

ナノバイオエンジニアリング

国立研究開発法人理化学研究所

金山 直樹, 前田 瑞夫

Naoki KANAYAMA, Mizuo MAEDA



1. はじめに

昨今、少子高齢化が進行するわが国では、医療ニーズの多様化・増加に伴って、社会保障費に占める医療費の割合の急激な増大が予想されている。一方で、社会保障制度を支える側の労働者人口は確実に減少しており、今後、益々増大する医療費に対して社会保障としてどう対応していくか喫緊の課題となっている。このような背景をもとに、近年、医療費低減の観点から先制医療の重要性が認識されてきている。

先制医療とは、代謝産物や画像データなどから得られる生体情報を定量化・数値化した指標(バイオマーカー)を用いて、臨床症状が発症するよりも早期に疾患を予測し、適切なタイミングと手法で治療介入を行う医療制度である。疾患の発症あるいは重篤化を回避しながら医療の効率化・最適化を図ることで質を維持し、ひいては医療費の低減につながるものと期待されている。わが国で2人に1人が罹患するといわれるガンを例に挙げれば、早期発見・治療による良好な治療成績が認められており、先制医療はガン治療に関わる医療費の低減のみならず、治癒率の向上の面からも効果が期待できる。しかしながら、厚生労働省が実施した国民生活基礎調査¹⁾によれば、各種ガン検診の受診率は平均して3~4割程度に留まっており、先制医療の実現には程遠い現状にある。今後は、検診の受診率向上に向けた意識改革の推進は勿論のこと、診断技術の面においても受診者の身体的・経済的・時間的負担の低減、さらには医療サービスの地域間格差を解消するための技術革新が

求められている。

近年、ガンの生物学的研究の進展に伴い、早期ガン診断への応用が期待される血中遊離物質が多数見出されている²⁾。バイオエンジニアリングは、生体の構造や機能に関わる研究から得られた知見を、実社会に有用な物質・技術の開発を通じて還元することを目指す分野である。新たに見出された血中遊離物質を基に、診断精度や操作性、経済性を満足する診断デバイスを考案・実現することは、バイオエンジニアリングが果たすべき重要な責務である。本稿では、先制医療の実現をサポートする診断技術のなかで、幾つかの有望な血中バイオマーカーを用いるガンの早期診断法の開発動向に関して、ナノバイオエンジニアリングの視点からみた最近の進歩を概説する。

2. 血中バイオマーカーを用いる診断技術

1) マイクロRNA

近年、血中バイオマーカーのなかでも特に注目を集めているのが、マイクロRNA (microRNA, miRNA) と呼ばれる18~25塩基程度の短鎖RNAである。これまでに、ガンに関連するmiRNAとして、let-7やmiR-21など多くのガン関連miRNAが特定されてきている。例えばlet-7は、ガン遺伝子である*K-ras*のmRNAを標的としており、let-7の異常発現がガン抑制機構の破綻を招き、ガン化につながると考えられている。このように、ガン関連miRNAは正常組織と比べて発現プロファイルが変化するため、この変化を指標としたガン診断に期待が集まっている³⁾。またmiRNAは、後述するエクソソームと呼ばれる細胞から分泌される小胞顆粒に内包されて、血液を含むさまざまな体液中で安定に存在していることが明らかになり⁴⁾、このエクソソームに内包されたmiRNAを対象としてガン関連miRNAの発現をモニタリングする、低侵襲なガン早期診断の実現に向

■ 著者連絡先

国立研究開発法人理化学研究所 前田バイオ工学研究室

(〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1)

