

研究終了報告書

「形状と組成情報に基づく 1 粒子解析技術の開発」

研究期間：2017 年 10 月～2021 年 3 月

研究者：龍崎 奏

1. 研究のねらい

本研究では、液中に浮遊している微粒子の「形状情報」と「組成情報」を計測する革新的 1 粒子解析技術の開発をねらいとしている。生体粒子では、平均化すると埋もれてしまう様な少数派の粒子が結果的に大きな変化をもたらす可能性があるため、1 粒子ごとに計測することが重要である。特に本研究では、がん転移などに関わっているとされているエクソソーム(EV)の「形状」と「組成」を解析し、構造的な観点から EV の機能解析を目指す(図 1)。

本技術はナノポアデバイス技術を基盤としており、電気泳動を用いてナノスケールの小さい穴(ナノポア)にたった 1 個の EV を通過させる。その際、ナノポアを流れているイオン電流の変化から、ナノポアを通過した EV の形状情報を解析し、さらにラマン散乱光を計測することで組成情報も解析する。しかしながら、基本的に EV の形状は球であるため、各 EV の形状の違いを見極めるためには、イオン電流のごく僅かな変化量を定量解析する必要があり、技術的な課題がある。一方、ナノポアを通過する EV の速度が速いため、1EV からのラマン散乱光強度は非常に弱く、計測するのが困難である。本研究では、これらの技術的課題を解決することで、革新的 1 粒子解析技術の開発を目指す。



図1. 本研究の概略図

2. 研究成果

(1) 概要

本 1 粒子解析技術を実現させるためには、「1. 微小イオン電流変化量の定量解析技術」、「2. 微小ラマン散乱光の高速分光技術」を新たに構築する必要があった。これらの技術的課題に対して、「1. イオン電流解析のための機械学習」、「2. 微小ラマン散乱光のための高速 CCD 検出器」、「3. 1EV ラマン分光用のプラズモニックナノポア構造」を開発することで、本 1 粒子解析技術を構築した。その後、本技術を用いて EV を計測したところ、これまでの技術では識別が難しかった EV を形状の観点から識別することに成功し、さらに EV 表面の分子情報解析にも成功した。EV は極めて多様性が高く、ある 1 細胞から分泌された EV であっても様々な EV が存在しているため、分泌元の細胞種だけで分類化するのではなく、さらに細かく分類化することが EV の機能解析において重要である。本技術による形状識別では、ある細胞種由来の EV をさらに細く分類化することができるため、分類ごとに EV を分離することで EV のさらなる機能解析が期待される。一方、1EV ラマン分光測定では無標識で EV 表面の分子情報を解析することができるため、新たな表面分子を見つけることが可能である。実際、本技術によりこれまで議論されてこなかった表面分子を検出し、EV の機能解析において新たな知見を得ることに成功した。

今後、本研究によって構築した技術を駆使することで、EV のさらなる理解に繋がると同時に、がん検査デバイスなどのバイオセンサー応用への展開も期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A「イオン電流解析のための機械学習」

ナノポアデバイスの構造は、ナノポアの上下にイオン電流計測および電気泳動用の電極が設けられ、ナノポアと電極はともに KCl などの電解質溶液で満たされている。ナノポア内に粒子が無ければ、ナノポアを介して電極間にイオン電流が流れ、電気泳動により粒子がナノポア内に入ると、一部のイオン電流が粒子によって遮断され、イオン電流が減少する(ブロッキング電流)。このブロ

