

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12697

研究課題名(和文) その場診断実現のためのバイオマーカー高感度裸眼検出手法の開発

研究課題名(英文) Development of sensitive and naked-eye biomarker detection toward cancer point-of-care diagnosis

研究代表者

石原 量 (ISHIHARA, Ryo)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30633507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研では、がんをはじめとする様々な重篤な疾患の“その場診断手法”を確立するために、バイオマーカーとして期待されている細胞外ベシクルやmicroRNAの簡易高感度検出をめざした。申請者が開発してきたポータブルな「表面機能化自律駆動マイクロチップ」のマイクロ流路の一部を狭窄させる工夫、およびマイクロ流路の内表面の化学修飾を工夫することによって、より効率よくバイオマーカーを検出できるようになり、検出感度を2-3桁向上させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた、細胞外ベシクルの検出感度は唾液や血液といった生体サンプルで実現することができればがん診断の実現が期待できる値である。しかし生体サンプル由来の夾雑物の影響で感度が低下してしまうことも考えられ、また血清など生体サンプルを流すと一定の頻度でマイクロ流路が詰まってしまうという課題が残っている。今後これらの課題を解決し、さまざまな疾患をその場診断できる手法を確立したい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish a point-of-care diagnostic method for various severe diseases, including cancer, by developing a simple and highly sensitive detection method for extracellular vesicles and microRNAs, which are anticipated as biomarkers. By incorporating constricted sections within the microchannels and chemically modifying the inner surfaces of the portable "surface-functionalized power-free microchip" developed by the applicant, we achieved more efficient biomarker detection. Consequently, we succeeded in improving the detection sensitivity by 2 to 3 orders of magnitude.

研究分野：バイオマテリアル

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

## 1. 研究開始当初の背景

がんは2人に1人がかかる重篤な疾患である。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円単位の費用がかかるため、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。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)や microRNA(miRNA)に着目した。バイオマーカーを高感度で簡便に検出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 や miRNA 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。

こういった背景を受け、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(SF-PF microchip)」を開発してきた(Ishihara et al., Anal. Sci., 2017, Ishihara et al., ACS Omega, 2017)。SF-PF microchip 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1  $\mu$ L 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。しかしながら、がんのその場診断確立のためには、SF-PF microchip には、検出に蛍光を利用しており、検出感度が低いという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様々な重篤な疾患の“その場診断手法”を確立するために、申請者が開発している、持ち運び可能な「表面機能化自律駆動マイクロチップ」を改良し、バイオマーカーの裸眼および高感度検出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(365 nm, 100 W)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、miRNA捕捉のためにはDNA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。EVの非特異的吸着の抑制のためには、部分UVグラフト重合法を適用してpoly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)(PMPC)鎖を流路内表面にグラフトすることによって実現した。開始剤濃度、モノマー濃度、抗体およびDNA濃度などの実験条件は最適化した。

## (2) 表面機能化自律駆動マイクロチップ上での EV 検出

EV および miRNA 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 EV では血清を用いた。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。miRNA はがんのバイオマーカーとして報告されている配列を依頼合成し用いた。蛍光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 1-2  $\mu\text{L}$ 、検出時間は 20 分程度であった。

## 4. 研究成果

- (1) 表面機能化自律駆動マイクロチップの素材である PDMS の特徴を知るために、その特徴の一つであるガス透過性を利用して水素センサーを開発し Membranes 誌に発表した。
- (2) がんのバイオマーカーの一つである EV の高感度検出を可能とする SF-PF microchip の作製をめざした。流路の一部に狭窄した部分を持つ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の UV グラフト重合し、抗体を固定することによって血清中の細胞外ベシクルを検出することができた。この成果は The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2021) において発表した。
- (3) 細胞外ベシクルのさらなる高感度検出をめざし、上記の表面機能化自律駆動マイクロチップをさらに改良した。流路の一部に狭窄した部分を持つ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の UV グラフト重合する部位の制御方法を確立し、検出部位に到達するまでの部分には非特異吸着を抑制するグラフト鎖を成長させ、検出部位には細胞外ベシクルを捕捉するための抗体を固定するためのグラフト鎖を成長させた。これらによって、検出部位に到達するまでの細胞外ベシクルの損失を抑えることができた。この成果は、第 31 回日本 MRS 年次大会において発表した。
- (4) がんのバイオマーカーの一つである細胞外ベシクルを簡便かつ高感度検出することをめざし表面機能化自律駆動マイクロチップを作製した。より効率よく細胞外ベシクルを捕捉するために、流路の一部に狭窄した部分を持つポリジメチルシロキサン製のマイクロチップを採用し、その狭窄した部分の流路高さを最適化した。さらに、細胞外ベシクルを検出する際の検出プロトコルを最適化した。これら 2 つの改善によって、29 倍検出下限値を小さくすることに成功し、検出下限値は  $6.3 \times 10^{10}$  particles/mL となった (Fig. 1)。これは血液中に存在する全細胞外ベシクルの濃度よりも小さい値である。検出に要したサンプル体積は 2 マイクロリットル、検出に要した時間は 19 分となった。この成果は、Membranes 誌に発表した。

