

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「細胞外微粒子に起因する生命現象の解
明とその制御に向けた基盤技術の創出」
研究課題「多次元・ネットワーク化計測による細胞
外微粒子の多様性と動態の解明」

研究終了報告書

研究期間 2019年10月～2025年03月

研究代表者：太田 禎生
(東京大学 先端科学技術研究
センター 准教授)

§1 研究実施の概要

(1)実施概要

本研究では、1EV 粒度(アプローチ①)と、1細胞や1細菌の粒度(アプローチ②)で開発しました。そしてこれらを応用した高精細な統合解析により、EV の新分類法の開発と、多様な細胞-細菌-EV の相互作用と EV 動態・役割の解析を行いました。

- 1EV 粒度(アプローチ①)
 - 太田グループを中心に、微粒子解析に最適化した光流体計測系と、機械学習を用いた新たな微小信号解析手法の融合により、約 10 万粒子毎秒のスループットで、直径 30nm 以下の微粒子を、大規模に検出・解析できる EV アナライザーを開発しました。吉岡グループや小嶋グループの提供する様々な EV サンプルを使い、煩雑な濃縮作業をしない血清中の非精製細胞外微粒子の高感度検出、がん診断マーカーの高精度な検出・診断を実証しました。
 - 太田グループと吉岡グループの共同研究により、三次元流体フォーカスによる微粒子整列、光学計測とリアルタイム解析、高速なマイクロ液滴分取デバイスを組み合わせる事により、光学特性に基づいた高速 EV ソーターの開発に成功しました。標準ナノ粒子のソートを検証し、EV サンプルのソートを実証しました。
 - 太田グループを中心に、高速なラベルフリー計測を統合した EV・細菌解析技術を開発しました。菌株の分類と抗生物質応答を解析し、疾患診断の適用性を検証しました。由来を予測する非標識 EV 解析の可能性を発見しました。
- 1細胞や1細菌の粒度(アプローチ②)
 - 太田グループを中心に、光学核酸バーコーディング法による、並列なイメージングと遺伝子発現のマルチモーダル1細胞計測と解析を実証しました。また、世界最高流速、世界最高スループット三次元イメージングサイトメトリー技術を開発しました。さらに微小ハイドロゲル細胞培養技術と組み合わせ、三次元細胞モデル解析へと発展させ、実証しました。
 - 太田グループと吉岡グループを中心に、液滴操作と液滴内細胞培養を融合し、1細胞単位での EV 動態解析技術を開発し、細胞分裂と EV 分泌動態の関わりを発見しました。さらに小嶋グループの準備した細胞にも本解析を適用するのと並行して、小嶋グループでは gRNA でバーコード化した細胞外小胞(EV)を用いることで、EV の放出を制御する因子を包括的に解析する技術を実証しました。これにより、EV 放出に関わる機構理解の深化に思考しました。
 - 太田グループと長谷グループの共同研究を通して、細菌と細胞間の微粒子を介したコミュニケーションの解析系の基盤を開発しました。長谷グループを中心としたバルク系での相互作用解析を進める一方で、液滴内でハイドロゲル技術を用いた細菌-細胞間の微粒子コミュニケーション解析系のワークフローを開発しました。現在、大規模な細菌ライブラリーを用いた網羅的解析の実証を目指し、研究を続けています。

(2)顕著な成果

＜優れた基礎研究としての成果＞

1. ラベルフリー解析による生体微粒子分析可能性の開拓

概要:EV や MV、細菌や細胞に対する光流体デバイスにラベルフリー光学計測能を実装し、分類解析技術を開発しました。これにより、細菌分類を実現することに成功し、医療診断や表現型解析への応用可能性を実証しています(論文投稿準備中)。さらに、本解析技術を大量 EV 解析に適用することにより、細菌や細胞由来の微粒子や夾雑物との違いを見出し、由来を見分けられる可能性を示しました。さらには、腫瘍マウス血清由来に優位な EV を見出しており、新たなバイオマーカーとなる可能性を発見し、これを検証しています。

