

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6230027号
(P6230027)

(45) 発行日 平成29年11月15日(2017.11.15)

(24) 登録日 平成29年10月27日(2017.10.27)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 27/26 (2006.01)	GO 1 N 27/26 P
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y
GO 1 N 27/447 (2006.01)	GO 1 N 27/26 U
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 27/447 3 3 1 K
	GO 1 N 27/447 3 3 1 H
	請求項の数 21 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-531606 (P2014-531606)
 (86) (22) 出願日 平成25年8月15日 (2013. 8. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2013/071967
 (87) 国際公開番号 W02014/030590
 (87) 国際公開日 平成26年2月27日 (2014. 2. 27)
 審査請求日 平成28年6月10日 (2016. 6. 10)
 (31) 優先権主張番号 特願2012-185666 (P2012-185666)
 (32) 優先日 平成24年8月24日 (2012. 8. 24)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 504137912
 国立大学法人 東京大学
 東京都文京区本郷七丁目3番1号
 (73) 特許権者 000004112
 株式会社ニコン
 東京都港区港南二丁目15番3号
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100108578
 弁理士 高橋 詔男
 (72) 発明者 一木 隆範
 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大
 学法人東京大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エキソソームの分析方法、エキソソーム分析装置、抗体-エキソソーム複合体、及びエキソソーム電気泳動チップ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

エキソソームの分析方法であって、
 (a) 試料からエキソソームを調製する工程と、
 (b) 前記工程(a)で調製されたエキソソームと、前記エキソソームの表面に存在するタンパク質を抗原とする抗体と、を接触させて第1の抗体-エキソソーム複合体を形成させる工程と、
 (c) 前記第1の抗体-エキソソーム複合体のゼータ電位を計測する工程と、
 を有するエキソソームの分析方法。

【請求項2】

前記工程(c)は、前記第1の抗体-エキソソーム複合体を電気泳動により分離して、前記第1の抗体-エキソソーム複合体のゼータ電位を1粒子レベルで計測する工程である請求項1に記載のエキソソームの分析方法。

【請求項3】

前記工程(c)は、光学的に測定した移動度に基づいて前記第1の抗体-エキソソーム複合体のゼータ電位を計測する工程を含む請求項2に記載のエキソソームの分析方法。

【請求項4】

前記第1の抗体は、異常細胞又は正常細胞に高発現が認められるタンパク質を抗原とする請求項1~3のいずれか一項に記載のエキソソームの分析方法。

【請求項5】

前記第 1 の抗体は、異常細胞特異的又は正常細胞特異的に発現が認められるタンパク質を抗原とする請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のエキソソームの分析方法。

【請求項 6】

前記第 1 の抗体は、複数種類の抗体からなる請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のエキソソームの分析方法。

【請求項 7】

前記工程 (c) の後、

(d) 前記工程 (a) で調製されたエキソソームと、前記エキソソームの表面に存在するタンパク質を抗原とする第 2 の抗体と、を接触させて第 2 の抗体 - エキソソーム複合体を形成させる工程と、

(e) 前記第 2 の抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を計測する工程と、を有する請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のエキソソームの分析方法。

【請求項 8】

前記工程 (e) は、前記第 2 の抗体 - エキソソーム複合体を電気泳動により分離して、前記第 2 の抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を 1 粒子レベルで計測する工程である請求項 7 に記載のエキソソームの分析方法。

【請求項 9】

前記工程 (e) は、光学的に測定した移動度に基づいて前記第 2 の抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を計測する工程を含む請求項 8 に記載のエキソソームの分析方法。

【請求項 10】

前記第 2 の抗体は、臓器特異的に高発現が認められるタンパク質を抗原とする請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載のエキソソームの分析方法。

【請求項 11】

エキソソーム分析装置であって、

試料からエキソソームを調製する調製手段と、

前記エキソソームと、前記エキソソームの表面に存在するタンパク質を抗原とする抗体と、を接触させて抗体 - エキソソーム複合体を形成させる複合体形成手段と、

前記抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を計測する計測手段と、

を備えたエキソソーム分析装置。

【請求項 12】

前記抗体 - エキソソーム複合体を電気泳動により分離する電気泳動手段を含む請求項 11 に記載のエキソソーム分析装置。

【請求項 13】

エキソソーム電気泳動チップであって

試料から調製したエキソソームと、該エキソソームの表面に存在するタンパク質を抗原とする抗体と、を接触させた、抗体 - エキソソーム複合体を含む懸濁液が注入されるリザーバーと、

前記抗体 - エキソソーム複合体を含む懸濁液の電気泳動を行う流路と、

を備え、

前記流路は、前記抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を算出するために光照射される部分を有するエキソソーム電気泳動チップ。

【請求項 14】

電圧を前記流路に印加するための電極が入れられる 2 つの部分を用意する請求項 13 に記載のエキソソーム電気泳動チップ。

【請求項 15】

電圧を前記流路に印加するための電極を用意する請求項 13 又は 14 に記載のエキソソーム電気泳動チップ。

【請求項 16】

前記流路の少なくとも一部は、生体分子の非特異的吸着を抑制するために、ポリマーでコーティングされている請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載のエキソソーム電気泳動

10

20

30

40

50

チップ。

【請求項 17】

エキソソームの分析方法であって、
 (a) 試料からエキソソームを調製する工程と、
 (b) 前記工程 (a) で調製されたエキソソームと、前記エキソソームの表面に存在する生体分子と特異的に結合する分子と、を接触させて複合体を形成させる工程と、
 (c) 前記複合体のゼータ電位を計測する工程と、
 を有するエキソソームの分析方法。

【請求項 18】

前記工程 (c) は、前記複合体を電気泳動により分離して、前記複合体のゼータ電位を 1 粒子レベルで計測する工程である請求項 17 に記載のエキソソームの分析方法。

