

第5章 ナノポアテクノロジーによる miRNA およびエクソソームの検出

竹内七海^{*1}, 劉 婷^{*2}, 滝口創太郎^{*3},
林 貢平^{*4}, 川野竜司^{*5}

1 はじめに

ナノポアテクノロジーはナノサイズの細孔を通過する分子を電氣的に計測する技術であり、DNA ナノポアシーケンサが実用化されたことで、近年急速に発展している。1996年、UC Santa CruzのD. Deamerらがナノポア形成タンパク質を平面脂質膜中に再構成し、パッチクランプによりポアを通過するDNAを検出とナノポアシーケンサへの応用について報告した。2000年代に入り、ヒトゲノムの解読が終了すると、次に安価・高速なゲノムシーケンスの手法の開発が望まれ、ナノポアシーケンシングも次世代の\$1000でゲノムが読めるシーケンサとして期待されていた。2015年、Oxford Nanopore Technology社から小型・安価なナノポアシーケンサが販売され、最近ではDNAだけではなくRNAのシーケンスもできるようになってきている。

一方で、ナノポアシーケンサ以外にもナノポア計測と呼ばれる、ナノポアを用いた様々な一分子計測法が開発されてきている。標的分子をラベルする、もしくはサイズに敵したナノポアを用いることで、一分子レベルで種々の分子の検出が可能となる。これまでに低分子化合物、金属イオン、ポリペプチド、タンパク質などの測定が多数報告されている。また生体ナノポア以外にもナノ微細加工により作製した固体ナノポア技術も急速に進展しており、比較的大きなサイズのタンパク質や細胞小胞の検出への応用研究が盛んである。

本章ではmiRNAを標的としたリキッドバイオブシーに関連するナノポア技術に関し、ナノポア計測、ナノポアシーケンス、ナノポアによるエクソソーム検出について、最近の動向についてまとめた。

-
- * 1 Nanami Takeuchi 東京農工大学 工学府
博士後期課程学生；日本学術振興会特別研究員
 - * 2 Ping Liu 東京農工大学 生物システム応用科学府 博士後期課程学生
 - * 3 Sotaro Takiguchi 東京農工大学 工学府 大学院生
 - * 4 Kohei Hayashi 東京農工大学 工学府 大学院生
 - * 5 Ryuji Kawano 東京農工大学 工学府工学研究院 教授

2 ナノポア技術を用いた miRNA の直接検出

ナノスケールの細孔を用いたナノポアセンシングは微量のサンプルから標的分子を一分子レベルで迅速に検出できるため、Point of Care Testing (POCT) の有望な技術として期待されている。ナノポアセンシングの原理は電気抵抗法に基づいており、電解液に挟まれた絶縁膜中にナノポアを配置し、ポア内を流れる微小なイオン電流を計測する。標的分子がポア内に入ると一時的にイオン電流が阻害されるため、阻害電流の阻害量・阻害時間・阻害頻度などを解析することで分子の種類や濃度などの情報を得ることができる。直径約 1 nm である一本鎖核酸分子の検出には、黄色ブドウ球菌が産生する溶血毒素 α -ヘモリシン (α HL) が形成する直径 1.4 nm のナノポアがよく用いられる。しかし、miRNA のような短鎖の核酸分子は種類によらず阻害電流が類似するため直接識別することは簡単ではない。そこで、標的 miRNA に結合するプローブを利用し、特異的な検出を行った研究が数多く報告されている。

Wang らは肺がんで発現上昇する miR-155 を DNA プローブを用いて検出した¹⁾。DNA プローブは miR-155 の相補配列と poly (dC)₃₀ タグで構成されており、ポアの狭窄部で電圧印加により miR-155 を解離しながらポア内を通過することで特徴的な阻害電流シグナルを示す (図 1)。この阻害電流シグナルのみをカウントすることで miR-155 を pM オーダーで定量し、実際に血漿由来 miRNA から肺がん患者を $p < 0.001$ で識別できた。その後の研究では、人工核酸プロー

