

細胞外小胞を簡便、迅速、高効率に分離・捕捉可能な ナノ多孔質ガラスデバイスの開発に成功！ ～細胞外小胞を利用した超早期がん診断に貢献～

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学未来社会創造機構ナノライフシステム研究所/大学院工学研究科 湯川 博 特任准教授、馬場 嘉信 教授らは、AGC 株式会社 材料融合研究所無機材料部ガラス・セラミックス材料チーム 山崎 秀司 研究員、東京医科大学医学総合研究所分子細胞治療研究部門 落谷 孝広 教授、熊本大学大学院生命科学研究部生体機能病態学分野消化器内科学講座 田中 靖人 教授らとの共同研究において、細胞外小胞^{※1}を簡便、迅速、高効率に分離・精製可能なナノ多孔質ガラスデバイス^{※2}の開発に成功しました。

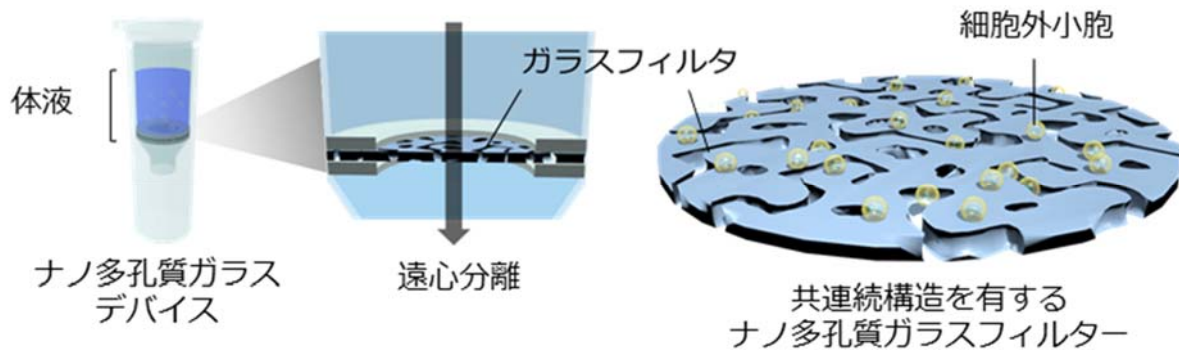
あらゆる体液中に存在する細胞外小胞は、個々の細胞情報をマイクロ RNA^{※3}、タンパク質、糖鎖などの物質として蓄えており、これらを分離・回収して解析することで、数多の疾患の低侵襲かつ早期診断、特に、細胞外小胞を利用した早期がん診断法の確立が期待されています。しかし、細胞外小胞は 100 nm 程度と極めて小さく、また細胞外小胞を分離・回収する技術が乏しく、細胞外小胞による早期がん診断の発展・進展の障害となっていました。

本研究では、 SiO_2 、 B_2O_3 、 Na_2O のスピノーダル分相^{※4}を酸・アルカリ処理することで得られた SiO_2 から成る厚さ 0.3 ~ 1.0 mm、孔径 150 ~ 600 nm に制御された共連続構造を有するナノ多孔質ガラスフィルタを作成し、これを遠心分離カラムに組み込んだナノ多孔質ガラスデバイスの開発に成功しました。

本デバイスを利用することで、細胞外小胞を簡便、迅速(5 分以内)、且つ高効率に分離・捕捉できるようになり、更に、これまでの一般的な方法と比較しても有用であるため、臨床現場への普及により細胞外小胞を利用した超早期がん診断の実現への貢献が期待されます。

本研究成果は、国際科学誌「Scientific Reports」(英国時間 2021 年 4 月 21 日付)のオンライン版に公開されました。

なお、本研究は、国立研究開発法人 科学技術振興機構(JST) 革新的イノベーション創出プログラム(COI STREAM)、及び日本医療研究開発機構(AMED) 肝炎等克服実用化研究事業の支援を受けて実施されました。



