

2022 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	エクソソームの高感度比色アッセイ法の構築
キーワード	① エクソソーム、② マイクロビーズ、③ 単一粒子測定

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	モリイワ ユキコ 守岩 友紀子
配付時の所属先・職位等 (令和4年4月1日現在)	東京薬科大学 薬学部 生体分析化学教室・助教
現在の所属先・職位等 (令和5年7月1日現在)	同上
プロフィール	平成 28 年に東京薬科大学薬学部 医療薬物薬学科を卒業後、薬剤師免許を取得。同年に東京薬科大学薬学部 薬学研究科博士課程入学。令和 2 年に東京薬科大学薬学部薬学研究科博士課程修了後、同年に東京薬科大学薬学部 助教に着任した。 現在申請者は、マイクロ粒子を利用した分析法の開発や機能性マイクロ粒子の創製を研究テーマとしている。今後も粒子の界面設計や粒子の合成に積極的に取り組んでいきたい。

1. 研究の概要

エクソソームは血中滞留性や安定性の高さから、バイオマーカーとして注目されている。一方で、血液や尿等の生体試料を対象にした場合、夾雑物質として多量に含まれる多種多様の生体分子からエクソソームを高い回収率かつ高純度で単離すること自体確立されておらず、計測技術の設計が困難である。本申請課題では、リポソームへの膜融合によるエクソソームの単離およびアッセイ法の高感度化に重要となるシグナル増幅と単一粒子測定 (SPD) を組み合わせたエクソソームの高感度検出法について検討した。リポソームへのエクソソームの膜融合により、従来の超遠心によるエクソソームの回収率 (約 10%程度) と比較して、回収率の向上が期待される。多量のマーカー色素を封入したリポソームにエクソソームが膜融合すると、アンホテリシン B がコレステロールを認識して膜にナノポアを形成するため、マーカー色素が漏出される。漏出したマーカー色素を検出することで、本法は優れたエクソソームのシグナル増幅能を有することとなる。さらに、漏出したマーカー色素を SPD により単一粒子表面に濃縮することで、大型な装置を必要とせず高感度な測定法を設計することが可能となる。

2. 研究の動機、目的

エクソソームは細胞から分泌される直径 100 nm 程度の小胞体であり、核酸やタンパク質などの細胞情報が集約されている。分泌元の細胞の状態に応じて、エクソソームを構成する生体分子の種類や量が異なるだけでなく、血中滞留性や安定性の高さから、バイオマーカーとして注目されている。一般に、エクソソームを計測する際には、エクソソームの膜たんぱく質に特異的に結合する抗体を用いたイムノアッセイやイムノセンサーが利用されている。しかしながら、血液や尿等の生体試料を対象にした場合、夾雑物質として多量に含まれる多種多様の生体分子による非特異吸着に計測結果が影響されることがある。このような場合、エクソソームを単離するための前処理が有効であるが、これら夾雑成分が共存する中、エクソソームを高い回

収率かつ高純度で単離することは困難である。

申請者はこれまでに、エクソソームの人工脂質二分子膜への膜融合に関する知見を多く有している。そこで、膜融合を利用することで、夾雑成分を含む生体試料の中から、エクソソームのみを単離することができると考えた。設計した分析法の原理を以下に示す。エクソソームを多量のマーカー色素を封入したリポソームに膜融合させる。このリポソームはフォスファチジルコリン (PC) のみで作製しているが、膜融合によりエクソソーム由来のコレステロールがリポソーム膜に移行する。膜内のコレステロールを分子認識するアムホテリシン B (AmB) で膜融合後のリポソームを処理すると、膜にナノポアを形成する。それにより、封入されていたマーカー色素が漏出される。膜融合するエクソソームの個数に依存して AmB のポア数が増加し、多量のマーカー色素が漏出される。そのため、本法は優れたシグナル増幅能を有することになる。さらに、漏出したマーカー色素を感度良く検出するために、単一粒子測定 (Single particle detection: SPD) に着目した。SPD により、少数のマーカー分子であっても、1 粒子に濃縮することで検出可能になる。そのため、エクソソームが膜融合したリポソーム量も少量でよいため、計測感度の向上が期待される。本法は、エクソソームの単離と高感度検出を達成することができる新規なエクソソーム計測技術となる。