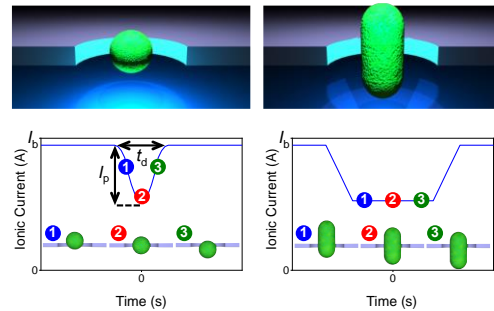


図2. ナノポアデバイス形状解析の概略図。□

ッキング電流に粒子の連続的な断面積の情報が反映されているため、そのブロッキング電流の時間変化からナノポアを通過した粒子の形状を見積もることができる(図2)。ここで、ブロッキング電流の最大値(I_b)は粒子の短軸径を反映し、幅(t_b)は長軸径を反映しているため、 I_b と t_b で概ねの粒子形状が求まる。しかしながら、上述したように、基本的に EV の形状は球であるため、各 EV の形状の違いを見極めるためには、 I_b と t_b だけではなくブロッキング電流のごく僅かな変化量を定量解析する必要がある。本研究では、これまでの解析に用いていた I_b と t_b の情報に加え、ブロッキング電流の時間変化を機械学習させることで、粒子ごとのごく僅かな違いを数学的に求めた。具体的には、ブロッキング電流の時間変化を主成分分析し、第1主成分と第2主成分の2次元プロットをクラスター解析することで、粒子形状の解析を行った。その結果、例えば、乳がん細胞(MDA-MD-231)由来の EV では、従来の解析方法では全て球状で1種類の粒子集団として識別されていたが、本機械学習によって形状の観点から4種類の集団が存在していることが示唆された(図3)。この結果はあくまで数学的に求められた結果であるため生物学な意味を考察する必要があるが、この結果は EV の多様性を評価する上で重要な指標になりえる。さらに、これらの粒子を分注することができれば、EV のより詳細な機能解析が可能となるため、本解析技術は EV の新しい分類化手法としての有用性が期待される。

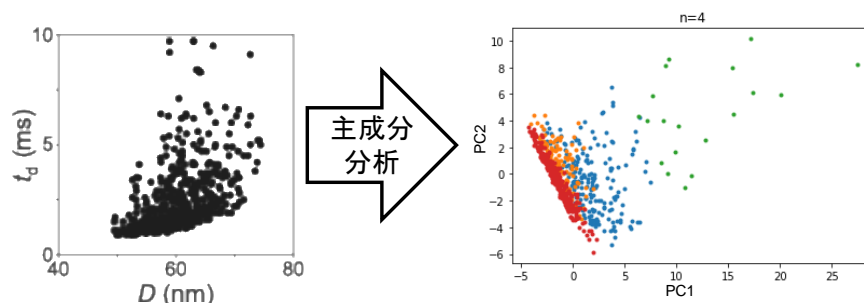
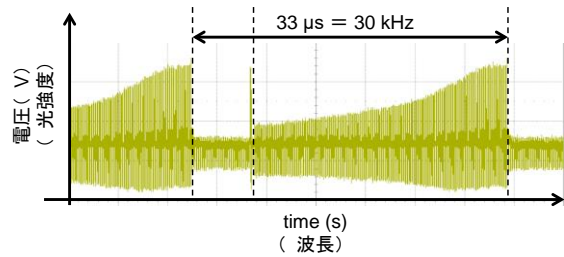


図3. MDA-MD-231-EVの粒径 $D(I_b)$ - t_b プロット(左). ブロッキング電流の時間変化を機械学習させることで得られる□ PC1-PC2プロット(右). □

研究テーマ B「微小ラマン散乱光のための高速 CCD 検出器」

ナノポアを通過する EV の速度は ms オーダーであるため、10 kHz 以上のラインレートで計測する必要があるが、市販の検出器 (CCD) では 1~5 kHz が上限である。そのため、本研究では ms オーダーでラマン散乱光を検出することができる高速 CCD 検出器の開発を行った。具体的には 30~70 kHz の



ラインレート (時間分解能: 30000~70000 スペクトル/1 秒) を有する CCD 検出器を開発した。本発明では、CCD の出力を 8 チャンネルにし、並列で情報処理することで通常の 1 チャンネル CCD よりも早い光検出を可能にした。しかしながら、出力を 8 チャンネルにすることで、各回路の個体差によってデータ出力のタイミングがチャンネルごとにずれてしまう。そこで、出力のタイミングを制御するためのタイミング制御回路を独自開発することで、本 CCD の開発に成功した (図 4)。さらに、高速計測に伴い出力データの容量も増え、膨大なデータを高速にデータ処理する必要がある。本装置では、粒子がナノポアを通過した時だけデータを保存するシステムを構築したことで、微小ラマン散乱光のための高速 CCD 検出器の構築に成功した。

