

研究報告書

「がん転移メカニズム解明にむけた人工超空間の創製」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月 ~ 2019年3月

研究者: 安井 隆雄

1. 研究のねらい

本研究では、微細流路中の「狙った空間位置」に「狙った材料・表面」で「狙った大きさ・空間空隙」を持つ人工超空間の創製技術を駆使し、がん細胞から正常細胞への輸送されるエクソソーム解析を達成する。エクソソームは、細胞が分泌する直径 40-200 nm の脂質二重膜で覆われたエンドソーム由来の小胞顆粒であり、生命の微調整役として機能する microRNA が内包されていることより、がん細胞由来のエクソソームのがん化因子としての役割が注目されている。エクソソームを解析するには、血液・尿・唾液などの体液中に含まれるエクソソームを効率良く解析する必要があるが、体液中エクソソームの濃度は 0.01~1vol%と極めて低濃度であるために、超遠心分離・市販試薬を用いた既存の回収手法では、効率的なエクソソーム回収は未だ達成されていない。本研究の基盤となる技術は、微細加工技術とボトムアップ技術を組み合わせ、解析対象に応じたナノ構造体の位置・表面・サイズ・空隙を制御可能な任意空間(人工超空間)作製法であるが、この手法を用いて数百 nm のナノ粒子を捕捉する空間作製は未開拓の領域であった。それは、溶液中のナノ粒子への重力影響の少なさによる粒子回収の困難さに起因している。そのため、上述のような遠心力や凝集による重力影響増加を基盤とした回収方法が中心に考えられており、回収効率・解析効率の低さが本質的な課題であった。この課題を克服し、より実用的で一般性のある回収・解析法を確立するために、人工超空間ライブラリから候補となる組み合わせ探索や新たな表面の創出など人工超空間の多様化を図る。また、エクソソームの表面状態を解析することで、回収に有効となりそうな静電相互作用や抗原抗体反応など相互作用力を生み出す空間の作製も実現する。新奇に創製する人工超空間を用いて、がん細胞から正常細胞への輸送されるがん化因子であるエクソソームを解析し、エクソソームによるがん転移メカニズム解明を実現する。がん転移を促すエクソソームを体液中より回収・解析することで、新奇がん診断法の確立も目指す。さらに、スクリーニングした人工超空間を用いた血中がん化因子エクソソームの透析によるがん転移阻害へと展開する。エクソソーム解析技術開発にとどまることなく、人工超空間が切り拓く新たな生体分子の分析化学を学術的にも確立させることも重視する。

2. 研究成果

(1)概要

エクソソームの回収・解析に適した人工超空間を創出し、がん化因子エクソソームの解析に成功した。エクソソームを空間に捕捉するための戦略として、酸化亜鉛ナノワイヤを枠組みとしたナノワイヤ空間を設計し、溶液中における酸化亜鉛とエクソソームの表面電荷を利用したエクソソームの高効率捕捉を達成した(論文 1)。尿中に 0.01vol%で存在するエクソソームを静電相互作用により 99%以上回収できるようになった。また、尿中のエクソソームを捕捉したナノワイヤ

空間にエクソソーム破碎液を導入し、in-situ で内包 microRNA 抽出を行なったところ、1000 種類を超える microRNA 種が尿中に存在することを世界で初めて明らかとした(人間の microRNA は 2000 種類以上の存在が確認されているのに対し、従来技術では 300 種類程度しか検出できなかった)。さらに、非がんドナーの尿と 5 種のがん(肺がん・膵がん・肝がん・膀胱がん・前立腺がん)ドナーの尿に含まれる microRNA を比較解析することで、非がん/がんドナーで特異的に発現している microRNA を特定した。本成果に基づいたベンチャー企業 Icaria 株式会社を共同創立し、尿中 microRNA を用いた早期がん診断技術の普及を進めている。