【ポイント】

- ✓ あらゆる体液中に存在する細胞外小胞は、個々の細胞情報をマイクロ RNA、タンパク質、糖鎖などの物質として蓄えており、これらを分離・回収して解析することで、数多の疾患について、低侵襲に早期に診断できる。
- ✓ 細胞外小胞は非常に小さいため(約 100 nm)、現状、医師が臨床現場において、日常的に細胞外小胞を分離・回収する技術が乏しく、細胞外小胞を用いた診断の実現やその発展に大きな障害となっていた。
- ✓ 厚さ 0.3 ~ 1.0 mm、孔径 150 ~ 600 nm に制御されたガラスフィルタを有する、ナノ多孔質ガラスデバイスの開発に成功し、本デバイスにより、通常の遠心機を用いることで、細胞外小胞の簡便、迅速(5 分以内)、且つ高効率な分離・捕捉に成功した。
- ✓ これまでの方法と比較しても有用であり、臨床現場への普及により細胞外小胞を利用した超早期がん診断の実現への貢献が期待される。

1. 背景

がんの罹患、再発、転移などに対する早期診断・発見は、がんの奏効率の上昇に極めて大きな役割を果たしているのは言うまでもありません。しかし、がんの早期診断・発見を広く一般的に実現していくためには、被験者(患者)の生体から検体(組織切片など)を採取して行う病理組織学的検査法である生検(バイオプシー)に代わり、痛みをほとんど伴わない非侵襲な方法である液体生検(リキッドバイオプシー^{※5})技術の発展・進展が重要になります。そして、近年、リキッドバイオプシーの検査対象としてあらゆる体液中に含まれる細胞外小胞に注目が集まっています。

細胞外小胞は個々の細胞情報をマイクロ RNA、タンパク質、糖鎖などの物質として蓄えており、これらを分離・回収して解析することで数多の疾患について、低侵襲に早期に診断できると期待されています。特に、がん細胞は多くの細胞外小胞を血清、尿などのあらゆる体液中に放出していることが知られており、細胞外小胞を利用した、がんの超早期診断法の確立が期待されています。ただし、細胞外小胞の大きさは 100 nm 程度であり、細胞と比較しても 100 分の 1 以下と極めて小さく、細胞を分離・回収するのに一般的に利用する遠心機では、分離・回収することができません。従って、医師が現状の臨床現場において、日常的に細胞外小胞を分離・回収することは非常にハードルが高く、細胞外小胞による超早期がん診断の発展・進展の障害となっていました。

そこで、本研究では、早期のがん診断・発見の実現に貢献するため、あらゆる体液から細胞外小胞を簡便、迅速、高効率に分離・捕捉可能なナノ多孔質ガラスデバイスの開発を目指しました。

2. 研究成果

今回、 SiO_2 、 B_2O_3 、 Na_2O のスピ

ノーダル分相を酸・アルカリ処理することで得られた SiO_2 から成る厚さ 0.3 ~ 1.0 mm、孔径 150 ~ 600 nm に制御された共連続構造を有するナノ多孔質ガラスフィルターを作成し、これを遠心分離カラムに組み込んだナノ多孔質ガラスデバイスの開発に成功しました(図 1a,b)。実際に、図 1b に示すデバイス上部(upper part)に、細胞外小胞を含む体液(血清、尿など)を 500 μL /1 回を入れ、6,000 \times g の条件下で遠心することで、細胞外小胞を 5 分以内で高効率にナノ多孔質ガラス膜中に分離・捕捉できることを明らかにしました(図 2)。なお、液体成分やそれ以外に含まれる細胞外小胞サイズ以下のタンパク質などの成分は下部(lower part)に回収されました。

そして、ナノ多孔質ガラス膜中に分離・捕捉された細胞外小胞に含まれるマイクロ RNA を抽出したところ、従来の超遠心法や超遠心分離法、凝集試薬法、ビーズ抗体法などと比較しても多くの種類のマイクロ RNA を抽出することが可能であり、高い再現性を示すことも分かりました。また、1 回のサンプル注入(500 μL)において、細胞培養上清、体液である血清や尿からマイクロアレイ^{※6} 解析に十分な量の細胞外小胞を分離・捕捉し、マイクロ RNA を抽出できることを実証しました(図 3a-e)。

