

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18985

研究課題名(和文) 表面プラズモン共鳴センサーを用いる呼気凝縮液中エクソソーム分析法の開発

研究課題名(英文) Development of analytical method for exosome in exhaled breath condensate using a surface plasmon resonance sensor

研究代表者

中嶋 秀(Nakajima, Hizuru)

東京都立大学・都市環境科学研究科・准教授

研究者番号：10432858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームはヒトの呼気にも含まれていることが報告されている。エクソソームには分泌元の細胞の情報が集約されているので、呼気中のエクソソームを診療所等の臨床現場で簡便に分析できる手法を確立できれば、非侵襲的かつ迅速に癌の診断や進行状況を評価できると考えられる。そこで本研究では、エクソソームと人工生体膜の膜融合現象とSPRセンサーを利用して、エクソソームの膜タンパク質を簡便・迅速に定性・定量する方法を開発した。また、呼気中のエクソソームを分析するための携帯可能な呼気凝縮液サンプラーを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームの膜タンパク質は、一般的にLC-MSやイムノアッセイ法で分析されているが、前処理時に添加した界面活性剤により消化酵素や膜タンパク質の活性が低下するため、定量分析が難しいという問題がある。これに対して、本研究で開発した手法では、界面活性剤を用いずに、エクソソームを含む試料溶液をセンサーチップに滴下するだけで、簡便に定性と定量が可能であるので、学術的に意義のある研究である。また、本手法により呼気を用いて非侵襲的かつ迅速に癌の診断や進行状況を評価できる可能性があるため、社会的にも意義のある研究である。

研究成果の概要(英文)：Exosomes have been reported to be contained in human exhaled breath. Since exosomes contain information on the cells from which they are secreted, it would be possible to non-invasively and rapidly evaluate the diagnosis and progress of cancer if a method could be established to easily analyze exosomes in exhaled breath in clinics. In this study, we developed a simple and rapid method for the qualitative and quantitative analysis of exosomal membrane proteins using the membrane fusion phenomenon between exosomes and artificial biological membrane, and an SPR sensor. We also developed a portable exhaled breath condensate sampler for analyzing exosomes in exhaled breath.

研究分野：分析化学

キーワード：表面プラズモン共鳴センサー エクソソーム 人工生体膜 膜融合 呼気凝縮液

### 1. 研究開始当初の背景

癌細胞から分泌されるエクソソームには、分泌元の癌細胞の情報が集約されているので、癌細胞由来のエクソソーム膜タンパク質を高感度かつ網羅的に計測する技術を開発することにより、社会から強く要求されている癌の早期発見と、癌の進行状況に合わせて治療方針を決定する個別化医療を実現できると考えられる。しかし、難溶性の生体高分子である膜タンパク質を高感度かつ網羅的に分析することは極めて困難であり、分析化学の大きな課題となっている。これは、膜タンパク質が難溶性であることに加えて、膜タンパク質が脂質二分子膜に表在もしくは内在しているためである。

### 2. 研究の目的

近年、エクソソームがヒトの呼気にも含まれていることが報告された (J. Geelen et. al., *J. Allergy Clin Immunol.*, **132**, 219-222, 2013., B. Sastre et. al., *Frontiers in Immunology*, **8**, 1-14, 2017.)。このことから、呼気中のエクソソームを診療所等の臨床現場で簡便に分析できる手法を確立できれば、非侵襲的かつ迅速に癌の診断や進行状況を評価できると考えられる。そこで本研究では、上記に挙げた膜タンパク質分析の問題点を解決し、呼気に含まれるエクソソームを現場で、誰もが、簡便、迅速かつ高感度に測定できる革新的な分析技術を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、申請者がこれまでに開発してきた小型の表面プラズモン共鳴 (SPR) センサと、研究分担者の東海林准教授が見出したエクソソームと人工生体膜の膜融合現象 (*Biosensors and Bioelectronics*, **150**, 111918, 2020.) を利用して、エクソソームの膜タンパク質を高感度かつ網羅的に計測することが可能な新規分析法を開発した。また、呼気中に含まれるエクソソームを分析するために、手嶋教授と共同で呼気凝縮液サンプラーを開発した。

