

称号及び氏名 博士（工学） 藤原 聡子

学位授与の日付 2024 年 3 月 31 日

論文名 「エクソソームの粒子径分級・捕集・検出を志向した  
マイクロ・ナノ分析デバイスの開発」

論文審査委員 主査 久本 秀明

副査 松岡 雅也

副査 椎木 弘

## 論文要旨

エクソソームとは、細胞間情報伝達の役割を担う細胞外微粒子（Extracellular Vesicles, EVs）の 1 つで、細胞由来の構造をもつ。そのため、疾患診断のための新規バイオマーカーへの応用、ガン転移機構など多様な生体内反応の解明、疾患治療のための薬剤キャリアへの展開、と未病から治療まで幅広く医学・生理学分野での研究が進んでいる。エクソソームは『粒子径』・『膜・内包物を構成する生体分子』・『分泌機構』に基づき、アポトーシス小胞やマイクロベシクルとは本来区別される。しかし、各々未だ不明瞭な点が数多くあることから、この分類は多くの曖昧さを含んでいる。近年、EVs の『粒子径』と『膜・内包物の生体分子』の相関を示唆する結果が報告された。しかし、その報告内で使用された方法を含め、これまで開発されてきた『粒子径』分離法や『膜・内包物の生体分子』検出法など EVs/エクソソーム解析方法には、主に 2 つの課題があった。1 つ目は、従来の粒子径分離が分離原理・分泌細胞に依存した、ある一定の特徴をもつ微粒子群の採取に過ぎない点である。例えば超遠心分離法は、微粒子の特徴である拡散や（粒子径に依存しない）比重に基づく原理である。そのため、数 100 nm 単位でしか分離できず、数 10 nm 単位での高精度な分級は困難であった。2 つ目は、従来の膜・内包物の生体分子検出法、例えば質量分析法は優良な定量性を示すが、対象を限定した単一オミクス解析が主流であるため、全ての生体分子の網羅的解析には、検出する生体分子に応じた方法とそれに伴う煩雑な前処理、また長い分析時間、高い分析費用が必要な点である。ここではさらに、微粒子群を破砕するため、検出された生体分子の所在特定も極めて困難であった。以上のことから、詳細な EVs の分類、また EVs/エクソソームの『粒子径』と『膜・内包物の生体分子』の相関を明らかにするための分析方法/デバイスが求められている。

そこで本研究では、上記 2 つの課題に対して、ナノ空間内電気二重層（Electric Double Layer, EDL）を用いた粒子径分級、プラズモニック結晶（Plasmonic Crystal, PC）上への誘電泳動（Dielectrophoresis, DEP）捕集・表面増強ラマン散乱（Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS）検出を利用したデバイス開発を着想した。

まず、EDL を利用した粒子径分級法では、石英表面に形成される EDL の厚みが溶液の電解質濃度で変化する特徴をナノ空間に応用し、エクソソーム粒子径分級へ展開した。次に、金属ナノ構造の周期配列体である PC の増強電場によって観測される SERS を利用した、エクソソームの膜・内包物情報の網羅的かつ一括検出を着想した。しかし、上記提案の粒子径分級法で採取したエクソソーム溶液は低濃度と予想される。さらに、PC 増強電場領域は極めて狭小なため、増強電

場領域に吸着したエクソソームのラマン信号のみが観測され、増強電場領域以外のエクソソームは信号に寄与しないと考えられる。したがって、SERS を利用した膜・内包物情報の取得前に、PC 増強電場領域に対して、溶液中のエクソソームを捕集/濃縮する手段が必要と考えた。そこで、DEP を利用した PC 上へのエクソソーム捕集法を着想した。本法による、エクソソーム膜・内包物に係るタンパク質の PC 増強電場領域への捕集挙動を、PC の吸収スペクトルで評価した。最後に、SERS を利用したエクソソーム膜・内包物情報の網羅的検出には、増強電場領域が狭小な通常の PC よりも、広範囲な増強電場領域をもつ PC である金ナノコーンアレイ (Gold Nanocone Array, Au NCA) が有利と考え、作製した Au NCA の励起波長依存性と SERS 性能を評価した。

