

2011/8070A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

リガンド固定化マイクロデバイスによる

循環がん細胞診断デバイスの開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 馬原 淳

平成24（2012）年 4月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

第 3 次対がん総合戦略研究事業

リガンド固定化マイクロデバイスによる

循環がん細胞診断デバイスの開発

平成 2 3 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 馬原 淳

平成 2 4 (2 0 1 2) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
リガンド固定化マイクロデバイスによる循環がん細胞 診断デバイスの開発	----- 1
馬原 淳	
II. 分担研究報告	
1. リガンド固定化分子の設計と界面における 非特異吸着・細胞ローリング挙動の解析	----- 9
馬原 淳	
2. マイクロ流路の構造設計と細胞ローリングの観察	----- 23
山岡 哲二	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 35

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

リガンド固定化マイクロデバイスによる循環がん細胞診断デバイスの開発

研究代表者 馬原 淳

国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部

研究要旨 がんは、血中にがん細胞が漏出し他の組織に定着して転移巣を形成する。1998年、University of Texas Southwestern Medical Center のUhrグループは、血中にあるCD44陰性、Cytokeratin陽性の細胞をフローサイトメトリーで評価することで、転移性がんの早期発見、病状の診断、予後判定に有効であることを報告した。本研究課題では、このような血中に漏出したがん細胞を高感度で検出するための手法として、細胞ローリングを応用した循環がん細胞診断デバイスを製作し、転移がんに対する新たな細胞診断技術の確立を目指す。

分担研究者：山岡 哲二
国立循環器病研究センター研究所
生体医工学部・部長

A. 研究目的

がん転移というイベントは、がん患者の生存率や、治療方針に対して大きな影響を与えるにも関わらず、がん転移に関わることが知られている循環がん細胞 (Circulating Tumor Cell; CTC) の検出は極めて難しい。細胞に関わる基礎研究の進展により、がんに関わる細胞の同定や、転移のメカニズムが多く議論されている。特に、1998年、University of Texas Southwestern Medical Center のUhrらのグループは、血中にあるCD44陰性、Cytokeratin陽性の細胞をフローサイトメトリーで検出し評価するこ

とにより、転移がんの早期発見、病状の診断、予後判定において極めて有用であることを報告した。しかしながら、血中に存在するがん細胞 (循環がん細胞 (Circulating Tumor Cell; CTC)) は、 10^9 個のうち1個程度の割合でしか存在せず、血中における半減期が3時間程度であることが知られている。このため、微量な血液サンプルから転移がんを効率良く検出するためには、細胞表面マーカー特異的に、マイクロ流路系で細胞を診断できるデバイスの開発が望まれている。

これまでに我々を含む研究グループは、細胞ローリング現象と呼ばれる細胞表面マーカーとその発現密度に対して特異的に誘起される細胞の回転運動を利用して細胞を分離する細胞ローリングカラムを開発し、その有

効性について報告してきた。これは、細胞表面に提示されているマーカー分子に対するリガンドを固相表面へ固定化して、リン酸緩衝液等の液体による液流で細胞を流すことで、細胞表面とリガンドが吸脱着反応を繰り返す、細胞が回転運動する。この回転速度は、細胞表面マーカーの種類のみならず、その発現密度にも依存していることをこれまでに明らかとした。この現象は、血管内における白血球ローリング現象としても知られており、炎症部位付近で内皮細胞表面に発現するマーカー分子に従って、白血球が集積する。申請者は、この細胞ローリング現象を転移がんの細胞診断技術へと応用できる可能性に着想した。すなわち、天然の血管内部においても CTC は内皮細胞や他の組織と相互作用し定着した箇所では細胞が浸潤し新たながんの転移巣を形成する。この原理に基づいて CTC 細胞を診断することができれば、転移にかかわるイベントを人工的に模倣した環境で、転移する可能性のあるがん細胞を直接診断できるのではないかと考えられる。