研究テーマ C「1EV ラマン分光用のプラズモニックナノポア構造」

テーマ B でも述べたように、ナノポアを通過する EV の速度は ms オーダーであるため、1EV からのラマン散乱光は非常に弱い。そのため、テーマ B のように CCD 検出器の改良と同時に、散乱光の強度を増強させることも重要である。本研究では、ラマン散乱光を 10^8 倍に増強できるプラズモニックナノポア構造の作製を行った。プラズモニックナノポアとは、プラズモン共鳴を示すナノポア構造のことである。プラズモン共鳴を起こす条件は幾つかあるが、金属ナノ構造に特定波長の光を照射することで、その金属ナノ構造体表面においてプラズモン共鳴が発生する。ポア構造において十分なプラズモン共鳴を発生させるためには、直径を 100 nm 程度にする必要がある。しかしながら、ラマン分光計測において生体試料に用いられる代表的な照射光レーザーは 785 nm であるため、

スポット径は概ね $1 \mu\text{m}$ である。したがって、照射光の多くがプラズモン共鳴に貢献することなく基板表面で反射しており、ラマン散乱光は $10^3 \sim 10^5$ 倍程度しか増強されない。本研究では、図 5 に示すような逆ピラミッド型構造を用いることで、照射光を効率よくナノポア構造に集光し、さらにポア構造が角度 (θ) を持ったことで構造効果も得られ、最終的にラマン散乱光を 10^8 倍に増強できるプラズモニックナノポア構造の作製に成功した。これにより、1EV からの微弱なラマン散乱光でも計測が可能となった。(論文リスト 1,2)

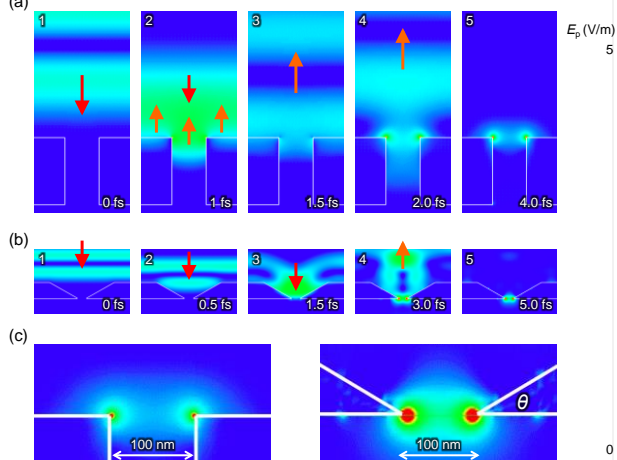


図5. プラズモニックナノポアの電場ダイナミクスシミュレーション。(a) 既存のプラズモニックナノポア構造。(b) 本研究で提案した逆ピラミッド型構造。(c) 各エッジの拡大図。

研究テーマ D「1EV ラマン分光計測」

本研究では、テーマ B で開発した CCD 検出器とテーマ C で開発したプラズモニックナノポア構造を用いて実際に 1EV ラマン分光測定を行った。EV を電気泳動によってナノポアを通過させた場合、残念ながら十分な強度のラマン散乱光を得ることはできなかったが、光ピンセットによって EV をナノポア構造に 1~10 秒程度トラップさせることで、十分な強度を示すラマン散乱光の検出に成功した。また、1EV 測定後に光ピンセットをオフにし、再度、光ピンセットをオンにすることで次の EV が計測できるため、この作業を繰り返し替えることで容易に数百個の EV のラマンスペクトルを計測することが可能となり、1EV ラマンスペクトルの統計解析が可能となった（図 6）。これまでの研究では、集団としての EV ラマンスペクトルは報告されているが、個々の EV のラマンスペクトルを数百個計測した例はなく、さらにそれを統計解析した例もないため、本研究が初めてとなる。また、各スペクトルを機械学習で解析することで、これまでの手法では難しかったラマンスペクトルのより詳細なピーク帰属が可能となり、EV 表面のより詳細な分子情報を得ることに成功した。さらに、EV の種類によって表面分子の分布や多様性が異なっていることも明らかとなった。これらの結果から、本 1 粒子解析技術は新たな EV 解析技術としてのポテンシャルを有し、EV をさらに理解するための新しいツールとして期待される。

