

研究終了報告書

「細胞外小胞の網羅的捕捉と機械的解析による miRNA 分泌経路の解明」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：安井 隆雄

1. 研究のねらい

細胞外小胞は、その内部に遺伝子発現を制御する microRNA (miRNA) 等の核酸が、その表面には細胞取り込みの選択性を決定する膜タンパク質が存在しており、細胞間や個体間、生体システム全体の情報伝搬物質として封筒のような役割(手紙:miRNA、切手:膜タンパク質)を機能していることが知られている。特に、がんに関連する一連の生物学的な生命現象においては、「細胞外小胞による臓器特異的ながん転移ニッチ形成」「細胞外小胞によるがん細胞の休眠状態誘導」「細胞外小胞による脳血管門破壊」「細胞外小胞による正常細胞がん化」と様々な関与が報告されている。これら研究では、がん細胞の情報伝搬物質である細胞外小胞が、血流による体内循環と細胞外小胞の表面の膜タンパク質を介して受容細胞に取り込まれ、受容細胞内で細胞外小胞に内包される機能性 miRNA が機能し、細胞外小胞に惹起される生体応答が生じていると考えられている。当該研究手法では、超遠心法による細胞外小胞の回収を行い、受容細胞への取り込みによる機能確認と標的 miRNA の探索が行われてきた。しかし、超遠心力による捕捉効率の低さ(~30%)により、生成過程「がん細胞がどのような機能性 miRNA を持つ細胞外小胞を生成しているのか?」、機能発現過程「取り込まれた機能性 miRNA はどんな機能を保持しているのか?」、分解排泄過程「排泄される細胞外小胞の miRNA は診断バイオマーカーとして利用可能なのか?」について、本質的に理解が遅れている。本研究は、細胞外小胞の網羅的捕捉技術と細胞外小胞 miRNA の選択的抽出技術、細胞外小胞 miRNA プロファイルの機械学習解析技術を開発し、細胞外小胞を介した miRNA 分泌経路の解明をねらいとした。

本研究では、ナノワイヤを用いた細胞外小胞の網羅的捕捉技術と細胞外小胞 miRNA の選択的抽出技術、miRNA プロファイルの機械学習解析技術を開拓し、従来までの超遠心法ではその捕捉効率の低さにより見出すことが困難であった、がん発生に伴う細胞外小胞の生成・機能発現・分解排泄過程時の miRNA 分泌経路の解明を行う。具体的には、生成過程に相当する「腫瘍中 miRNA/腫瘍が放出する細胞外小胞 miRNA」、機能発現過程に相当する「血中細胞外小胞 miRNA」、分解排泄過程に相当する「尿中細胞外小胞 miRNA」のプロファイルの解析を行う。解析により見出される miRNA 群を用い、がん由来 miRNA の情報に基づいて、各種がん患者の尿中細胞外小胞の miRNA プロファイル比較より、尿中細胞外小胞 miRNA に基づいた診断技術への展開も行う。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、研究テーマ A として、網羅的に細胞外小胞を捕捉する技術、そして、EV-miRNA のみを選択的に抽出する技術の開発を行った。また、研究テーマ B ではモデル検体となるマウ

ス臨床検体を使ったがん関連 miRNA プロファイル取得、研究テーマ C ではヒト検体のがん関連 miRNA 分泌経路の機序解明と診断バイオマーカーへの展開へと展開した。

研究テーマ A においては、ナノワイヤの酸化物の材質検討からはじめ、ZnO とナノワイヤの材質を定めた。次に ZnO ナノワイヤの形態や結晶構造と細胞外小胞の捕捉効率に影響を及ぼすことを明らかとした。ナノワイヤの材質、形態、結晶構造を決定し、その後、ZnO ナノワイヤをマイクロ流路と組み合わせ、細胞外小胞の網羅的捕捉技術の開発による尿中細胞外小胞の網羅的捕捉を達成した。

研究テーマ B においては、脳腫瘍に由来する細胞外小胞が尿中に出てきていることの実証を行った。尿中にて脳腫瘍細胞由来の細胞外小胞の追跡を行った。脳腫瘍に由来する細胞外小胞が尿まで到達していることを確認した。