2. 大量の細胞に対する1細胞レベルでの EV 放出動態解明

概要:新規開発した液滴アレイ化技術基盤と蛍光タンパク標識 EV を分泌する細胞株を用いて、長時間にわたって多数の1細胞 EV 分泌動態観測を行い、EV 分泌動態が細胞ごとに異なる多様性を確認し、さらに細胞分裂時に EV 分泌量が上がることを発見しました (Hattori, Ota et al., *Anal Chem* 2022)。得られた知見は、3 の小嶋 G の研究にも生かされ、内在性 EV 放出機構の理解を深化させました。

3. gRNA バーコード化 EV を活用した EV 放出制御因子の網羅的解析技術の確立

概要:小嶋 G を中心として、CRISPR gRNA でバーコード化した細胞外小胞(EV)を用いることで、EV の放出を制御する因子を、特定の亜集団(subpopulation)選択的に、包括的に解析する技術を開発することに成功しました(Kunitake, Kojima* et al, 代表的論文(3))。これにより、これまで知られていなかった EV 放出制御因子や、CD63+ EV, CD9 EV+の放出制御の違いなどが明らかとなりました。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. ハイスループットな1細胞解析技術の開発

概要:三次元またはマルチモーダルな細胞解析技術を開発しました。世界最速 2,000 細胞毎秒以上のスピードを有する三次元画像サイトメトリー技術(特許出願済、*Small Science* 2022, *Small Methods* 2023)と、従来比で二桁速い 10 メートル毎秒以上の細胞速度で計測する三次元画像サイトメトリー技術を開発しました(特許出願済、*Biomed Opt Express* 2022)。さらに、世界で初めて浮遊させた細胞・ユニット毎に、イメージングと遺伝子発現計測を多角的・並列に行う新規マルチモーダル解析技術を実証しました(特許出願済、*Adv Opt Mat* 2024)。

2. ハイスループットな1EV 解析技術の開発

概要:世界最速・高感度な EV アナライザーを実現しました。新たに、背景ノイズを学習することで、ノイズに埋もれていた微弱な散乱光信号を回復する教師なし機械学習デノイズ技術を開発し(特許出願中)、ナノ粒子の検出に特化して開発した流体・光学計測ハードウェアと融合した結果、約数十万イベント毎秒の速度で 27nm の微小標準粒子を検出する、スループットと感度を両立した装置の開発に成功しました(Iwamoto et al, *Nature Communications*, 2025)。本技術は実用化を進めています。

3. ハイスループットな EV ソーター技術の開発

概要:世界初の高速 EV ソーターを開発しました。微粒子整列音響フォーカシング流体技術の開発(Ugawa M, *Analyst* 2021) (Tsuyama Y, *Sens. Actuators B Chem* 2022)や世界最高速 40000 液滴/秒の液滴ソーティング技術の開発と検討を経て、EV 整列、光学検出、液滴ソーターとのタイミング合わせのための信号処理を融合して(特許出願済)、EV 由来の蛍光信号に基づく高速選別、液滴から EV 膜組成を保持したまま非破壊的に回収を検証しました(論文投稿準備中)。

< 代表的な論文 >

1. Ugawa M, Ota S*, High-throughput parallel optofluidic 3D-imaging flow cytometry, *Small Science*, (2022)

概要:単一対物レンズライトシート顕微鏡とマイクロ流体音響整列技術を併用し、既報よりも一桁速い世界最速 2,000 細胞毎秒以上のスループットを有する多色蛍光三次元画像フローサイトメトリー技術を開発しました。数分で計測された数十万細胞の画像に対して、新規開発した画像解析アルゴリズムを適用し、分裂中の細胞の核三次元画像を迅速に解析し、二次元画像に対して優位に高精度な解析が行える有用性を実証しました。さらに、ハイドロゲル上に培養した 3D 細胞モデルの計測を行い、三次元画像解析を実証しました(*Small Methods*, 2024)。

2. Koki Kunitake, Tadahaya Mizuno, Kazuki Hattori, Chitose Oneyama, Mako Kamiya, Sadao

Ota, Yasuteru Urano, Ryosuke Kojima* Barcoding of small extracellular vesicles with CRISPR-gRNA enables comprehensive, subpopulation-specific analysis of their biogenesis/release regulators, *Nature Communications* 2024.

