

単一ナノ粒子計測を可能にするエクソソームアレイチップを世界で初めて開発 ～エクソソームの個性を調べる新たなプラットフォーム技術～

1. 発表者：

- 一木 隆範（東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 教授 / 川崎市産業振興財団 ナノ医療イノベーションセンター ラボ長）
倉持 宏実（東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 特任研究員）
大久保 喬平（東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 博士研究員(研究当時) / 現：東京理科大学 助教）
横田 秀輔（東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 修士課程 2年生(研究当時)）
岩谷 晶子（東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 修士課程 2年生）
土屋 章一（川崎市産業振興財団 ナノ医療イノベーションセンター 研究支援専門職員）

2. 発表のポイント

- ◆ 単一ナノ粒子計測を可能にするエクソソーム（注 1）アレイチップの開発に成功し、最先端の半導体加工技術で、エクソソーム付着スポット（直径 200 nm）を 1 mm²あたり 10,000 個の高密度アレイ状に配列しました。
- ◆ がん細胞などに由来するエクソソームを約 100 nm の位置精度で付着スポット上に個々に付着させ、由来細胞の違いによる変形能の差を一つ一つ測定できる新たなプラットフォーム技術を確立しました。
- ◆ エクソソームの多様性の解明、早期がん診断や、新たな医薬・治療法開発などへの応用が期待されます。

3. 発表概要：

東京大学大学院工学系研究科の一木隆範教授らは、単一ナノ粒子計測を可能にするエクソソームアレイチップを世界で初めて開発しました。マイクロ流体デバイスと組み合わせ、従来の手法では集団の特性しか測れなかったエクソソームを個別に計測できる、新たなプラットフォーム（図 1）を実現しました。

がん診断のバイオマーカー候補のエクソソームには多様性があり、個別の評価が必要ですが、ナノ粒子を一つ一つ計測する手法はほとんどありません。本研究では、生化学・医学研究で幅広く用いられるマイクロアレイ（注 2）製造技術を最先端の電子線描画法（注 3）で格段に高精度化し、エクソソームを付着できる直径 200 nm（ナノメートル、10⁻⁹メートル）のスポットを、シリコン基板上に 1 mm²（平方ミリメートル）に 10,000 個の高密度に形成しました。

流体デバイスでがん細胞などに由来するエクソソームを供給すると、約 100 nm の位置精度でスポット上に付着できます。これを原子間力顕微鏡（注 4）で測定した結果、由来細胞の違いで変形能に差があることを見出しました。このアレイプラットフォームは、単一粒子計測・解析に基づく新たな個別化医療技術や早期がん検出技術への応用が期待されます。

4. 発表内容：

【研究の背景】

エクソソームは血液や尿などの体液中に存在し、さまざまな細胞から分泌されるナノサイズの粒子で、細胞間コミュニケーションを担うと考えられています。特に内包されているマイクロ RNA はがん検出のバイオマーカーとしての利用が期待されています。医療材料としてドラッグデリバリーなどへの利用が期待されると同時に、エクソソームには多様性があることが明らかになりつつあります。

多数のエクソソームを個別に調べなくてはそれぞれの特性が分かりませんが、従来の技術ではエクソソーム集団の特性を計測する技術で、一つ一つのナノ粒子を計測・解析する手法はほとんどないため、どのように特性が異なるのか、詳細は分かっていません。そのため、ナノ粒子のさまざまな特性を個別に、かつ、多項目に渡って効率よく計測できる技術が求められていました。

エクソソームの多様性を詳しく知れば、エクソソームの分類・分離技術の開発・医療材料としての評価ができると期待されます。

【具体的な研究内容・成果】

本研究グループは、生物学・医学・薬学の研究で幅広く利用されている DNA マイクロアレイの技術を、最先端の半導体加工技術である電子線描画法で格段に高精度化し、高密度ナノアレイチップを作製しました。さらに、このアレイチップをマイクロ流体デバイス技術と組み合わせ、個別にエクソソームを計測できる単一ナノ粒子計測アレイプラットフォームを確立しました。本技術のポイントとして、下記の点が挙げられます。