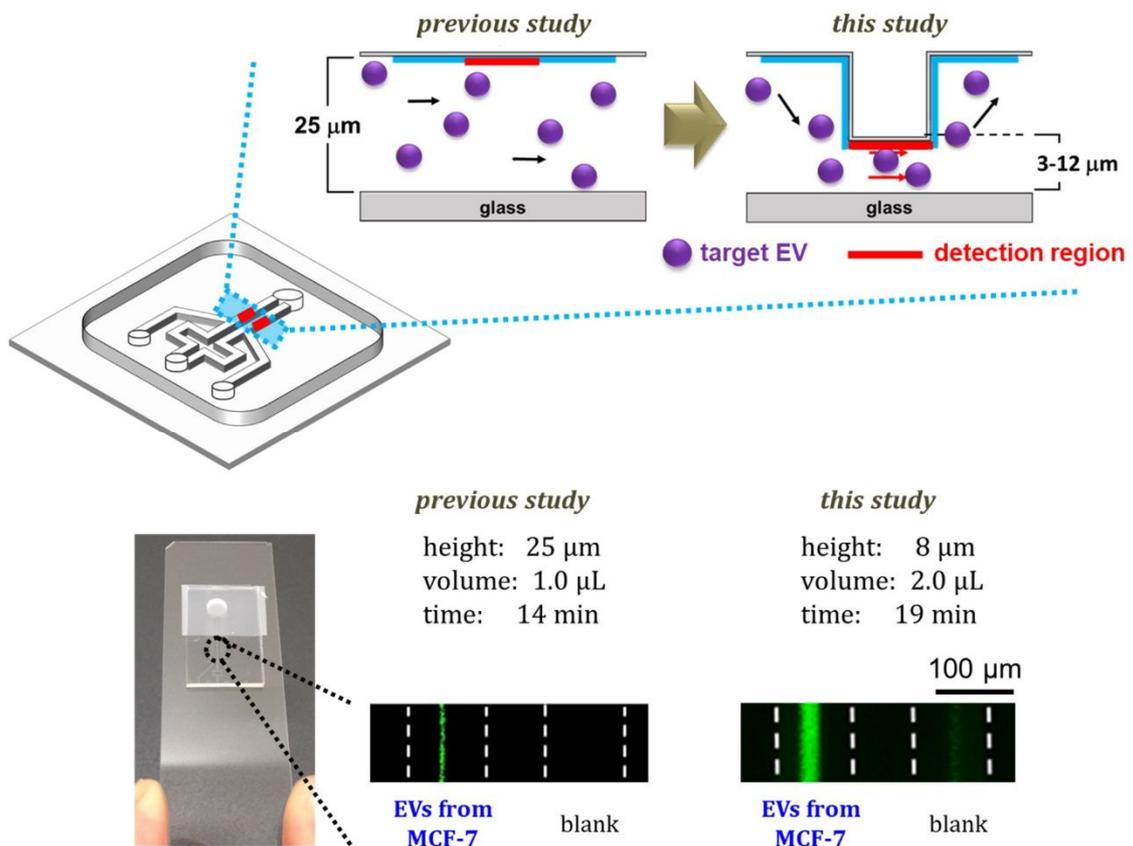


Fig. 1 表面機能化自律駆動マイクロチップにおける「マイクロチャネルの狭窄化」および「検出プロトコルのサンプル体積増加」による EV の検出感度の向上

- (5) 検出部位に到達するまでの細胞外ベシクルの損失を抑えることによって、1桁高い感度で細胞外ベシクルを検出することに成功した。これらの成果は、第32回日本MRS年次大会、The 13th SPSJ International Polymer Conference (IPC2023)において発表した。さらに本成果を発表の一部として、次の2つの招待講演(第7回バイオ工学研究交流会および第72回高分子討論会)においても発表した。

