

助成金事業実績報告書

2021年11月30日

公益財団法人 川西記念新明和教育財団 御中

神戸大学大学院工学研究科
高野恵里

研究題目 : インタクトなエクソソームをバイオマーカーとした前立腺がんの超高感度・高速自動分析法の開発

1. 研究開始当初の背景

前立腺がん：日本においては罹患率が増加

前立腺がんは、2017年の男性の部位別がん死亡率 19.8%を占め、2018年のがん統計予測では3番目に多い(図1、出典：国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」)。前立腺がんはリンパ節と骨に転移しやすく、進行した転移性のステージでは効果的な治療法がないため、死亡率を低下させるためには早期発見が重要である。前立腺がん診断においてバイオマーカータンパク質である前立腺特異抗原(PSA)の測定は、確立されたものではあるが、特異度は決して高くはない。

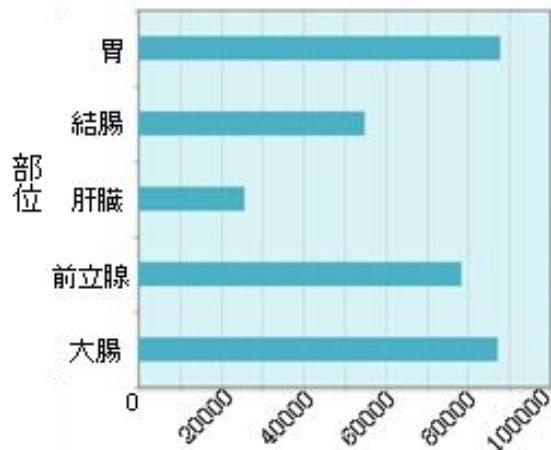


図1：部位別2018年度がん統計 罹患者数 男性・全年齢

このため、前立腺がん検出の特異度が高く、非浸襲でがんリスクを管理できる新たな検出法の開発が求められている。

新たなバイオマーカー：エクソソーム

近年、細胞から放出される約100nmの細胞外小胞(図2)が、がん増殖・転移と関連することが報告され、がんの新しいバイオマーカーとして注目されている。がん細胞由来エクソソームは、がん細胞がなければ検出されないため、従来用いられてきたバイオマーカーによる診断に比べ、診断精度は格段に向上し、生検に代わるリキッドバイオプシーとして大きな期待がかけられている。

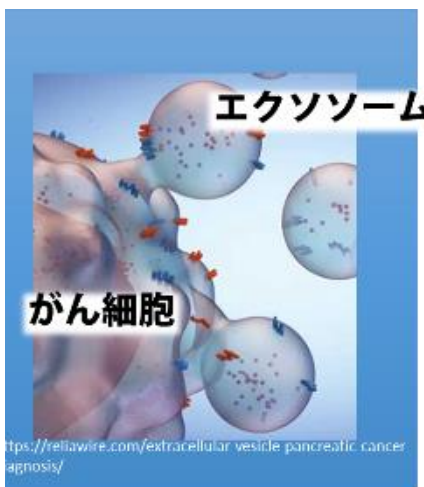


図2：細胞から放出されるエクソソーム

独自技術：部位特異的鑄型重合後修飾(PIM)法

申請者らは、分子鑄型重合法の際、重合後に形成された認識空間内のみを化学修飾する部位特異的鑄型重合後修飾(PIM)に世界で初めて成功した。この分子認識素子は、炎症マーカーの検出限界が 100 倍以上高いことを報告した(Angew. Chem. Int. Ed. 2016)。そこで本研究では、この独自技術をエクソソーム検出に応用する。

2. 研究の目的

本研究では、エクソソームをバイオマーカーとした超高感度・高速前立腺がん検出法の開発を目的とする。微小サイズのエクソソームセンシング基板と、それを装着して自動分析を行うための検出器付小型分注ロボットにて、試料 10 μ L 中 10⁴ 個のエクソソーム検出を可能とするとともに、10 分以内で 1 試料の分析ができるプロトコルを確立する。最終的にはエクソソームを標的として前立腺がん検出が可能か検討する。

