

尿中マイクロ RNA 測定技術

安井 隆雄, 馬場 嘉信

日本人の死亡原因の第1位である「がん」。2人に1人は罹患すると言われ、2015年には、年間約37万人が亡くなっている。厚生労働省は「がん対策推進基本計画(第3期)」(18年3月)の中で、がんの早期発見・早期治療につながるがん検診の重要性を指摘し、受診率の向上を目指しているが、実際のところ、がん検診は何かと負担が大きく実現までには時間がかかる見通しである。特に働き盛りの世代は、時間がなく、受診の機会を逃すこともあるのが現状である。そのような状況に一石を投じるべく、筆者らは分析化学・材料化学的な観点に基づき、簡単で気軽ながん検出を可能にする研究を推進してきた。本稿では「創案と開発」稿の一環として、すでに曖昧になりつつある記憶を紐解き、失敗談も含めた開発秘話や成功までのストーリーを稚拙ながら紹介させて頂く。拙稿より、様々な苦労の中で、多角的な観点から何が解決のキーとなったかを読み取って頂ければ幸いである。

1 ナノワイヤとの出会い

2011年頃に、大阪大学の川合知二教授(現大阪大学特任教授)が代表であった最先端研究開発支援プログラム(FIRST)の共同研究者である大阪大学の柳田剛准教授(現東京大学教授)から、「新しい材料があるけれど使ってみないか」と紹介されたのがナノワイヤであった。筆者(安井)は学生の時より、DNAやタンパク質といった生体分子を分離する研究を行っており、当時は、電気泳動を用いて1分子DNAの挙動を精密制御すべく、ナノピラー(直径500nm・高さ4000nm・ピラー間隔100~1000nm)や、ナノウォール(幅600nm・高さ5000nm・間隔200nm)といったナノ構造を、ゲルやポリマーの代わりに用いる研究を推進していた¹⁾²⁾。これらナノ構造は、電子線描画装置などを使った微細加工技術(トップダウンアプローチ)で合成石英基板上に作製していたため、1枚のチップを作製するのに3日程度が必要であり、また、構造体の直径はどれだけ小さくしても~100nmであった。自己組織化(ボ

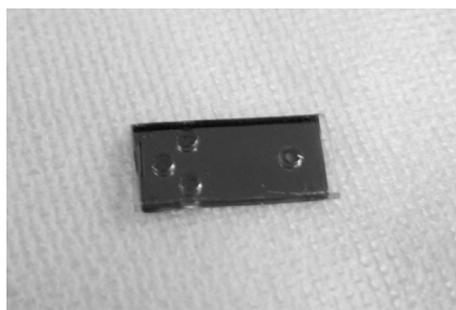


図1 Si基板上のSnO₂ナノワイヤとポリジメチルシロキサン(PDMS)微細流路を組み合わせたナノワイヤデバイス

トムアップアプローチ)で成長する材料「ナノワイヤ」は、作製にかかる時間が1日未満であり、かつ、構造体の直径が10nm程度であるため、作製に要する時間・作製される構造体のサイズの観点から、ナノワイヤは非常に魅力的な材料であった。

共同研究を開始して、最初に出てきたSnO₂ナノワイヤはSi基板上に作製されており、また、微細流路はポリジメチルシロキサン(PDMS)であったため、当該ナノワイヤチップを用いた電気泳動の動作検証は非常に困難であった(図1)。大阪大学グループの研究者Sakon Rahongさん(平成26年度博士(工学)名古屋大学;現King Mongkut Institute of Technology Ladkrabang(KMITL)講師)がデバイスを大阪大学で作製し、名古屋大学グループのM2本山高貴さん(平成23年度修了)とB4呉瓊さん(平成25年度修了)が中心となり名古屋大学で電気泳動の実験を行うという研究体制で進めていた。しかし、電気泳動中のSi基板の絶縁破壊と気泡生成によって、SnO₂ナノワイヤへのDNA泳動は困難を極めていた。共同研究開始後、半年くらいが経過した時に、名古屋大学グループより大阪大学グループへデバイスをSi基板から合成石英基板へ変更してもらおうようお願いをした。それまでに絶縁破壊を抑えるために、SiO₂膜の成膜などを行っていたが、想定していた性能が得られなかったためである。