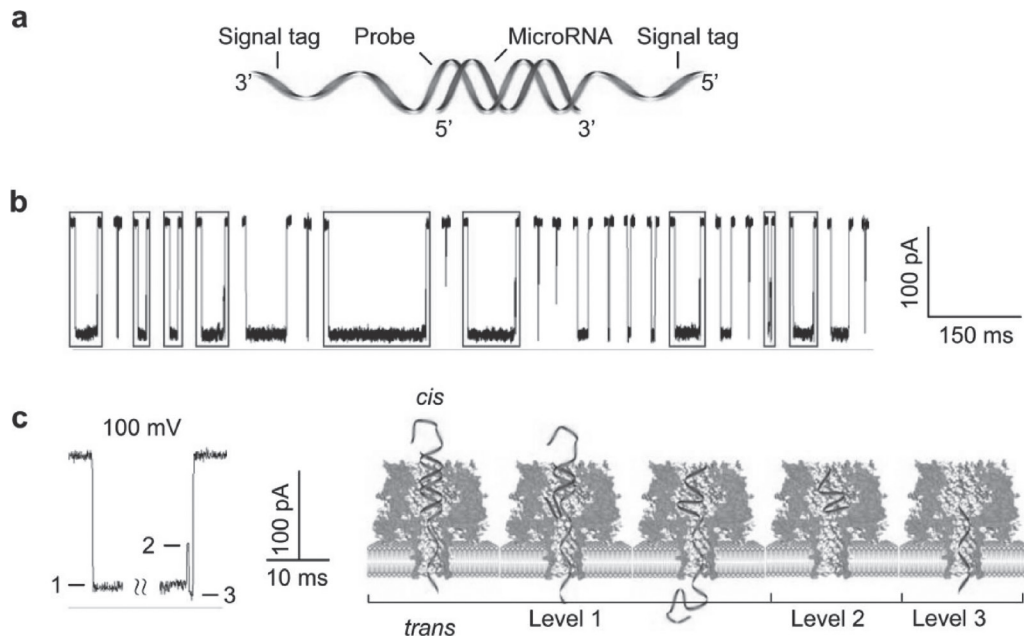


図 1 (a) miR-155 と結合したプローブ DNA, (b) 特徴的な阻害電流シグナル, (c) 特異的な電流阻害の原理

第5章 ナノポアテクノロジーによる miRNA およびエクソソームの検出

ブ^{2,3)}や分子ビーコン型プローブ⁴⁾など、特異性の向上に向けたプローブ開発が進められている。一方で、miRNA はがんの種類や病期により複数種類が発現上昇または発現減少するため、その発現パターンを同時に検出することが望ましい。そこで Hiratani らは、複数種類 miRNA の発現パターンを認識する手法として、DNA 分子を用いた情報処理技術である DNA コンピューティング技術の利用を提案している。DNA コンピューティング技術とナノポアセンシングによるパターン認識の第一歩として、小細胞肺癌から分泌される2種類の miRNA を入力分子とする AND ゲートを構築した (図 2a)⁵⁾。標的とした miR-20a と miR-17-5p が同時に存在する (1, 1) の場合のみナノポアに詰まる十字型の構造を形成するような診断用 DNA (図 2b) を設計し、これを AND 演算として実装したところ、出力分子に由来する障害電流の持続時間から AND ゲートにおける4つの演算パターンを $p < 0.05$ で識別できた (図 2c)。

上記の研究では生体ナノポアである α HL を用いているが、固体材料に人工的にポアを形成する固体ナノポアの開発も進められている。Cai らは固体ナノポアの中でも絶縁膜が不要であり、