研究テーマ C においては、尿中 miRNA あるいは尿中細胞外小胞のみの miRNA の診断・治療・薬効バイオマーカー候補探索へと展開した。名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科（夏目敦至先生）と共同で、脳腫瘍患者の尿検体や、非脳腫瘍患者の尿検体に含まれる miRNA を解析し、脳腫瘍の尿中マーカーの探索を行った。脳腫瘍患者に由来するオルガノイドが分泌する特徴的な miRNA を含む細胞外小胞は、尿中に安定して存在していると考えられた。また、尿中 miRNA を用いる診断モデルは、脳腫瘍の悪性度や大きさを問わず、正確に診断可能であることが実証された。

(2) 詳細

【研究テーマ A: 細胞外小胞 miRNA の選択抽出技術の開発】(論文 2, 論文 3)

本提案において、細胞外小胞 miRNA の選択抽出技術は、最終目標とする細胞外小胞により惹起されるがん関連 miRNA 分泌経路の機序解明に必須の技術である。これまでの研究では、細胞外小胞の捕捉効率を優先するため、細胞外小胞 miRNA (EV-miRNA) と細胞外小胞外の free-floating miRNA (EV free-miRNA) のどちらも捕捉していた。例えば、体液サンプルを導入すると、体液中 (pH = 4~7) で表面が負に帯電する細胞外小胞と miRNA が、体液中で表面が正に帯電するナノワイヤ表面に捕捉される。その後、細胞外小胞の破碎液 (lysis buffer) を導入すると、EV-miRNA と EV free-miRNA が回収される。本研究テーマでは、網羅的に細胞外小胞を捕捉する技術、そして、EV-miRNA のみを選択的に抽出する技術の開発を行った。

本研究の基盤技術である、ナノワイヤを用いた細胞外小胞の網羅的捕捉技術は、ナノワイヤの表面電荷によって細胞外小胞を捕捉できることが大きな特徴である。細胞外小胞は密度やサイズ、表面電荷、表面の膜タンパク質などの生物・化学・物理学的な特徴を持つことが知られている。従来の捕捉技術では、これらの特徴を用いた分離技術であり、例えば、超遠心機を用いる密度による分離、免疫反応を用いる表面膜タンパク質による分離、サイズ排除クロマトグラフィーを用いるサイズによる分離、などが報告されている。本研究では、細胞外小胞の新たな分離パラメータとして、酸化物ナノワイヤを用いる表面電荷による分離を提案した。ナノワイヤと細胞外小胞の相互作用のみに着目すべく、マイクロ流路ではなく、テフロンを素材とする固定具にナノワイヤを作製した Si 基板を固定した。ナノワイヤに濃度既知の細胞外小胞を含む溶液を 1 mL 滴下し、12 時間の捕捉後に未捕捉の細胞外小胞の濃度計測と捕捉率の算出を行った。pH=7 の条件下で、表面が負から正に帯電するようにナノワイヤの表面酸化物の材料を酸化ケイ素 (SiO₂)、酸化チタン (TiO₂)、酸化亜鉛 (ZnO) と系統的に変化させた (図 1a)。細胞培養上清を

超遠心処理にすることによって細胞外小胞のモデルサンプルを準備し(図 1b)、表面が正に帯電する ZnO ナノワイヤがこの 3 種では最も捕捉効率が優れていることを明らかにした(図 1c)。

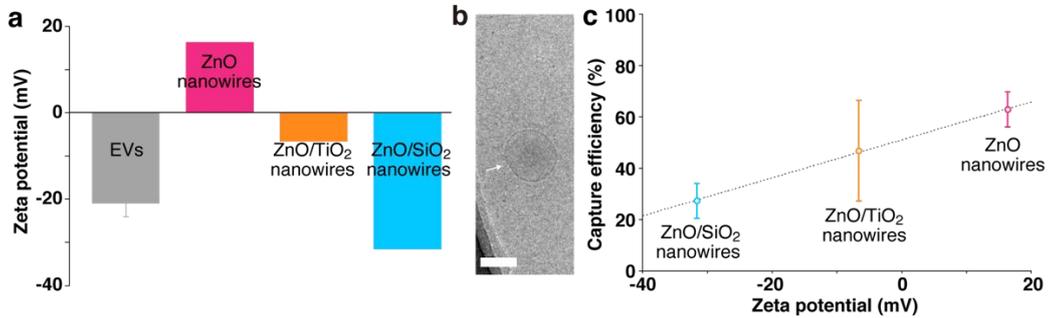


図 1: 電荷による細胞外小胞の捕捉 (a) 細胞外小胞 (EVs) と各種酸化物の表面電位 (b) 準備した細胞外小胞のクライオ透過電子顕微鏡画像 (c) 表面電荷 vs. 捕捉効率