1. 電子線描画法による高精度なアレイ構造：アレイのスポットサイズを 200 nm に微細化し、シリコン基板上に高密度 (1 mm²に 10,000 個) に配置。
2. 膜タンパク質 (注 5) によらない付着：アレイスポットを脂質分子で修飾してエクソソームを付着させるため、生体ナノ粒子解析プラットフォームとして高い汎用性あり。
3. ナノアレイチップとマイクロ流路の組み合わせ：アレイチップへのエクソソーム供給条件を制御し、付着スポット上に約 100 nm の精度で個々のエクソソーム粒子を付着。

大きさ 100 nm 程度のエクソソームを個々にアレイ状に並べるには、ナノ粒子を精度よく付着させる技術を開発しなくてはなりません。従来の DNA アレイチップは、直径数十 μm (マイクロメートル、10⁶ メートル) のスポットをフォトリソグラフィ技術でガラス上に作り、スポット内に多数の DNA を付着させます。本研究では、電子回路作製に用いられる電子線描画法を利用して、アレイのスポットサイズを 200 nm にし、高密度 (1 mm²に 10,000 個) に配置しました。

一般的に、エクソソームをアレイチップ表面に付着させる場合、特定の抗体でチップ表面を修飾し、特定の膜タンパク質を持つエクソソームだけを捕捉します。本研究では、高価な抗体を用いず、安価な脂質分子でアレイスポットを化学修飾しました。抗体と膜タンパク質の相互作用によるエクソソーム捕捉に比べ、多種多様なエクソソームを捕捉できます。

アレイチップをマイクロ流体デバイスに取り付けてエクソソームを含む溶液を供給すると、エクソソームがナノスポット上に付着します。エクソソームが付着したアレイチップを流体デバイスから取り出すと、さまざまな分析手法で、付着した個々のエクソソームの物性を計測することができます。今回、がん細胞などに由来するエクソソームを、ナノアレイチップ上に付着させ、原子間力顕微鏡で個々のサイズを測定しました。その結果、由来細胞が違っていると、付着したエクソソームの変形能に差があることを見出しました。

【研究成果の重要性】

エクソソームの高密度アレイをベースとする新たなプラットフォームは、これまで不可能だった単一ナノ粒子の計測・解析を実現します。さまざまな分析技術と組み合わせれば、個々のエクソソーム内部にあるマイクロ RNA や膜表面特性に関する情報を多元的に得られます。また、生体を構成する多数の分子を網羅的に調べるオミックス解析や、機械学習との融合にも有利だと考えられます。

エクソソームの多様性に関する理解が進めば、病理との関係性が分かるだけでなく、エクソソームの分類・分離技術の開発・特性のばらつき評価などが可能になり、生体材料としての品質管理技術や、エクソソーム治療薬の開発に大きく貢献すると期待されます。

なお、本成果は米国のオンライン科学誌「PLOS ONE」（米国東部時間：2019年10月24日）に掲載されました。

5. 発表雑誌：

雑誌名：PLOS ONE（2019年10月24日(EST)オンライン）

論文タイトル：Extracellular vesicles nanoarray technology: Immobilization of individual extracellular vesicles on nanopatterned polyethylene glycol-lipid conjugate brushes

著者：Shusuke Yokota, Hiromi Kuramochi, Kyohei Okubo, Akiko Iwaya, Shoichi Tsuchiya, and Takanori Ichiki

DOI 番号：10.1371/journal.pone.0224091

6. 問い合わせ先：

東京大学 大学院工学系研究科 マテリアル工学専攻
教授 一木 隆範（いちき たかのり）

7. 用語解説：

（注1） エクソソーム

エクソソームは血液や尿などの体液中に存在し、さまざまな細胞から分泌される細胞外小胞の一種で、脂質二重膜でできているナノサイズ（30-150 nm）の粒子です。表面には特定の膜タンパク質が存在し、内部にはタンパク質・DNA・マイクロ RNA などを含んでいます。細胞間コミュニケーションを担うなど、生体内で多くの役割を持つと考えられています。バイオマーカーとしての機能が注目され、近年、生体内での機能の解明が急速に進んでいます。