第 1 章は緒言であり、関連する先行研究を参照し本研究の背景と目的を述べた。

第 2 章では、ナノ空間内 EDL 厚さ制御に基づくエクソソーム粒子径分級について述べた。従来型エクソソーム粒子径分離法の課題解決のため、これまでに反応系の微小化に伴う分析時間短縮、装置の小型化、複数機能の統合による高スループット化が達成されてきた。しかし、分離時間や回収率は改善できたが、これらは依然として原理に依存した微粒子群の採取であり、かつ数 100 nm 単位での分解能でしか分離できない。この分解能改善のため Deterministic Lateral Displacement (DLD) 法が開発された。しかし、DLD 法では粒子径 50 nm と 110 nm ナノ粒子 (NPs) の分離は実現できたが、エクソソーム分離では NPs の様に明確な分離は困難であった。そこで、本章ではナノ空間内 EDL 厚さ制御に基づくエクソソーム粒子径分級法を検討した。本法は、電解質濃度調節で石英表層の EDL 層厚みが制御できる特徴をナノ空間に適用したもので、電解質濃度の細かい調節で数 10 nm 単位でのエクソソーム粒子径分級を実現できると考えた。ここでは、まず高さ 200 nm のナノ流路を配する石英製マイクロ・ナノデバイスを作製し、次に、粒子径 40, 70, 140 nm NPs を用いてコンセプト確認を行った。この結果、泳動液の電解質濃度調節で EDL 厚みを制御でき、この原理を用いた数 10 nm 単位でのエクソソーム粒子径分級の可能性を示唆した。そのため、実際にエクソソーム試料で粒子径分級を検証した結果、約 30–40 nm の分解能でのエクソソーム粒子径分級を初めて実現した。しかし、粒子径分級後に回収したエクソソームの個数濃度は低く、スループット向上が必要だと分かった。今後、溶液制御のためのシースフローやナノ流路本数の増設によるスループット向上が見込まれる。

第 3 章では、DEP を利用した PC 上へのエクソソーム捕集法について述べた。第 2 章で粒子径分級した低濃度エクソソームを、第 4 章で開発する PC-SERS デバイスで膜・内包物検出するためには、PC 増強電場領域へのエクソソーム捕集/濃縮が求められる。そこで、本章では DEP を利用した PC 増強電場領域への迅速・簡便なエクソソーム捕集を検討した。DEP は誘電体が不均一電界にさらされた時に、誘電体に力がかかる現象である。そのため、PC 近傍に形成される不均一電界の利用で、溶液中のエクソソームを PC 増強電場領域へ捕集できると考えた。ここでは、PC として金ナノホールアレイ (Gold Nanohole Array, Au NHA) と、対向電極として Indium Tin Oxide (ITO) 電極を用い、Au NHA-DEP デバイスを作製した。次に、粒子径 250 nm NPs を用いてコンセプト確認を行った。結果、交流電圧印加に伴う DEP と交流電気浸透流による NPs の Au NHA 上への迅速な捕集が達成され、エクソソームなど生体分子捕集の可能性を示唆した。そのため、エクソソーム膜・内包物に含まれるアルブミンのモデルとして、ウシ血清アルブミン (BSA) の捕集を検証した。その結果、NPs 同様、BSA の Au NHA 上への捕集/濃縮が実証された。以上から、DEP がエクソソームに含まれるタンパク質の捕集に有効であり、高感度 SERS 検出への寄与が示唆された。

第 4 章では、広範囲増強電場をもつ PC の Au NCA を利用した SERS デバイス開発と、エクソソーム膜・内包物検出へ向けた基礎検討について述べた。これまで開発されてきた SERS デバイスは、非常に強い増強電場形成を志向したため、先鋭性に富んだ PC 構造が多い。また、増強電場領域が狭小なため、実際には増強電場領域に存在するエクソソーム膜・内包物のラマン信号を観測しているだけである。そこで、当研究室で開発された Au NCA の広範囲増強電場を利用した SERS デバイスを開発した。ここでは、Au NCA を作製し、4-メルカプト安息香酸 (4-MBA) を用いて、まずラマン信号強度の励起波長依存性を検討した。結果、532 nm に比べて 785 nm 励起で

は、約 60 倍信号強度が大きかった。これは、532 nm 励起時は NCA 内部、785 nm 励起時は NCA 外部に増強電場が形成されているため、NCA 外部に存在する 4-MBA の散乱光は 785 nm 励起の方が増幅しやすかったためと考察される。次に、785 nm 励起での SERS 性能を評価した。結果、Au NCA は金薄膜に比べて約  $10^5$  倍ラマン信号を増幅できることが分かった。また、Au NCA-SERS のデバイス間ラマン信号誤差は 6% 未満であった。以上の結果から、Au NCA は極めて良好な再現性を示す SERS デバイスだが、感度は先鋭性をもつ、あるいは類似するナノ構造をもつ SERS デバイスに比べて劣ることが分かった。今後、ラマン信号増幅のため、第 3 章で検討した DEP 捕集を組み合わせた高感度化が期待できる。

