

## 研究終了報告書

### 「aifAによるエクソソームの1ステップ単離配列と1粒子統合解析」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：許岩

#### 1. 研究のねらい

現在エクソソームの生物学的意義の解明とそれを対象とした診療技術の開発における最も大きな課題は、粒径の小ささに起因するエクソソームの単離や検出、解析の困難さにあると言える。本研究では、独自のナノ流体デバイス技術 aifA を用いて、エクソソームの簡便な1ステップ単離配列、迅速検出、高精度解析を統合した革新技術を確立することを目的とした。これにより、どこでも誰でも手軽に使えるエクソソームの汎用的な世界初の技術に発展させることを目指した。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

aifA 構造やエクソソーム検出機構の最適化により、aifA のエクソソームの単離能力をさらに向上させ、1粒子配列へと進化させた。これにより、aifA によるエクソソームの1ステップ単離配列・高効率検出(研究項目1)を確立した。そして、確立したエクソソームの1ステップ単離配列を用いて、タンパク質や核酸分析技術と組み合わせて、個々のエクソソームの表面及び内部における生体分子情報の解析に取り組んだ。その結果、エクソソームの表面蛋白質と microRNA のハイスループット1粒子解析(研究項目2, 3)を可能とした。これにより、生状態の個々のエクソソームに存在する多種多様な蛋白質や核酸を網羅的に解析する道を開けた。また、技術シーズの創出とその社会還元を常に意識しながら、研究期間のすべての段階において、生物学・医学への応用を想定した緊密な領域内外の共同研究を通じて、エクソソームに基づく新規精密診断法の開発において aifA がもつポテンシャルを少しずつ明らかにしつつある(研究項目4)。以上から、本研究の目的をほぼ達成できた。

##### (2) 詳細

##### 研究項目1. 「エクソソームの1ステップ単離配列・高効率検出」

エクソソームの1ステップ単離配列・高効率検出を目的として、aifA 構造の最適化とエクソソーム検出機構の最適化を行った。最適化した条件に基づいて、様々なエクソソームを用いて、エクソソームの1ステップ単離配列・高効率検出に取り組んだ。その結果、用いたすべての種類のエクソソームの実験において、aifA を用いて、超遠心分離を利用せずに、超微量のサンプル(数 $\mu$ L)から簡単な1ステップのピペット操作のみで、エクソソームの on-chip 単離配列、高効率検出を実現した。さらにエクソソームの定量に向けた探索実験において、aifA によりエクソソームを相対的に定量できる可能性が示唆された。

以上から、研究項目1の目的であるエクソソームの1ステップ単離配列・高効率検出を達成できたといえる。

### 研究項目2.「エクソソームの表面蛋白質のハイスループット1粒子解析」

エクソソームの膜表面には様々な蛋白質が存在しており、生状態のままで個々のエクソソームに存在する多種多様な蛋白質を網羅的に解析できれば、そのエクソソームの特徴を精密に捉えることができるようになる。その精緻な特徴から、エクソソームの種類や、個々のエクソソームの分子情報の「個性」及びそのばらつきを識別することができる。本研究項目では、研究項目1で確立したエクソソームの1ステップ単離配列を用いて、エクソソームの表面タンパク質の1粒子解析を目的とした。

具体的には、aifA のエクソソーム単離能を評価した。その結果、aifA によるエクソソームの相対定量の可能性が示唆された。そして、エクソソーム膜表面によく存在するマーカータンパク質に着目し、on-chip 単一エクソソームアレイ上の抗体標識化手法を開発した。また、エクソソームの表面タンパク質の1粒子解析手法を確立した。これにより、個々のエクソソームにある単一種類のマーカー蛋白質が検出できることを実証した。また、複数種類のマーカー蛋白質を同時に検出できることも実証した。これにより、生状態の個々のエクソソームに存在する多種多様な蛋白質を網羅的に解析する道を開けた。

以上から、研究項目2の目的であるエクソソームの表面蛋白質のハイスループット1粒子解析を達成したといえる。

### 研究項目3.「エクソソームからの核酸のハイスループット1粒子解析」

エクソソームは様々な miRNA を内包しており、細胞間、または個体間で受け渡すことで細胞間コミュニケーション道具として働く。個々の生状態のエクソソームからの miRNA をハイスループット解析することは、エクソソームの生物学意義や疾患メカニズムのより精密な解明に繋がる可能性がある。本研究項目では、研究項目1で確立したエクソソームの1ステップ単離配列を用いて、単一エクソソームに内包した miRNA の解析を目的とした。