更に、本デバイスは孔径、膜厚等に加え、遠心分離条件も容易に調整することが可能であるため、これらを最適化することで、これまでに血液や尿以外の数多の体液サンプルにも応用可能であることを明らかにしています。

以上、本デバイスは、通常の遠心機を利用することで、少量のサンプルから細胞外小胞を簡便に、短時間に、高効率に分離・捕捉が可能であり、ナノ多孔質デバイスを最適化することで数多の種類の体液中からの細胞外小胞も分離・捕捉が可能なることから、多くの研究機関、臨床現場において利用されることが強く期待されます。また、AGC 株式会社との共同開発によりそれらが加速されることが期待されます。

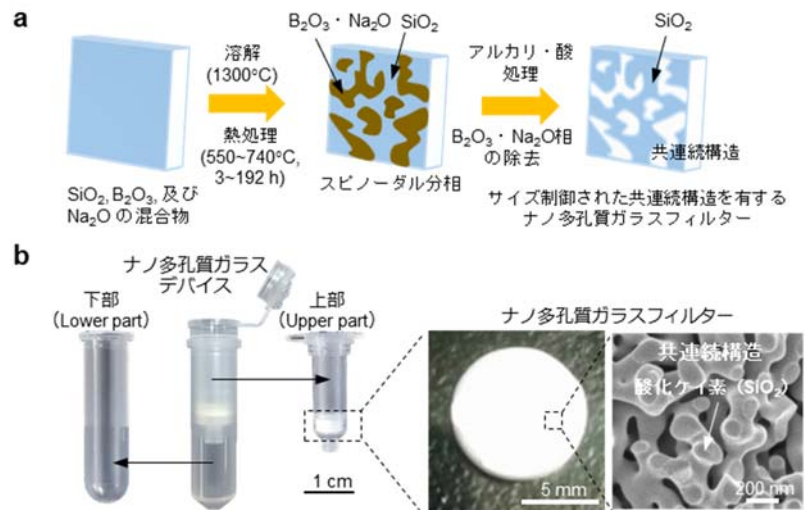