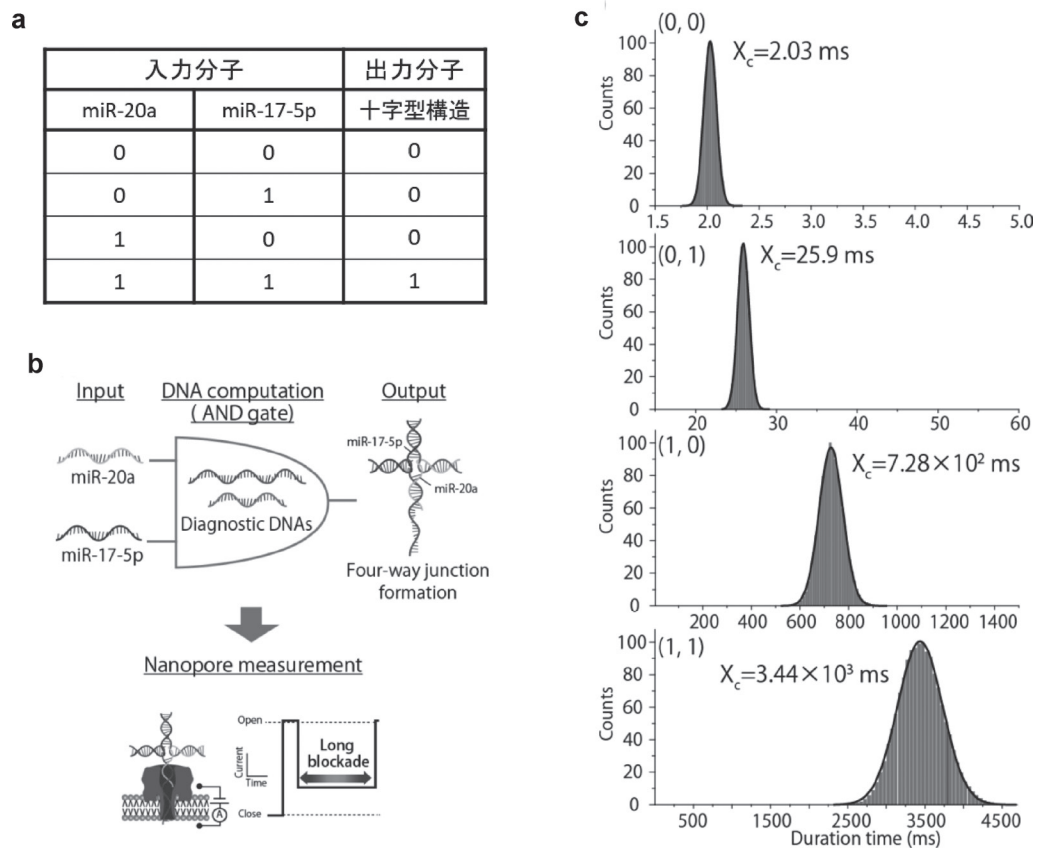


図 2 (a) AND ゲートの真理値表 (miRNA の無/有を 0/1 とする), (b) AND ゲートと十字型構造による電流阻害の模式図, (c) 各入力パターンの電流阻害時間のヒストグラム

