

論文の内容の要旨

論文題目 チップ電気泳動法を用いたエクソソームの1粒子計測に関する研究

氏名 加藤 啓

第1章 序論

細胞は性状やサイズの異なる様々な細胞外小胞体 (extracellular vesicles) を分泌しており、このうち、エンドソーム由来で直径 100 nm 以下に分布を有するとされるナノベシクルがエクソソームである。近年、このエクソソームが細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしている可能性が指摘され、また、がん等の疾患の新規バイオマーカーとして大きな注目を集めている。しかし、現在エクソソームのような不均一なナノ粒子の集団を分離・計測する技術の精度や信頼性が課題となっており、エクソソーム分析のための手法の確立が必要とされているのが現状である。そこで本論文では、従来技術でカバーできなかったエクソソームのようなメゾスコピックな大きさのバイオナノ粒子に対して、バイオデバイス技術の応用を試み、エクソソームの1粒子分析という手法を提案した。具体的には、オンチップ粒子電気泳動を応用したエクソソームの1粒子計測によって、バイオデバイス技術がバイオナノ粒子の分析に有用であることを実証するとともに、エクソソーム診断の可能性を明らかにすることを目指した。

2章 ナノリポソームの1粒子電気泳動計測

本章では、エクソソーム計測のための前段階として、エクソソームのモデル粒子を用い、チップ電気泳動法がナノバイオ粒子の1粒子計測に有効であること実証するとともに、ナノ計測に特有の現象や課題の検討を行った。

まず、エクソソームのモデル粒子としてアニオン性のリポソームを調製し、蛍光イメージングのために内部に蛍光物質を内封させた。ゼータ電位は負電荷脂質 PS の割合によって制御し、粒子の変形等の影響がなく安定して電気泳動可能な脂質割合を選択した。粒子径は2ステップのフィルタリングで制御し、精製した GUV のみメンブレン(孔径: 50-1000 nm)を通すことによって、単分散かつ分散の小さいリポソームを作製した。

測定システムは主に、 μ CE チップ、白金電極、直流電源レーザー光源、倒立顕微鏡、

EM-CCD カメラで構成し、マイクロキャピラリー内に導入した蛍光リポソームをレーザーで励起し、その蛍光を EM-CCD カメラで検出することで、蛍光イメージングでの電気泳動計測を可能とした。

ナノリポソーム (メンブレン径: 50 nm) のゼータ電位計測を行った結果、本チップ電気泳動システムによる 1 粒子計測は、レーザードップラー法と比較して正確なゼータ電位分布を取得できることが示された。また、ナノリポソームのゼータ電位の標準偏差は、粒子径の大きなリポソーム (メンブレン径: 100-1000 nm) よりも 2 倍以上が大きくなる現象を明らかにした。さらに、このゼータ電位のばらつきの原因を詳細に検討し、最も大きな要因をリポソーム脂質膜に含まれる負電荷脂質分子 PS の統計的ゆらぎの影響によって説明するとともに、ゼータ電位の相対標準偏差を、リポソームの直径 d 、PS のモル組成比 X_{PS} 、脂質分子の面密度 σ 、統計的ゆらぎ以外の誤差 EM_{ξ} を用いて定式化した。実際この式を用いて、直径 d の関数で実験値にフィッティングした場合と、PS 比 X_{PS} の関数で実験値にフィッティングした場合を比較すると、両者の σ 及び EM_{ξ} はよく一致し、かつ面密度 σ は文献値とも近い値が得られ、導出した式の妥当性が示された。

以上のように、2 章では、チップ電気泳動法がナノバイオ粒子の分析に有効であることを示すとともに、ナノ領域の計測においては、分子数が極端に少なくなることに起因する統計的ゆらぎの顕在化という現象・課題が生じ得るという重要な知見を明らかにした。

3 章 エキソソームの 1 粒子電気泳動計測

本章では、実際のエキソソームの電氣的性状を明らかにするために、チップ電気泳動システムを応用して正常細胞及びがん細胞由来のエキソソームの 1 粒子電気泳動計測を行い、エキソソームの表面性状について検討を行った。

エキソソームサンプルは細胞の培養上清から分画超遠心法により精製した。細胞サンプルは、ヒト乳腺上皮細胞 MCF10A、2 種類のヒト乳がん細胞乳がん細胞 MDA-MB-231 (MM231) 及び MDA-MB-231-D3H2LN (MM231LN)、ヒト前立腺上皮細胞 PNT2、2 種類のヒト前立腺がん細胞 PC-3 及び PC-3 ML の全 6 種類を用いた。測定システムは、レーザー暗視野顕微イメージングと μ CE チップ電気泳動法を組み合わせ、エキソソームの 1 粒子計測を可能に構成した。