そこで本研究では、これまでに開発した細胞ローリングシステムの基礎原理に基づいて、血中に存在する循環がん細胞 (Circulating Tumor Cell; CTC) を高感度で検出可能なマイクロデバイスの作製を目指す。検出の高感度化には、非特異的な反応を抑制し細胞の表面マーカー特異的にターゲット細胞を識別できるデバイスの界面分子構造や流路設計が必要になって

くる。そこで、本プロジェクトの初年度である 23 年度では、リガンドを固定化するための種々のガラス界面の設計と、ラジオアイソトープを用いた非特異吸着反応と固定化リガンドの定量をした。さらに、少量の検体でも分析できるような流路として、ガラス基板に 100 μm 程度の大きさをもつマイクロ流路を加工し、細胞懸濁液から微量の検体を分析流路へと流すことが可能なマイクロチャネルも設計した。さらに、作成している流路に対して合成したポリマーによりリガンドを固定化し、モデル細胞を用いた細胞ローリング挙動を観察することで、現在の流路設計ならびにリガンド固定化法において、細胞ローリングの誘起やその検出の可能性についても検討した。これまでの検討では、本年度までに作製した分子やデバイスを用いることで、細胞の非特異吸着を抑制し、特異的な細胞ローリング挙動を誘起することに成功している。このような成果を基に、次年度以降では、CTC 検査用のコントロール細胞を用いた検出精度の評価や、この結果のフィードバックにより界面におけるリガンド固定化法やその密度の再検討につなげ、より診断精度の高いデバイスを開発していく。以下に本年度検討した実験項目の方法と結果についての概要を記述する。

B. 研究方法

1. ガラス界面に対するスルホプロピルベタインのグラフト重合

ガラス界面に対してシランカップリング剤により開始剤である Br を導入し、その後、スルホプロピルベタインモノマーを臭化銅 (I)、ビピリジン存在下で、脱酸素条件により 37°C の条件下で原子移動ラジカル重合反応 (ATRP) により反応させた。その後、リガンドとなる抗体を導入するために、活性化エステルを有するビニルモノマーを同様に ATRP により反応させた。界面に対するグラフト重合の評価法として、X 線光電子分光法 (XPS) ならびに水接触角測定により評価した。また、コントロールとして、界面に対してポリアクリル酸のグラフト鎖を導入したものも作製し、比較検討した。

2. MPC-BMA-NVA ポリマーの合成

新たなベタインポリマーとして、脂質イオン基をもつ 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) と疎水鎖を持つメタクリル酸 *n*-ブチル(*n*BMA)、そして *N*-ビニルホルムアミド(NVFA)のランダム共重合体を開始剤アゾビスイソブチロニトリル (AIBN) によりラジカル重合した。再沈殿によりモノマーを除去した後に、2 N の塩酸溶液を添加することで NVFA の側鎖を加水分解して、アミノ基を導入した。合成したポリマーはサイズ排除クロマトグラフィー (GPC)、NMR により評価した。合成したポリマーを MPC-BMA-NVA としてガラス界面に対するリガンド固定化材料として以下の実験で用いた。

3. 新規合成ポリマーによるガラス界面へのコーティング条件の検討

リン酸緩衝液に溶解させた MPC-BMA-NVA ポリマーに対して、UV オゾン洗浄したガラスを浸漬し、24 時間静置した。その後、30 分乾燥させた後に、再び MPC-BMA-NVA 溶液へ浸漬してガラス界面へコーティングした。水接触角および XPS により界面に対するコーティング効果を評価した。また、NVA の導入率が異なるポリマーのコーティングや、1 N NaOH 溶液による洗浄後の変化などから、ガラス界面における吸着量を検討した。

4. ラジオアイソトープを用いたガラス界面へのタンパク非特異吸着量ならびにリガンド固定化量の定量

界面に対して微量なタンパク質の非特異吸着やリガンド固定化料を定量するために、ラジオアイソトープを用いたタンパク質定量化実験をおこなった。クロラミン T 法により I^{125} で標識した抗体を、種々の方法により修飾されたガラス界面に対して滴下し、室温あるいは 37°C でインキュベーションを行った後に、PBS で洗浄し、界面に吸着しているタンパク質吸着量を γ カウンターにより計測した。