大きな方針転換もあり、合成石英基板をベースとしたデバイス作製に半年を要したが、Sakonさんの努力も

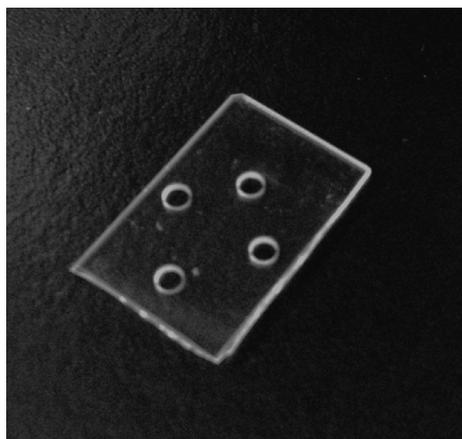


図2 0.5 mm 厚の合成石英基板に作製した微細流路中に SnO₂/SiO₂ (10 nm/10 nm) のコアシェルナノワイヤを成長させたナノワイヤデバイス

あり、0.5 mm 厚の合成石英基板に作製した微細流路中に SnO₂/SiO₂ (10 nm/10 nm) のコアシェルナノワイヤを成長させたナノワイヤ基板が完成した。緩衝溶液中の DNA の表面電荷は負に帯電しており、同緩衝溶液中で表面が負に帯電する SnO₂ をコア層として成長させ、さらに同緩衝溶液中で表面が負に帯電する SiO₂ をシェル層に作製した。そこからは、名古屋大学グループの定番であり、ヘキサフルオロケイ酸中にて、ナノワイヤ基板と 0.13 mm 厚の合成石英基板を貼り合わせ、ナノワイヤデバイス(図2)を完成させた。そのデバイスを用い、DNA 1 分子の挙動解析や、DNA の電気泳動分離を達成した³⁾。このナノワイヤデバイスは、Sakon さんの工夫もあって三次元化の道を進み、名古屋大学の研究員となった Sakon さんが、DNA・RNA・タンパク質の世界最高速度分離を発表した^{4)~6)}。

2 エクソソーム・マイクロ RNA との出会い

筆者らは、上述の最先端研究開発支援プログラム川合 FIRST の期間中に、名古屋大学豊田講堂にて開催された International Symposium on Innovative Nanobio-devices 2012 (ISIN 2012) (3月21~22日)にて、国立がん研究センターの落谷孝広教授のご講演でエクソソームとマイクロ RNA に出会った。落谷教授は、「細胞が分泌するエクソソームに含まれるマイクロ RNA を調べることで、がんの兆候が分かる。これからのがん研究はエクソソームが主流になる」と話されていた。その約1週間後の2012年4月に、筆者らは血液中のエクソソームを分離・捕捉するための研究をスタートさせた。時を同じくして、柳田グループよりナノワイヤを大面積で成長させる技術に成功したとの報せを受けた。前述のナノワイヤは physical vapor deposition (PVD) を用いて、ナノワイヤを vapor-liquid-solid (VLS) 成長させるため、成長させることが可能な面積は 10 mm×5 mm と

制限があった。装置改造より、ナノワイヤの成長可能な面積を大きくすることは可能であったが、それでもその面積は PVD のチャンバーサイズに依存してしまう。VLS 成長法に対し、柳田グループの Yong He 博士研究員(現重慶大学教授)が成功したナノワイヤの水熱合成成長法は、液相中で大面積にナノワイヤを成長可能であるメリットがあった⁷⁾。

水熱合成による酸化亜鉛ナノワイヤ成長法は、非常にシンプルであり、硝酸亜鉛とヘキサメチレンテトラミンを加えた溶液に基板を浸漬して、常圧・95℃の環境で3時間反応させると、基板表面に酸化亜鉛ナノワイヤが成長される方法である。使用する試薬は安価であり、プロセスも浸漬だけであるため大面積化が容易であった。また、特殊な装置を用いないことも大きなメリットであった。その大阪大学にて開発された酸化亜鉛ナノワイヤの成長技術を伝授して頂き、名古屋大学でのナノワイヤ成長プロセス確立に約半年を要した。エクソソームの取り扱いには、当時、名古屋大学の湯川博特任講師(現名古屋大学特任准教授)が Exoquick などの市販のキットを用いて、培養細胞からの採取に成功していた。また、名古屋大学の加地範匡准教授(現九州大学教授)の紹介もあって名古屋大学理学部の超遠心機を用いたエクソソーム分取にも成功していた。これら「エクソソームを扱う」技術と「ナノワイヤを成長させる」技術がそろい、ナノワイヤを使ったエクソソームの分離・捕捉とマイクロ RNA 回収の研究開発の準備が整った。水熱合成成長によるナノワイヤの大面積化とエクソソームの分離・捕捉に向けた研究を、当時、名古屋大学 M1 の伊藤聡さん(平成25年度修了)と共に開始した。