具体的には、核酸に特異的結合する蛍光プローブを用いて、単一エクソソーム内包 RNA の選択的検出と miRNA のシーケンス選択的検出を on-chip で行う手法を創出した。単一エクソソーム内包 RNA の選択的検出実験では、1粒子レベルでエクソソームが内包する RNA のハイスループット解析に成功した。また、miRNA のシーケンス選択的検出実験では、単一エクソソームに内包された標的 miRNA のハイスループット検出と精密な解析などができた。

以上から、研究項目3の目的であるエクソソームからの核酸のハイスループット1粒子解析を達成できたといえる。

### 研究項目4.「エクソソームのハイスループット1粒子統合解析による新規精密診断法の探索(領域内外連携)」

技術シーズの創出とその社会還元を常に意識しながら、研究期間のすべての段階において、領域内外のエクソソームの生物学・医学研究者と連携して、研究項目1、2、3それぞれに確立した技術を新規精密診断法の開発へと展開することを探索、議論してきた。生物学・医

学への応用を想定した緊密な共同研究を通じて、エクソソームに基づく新規精密診断法の開発において aifA がもつポテンシャルを少しずつ明らかになりつつある。また、研究項目2、3において、疾患に着目したエクソソームのマーカータンパク質や microRNA の1粒子統合解析は、エクソソームを疾患バイオマーカーとしての基礎と技術の確立に寄与できると期待される。

### 3. 今後の展開

以上の研究成果を踏まえ、今後は基礎と応用の両方において、本研究をさらに展開していく。基礎において、本研究で開発した aifA によるエクソソームの1ステップ単離配列・1粒子統合解析技術をより高精度かつ高時空間分解能のレベルへと発展させ、エクソソームの生物学的意義の詳細の解明に展開していく。応用において、本研究の成果が将来的な社会実装に繋がるために、今後様々な体液を用いる実証研究を物学・医学研究者と連携して行っていく。これにより、エクソソームに基づくがんや老化などに関わる疾患の新規診断法の確立を目指す。

### 4. 自己評価

本研究は当初提案した研究項目と研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)に従って、概ね計画通りに実施した。また、研究成果欄に記載した通り、当初設定した研究目的をほぼ達成した。一方、当初予期していなかった項目へも展開でき、計画を超える成果も出た。

本研究で確立した技術は、従来のエクソソームの単離技術における精製、濃縮などの煩雑な操作や回収試薬が不要となるだけでなく、既存のエクソソームの単離、解析技術をはるかに上回る低サンプル量、低損傷、高純度、高粒子分離能、高解析精度、高効率のエクソソームの単離、解析が実現できた。このため、「エクソソームを濃縮して解析する」という従来のエクソソームの研究戦略に基づいた様々な方法にある課題を解決でき、「濃縮せずに、エクソソーム 1 個でも検出、解析できるようにする」という全く新しい戦略を確立できた。精密機器、特殊試薬及び専門的知識へ依存しない簡便な操作のみで、生状態のままかつ1粒子精度でのエクソソームの単離、解析の実現を通じて、どこでも誰でも手軽に使えるエクソソームの汎用的な技術に発展させることが大いに期待される。これは、エクソソームの利用を多くのラボや医療現場で普及できるようになることに繋がり、エクソソームの基礎生物学研究と応用が加速しその裾野がさらに一層拡大すると確信している。

将来において、本研究を通じて蓄積した知的資産と技術シーズを活用したエクソソームの基礎生物学研究ツール及び臨床診療技術の開発は、エクソソームの形成や伝搬機序、生物学的意義、および機能の全容解明や、がん・感染症の超早期診断法の開発に寄与する。最終的には、患者一人ひとりの「個性」を重視した精密かつ適確で有効性の高い創薬と治療の実現を目標とする次世代の医療変革の推進に貢献できる可能性が高い。以上により、本研究の成果が将来もたらさうる科学技術・経済・社会へのインパクトが極めて大きいものといえる。