5. ガラスキャピラリーによるガラス界面における細胞ローリング挙動の観察

種々の合成高分子により表面を修飾したガラスキャピラリー (内径 0.5mm, 長さ 10cm) を用いて、顕微鏡

下で高速度カメラにより細胞の流れの様子をモニターした。得られた画像の解析により細胞のローリング速度、界面に対する非特異吸着について評価した。

6. マイクロ流路におけるリガンド固定化と細胞ローリング挙動の解析

汎用のフローチャンバーに MPC-BMA-NVA ポリマー溶液を加えて室温でインキュベートすることで、界面にポリマーの修飾をした。その後、抗 CD90 抗体を反応させて実験に用いた。細胞は、ラット脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた。フローチャンバー内に細胞懸濁液 (2×10^4 cells/ml) を注入し、高速度カメラにより細胞が流れる様子を記録し、コンピュータによりローリング速度を定量した。

7. スライドガラスを用いたマイクロ流路デバイスの作製と細胞ローリングの観察

マイクロ流路を作製するためには、ガラスを用いる方が化学的安定性や、物質の非特異吸着性も抑制できる。そこで、スライドガラスに対して幅 300 μ m、深さ 150 μ m の交差する流路を作製した。さらに、z 軸方向への加工精度をもつフェムト秒レーザーを装備した加工装置によりスライドガラスに対して任意のサイズ、形状の流路作成条件について検討を開始した。

C. 研究結果

各項目における結果の概要を記述

する。詳細については、分担研究報告書において記述する。

1. ガラス界面に対するスルホプロピルベタインのグラフト重合

界面へのグラフト重合については XPS 解析ならびに水接触角測定により確認された。さらに、ガラス界面に対するポリアクリル酸の重合についても、染色法により確認できたことから、本実験によりガラス表面に対するグラフト重合条件を確立する事ができた。作製したガラスキャピラリーを用いて以後の実験の検討を進めた。

2. MPC-BMA-NVA ポリマーの合成

モノマーの精製方法や、サンプル調整時の脱気法などを改良することで、ラジカル重合により MPC-BMA-NVA からなるポリマーを重合できる条件を見出した。また、GPC による分子量の解析結果より 28kDa 程度のポリマーを得ることができた。また、通常のラジカル重合であったにも関わらず分子量分布は狭い特性を示している。MPC:BMA:NVA のモル比が 30:59:1、30:59:0.5、30:59:0.1 のポリマーをすでに合成した。今後、固定化リガンド量の定量や非特異吸着の抑制について詳細に調べるため、さまざまな組成比をもつポリマーの合成反応を進める。作製したいずれのポリマーを用いた場合でもガラス界面への吸着能を認め、タンパクの非特異吸着抑制効果も確認できた。

3. 新規合成ポリマーによるガラス界面へのコーティング条件の検討

ガラス基板をポリマー溶液に浸漬することにより、有意な接触角の増加が示された。これは、ガラス界面に対してポリマーがコーティングされている結果であると考えられる。しかしながら2回目のコーティングにより接触角の十分な減少が示されていない。設計したポリマーは親水性基である MPC ドメインと疎水性基である BMA ドメインが存在するが、水への浸漬によりガラス相転移によって MPC 層がガラスの表面へ露出する機構が考えられる。今後、コーティング条件（ポリマー濃度、ガラスの乾燥時間、コーティング後の水の浸漬時間）などを最適化することにより、リガンドを高密度で、かつ非特異吸着を完全に抑制できる表面を構築できるものと考えている。

4. ラジオアイソトープを用いたガラス界面へのタンパク非特異吸着量ならびにリガンド固定化量の定量

RI ラベルした抗体を用いてポリマー修飾界面におけるタンパクの非特異吸着を検討した結果、ポリマーの修飾により非特異吸着を 1/10 程度低下させることに成功した。さらに、末端に活性基を有するポリマーに対して抗体を導入することで界面でのタンパク量の増加が認められたことから、ポリマー表面に対してリガンドとなる抗体を共有結合により固定化できたものと考えている。現段階での固定