（注2） マイクロアレイ

計測の対象物を基板表面上に多数付着させておき、一度に広範囲で多面的に検査する技術の総称。塩基配列の異なる DNA を基板表面上に付着したものは特に DNA マイクロアレイと呼ばれます。

（注3） 電子線描画法

代表的な半導体加工技術で、電子回路を集積化した半導体チップの製造技術として発展してきました。

目に見えない非常に微細なパターンや構造を形成することができます。

(注4) 原子間力顕微鏡

非常に細い針で試料表面を走査しながら、針先端と表面の原子の間に働く力の変化を計測し、微細な表面構造を可視化する顕微鏡です。

(注5) 膜タンパク質

細胞や細胞小器官などの生体膜（脂質二重膜）に付着しているタンパク質分子の総称です。エクソソームの脂質二重膜には、テトラスパニンなどの特定の膜タンパク質が存在することが分かっており、抗体との反応で調べられます。

8. 添付資料：

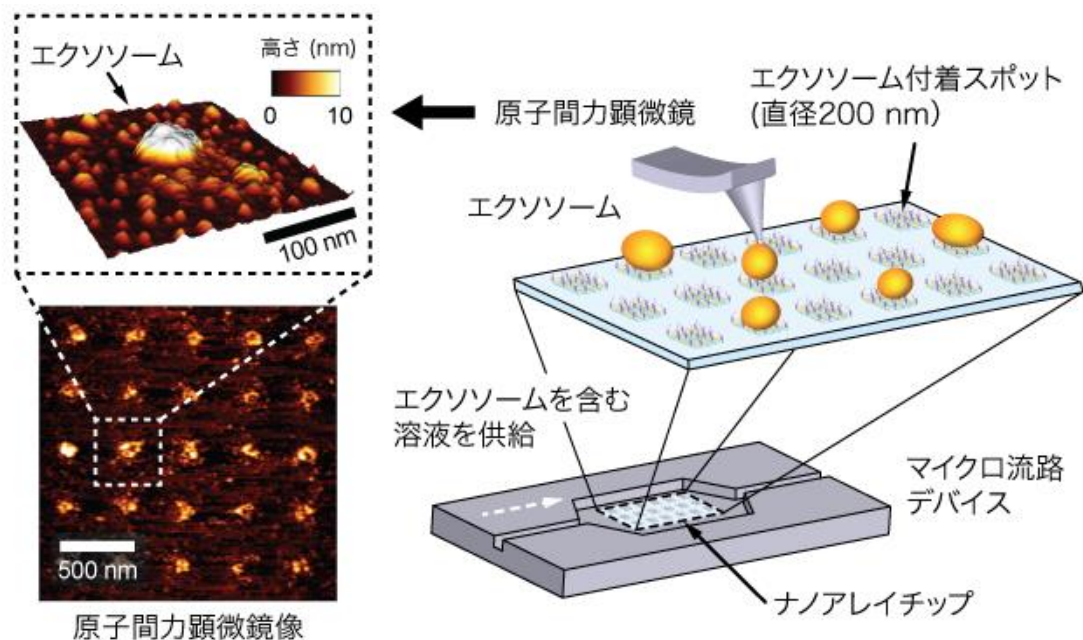


図1 本研究で開発した、エクソソームを平面配列化するナノアレイプラットフォーム
ナノアレイチップ表面には、脂質分子が修飾された付着スポットが高密度に形成されています。
マイクロ流路デバイスにナノアレイチップを取り付けて、エクソソームを含む溶液を流すと、
スポット上にエクソソームが付着します。デバイスからナノアレイチップを取り出せば、原子
間力顕微鏡などを用いて、エクソソームの個別解析が可能です。