次に、ZnO ナノワイヤによる細胞外小胞の捕捉効率を向上させる目的で、ナノワイヤの形態や結晶構造が捕捉効率に及ぼす影響を精査した。最初に、ZnO ナノワイヤの結晶成長時にアンモニアを添加することによって、ナノワイヤの形態が変化することを見出した。その後、アンモニアの添加に加え、成長時間の増加がナノワイヤの形態だけでなく、結晶構造にも影響を及ぼすことを明らかとした(図 2a)。アンモニアを添加し、成長時間を増加させることにより、ZnO ナノワイヤの特徴的な wurtzite のピークだけでなく、zinc blende のピークが現れることを見出した。また、高分解能の透過型電子顕微鏡像と電子回折像の結果より、アンモニア添加・6 時間成長ではナノワイヤ結晶の根本が、アンモニア添加・9 時間成長ではナノワイヤ結晶の先端に zinc blende の結晶構造が混在していることが明らかとなった。また、従来の wurtzite 結晶構造のみの ZnO ナノワイヤに対して、wurtzite と zinc blende の結晶構造が混在する ZnO ナノワイヤでは、後者のナノワイヤの方が 1 本あたりの細胞外小胞の捕捉効率が高いことが明らかとなった(図 2b, 2c)。本研究成果は、酸化物の結晶構造が細胞外小胞の捕捉効率に影響を及ぼすことを世界で初めて明らかにした研究成果となり、Nanoscale の outside back cover にも選出された(図 2d)。

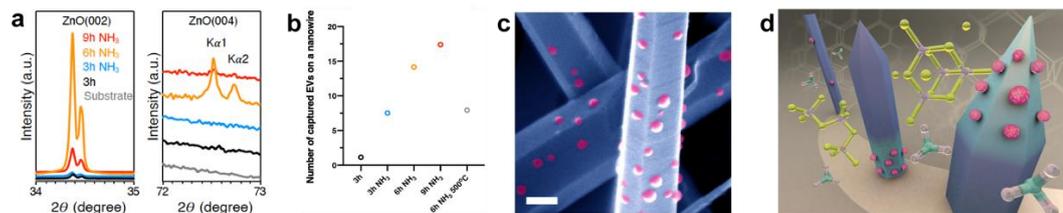


図 2: ZnO ナノワイヤの結晶構造が細胞外小胞の捕捉に及ぼす影響 (a) アンモニア添加と結晶成長時間の増加による XRD ピークの変化 (b) 各成長条件における 1 本あたりの細胞外小胞の捕捉数 (c) ナノワイヤに捕捉された細胞外小胞の SEM 画像、スケールバーは 100 nm を表す (d) Nanoscale の outside back cover に選出された概念図

また、上述の細胞外小胞が効率良く集められるナノワイヤをウェルプレートの底面に作製し、尿 10 滴から細胞外小胞の捕捉と細胞外小胞の膜タンパク質の検出を同時に行うオールインワンプラットフォームの開発と、尿による脳腫瘍診断方法の確立を目指した(図 3a)。オールインワンプラットフォームを用い、尿 10 滴より脳腫瘍患者の細胞外小胞に由来する膜タンパク質の発

現量が、脳腫瘍診断の新しい指標として利用可能であることを発見した(図 3b)。まず、脳腫瘍に由来する細胞外小胞が特定の膜タンパク質を有するかどうかを調べるため、脳腫瘍患者の腫瘍組織(オルガノイド)を培養し、培養液より細胞外小胞をオールインワンプラットフォームで解析した。膜タンパク質の発現量比(CD31/CD63)の解析を行ったところ、オルガノイドが形成される細胞と、オルガノイドが形成されない細胞では、発現量比(CD31/CD63)に差があることが明らかとなった。次に、脳腫瘍患者と非がん患者の尿サンプルからオールインワンプラットフォームで細胞外小胞を捕捉・膜タンパク質検出を行ったところ、膜タンパク質の発現量比(CD31/CD63)が両者で異なることも明らかとなった。これらの成果から、脳腫瘍細胞が放出する特徴的な細胞外小胞が尿中に存在していることを確認した。本研究から尿中の細胞外小胞は今後、脳腫瘍のバイオマーカーとして実用化される可能性が示された。

