65 シングルEV並列解析ナノバイオFETの創製

東京農工大学 大学院工学研究院 先端電気電子部門　　田畑　美幸

【研究の背景・目的】がん等の疾患検査を対象としたリキッドバイオプシーでは体液を循環している細胞や核酸がその検出対象となり、近年はmicroRNA（miRNA）とともに、その運搬体である細胞外小胞（Extracellular vesicles : EVs）が注目されている。EVは体液中を循環し豊富に存在していることから、将来のバイオマーカーとして期待されている。現状のEVと疾病との関連性評価はmiRNAやメッセンジャーRNAの配列特異的な蛍光ラベリングによる核酸定量解析法を採用しており、専門の技術および数時間から半日の解析時間を必要とする。そこで本研究では、腫瘍細胞やEVといった生体小胞膜表面の特性に着目し、小型化・簡易測定可能な超高感度リキッドバイオプシープラットフォームの創製を提案し、シリコンナノワイヤ電界効果トランジスタ（SiNW-FET）を試作し、SiNW-FETによる電気化学計測の原理に基づいたEVの検出を実施した。

【方法】EV解析可能なSiNW-FETを試作した。EVの大きさは0.1〜1μmであり、特定の大きさのセンシング領域をSiNWで製作し、配線は電子線レジストで保護した。SiNW-FETのチャネル長、チャネル幅、ウェルの材料、配線の最適化を行い、集積化する際の設計指針を得た。続いて、センサ上へのEV捕捉技術を検討した。EVの脂質二分子膜と脂質プローブとの親和性を利用してSiNW表面に生体小胞を捕捉するため、SiNW表面の機能化を実施した。脂質二分子膜にアンカーリングするオレイル基を、アルキル鎖またはPEG鎖等のスペーサーに結合させ、末端をホスホン酸基で修飾した分子をプローブ分子として用いた。SiNW表面に存在する水酸基とのカップリング反応にて上記脂質プローブをSiNW表面に固定化した。作製したSiNW-FETにてEV溶液の閾値電圧変化を計測した。

【結果と考察】EVは百ナノメートル程度の大きさを持つコロイド粒子であり、ブラウン運動をしている。FETを用いた本計測方式はデバイ長の制限を受けるため、運動しているEVをセンサ表面に捕捉する必要がある。このことから、捕捉分子としてEVの脂質二分子膜にアンカーリングする脂質誘導体を合成した。脂質誘導体の片末端にはセンサ材料である金属酸化物にカップリングするホスホン酸基を導入した。モデル実験として、オレイル誘導体をSiNW-FETの代わりにISFET（Ion-sensitive field effect-transistor）に固定化してEVを捕捉し、抗原マーカーCD105の発現に由来する酵素反応を計測した。基質の濃度増加に従って出力電位は増加した。これは酵素反応の結果生じたpH変化を計測しているため、抗原がISFET表面に存在することを示しており、オレイル誘導体がEV捕捉分子として機能していることが確認された。正常ヒト乳腺細胞MCF10Aとヒト乳線がん細胞MDA-MB231の細胞培養上清から超遠心法によりEVを回収し、そのゼータ電位を測定した。MCF10AとMDA-MB231由来EVのゼータ電位はそれぞれ−11.1 mVと−12.5 mVであり、がん細胞由来EVsの方が負に帯電していた。一般的に正常細胞と比較してがん細胞は糖鎖を過剰に発現していることが知られており、生理環境下では糖鎖の水酸基が解離してがん細胞の方が負の電位を呈していることが分かっている。今回計測したEVのゼータ電位計測結果は由来細胞の膜特性を反映していると考えられる。調製したEV溶液についてSiNW-FETにて閾値電圧を計測した結果、80 mV程度正の方向にシフトすることが分かり、EVの表面電荷特性や濃度がSiNW-FETの電気特性を大きく変化させることが分かった。この特性変化のメカニズムについては、ゼータ電位が明らかなモデル粒子を使い、詳細に検討していく予定である。SiNW-FETを用いたEVのデジタルカウンティングの目標達成に向けて、センサ上の保護膜ポケットにEVを集め、集めたEVをオレイル誘導体で捕捉して計測することを継続して検討している。個々のトランジスタ特性をバックゲート計測にて評価することで、閾値電圧のシフトを捉えるバイオセンサとして利用可能であることが分かりつつある。細胞とEVの関係性についても未解明な部分が多いが、膜タンパク質発現量の観点から新たな解釈を与えることが可能となる。

【発表】

1）　2025年1月　Mate2025、口頭発表　萌芽研究賞受賞

2）　2025年3月　生体医歯工学共同研究拠点成果報告会、ポスター発表