### 4. 研究成果

#### (1) マルチチャンネル SPR センサの開発

光源から放出された光を平凸レンズで平行光線にした後、シリンドリカルレンズを用いてその光線を 10° の角度幅を持った状態でプリズム上のセンサチップに線焦点を結ぶように入射し、その反射光を CMOS イメージセンサーで検出するマルチチャンネル SPR センサ (図 1) を開発した。

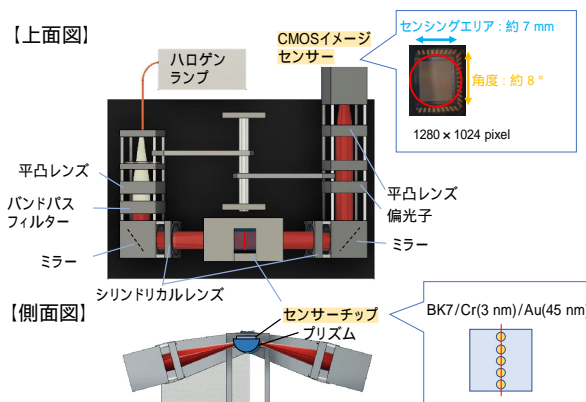


図1 SPRセンサーの光学系

#### (2) SPR センサを用いるエクソソーム膜タンパク質の定性・定量法の開発

本研究では、エクソソーム由来の複数の膜タンパク質を同時に測定するために、上記 SPR センサーチップ表面に人工生体膜をアレイ化し、人工生体膜のスポットにエクソソームを膜融合させるエクソソーム膜アレイを構築した (図 2)。これにより、測定対象となる膜タンパク質の抗体を各スポットに加えるだけで、膜タンパク質の量に応じて SPR シグナルが変化するため、定性・定量分析が可能になる。

まず、人工生体膜チップの作製方法について検討した。SPR センサーチップ (BK7/Ti3nm/Au45nm) の表面に、スペーサー分子である benzylidysulphide-TEG-OH とテザー分子である benzylidysulphide-PEG-phytanyl を用いて自己組織化膜を形成した。次に、脂質溶液 (EggPC: コレス

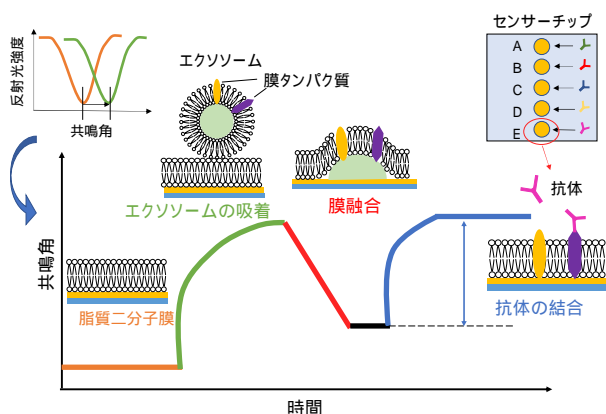


図2 測定原理

テロール)と 16 mM フェリシアン化カリウムを含む 150 mM KCl 溶液(pH 7.4)を添加し、センサーチップ表面に人工生体膜(脂質二分子膜)を形成した(図3)。センサーチップの金薄膜上に人工生体膜が形成されていることを確認するために、電気化学 SPR センサー(作用電極:センサーチップの金薄膜, 対極:Pt, 参照電極:Ag/AgCl)を用いてサイクリックボルタメトリー測定を行った。その結果、脂質溶液添加前はフェリシアン化カリウムの酸化還元に伴う電流値の変化が観測されたが、脂質溶液添加後は電流が全く流れないことがわかった(図4)。これは、人工生体膜が絶縁体であるためと推測され、これらの結果から、SPR センサーチップの金薄膜表面に人工生体膜が形成されていることが確認された。