疾患バイオマーカーとしてのマイクロ RNA と診断応用

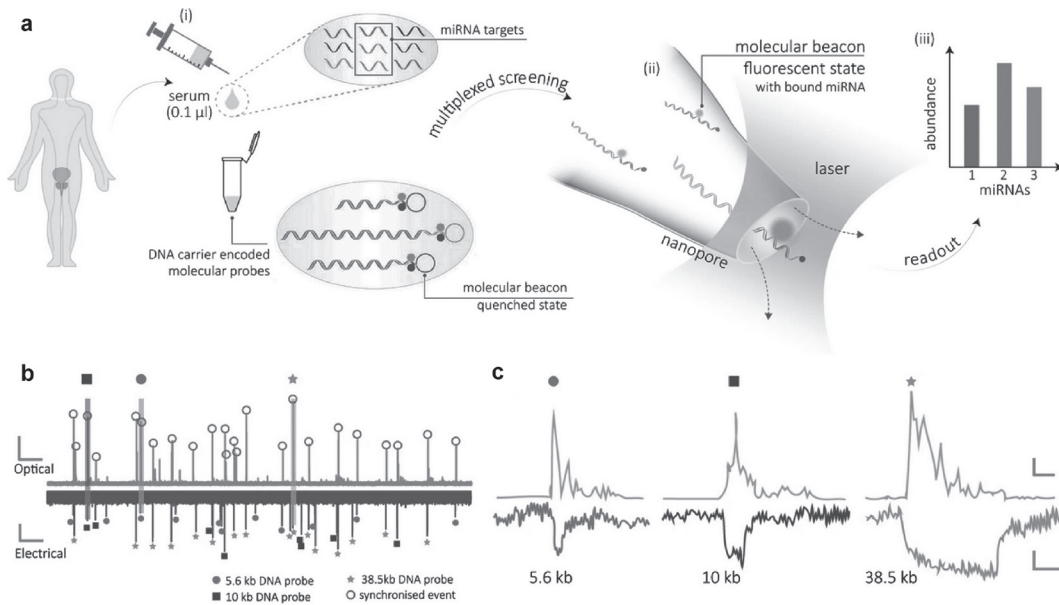


図3 (a) 蛍光・電流同時計測の流れ, (b) 蛍光シグナルと阻害電流シグナル, (c) 左から順にそれぞれ let-7a, miR-375-3p, miR-141-3p を検出した際に現れるシグナルの拡大図

市販材料から簡便に作製できるガラスピペットナノポアを用いて、前立腺がんの指標となる let-7a, miR-141-3p, miR-375-3p を同時に検出した (図3)⁶⁾。ここで用いた分子ビーコン型プローブは miRNA が結合すると蛍光を発し、Cai らは miRNA の種類によって異なる鎖長のプローブを設計した。蛍光シグナルの有無から miRNA の有無を識別し、同時にナノポアセンシングの阻害電流シグナルから miRNA の種類を識別することにより、fM オーダーの miRNA を検出し、血清中 miRNA から限局性前立腺がんと転移性前立腺がんを $p < 0.05$ で識別することに成功した。本手法では標的 miRNA の種類によらず必要な蛍光分子は1種類のみであるため、複数の疾患を識別する規模の miRNA 多重検出に応用できる可能性がある。

上記のようにナノポアセンシングは実検体での計測について研究開発が進められており、POCT としての疾患のスクリーニングやモニタリングのためのツールとして期待が高まっている。

3 MinION による miRNA 検出

1996 年にナノポアを用いた核酸の一分子検出が報告されて以来⁷⁾、ナノポアによる DNA/RNA シーケンスの実用化に向け膨大な研究が行われてきた⁸⁾。集積された技術をもとに、2016 年 Oxford Nanopore Technology (ONT) 社が安価でポータブルなナノポアシーケンサ (MinION) を実現、商業化に成功した⁹⁾。MinION は、ノート PC に USB 接続することで稼動し、

第5章 ナノポアテクノロジーによる miRNA およびエクソソームの検出

フローセルに搭載された 2048 個のナノポアで並列的にデータを取得する (図 4)。出力された電流の波形データは、ソフトウェアによるデータ処理を介して塩基配列情報へと変換 (ベースコール) される。MinION は次世代のシーケンス技術として発展を遂げる一方で、ナノポアを埋め込む膜の安定性や操作の簡便性に優れ、超並列にデータを取得できることから、ハイスループットな分子センシングを実現するプラットフォームとしても注目を集めている。ここでは、MinION を用いた分子センシングに関する研究例について紹介する。

