

# 研究終了報告書

## 「エクソソームの由来判別・生体内動態解析のための粒子径分級およびアプタマータグ選抜・解析法の開発」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：末吉 健志

### 1. 研究のねらい

本研究の目的は、「エクソソーム粒子径分級」と「エクソソームアプタマー高効率選抜」、そして「機械学習に基づくアプタマー配列解析」によって、エクソソームの粒子径・膜組成・内包物に関する複雑かつ多次元な総合的情報を、解析容易な配列情報である「アプタマータグ」に変換し、エクソソームの由来判別や生体内動態解析に適用することである。

生体内に存在するエクソソームは、ガン転移や細胞間情報伝達への関与が知られている。その粒子径分布・膜組成・内包物は由来細胞によって異なっており、その生体内動態や細胞間情報伝達機構の解明のためには、エクソソームが「どこで生じて(由来)、何を含んでいて(膜および内包成分)、どこまで移動しているのか(粒子径による搬送性)」を解明する必要がある。しかし、実際に採取されるエクソソームは多様な細胞から生じた混合試料となっているため、その生体内動態解析には、各エクソソームの由来判別の必要がある。

一方、当時のエクソソーム採取法・解析法では、粒子径分布・膜組成・内包物に関する情報のいずれかしか得られなかった。さらに、絶対量の少なさと成分の複雑さのため、その網羅的解析も困難であった。したがって、従来の解析法では、膜表面の特定タンパク質の選択的検出や、一部の内包 miRNA を用いた疾患診断など、限られた情報のみしか利用できなかった。加えて、粒子径 30-150 nm 程度であるエクソソームを従来法ではさらに細かく分級・分取できなかったため、その粒子径効果や内包物の相関解析もできなかった。以上の理由から、エクソソームの粒子径・膜組成・内包物の総合的解析に基づく由来細胞判別・生体内動態解析は、当時極めて困難であった。

上記課題を解決するための新規基盤技術として、マイクロ・ナノ流路構造を組み合わせた「ナノ粒子精密分級デバイス」を提案した。また、標的分子特異的に結合する核酸(アプタマー)に着目して、ミクロスケール電気泳動フィルタリングに基づく「アプタマー高効率選抜デバイス」を提案し、エクソソームアプタマー選抜法確立を目指した。さらに、各種培養細胞由来エクソソームに対して得られた「アプタマー配列の機械学習解析」に基づく配列情報のリスト化・タグ化によって多次元かつ複雑な情報の簡略化を提案し、由来細胞判別の実現を志向した総合的研究を行った。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、エクソソームの由来判別・生体内動態解析の実現に必要な技術として、粒子

径分級法、アプタマー選抜法およびアプタマー配列解析法の開発に取り組んだ。

粒子径分級法として、マイクロ・ナノ流路を組み合わせたナノ粒子分級デバイスを作製した。流路内表面の電気二重層厚さ調整によって、負に帯電したナノ粒子が実効的に通過可能なナノ空間を制御して分級する「Tunable Nanogate」デバイスを提案・実証し、粒子径の小さいエクソソームの分取に成功した。また、Nanogate サイズを 30 nm 程度の範囲で制御可能であることを明らかにした。加えて、デバイスの再設計によって、単位時間あたり分級量の 10 倍以上の向上が達成された。

アプタマー選抜法として、ミクロスケール電気泳動フィルタリング法を応用した新奇アプタマー選抜法を開発・実証した。ポリアクリルアミドゲル部分充填キャピラリーデバイスを作製し、モデル標的分子である免疫グロブリン E (IgE) を捕捉、さらに電気泳動によってランダム配列核酸ライブラリを反応させ続け、高結合能核酸のみを濃縮・獲得することに成功した。得られた核酸群の次世代シーケンサ解析の結果、3 回の選抜で有意に選択的増幅された核酸群が発見された。結合能評価の結果、選抜した核酸は抗体と同程度の高い結合能と、標的分子特異性を示すことが証明された。そこで、エクソソーム膜タンパク質 (CD63) に同様の選抜を行った結果、1 回の選抜でもアプタマーを獲得可能であることが実証された。動物細胞 (HEK293) および植物細胞 (シロイヌナズナ) 由来エクソソームに対するアプタマー選抜と、その配列の差異解析も進行中である。