3. 研究の方法

本研究では、エクソソーム結合情報発信型微小空孔を持つセンシング基板 (図 3) の作製と、エクソソームセンシングシステム (図 4) の構築を行い、がん由来エクソソームを迅速に高感度で検出可能か検討する。

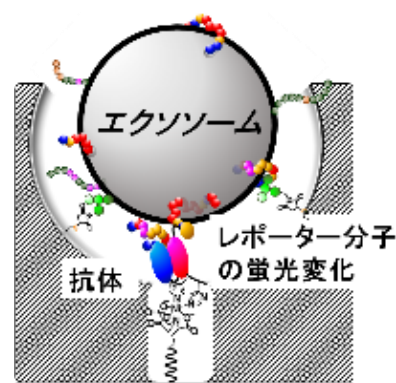


図 3：エクソソームセンシング空間の概念図

4. 研究成果

4-1 エクソソーム結合空間への蛍光分子、抗体導入確認

まず、鑄型重合法の原理に基づき、エクソソームが結合可能な微小空間を生体適合性ポリマーで形成した。その後、微小空間内に蛍光プローブおよび標的膜タンパク質に対する抗体を導入し、エクソソーム結合情報発信型微小空孔をセンシングチップ上に形成した。蛍光プローブ導入処理後は蛍光強度が増加したことから、結合空孔へ蛍光プローブが導入されたことを確認した。また、エクソソームマーカーである CD9 に対する抗 CD9 抗体を空孔へ導入したセンシングチップにて、ヒト前立腺癌細胞株 PC3 由来エクソソームの測定を行ったところ、10 μ L 中に 50 エクソソームがあれば検出可能な、超高感度検出を達成した。



図 4：エクソソームセンシングシステム

4-2 エクソソームセンシングシステムの構築

エクソソーム自動分析装置のプロトタイプ構築について、エクソソームセンシング基板を内部に装着したまま蛍光検出が可能な扁平構造をもつピペットチップ(図5)を特注で作製し、この扁平型ピペットチップにエクソソームセンシング基板が挿入されたまま、試料を吸引・分注・吐出・インキュベーションし、蛍光測定までを自動で行うことのできるプロトタイプ機を構築した。作製したセンシングチップを用いて自動分析装置にて測定したところ、同じエクソソームについて異なる抗体での蛍光強度変化、同じ抗体での異なるエクソソームでの蛍光強度変化は、それぞれ異なる挙動を示し、エクソソーム表面上に発現している膜タンパク質組成の違いによる種々のエクソソームの結合特性をこのチップを用いて評価可能であることを確認した。



図5：扁平型ピペットチップ

この結果をもとに、エクソソームセンシングを1検体10分以内で高感度に精度よく得るための最適化を行った。反応時間について検討したところ、5分以内の反応時間でも30-60分反応させた時と同じく高感度で検出可能であり、1検体10分以内でのプロトコルを達成することが可能であった。また、このプロトコルにて前立腺がん細胞であるPC3由来と、健常人細胞由来の種々の抗体に対するエクソソームの結合実験を行ったところ、抗GGT-1に対する結合挙動が異なることがわかった。

このように、エクソソーム結合空孔を多数配置したエクソソームセンシング基板を調製し、この基板が挿入・留置できる特注の扁平型ピペットチップと、吸引・吐出・分注から検出に至るすべての過程を自動化したロボットを用いることで、エクソソームセンシングシステムの構築が可能であった。

以上のように、分子鋳型重合法とPIM技術を組み合わせた我々の技術と、高い選択性をもつ抗原抗体反応を融合し、結合情報を可視化する蛍光レポーター分子をその空間内に配置するという、従来にはまったくない着想を基本原理とするエクソソームセンシングチップを創製し、エクソソームを前処理なしのインタクトな状態で、試薬添加なしに超高感度で高速に検出可能であった。低侵襲ながん検査法は、このコロナ禍での検診控えとも相まってますます需要が高まっており、本法の社会に対する波及効果は高いと考えられる。