ナノポア計測では黄色ブドウ球菌由来の α HL ナノポアがよく用いられるが、MinION には大腸菌由来の CsgG ナノポアが搭載されている (図 5a)¹⁰⁾。miRNA のような短鎖の核酸は、直径約 2 nm の CsgG ナノポアを通過する速度が速すぎて検出できないことが問題であった。そこで Kanavarioti らは、酸化オスミウム 2, 2-ビピリジン (図 5b) をタグ付けしたプローブ核酸を使用する方法論を提案した¹¹⁾。このプローブ核酸はオスミウムタグの影響でナノポアの通過速度が遅く特異的な阻害電流シグナルとして検出される (図 5c)。一方で、標的 miRNA と結合し二本鎖を形成したプローブ核酸は、サイズが大きく CsgG ナノポアでは検出されない。これにより標的 miRNA 存在下ではプローブ核酸由来の阻害電流シグナルが消失する (図 5d)。この原理に基づいて血清中の微量標的 miRNA (amol オーダー) をハイスループット検出することに成功した¹²⁾。これに追隨して Nivala らは MinION と 9 種類のペプチドタグを用いて異なる標的タンパク質を識別する手法を報告した¹³⁾。このようなタグ標識と MinION を用いた分子検出は、複数種類 miRNA 同時検出のハイスループット化への応用が期待できる。しかし、上述の研究ではデータ解析にベースコールのようなビッグデータの処理を必要とせず容易に標的分子を検出できる一方で、使用するナノポアが CsgG に限られていた。ONT 社と共同研究を進める Guo らは、CsgG とは異なる Phi29 ナノポアを MinION に搭載した標的ペプチド検出に関する研究成果を報告した¹⁴⁾。このように ONT 社との技術融合により任意のナノポアを MinION に搭載することができ