3 ナノワイヤを用いた尿中マイクロ RNA の分離回収

上述の通り2012年秋には準備が整い、筆者らはエクソソームの分離・解析に着手した。エクソソームは、人の体液、例えば、血液や汗、唾液、尿に含まれているという話を伺っていたため、使い捨て可能なナノワイヤデバイスの開発を行った。ポリメタクリル酸メチル樹脂(PMMA)に酸化亜鉛ナノワイヤを成長させ、使い捨て可能な PMMA ナノワイヤデバイスを開発した(図3)。そして、2013年春、名古屋大学 M2 となっていた伊藤聡さんが PMMA に微細流路とナノワイヤを作製した PMMA ナノワイヤデバイスを用い、エクソソームと Lysis buffer を連続導入することで、エクソソームに内包されるマイクロ RNA が抽出されることを確認した。エクソソーム内マイクロ RNA 抽出は、その後の実験にて再現が可能であり、エクソソームを酸化亜鉛ナノワイヤにて捕捉可能であることに手応えを得ることができた。

次に着手したのは、酸化亜鉛ナノワイヤのエクソソーム捕捉能の評価であった。この実験は2013年春より開

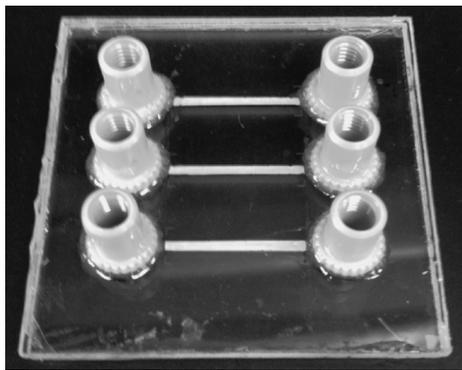


図3 ポリメタクリル酸メチル樹脂 (PMMA) に酸化亜鉛ナノワイヤを成長させたナノワイヤデバイス

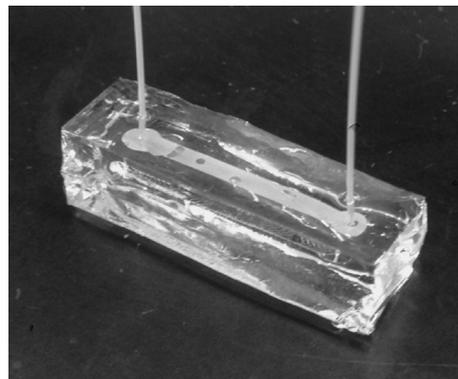


図4 PDMS に埋め込んだナノワイヤと、ヘリンボーン構造を持つ微細流路を作製した PDMS を貼り合わせたナノワイヤデバイス

始し、非常にタフな実験となった。2013年春当時、ナノトラッキング法は、商品として販売されていなかった(※ナノサイトシリーズのプレスリリースは2014年8月29日、JASIS2014内のマルバースが初セミナー)。そのため、筆者らのグループは、当時、名古屋大学M1である小中出侑樹さん(平成26年度修了)が中心となり、粒度分布・粒径測定ナノ粒子マルチアナライザー qNano を用いた濃度定量を行っていた。細胞上清や血清、尿中から超遠心法によりエクソソームを抽出し、リン酸緩衝生理食塩水に分散させ、qNanoによる濃度定量を行い、濃度を統一したエクソソームを酸化亜鉛ナノワイヤに捕捉させ、エクソソーム膜タンパク質 CD9/CD63/CD81 を蛍光染色した抗体で検出する実験を繰り返した。静置条件におけるエクソソームの吸着に要する時間や、エクソソーム濃度・抗体濃度の条件について先行情報がほとんどなく、手探りで条件検討を進めていた。小中出さんの努力の甲斐もあり、2014年秋の段階では、酸化亜鉛ナノワイヤがエクソソームを捕捉していることが明らかとなった。また、2015年春には、他の酸化ナノワイヤと酸化亜鉛ナノワイヤのエクソソーム捕捉能を比較検討した。この実験は、当時、名古屋大学M1である中村宥太さん(平成29年度修了)によって行われ、Si基板上に成長させた酸化亜鉛ナノワイヤに、原子層堆積装置により Al_2O_3 や SiO_2 などを成膜し、コア-シェルナノワイヤとエクソソームの捕捉能に関する知見が得られた。

