

研究終了報告書

「単一エクソソームトランスクリプトーム解析法によるエクソソーム内 RNA の網羅的解析」

研究期間： 2017 年 10 月～2021 年 3 月

(新型コロナウイルス感染症の影響を受け 2021 年 9 月まで延長)

研究者： 金 秀炫

1. 研究のねらい

本研究では、単一エクソソームを捕捉した「エクソソーム捕捉ビーズ」とインデック配列を含む「RNA 捕捉ビーズ」の組み合わせにより単一エクソソームを標識することで、各エクソソーム内 RNA の網羅的解析を可能にする「単一エクソソームトランスクリプトーム解析法」の確立を目指す。具体的には、多数の単一粒子を確実に捕捉することが可能なエレクトロアクティブマイクロウェルアレイ (Electroactive Microwell Array (EMA)) を高度化し、インデックスアダプターを持つ RNA 捕捉ビーズと、エクソソームの表面タンパク質に対する抗体を持たせることで単一エクソソームを捕捉したビーズの 2 種類を 1 つのマイクロウェルに確実にトラップできる Microfluidic Indexing 法を開発する。ここで、エクソソーム単離の検証と高感度エクソソームの定量化を実現するため、エクソソームを一粒子レベルで定量的に検出することが可能な「単一エクソソーム ELISA 法」を確立する。単離されたエクソソームから取り出した RNA を RNA 捕捉ビーズに捕捉することで、各エクソソームからの RNA を標識し、様々なエクソソーム内の核酸情報を一粒子レベルで網羅的に解析する。これにより、エクソソーム集団中の個々のエクソソームが持つ核酸を網羅的に把握できるため、各エクソソームの特性や機能の理解などの基礎科学への寄与が期待される。さらに、このシステムを臨床サンプルのエクソソーム解析に応用することで、新たなバイオマーカーとしてエクソソームを検討することができるため、診断法や治療法の開発にも資する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、「単一エクソソームトランスクリプトーム解析法」を確立するため、「Microfluidic Indexing 法の確立」、「単一エクソソーム ELISA 法の確立」、「RNA 捕捉ビーズの開発」の項目に対して研究を進めている。まず、「Microfluidic Indexing 法の確立」については、単一エクソソームを捕捉したエクソソーム捕捉ビーズとインデックスアダプターを持つ RNA 捕捉ビーズの 2 種類のビーズを 1 つのマイクロウェルにトラップすることで、多数の単一エクソソームを標識可能な Microfluidic Indexing 法の確立を検討した。Microfluidic Indexing 法を実現するため、各マイクロウェルの底面の電極をそれぞれ独立して操作できる Addressable Electroactive Microwell Array (AEMA) を開発した。具体的には、反応用の Combinatorial Reactor (CR) の底面に、誘電泳動電極の個別制御が可能な Trap Well (TW) を配置し、順番に RNA 捕捉ビーズと、エクソソーム捕捉ビーズを指定のマイクロウェルにトラップすること

で、単一エクソソームを効率良く標識することが可能になる。製作した AMEA の検証実験では、それぞれ異なる蛍光色素で染色した 3 つの単一細胞の組み合わせを実現することに成功した。「単一エクソソーム ELISA 法の確立」については、単一エクソソーム捕捉の検証と高感度エクソソームの定量化を実現するため、単一エクソソーム ELISA 法を確立した。単一エクソソーム ELISA 法の検証実験のため、細胞培養上清由来の凍結乾燥エクソソームをターゲットとした ELISA システムをマイクロビーズの上に構築した。マイクロビーズをマイクロウェルに封入した後、蛍光信号を発するマイクロウェルの数とエクソソームが捕捉されたマイクロビーズの数をカウントすることで、エクソソームの定量化とエクソソームの単離が検証できた。「ビーズの組み合わせ方法の確立」については、インデックス配列を含む RNA ライゲーションアダプターを表面修飾した RNA 捕捉ビーズを用いて、ライゲーション反応により、miRNA を捕捉することが可能であることを確認した。単一エクソソームを捕捉した捕捉ビーズと RNA 捕捉ビーズを用いてライゲーション反応を行うことで、インデックス配列を含む DNA ライブラリープールの生成により、単一エクソソームトランスクリプトーム解析法の確立が期待できる。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け 6 ヶ月間研究期間を延長し、RNA 捕捉ビーズを用いたライゲーションによる合成 RNA の捕捉・シーケンシングが可能であることを確認した。