化法では、MPC-BMA-NVA をコートしたガラス界面において、ファンデルワールス半径から、1/10 の表面が抗体で占有されている密度となる。

5. ガラスキャピラリーによるガラス界面における細胞ローリング挙動の観察

細胞懸濁液を流して、細胞溶出条件下における界面への吸着やローリング挙動を観察した。その結果、スルホプロピルベタインでガラス界面を修飾したガラスキャピラリーでは、細胞が界面に吸着することなく流れている様子が観察された。さらに、抗体を界面に導入することで、細胞がローリングしていた。しかし、ガラスキャピラリー界面にアクリル酸を導入した場合には、非特異吸着が観察されている。また、MPC-BMA-NVA で修飾した界面では、スルホプロピルベタイン導入の場合と同様の結果であった。この様なことから、界面の分子構造は細胞ローリングでの非特異吸着を低下させることが示された。また、流速などのコントロールにより固定化リガンド特異的なローリングの誘起もコントロールできることが判明した。

6. マイクロ流路におけるリガンド固定化と細胞ローリング挙動の解析

ガラスキャピラリーを用いた場合には、顕微鏡下での細胞の観察が困難である。明確に細胞を追跡するためには、界面が平坦であることが望ましい。市販のフローチャンバーを用いた場

合では、細胞の挙動がより明確に追跡でき、細胞診断用のローリング速度解析デバイスにおいて最適であった。また、このフローチャンバーにおいても MPC-BMA-NVA によるコーティングによりリガンドを固定化でき、細胞ローリングを観察することができた。

7. スライドガラスを用いたマイクロ流路デバイスの作製と細胞ローリングの観察

マイクロチップによる細胞診断デバイスで重要な点は、界面に固定化したリガンド分子の分子認識能のみならず、リガンド固定化流路へ一定量のサンプルをインジェクトする機構を設計することである。この課題に対して、直行に交差する流路を設計して、サンプルが循環する流路から一定量だけ分析流路へと液体を誘導する機構を設計した。詳細については、分担研究報告書に記載しているが、直行型の流路設計によりこれまでコントロールが極めて困難であった数 nL のサンプル量を精密ポンプにより制御することが可能となった。今後、フェムト秒レーザー加工装置によりさまざまな流路を作製し、分析精度を向上させるためのマイクロチップの構造について検討を進める予定である。

D. 考察

リガンドを固定化する分子については、ベタイン構造をもつことによりタンパクの非特異吸着を効率良く抑制できることが見出された。特に、MPC-BMA-NVA からなるポリマーはマイクロ流路のような微小な構造をもつ内部においてもコーティングすることで固定化でき、実用的なコーティング方法であると考えている。しかしながら、固定化抗体量の密度は、表面積の 1/10 程度にとどまっており、今後条件の最適化により種々の固定密度を調製できるような条件を検討する。

マイクロ流路の形状については、現段階において、深さ 150 μm 程度の流路が良いのではないかと考えている。用いる細胞の 1 回分析当りの細胞数にも依存するが、高密度な細胞を分析流路に流すことで、細胞がローリングできる界面を維持できなくなり、分析精度が減少する可能性がある。流路幅などの変更と同時に、微小流路内に流れる液の流れを検討し、ローリングに最適な形状を検討する必要がある。23 年度の実験により、マイクロ流路を用いた細胞診断デバイスの基礎的構造ならびにリガンド固定化の分子設計がほぼ達成されたものと考えている。

E. 結論

本申請プロジェクトの初年度である 23 年度においては、申請書において計画していた研究項目をほぼ予定通りに実行することができた。特に、ガラス界面に対して非特異吸着を抑制