E-mail. nkanayama@riken.jp

け世界中の研究者が鎬を削っている。

体液中に存在するmiRNA量は細胞内のそれと比べて少なく (total RNAの0.01%程度), 血液から得られるmiRNAの発現プロファイルに基づくガン診断には, ピコ (10^{-12}) からフェムト (10^{-15}) M, あるいはそれ以上の感度が要求される。現在, miRNA発現解析にはRT-PCR (real time-polymerase chain reaction) 法が一般的に用いられている。miRNA分析においては, 試料から抽出したmiRNAをcDNAに逆転写し, これをPCRにより増幅し蛍光プローブで検出することで, 試料中のmiRNA発現プロファイルを高感度で解析できる。しかしRT-PCR法では, ①生体試料からmiRNAを単離・精製する, ②DNA (cDNA) に逆転写する, ③PCRをかけてDNAを増幅する, の一連のプロセスに要する時間とコストが問題視されている。以上の問題点を解決すべく, RCA (rolling circle amplification) 法など温度サイクルを必要としないサンプルの等温増幅反応の適用や⁵⁾, 金ナノ粒子⁶⁾, 磁性粒子⁷⁾, カーボンナノチューブ⁸⁾などの, いわゆるナノマテリアルの特異な光学・磁気・電子特性を利用したmiRNA検出の高感度化が検討されている。

最近, 金ナノ粒子の消光特性とヌクレアーゼの基質特異性を巧みに利用し, 簡便にmiRNAを直接検出する手法が報告された⁹⁾。ここでは, 標的miRNA (ターゲット) と相補的な配列をもつ蛍光標識オリゴDNAを金ナノ粒子上に固定して, 蛍光を予めクエンチしプローブとして用いる。ターゲットが系中に存在すると, 金ナノ粒子上でDNA/RNAヘテロ二重鎖が形成され, これを基質とするヌクレアーゼ (duplex-specific nuclease, DSN) が作用する。ここで重要なのは, DSNはヘテロ二重鎖のDNAのみ切断し, RNAを切断しない点である。つまり, プローブ上ではDSNに切断されたDNAの蛍光ラベル部位が溶液中へ放出され蛍光を回復し (シグナル), これと同時にターゲットmiRNAは別のDNAとヘテロ二重鎖形成する。このヘテロ二重鎖もDSNに認識され, 蛍光ラベルを放出しシグナルを発する。すなわち, プローブ上でターゲットの「リサイクル」が繰り返されるのである。サンプルとプローブ, DSNを混合するだけでターゲットリサイクリングによる蛍光増幅が誘起される簡便な本法では, 5 pMのmiRNA (miR-21, miR-203) 検出が達成された。また同様のmiRNAの高感度検出が, ポリドーパミンナノ粒子を消光剤に用いた系においても報告されている¹⁰⁾。

一方で, エクソソームに内包された生体試料中のmiRNAを抽出せず, そのまま検出しようという野心的な取り組みも見られる¹¹⁾。モレキュラービーコン (molecular beacon,

MB) は, 標的配列の核酸にハイブリダイズし, 蛍光シグナルを発するように分子設計された核酸プローブであるが, このMBがエクソソームの脂質二分子膜を透過してエクソソーム内の標的miRNA (miR-21) とハイブリダイズし, 蛍光シグナルを発することがMCF-7細胞培養上清中のエクソソームを用いたモデル実験で示された。またMBの膜透過効率, 膜貫通タンパク (streptolysin O) によるチャンネル形成によって向上すること, ヒト血清中にスパイクされたエクソソームに対しても有効であることが確認された。現状では, 実際の診断で要求される感度や定量性の観点から解決すべき課題は残るものの, エクソソーム内のmiRNAを単離・精製することなく検出するというアイデアは, 作業効率や再現性の観点から興味深い。

2) エクソソーム

エクソソームは, 30~100 nmの大きさの小胞顆粒であり, ささまざまな組織の細胞から分泌される。エクソソームは脂質二分子膜の中に, 分泌源の細胞に由来するタンパク質やmiRNAなどを内包しており, 膜表面には膜タンパク質を有している。体内でガン細胞が発生した場合には, ガン細胞からその特徴を反映したエクソソームが分泌されると考えられ, これをガン診断のバイオマーカーとして利用することが考案されている。ところが, 血液中には $10^8 \sim 10^{10}$ 個/mlの膨大な量の正常細胞由来のエクソソームに加えて, サイズや濃度が類似したりポタンパク質などの微小粒子が大量に混在しており, ガン細胞由来の微量のエクソソームを選択的に分離・検出することは容易ではない。また, エクソソーム自体も組成やサイズの面で不均一であることから, 血液中からガン細胞に由来するエクソソームを分離・検出するための方法論が多方面から模索されている¹²⁾。