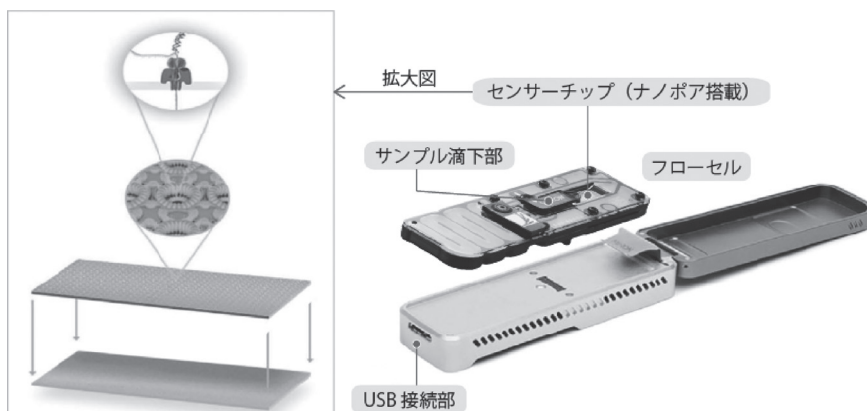


図 4 ナノポアシーケンサ MinION とフローセル

疾患バイオマーカーとしてのマイクロ RNA と診断応用

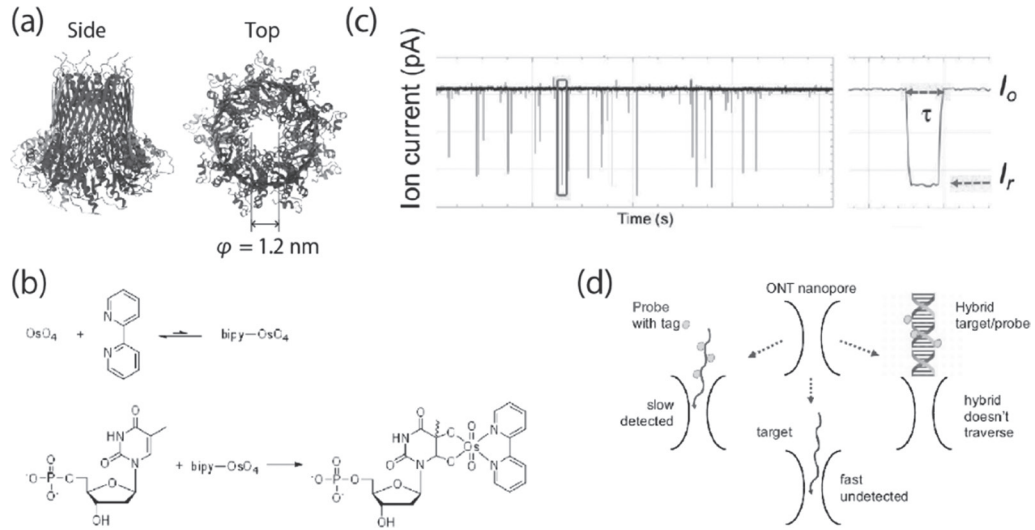


図 5 (a) MinION に搭載されている CsgG ナノポア, (b) 酸化オスミウム 2, 2'-ビピリジンと核酸分子へのタグ付け, (c) オスミウムタグで標識されたプローブ核酸由来の阻害電流シグナル, (d) オスミウムタグで標識されたプローブ核酸を用いた腫瘍由来核酸検出の概要



図 6 ONT 社のナノポアシーケンスプラットフォーム (<https://nanoporetech.com/>)

れば、前項で紹介したこれまでの miRNA 検出手法をハイスループット化でき、実用化に向け飛躍的な進展が見込まれる。

図 6 に示すように、最近では MinION の他にもフローセルを 5 つ搭載可能な GridION, 48 個搭載可能な PromethION などシーケンスの高速化を目的としたデバイスが販売されている。また現在開発中 (最新の情報はホームページ <https://nanoporetech.com/> を参照されたい) の SmidgION は、MinION を更に小型化し、スマートフォンに接続して利用できるデバイスであり、電源も内蔵するなど現地での利用を促進する製品となっている。このような分子センシングプラットフォームは、離島のように頻回の受診・健康診断が難しい地域における POCT デバイスとして実用化されることが期待できる。

4 ナノポア技術によるエクソソームの検出

エクソソームは細胞内の直径約 100 nm の脂質二分子膜小胞が細胞外に分泌されたものであり、細胞間情報伝達の媒体として働く。エクソソームは核酸やタンパク質を内包しており、特にがん細胞由来エクソソームが内包する miRNA は診断マーカーとして注目されている。これまでの研究で同じ細胞集団から分泌されたエクソソームにも多様性があることが示唆されており¹⁵⁾、この違いを明らかにするためには単粒子レベルでエクソソームを解析する必要がある。エクソソームの単粒子解析ツールとして、既に製品化されているナノ粒子マルチアナライザー (qNano)¹⁶⁾や、単一ナノ粒子を計測可能なエクソソームアレイチップがある¹⁷⁾。しかし、これらの手法は高コスト・操作の煩雑性といった課題があり、迅速・簡便で安価なエクソソーム単粒子解析手法の確立が求められる。そこで近年、エクソソームと同程度の孔径を持つ固体ナノポアを用いた膜小胞センシング技術が注目されている。ここでは、固体ナノポアとしてガラスピペットナノポアおよび窒化ケイ素 (SiN) 薄膜ナノポアを用いたエクソソームの単粒子検出に関する研究例について紹介する。