尿中のエクソソームの表面状態解析手法として、ブリッジ回路によるイオン電流計測法を開発し、夾雑物が多い尿サンプルに対応した幅広いサイズ検出を達成した(論文 2)。開発した電流計測系では、平衡状態を作った電気回路(ブリッジ回路)の中でマイクロアンペア(μA)のバックグラウンド電流をピコアンペア(pA)に抑えこみ、シグナル電流のみを信号として得ることに成功した。検出部体積に対して $1/10^4$ 以下の体積持つ直径 200 nm の微小粒子(エクソソームのモデルサンプル)の検出に成功した。また、本検出系に顕微鏡観察機能を付与し(論文 3)、細胞片やエクソソームが含まれる尿サンプルより、エクソソームを効率良く識別可能であること概念実証を行なった。

人工超空間が切り拓く新たな生体分子の分析手法として、ナノワイヤ空間への自己組織化膜による機能化と生体分子認識や(論文 4)、人工超空間による新奇無標識検出系の構築を確立した(論文 5)。

(2) 詳細

研究テーマ A「エクソソーム解析に適した人工超空間の創出とがん化因子エクソソームの解析」(論文 1)

1 mL の尿サンプルからエクソソーム回収と内包される microRNA の in-situ 抽出(図 1a)を目標とし、溶液の流れに対するナノワイヤ空間の機械的強度を上昇させるため、シリコーンゴム(PDMS)に酸化亜鉛ナノワイヤを打ち込みしたアンカードナノワイヤデバイスの作製を行なった(図 1b)。酸化亜鉛ナノワイヤは、シリコン基板に成膜された酸化クロム層を成長核として水熱合成により自己組織化成長させた。その後、未硬化の PDMS を導入し、硬化、剥離することで、ナノワイヤを PDMS に埋め込んだ。埋め込まれたナノワイヤを成長核として、再び、ナノワイヤの水熱合成成長を行なって、アンカードナノワイヤとした。最後に、混合流を引き起こす herringbone 構造(への字型の構造)をもった PDMS 流路を貼り合わせ、PEEK チューブを接合し、ナノワイヤ空間を有するデバイスを作製した。デバイスに尿を導入すると、酸化亜鉛で形成されるナノワイヤ空間は、尿中($\text{pH}=6-8$)で表面が正に帯電しており、尿中で表面が負に帯電しているエクソソームを高効率に捕捉することが可能であった(図 1c)。続いて、界面活性剤を主成分とするエクソソーム破碎液を導入することで、捕捉したエクソソームから in-situ で内包 microRNA を抽出することに成功した。ナノワイヤ空間によって尿 1 mL より回収した microRNA と、超遠心法(ゴールドスタンダード法)によって尿 20 mL より回収した microRNA の回収種類を比較したところ、すでに発見されている 2000 種以上のヒト由来 microRNA に対して、超遠心法では 200~300 種類程度の、ナノワイヤ空間は 1000 種類以上の microRNA を検出することが可能であった(図 1d)。また、microRNA の回収時間を比べたところ、超遠心法は 5-6 時間を要するのにに対し、ナノワイヤ空間はわずか 40 分であった。さらに、がん患者(肺、膵臓、肝臓、膀胱、

前立腺)より採取した尿 1 mL と非がん患者より採取した尿 1 mL をナノワイヤ空間に導入し、それぞれの尿より microRNA を抽出・回収し、microRNA 発現量の比較解析したところ、がん患者で特異的に発現している microRNA のパターンを見出した(図 1e)。