アプタマー解析法としては、既知の解析法の適用から開始した。配列全体の総合的な類似性に基づくクラスタリング (AptamCORE)、部分配列および二次構造に着目したスコアリング (SmartAptamer)、などの解析法を試し、それぞれの解析特性を確認した。これらの結果を受けて、エクソソームのような複雑系試料に対して選抜された混合アプタマーの配列解析方法について開発・検証中である。

## (2) 詳細

### 基盤技術開発 1. エクソソーム粒子径分級デバイスの開発

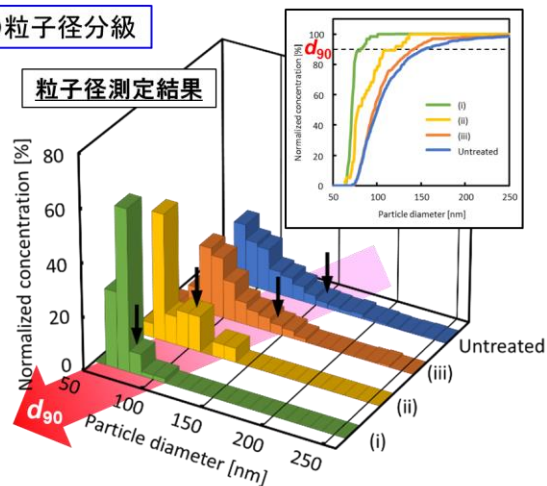
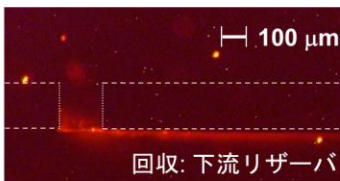
エクソソームを厳密に粒子径毎に分級してそのサイズ効果を評価可能とするため、従来法では困難であった粒子径 10~100 nm 粒子の精密分級の実現を目的として、新奇分級原理「電気二重層調整による Tunable Nanogate を用いたナノ粒子の精密分級法」を提案し、Tunable Nanogate 搭載型マイクロ・ナノ流路デバイスを森川響二郎氏 (東京大学・精華大学) とともに設計・作製した。原理検証用デバイスを用いてナノ粒子分級を試みた結果、溶液のイオン強度低下に伴う Nanogate サイズの低下が認められ、ポリスチレン製ナノ粒子の通過制御が達成された。さらに、HEK293 由来エクソソームについて粒子径分級を試みた結果、Nanogate サイズの段階的制御による約 30 nm 単位での精密分級が達成された。以上の結果から、Tunable Nanogate を用いたエクソソーム粒子径分級によって、粒子径がより小さいエクソソームのみを選択的に分取可能となったが、粒子径測定が可能な量のナノ粒子を分級するために 1 時間程度の操作を要する点が課題として残された。

## HEK293由来エクソソームの粒子径分級

### 1. 電気泳動前



### 2. ナノ流路通過



Fujiwara, S. Sueyoshi, K. et al., *Micromachines* 2020.  
*Micromachines* 2022 Best Paper Awards

そこで、Nanogate 数を 20 倍、さらにナノゲート側に粒子を押し付けるシース流れ形成用流路を追加したナノ粒子分級用デバイスを、森川氏とともに新たに設計・作製した。新デバイスを用いてナノ粒子およびエクソソーム分級を試みた結果、旧デバイスと比して単位時間当たり分級量が 10 倍以上向上された。現在、多段階分級デバイスの実現に向けたデバイス設計・作製を進めているところである。

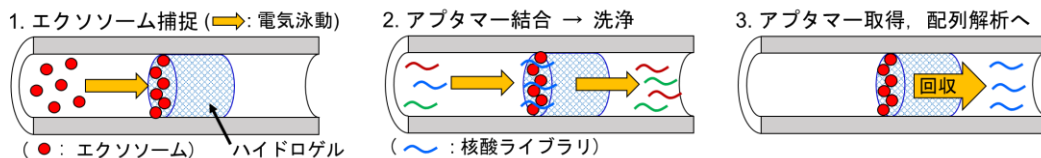
また、本さがけ研究において行われた「微粒子解析バトル」にて開始した、濱田隆宏氏（岡山理科大）との共同研究で提供いただいたシロイヌナズナ由来エクソソームの粒子径分級を行った結果、50~200 nm 程度での粒子径分布を示したエクソソームから、100 nm 以下のエクソソームを分級することに成功した。採取した小サイズエクソソームのプロテオーム解析や機能解析によって、今後、エクソソームの粒子径効果が明らかになるものと期待される。