上記 6 種類の培養細胞由来のエキソソームの 1 粒子のゼータ電位を測定した結果、がん細胞由来のエキソソームのゼータ電位分布は、正常細胞由来のエキソソームのゼータ電位分布に比べて負にシフトすることを示した。この結果は、由来細胞のゼータ電位の変化と同傾向であり、エキソソームと由来細胞のゼータ電位には強い相関があることが明らかにされた (相関係数=0.92)。さらに、エキソソーム表面が由来細胞表面の性状を反映する原因について考察し、細胞のがん化による糖鎖のシアル酸の変化を、エキソソームも反映している可能性に言及した。この仮説を実験的に検証するため、前立腺上皮

細胞由来のエクソソームと前立腺がん細胞由来のエクソソームについて、シアル酸切断酵素(シアリダーゼ)で表面処理して1粒子ゼータ電位計測を行った。その結果、処理後はゼータ電位が正にシフトし、さらに立腺上皮細胞由来と前立腺がん細胞由来のエクソソームの電位差は小さくなることを示が示された。すなわち、エクソソームの由来細胞によるゼータ電位の差は糖鎖のシアル酸の発現量を反映していると考えられ、仮説の妥当性が確認された。

以上のように3章では、チップ電気泳動法を応用してエクソソームの1粒子電気泳動計測を行い、エクソソーム表面の電気的性状について明らかにするとともに、エクソソームが由来細胞の表面性状を反映していることを実験的に示した。

4章 エクソソーム表面の免疫反応性評価への応用

本章では、簡便かつ高感度なエクソソームの膜タンパク質分析方法の構築を目的として、オンチップ免疫電気泳動法によってエクソソーム表面の免疫反応性を評価し、エクソソーム診断の可能性を検討した。

まず、抗体標識によってエクソソームの平均ゼータ電位が変化するか確認した。CD10抗原の発現量が異なる乳性上皮細胞 MCF10A 及び乳がん細胞 MM231、また、HER2抗原の発現量が異なる乳がん細胞 SK-BR-3 及び MM453 を利用して、これらの培養上清からエクソソームを精製した。PALS 法によりこれらエクソソームの平均ゼータ電位を計測した結果、由来細胞の抗原の発現量に応じてエクソソームの平均ゼータ電位が変化することが示された。この結果は、エクソソーム表面に CD10 抗体や Her2 抗体が特異的に結合して、ゼータ電位の変化を引き起こしたものと考えられ、エクソソームの免疫反応の有無を、ゼータ電位を指標として判定できることが示された。

続いてオンチップ免疫電気泳動によってエクソソーム1粒子の免疫反応性が評価できるか検討した。乳がん細胞 MM231 由来のエクソソームに、エクソソームマーカである CD63 抗体を作用させて、チップ電気泳動法による1粒子ゼータ電位測定を行った結果、ゼータ電位ヒストグラムのピークは正の方向へシフトした。この結果は、オンチップ免疫電気泳動によって、エクソソーム1粒子レベルの免疫反応性を高感度に判定できることを示すものである。

さらに、担がんマウスの血中エクソソームのオンチップ免疫電気泳動を行い、エクソソーム診断への応用可能性を検討した。ヒト乳がん細胞 MM231LN をヌードマウス(♀)に移植し、移植後30日目に採血した血漿から、分画超遠心法にて血中エクソソームを精製した。ヒト細胞由来のエクソソームマーカ(マウス細胞由来のエクソソームには作用しない)である CD63 抗体、MM231LN 細胞のマーカである CD44 抗体を血中エクソソームに作用させ、免疫電気泳動実験を行った結果、ヒト乳がん細胞 MM231LN 由来のエクソソーム表面の免疫反応によって、ピークが分離したゼータ電位のヒストグラムが得られた。この結果は、本章で提案した手法によって、血漿中に少量含まれるが

ん細胞由来エクソソームの 1 粒子免疫性を高感度に判定できることを意味するものである。

以上のように 4 章では、ゼータ電位を指標としてエクソソーム表面の免疫性反応を評価できることを示した。また、オンチップ免疫電気泳動法は、1 粒子レベルの免疫反応を評価可能なため、サンプル中のわずかながん等の疾患エクソソームも検出可能であり、エクソソーム診断へも応用できる可能性を示した。

5 章 結論

本論文では、バイオデバイス技術をバイオナノ粒子計測に展開し、チップ電気泳動法を応用したエクソソームの 1 粒子計測という新規なエクソソーム分析法を提案した。そして、バイオデバイス技術が、エクソソームのようなナノバイオ粒子の分析に有効であることを実証し、エクソソーム診断にも応用できる可能性を示した。これらの成果は、バイオナノ粒子の分析法の新しい方向性を示し、生命現象におけるエクソソームの役割の解明や、エクソソームを利用した診断・治療の実現といった医学・生命科学の更なる発展に貢献するものと期待される。