第 5 章では、本研究で得られた結果や知見を総括した。本研究では、エクソソーム粒子径分級とエクソソーム膜・内包物の生体分子検出へ向けた分析デバイス設計の指針を示した。本研究で開発した方法/デバイスの更なる高性能化で、エクソソームの『粒子径』と『膜・内包物の生体分子』の相関、そして EVs 分類の明確化に寄与できると期待される。

## 審査結果の要旨

本論文は、これまで研究者間で統一した分析が行われてこなかった、細胞外微粒子の 1 つであるエクソソームを分析する包括的なデバイス設計・方法論構築を目指し、粒子径分級・試料分子捕集・検出に分けてそれぞれの新たな方法論を明示した研究であり、以下の成果を得ている。

ナノ空間内電気二重層 (Electrical double layer, EDL) 厚さ制御に基づくエクソソーム粒子径分級では、電解質濃度調節で石英表層 EDL 層厚みが制御できる特徴をナノ空間へ適用し、電解質濃度の細かい調節で数 10 nm 単位でのエクソソーム粒子径分級を検討した。ここでは、まず高さ 200 nm のナノ流路を配する石英製マイクロ・ナノデバイスを作製し、ナノ粒子 (Nano particles, NPs) 試料でコンセプトの原理検証を行い、数 10 nm 単位でのエクソソーム粒子径分級の可能性を示唆した。実際にエクソソーム試料で粒子径分級を検証した結果、約 30–40 nm の分解能でのエクソソーム粒子径分級を初めて実現した。

エクソソームの高感度検出に寄与するプラズモニック結晶 (Plasmonic crystal, PC) 上へのエクソソーム捕集法の検討では、誘電泳動 (Dielectrophoresis, DEP) に着目した。DEP は誘電体が不均一電界にさらされた時に、誘電体に力がかかる現象である。そのため、PC 近傍に形成される不均一電界の利用で、溶液中のエクソソームを PC 増強電場領域へ捕集できると考えられる。ここでは、PC として金ナノホールアレイ (Gold Nanohole Array, Au NHA) と、対向電極として Indium Tin Oxide (ITO) 電極を用い、Au NHA-DEP デバイスを作製した。まず粒子径 250 nm NPs でコンセプト確認を行い、交流電圧印加に伴う DEP と交流電気浸透流による NPs の迅速な捕集を確認し、エクソソームなど生体分子捕集の可能性を示唆した。エクソソーム膜・内包物に含まれるアルブミンのモデルとして、ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin, BSA) の捕集を検証した結果、BSA の Au NHA 上への捕集/濃縮が実証されたことから、DEP がエクソソームに含まれるタンパク質の捕集に有効であることを明らかにした。

広範囲増強電場をもつ PC の金ナノコーンアレイ (Gold Nanocone Array, Au NCA) を利用した表面増強ラマン散乱 (Surface-enhanced Raman scattering, SERS) デバイス開発と、エクソソーム膜・内包物検出へ向けた基礎検討では、Au NCA を作製し、4-メルカプト安息香酸 (4-MBA) を用いて検討した。ここではラマン信号強度の励起波長依存性を検討し、光励起時に形成される増強電場発生領域と感度向上の関係を考察した。適切なレーザー光源の利用で信号強度を増強できることを明らかにした。次に、SERS 性能を評価した結果、Au NCA は金薄膜に比べて約  $10^5$  倍ラマン信号を増幅できることを明らかにした。また、Au NCA-SERS のデバイス間ラマン信号誤差は 6% 未満であり、Au NCA は極めて良好な再現性を示す SERS デバイスとなることも明らかにした。

以上の諸成果は、エクソソーム粒子径分級とエクソソーム膜・内包物の生体分子検出へ向けた分析デバイス設計および分析の方法論の指針を示したものである。今後、本研究で開発した方法/デバイスの更なる高性能化で、エクソソームの『粒子径』と『膜・内包物の生体分子』の相関、そして細胞外微粒子分類の明確化に寄与できると期待されるものであり、本分野の学術的・産業的な発展に貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。学位論文審査委員会は、本論文の審査および最終試験の結果から、博士 (工学) の学位を授与することを適当と認める。