できるポリマー分子の設計や合成条件の確立は、次年度以降の実験において非常に重要になる。さらに、ガラスをもちたマイクロチップのプロトタイプ作製にも着手できた。流路の幅や深さ、長さなどについては今後十分に検討する必要があるが、100 μm 程度の深さをもつマイクロ流路の構造が細胞ローリングや検体を連続的に検査する上で必要ではないかという感触を得ている。ラジオアイソトープを用いた固定化抗体量の定量プロトコルや、高速度カメラによるローリング速度の定量化など今後の診断デバイス開発において必要となる要素を確立できたのではないかと考えている。条件の最適化や詳細な定量結果などを考慮して、最終的な目的である CTC 検査用のマイクロチップの創成につなげていく予定である。

F. 健康危険情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

G. 研究発表

1. 発表論文

1) Yamaoka T., Mahara A., Cell rolling column in purification and differentiation analysis of stem cells, *Reactive & Functional Polymers* 2011, **71**:362-366.

2) Mahara A., Kiick LK, and Yamaoka T., Three-dimensional culture and differentiation of stem

cells in elastin-like polypeptide hydrogels, *ICBS2011*, 2011:313-314.

2. 学会発表

1) 馬原 淳、山岡哲二, Novel cell rolling column for stem cell separation, 1st International congress on Advanced Materilas 2011 (中国济南) (2011) [国際学会 口頭発表]

2) 馬原 淳、カルロス アグデロ、北野 博巳、山岡 哲二, 抗体固定化スルホベタイン界面を用いた細胞分離カラムの応用, 第 60 回 高分子討論会 (岡山) (2011) [国内学会 口頭発表]

3) 馬原 淳, アグデロ カルロス, 北野 博巳, 山岡 哲二, 抗体固定化スルホベタイン界面をもつ細胞分離カラムの開発, 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会 (京都) (2011), [国内学会、口頭発表]

4) A. Mahara, C. Agudelo, H. Kitano and T. Yamaoka, Development of antibody-immobilized interface for cell-rolling column, 15th International Conference on Thin Films, 2011 (京都) (2011) [国際学会、口頭発表]

5) 馬原 淳、山岡 哲二, 細胞分離技術の現状と新展開, 第 28 回医用高分子研究会 (東京) (2011) [国内学

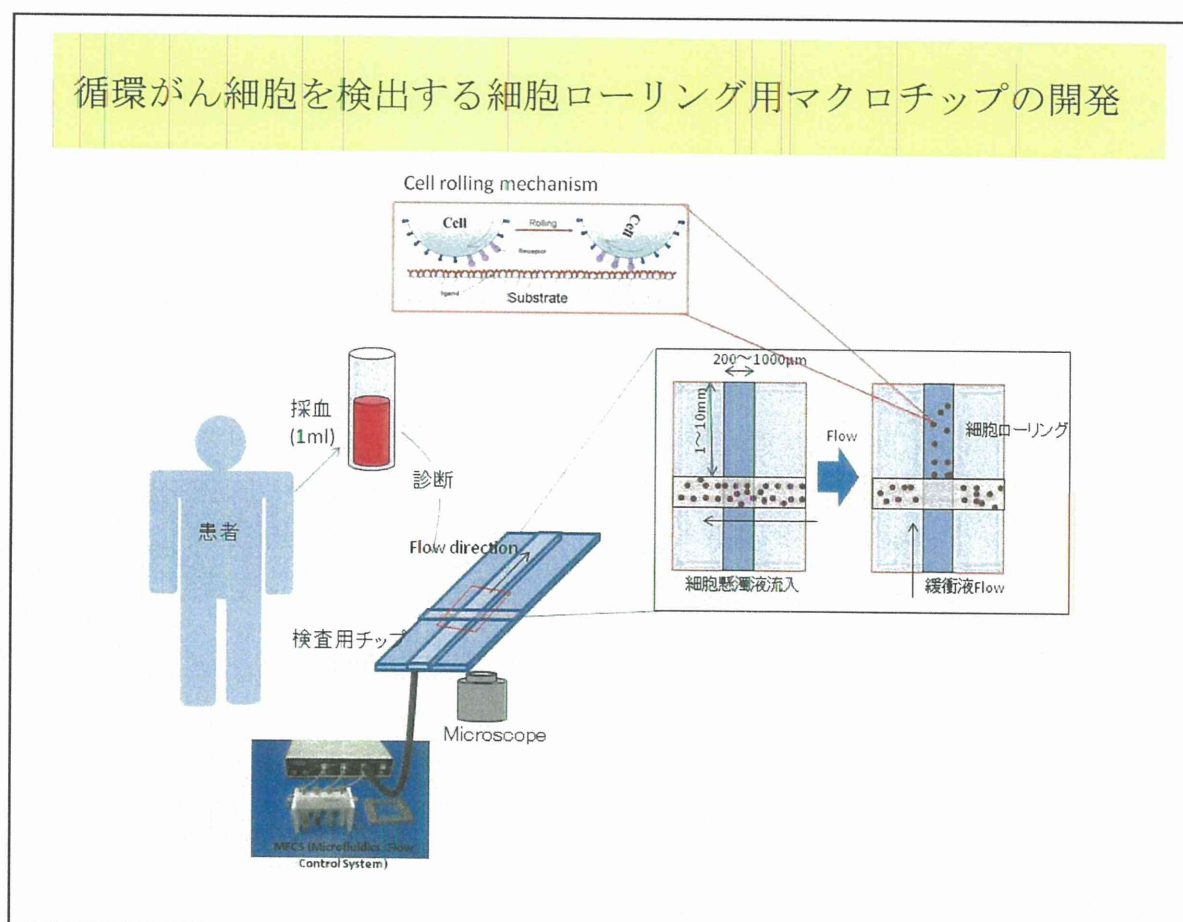
会、口頭発表]