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: 6件

1. Kamai, H., <u>Xu, Y.*</u> , Fabrication of Ultranarrow Nanochannels with Ultrasmall Nanocomponents in Glass Substrates. <i>Micromachines</i> , 2021, 12(7), 775. (Editor's Choice; selected as Feature Paper)
概要: 本研究では、電子ビームリソグラフィとプラズマドライエッチングからなるナノファブリケーションプロセスを最適化することにより、数十ナノメートルの狭い線幅を持つガラス基板にナノ流体構造のファブリケーションを確立した。このナノ流路の極限加工法を用いて貫通 aifA の作製を可能とした。
2. Kawagishi H., Kawamata S., <u>Xu, Y.*</u> , Fabrication of nanoscale gas-liquid interfaces in hydrophilic/hydrophobic nanopatterned nanofluidic channels, <i>Nano Letters</i> , 2021, 21, 10555-10561 ( <i>Featured on the cover of the journal; 大阪府立大学と JST より共同プレスリリース; 国内外メディア・SNS 報道多数</i> ).
概要: 独自のナノ流体デバイス工学技術を駆使して、ナノ流路に極めて高精度、均一かつ安定にナノスケールで気体と液体が接する界面(超微小気液界面)を作製することに成功した。この超微小気液界面はナノ流路内に並べることができ、また任意な位置に移動することもできる。さらに、この超微小気液界面ができる際に、物質が濃縮される現象を見いだした。この現象はナノ空間の特別な物理化学に起因すると考えられ、極微量の生体試料からエクソソームやウィルスの濃縮への応用に期待される。
3. Fukuda S, <u>Xu, Y. *</u> , A biomimetic anti-biofouling coating in nanofluidic channels, <i>Journal of Materials Chemistry B</i> , 2022, doi:10.1039/D1TB02627E
本研究では、ナノ流路内における生体物質の非特異吸着の課題を克服するために、シリルヒドリド化ホスホリルコリン含有モノマー材料を設計して合成した。この新しいリン脂質モノマー材料を用いて、分子自己組織化により、小さいナノ流路に抗非特異吸着の表面修飾ができた。この材料と表面修飾の手法は aifA 内のエクソソームの非特異吸着の課題の解決に役に立つことが期待される。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 4 件(特許公開前のもも含む)

1	発明者	許岩
	発明の名称	粒子捕捉装置及び粒子捕捉方法
	出願人	大阪府立大学
	出願日	2019/11/14
	出願番号	特願 2019-518882
	概要	細胞外小胞顆粒やウィルスなどのナノ粒子の定量的な解析に多くの課題を解決するために、本発明は、捕捉対象粒子を粒子捕捉用開口の内部に閉じ込めることができ、捕捉対象粒子を個別に観察、解析などすることができる粒子捕捉装置を提供する。

2	発 明 者	許 岩
	発 明 の 名 称	粒子捕捉装置及び粒子捕捉方法
	出 願 人	大阪府立大学
	出 願 日	2019/11/15
	出 願 番 号	中国特許出願 201880032643.0
	概 要	(上記1と同じ)細胞外小胞顆粒やウイルスなどのナノ粒子の定量的な解析に多くの課題を解決するために、本発明は、捕捉対象粒子を粒子捕捉用開口の内部に閉じ込めることができ、捕捉対象粒子を個別に観察、解析などすることができる粒子捕捉装置を提供する。
3	発 明 者	許 岩
	発 明 の 名 称	粒子捕捉装置及び粒子捕捉方法
	出 願 人	大阪府立大学
	出 願 日	2019/11/15
	出 願 番 号	米国特許出願 16/614,112
	概 要	(上記1と同じ)細胞外小胞顆粒やウイルスなどのナノ粒子の定量的な解析に多くの課題を解決するために、本発明は、捕捉対象粒子を粒子捕捉用開口の内部に閉じ込めることができ、捕捉対象粒子を個別に観察、解析などすることができる粒子捕捉装置を提供する。

(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)

学会発表計46件、うち招待講演29件(うち国際 20 件);英語 Book Chapter 5 件;招待総説・解説 計 3 件、Revision submitted 1 件;プレスリリース1件、報道多数。

<Invited Review>

1. Yang J., Xu, Y.\*, Nanofluidics for sub-single cellular studies: nascent progress, critical technologies, and future perspectives, *Chinese Chemical Letters (CCL)*, 2021, doi:10.1016/j.ccl.2021.09.066.

<Book Chapters>

2. Yang J., Xu, Y.\*, Nano-in-nano integration technology for advanced fabrication of functional nanofluidic devices, in “*Advanced MEMS/NEMS Fabrication and Sensors*”, Springer Nature, pp111-132, 2021 October 13, ISBN: 9783030797492; DOI: 10.1007/978-3-030-79749-2\_5.
3. Yang J., Xu, Y.\*, Principles and applications of the nano-in-nano integration for multidisciplinary nanofluidics, in “*Multidisciplinary Microfluidic and Nanofluidic Lab-on-a-Chip: Principles and Applications, 1st Edition*”, pp407-428, Elsevier, 2021, Sept. 24; 486 pages in total, ISBN: 978-0-444-59432-7; Doi: 10.1016/B978-0-444-59432-7.00012-1

<招待講演>

4. Xu Y., Towards molecular manual-assembly: nanofluidic manipulation of single nanometric objects and extracellular vesicles, The 2nd Symposium for Cell Analysis on Micro/Nanofluidics, Beijing, China, Sept., 2019. (*Keynote*)

<プレスリリース>

5. 大阪府立大学と JST より共同プレスリリース: ナノスケールで物質の濃縮効果を発見—

ナノ流体デバイスによる超微小気液界面の作製と効果—;2021年10月14日。(国内外  
メディア報道、転載多数)