## 基盤技術開発 2. エクソソームアプタマー高効率選抜デバイスの開発

アプタマーとは、特定標的分子のみと選択的に結合する核酸の総称であり、抗体よりも安価で化学的安定性に優れるため、次世代分子認識素子として期待されている分子である。近年では、そのセンシング応用も進められており、エクソソームに対して複数の膜タンパク質アプタマーを用いて染色した結果、エクソソームの由来によって結合するアプタマーに差異が見られるなどの報告もなされていた。また、アプタマーは、ランダム配列核酸群（核酸ライブラリ）と標的分子の混合溶液中から核酸-標的分子複合体のみを分離して増幅する操作を繰り返す SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) と呼ばれる手法によって進化工学的に選抜されている。そこで、複雑な組成を示すエクソソームに対して一括してアプタマーを選抜し、得られたアプタマーの配列を指紋やタグとして解析すれば、エクソソームの組成に関する個性を評価可能であると着想した。その実現のためには、長時間(1~2 か月)かつ熟練した選抜操作を要していた従来の SELEX から脱却した新奇アプタマー選抜法の開発が急務であった。そこで、開発を進めてきた「マイクロスケール電気泳動フィルタリング(Microscale Electrophoretic Filtering, MEF)」で捕捉された酵素がその活性(≒三次構造)を維持していることに着目し、MEF を用いた新奇アプタマー選抜法を着想した。

MEF に基づくアプタマー選抜法では、まずポリアクリルアミドゲルが部分的に充填されたガラスキャピラリー内に標的物質を電気泳動導入し、ゲルの分子ふるい効果によって標的物質を捕捉する。続いて、ランダム配列核酸を電気泳動導入し続けると、捕捉された標的物質に結合する核酸のみが捕捉界面に残留し、結合しない核酸は下流へと速やかに分離・除去される。そのため、従来の拡散異存の競合的結合反応とは異なり、結合能を示す核酸のみが高効率に濃縮される。さらに洗浄操作によって結合能の弱い核酸を除去した後、残存する強結合性核酸を回収すれば、それがアプタマー候補となる。

#### 電気泳動フィルタリングに基づくアプタマー選抜デバイス



提案した原理に基づく選抜を実証するため、ポリアクリルアミドゲル部分充填キャピラリーデバイスを作製し、モデル分子として蛍光標識免疫グロブリン G (IgG) を導入したところ、ゲルの上流界面に捕捉・濃縮される様子が確認された。続いて、免疫グロブリン E (IgE) を同様に捕捉した後、蛍光標識核酸ライブラリを電気泳動導入した結果、ゲル界面近傍において IgE 未捕捉時と比較して有意な蛍光強度の増加が観察された。また、洗浄液および溶離液の導入による段階的な蛍光強度減少が確認されたことから、結合性核酸の濃縮および回収の達成が示唆された。そこで、溶離液に対して PCR による核酸増幅を行い、生成物のゲル電気泳動を行った結果、想定される長さの核酸群が検出された。この PCR 生成物を新たな結合性核酸ライブラリとして、さらに 2 回の選抜操作を行った。そして、得られた生成物を次世代シーケンサ (NGS) で解析した結果、3 回の選抜操作で顕著に増幅される核酸が確認された。そこで、得られた核酸配列を基にアプタマー候補 1 および 2 を合成し、IgE および非標的タンパク質 (IgG, 牛血清アルブミン, BSA) との結合能評価を行った。その結果、両アプタマー候補共に核酸に比する結合能 (解離定数  $\sim 1$  nM) と非標的分子に対する特異性が確認された。開発したアプタマー選抜法は 1 サイクル 4 時間程度、3 サイクルでの選抜が可能であり、従来法と比して選抜時間の大幅な短縮 ( $\sim 1/10$ ) と操作の大幅な簡略化が実現された。さらに、エクソソーム膜タンパク質の 1 つである CD63 について、1 サイクルでのアプタマー選抜を試みた。その結果、既知のアプタマーと類似の配列を持つ候補が選抜され、その CD63 に対する結合能 ( $\sim 8.4$   $\mu$ M) と特異性が確認された。以上の結果から、開発した選抜法に基づく高効率アプタマー選抜が実証された。そこで、HEK293 およびシロイヌナズナ由来エクソソームに対して 3 ラウンドでのアプタマー選抜を行い、獲得したアプタマー候補についてその結合能を評価した。その結果、今回獲得したアプタマー候補はすべてどちらのエクソソームに対しても結合能を示し、由来細胞に対する特異性は得られなかった。その一方で、電気泳動分析の結果は、それぞれ異なる複合体の形成を示しており、由来の異なるエクソソームの共通性および多様性が示唆された。しかしながら、多様なエクソソームのアプタマー選抜・配列解析に対応するためには、より簡便かつ迅速な選抜法が必須である。現在、今後の研究加速のために、マイクロデバイス化によるさらなる簡便・迅速・高効率選抜デバイスの実現に向けて研究を進めているところである。