10

【請求項 19】

エキソソーム分析装置であって、
 試料からエキソソームを調製する調製手段と、
 前記エキソソームと、前記エキソソームの表面に存在する生体分子と特異的に結合する分子と、を接触させて複合体を形成させる複合体形成手段と、
 前記複合体のゼータ電位を計測する計測手段と、
 を備えたエキソソーム分析装置。

【請求項 20】

前記複合体を電気泳動により分離する電気泳動手段を含む請求項 19 に記載のエキソソーム分析装置。

20

【請求項 21】

エキソソーム電気泳動チップであって、
 試料から調製したエキソソームと、該エキソソームの表面に存在する生体分子と特異的に結合する分子と、を接触させた、複合体を含む懸濁液が注入されるリザーバーと、
 前記複合体を含む懸濁液の電気泳動を行う流路と、
 を備え、
 前記流路は、前記抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を算出するために光照射される部分を有するエキソソーム電気泳動チップ。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、エキソソームの分析方法、エキソソーム分析装置、抗体 - エキソソーム複合体、及びエキソソーム電気泳動チップに関する。

本願は、2012年8月24日に、日本に出願された特願2012-185666号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

【背景技術】

【0002】

エキソソームは、直径30～100nmの小型脂質小胞であり、エンドソームと細胞膜との融合体として、腫瘍細胞、樹状細胞、T細胞、B細胞等、種々の細胞から、血液、尿、唾液等の体液中に分泌される。

40

【0003】

がん細胞等の異常細胞は、細胞膜に特有のタンパク質を発現している場合がある。エキソソームの膜表面は、分泌源の細胞由来のタンパク質を発現している。そのため、体液中のエキソソーム膜表面のタンパク質を分析することで分泌源の細胞の性質がわかり、バイオプシー検査をしなくとも生体内の異常を調べることができる検査技術が確立できる可能性がある。なお、バイオプシー検査とは、病変部位の組織を採取し顕微鏡等で病変部位を観察することによって、病気の診断等を調べる臨床検査をいう。

【0004】

このような期待に対して、エキソソームの膜表面に発現しているCD63を抗原とする

50

抗体で修飾したビーズを用いて、CD63陽性のエクソソームを捕捉し蛍光修飾抗体で標識し、フローサイトメトリーを用いて計測することにより、エクソソームの膜表面を分析する方法が提案されている（非特許文献1参照）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Lasser C., et al., J. Vis. Exp., (2012) vol. 59, e3037.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0006】

しかし、エクソソームの膜表面におけるCD63等の糖タンパク質の発現量は少ないため、非特許文献1に記載のエクソソームの分析方法は、多量のサンプルを用いて、複数粒子のエクソソームを抗体修飾ビーズに捕捉させなければ、エクソソームの膜表面における糖タンパク質の発現を検出できない。非特許文献1に記載のエクソソームの分析方法は、簡便かつ高感度にサンプル由来のエクソソームを分析するという点においては改良の余地がある。

【0007】

本発明は、上記事情に鑑みてなされ、高感度にエクソソームを分析できる、エクソソームの分析方法及びエクソソーム分析装置、抗体-エクソソーム複合体、並びに、エクソソーム電気泳動チップを提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは上記の課題を解決するため、鋭意研究を行った結果、エクソソームの膜表面に存在するタンパク質を抗原とする抗体とエクソソームとからなる複合体のゼータ電位を計測することにより課題を解決できることを見出した。本発明の一実施態様は、下記(1)~(6)を提供する。

(1)本発明の一実施態様におけるエクソソームの分析方法は、エクソソームの分析方法であって、

(a) 試料からエクソソームを調製する工程と、

30

(b) 前記工程(a)で調製されたエクソソームと、前記エクソソームの表面に存在するタンパク質を抗原とする抗体と、を接触させて第1の抗体-エクソソーム複合体を形成させる工程と、

(c) 前記第1の抗体-エクソソーム複合体のゼータ電位を計測する工程と、を有する。

(2)本発明の一実施態様におけるエクソソーム分析装置は、エクソソーム分析装置であって、

試料からエクソソームを調製する調製手段と、

前記エクソソームと、前記エクソソームの表面に存在するタンパク質を抗原とする抗体と、を接触させて抗体-エクソソーム複合体を形成させる複合体形成手段と、

40

前記抗体-エクソソーム複合体のゼータ電位を計測する計測手段と、を備える。

(3)本発明の一実施態様におけるエクソソーム電気泳動チップは、エクソソーム電気泳動チップであって

試料から調製したエクソソームと、該エクソソームの表面に存在するタンパク質を抗原とする抗体と、を接触させた、抗体-エクソソーム複合体を含む懸濁液が注入されるリザーバーと、

前記抗体-エクソソーム複合体を含む懸濁液の電気泳動を行う流路と、を備え、

前記流路は、前記抗体-エクソソーム複合体のゼータ電位を算出するために光照射され

50

る部分を有する。

(4) 本発明の一実施態様におけるエキソソームの分析方法は、エキソソームの分析方法であって、

(a) 試料からエキソソームを調製する工程と、

(b) 前記工程(a)で調製されたエキソソームと、前記エキソソームの表面に存在する生体分子と特異的に結合する分子と、を接触させて複合体を形成させる工程と、

(c) 前記複合体のゼータ電位を計測する工程と、
を有する。

(5) 本発明の一実施態様におけるエキソソーム分析装置は、エキソソーム分析装置であって、

試料からエキソソームを調製する調製手段と、

前記エキソソームと、前記エキソソームの表面に存在する生体分子と特異的に結合する分子と、を接触させて複合体を形成させる複合体形成手段と、

前記複合体のゼータ電位を計測する計測手段と、

を備える。

(6) 本発明の一実施態様におけるエキソソーム電気泳動チップは、エキソソーム電気泳動チップであって、

試料から調製したエキソソームと、該エキソソームの表面に存在する生体分子と特異的に結合する分子と、を接触させた、複合体を含む懸濁液が注入されるリザーバーと、

前記複合体を含む懸濁液の電気泳動を行う流路と、

を備え、

前記流路は、前記抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を算出するために光照射される部分を有する。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、高感度にエキソソームを分析できる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】本実施形態におけるエキソソーム分析装置の一態様の模式図である。