最近, 血清中からガン細胞由来のエクソソームを分離することなく, 選択的に検出する手法が開発された¹³⁾。これは, ガン細胞由来のエクソソーム表面に特有の膜タンパク質が特定されたことが非常に大きい。これまでに, 殆どのエクソソーム表面にはCD9という糖タンパク質が提示されていることが知られていた。新たに大腸ガン細胞由来のエクソソームが, 特徴的な糖タンパク質 (CD147) を表層に提示していることが突き止められ, 状況は一変した。以下に, ExoScreenと名付けられた検出法を簡単に紹介する。使用するものは, CD9抗体およびCD147抗体がそれぞれ固定された2種類のビーズである。CD9抗体固定化ビーズは, 照射により一重項酸素 (1O_2) を放出する特性をもち (ドナービーズ), CD147抗体固定化ビーズは 1O_2 と反応し化学発光する性質をもつ (アクセプタービーズ)。ドナー

ビーズから発生する $^1\text{O}_2$ の飛程距離は約200 nmであり、2種類のビーズが200 nm以内に存在したとき、つまり同じエクソソーム上に2種類のビーズが結合した場合に光照射によって化学発光が誘起され、大腸ガン細胞由来のエクソソームの存在を発光シグナルから検知することができる。この手法は僅か2ステップ、2時間以内で診断結果が得られる。また、標的となる表層タンパク質(抗原)が確定すれば、それに対する抗体を固定化したアクセプタービーズを用意することで多様なエクソソーム診断が原理的に可能である。ごく最近、早期診断の難しいガンとして知られる膵臓ガンの細胞から分泌されるエクソソームの表面に特徴的な膜糖タンパク質(Glypican-1, GPC1)が特定され、早期診断への応用が期待されている¹⁴⁾。

3) その他

その他にも、血中循環物質として血中代謝物や血中遊離核酸(cell-free nucleic acid, cfNA)¹⁵⁾などが、ガン早期診断のバイオマーカーとして検討されている。最近、血液に含まれる遊離ヌクレオソームをガンマーカーとして利用する、簡便な診断法が報告された¹⁶⁾。ナノメーターサイズのカラム状の銀が集積した特殊なチップ上に、良性疾患(食道アカラシア、胃間葉系腫瘍、十二指腸乳頭良性腫瘍)および胃ガン・大腸ガン患者から採取した血清を希釈して滴下し、表面増強ラマン(SERS)測定を行ったところ、胃ガン・大腸ガン患者の血清でのみ強いSERSシグナルが観測された。これは、胃ガン・大腸ガンに罹患した患者の血清中に、チップ上の銀に強く吸着する成分が多く存在することを意味する。最近、その吸着成分がガン患者血液中で増加する正電荷を帯びた血中遊離ヌクレオソームと考えられることが報告された¹⁷⁾。この手法は、ガン発症に伴う特異的なエピゲノム異常を簡便に検知する手法として興味深い。

3. おわりに

最近、非侵襲的に採取できる尿に含まれる成分を対象とした大変ユニークなガン診断に関する報告がなされた¹⁸⁾。最後に簡単に紹介しておきたい。ここで活躍するのは、線虫の一種*C. elegans*である。*C. elegans*は2種類の嗅覚神経をもち、特定のにおいに対して走性行動をとることが知られている。驚くべきことに、*C. elegans*は健常者とガン患者の尿の違いをにおいて識別し、異なる走性行動(健常者の尿:忌避行動、ガン患者の尿:誘引行動)をとることが確認された。しかもその的中率は95%以上と一般的なガンマーカーと比べて高く、また早期のガン患者の尿に対しても誘引行動を示すという。現状では尿のなかに含まれる