### 基盤技術開発 3. アプタマータグの機械学習解析法の開発

エクソソーム表面膜タンパク質の量や種類がエクソソームによって異なることが既に知られていたため、エクソソーム表面および内包成分に対してそれぞれのアプタマーを包括的に選抜できれば、そのアプタマー配列を基にエクソソームを推定できると考えた。そのためには、複数の標的分子に対して一括して選抜したアプタマーの配列解析を行う必要がある。そこで、まずは既存の解析法を用いて単純系および複雑系に対して選抜したアプタマー群の解析を行った。AptamCORE を用いた解析では、ランダム領域全体に対して相同性の高い配列群をクラスター化してカウントすることができ、サイクル数の進展に伴う特定配列の増幅を特に優位に検出可能であった。また、SmartAptamer を用いた解析では、配列の一部(モチーフ)を総当たりに解析してスコア化できるため、配列全体よりも部分構造に特化した解析が可能であった。アプタマー選抜のための核酸ライブラリは、30 または 40 塩基のランダム配列を含むものを用いているため、実験的に考えられる全配列は含まれておらず、全配列を総合的に評価する AptamCORE 的な解析手法よりも、モチーフを解析・発見できる SmartAptamer 的な解析手法の方が好ましいと想定された。これらの知見をもとに開発中の解析法によって、複雑系解析におけるスコア可視化を試みている。

### 3. 今後の展開

微粒子分級法については、特に小サイズエクソソーム群の高精度かつ高効率な選抜を行い、生体実験やプロテオーム解析に十分量のエクソソームの確保を目指す。また、得られた小サイズエクソソームのアプタマー選抜・解析によって、曲率変化や小サイズエクソソーム特異成分に応答する「粒子径応答性アプタマー」の取得を目指す。また、大サイズエクソソームの変形を伴うナノ流路通過を示唆するデータも得られており、その詳細の解明によって、3~5 年後には「ナノ粒子変形能(硬さ)」の新奇物性評価法へと展開できるものと期待される。他、ナノ粒子評価・分級法としての社会実装に向けて、同原理でより簡便に製作可能なデバイスの開発に取り組んでおり、3~5 年後には任意の粒子径のナノ粒子の多段階分級が実現できるものと期待している。

アプタマー選抜法については、原理検証段階の試作デバイスの時点で、従来法と比して選抜時間の大幅な短縮と操作簡略化が実現された。また、開発中のアプタマー選抜チップでは、さらなる選抜時間短縮と操作簡略化の実現が期待できる。これらの結果は、現在のアプタマー利用のボトルネックの解消に繋がり、抗体に代わる選択肢としてアプタマーを提案できる社会に貢献できる技術となり得る。今後の 3~5 年間でアプタマー選抜チップ関連技術を完成させ、その後の 10 年間で現在主流の抗体医薬品をアプタマー医薬品に置換できれば、その市販価格は 1/10 以下にでき、SDGs 第 3.8 項「ユニバーサル・ヘルス・カバレッジの達成」にも大きく貢献するものと期待される。