6) A. Mahara, C. Agudelo, H. Kitano, and T. Yamaoka, Sulfopropyl betain surface suppressed the nonspecific cell binding of the cell-rolling column, 第21回日本MRS学術シンポジウム(横浜)(2011)[国内学会、口頭発表]

7) C. Agudero, A. Mahara, H. Kitano, and T. Yamaoka, Design of antibody-immobilized zwitterionic telomere brush surface for stem cell separation system, Termis-NA 2011 (米国)(2011)[国際学会、口頭発表]

8) 山岡哲二, Biomaterials for Stem Cell Transplantation -Cell Purification and Cell Tracking-, 3th Asia Biomaterial Congress (釜山)(2011)[国際学会・口頭発表]

H. 知的財産権の出願・登録情報
該当なし



厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

リガンド固定化分子の設計と界面における
非特異吸着・細胞ローリング挙動の解析

分担研究者 馬原 淳

国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部

研究要旨 本研究プロジェクトでは、細胞ローリングの原理を応用した新たなリガンド固定化マイクロ流路による細胞診断デバイスを作製する。23年度では、タンパクや細胞の非特異吸着を抑制する新たなポリマー分子として、脂質イオン基をもつ 2-methacryloyl- oxyethyl phosphorylcholine (MPC) と疎水鎖であるメタクリル酸 n-ブチル(nBMA)を主鎖にもつポリマーを設計した。合成法の確立ならびにリガンド固定化効率を評価し、マイクロ流路内における特異的なローリング挙動を観察した。

A. 研究目的

細胞ローリングとは、固定化されたリガンドと細胞表面の分子との特異的な相互作用による回転運動である。血中において、白血球は内皮細胞表面に提示される分子によりトラップされ、血流により回転運動し発現密度が高い領域で回転が停止し、目的の部位へと輸送される。これまでに申請者を含む研究グループは、このような生体内での特異的な細胞のローリング現象を模倣した新たな細胞分離カラムを開発してきた。細胞表面のマーカー分子の種類のみならず、その発現密度にも依存してローリング速度が変化することから、細胞をより高精度で分離することが可能となる。本研究プロジェクトでは血中で循環している循環がん細胞（Circulating tumore cell; CTC）をこの原理により検出す