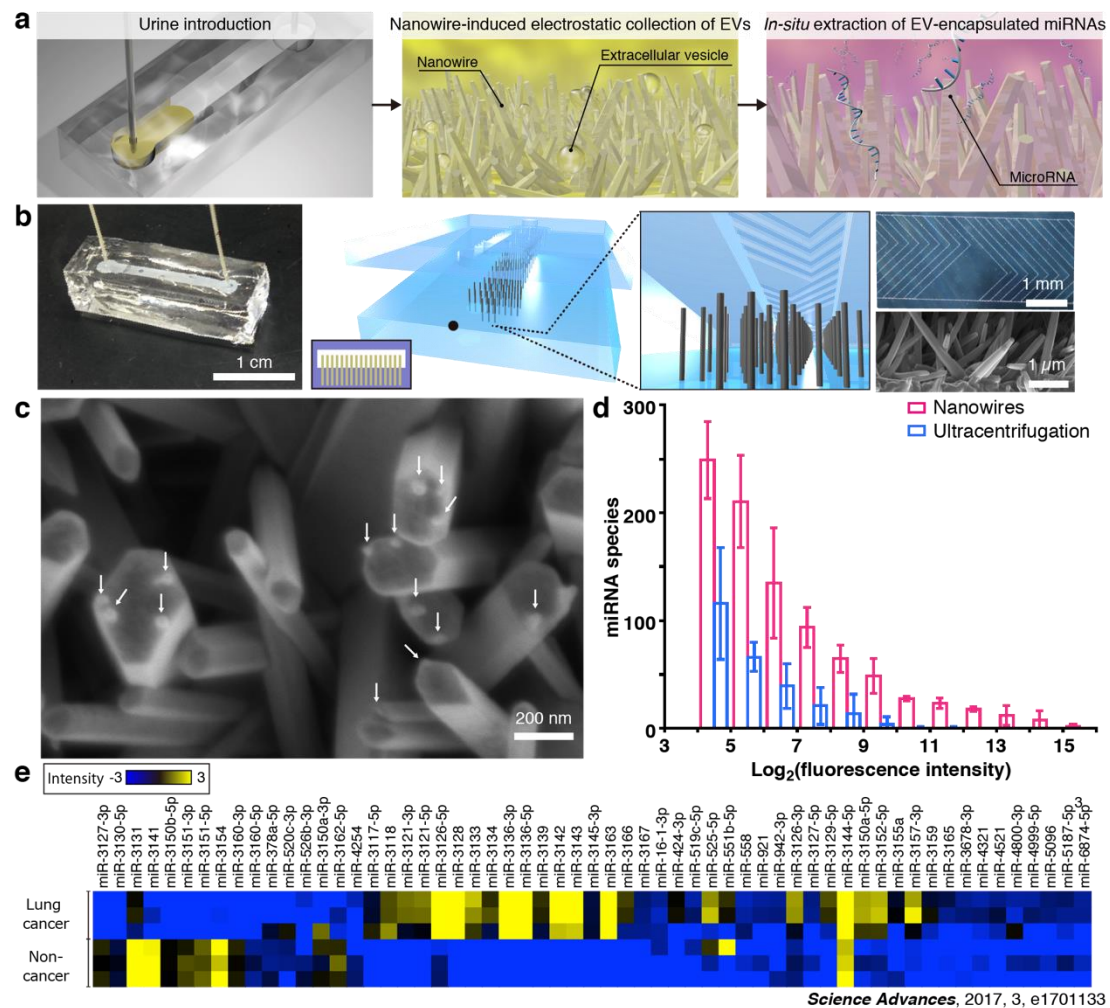


図 1 (a) ナノワイヤ空間を用いた尿中エクソソーム捕捉と microRNA 回収 (b) ナノワイヤ空間を有するデバイス (c) ナノワイヤ空間に捕捉されたエクソソームの SEM 画像(矢印がエクソソームを示す) (d) microRNA 回収種類比較(超遠心 vs. ナノワイヤ空間) (e) 肺がん vs.非がんの発現 microRNA 比較

研究テーマ B「尿中エクソソーム検出に向けたブリッジ回路によるイオン電流計測法の創出」(論文 2, 3)

イオン電流計測法は、導電性溶液で満たされた空間を物体が通過する際に発生する抵抗値変化を信号電流として感知することで、電流値に基づいたサンプルの大きさを識別することが可能である。しかしながら、従来の直列回路計測では、検出範囲が狭く、ポアに対して $1/10^2$ 以上の体積を持つサンプルしか検出できないという問題があったために、尿中に含まれる細胞片などの夾雑物(数 10 μm)から尿中エクソソーム(40–200 nm)のような約 10^3 のサイズ差を持つ環境下での計測では、検出対象となる夾雑物除去の前処理を行う必要があった。本研究では、ブリッジ回路を作ることによって信号電流のみを増幅し、夾雑物が多い尿サンプルに対応した幅広いサイ