【図2】実施例1における抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位計測結果である。

【図3】実施例2におけるマイクロキャピラリー電気泳動を用いて、抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を計測する工程を示す模式図である。

【図4】実施例2におけるマイクロキャピラリー電気泳動を用いた抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位計測結果である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下、本発明の好ましい例を説明するが、本発明はこれら例に限定されることはない。本発明の趣旨を逸脱しない範囲で、構成の付加、省略、置換、およびその他の変更が可能である。

エキソソームの分析方法

本実施形態のエキソソームの分析方法は、細胞の異常を検出するためのエキソソームの分析方法であって、

(a) 検出対象の細胞が分泌したエキソソームを含有する試料から前記エキソソームを調製する工程と、

(b) 前記工程(a)で調製されたエキソソームと、前記エキソソームの表面に存在するタンパク質を抗原とする抗体と、を接触させて第1の抗体 - エキソソーム複合体を形成させる工程と、

(c) 前記第1の抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を計測する工程と、
を有する。

【0012】

エキソソームは、細胞の分泌物であり、その表面に分泌源の細胞由来のタンパク質を発現している。生体内に存在するがん細胞等の異常細胞は、その細胞膜に特有のタンパク質を発現している。

そのため、エキソソームの表面に発現しているタンパク質を分析することで分泌源の細胞の異常を検出することができる。ここで、エキソソームの表面とは、細胞から分泌される膜小胞の膜表面であって、分泌されたエキソソームが生体内の環境と接する部分をいう。

更に、エキソソームは、生体内で循環している血液中で検出されるため、エキソソームを分析することで、バイオプシー検査をしなくとも、生体内の異常を検出することができる。

以下、各工程について説明する。

【0013】

工程(a)は、検出対象の細胞が分泌したエキソソームを含有する試料から前記エキソソームを調製する工程である。係る試料としては、検出対象の細胞をとりまく環境から得られる試料であって、前記細胞が分泌したエキソソームを含有する試料であれば特に限定されず、血液、尿、母乳、気管支肺胞洗浄液、羊水、悪性滲出液、唾液等の試料が挙げられる。血液又は尿は、エキソソームを検出しやすい。更に一例として、血液においては、エキソソームの検出のしやすさから、血漿が挙げられる。

また、係る試料には、培養細胞が分泌したエキソソームを含有する細胞培養液も含まれる。

【0014】

検出対象の細胞としては、エキソソームを産生することが知られているがん細胞、肥満細胞、樹状細胞、網赤血球、上皮細胞、B細胞、神経細胞等が挙げられる。

【0015】

係る試料からエキソソームを調製する方法としては、超遠心分離、限外ろ過、連続フロー電気泳動、クロマトグラフィー等の方法が挙げられる。ろ過及びクロマトグラフィーの中では、サイズフィルターを用いたろ過方法やゲルろ過クロマトグラフィー法等の方法が挙げられる。

【0016】

工程(b)は、前記工程(a)で調製されたエキソソームと、前記エキソソームの表面に存在するタンパク質を抗原とする抗体と、を接触させて第1の抗体-エキソソーム複合体を形成させる工程である。

【0017】

工程(b)において、接触とは、例えば、エキソソームの表面に存在するタンパク質と前記タンパク質を抗原とする抗体とが、抗原-抗体反応を起こすほどに、相互作用することを意味する。

エキソソームを分泌する異常細胞は、その細胞表面に特有のタンパク質を発現しているか、又は、前記異常細胞において、特有のタンパク質の発現が欠損している。従って、正常細胞と比較して、発現パターンの異なるタンパク質を抗原とする抗体を用いることで、細胞の異常を検出できる。

係る観点から、第1の抗体は、一例として、異常細胞又は正常細胞に高発現が認められるタンパク質を抗原とし、また、一例として、異常細胞特異的又は正常細胞特異的に発現が認められるタンパク質を抗原とする。

【0018】

例えば、正常の乳腺上皮細胞株において、CD10、CD5/6、CAV1、MOESIN、ETS1等のタンパク質が高発現している一方、乳がん細胞株においては、これらのタンパク質の発現が低下している旨の報告がなされている(Charafe-Jauffret E, et al., Oncogene (2006) vol. 25, pp 2273-2284.)。一例として乳腺上皮細胞の異常を検出する場合、これらの抗体を第1抗体として用いる。

10

20

30

40

50

第1の抗体が認識する抗原としては、エキソソームの表面に存在するタンパク質であれば特に限定されず、細胞内に存在するタンパク質の一部が表面に露呈されていてもよい。例えば、がん細胞において免疫細胞に攻撃される成分(以下、がん抗原という。)は、がん細胞の細胞質内でペプチドに分解され、がん細胞の細胞膜表面にクラスI MHC分子と共にがん抗原ペプチドとして発現される。第1の抗体が認識する抗原は、係るがん抗原ペプチドであってもよい。

第1の抗体がエキソソームとの複合体を形成しやすいという観点から、一例としてレセプター等の膜タンパク質を抗原とする。

従って、乳腺上皮細胞の異常を検出する場合、一例として第1の抗体がCD10、CD5/6、CD44等の膜タンパク質を抗原とする。

10

【0019】

また、第1の抗体は、複数種類の抗体からなるものであってもよく、前記複数種類の抗体は、同一の抗原の異なるエピトープを認識してもよい。係る抗体を用いることにより、特定の抗原を有するエキソソームの認識精度を高めることができる。

また、複数種類の抗体は、異なる抗原を認識してもよい。例えば、乳がん細胞又は乳腺上皮正常細胞に高発現が認められる複数種類のタンパク質を抗原とする複数種類の抗体を用いることによって、乳腺上皮細胞の異常を検出する際の精度を高めることができる。