次に、エクソソームと人工生体膜の膜融合について検討した。人工生体膜を形成したセンサーチップに 1 価の陽イオンチャンネルを形成するグラミシジン A を含む溶液と HEK293 エクソソームを含む溶液を順次添加したときの SPR 応答とイオン電流の変化を同時に計測した。人工生体膜にエクソソームが膜融合すると、融合時にできる脂質膜のひずみにグラミシジンが入り込み、膜内のチャンネル数が増加する。これにより電流値が増加すると予想されるが、膜融合の際に使用する溶液の pH が 7.4 のときは電流がほとんど流れず、膜融合は起こらないことがわかった(図5)。しかし、溶液の pH を 5.5 に変更すると、フェリシアン化カリウムの酸化還元ピークが観測され、電流値も時間の経過とともに増加した。このことから、pH が 5.5 の条件では、エクソソームと人工生体膜の膜融合が起こっていることが確認された。また、SPR 測定においても、エクソソームを添加すると共鳴角が増加したことから、エクソソームが人工生体膜に融合していることが確認された。

上記のエクソソームを膜融合させたセンサーチップに、エクソソームの膜に存在するタンパク質(CD63)に対する抗体を添加したところ、共鳴角が増加することが確認された。以上の結果から、本研究で開発した手法により、エクソソームの膜タンパク質を定性・定量できることが確認された。

### (3)呼気のサンプリング・濃縮技術と希釈度補正法の開発

ポリプロピレン製シリンジにアルミホイルを巻き付け、これを $-15^{\circ}\text{C}$ に冷却後、ストローで息を吹き込むことにより呼気凝縮液(EBC)を得る携帯可能な呼気凝縮液サンプラーを作製した(図6)。このサンプラーにより、約 10 分間の呼吸により約 1.5 mL の EBC を採取することが可能であった。

以上のように、本研究ではエクソソームと人工生体膜の膜融合現象と SPR センサーを利用したエクソソーム膜タンパク質の定性・定量法および携帯可能な呼気凝縮液サンプラーを開発した。本手法を用いた呼気凝縮液中エクソソームの分析による癌診断の研究の発展が期待される。

