

国立大学法人神戸大学

事業実施期間：開始 平成30年4月1日～終了 令和2年3月31日

共同研究・共同事業者

システム・インスツルメンツ株式会社

研究・事業名

がん診断用エクソソーム自動分析装置の開発

交付申請内容

研究・事業の目的及び意義

【本研究の目的】

本研究では、がんの悪性化や転移・再発を予測・診断を可能にする新たなリキッドバイオプシー手法のための、エクソソームを前処理なしで計測可能なエクソソーム自動分析計を開発する。

【本研究の意義】

エクソソームは、細胞から放出される約100nmの小胞で、様々な体液に含まれ、内部に宿主細胞由来のタンパク質やmiRNA等を包含し、細胞間コミュニケーションを担っていると報告されている (Nat. Cell Biol. 2007, 9, 654; Nature 2015, 527, 329)。さらに、近年がん増殖・転移との関連が報告され、がんの新バイオマーカーと期待されている (Hematol. Onc. 2017, 10, 175)。

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ず、従来用いられてきたバイオマーカーによるがん診断に比べ、診断の精度は格段に向上し、生検に変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。しかし、これまでに、エクソソームはELISAやプロテオーム解析を用いて測定・解析されてきたが、操作が煩雑で、時間がかかる、装置が高価などの問題がある。前処理なしに特定のエクソソームを簡便に測定する方法が強く要望されている。このような現状を打破する本研究は、従来のがん診断法からのパラダイムシフトを誘起し、イノベーションを創出し、国民の健康に資する技術開発としてきわめて高い意義がある。

研究・事業の方法及び手段

申請者は、最近、分子鋳型重合法の際、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鋳型重合後修飾(PIM)に世界で初めて成功し (Angew. Chem. Int. Ed. 2014; J. Am. Chem. Soc. 2009)、PIMを用いて作製した分子認識素子をもつセンサーによりバイオマーカーの検出限界を14pMと100倍以上向上させた (Angew. Chem. Int. Ed. 2016)。

そこで本研究では、この技術を用いて、世界で始めて、エクソソーム結合空孔を作製して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孔内に配置したエクソソームセンシングチップを創製し、エクソソームを高感度・簡便に検出する。

(1) エクソソームセンシング基板の開発

(1)-1 エクソソームセンシング空孔の形成：鋳型重合法の原理に基づき、シリカナノ粒子を鋳型にして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する。ここ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する。

(1)-2 導入する抗体：導入する抗体は、CD9, CD63, CD81とし、各種エクソソームのこれらの抗体に対する結合特性を評価する。

(2) エクソソーム自動分析計の構築

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(サイズ100μL)を特注で作製し、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デスクトップタイプ小型自動分析装置を開発する。感度は、試料10μLに10⁴個のエクソソームが検出可能とする。10分以内で1試料の分析ができる標準プロトコル

を確立する。

(3) 健康人およびがん患者のエクソソーム解析

30年度に臨床研究計画を神戸大学大学院医学研究科倫理委員会に提出し審査を受け、31年度には神戸大学医学部附属病院を受診する主要5大がんのうち、主に乳がん患者20名と20名の健康人から体液を採取し、各抗体に対するエクソソームの結合パターン解析を行う。この結合パターンを多変量解析し、健康人とがん患者の識別が可能かどうか検討し、がん診断の正確性、迅速性を評価する。

研究・事業の特徴(新規性、独自性等)

【国内の類似研究との比較】

現在のエクソソームタンパク質を分析するための主たる方法としては、ELISA法やプロテオーム解析法が挙げられるが、これらは煩雑なプロセスと長い測定時間を要する。これらに対し、本研究において開発を行うエクソソームセンシング基板を用いる分析法では、試薬レスでインタクトのエクソソームを分析することが可能である点で、ステップ数の大幅な減少を実現できる。さらに、小型自動分析装置を開発することで、ほぼすべての分析工程の自動化が可能となり、極めて簡便なりキッドバイオプシーを実現できる。