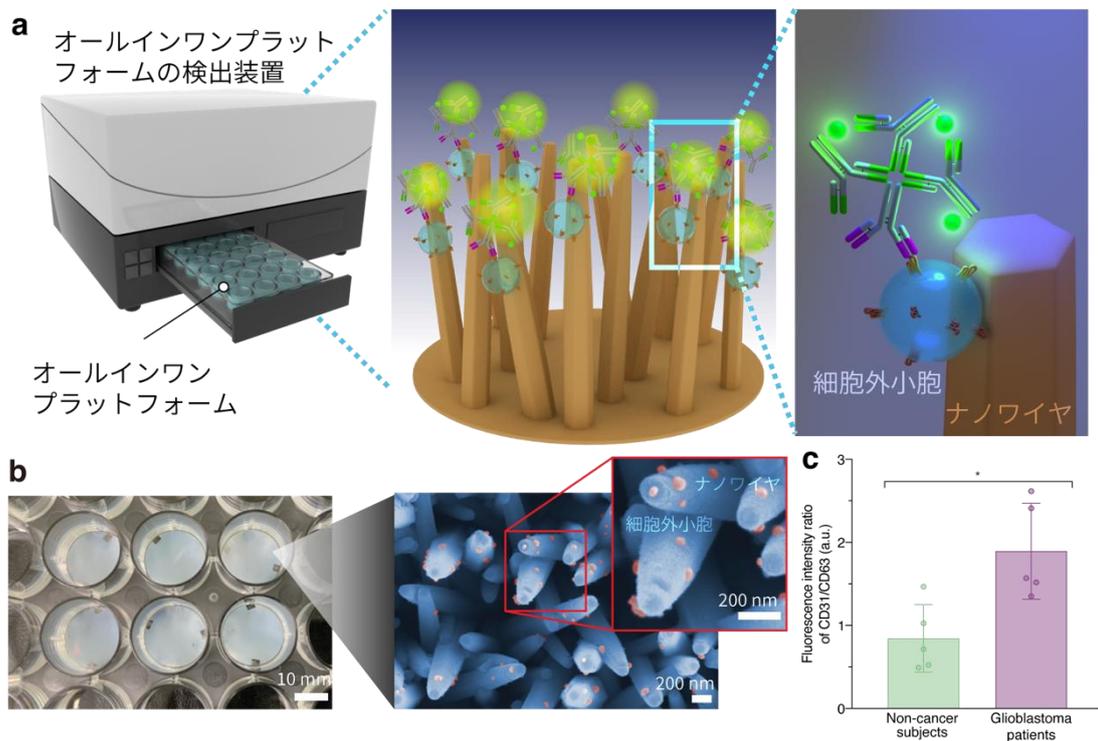


図 3: オールインワンプラットフォームによる脳腫瘍由来の尿中細胞外小胞の検出 (a) オールインワンプラットフォームの概念図 (b) オールインワンプラットフォームの写真とナノワイヤに捕捉された細胞外小胞の SEM 画像 (c) 脳腫瘍患者 vs. 非がん患者の尿中細胞外小胞検出

ナノワイヤの材質、形態、結晶構造を決定し、その後、ZnO ナノワイヤをマイクロ流路と組み合わせ、細胞外小胞の網羅的捕捉技術の開発を進めた。マイクロ流路を非特異的な吸着が少ない材質としてシクロオレフィンポリマー(COP)に作製し、ZnO ナノワイヤをSi基板に作製した。COP マイクロ流路とCOPのブロックにZnO ナノワイヤ基板を挟み込み、ナノワイヤデバイスとした。このナノワイヤデバイスによる~99%の捕捉を確認し、細胞外小胞の網羅的捕捉技術の開発とした。最後に、網羅的に捕捉する細胞外小胞から細胞外小胞 miRNA の選択抽出技術の開発を行った。

【研究テーマ B: マウス/臨床検体を使ったがん関連 miRNA プロファイル取得】

本提案の基盤技術である、ナノワイヤを用いた細胞外小胞の網羅的捕捉技術は、必要サン

ル量が 0.05~1 mL であるため、マウス実験への適用や貴重な臨床検体への適用が可能であった。マウス実験では、尿中にて脳腫瘍細胞由来の細胞外小胞の追跡を行った。その結果、脳腫瘍に由来する細胞外小胞が尿まで到達していることを確認した。

【研究テーマ C: がん関連 miRNA 分泌経路の機序解明と診断バイオマーカーへの展開】

本提案では、診断バイオマーカーとしての優位性を示すためにも症例数の増加を研究開始後より進め、尿中 miRNA あるいは尿中細胞外小胞のみの miRNA の診断・治療・薬効バイオマーカー候補探索へと展開した。この研究成果では、名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科（夏目敦至先生）と共同で、脳腫瘍患者の尿検体や、非脳腫瘍患者の尿検体に含まれる miRNA を解析し、脳腫瘍の尿中マーカーの探索を行った。