ズ検出範囲を達成した(図 2a)。ブリッジ回路は、可変抵抗操作によって計測空間の平衡状態(ポテンシャル差がない状態)を生み出し、 μA スケールのバックグラウンド電流を 0 A に抑え、サンプル導入による平衡崩れに基づいた信号電流の取得を実現する(図 2b)。その結果、同一の計測空間を用いて $1/10^4$ 以下の体積持つ直径 200 nm の微小粒子(エクソソームのモデルサンプル)の検出に成功し、細胞片やエクソソームが含まれる尿サンプルより、エクソソームを効率良く識別可能であること概念実証を達成した(図 2c)。

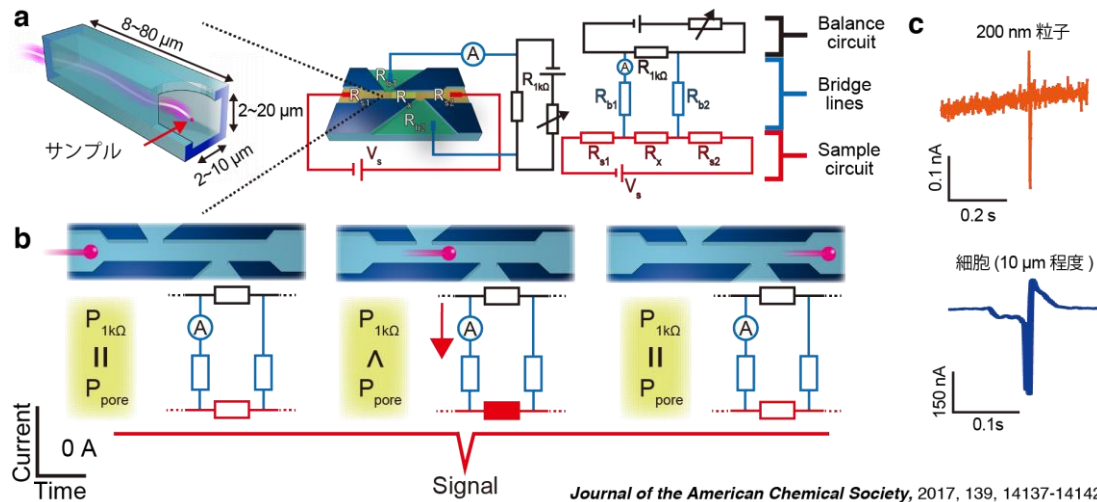


図 2 (a) ブリッジ回路によるイオン電流計測法 (b) ポテンシャル差を利用した信号検出 (c) 同一計測空間によるエクソソームモデルサンプル計測と細胞計測

研究テーマ C「人工超空間が切り拓く新たな生体分子の分析手法の創出」(論文 4, 5)

人工超空間が切り拓く新たな生体分子の分析手法として、ナノワイヤ空間への自己組織化膜による機能化と生体分子の認識能付与を達成した。ナノワイヤ表面に堆積させた金原子層を経て形成した自己組織化膜は、それ自体がタンパク質の吸着を抑制する分子にて構成されており、カルシウムイオン存在下で C 反応性タンパク質を選択的に認識することが可能であった。また、人工超空間を検出場として利用する方法となる新奇無標識検出系の構築も達成した。空間を形成するナノ構造体を規則正しく周期的に配置することで、回折光が生じる空間内の溶媒の屈折率変化に基づいた無標識検出を行なった。サンプルの濃度や、分子の長さ・大きさによって屈折率が変化し、サンプル変化量のリアルタイム無標識検出を実現した。