最後に、ここで得られた細胞外ベシクルの検出感度は唾液や血液といった生体サンプルに適用することができればがん診断の実現が期待できる値である。しかし血清などを流すと一定の頻度でマイクロ流路が詰まってしまうという課題がある。また夾雑物の影響で感度が低下してしまうことも考えられる。本課題は今年度で終了となるが、現在採択されている科研費も利用し、今後これらの課題を解決し、さまざまな疾患をその場診断できる手法を確立したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishihara Ryo, Katagiri Asuka, Nakajima Tadaaki, Matsui Ryo, Hosokawa Kazuo, Maeda Mizuo, Tomooka Yasuhiro, Kikuchi Akihiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Design of a Sensitive Extracellular Vesicle Detection Method Utilizing a Surface-Functionalized Power-Free Microchip	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 679 ~ 679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/membranes12070679	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 R. Ishihara, Y. Makino, Y. Yamaguchi, K. Fujimoto, K. Nishio	4. 巻 12
2. 論文標題 Pt/WO3 Nanoparticle-Dispersed Polydimethylsiloxane Membranes for Transparent and Flexible Hydrogen Gas Leakage Sensors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/membranes12030291	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 Ishihara Ryo, Tanabe Kanta, Inomata Shoko, Matsui Ryo, Kitane Ryoichi, Hosokawa Kazuo, Maeda Mizuo, Kikuchi Akihiko	4. 巻 59
2. 論文標題 Fabrication of Storable Surface-Functionalized Power-Free Microfluidic Chip for Sensitive MicroRNA Detection Utilizing Ultraviolet 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 ISHIHARA Ryo, KITANE Ryoichi, AKIYAMA Yoshitsugu, INOMATA Shoko, HOSOKAWA Kazuo, MAEDA Mizuo, KIKUCHI Akihiko	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 石原 量
2. 発表標題 捕捉材料の設計と研究の魅力
3. 学会等名 令和4年度日本分析化学会関東支部若手交流会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石原 量, 緒方蓮, 横張日菜子, 鹿取ことみ, 坂井奈央, 柘植奏羽, 中島忠章, 志村絵理, 馬場猛
2. 発表標題 細胞外ベシクルを高感度検出するための表面機能化自律駆動マイクロチップのデザイン
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石原 量, 緒方蓮, 横張日菜子, 鹿取ことみ, 坂井奈央, 柘植奏羽, 中島忠章, 志村絵理, 馬場猛
2. 発表標題 細胞外ベシクル高感度検出のための部分グラフトおよび部分狭窄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32回日本MRS年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 株木千貴, 森岡和大, 石原量, 守岩友紀子, 柳田顕郎, 東海林敦
2. 発表標題 PDMSスポンジを利用した計測技術の開発
3. 学会等名 第三回生体膜デザインコンファレンス
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石原 量
2. 発表標題 細胞外ベシクルを高感度検出するメソドロジー
3. 学会等名 第四回生体膜デザインコンファレンス
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 R. Ishihara, R. Matsui, T. Nakajima, K. Hosokawa, M. Maeda, A. Kikuchi
2. 発表標題 Design of a Microchip Channel Surface for Breast Cancer Cell-Derived Extracellular Vesicle Detection
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石原 量, 緒方蓮, 坂井奈央, 鹿取ことみ, 廣瀬凜, 三村啓太, 中島忠章, 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および部分狭窄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31回日本MRS年次大会
4. 発表年 2021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

1. 発表者名 石原 量
2. 発表標題 細胞外ベシクルを簡易検出するための表面機能化自律駆動マイクロチップの開発
3. 学会等名 第7回バイオ工学研究交流会，2023年7月29日（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石原 量
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細胞外ベシクルとmicroRNAの検出
3. 学会等名 第72回高分子討論会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石原 量
2. 発表標題 がんのその場検査実現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 千葉県分析化学交流会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 R. Ishihara, H. Yokohari, R. Ogata, K. Katori, N. Sakai, K. Tsuge, T. Nakajima, E. Shimura, and T. Baba
2. 発表標題 Extracellular Vesicle Detection on a Microchip with Partial Grafted and Low-Height Regions toward Cancer Point-of-Care Testing
3. 学会等名 The 13th SPSJ International Polymer Conference (IPC2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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