どんな成分に*C. elegans*が反応しているのか詳細なメカニズムが未解明であり、またガンの種類を特定できないという課題があるものの、「虫の知らせ」を利用したメタボローム解析ともいえる本成果は、簡便・安価なガン診断につながる重要なヒントであり、生体規範工学の観点からみても注目に値する。

以上、血中バイオマーカーを中心としたガン早期診断の研究動向に関して、ナノバイオエンジニアリングの観点からみた最近の進歩について2014~2015年の報告を中心に紹介した。診断精度は勿論のこと、操作性・経済性などの要求項目を満足する診断技術を開発し、先制医療の実現へと結実させるには、今後さらなるブレークスルーが求められるところである。

本稿のすべての著者には規定されたCOIはない。

文 献

- 1) 厚生労働省 平成25年 国民生活基礎調査の概況. p.29. Available from: <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa13/>
- 2) Hanash SM, Baik CS, Kallioniemi O: Emerging molecular biomarkers--blood-based strategies to detect and monitor cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **8**: 142-50, 2011
- 3) Lu J, Getz G, Miska EA, et al: MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**: 834-8, 2005
- 4) Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**: 654-9, 2007
- 5) Zhu X, Shen Y, Cao J, et al: Detection of microRNA SNPs with ultrahigh specificity by using reduced graphene oxide-assisted rolling circle amplification. *Chem Commun (Camb)* **51**: 10002-5, 2015
- 6) Park J, Yeo JS: Colorimetric detection of microRNA miR-21 based on nanoplasmonic core-satellite assembly. *Chem Commun (Camb)* **50**: 1366-8, 2014
- 7) Lee H, Park JE, Nam JM: Bio-barcode gel assay for microRNA. *Nat Commun* **5**: 3367, 2014
- 8) Li F, Peng J, Zheng Q, et al: Carbon nanotube-polyamidoamine dendrimer hybrid-modified electrodes for highly sensitive electrochemical detection of microRNA24. *Anal Chem* **87**: 4806-13, 2015
- 9) Degliangeli F, Kshirsagar P, Brunetti V, et al: Absolute and direct microRNA quantification using DNA-gold nanoparticle probes. *J Am Chem Soc* **136**: 2264-7, 2014
- 10) Xie Y, Lin X, Huang Y, et al: Highly sensitive and selective detection of miRNA: DNase I-assisted target recycling using DNA probes protected by polydopamine nanospheres. *Chem Commun (Camb)* **51**: 2156-8, 2015
- 11) Lee JH, Kim JA, Kwon MH, et al: In situ single step detection of exosome microRNA using molecular beacon. *Biomaterials* **54**: 116-25, 2015
- 12) Akagi T, Kato K, Kobayashi M, et al: On-chip immunoelectrophoresis of extracellular vesicles released

- from human breast cancer cells. *PLoS One* **10**: e0123603, 2015
- 13) Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, et al: Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat Commun* **5**: 3591, 2014
 - 14) Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, et al: Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* **523**: 177-82, 2015
 - 15) Das J, Ivanov I, Montermini L, et al: An electrochemical clamp assay for direct, rapid analysis of circulating nucleic acids in serum. *Nat Chem* **7**: 569-75, 2015
 - 16) Ito H, Inoue H, Hasegawa K, et al: Use of surface-enhanced Raman scattering for detection of cancer-related serum-constituents in gastrointestinal cancer patients. *Nanomedicine* **10**: 599-608, 2014
 - 17) Ito H, Hasegawa K, Hasegawa Y, et al: Silver nanoscale hexagonal column chips for detecting cell-free DNA and circulating nucleosomes in cancer patients. *Sci Rep* **5**: 10455, 2015
 - 18) Hirotsu T, Sonoda H, Uozumi T, et al: A highly accurate inclusive cancer screening test using *Caenorhabditis elegans* scent detection. *PLoS One* **10**: e0118699, 2015