3. 今後の展開

本研究の今後の展望は、平均寿命及び健康寿命と平均寿命との差を生んでいる「がん」に焦点をあて、「がん」の革新的予防・診断・治療法の開発を推進することに集約される。本研究では、尿 1 mL でその個人の 1000 種類以上の microRNA の発現パターンを解析することが可能である。従来の健康診断では、採取される尿の体積が 7-8 mL に対し、診断に用いられる体積が 5-6 mL であるため、1-2 mL は廃棄されていた。今回の技術を用いることで、廃棄する 1-2 mL の尿よりその個人の microRNA 発現パターンデータを得ることができる。本技術が普及することによって、個人の尿中 microRNA 発現パターンを誕生の瞬間から収集でき、尿中 microRNA の発現パターンが体内異常(がん等)の発生する瞬間を示唆することが可能となる。また、「がん」に関して、未解明で

あった病体・病因の発生・進行機構や転移メカニズムの解明より、発症前診断を実現し、次世代医療の発展にも貢献すると考えられる。今後は、本技術をベースとして共同創立したベンチャー企業(Icaria 株式会社)や、複数の企業と協働し、革新的な尿解析システムの早期社会実装を実現する。

4. 自己評価

本研究では、(1)多様な人工超空間によるがん化因子エクソソームの解析とがん予防・診断・治療への展開、(2)エクソソームの表面状態解析と人工超空間を用いたがん化因子エクソソームの透析によるがん転移阻害、(3)人工超空間が切り拓く新たな生体分子の分析化学手法の創出、の3点を主要な目的に掲げていた。(1)に関しては、酸化亜鉛ナノワイヤ空間による99%以上の尿中エクソソームの静電相互作用捕捉を見出し、複数の受賞や論文成果に繋がるなど学術的価値が高く評価された他、JST フェアなどを経由して企業からも共同研究の提案を受けるなど大きな反響を得た。また、プレスリリースや多数の新聞報道を経て、多数のベンチャーキャピタルから問い合わせがあり、最終的にはベンチャー企業の共同創立にまで繋がった。(2)に関しては、革新的なイオン電流計測法を提案すると共に、当該の電流計測システムを基盤とした計測システムを企業と共同開発するまでに至った。(3)に関しては、従来の生体分子分析手法では実現不可能な分析法をいくつも創出し、非常に多くの企業から引き合いを受け、実用化に向けた検討も開始している。以上のように、本研究の目標は当初の想定を超えて達成することができ、名古屋大学出前授業 in 豊橋 2017「尿を使ったがん診断」といったアウトリーチ活動も行うなど、科学技術及び社会・経済への波及効果も極めて高いものとなった。

さらに、当さがけ領域において多くの先鋭の若手研究者と交流する中で、従来の方針である「位置・表面・サイズ・空隙を制御可能な任意空間(人工超空間)創製法」をさらに一歩進め、「機能制御した人工超空間創製法」の上位概念の着想に至り、これが革新的な生体分子分析法の創出に繋がった。分析対象物質から想定される空間の機能を意識することで、必要とされる空間位置・表面形状・サイズや空隙の骨格を分析化学的にデザインする道を拓くものであり、学術的価値は極めて高い。このような空間機能の創製法は、今後の革新的な分析手法開発に繋がるものとして期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. T. Yasui, T. Yanagida, S. Ito, Y. Konakade, D. Takeshita, T. Naganawa, K. Nagashima, T. Shimada, N. Kaji, Y. Nakamura, I. A. Thiodorus, Y. He, S. Rahong, M. Kanai, H. Yukawa, T. Ochiya, T. Kawai and Y. Baba, Unveiling massive numbers of cancer-related urinary-microRNA candidates via nanowires, *Science Advances*, 2017, 3, e1701133.
2. H. Yasaki, T. Yasui, T. Yanagida, N. Kaji, M. Kanai, K. Nagashima, T. Kawai and Y. Baba, Substantial expansion of detectable size range in ionic current sensing through pores by using a microfluidic bridge circuit, *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139, 14137-14142.
3. H. Yasaki, T. Yasui, T. Yanagida, N. Kaji, M. Kanai, K. Nagashima, T. Kawai and Y. Baba, A

real-time simultaneous measurement on a microfluidic device for individual bacteria discrimination, *Sensors and Actuators B*, 2018, 260, 746–752.