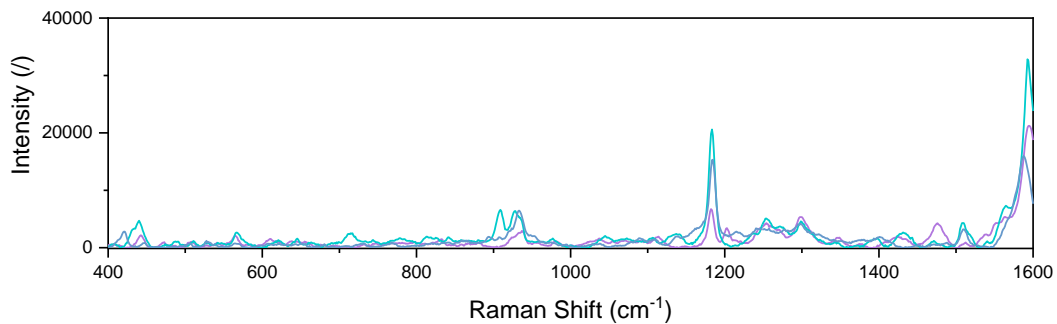


図6. 1EVラマンスペクトルの例. 光ピンセットを用いて3つEVを個々に計測した結果.□

3. 今後の展開

本研究により、主に「形状に基づくEVの分類化技術」、「高速 CCD 検出器技術」、「1EV ラマン分光計測技術」の構築に成功してきた。上述したように、EV は極めて多様性が高く、ある 1 細胞から分泌された EV であっても様々な EV が存在しているため、分泌元の細胞種だけで分類化するのではなく、さらに細かく分類化することが EV の機能を理解する上で重要である。この観点から、「形状に基づくEVの分類化技術」は EV の多様性を評価する上で重要な指標になりえる。さらに、分類化された粒子を分注することができれば、EV のより詳細な機能解析が可能となるため、本技術は EV の新しい分類手法としての有用性が期待される。続いて、「高速 CCD 検出器技術」は一般的な CCD 検出器として用いることが可能なため、本研究に関わらず、様々な分野での高速分光に貢献できることが期待される。また、この技術を 2 次元に拡張することで、高速カメラも実現可能である。最後に、「1EV ラマン分光計測技術」はこれまでに無い新しい 1 粒子解析技術であるため、既存の計測技術では得られない表面分子情報が得られ、さらに数百個の EV を個々に計測することができるため、EV 表面分子の統計解析が可能である。この技術により、分子生物学的な観点から EV の機能解明が期待される。さらに、EV 表面分子には分泌元の細胞情報が含まれているため、本技術を基盤としたバイオセンサー（がん検査デバイスなど）への応用展開も期待される。最終的に全ての技術を集積することで、EV の「形状情報」と「組成情報」を同時計測する技術を構築し、さらなる 1 粒子解析技術の発展が期待される。

4. 自己評価

本研究では、液中に浮遊している微粒子の「形状情報」と「組成情報」を同時計測する革新的 1 粒子解析技術を開発し、エクソソーム (EV) の「形状」と「組成」を解析することで構造的な観点から EV の機能解析を目指すものであった。最終的には、「形状情報」と「組成情報」の同時計測は達成されなかったものの、要素技術開発に関しては概ね計画通りに研究を進めることができたと言える。特に、1EV ラマン分光計測技術では、数百個の EV を個々にラマン分光計測することが可能となり、これまでに無い新しい技術構築に成功した。また、技術構築だけではなく、実際の EV を計測することで、これまでの研究では得られていなかった表面分子情報が得られ、EV の機能解析において補助的なデータを示すことができた。これらの結果から、本 1 粒子解析技術が新たな EV 解析技術として使用できる可能性を示せたため、研究目標は概ね達成されたと考えられる。今後、本技術を用いた EV 研究を続けることで、本技術の有用性をより明確にすることが重要である。

