

細胞外小胞の超高感度センシングのための 機能性分子集積ナノ界面の創製

Fabrication of nano-interface integrated with functional molecules for super-sensitive sensing for extracellular vesicles

神戸大院工¹ ○砂山 博文¹, 森 貴翔¹, 清水 拓¹, 高野 恵里¹, 北山 雄己哉¹, 竹内 俊文¹
Kobe Univ.¹, ○Hirobumi Sunayama¹, Kisho Mori¹, Taku Shimizu¹, Eri Takano¹, Yukiya Kitayama¹,
Toshifumi Takeuchi¹

E-mail: takeuchi@gold.kobe-u.ac.jp

細胞外小胞(EVs)は細胞から分泌される約 100 nm 程度の脂質二重膜で囲まれた粒子で、その表面には宿主細胞由来の表面タンパク質や糖鎖を有し、内部にはマイクロ RNA (miRNA)、DNA などの核酸やタンパク質等を含んでいる。近年、EVs が細胞間コミュニケーションやがんの増殖・転移に関する微小環境形成に関与していることが報告され注目されている。EVs の検出は、これまで免疫測定法により行われていたが、感度が不足しているうえに煩雑な前処が必要な場合が多く、迅速で簡便、かつ超高感度で EVs を検出する方法の早急な確立が望まれている。このような背景から、我々は、前処理を必要とせず、従来の免疫測定法より高感度で迅速に EVs を検出する方法の開発に着手した。

我々はこれまでに分子インプリンティング技術により人工高分子内に標的分子のサイズ・形状・表面官能基が反映された結合空間を有する分子認識材料、分子インプリントポリマー(MIP)を開発してきた[*Chromatography*, **2016**, 37, 43]。また、MIP 内の結合空間への後天的な化学修飾により MIP を多機能化するポストインプリンティング修飾法(PIM)の開発にも成功している[*Chem. Commun.*, **2018**, 54, 6243]。本研究では、これらの技術を応用し、EVs 捕捉可能なナノ空孔を鋳型分子としてシリカナノ粒子を用いて作製し、形成されたナノ空孔に PIM として①EVs 表面タンパク質認識抗体と②蛍光レポーター分子を導入する新たな表面ナノ加工技術について検討を行った。

ジスルフィドをもつ重合官能基と His-tag を修飾したシリカナノ粒子を作製し(Fig. 1A)、重合開始基の Br 基、His-tag 結合のための Ni(II)錯体(Ni-NTA)を修飾した金基板上に、この修飾シリカナノ粒子を His-tag を介して固定化した。この基板上で表面開始原子移動ラジカル重合によりポリマー薄膜を作製後、還元剤及び酸処理でシリカナノ粒子を除去しナノ空孔を形成させた。PIM として、残存する SH 基に蛍光分子を導入し、His-tag を介して protein G、さらに抗体を導入した(Fig. 1B)。

蛍光測定結果より EVs 濃度に依存して蛍光強度が変化し、見かけの結合定数(K_d)が 1.3×10^{16} (M) と推定された。この高い親和性は、市販の ELISA の 1000 倍であり、超高感度を達成した。(Fig. 1C)。本センシングシステムを用いた乳がん診断への応用についても検討を行ったので報告する。

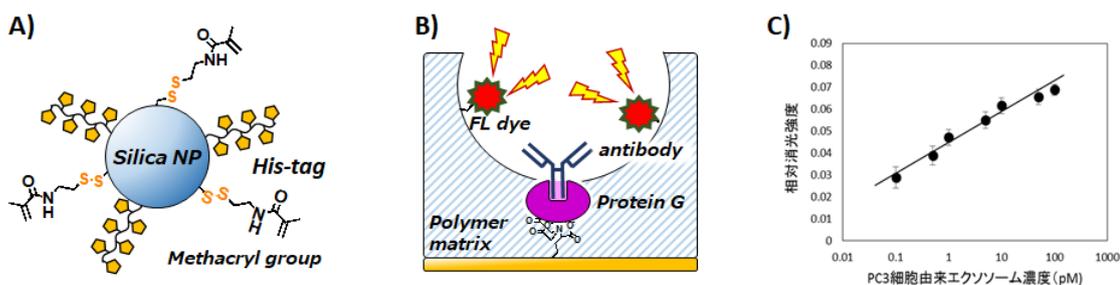


Figure 1. Schematic illustration of polymerizable group and His-tag modified silica nanoparticle (A), EVs sensing nano-interface (B) and binding activity toward PC-3 secreted EVs (C).