4. T. Shimada, T. Yasui, A. Yokoyama, T. Goda, M. Hara, T. Yanagida, N. Kaji, M. Kanai, K. Nagashima, Y. Miyahara, T. Kawai and Y. Baba, Biomolecular recognition on nanowire surfaces modified by the self-assembled monolayer, *Lab on a Chip*, 2018, in press.

5. T. Yasui, K. Ogawa, N. Kaji, M. Nilsson, T. Ajiri, M. Tokeshi, Y. Horiike and Y. Baba, Label-free detection of real-time DNA amplification using a nanofluidic diffraction grating, *Scientific Reports*, 2016, 6, 31642–31649.

(2)特許出願

研究期間累積件数:4件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表(Invited)

1. T. Yasui, “Nanowires for early disease diagnosis”, Pittcon Conference & Expo 2017, Chicago, IL, 2017/3/8
2. T. Yasui, “Oxide nanowires for bio-applications from molecular to cellular levels”, ICAPMA2017, Thailand, 2017/6/1
3. T. Yasui, “Nanowire devices for bio- and medical-applications”, Special guest lecture at KMITL, King Mongkut’s Institute of Technology Ladkrabang, (KMITL), 2018/2/14
4. T. Yasui, “Nanowire spaces for urinary extracellular vesicle analysis”, ICSS2018, Rome, Italy, 2018/7/3
5. T. Yasui, “Oxide nanowires for urinary extracellular vesicle analysis”, STEMa2018, Thailand, 2018/7/19

受賞

1. 2018年 第35回永井学術賞
2. 2018年 第31回安藤博記念学術奨励賞
3. 2017年 日本分析化学会 奨励賞
4. 2016年 化学とマイクロ・ナノシステム学会第34回研究会 優秀研究賞
5. 2016年 平成27年度赤崎賞

著作物

1. 安井隆雄, 馬場嘉信, “尿中マイクロ RNA から「がん」を特定”, ライフライン 21 がんの先進医療, 株式会社路書房, 2018, pp. 30–34
2. 安井隆雄, “尿 1mL 中のマイクロ RNA から、がんの有無特定”, コンバーテック, 加工技術研究会, 2018, 543, pp. 6–10
3. 安井隆雄, 加地範匡, 馬場嘉信, “尿を使った疾病診断を目指したナノワイヤ空間の創製”, 化学工業, 化学工業社, 2017, 68, pp. 768–772
4. 安井隆雄, 湯川博, 馬場嘉信, “miRNA 検出測定用ツールの最新の成果”, miRNA の最新

知識, 医薬ジャーナル社, 2017, 139-144

5. 安井隆雄, 小野島大介, 湯川博, 馬場嘉信, “ナノバイオデバイスによる体液中エクソソーム解析”, リキッドバイオプシー-体液中腫瘍マーカーの検出・解析技術-, シーエムシー出版, 2017, pp. 220-225

プレスリリース・新聞記事など

1. 2017年12月16日, “尿中マイクロRNAから「癌」を特定”, 名古屋大学/九州大学/国立がん研究センター/JST/AMED プレスリリース
2. 2017年8月31日~9月1日, JSTフェア出展
3. 2017年10月1日, “名古屋大学出前授業 in 豊橋 2017「尿を使ったがん診断」”, アウトリーチ活動
4. 2017年, Science Advances, Facebook & twitter
5. 2017年, YAHOO!ニュース「尿からがんを診断 名大が発表」, CBCニュース, 共同通信および他 25 紙, 朝日新聞, 日経デジタルヘルス, 日本経済新聞, 日経バイオテク, yomiDr., 読売新聞, Science Portal(JST), 日刊工業新聞
6. 2018年, Nano Insight Japan, “ナノテクと医学の合体により「がん」簡易早期診断に革新～尿中マイクロRNAから『がん』を特定～”