(2) 詳細

「Microfluidic Indexing 法の確立」

単一エクソソームを効率良く標識するための Microfluidic Indexing 法を実現するため、反応用の Combinatorial Reactor (CR) の底面に、誘電泳動電極の個別制御が可能な Trap Well (TW) を配置した AEMA を設計・試作した。各マイクロウェルの誘電泳動電極を個別に制御可能な AEMA を用いて、順番に RNA 捕捉ビーズと、エクソソーム捕捉ビーズを指定のマイクロウェルにトラップすることで、単一エクソソームを効率良く標識することが可能になる。試作した AMEA は一般的な CMOS プロセスに利用される、配線層および保護膜層からなる Back-end-of-line (BEOL) プロセスを利用することで電極の個別制御が可能である。なお、配線は 5 層メタルプロセスである。保護膜層は、Si₃N₄/SiO₂ 層とポリイミド層からなる。誘電泳動電極対は最上位配線層で形成し、Si₃N₄/SiO₂ 層で形成した TW 底面の下に配置されるが、誘電泳動電極対を形成する配線層成分はアルミニウムが主成分であるため、腐食や漏電を防ぐために、TW の底面から誘電泳動電極までに Si₃N₄/SiO₂ 層からなる薄い層間膜を形成することでデバイス表面に流れる溶媒に直接接着しない構成とした。形成した AEMA 基板上にマイクロ流路がパターンニングされた PDMS シートを、酸素プラズマを用いてボンディングすることでマイクロ流体デバイスを形成した。

試作したデバイスの検証実験のため、まず単一細胞トラップを確認するため、緑蛍光色素

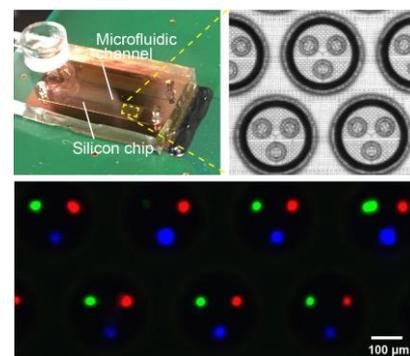


図 1. 単一細胞の組み合わせ

で染色した PC3 細胞(緑 PC3 細胞)をマイクロ流体デバイスへ流入させ、TW1 の電極へ電圧を印可することで、細胞を TW1 へトラップした。TW1 のみの電極へ電圧を印可するため、細胞は TW1 にトラップされる。検証実験では 98%もの高い single cell occupancy ratio(トラップされた単一細胞数/TW1 の数)で単一細胞をトラップすることに成功した。製作した AMEA の検証実験のため、それぞれ異なる蛍光色素で染色した 3 つの単一細胞の高効率組み合わせ(90%)を実現することに成功した(図 1)。

「単一エクソソーム ELISA 法の確立」

エクソソームの単離の検証と高感度エクソソームの定量化を実現するため、単一エクソソーム ELISA 法を確立した。ターゲットエクソソームをエクソソーム捕捉ビーズに捕捉するため、ビーズの表面をエクソソームの膜表面に存在するタンパク質を抗原として反応する捕捉抗体で表面修飾した。また、エクソソームを捕捉しているエクソソーム捕捉ビーズからの信号を検出するため、 β -galactosidase (以降 β -gal)で標識された検出抗体を準備し、捕捉抗体-エクソソーム-検出抗体の3つで構成された複合体をエクソソーム捕捉ビーズ上に形成した。次に、 β -gal の反応基質溶液と共にエクソソーム捕捉ビーズをマイクロウェルに捕捉した後、オイルを用いてマイクロウェルを封入した。エクソソームを捕捉したビーズがマイクロウェル中にあると、 β -gal からの酵素反応生成物(蛍光分子)が超微小マイクロウェル中に濃縮されるため、単一エクソソームからの信号が検出可能になる。蛍光信号を発するマイクロウェルの数としてエクソソームの数をカウントすることで、エクソソームの単離の検証とエクソソームの定量化が可能になる。単一エクソソーム ELISA 法の検証実験のため、細胞培養上清由来(COLO1 細胞株)の凍結乾燥エクソソーム(コスモ・バイオ株式会社)をターゲットとした単一エクソソーム ELISA を行なった。蛍光信号を発するマイクロウェルの数と捕捉されたマイクロビーズの数をカウントし、その割合(Exosome-beads)がエクソソームの濃度に依存することを確認した(図 2)。エクソソーム捕捉ビーズとエクソソームの比が 1 : 0.6 のとき、9%程度のビーズから信号の検出が可能であることを確認した。この条件で最大の信号を発するビーズの割合はポアソン分布により 20%であり、高い効率でエクソソームの捕捉が可能であることを確認した。