【0020】

また、第1の抗体は、がんに関連する抗体に限定されない。第1の抗体として、肥満、糖尿病、神経変性疾患等に関連する抗体を用いることにより、対象細胞におけるこれらの疾患に関連する異常を検出することができる。

20

【0021】

工程(c)は、前記第1の抗体-エキソソーム複合体のゼータ電位を計測する工程である。なお、ゼータ電位とは、水溶液中に分散された粒子の表面の帯電の指標であり、厳密には、水溶液中に分散する粒子が電場を印加されて移動する際の「すべり面」の電位として定義される。電気泳動実験により計測できる粒子の移動度に対し、スモルコフスキー(Smoluchowski)の式等を適用することで求められる。エキソソームは負に帯電している一方、抗体は正に帯電しているため、第1の抗体とエキソソームとが複合体を形成する場合には、前記複合体のゼータ電位は、エキソソーム単独のゼータ電位と比較して正にシフトしている。

30

従って、複合体のゼータ電位を計測することによって、エキソソームの膜表面における、第1抗体が認識するタンパク質の発現を検出でき、分泌源の細胞の異常を検出することができる。

また、本実施形態の分析方法は、従来のエキソソームの分析方法と異なり、抗体で修飾したビーズを用いて、エキソソームを多数捕捉する必要が無い。そのため、本実施形態の分析方法によれば、細胞の異常を高感度にかつ簡便に検出できる。

【0022】

更に、工程(c)は、一例として、前記第1の抗体-エキソソーム複合体を電気泳動により分離して、前記第1の抗体-エキソソーム複合体のゼータ電位を1粒子レベルで計測する工程である。

40

例えば、生体内を循環している血液からエキソソームを調製する場合、前記エキソソームは複数の臓器由来の複数種類の細胞から分泌される為、エキソソームの膜表面に存在するタンパク質の種類及び発現量は、粒子ごとに異なる。従って、係るエキソソームを詳細に分析するためには、一例として、電気泳動により1粒子レベルで分離して、分析する。1粒子のエキソソームに結合する抗体の分子数が多いほど、複合体は正に帯電し、電気泳動における複合体の移動速度は遅くなる。

【0023】

更に、工程(c)は、一例として、光学的に測定した移動度に基づいて前記第1の抗体-エキソソーム複合体のゼータ電位を計測する工程を含む。

例えば、電気泳動の際、例えば、波長488nm、強度50mWのレーザー光を抗体-エ

50

キソソーム複合体に照射して、レイリー散乱光による粒子画像を取得し、抗体 - エキソソーム複合体の電気泳動度を測定する。複数種類の抗体 - エキソソーム複合体を電気泳動により分離し、スモルコフスキー (Smoluchowski) の式：

【数 1】

$$\zeta = \frac{u \times \eta}{\epsilon_r - \epsilon_0}$$

ゼータ電位(ζ) = 電気泳動移動度(u) × 溶液の粘性(η) / 溶媒の比誘電率(ε_r) / 真空中の誘電率(ε₀)

を用いて複合体の電気泳動移動度からゼータ電位を算出することで、試料中のエキソソームを 1 粒子レベルで分析することができる。

10

【0024】

がん幹細胞は、腫瘍組織形成の大本になる細胞であり、治療に対する抵抗性が高いことから、がんの再発・転移等の起源になると考えられている。一例として、治療によって大部分のがん細胞を除いても、ごく少数のがん幹細胞が生き残っていれば再発が起こりうることになり、これが、がんにおいてしばしば再発が起きる理由だと考えられている。従って、がん幹細胞を標的として除去することができれば、がんの転移や再発の防止にも有用な治療法の開発につながることを期待されている。

乳がん、すい臓がん、胃がん、大腸がん等の固形がんにおいては、CD44 陽性のがん細胞は免疫不全マウスでの腫瘍形成能力が高く、CD44 陽性のがん細胞はがん幹細胞様の性質を有することが報告されている。

20

従って、本実施形態によれば、生体内を循環している血液からエキソソームを調製し、第 1 の抗体として CD44 を抗原とする抗体を用い、抗 CD44 抗体 - エキソソーム複合体を電気泳動により分離して、抗 CD44 抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を 1 粒子レベルで計測することにより、CD44 を高発現する微量の転移性乳がん細胞等を検出することができる。

【0025】

本実施形態のエキソソームの分析方法は、更に、前記工程 (c) の後、一例として、(d) 前記工程 (a) で調製されたエキソソームと、前記エキソソームの膜表面に存在するタンパク質を抗原とする第 2 の抗体と、を接触させて前記第 2 の抗体 - エキソソーム複合体を形成させる工程と、

30

(e) 前記第 2 の抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を計測する工程と、を有する。

即ち、一例として、本実施形態のエキソソームの分析方法は、上述した第 1 の抗体を用いて、エキソソームとの複合体のゼータ電位を計測する工程とは別に、第 1 の抗体とは異なる第 2 の抗体を用いて、エキソソームとの複合体のゼータ電位を計測する工程を有する。

以下、各工程について詳細に説明する。

【0026】

工程 (d) は、前記工程 (a) で調製されたエキソソームと、前記エキソソームの膜表面に存在するタンパク質を抗原とする第 2 の抗体と、を接触させて前記第 2 の抗体 - エキソソーム複合体を形成させる工程である。

40

第 2 の抗体は、一例として、第 1 の抗体とは異なり、第 1 の抗体を用いることにより特定される検出細胞の性質とは異なる性質を特定できる。例えば、第 1 の抗体としてがん特異的に発現するタンパク質を抗原とするものを用いた場合、第 2 の抗体として臓器特異的に発現するタンパク質を抗原とするものを用いる。これにより、エキソソームの分泌源の細胞ががん細胞であるかどうかを特定できるだけでなく、エキソソームの分泌源の細胞が生体内のどの臓器由来であるかを特定できる。