まず、脳腫瘍由来の miRNA が尿中に認められるかどうかを調べるため、脳腫瘍患者の腫瘍組織(オルガノイド)を培養し、ナノワイヤデバイスを用いて脳腫瘍組織が分泌している miRNA を抽出した。オルガノイドは、脳腫瘍患者の腫瘍を単一細胞レベルで分取し、単一細胞より作成した。マイクロアレイ解析をおこなったところ、非がん患者に比べて脳腫瘍患者の尿で発現変動を示していた miRNA の 73.4%は、その患者の脳腫瘍自体から分泌された miRNA であることが明らかとなった。一方、脳腫瘍が分泌する特徴的な miRNA は非がん患者の尿中にはほとんど含まれていないことも明らかとなった。これらの結果から、脳腫瘍が分泌した特徴的な miRNA を含む細胞外小胞は、尿中に安定して存在していると考えられた(図 4)。

尿中 miRNA の脳腫瘍バイオマーカーとしての可能性検討においては、68名の脳腫瘍患者と66名の非がん患者の尿から miRNA を抽出し、miRNA 発現プロファイルの比較を行った。脳腫瘍患者の miRNA の組み合わせには特徴的な発現パターンがあることがわかり、別の34名の脳腫瘍患者と34名の非がん患者をそのパターンをもとに分類したところ、99%の正確度(感度:100%、特異度:97%)で脳腫瘍を診断できることを発見した(図 4)。さらに、非常に稀な脳腫瘍に罹患している患者15名も、この方法で判定を行ったところ、15名全員が“脳腫瘍あり”と正しく判定された。今回、作成したモデルは、脳腫瘍の悪性度や大きさを問わず、正確に診断可能であることが実証された。本研究成果から尿中 miRNA は今後、脳腫瘍のバイオマーカーとして実用化される可能性が示された。

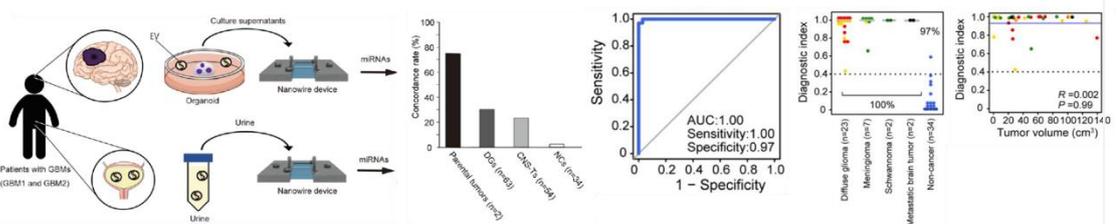


図4:脳腫瘍患者のオルガノイド由来 miRNA と尿中 miRNA の比較と、ROC 曲線(感度:100%、特異度:97%)、診断スコア

3. 今後の展開

本研究の今後の展望は、平均寿命及び健康寿命と平均寿命との差を生んでいる「がん」に焦点をあて、「がん」の革新的予防・診断・治療法の開発を推進することに集約される。本研究では、脳腫瘍に焦点をあて、脳腫瘍細胞に由来する細胞外小胞が尿中まで到達することを明らかとした。また、尿 1 mL で脳腫瘍患者の miRNA 発現パターンを解析することが可能であり、99%の正確度(感度:100%、特異度:97%)で脳腫瘍を診断できることを発見した。