ガラスピペットを用いたナノポア計測では、市販のガラスキャピラリからブーラーを用いて作製したサブミクロンサイズの孔を使用する。Liu らは、ガラスピペットナノポアを用いてエクソソームと同程度のサイズの脂質膜小胞 (リボソーム) の検出を試みた¹⁸⁾。リボソーム由来と考えられる阻害電流シグナルが電圧・濃度依存的に増加したことから、本手法により脂質膜小胞が検出できることを報告した。これに追従して Feng らは、二つの孔をもつガラスキャピラリから作製した多機能ナノ電極-ナノポアナノピペット (MNNP) を用いて、HeLa 細胞から分泌されるエクソソームの検出を試みた¹⁹⁾。片側の孔にカーボンを充填することでカーボンナノ電極 (CNE) を作製し、エクソソームマーカータンパク質 CD63 に対する抗体 (抗 CD63) を CNE 表面上に化学修飾 / 非修飾した MNNP を用いて、エクソソーム計測を行った (引用文献 19 Fig. 1)。抗 CD63 修飾 MNNP のほうが、粒子がナノポアを通過する際の平均電流阻害時間が長く、エクソソーム膜中の CD63 が CNE 表面上の抗 CD63 と相互作用していることが示唆された (引用文献 19 Fig. 2, Fig. 3)。このことから、検出された粒子はエクソソームであると述べている。さらに、HeLa 細胞から分泌されるエクソソームの直接検出を試みた。マイクロマニピュレーターを用いて MNNP-細胞間の距離を変化させて計測を行ったところ、MNNP-細胞間の距離が増大するにつれて阻害電流シグナルの出現頻度が低下した。また、エクソソーム生成阻害剤を HeLa 細胞に添加したところ、阻害電流シグナルの出現頻度は大幅に低下したことから、本手法によりエクソソーム検出が可能であることを示した。

SiN 薄膜を用いたナノポア計測では、微細加工技術により SiN 薄膜に形成させたサブミクロンサイズの孔 (図 7a) を使用する。Ryuzaki らは、Si₃N₄ 薄膜ナノポアを用いたエクソソーム検出手法を報告し²⁰⁾、また肝臓がん細胞由来エクソソームに関してナノポア計測で得られた阻害電流シグナルの形状から球形、楕円形のエクソソームを識別することに成功した (図 7b)。肝臓がん

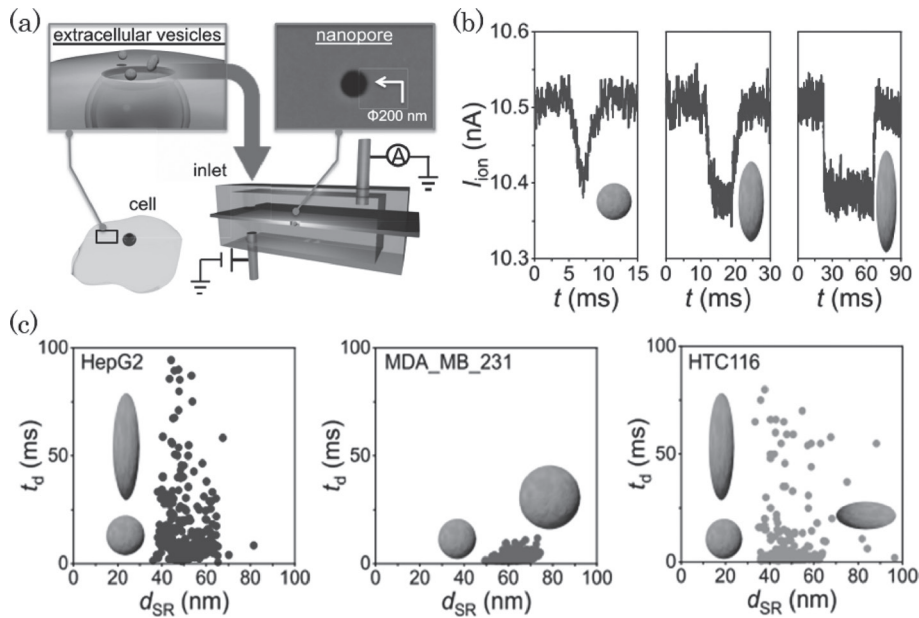


図7 (a) Si_3N_4 薄膜ナノポアを用いたエクソソーム計測の実験系, (b) 検出されたエクソソームの形状と典型的な阻害電流シグナル, (c) 肝臓がん細胞 (HepG2), 乳がん細胞 (MDA_MB_231), 大腸がん細胞 (HTC116) 由来のエクソソームを用いたナノポア計測による形状分布解析の結果

Reprinted with permission from S. Ryuzaki *et al.*, *Anal. Chem.*, **93** (18), 7037-7044 (2021).
Copyright 2021 American Chemical Society.