【研究の独創性・新規性】

本研究で開発するエクソソームセンシング基板は、エクソソーム結合情報を蛍光変化に変換する機能を有したエクソソーム結合空間共通プラットフォームをもち、このプラットフォーム上に、任意の抗体を固定化できるなどのセンサシステムフォーマットとは一線を画す利便性を有している。本研究は、国際的に鋳型重合法をリードしてきた神戸大学の独自技術を用いてのみ構築可能であり、基盤技術からすべてオリジナルであることから、きわめて創造的で独自性が高い。

さらに、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、エクソソーム計測を自動化する。このようなエクソソーム自動分析計は、申請者らの独自技術によってのみ達成される。

研究・事業により期待される効果

エクソソームは、細胞間のコミュニケーションを担うことが明らかになって以来、その機能の解明のために、様々な研究が行われている。国民病とも言われ今日まで困難であったがん診断を、システム・インスツルメンツ(株)の自動分析のノウハウと神戸大学オリジナルのセンシング技術を融合した革新的計測装置であるエクソソーム自動分析装置によって可能にする。従来

の生検による診断からのパラダイムシフトを誘起する本提案の成果は、知的財産として保護しつつ実用化に向けて企業との共同研究に発展させることで新産業を創出し、生産される次世代ナノ材料は国民の健康維持に貢献するなど大きな社会貢献発展に資する。

実績報告内容

研究・事業の内容及び目標達成状況

本研究では、(1)膜タンパク質組成を同時測定するエクソソームセンシング基板の開発、(2)エクソソーム自動分析計の構築、(3)健常人およびがん患者のエクソソーム解析を行った。

初年度は、鋳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、鋳型粒子除去後の結合空間内のみ蛍光プローブおよび標的タンパク質に対する抗体を導入し、エクソソームセンシング基板を得た。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、エクソソーム自動分析計のプロトタイプ機の構築について、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(サイズ 100 μ L)を特注で作製し、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(図1)。作製したセンシングチップにて、標的膜タンパク質に対する抗体として抗CD9、CD63をそれぞれ導入し、5ng/mLのエクソソーム試料溶液を吸引・反応させ、蛍光強度変化を測定したところ、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。

次年度は、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と、健常人およびがん患者のエクソソーム解析を行った。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。そこで、乳がん関連のエクソソームを検出するため、抗CD9、抗CD63、抗エストロゲン受容体(ER)、抗ヒト上皮成長因子受容体2(Her2)、抗GGT1の5種類の抗体を検出チップに結合させ、乳がん患者の涙液中エクソソーム(青)と健常人の涙液中エクソソーム(オレンジ)の結合挙動について検証したところ、抗Her2および抗GGT1に対する結合挙動が異なることが明らかとなった(図2)。この結果について主成分分析を用いてパターンベースの解析を行ったところ、乳がん患者群と健常人群を分離でき、結合パターンを多変量解析し、健常人と

がん患者の識別が可能であることも示唆された。

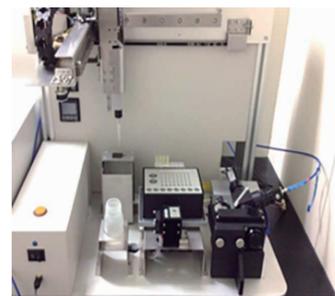
このように、エクソソーム結合空孔を多数配置したエクソソームセンシング基板を調製し、この基板が挿入・留置できる特注の扁平型ピペットチップと、吸引・吐出・分注から検出に至るすべての過程を自動化したロボットを用いることで、エクソソーム自動分析計の構築が可能であった。

今後の展開

今後は、主要5大がん(胃がん、肺がん、肝がん、乳がん、大腸がん)への水平展開を行い、健常人とがん患者の識別が可能かどうか検討し、がん診断の正確性、迅速性を評価する。

このようなエクソソーム自動分析計は、申請者らの独自技術によってのみ達成されるものであり、一般に向けて手軽にがん診断が行えるようなビジネスモデルについて、実施可能かどうか調査する。また、エクソソームのみならず、様々な疾病にも使用可能であることから、今後広範な応用展開が期待される。

(図 1)



(図 2)