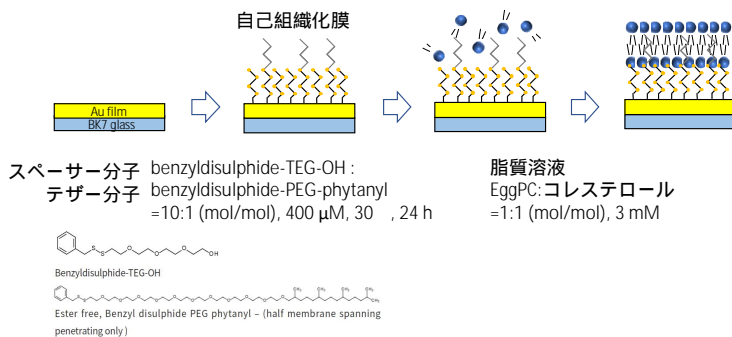


図3 人工生体膜チップの作製方法

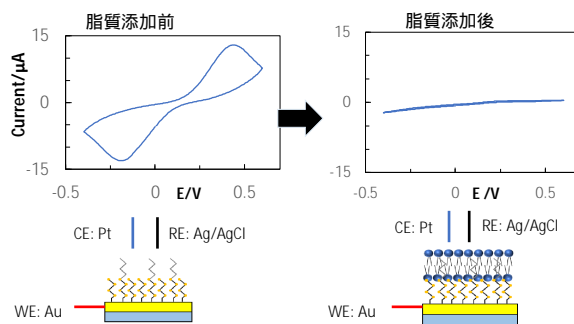


図4 脂質溶液添加前後のフェリシアン化カリウムのサイクリックボルタモグラム

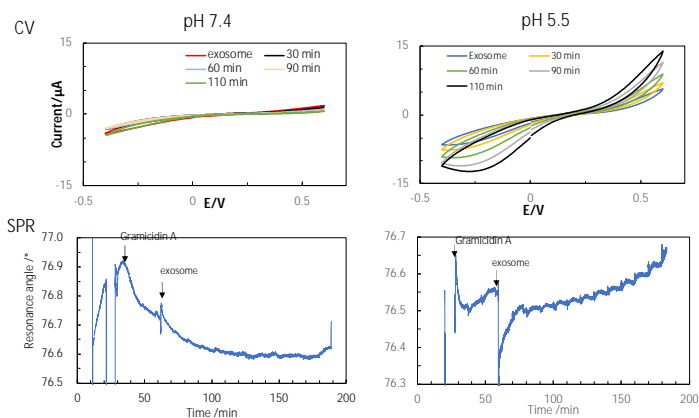


図5 エクソソーム添加後のサイクリックボルタモグラムおよびSPRセンサー応答

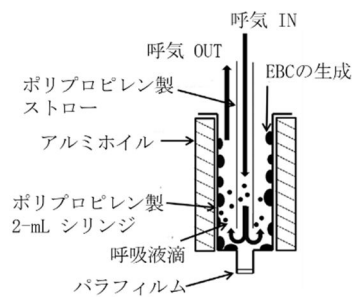


図6 呼気凝縮液サンプラー

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計23件（うち査読付論文 23件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 森岡和夫, 中嶋秀	4. 巻 69
2. 論文標題 オンサイトでの定量分析を指向した小型分析装置	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学と教育	6. 最初と最後の頁 210-213
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 -

1. 著者名 Shoji Atsushi, Nakajima Miyu, Morioka Kazuhiro, Fujimori Eiji, Umemura Tomonari, Yanagida Akio, Hemmi Akihito, Uchiyama Katsumi, Nakajima Hizuru	4. 巻 240
2. 論文標題 Development of a surface plasmon resonance sensor using an optical fiber prepared by electroless displacement gold plating and its application to immunoassay	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Talanta	6. 最初と最後の頁 123162 ~ 123162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.talanta.2021.123162	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25件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 東海林敦
2. 発表標題 エクソソームと人工生体膜の膜融合
3. 学会等名 プラズマ分光分析研究会 第113回講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東海林敦
2. 発表標題 生体膜デザインが拓くバイオ分析科学～人工細胞へのエクソソーム膜融合現象
3. 学会等名 令和3年度生体膜デザインコンファレンス ミニ研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東海林敦, 森田健司, 田路真弥, 守岩友紀子, 森岡和大, 柳田頭郎
2. 発表標題 生細胞から分泌されるエクソソームのリアルタイムモニタリングを可能とする光ファイバー表面プラズモン共鳴センサーの開発
3. 学会等名 第33回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤真奈, 東海林敦, 森岡和大, 辺見彰秀, 山本将史, 中嶋秀
2. 発表標題 エクソソーム膜タンパク質計測のための人工生体膜チップの作製方法の検討
3. 学会等名 第3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 伊藤真奈, 東海林敦, 森岡和大, 辺見彰秀, 山本将史, 中嶋秀
2. 発表標題 脂質二分子膜に包埋させたグラミシジンのマルチチャネル活性評価
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小山大輝, 伊藤真奈, 東海林敦, 森岡和大, 辺見彰秀, 山本将史, 中嶋秀
2. 発表標題 2次元SPRセンサーを用いるエクソソーム分析法の開発
3. 学会等名 第4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 石塚百夏, 高須蒼生, 村上博哉, 手嶋紀雄, 江坂幸宏
2. 発表標題 LC-MS/MSを用いた呼気凝集液(EBC)中のアミノ酸の高精度定量分析
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会
4. 発表年 2022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
研究分担者	手嶋 紀雄  (Teshima Norio)  (30292501)	愛知工業大学・工学部・教授    (33903)	
研究分担者	東海林 敦  (Shoji Atsushi)  (90459850)	東京薬科大学・薬学部・准教授    (32659)	

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