細胞, 乳がん細胞, 大腸がん細胞由来のエクソソームについても同様に形状分布解析を行い比較したところ, エクソソームの形状とその分布が細胞種ごとに異なることがわかった (図7c)。さらに, 乳がん患者と健常者の血中エクソソームも互いに異なる分布を示した。以上より, 体液中エクソソームをナノポア計測することによりがん診断, がん種の特定をできることが示唆された。

上述の通り, 現在までにナノポア技術によりエクソソームを単粒子レベルで検出し, その種類を区別することは可能となっている。しかし, 検出されたエクソソームを単粒子レベルで分取し, その内容物を解析する技術は未だ報告されていない。今後の研究の展開によりこの技術が確立すれば, より簡便・高効率にエクソソームを単粒子解析でき, エクソソーム分類能の向上ならびにがん治療薬開発の進展が期待できる。

5 おわりに

本章では miRNA やそれを含有するエクソソームを標的としたリキッドバイオプシーに関連するナノポアテクノロジーに関して概説した。市販のナノポアセンサーやナノポア計測では, シ

第5章 ナノポアテクノロジーによる miRNA およびエクソソームの検出

ンプルな原理で電気的かつ迅速に標的分子を検出できることから、次世代のリキッドバイオプシーの強力なツールの一つとなる可能性が高い。また欧米や中国では盛んに研究が行われ、急速に技術が発展してきているが、日本ではまだ研究者の数が少ない。今後日本でもナノポア関連研究が発展することを期待したい。

文 献

- 1) Y. Wang *et al.*, *Nat. Nanotechnol.*, **6**, 668–674 (2011)
- 2) K. Tian *et al.*, *ACS Nano*, **7**, 3962–3969 (2013)
- 3) D. M. Xi *et al.*, *Anal. Chem.*, **88**, 10540–10546 (2016)
- 4) X. Y. Wu *et al.*, *Chem. Commun.*, **54**, 7673–7676 (2018)
- 5) M. Hiratani *et al.*, *Anal. Chem.*, **90**, 8531–8537 (2018)
- 6) S. Cai *et al.*, *Nat. Commun.*, **12**, 3515 (2021)
- 7) J. J. Kasianowicz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 13770–13773 (1996)
- 8) D. Branton *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **26**, 1146–1153 (2008)
- 9) M. Jain *et al.*, *Genome Biol.*, **17**, 239 (2016)
- 10) S. E. Van der Verren *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **38**, 1415–1420 (2020)
- 11) M. Sultan *et al.*, *Sci. Rep.*, **9**, 14180 (2019)
- 12) A. S. W. Kang *et al.*, *Sci. Rep.*, **10**, 19790 (2020)
- 13) N. Cardozo *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, DOI : 10.1038/s41587-021-01002-6 (2021)
- 14) Z. X. Ji *et al.*, *Nanomedicine*, **25**, 102170 (2020)
- 15) D. K. Jeppesen *et al.*, *Cell*, **177**, 428–445 (2019)
- 16) S. L. N. Maas *et al.*, *J. Vis. Exp.*, **92**, e51623 (2014)
- 17) S. Yokota *et al.*, *PloS One*, **14**, e0224091 (2019)
- 18) Y. Liu *et al.*, *Electrochem. Commun.*, **89**, 38–42 (2018)
- 19) W. N. Feng *et al.*, *Chinese J. Anal. Chem.*, **48**, e20061–e20068 (2020)
- 20) S. Ryuzaki *et al.*, *Anal. Chem.*, **93**, 7037–7044 (2021)