研究実施体制および研究費執行状況においても、当初の計画通りに研究を遂行できたと考えられる。本研究では技術開発が主軸であったため、最初の設計を間違えてしまうと大幅な修正コストが必要であったが、幸いにも領域アドバイザーの先生方や共同研究者からの助言に助けをもらい、大幅な修正をすることなく研究を遂行することができた。

本研究成果は、科学技術及び社会・経済への波及効果の観点からもある一定の成果を示せたと考えている。1EV ラマン分光計測技術は、EV の表面分子をマーカーにしたバイオセンサーの基礎技術になり得る。EV 表面分子には分泌元の細胞の情報が含まれているため、本技術を用いることで体液を用いたがん検査デバイスなどへの応用が期待される。現在、体液検査のみでがんを検出し、さらにそのがんの種類を特定する技術は実用化してい

ない。そのため、本技術を用いたバイオセンサーが実用化すれば、大きな経済効果が期待される。

本研究領域は、文部科学省の選定した戦略目標「細胞外微粒子により惹起される生体応答の機序解明と制御」を達成することが目的であり、その達成目標は大きく三つに区分されている。その内の一つに「細胞外微粒子の検出・分離・解析技術の高度化」というものがある。本研究成果は、この区分に該当する成果だと言える。1EV からのラマン散乱光はこれまでの技術では計測ができなかったため、本 1EV ラマン分光計測技術は「検出の高度化」に該当する。また、本研究では 1EV の形状解析やラマンスペクトルの解析において機械学習を用いた新たな解析方法を示してきた。よって、「解析技術の高度化」についてもある一定の成果が得られたと考えられる。分離技術については直接的な高度化は行って来なかったものの、本研究成果の一つである「形状に基づく EV の分類化技術」は EV の新しい分類化手法としての有用性が期待されるため、EV を分離する際の新しい基準として貢献できる可能性がある。

これらの観点から、本研究は概ね研究計画通りに遂行できたものと考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

1. <u>S. Ryuzaki</u> , R. Matsuda, and M. Taniguchi, “Pore Structures for High-Throughput Nanopore Devices”, <i>Micromachines</i> (2020), 11, 893–1–13.
ナノポアデバイスでは、電気泳動によって検体をナノポアに通過させ、その際にイオン電流を計測するのが一般的である。しかしながら、一般的なナノポア構造では、電場勾配がナノポア内部に集中しているため、ナノポアから離れたところに浮遊している検体を検出することは難しい。本論文では、デバイス全体に電場勾配が広がり、検体の検出効率を向上させられる新しいナノポア構造の作製に成功した。
2. R. Matsuda, <u>S. Ryuzaki</u> , K. Okamoto, Y. Arima, M. Tsutsui, M. Taniguchi, and K. Tamada, “Finite-difference time-domain simulations of inverted cone-shaped plasmonic nanopore structures”, <i>J. Appl. Phys.</i> (2020), 127, 243109–1–6.
既存のプラズモニックナノポア構造を基板に用いた表面増強ラマン分光では、ラマン散乱光が $10^3 \sim 10^5$ 倍に増強しているが、プラズモニックナノポアデバイスの観点から考えるとこの値はまだ小さい。本論文では、ナノポアを逆ピラミッド構造にすることで照射光がナノポアに集光され、さらに角度を持ったナノポア構造によって構造効果も得られ、最終的に 10^8 倍の増強度が得られることを理論的に明らかにした。

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 2 件(特許公開前のもも含む)

(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)

招待講演

1. 第 81 回秋季応用物理学会, オンライン, 9/8 (2020). “プラズモニックナノポアデバイス

- の創生”。
2. OCU 先端光科学シンポジウム, 大阪, 10/21 (2019). “プラズモニクナノポアデバイスの創生”。
 3. The 7th International Conference on DV-X α Method, Semarang, Indonesia, 9/2-4 (2019). “Novel shape analysis method for single bioparticles in aqueous solutions”
 4. International Conference on Functional Nanomaterials and Nanodevices, Vienna, Austria, 9/3-5 (2018). “Nanopore devices for shape analysis of single nanobiomaterials in aqueous solutions”。
 5. The Seminar on Precision Driving and Sensing Technology, Xi' an, China, 7/9 (2018). “Novel structure analysis for nanomaterials”。