

## 審査の結果の要旨

氏名 加藤 啓

細胞は性状やサイズの異なる様々な小胞体を分泌している。これらの内、エキソソームはエンドソーム由来で 100 nm 以下に直径が分布するナノベシクルである。近年、このエキ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、がん等の疾患のバイオマーカーになりうるとの報告が相次ぐなど、生物学、医学の分野において重要な研究対象となっている。しかしながら、エキソソームのような不均一なナノ粒子の集団を分離・計測するために有効な分析方法、装置の不在が顕在化しており、エキソソーム分析法の確立が、エキソソーム研究の大きな課題となっている。そこで本論文では、従来技術でカバーできなかったエキ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を応用展開し、エキソソームの 1 粒子分析手法を提案し、その疾患診断への応用を目指している。具体的には、マイクロキャピラリーチップ粒子電気泳動を応用したエキソソームの 1 粒子計測によって、個々のエキソソームの免疫反応性評価の可能性を明らかにしている。本論文は全 5 章からなる。

第 1 章では、研究の背景と目的、ならびに論文の構成を示している。エキソソームに代表される細胞外小胞体の医学および生物学における研究の歴史的背景と現状を概説した上で、エキソソーム分析のための手法、ツールが現在確立されていないという重要な課題を明らかにしている。この課題解決のため、エキソソームを分析対象としてマイクロ流体デバイス技術を応用した計測方法を開発することの意義を述べている。

第 2 章では、提案するマイクロキャピラリーチップ電気泳動システムの概要について述べた後に、エキソソーム計測のための前段階として、エキ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を述べている。さらに、ナノ領域の大きさを有する小胞体の計測においては、小胞体を形成する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がゼータ電位測定においても顕在化するという事実を実験的に初めて明らかにしている。

第 3 章では、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、エキソソーム表面の電氣的性状を評価するとともに、由来細胞の表面性状との相関も明らかにしている。特

に、がん細胞由来のエキソソームのゼータ電位が正常細胞由来のエキソソームのゼータ電位に比べて負にシフトすることを示し、この原因について、由来細胞表面の生物学的性状、すなわちがん化に伴う糖鎖の発現量の変化がエキソソーム表面においても継承される可能性についても実験で示している。

第4章では、簡便かつ高感度なエキソソームの膜タンパク質分析方法として、オンチップ免疫電気泳動法によるエキソソーム表面の免疫反応性評価法について述べている。乳がん細胞由来のエキソソームに、エキソソームマーカーである CD63 抗体を作用させて、エキソソームの免疫電気泳動計測を行った結果、エキソソーム表面の膜タンパク質の免疫反応性を、ゼータ電位を指標にして評価できることを明らかにしている。さらに、エキソソーム診断の可能性を検討するために、乳がん細胞を移植したマウスの血漿由来のエキソソームの免疫電気泳動法を行った結果、担がんマウス血漿中にわずかに含まれる乳がん細胞由来のエキソソームが検出できたことが示されている。

第5章は以上の総括であり、さらに、バイオデバイス技術を応用したエキソソーム分析法の今後の展望について述べている。

以上のように、本論文は、バイオデバイス技術を応用してエキソソームの電気泳動度を1粒子レベルで計測するための方法論を提案し、実際に培養細胞および血液由来のエキソソームの評価実験を通して、その有用性を実証したものである。本論文で創出された新しい方法論は、生体由来ナノ粒子であるエキソソームに限らず、ドラッグデリバリーシステムで利用されるナノミセルなど人工的なナノ粒子など広い範囲のナノベシクルを対象として、その機能を精密に評価する上で大変有用であり、これらの生物学的な意味の理解に貢献するのみならず、近い将来、早期診断、治療などの医学分野におけるナノベシクル応用を進める際の技術的基盤を与えるものである。本論文におけるこれらの成果は、バイオエンジニアリングの観点から有用性が高く、学術的にも価値が高いと判断される。

よって、本論文は、博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。