図1. ナノ多孔質ガラスデバイスの構造
a. 共連続構造を有するナノ多孔質ガラスフィルターの作成方法
b. ナノ多孔質ガラスデバイスの構造と形状

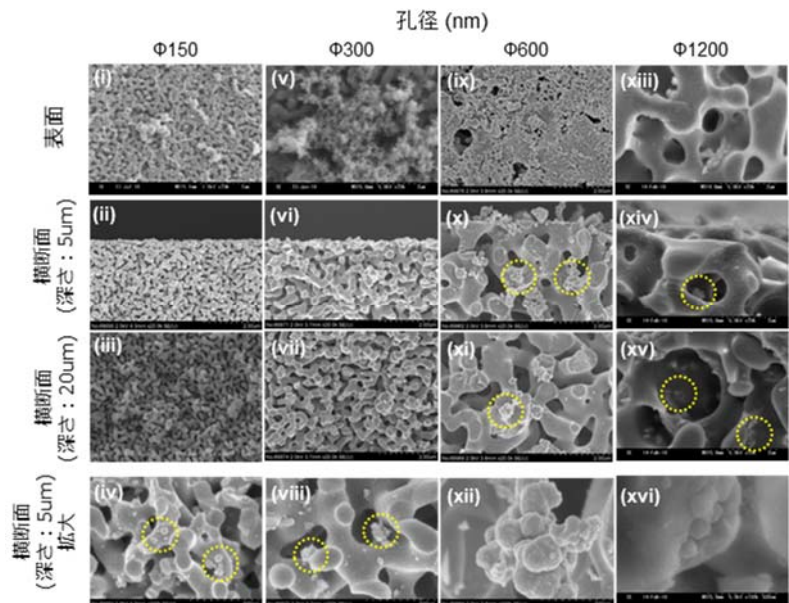


図2. ナノ多孔質ガラスデバイスによる細胞外小胞の分離・捕捉

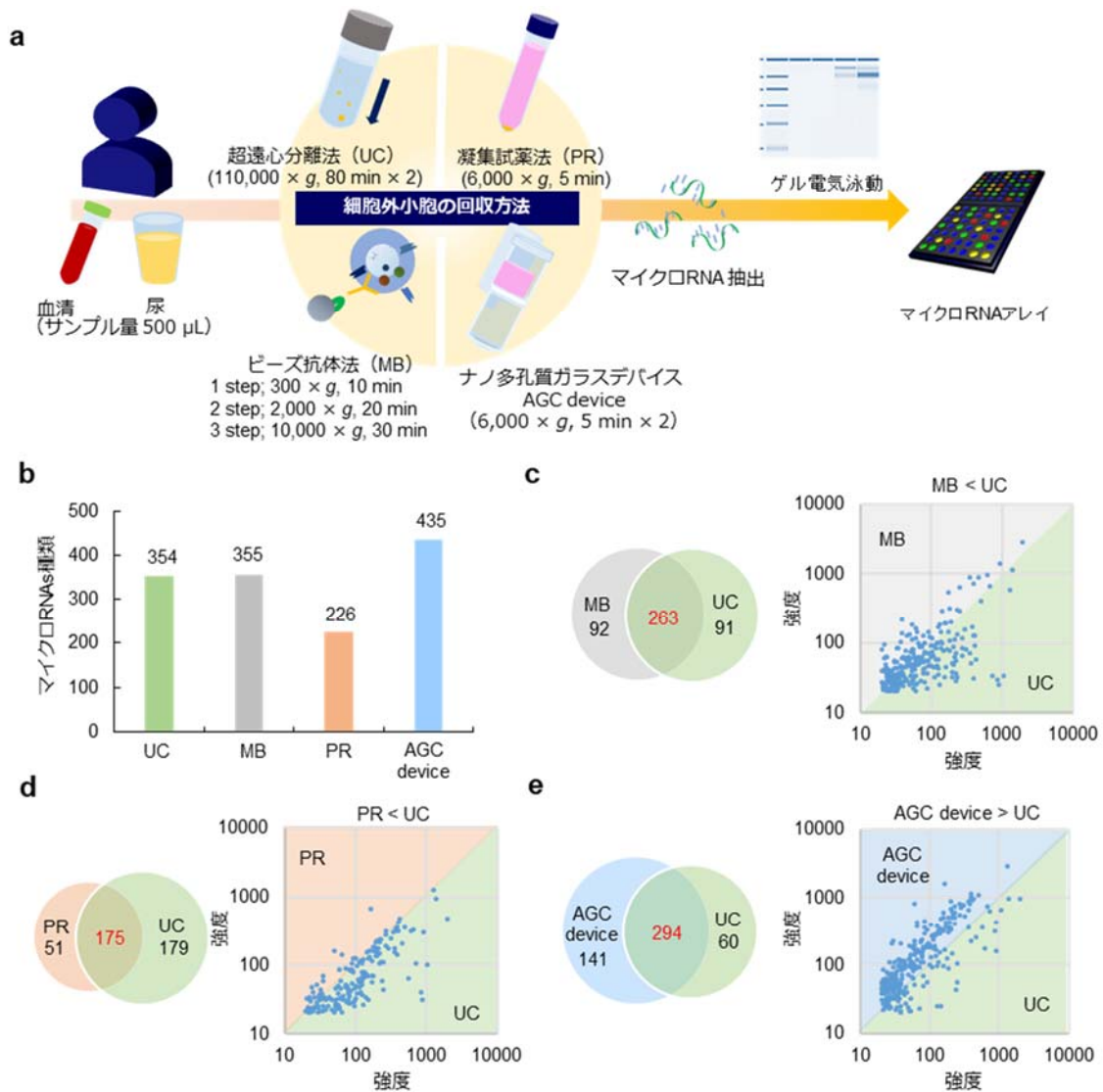


図3. ナノ多孔質ガラスデバイスにより捕捉された細胞外小胞からのマイクロRNA抽出種類の比較
a. 代表的な細胞外小胞の分離・回収方法からのマイクロRNA評価のスキーム
b. 各方法から分離・回収された抽出された細胞外小胞から抽出されたマイクロRNA種類
c-e. 各種方法とのマイクロRNA種類の比較