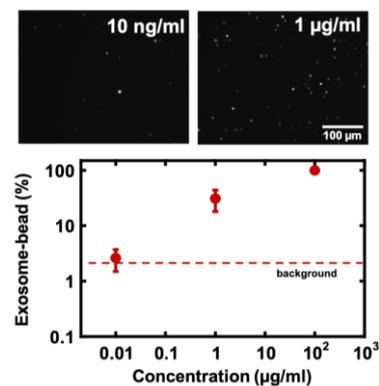


図 2. 単一エクソソーム ELISA

「RNA 捕捉ビーズの開発」

インデックス配列を含む RNA ライゲーションアダプターを表面修飾した RNA 捕捉ビーズを用いて miRNA を捕捉することが可能であることを確認した。具体的には、RNA 捕捉ビーズのアダプターをアデニル化させた後、T4 RNA Ligase 2 を用いて FAM でラベリングされた miRNA に対してライゲーション反応を行なった。その結果、RNA 捕捉ビーズから強い蛍光を発することを確認し、FAM でラベリングされた miRNA を RNA 捕捉ビーズに捕捉可能であることを確認した (図 3)。一方、アデニル化させなかった RNA 捕捉ビーズからは、蛍光が発しないことから、T4 RNA Ligase 2 はアデニル化されたアダプターのみを選択的に miRNA をライゲーションさせることが可能であることを確認した。この方法を利用することで、アダプターアダプターコンジュゲーションの生成を抑制することが期待できる。

インデックス配列を含む RNA 捕捉ビーズを用いて miRNA の捕捉・シーケンシングが可能であることを確認した。具体的には、RNA 捕捉ビーズ上で、合成 RNA (21 塩基) のライゲーションと、5' アダプターのライゲーションを順に行い、インデックス配列を含む DNA ライブラリーを生成した。その後、次世代シーケンサー (MiSeq) を用いてシーケンシングを行った結果、合成 RNA の配列を含む DNA ライブラリーが生成されたことを確認した。しかし、アダプター同士のライゲーションにより、合成 RNA の配列を含む DNA ライブラリーはわずか 0.2% であることも確認した。効率的な miRNA のシーケンシングを行うためには miRNA のみを選択的にライゲーションさせるための条件検討が必要である。以上の結果より、ライゲーション効率の向上は必要だが、インデックス配列を含む RNA 捕捉ビーズにより単一エクソソームトランスクリプトーム解析法の確立が可能であることが示唆された。

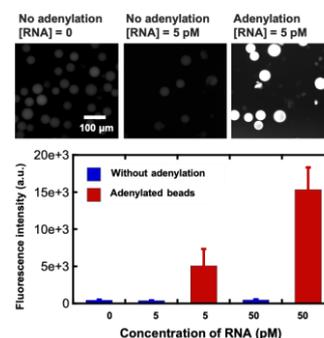


図 3. RNA 捕捉ビーズを用いた miRNA の捕捉

3. 今後の展開

本研究で確立した基礎技術である「単一エクソソーム ELISA 法」や「Microfluidic Indexing 法」を用いることで、各エクソソームの特性や機能を理解できる単一エクソソームトランスクリプトーム解析法の確立が期待できる。各エクソソームの特性を把握した上、単一エクソソーム ELISA 法を用いて臨床サンプルに含まれているターゲットエクソソームを検出することで、新たなバイオマーカーとしてエクソソームの検討が期待できる。単一エクソソーム ELISA 法は微量のサンプル中のエクソソームを高感度で検出可能であるため、診断デバイスとしての展開が期待できる。一方、Microfluidic Indexing 法に関しては、単一細胞トランスクリプトーム解析への応用が可能であり、極めて少数の血中循環腫瘍細胞の解析への応用が期待できる。さらに、高効率で細胞の組み合わせが可能であるため、単一細胞レベルでの細胞間相互作用の研究への応用が期待できる。