アプタマー解析法については、医療系研究者との共同研究が必要ではあるが、3~5 年後には健康者および罹患者由来生体試料のアプタマー群差分析によって、疾患関連アプタマーを発見できるようになる。そうすれば、未知の物質であっても発見した疾患関連アプタマーを用いて特異的に捕捉・濃縮して取得できるため、疾患マーカー探索に大きく貢献できるものと考えられる。また、現在の DNA チップやプロテインチップ、糖鎖解析チップなどは原理上

測定可能な成分が限定されるが、アプタマーは低分子から高分子まで多様な標的分子適用可能である。協力企業が必要にはなるが、3~5年後には、より汎用的な「健康診断チップ」の開発に適用できる可能性がある。その際にも、開発中の複雑系アプタマー解析法が大きく貢献できるものと期待される。

#### 4. 自己評価

##### 研究目的の達成状況

大きく分けて「ナノ粒子の精密分級法開発」、「簡便かつ迅速なアプタマー選抜法開発」「アプタマー群配列の機械学習解析」に取り組んできた。開発期間のうち約2年間はコロナ禍による研究制限があったため、全体的に研究計画の進行が遅れ気味であったことは否めない。ナノ粒子精密分級法については、原理実証から分級効率向上、エクソソームの精密分級までは達成されたが、次の段階としての多段階分級デバイス開発と分級後エクソソームの解析は現在取り組んでいるところである。アプタマー選抜法開発については、原理実証からその応用までは達成でき、現在エクソソームアプタマー選抜への適用とさらなる神速化・高効率化のためのマイクロデバイス化に取り組んで切るところである。

##### 研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

研究室に配属された学生と協力して、研究環境と研究体制を上手く構築できた。特に、コロナ禍の影響を大きく受けた2年度目、3年度目については、オンライン環境の構築やスケジュール管理の徹底を行い、研究遅延を最小限に食いとどめることができた。加えて、本さきがけ研究内の企画「微粒子解析バトル」によって、濱田隆宏氏との共同研究「植物由来エクソソーム解析」を立ち上げ、実際の生体由来エクソソーム解析を実施可能となった。他、研究室を共同主催している久本秀明氏、遠藤達郎氏との協力体制も依然として問題なく進められた。また、必要に応じて学内・学外の共同利用研究設備を利用した解析を進められたことに加え、本研究で開発した技術を基にした企業との共同研究も新たに開始できた。

研究費執行状況について、概ね計画通りに遂行できたが、コロナ禍の影響が大きかった2年度目、3年度目については、出張旅費の大幅な低下や消耗品使用料の減少による残額が生じた。しかしながら、コロナ禍の影響が軽減された最終年度には、遅れを取り戻すために研究に尽力した結果、概ね計画通りの予算執行が進んでいる。

##### 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果※「今後の見込み」

微粒子分級法については、生体内におけるエクソソームの粒子径効果の評価に適用可能なほか、ナノDDSの極小化などにも適用可能であると考えている。また、「ナノ粒子変形能(硬さ)」の新奇物性評価法へと展開が進めば、「硬さ」の差異が取り込み機構に与える影響などの評価に繋がり、より効果的なナノDDSキャリアの創成に繋がる可能性がある。

アプタマー選抜法については、特に開発中のアプタマー選抜チップによるさらなる選抜時間短縮と操作簡略化の実現が期待できる。現在のアプタマー利用のボトルネックである選抜難易度の高さが解消されれば、抗体に代わる分子認識素子としてアプタマーが利用される社会に繋がるものと期待される。特に抗体からアプタマーへの置換によって標的医薬品の製造に係るコストを1/10以下にできるため、より安価な医薬品開発が実現され、SDGs第3.8項

「ユニバーサル・ヘルス・カバレッジの達成」にも大きく貢献するものと期待される。

アプタマー解析法については、健常者および罹患者由来生体試料のアプタマー群差分析に基づく疾患関連アプタマーの発見によって、未知の疾患マーカー探索に大きく貢献できるものとする。また、現在の DNA チップやプロテインチップ、糖鎖解析チップよりも多様な標的分子に対応可能で汎用的な「健康診断チップ」の開発に適用できる可能性がある。

## 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:7件 (+ 投稿中1件, 投稿準備中2件)

1. Satoko Fujiwara, Kyojiro Morikawa, Tatsuro Endo, Hideaki Hisamoto, Kenji Sueyoshi. Size sorting of exosomes by tuning the thicknesses of the electric double layers on a micro-nanofluidic device. *Micromachines*. **2020**, *11*, 458-469.