【0027】

例えば、臓器特異的に発現しているタンパク質としては、PSA、PSCA、PSMA 等の前立腺がんマーカー；CA15-3、BCA225、HER2 等の乳がんマーカー等

50

が挙げられる。これを抗原とする抗体を第2の抗体として用いることにより、検出対象のがん細胞の癌腫を特定できる。

【0028】

工程(e)は、前記第2の抗体-エキソソーム複合体のゼータ電位を計測する工程である。前記工程は、第1の抗体-エキソソーム複合体に代えて、第2の抗体-エキソソーム複合体を用いる以外は、前記工程(c)と同様である。

エキソソームを詳細に分析する観点から、工程(e)も、一例として、前記第2の抗体-エキソソーム複合体を電気泳動により分離して、前記第2の抗体-エキソソーム複合体のゼータ電位を1粒子レベルで計測する工程である。

また、工程(e)は、一例として、光学的に測定した移動度に基づいて前記第2の抗体-エキソソーム複合体のゼータ電位を計測する工程を含む。

10

【0029】

本実施形態のエキソソーム分析方法は、細胞の異常を検出するためのエキソソームの分析方法であって、

(a) 試料からエキソソームを調製する工程と、

(b) 前記工程(a)で調製されたエキソソームと、前記エキソソームの表面に存在する生体分子と特異的に結合する分子と、を接触させて複合体を形成させる工程と、

(c) 前記複合体のゼータ電位を計測する工程と、
を有する。

一例として、前記工程(c)は、前記複合体を電気泳動により分離して、前記複合体のゼータ電位を1粒子レベルで計測する工程である。

20

【0030】

エキソソーム分析装置

本実施形態のエキソソーム分析装置は、細胞の異常を検出するためのエキソソーム分析装置であって、

検出対象の細胞が分泌したエキソソームを含有する試料からエキソソームを調製する調製手段と、

前記エキソソームと、前記エキソソームの表面に存在するタンパク質を抗原とする抗体と、を接触させて抗体-エキソソーム複合体を形成させる複合体形成手段と、

前記抗体-エキソソーム複合体のゼータ電位を計測する計測手段と、

30

を備える。

一例として、前記エキソソーム分析装置は、前記抗体-エキソソーム複合体を電気泳動により分離する電気泳動手段を含む。

【0031】

近年、体外診断分野における試験の高速化、高効率化、及び集積化、又は、検査機器の超小型化を目指した μ -TAS(Micro-Total Analysis Systems)の開発が進められている。

μ -TASとは、MEMS(Micro Electro Mechanical Systems)技術を用いて、チップ上に微小な流路、反応室、及び混合室を設け、一つのチップ上で生体分子を分析するマイクロ流体デバイスを意味する。 μ -TASは、少量の試料で測定、分析が可能なこと、持ち運びが可能となること、低コストで使い捨てが可能なこと等、従来の検査機器に比べて優れている。

40

更に、 μ -TASは、高価な試薬を使用する場合や少量多検体を検査する場合において、有用性が高い方法として注目されている。

従って、検出対象の細胞が分泌した微量のエキソソームを分析するため、本実施形態のエキソソーム分析装置は、一例として、マイクロ流体デバイスを少なくとも一部に有する。

。

以下、図1を用いて、本実施形態のエキソソーム分析装置の一例について説明する。

【0032】

図1は、本実施形態のエキソソーム分析装置1の基本構成を示す模式図である。本実施

50

形態のエキソソーム分析装置 1 は、血液検体からエキソソームを調製し、前記エキソソームの分析を介して、分泌源の細胞の異常を検出するための装置として用いられる。

本実施形態のエキソソーム分析装置 1 は、液溜部 4 , 7、駆動源 2、バルブ 9、及び精製装置 11 からなる調製手段（調製部）21 と、液溜部 3 , 7、駆動源 2、バルブ 8、及び合流部 13 からなる複合体形成手段（複合体形成部）20 と、電気泳動槽 12 からなる計測手段（計測部）22 と、から構成されている。

図 1 に示すように、本実施形態のエキソソーム分析装置 1 は、駆動源 2 の下流に、液溜部 3 , 4 を有しており、液溜部 3 には、それぞれ、抗体、血液が溜められている。駆動源 2 の上流に位置する液溜部 7 には、駆動液が溜められている。更に、液溜部 3 , 4 の上流の流路には、流体の流れを制御するバルブ 8 , 9 が設けられている。

10

【0033】

まず、バルブ 9 を開け、駆動源 2 によって、液溜部 4 に溜められている血液検体が押出され、押出された血液検体が精製装置 11 を通る。精製装置 11 は、血液から血漿のみを選び分けるフィルター部と、血漿中の成分をサイズで選り分けるゲルろ過カラムからなる。精製装置 11 を通ったエキソソーム画分は、バルブが閉状態にある前記バルブ付きの合流部 13 に溜められる。

次いで、バルブ 8 を開け、駆動源 2 によって、液溜部 3 に溜められている抗体が押出され、合流部 13 にて、エキソソームが抗体と接触し、抗体 - エキソソームが形成される。

次いで、合流部 13 に付されたバルブを開け、抗体 - エキソソームは電気泳動槽 12 を通る。電気泳動槽 12 は、図示略の電気泳動装置に接続されており、前記電気泳動装置によって、抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位が計測される。

20

このように本実施形態のエキソソーム分析装置 1 によれば、生体内の微量のエキソソームを簡便かつ高感度に分析できる。

【0034】

本実施形態のエキソソーム分析装置は、細胞の異常を検出するためのエキソソーム分析装置であって、

試料からエキソソームを調製する調製手段と、

前記エキソソームと、前記エキソソームの表面に存在する生体分子と特異的に結合する分子と、を接触させて複合体を形成させる複合体形成手段と、

前記複合体のゼータ電位を計測する計測手段と、

30

を備える。

一例として、前記エキソソーム分析装置は、前記複合体を電気泳動により分離する電気泳動手段を含む。

【0035】

抗体 - エキソソーム複合体

本実施形態の抗体 - エキソソーム複合体は、細胞の異常を検出するための抗体 - エキソソーム複合体であって、

試料から調製されたエキソソームと、

前記エキソソームの表面に存在するタンパク質を抗原とする抗体と、からなり、

電気泳動移動度によって算出される前記抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位が、前記エキソソームのゼータ電位と比較して正の電荷を有する。