4. 自己評価

最終目標の単一エクソソームトランスクリプトーム解析法は確立できなかったが、要素技術である単一エクソソーム ELISA 法と Microfluidic Indexing 法の確立に成功した。特にマイクロ流体デバイスを用いた Microfluidic Indexing 法は世界においても独自性の高い、有益性の高い技術である。また、単一エクソソーム ELISA 法は臨床現場で使用可能な実用性が高い技術であり、診断システムとしてその展開が期待できる。今後もこれらの要素技術を活かした単一エクソソームトランスクリプトーム解析法の確立を目指して研究を続ける。研究の進め方に関しては、研究補助者 1 名と研究体制を構築し、研究環境整備に研究費を充実に執行した。

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: 3件

1. J. Park, T. Komori, T. Uda, K. Miyajima, T. Fujii, and S. H. Kim*. Sequential cell processing system by integrating hydrodynamic purification and dielectrophoretic trapping for analyses of suspended cancer cells. *Micromachines*. 2020, 11, 47; doi:10.3390/mi11010047

誘電泳動電極を配置した EMA を用いてがん細胞の分離と解析が可能であるシステムを開発した。

2. M. Takeuchi, K. Nagasaka, M. Yoshida, Y. Kawata, Y. Miyagawa, S. Tago, H. Hiraike, O. Wada-Hiraike, K. Oda, Y. Osuga, T. Fujii, T. Ayabe, S. H. Kim* and T. Fujii. On-chip immunofluorescence analysis of single cervical cells using an electroactive microwell array with barrier for cervical screening. *Biomicrofluidics*. 13, 044107, 2019, featured as Cover of the issue and selected as Editor's picks.

誘電泳動電極を配置した EMA を用いてがん細胞の高効率捕捉と免疫染色が可能であるシステムを開発した。

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 7 件(特許公開前のもも含む)

1	発 明 者	飯塚邦彦、佐藤大紀、満仲健、藤井輝夫、金秀炫
	発 明 の 名 称	粒子分別装置
	出 願 人	東京大学、シャープ株式会社
	出 願 日	2018/7/11
	出 願 番 号	特願 2018-131700
	概 要	本発明は、流体中の微小な生体又は非生体の微粒子を分離・解析するための液体中微粒子分離・解析システムに関するものである。

(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)

- B. N. Hapsianto, N. Kojima, R. Kurita, H. Yamagata, H. Fujita, T. Fujii and S. H. Kim, "Nitrogen-mustard coated magnetic beads for hybridization and elution-free circulating tumor dna detection", *Proceedings of International Conference on Miniaturized Systems*

- for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2019), Congress Center Basel, Basel, Switzerland (2019)
- H. Saito, S. H. Kim, I. Tsuchiya, S. Nagasawa, M. Seki, Y. Komazaki, T. Torii, Y. Suzuki and T. Fujii, “Integration of on-chip cluster purification and compartmentalization for rna-seq analysis of clusters”, Proceedings of International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2019), Congress Center Basel, Basel, Switzerland (2019)
 - D. Sato, T. Shindo, T. Mitsunaka, Y. Fujimoto, K. Iizuka, S. Tago, Y. Takayama, T. Fujii and S. H. Kim, “Integrated parallel flow cytometry device with time gated spads”, Transducers 2019 – EUROSENSORS XXXIII Berlin, GERMANY (2019), M2A.005, Oral presentation
 - S. H. Kim, M. Yoshida, S. Tago and T. Fujii, “Efficient pairing of single cells using trap-and-drop microwell array”, Proceedings of International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2018), Kaohsiung, Taiwan (2018), Oral presentation
 - C. J. Park, S. H. Kim, T. Fujii, “Electroactive microwell array for separate trapping of single cells and clusters”, Proceedings of International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2018), Kaohsiung, Taiwan (2018)