腎臓や膀胱から最も遠く、なおかつ、脳血管門が存在する脳腫瘍にてがんを検知することができた成果より、他のがん種においても同様の展開をすることが期待できる。

4. 自己評価

本研究は、(1)細胞外小胞の網羅的捕捉技術と細胞外小胞 miRNA の選択的抽出技術の開発、(2)細胞外小胞 miRNA プロファイルの機械学習解析技術の開発、(3)細胞外小胞を介した miRNA 分泌経路の解明の3点を主要な目的に掲げていた。(1)に関しては、ナノワイヤの材質、形態、結晶構造を決定し、ナノワイヤデバイスによる～99%の捕捉を確認し、細胞外小胞の網羅的捕捉技術の開発とした。これらの成果は、複数の受賞や論文成果に繋がるなど学術的価値が高く評価された他、プレスリリースや多数の新聞報道を経て、企業からも共同研究の提案を受けるなど大きな反響を得た。(2)に関しては、(1)の技術と組み合わせ、網羅的に捕捉する細胞外小胞から抽出される miRNA プロファイルを機械学習解析することに成功し、名古屋大学脳神経外科(夏目敦至先生)と脳腫瘍へと展開している。(3)に関しては、細胞外小胞の排泄経路に関する大きな知見を得た。以上のように、本研究の目標は当初の想定を超えて達成することができ、第 81 回名大カフェ「1mL の尿からがん診断」や、令和 4 年度 豊西総合大学講座「化学とリキッドバイオプシー」といったアウトリーチ活動も行うなど、科学技術及び社会・経済への波及効果も極めて高いものとなった。

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:15件

1. Y. Kitano, K. Aoki, F. Ohka, S. Yamazaki, K. Motomura, K. Tanahashi, M. Hirano, T. Naganawa, M. Iida, Y. Shiraki, T. Nishikawa, H. Shimizu, J. Yamaguchi, S. Maeda, H. Suzuki, T. Wakabayashi, Y. Baba, T. Yasui and A. Natsume, Urinary microRNA-based diagnostic model for central nervous system tumors using nanowire scaffolds, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2021, **13**, 17316-17329, 10.1021/acsami.1c01754.

本論文では尿中 miRNA の脳腫瘍バイオマーカーとしての可能性検討を行った。68 名の脳腫瘍患者と 66 名の非がん患者の尿から miRNA を抽出し、miRNA 発現プロファイルの比較を行った。脳腫瘍患者の miRNA の組み合わせには特徴的な発現パターンがあることがわかり、別の 34 名の脳腫瘍患者と 34 名の非がん患者をそのパターンをもとに分類したところ、99%の正確度(感度:100%、特異度:97%)で脳腫瘍を診断できることを発見した。

2. T. Yasui, P. Paisrisarn, T. Yanagida, Y. Konakade, Y. Nakamura, K. Nagashima, M. Musa, I. A. Thiodorus, H. Takahashi, T. Naganawa, T. Shimada, N. Kaji, T. Ochiya, T. Kawai and Y. Baba, Molecular profiling of extracellular vesicles via charge-based capture using oxide nanowire microfluidics, *Biosens. Bioelectron.*, 2021, **194**, 113589, 10.1016/j.bios.2021.113589.

本論文では、細胞外小胞の新たな分離パラメータとして、酸化ナノワイヤを用いる表面電荷による分離を提案した。pH=7 の条件下で、表面が負から正に帯電するようにナノワイヤの表面酸化物の材料を酸化ケイ素(SiO₂)、酸化チタン(TiO₂)、酸化亜鉛(ZnO)と系統的に変化さ

せた。細胞培養上清を超遠心処理にすることによって細胞外小胞のモデルサンプルを準備し、表面が正に帯電する ZnO ナノワイヤがこの 3 種では最も捕捉効率が優れていることを明らかにした。

3. K. Chattrairat, T. Yasui, S. Suzuki, A. Natsume, K. Nagashima, M. Iida, M. Zhang, T. Shimada, A. Kato, K. Aoki, F. Ohka, S. Yamazaki, T. Yanagida and Y. Baba, All-in-one nanowire assay system for capture and analysis of extracellular vesicles from an ex vivo brain tumor model, *ACS Nano*, 2023, **17**, 2235-2244, 10.1021/acsnano.2c08526.

本論文では、ウェルプレートにナノワイヤを配置し、細胞外小胞捕捉と細胞外小胞の膜タンパク質の検出を同時に行うオールインワンプラットフォームを開発した。このプラットフォームにより、脳腫瘍患者や非がん患者の尿中細胞外小胞の特定の 2 種類の膜たんぱく質の発現量比を調べたところ、発現量比が異なることが明らかとなりました。このプラットフォームを用い、他のがん患者の尿中細胞外小胞の特定の膜たんぱく質の発現量解析を進展させることで、多種のがんの早期検知が可能になると期待される。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 7 件 (特許公開前のものも含む)

(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)

1. 令和 2 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞 (2020/4/14)
2. 中谷賞 (奨励賞) (2021/2/26)
3. 船井学術賞 (2021/5/8)
4. ChemComm 2021 Emerging Investigators に選出 (2021/10/29)
5. Nanoscale 2022 Emerging Investigators に選出 (2022/3/2)