40

また、本実施形態の抗体 - エキソソーム複合体は、一例として上述したゼータ電位計測に用いられる。

更に、本実施形態の抗体 - エキソソーム複合体の物性は、抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位がエキソソーム単体のゼータ電位に比べて、一例として 0.1 mV 以上、あるいは 1 mV 以上、シフトしている。また、抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位は、エキソソーム単体のゼータ電位に比べて、例えば、0.5、1、2、3、4、または 5 mV 以上シフトしている。

本実施形態の抗体 - エキソソーム複合体は、上述した本実施形態のエキソソームの分析方法において説明されたものと同様であり、その説明を省略する。

50

【 0 0 3 6 】

エキソソーム電気泳動チップ

本実施形態のエキソソーム電気泳動チップは、細胞の異常を検出するためのエキソソーム電気泳動チップであって

試料から調製したエキソソームと、該エキソソームの表面に存在するタンパク質を抗原とする抗体と、を接触させた、抗体 - エキソソーム複合体を含む懸濁液が注入されるリザーバーと、

前記抗体 - エキソソーム複合体を含む懸濁液の電気泳動を行う流路と、
を備えたものである。

【 0 0 3 7 】

前記エキソソーム電気泳動チップは、一例として電圧を前記流路に印加するための電極が入れられる2つの部分を備える。前記2つの部分は、2つのリザーバー内の任意の位置にそれぞれ1つずつ設けられる。また、前記エキソソーム電気泳動チップは、一例として電圧を前記流路に印加するための電極を備える。

前記流路は、一例として、前記抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を算出するために照射される部分を有する。また、一例として前記流路の少なくとも一部は、生体分子の非特異的吸着を抑制するために、ポリマーでコーティングされている。前記ポリマーの例としては、PEG（ポリエチレングリコール）や、BSA（ウシ血清アルブミン）などタンパク質の吸着ブロッキングで用いられるポリマー等が挙げられるが、特にタンパク質の非特異的吸着を抑制する観点からMPC（2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン）が好ましい。

【 0 0 3 8 】

本実施形態のエキソソーム電気泳動チップは、細胞の異常を検出するためのエキソソーム電気泳動チップであって、

試料から調製したエキソソームと、該エキソソームの表面に存在する生体分子と特異的に結合する分子と、を接触させた、複合体を含む懸濁液が注入されるリザーバーと、

前記複合体を含む懸濁液の電気泳動を行う流路と、
を備える。

【 0 0 3 9 】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【 0 0 4 0 】

実施例 1

[エキソソーム懸濁液の調製]

ヒト乳腺上皮細胞MCF10Aを、乳腺上皮細胞培地キット（Lonza社製）を用いて、コンフルエントに達するまで培養した。また、ヒト乳がん細胞MDA - MB - 231を、10% ウシ胎児血清（インビトロジェン社製）、100 units / mLペニシリン（インビトロジェン社製）、100 μg / mLストレプトマイシン（インビトロジェン社製）、及び100 μg / mLカナマイシン（インビトロジェン社製）含有RPMI培地（インビトロジェン社製）を用いて、コンフルエントに達するまで培養した。

次いで、培地交換を行い、MCF10A及びMDA - MB - 231を、無血清培地（100 units / mLペニシリン（インビトロジェン社製）、100 μg / mLストレプトマイシン（インビトロジェン社製）、及び100 μg / mLカナマイシン（インビトロジェン社製）含有RPMI培地（インビトロジェン社製））で、1日培養し、培養上清を回収した。

この培養上清を、2000 × gで15分間遠心分離して上清を回収し、回収した上清を16800 × gで35分間遠心分離して上清を回収し、更に回収した上清を151000 × gで70分間遠心分離した。上清を廃棄して沈殿をPBSで懸濁し、懸濁液を151000 × gで70分間遠心分離した。更に、上清を廃棄して沈殿をPBSで懸濁し、エキソ

10

20

30

40

50

ソーム懸濁液を得た。

【0041】

[抗体 - エキソソーム複合体の形成]

MCF10A及びMDA-MB-231の培養上清から調製したエキソソーム懸濁液それぞれに、抗ヒトCD10抗体(日本BD社製、型番555746)懸濁液又はIsotypeコントロール用マウスIgG1, 抗体(日本BD社製、型番349050)懸濁液を加えてなる抗体 - エキソソーム懸濁液を、4 で30分間攪拌して反応させ、抗体 - エキソソーム複合体の形成を試みた。

【0042】

[抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位計測]

抗体 - エキソソーム懸濁液750 μ Lをサンプルセルに入れ、ゼータ電位計測装置(マルバーン社製、商品名: Zetasizer Nano)を用いて、25、20Vの条件下、ゼータ電位を計測した。尚、試験を3回連続で行った。計測結果を図2に示す。

図2に示すように、MCF10Aにおいて、抗ヒトCD10抗体 - エキソソーム懸濁液は、Isotypeコントロール用マウスIgG1, 抗体 - エキソソーム懸濁液と比較して、そのゼータ電位が上昇していることが確認された。

このことから、Isotypeコントロール用マウスIgG1, 抗体 - エキソソーム懸濁液においては、Isotypeコントロール用マウスIgG1, 抗体 - エキソソーム複合体を形成していない一方、抗ヒトCD10抗体 - エキソソーム懸濁液においては、抗ヒトCD10抗体 - エキソソーム複合体を形成していることが確認された。