#### 概要

従来法では困難であったエクソソームを含む 100 nm 程度のナノ粒子の精密分級を実現するため、電気二重層の厚さ制御に基づく Nanogate サイズ調節機構を持つマイクロ・ナノ流路デバイスを開発した。作製したデバイスでは、簡便な溶液調整操作のみでナノ粒子の通過・非通過制御が実現されたほか、エクソソーム試料の分級に適用した際には約 30 nm 単位での粒子径分級制御が達成された。

2. Junku Takao, Tatsuro Endo, Hideaki Hisamoto, Kenji Sueyoshi, Direct measurement of initial rate of enzyme reaction by electrokinetic filtration using a hydrogel-plugged capillary device. *Analytical Sciences*. **2021**, *37*, 1439-1446.

#### 概要

酵素活性の簡便かつ迅速な評価のため、ハイドロゲル部分充填デバイスを用いた酵素反応初速度の直接測定法を開発した。作製したデバイスでは、酵素がゲル界面近傍の非常に狭い領域に捕捉され、基質分子はその領域を通過するわずかな時間だけ酵素と反応する。測定の結果、ゲルの分子ふるい効果で捕捉された酵素は、その活性(三次構造)を維持した状態であることが示唆された。本発見が、さきがけ研究に繋がる大きな知見となった。

3. Junku Takao, Reina Nagai, Tatsuro Endo, Hideaki Hisamoto, Kenji Sueyoshi, Aptamer selection based on microscale electrophoretic filtration using a hydrogel-plugged capillary device. *Molecules*. **2022**, *27*, 5818-5832.

#### 概要

アプタマーとは、標的分子特異的に結合する核酸である。長時間かつ煩雑な操作を要する従来のアプタマー選抜法の課題を解決するため、ハイドロゲル部分充填デバイスを用いたアプタマー選抜法を開発した。モデル試料として免疫グロブリン原理検証の結果、従来法と比して 1/10 の選抜時間、電気泳動のみの簡便な操作で、抗体に比する結合能と特異性を示すアプタマーの選抜が達成された。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 1 件申請予定 (特許公開前のものも含む)

1	発 明 者	
	発 明 の 名 称	
	出 願 人	
	出 願 日	
	出 願 番 号	
	概 要	
2	発 明 者	
	発 明 の 名 称	
	出 願 人	
	出 願 日	
	出 願 番 号	
	概 要	

(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)

Invited: The international Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (Pacifichem 2021) (online), Section: New Advances in Microscale Liquid Phase Separations (2021.12)

Kenji Sueyoshi, “Aptamer Selection Based on Microscale Electrophoretic Filtration”

Invited: Capillary Electrophoresis in the Biotechnology & Pharmaceutical Industries: Symposium on the Practical Applications for the Analysis of Proteins, Nucleotides & Small Molecules (CE Pharma 2022) (Portland, OR, USA) (2022.9)

Kenji Sueyoshi, “Aptamer Selection Using a Microscale Electrophoretic Filtration Device”

Invited: Royal Society of Chemistry-Tokyo International Conference 2022 (RSC-TIC 2022) (Tokyo, Japan) (2022.12)

Kenji Sueyoshi, “Microscale Electrophoretic Separation for Aptamer Selection”

依頼講演: 第 60 回生体医工学会大会・第 36 回日本生体磁気学会大会 (2021.6)

末吉健志「核酸アプタマー選抜・解析に基づく生体由来夾雑系試料の評価法開発」

講演: 第 95 回日本生化学会大会, さきがけ「生体における微粒子の機能と制御」第 5 回成果報告会 ~体内外微粒子の挙動から見えてくる世界~ (2022.11)

末吉健志「エクソソームの由来判別・生体内動態解析のための粒子径分級およびアプタマータグ選抜・解析法の開発」

受賞: Micromachines 2022 Best Paper Awards

Satoko Fujiwara, Kyojiro Morikawa, Tatsuro Endo, Hideaki Hisamoto, Kenji Sueyoshi. “Size sorting of exosomes by tuning the thicknesses of the electric double layers on a micro-nanofluidic device”

他, 国際学会発表 3 件, 国内学会発表 35 件 (指導学生の発表含む)