2014年春には、尿中マイクロRNAを酸化亜鉛ナノワイヤで再現よく回収するデバイスの開発に着手した。この実験は、当時、名古屋大学M1である竹下大貴さん(平成27年度修了)が中心となって行った。伊藤さんと竹下さんが尿中マイクロRNAを酸化亜鉛ナノワイヤによって大量回収できることを報告して以降、再現性を評価するための実験を繰り返している時に、PMMA上の酸化亜鉛ナノワイヤが剥離している様子が観察された。その様子を詳しく観察すると、エクソソームを破碎してマイクロRNAを回収するために用いる Lysis

buffer がナノワイヤを PMMA から剥離していることが確認された。このナノワイヤ剥離が再現性を著しく悪化させている原因であることに気づいた筆者らは、ナノワイヤをシリコン樹脂の一種であるポリジメチルシロキサン (PDMS) に埋め込んで、剥がれないようにすることを着想した。手法としては、2段階のナノワイヤ成長を用いた。まず Si 基板に1回目のナノワイヤ成長を行い、その上から未硬化の PDMS を流し込んで加熱し、PDMS の硬化後に Si 基板を剥がして、ナノワイヤを機械的に破断し、PDMS に埋没させた。その後、PDMS をナノワイヤの成長溶液に浸漬させ、埋没させたナノワイヤの破断面から2回目のナノワイヤ成長を行った。この2段階のナノワイヤ成長により、PDMS にナノワイヤを埋め込んだ構造を作製した。PDMS に埋め込まれたナノワイヤの電子顕微鏡画像取得には、九州大学の長島一樹准教授(現東京大学准教授)に大変にお世話になった。その後、ヘリンボーン構造が作製された微細流路⁸⁾を持つ PDMS と貼り合わせることで、PDMS 埋め込み型ナノワイヤデバイスが完成した(図4)。文章として記載すると数文で完結するが、このデバイス作製プロセスの開発には1~2年を要した。このプロセスで作製したナノワイヤデバイスを用いることで、尿中マイクロRNAを再現よく回収することができるようになった。

2016年春になり、酸化亜鉛ナノワイヤを用いて、尿1mLからがん患者が特異的に発現するマイクロRNAの特定に着手した。この実験は、当時、名古屋大学B4である長縄豪さん(平成30年度修了)が中心となって行った。長縄さんは、まず、2016年の初頭にデバイス作製プロセスの最適化に着手し、2016年の秋には最適化が完了した。この最適化プロセスにより作製したナノワイヤデバイスに尿を流し込むと、従来技術では200種類程度しか発見されなかった尿中マイクロRNAが、1300種類以上存在することを発見した。当時は、1300種類以上も見つかったこの事実には驚くと同時に、(これ

だけの種類があるため) がん診断を視野に捉えたと感じた。非がん患者3名、がん患者3名の尿から、約1300種類のマイクロRNAを抽出し、発現量の違いを調べた結果、泌尿器系のがんのほか、肺、すい臓、肝臓のがん患者に、特異的に増減するマイクロRNAの存在を突き止めた⁹⁾。

4 おわりに

2011年にナノワイヤと出会って以降、尿中マイクロRNA解析まで非常に長い道のりであったが、過ぎ去ってみれば一瞬であった。2017年に尿中マイクロRNAの論文を発表するまでに非常に多くの人々の助けがあり、本プロジェクトは実現したと考えている。紙面の都合もあり、著者欄には2名のみ表記となっているが、川合知二先生(現大阪大学特任教授)、柳田剛先生(現東京大学教授)、長島一樹先生(現東京大学准教授)、Sakon Rahong先生(現KMITL講師)、平成23年度修了本山高貴さん、平成25年度修了呉瓊さん、平成25年度修了伊藤聡さん、平成26年度修了小中出侑樹さん、平成27年度修了竹下大貴さん、平成29年度修了中村宥太さん、平成30年度修了長縄豪さんらの協力によって達成された成果であることを強調したい。現在、開発した技術を基盤とする名大発ベンチャーであるIcaria株式会社を小野瀬隆一さんと共同創業し、名古屋大学医学部や国立がん研究センター、多くの病院と共同で、複数のがん種のドナーサンプルの網羅的な解析を推進中である。将来的には、がんの早期診断技術の開発と、がん層別化マーカー探索へと展開したいと考えている。