3. 研究の結果

3D プリンター (Photon Mono 4K、Anycubic) を用いてマイクロサイズの粒子が 1 粒子固定化される細孔を有する平面基板を作成した。その細孔に 1 粒子のシリカマイクロビーズ (直径: 500 μm) を固定化し、生検トレパンを用いて直径 3 mm の穴をあけた厚さ 2 mm のポリジメチルシロキサン (PDMS) シートを両面テープで張り合わせることで、固定化したビーズ上にマイクロウェルを作製した (Fig. 1)。比色分析を行う前に蛍光色素であるカルセインを用いて本アッセイ法を検討した。エタノールにより溶解したカルセイン封入リポソーム溶液をシリカマイクロビーズに添加した結果、カルセインがシリカマイクロビーズに凝集・濃縮され、ビーズが強い蛍光を示すことがわかった (Fig. 2)。続いて、脂質二分子膜にコレステロールを含有するカルセイン封入リポソームと AmB を用いて、本アッセイ法が機能するか調査した。コレステロールを指標にしてポアを形成する AmB によりリポソームにポアが形成され、封入されたカルセインが漏出し、ビーズが蛍光を発することがわかった。本アッセイ法をエクソソームの検出に適用するために、エクソソームを脂質二分子膜にコレステロールを含有しないカルセイン封入リポソームに膜融合させた。膜融合によりエクソソーム由来のコレステロールを包埋させ、AmB を添加したところ、ポア形成によりカルセインが漏出し、ビーズの蛍光強度が大きくなることを明らかにすることができた。この結果より、約 10 万個のエクソソームを検出することができた (Fig. 3)。今後は、封入させる色素を検討し、比色分析への適用を検討する。また、エクソソームは負に帯電しているため、容易にカチオン脂質 (EPC) 膜と膜融合する。リポソーム膜組成における EPC 量や pH により膜融合条件の最適化を行う。本法は、マイクロウェルの設計を変えることでマイクロビーズのアレイ化も可能であるため、多検体を対象にエクソソームの一斉分析への応用も期待される。

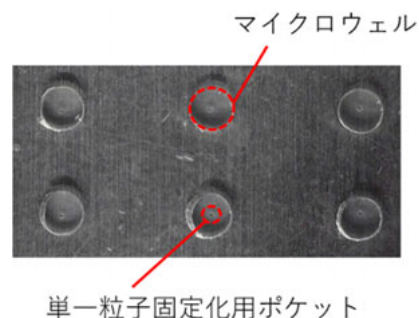


Fig. 1 単一粒子を固定化したマイクロウェル.

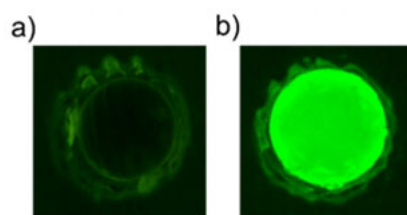


Fig. 2 エタノールにより溶解したカルセイン封入リポソーム添加前 a) と添加後 b) のシリカマイクロビーズ.

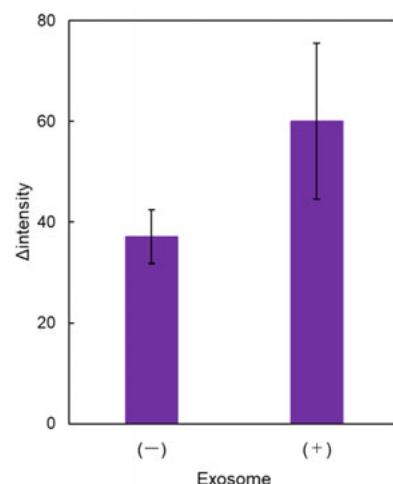


Fig. 3 本アッセイ法によるエクソソームの検出.

4. 研究者としてのこれからの展望

研究者として、自身のアイデアから今まで世の中では考えられなかったアプローチを利用した計測技術やデバイスを開発したいと考えております。これまで、計測技術が高度化・高性能化されてきましたが、現在においても、計測技術課題は多く残されています。計測技術のさらなる発展は、これまで困難であったこと、解明されてこなかった事象をとらえることができるかと確信しております。そのため、世の中における計測ニーズを的確に把握し、そのニーズに応えることのスキルを備えている人材になりたいと考えております。そのためには、専門分野を複数持ち、幅広い知識を基盤として活躍する能力を有していることが重要であると考えます。時には、自らの専門分野に閉じこもることなく、周辺の専門分野や全く異なる専門分野を含む多様なものに関心を持ち、既存の枠にとらわれないものの見方を備えていきたいです。今後も、当該研究を含め現在行っている研究をさらに発展させ、多くの学会発表や論文発表を実現できる研究者を目指したいと考えております。また、自身の研究活動を、学生への教育にフィードバックし、次世代の研究者の育成に貢献したいと思っております。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

この度は「2022年度 女性研究者奨励金」に採択していただき、誠にありがとうございました。ご支援いただきましたことを、ここに厚く御礼申し上げます。奨励金を頂いたことにより、この研究をより一層前向きに進めることができました。その結果、学会発表や論文の作成につながる成果を得ることができました。今後も、女性研究者として、研究を進められるよう励んで参ります。



Fig. 4 実験の様子.