一方、MDA-MB-231においては、Isotypeコントロール用マウスIgG1, 抗体 - エキソソーム懸濁液及び抗ヒトCD10抗体 - エキソソーム懸濁液のゼータ電位に差がないことから、どちらの懸濁液も複合体を形成していないことが確認された。

【0043】

CD10は、正常細胞であるMCF10Aに高発現が認められ、がん細胞であるMDA-MB-231に発現が認められないことが報告されている(Charafe-Jauffret E, et al., Oncogene (2006) vol. 25, pp 2273 - 2284.)。

実施例1によれば、ある細胞で発現量が多いタンパク質を抗原とする抗体を用いて、抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を測定することにより、エキソソームの分泌源である細胞の存在を確認できる。すなわち、がん細胞特異的に発現するタンパク質又はがん細胞に高発現するタンパク質を抗原とする抗体を用いて、抗体 - エキソソーム懸濁液のゼータ電位を測定することにより、エキソソームの分泌源の細胞の異常を検出し、生体内に存在するがんを簡便かつ高感度に検出できることが明らかである。

【0044】

実施例2

[エキソソーム懸濁液の調製]

実施例1と同様の方法にて、ヒト乳がん細胞MDA-MB-231由来のエキソソーム懸濁液を調製した。

【0045】

[抗体 - エキソソーム複合体の形成]

MDA-MB-231の培養上清から調製したエキソソーム懸濁液それぞれに、抗ヒトCD63抗体(日本BD社製、型番556019)懸濁液又はIsotypeコントロール用マウスIgG2a抗体(日本BD社製、型番555746)懸濁液を加えてなる抗体 - エキソソーム懸濁液を、4 で30分間攪拌して反応させ、抗体 - エキソソーム複合体の形成を試みた。また、ネガティブコントロールとして、抗体懸濁液を加えないエキソソーム懸濁液を同様の条件にて用意した。

【0046】

[電気泳動チップによる抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位計測]

図3右図に示すチップ電気泳動システムを用いて、抗体 - エキソソーム懸濁液の電気泳

10

20

30

40

50

動を行い、抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を計測した。詳細を以下に示す。

【 0 0 4 7 】

(P D M S (ポリジメチルシロキサン) 電気泳動チップの作製)

P D M S 製電気泳動チップをソフトリソグラフィ法で作製した。電気泳動チップ内の流路のサイズは幅 2 0 0 μ m、高さ 5 0 μ m、長さ 1 0 0 0 μ m である。タンパク質の非特異吸着を抑制すべく、流路内壁を M P C (2 - メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) ポリマーでコーティングした。

【 0 0 4 8 】

(抗体 - エキソソーム複合体を用いたマイクロキャピラリー電気泳動)

作製した P D M S 製電気泳動チップの両端に備えられたリザーバーの一方に、抗体 - エキソソーム懸濁液を加え、他方からシリンジで吸引して、エキソソーム懸濁液又は抗体 - エキソソーム懸濁液を、電気泳動チップ内の流路内に導入した。両方のリザーバーにプラチナ電極を入れ、電界強度 5 0 V / c m で 1 0 秒間電圧を印加して、電気泳動を行った。

図 3 左図は、エキソソーム及び抗体 - エキソソーム複合体それぞれの電気泳動の拡大図を示す。エキソソームは負に帯電する一方、抗体は正に帯電するため、抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位は、エキソソーム単独のゼータ電位と比較して正の電荷を有している。従って、抗体 - エキソソーム複合体の泳動度は、エキソソームの泳動度より小さいものとなる。

更に、電気泳動チップの下側方から波長 4 8 8 n m、強度 5 0 m W のレーザー光を照射し、出射光であるエキソソーム由来の散乱光を、電気泳動チップ下方にある対物レンズ (倍率 × 6 0) で集光した。

次いで、A n d o r 社製の高感度カメラ E M C C D i X o n 3 を用いて、エキソソーム及び抗体 - エキソソーム複合体それぞれの像を取得し、エキソソーム及び抗体 - エキソソーム複合体それぞれの移動速度を電界強度で除して、電気泳動移動度を算出した。また、無電荷ビーズの電気泳動度を測定して、流路内の電気浸透流の電気泳動移動度を算出し、エキソソーム及び抗体 - エキソソーム複合体それぞれの電気泳動移動度から無電荷ビーズの電気泳動移動度を差し引いて、エキソソーム及び抗体 - エキソソーム複合体それぞれの真の電気泳動移動度を算出した。

次いで、スモルコフスキー (S m o l u c h o w s k i) の式を用いてエキソソーム及び抗体 - エキソソーム複合体それぞれの真の電気泳動移動度からゼータ電位を算出した。結果を図 3 及び表 1 に示す。

【 0 0 4 9 】

【表 1】

	(-)anti-CD63	(+)anti-CD63	Isotype control
Zeta potential (mV)	-9.94±2.44	-2.88±3.87	-7.52±1.48

【 0 0 5 0 】

図 4 左は、エキソソーム懸濁液におけるゼータ電位の分布を示す。横軸は、ゼータ電位を示し、縦軸は、エキソソームの数を示す。合計 1 1 0 個のエキソソームのゼータ電位が計測された。表 1 に示すように、エキソソーム懸濁液におけるゼータ電位の平均値は、- 9 . 9 4 ± 2 . 4 4 m V であった。また、コントロール用マウス I g G 2 a 抗体 - エキソソーム懸濁液におけるゼータ電位の平均値は、- 7 . 5 2 ± 1 . 4 8 m V であり、エキソソーム懸濁液におけるゼータ電位の平均値と近い値を示した。

図 4 右は、抗ヒト C D 6 3 抗体 - エキソソーム懸濁液におけるゼータ電位の分布を示す。横軸は、ゼータ電位を示し、縦軸は、エキソソームの数を示す。合計 3 2 個のエキソソームのゼータ電位が計測された。表 1 に示すように、抗ヒト C D 6 3 抗体 - エキソソーム懸濁液におけるゼータ電位の平均値は、- 2 . 8 8 ± 3 . 8 7 m V であり、エキソソーム懸濁液及びコントロール用マウス I g G 2 a 抗体 - エキソソーム懸濁液と比較して、そのゼータ電位が上昇していることが確認された。