文 献

- 1) T. Yasui, N. Kaji, M. R. Mohamadi, Y. Okamoto, M. Tokeshi, Y. Horiike, Y. Baba : *ACS Nano*, **5**, 7775 (2011).
- 2) T. Yasui, N. Kaji, R. Ogawa, S. Hashioka, M. Tokeshi, Y. Horiike, Y. Baba : *Anal. Chem.*, **83**, 6635 (2011).

- 3) T. Yasui, S. Rahong, K. Motoyama, T. Yanagida, Q. Wu, N. Kaji, M. Kanai, K. Doi, K. Nagashima, M. Tokeshi, M. Taniguchi, S. Kawano, T. Kawai, Y. Baba : *ACS Nano*, **7**, 3029 (2013).
- 4) S. Rahong, T. Yasui, T. Yanagida, K. Nagashima, M. Kanai, A. Klamchuen, G. Meng, Y. He, F. Zhuge, N. Kaji, T. Kawai, Y. Baba : *Sci. Rep.*, **4**, 5252 (2014).
- 5) S. Rahong, T. Yasui, T. Yanagida, K. Nagashima, M. Kanai, G. Meng, Y. He, F. Zhuge, N. Kaji, T. Kawai, Y. Baba : *Anal. Sci.*, **31**, 153 (2015).
- 6) S. Rahong, T. Yasui, T. Yanagida, K. Nagashima, M. Kanai, G. Meng, Y. He, F. Zhuge, N. Kaji, T. Kawai, Y. Baba : *Sci. Rep.*, **5**, 10584 (2015).
- 7) Y. He, T. Yanagida, K. Nagashima, F. W. Zhuge, G. Meng, B. Xu, A. Klamchuen, S. Rahong, M. Kanai, X. M. Li, M. Suzuki, S. Kai, T. Kawai : *J. Phys. Chem. C*, **117**, 1197 (2013).
- 8) A. D. Stroock, S. K. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezic, H. A. Stone, G. M. Whitesides : *Science*, **295**, 647 (2002).
- 9) T. Yasui, T. Yanagida, S. Ito, Y. Konakade, D. Takeshita, T. Naganawa, K. Nagashima, T. Shimada, N. Kaji, Y. Nakamura, I. A. Thiodorus, Y. He, S. Rahong, M. Kanai, H. Yukawa, T. Ochiya, T. Kawai, Y. Baba : *Science Advances*, **3**, e1701133 (2017).



安井隆雄 (Takao YASUI)

名古屋大学大学院工学研究科, 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, JST さきがけ (〒464-8603 愛知県名古屋市中種区不老町)。名古屋大学。博士(工学)。



馬場嘉信 (Yoshinobu BABA)

名古屋大学大学院工学研究科, 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, 量子科学技術研究開発機構量子生命科学領域。(〒464-8603 愛知県名古屋市中種区不老町)。九州大学。博士(理学)。

原 稿 募 集

創案と開発欄の原稿を募集しています

内容: 新しい分析方法・技術を創案したときの着想, 新しい発見のきっかけ, 新装置開発上の苦心と問題点解決の経緯などを述べたもの。但し, 他誌に未発表のものに限ります。

執筆上の注意: 1) 会員の研究活動, 技術の展開に参考になるよう, 体験をなるべく具体的に述べる。物語風でもよい。2) 従来の分析方法や装置の問題点に触れ, 記事中の創案や開発の意義, すなわち主題の背景を分かりやすく説明する。3) 図や表, 当時のスケッチなどを用いて理解しやす

くすることが望ましい。4) 原稿は図表を含めて4000~8000字(図・表は1枚500字に換算)とする。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。原稿の送付および問い合わせは下記へお願いします。

〒141-0031 東京都品川区五反田1-26-2

五反田サンハイツ 304号

(公社)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会
〔電話: 03-3490-3537〕