概要: CRISPR gRNA でバーコード化した細胞外小胞(EV)を用いることで、EV の放出を制御する因子を、特定の亜集団(subpopulation)選択的に、異なった形で寄与する可能性が高い遺伝子群やシグナル伝達系を抽出し、siRNA や阻害剤を細胞に適用した時の各 EV の放出量を検討しました。これにより、これまでに知られていなかった EV 放出制御因子や、CD63+ EV, CD9 EV+ の放出制御の違いなどが明らかとなりました。

3. Yuichiro Iwamoto†, Ben Salmon†, Yusuke Yoshioka, Ryosuke Kojima, Seung Wuk Lee, Alexander Krull*, Sadao Ota*, High throughput analysis of rare nanoparticles with deep-enhanced sensitivity via unsupervised denoising, *Nature Communications*. 2025.

概要: 深層学習を用いた教師なし1次元デノイズ技術を開発し、ナノ粒子検出のために最適化した光学・流体検出ハードウェアと融合することにより、毎秒 10 万粒子以上の検出速度、30nm 以下の PS ビーズを検出する高感度、そして 100 万粒子を超える大規模検出能を両立した、Deep Nanometry 法を実現した。この手法を用いて、非精製血清から直接疾患 EV を検出するだけでなく、がん患者血清(精製)から陽性 EV を優位に検出できることを実証しました。

§ 2 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

①太田グループ(研究機関別)

研究代表者: 太田 禎生 (東京大学先端科学技術研究センター 准教授)

研究項目

- 新規多次元 EV 解析技術の開発
- 新規多次元サイトメトリーの開発
- 新規1細胞 EV 解析技術の開発

②吉岡グループ(研究機関別)

主たる共同研究者: 吉岡 祐亮 (東京医科大学医学総合研究所 講師)

研究項目

- EV 放出動態を可視化するモデル細胞系を開発
- 細菌由来の membrane vesicle (MV)の回収方法の検討、解析

③長谷グループ(研究機関別)

主たる共同研究者: 長谷 耕二 (慶應義塾大学薬学部 教授)

研究項目

- 細菌由来の membrane vesicle (MV)の回収方法の検討、解析

④小嶋グループ(研究機関別)

主たる共同研究者: 小嶋 良輔 (東京大学大学院医学系研究科 准教授)

研究項目

- バーコード化 EV と次世代フローサイトメーターの協奏利用による EV 研究の新展開

⑤末吉グループ(研究機関別)

主たる共同研究者: 末吉 健志 (学校法人北里大学理学部化学科 教授)

研究項目

- アプタマー修飾ハイドロゲルビーズを用いた選択的な EV 迅速捕捉・濃縮・回収・機能解析手法の開発

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- Alexander Krull (University of Birmingham・教師なしデノイズ技術の開発) (太田)
- 野村暢彦、豊福雅典、Andrew Utada (筑波大学・細菌間相互作用の研究) (太田)
- 星野歩子教授 (東京大学) との細胞外微粒子解析に関する共同研究 (太田)
- 岡本章玄 (国際ナノアーキテクストニクス研究拠点・MV 内核酸の解析) (長谷)
- 今見考志 (理化学研究所・MV のプロテオーム解析) (長谷)
- 山野友義 (金沢大学・改変 EV の作成) (小嶋)
- 佐藤好隆 (名古屋大学・ウイルス放出機構の解析) (小嶋)
- 安井隆雄 (改変 EV の提供, EV 尿中移行の解析) (小嶋)
- 高橋暁子 (がん研究会、EV 改変プラスミドの提供) (小嶋)
- 佐藤雄介先生 (東北大学・エクソソームの脂質パッキング欠損選択的結合アプタマーの選抜・解析に関する共同研究) (末吉)
- 渡部徹郎 (東京医科歯科大学、腫瘍血管新生と EV に関する共同研究) (吉岡)
- 高谷里依子 (千葉大学、小児肥満と血中 miRNA の関連に関する共同研究) (吉岡)
- 照沼篤 (筑波記念病院、間葉系幹細胞 EV の内包物比較に関する共同研究) (吉岡)
- 菊地信介 (旭川医科大学、末梢動脈疾患の EV-miRNA バイオマーカーの開発) (吉岡)
- 北村俊雄 (東京大学、骨髄異形成症候群における EV 機能解析) (吉岡)
- 藤田雄 (慈恵医科大学、COVID-19 の重症化予測マーカーの開発) (吉岡)
- 松崎潤太郎 (慶應義塾大学、動脈硬化性疾患における EV-miRNA マーカー開発) (吉岡)