このことから、I s o t y p eコントロール用マウスI g G 2 a抗体 - エキソソーム懸濁液においては、I s o t y p eコントロール用マウスI g G 2 a抗体 - エキソソーム複合体を形成していない一方、抗ヒトC D 6 3抗体 - エキソソーム懸濁液においては、抗ヒトC D 6 3抗体 - エキソソーム複合体を形成していることが確認された。

【0051】

図4右に示すように、電気泳動チップを用いることにより、抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位の平均値だけでなく、抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を1粒子レベルで計測することができる。そのため、ゼータ電位の平均値からは、抗体が認識する抗原を有するエキソソームが試料中に存在しないように思われる場合であっても、電気泳動チップによって、マイナーポピュレーションとして存在する前記抗原を有するエキソソーム

10

を検出することができる。

即ち、実施例2によれば、例えば、生体内に微量に存在する悪性度の高いがん細胞を高感度に検出し、がんの浸潤・転移を早期に発見できることが明らかである。

【0052】

更に、実施例1及び実施例2の結果から、例えば、先ず、第1の抗体としてがん細胞特異的に発現するタンパク質を抗原とする抗体を用いて、第1の抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を計測し、次いで、第2の抗体として臓器特異的に発現するタンパク質を抗原とする抗体を用いて、第2の抗体 - エキソソーム複合体のゼータ電位を計測することにより、検出対象の細胞がどの臓器由来のがん細胞であるかを特定できる。また、がん細胞に限らず、用いる抗体の組合せを変えることにより、生体内における細胞の異常を詳細に

20

特定することができる。

【0053】

以上の結果から、本実施形態によれば、簡便かつ高感度にエキソソームを詳細に分析できることが明らかである。

【産業上の利用可能性】

【0054】

本発明は、簡便かつ高感度にエキソソームを分析できる、エキソソームの分析方法及びエキソソーム分析装置を提供することができる。

【符号の説明】

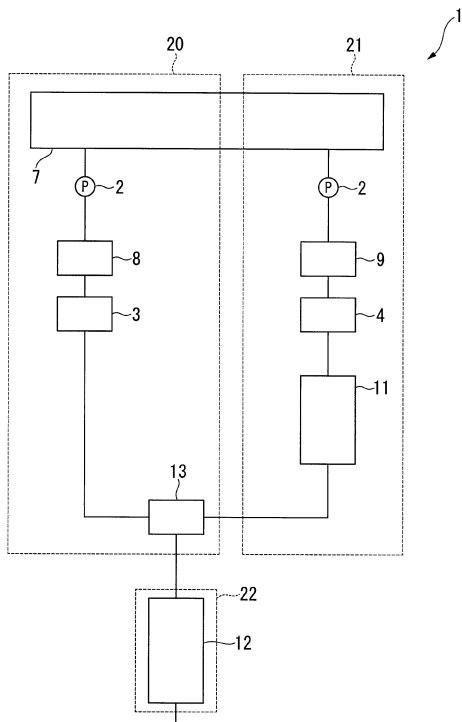
【0055】

- 1 エキソソーム分析装置
- 2 駆動源
- 3, 4, 7 液溜部
- 8, 9 バルブ
- 11 精製装置
- 12 電気泳動槽
- 13 合流部
- 20 複合体形成手段
- 21 調製手段
- 22 計測手段

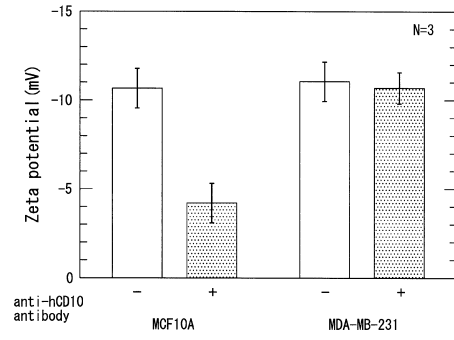
30

40

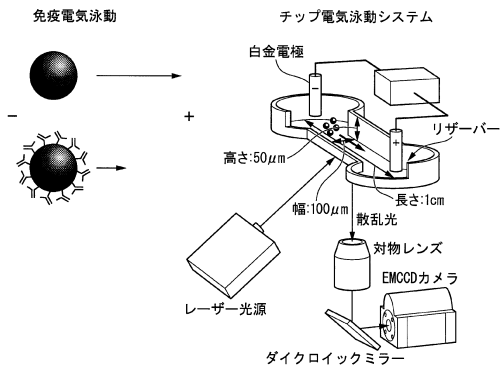
【図1】



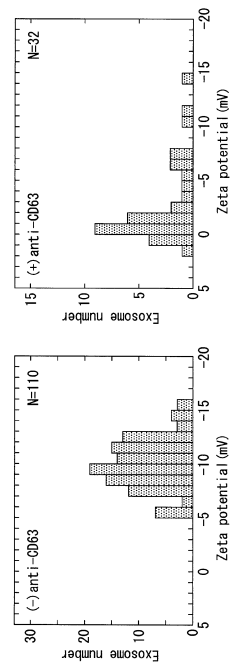
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 37/00 1 0 1

(72)発明者 赤木 貴則
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 塩野 博文
東京都千代田区有楽町一丁目12番1号 株式会社ニコン内

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 特表2011-510309(JP,A)
特表2010-537158(JP,A)
特開2011-106915(JP,A)
特許第2924815(JP,B2)
特開2003-066005(JP,A)
米国特許出願公開第2012/0070858(US,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
G 0 1 N 2 7 / 2 6
G 0 1 N 2 7 / 4 4 7
G 0 1 N 3 7 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)