3. 今後の展開

今後は、本デバイスは少量の体液サンプルから効率的に細胞外小胞を分離・捕捉することが可能なことから、他の数多くの体液診断への応用展開を目指します。また、AGC 株式会社との共同開発により、高精度なナノ多孔質ガラスデバイスの安定供給を実現することで、多くの研究機関、臨床現場において利用頂くとともに、その解析データを共有することでより精度の高い診断方法の確立を目指します。

4. 用語解説

※1. 細胞外小胞

細胞が分泌する直径 40~5,000 nm 程度の脂質 2 分子膜に覆われた小胞体。

※2. ナノ多孔質ガラスデバイス

多孔質とは細孔が非常に多く空いている材料のことを意味し、そのなかでも細孔の大きさがナノサイズのものがナノ多孔質（ポーラス）材料という。ナノ多孔質ガラスデバイスは、ナノ多孔質ガラス膜を膜状に成型し、遠心分離カラムに導入したもの。

※3. マイクロ RNA

20~25 塩基長の短い RNA 鎖である機能性核酸。細胞内には多種類のマイクロ RNA が存在し、主に、細胞外小胞に内包され、細胞外へ放出されることが知られている。

※4. スピノーダル分相

不安定状態から平衡状態への状態変化に対応する相分離のこと。

※5. リキッドバイオプシー

腫瘍組織を用いる従来の生検(バイオプシー)に対して、血液などの体液を用いてバイオマーカーを測定する検査手法の総称。測定対象には腫瘍由来のがん細胞、DNA、細胞外小胞などが用いられる。検体採取の簡便さから、臨床での実用化が期待されている。

※6. マイクロアレイ

検査や実験の対象物(今回はマイクロ RNA)を基板上に多数(千個以上)固定化しておき、これに対してサンプル添加することで、それらの発現状況を一度に網羅的に検査するための技術。

5. 論文情報

掲載誌名: Scientific Reports

論文タイトル: Co-continuous structural effect of size-controlled macro-porous glass membrane on extracellular vesicle collection for the analysis of miRNA

著者: Hiroshi Yukawa^{1,2,3,4*}, Shuji Yamazaki⁵, Keita Aoki², Kengo Muto², Naoto Kihara⁵, Kazuhide Sato^{1,4,6}, Daisuke Onoshima¹, Takahiro Ochiya⁷, Yasuhito Tanaka⁸, and Yoshinobu Baba^{1,2,3,9*}

所属: 1. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan.

2. Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan.

3. Institute of Quantum Life Science, National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology, Anagawa 4-9-1, Inage-ku, Chiba, 263-8555, Japan.

4. Nagoya University Institute for Advanced Research, Advanced Analytical and Diagnostic Imaging Center (AADIC) / Medical Engineering Unit (MEU), B3 Unit, Nagoya University, Tsurumai-cho 65, Showa-ku, Nagoya, 466-8550, Japan.

5. AGC Inc., 1-5-1, Marunouchi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8405, Japan.

6. Nagoya University Institute for Advanced Research, S-YLC, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8603, Japan.

7. Department of Molecular and Cellular Medicine, Institute of Medical Science, Tokyo Medical University, Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8402, Japan.

8. Department of Gastroenterology and Hepatology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, Honjo 1-1-1, Chuo-ku, Kumamoto, 860-8556, Japan.

9. College of Pharmacy, Kaohsiung Medical University, Shin-Chuan 1st Rd., Kaohsiung, 807, Taiwan, R.O.C.

DOI: 10.1038/s41598-021-87986-2

URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-87986-2>

English Ver.: www.nature.com/articles/s41598-021-87986-2