. 学会等名 2nd Glowing Polymer Symposium in KANTO (GPS-K2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Ishihara, Y. Yamaguchi, K. Tanabe, Y. Makino, K. Nishio
2. 発表標題 Fabrication of Pt/WO <sub>3</sub> -Coated Polydimethylsiloxane Membrane for Transparent/Flexible Hydrogen Gas Monitoring
3. 学会等名 2019 MRS Fall Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原 量
2. 発表標題 バイオマーカーの高感度簡易検出を可能とする表面機能化自律駆動マイクロチップの開発
3. 学会等名 千葉大学工学部講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原 量
2. 発表標題 がんのその場診断をめざした表面機能化自律駆動マイクロチップの開発
3. 学会等名 順天堂大学浦安病院 TVカンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原 量, 片桐明日香, 中島忠章, 細川和生, 前田瑞夫, 友岡康弘, 菊池明彦
2. 発表標題 細胞外ベシクル高感度検出のための表面機能化自律駆動マイクロチップの設計
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 R. Ishihara, T. Nakajima, R. Matsui, A. Katagiri, K. Hosokawa, M. Maeda, Y. Tomooka, A. Kikuchi
2. 発表標題 Design of a Microchip for Extracellular Vesicle Detection toward Point-of-Care Testing
3. 学会等名 1st Glowing Polymer Symposium in KANTO (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井峻, 石原 量, 片桐明日香, 中島忠章, 細川和生, 前田瑞夫, 友岡康弘, 菊池明彦
2. 発表標題 がん特異的な細胞外ベシクルの検出をめざしたマイクロチップの作製
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会, 愛知・名古屋国際会議場
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片桐明日香, 石原量, 中島忠章, 細川和生, 前田瑞夫, 友岡康弘, 菊池明彦
2. 発表標題 細胞外ベシクルの簡易・高感度検出のためのマイクロチップおよび検出プロトコルの検討
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井峻, 石原 量, 中島忠章, 片桐明日香, 細川和生, 前田瑞夫, 友岡康弘, 菊池明彦
2. 発表標題 表面機能化自律駆動マイクロチップを用いたがん細胞由来細胞外ベシクルの検出
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 喜種棕一, 石原 量, 秋山好嗣, 猪股祥子, 細川和生, 前田瑞夫, 菊池明彦
2. 発表標題 表面機能化自律駆動マイクロチップを用いたmicroRNAの複数同時検出
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 S. INOMATA, R. ISHIHARA, K. HOSOKAWA, M. MAEDA, and A. KIKUCHI
2. 発表標題 Effect of MicroRNA Supply to Functionalized Surface of Power-free Microchip on Detection Signal Intensity
3. 学会等名 第28回日本MRS年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井峻, 石原量, 中島忠章, 片桐明日香, 細川和生, 前田瑞夫, 友岡康弘, 菊池明彦
2. 発表標題 がん細胞由来細胞外ベイクルの検出をめざしたマイクロチップの作製
3. 学会等名 第36回高分子学会千葉地域活動若手セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 喜種棕一, 石原量, 秋山好嗣, 猪股祥子, 細川和生, 前田瑞夫, 菊池明彦
2. 発表標題 がんのその場検査のためのmicroRNA複数同時検出用マイクロチップの作製
3. 学会等名 第36回高分子学会千葉地域活動若手セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Ishihara, Y. Yamaguchi, K. Tanabe, Y. Makino, K. Nishio
2. 発表標題 Fabrication of Pt/WO <sub>3</sub> -Polydimethylsiloxane Hybrid Membrane for Hydrogen Gas Sensor
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原 量, 坂井奈央, 中島忠章, 松井峻, 志村絵理, 馬場猛
2. 発表標題 細胞外ベシクル検出のための部分グラフト型表面機能化自律駆動マイクロチップの作製
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 石原量, 中島忠章 他31名	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 216
3. 書名 「早期発見・予防に向けた次世代がん検査技術の最前線」 Frontier of Next-generation Cancer Testing Technology for Detection and Response	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	内野 斐隆 (UCHINO Yoshitaka)		
研究協力者	田辺 貫太 (TANABE Kanta)		
研究協力者	片桐 明日香 (KATAGIRI Asuka)		

## 6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	猪股 祥子  (INOMATA Shoko)		
研究協力者	松井 峻  (MATSUI Ryo)		
研究協力者	喜種 棕一  (KITANE Ryoichi)		
研究協力者	牧野 善大  (MAKINO Yoshihiro)		
研究協力者	山口 祐貴  (YAMAGUCHI Yuki)		
連携研究者	菊池 明彦  (KIKUCHI Akihiko)  (40266820)	東京理科大学・先進工学部マテリアル創成工学科・教授   (32660)	
連携研究者	中島 忠章  (NAKAJIMA Tadaaki)  (40631213)	横浜市立大学・理学部・助教   (22701)	
連携研究者	前田 瑞夫  (MAEDA Mizuo)  (10165657)	理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員   (82401)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	細川 和生  (HOSOKAWA Kazuo)  (00373366)	理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員   (82401)	
連携研究者	西尾 圭史  (NISHIO Keishi)  (90307710)	東京理科大学・先進工学部マテリアル創成工学科・教授   (32660)	
連携研究者	秋山 好嗣  (AKIYAMA Yoshitsugu)  (40640842)	東京理科大学・教養教育研究院葛飾キャンパス教養部・准教授   (32660)	
連携研究者	小松 周平  (KOMATSU Shuuhei)  (60843844)	東京理科大学・先進工学部マテリアル創成工学科・助教   (32660)	
連携研究者	友岡 康弘  (TOMOOKA Yasuhiro)  (10197949)	東京理科大学・基礎工学部・教授   (32660)	

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

## 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関