るマイクロチップデバイスを作製している。細胞ローリングカラムの研究においても、検体となる細胞がカラム界面へ非特異的に吸着してしまう現象が見出されている。これは界面におけるリガンドの固定化状態や固定化に使用しているポリマーの分子構造に依存するものであると考えられている。マイクロチップにおいて検出する細胞は血中において 10^9 個に 1~2 固定度という非常に少ない割合であるために、このようなりガンド固定化界面における非特異的な吸着挙動を完全に抑制することが重要である。本研究プロジェクトの初年度では、この細胞の非特異吸着を抑制できるようなりガンド固定化法ならびに固定化分子の設計と合成法の確立を目指した。さらに、新たに合成した分子を用いて固定化できるリガンド密度や、ポ

リマーコーティングによる非特異吸着の抑制効果、さらにはマイクロ流路内におけるリガンド特異的な細胞ローリング挙動について検討した。以下にその詳細について記述する。

B. 研究方法

1. MPC-BMA-NVA ポリマーの合成

脂質イオン基をもつ 2-methacryloyl oxyethyl phosphorylcholine (MPC) と疎水鎖を持つメタクリル酸 *n*-ブチル(*n*BMA)、そして *N*-ビニルホルムアミド(NVFA)のランダム共重合体を作製した (図 1)。MPC, BMA, NVFA の各モノマーをエタノールに溶解し、開始剤アゾビスイソブチロニトリル (AIBN) をモノマーの総モル比に対して 1% 添加して、80°C で 4 時間反応させた。その後、減圧下で溶媒を除去し、ヘキサンとジエチルエーテルを用いて再沈殿により精製した。2N の塩酸により NVFA の側鎖を加水分解することで、ポリマーにアミノ基を導入した。リン酸緩衝液を溶離相として GPC により分子量ならびに分子量分布を測定した。

2. 新規合成ポリマーによるガラス界面へのコーティング条件の検討

加水分解によりアミノ基が導入された MPC-BMA-NVA ポリマーをエタノールに 5mg/ml の濃度で調整し、24 時間 UV オゾンにより洗浄したガラスを浸漬させた。30 分室温により十分に乾燥させた後に、再びポリマー溶液に浸漬して表面コーティングを行った。

その後、洗浄することにより MPC-BMA-NVA によりコーティングしたガラス界面を調製した。表面に対するポリマーの修飾効果を X 線光電子分光法 (XPS) で評価した。さらに、修飾したガラス基板をイオン交換水で一晩浸漬して、その後 60°C で 30 分乾燥させて 2θ 法により水接触角を測定した。

3. ラジオアイソトープを用いたガラス界面へのタンパク非特異吸着量ならびにリガンド固定化量の定量

ガラス界面に対するタンパクの非特異吸着能の検討並びに固定化抗体量を評価するために、ラジオアイソトープを用いて評価した。抗ラット CD90 抗体を 2-メルカプトエチルアミン溶液により 37°C で 1 時間インキュベートして F(ab)'₂ のフラグメントを作製した。サンプルは、Sephadex G25 カラムをもちいて精製し、抗体量は BCA 法により定量した。この抗体を、クロラミン T 法により I¹²⁵ で標識した。この場合も同様に、Sephadex G25 カラムにより抗体を精製した。調製した I¹²⁵ 標識 F(ab)'₂ 抗体をガラス界面へ添加し、37°C でインキュベート後、リン酸緩衝液により洗浄して、界面に吸着している、あるいは固定化されている抗体量を γ カウンターにより定量した。

4. ガラスキャピラリーによるガラス界面における細胞ローリング挙動の観察

山岡哲二分担研究者により作製されたスルホプロピルベタインポリマ

一ならびにポリアクリル酸修飾ガラスキャピラリー（内径 0.5mm, 長さ 10cm）を用いて、顕微鏡下で高速度カメラにより細胞の流れる様子をモニターした。細胞はラットの脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた。ラットの脂肪組織を酵素により処理してメンブレンによりろ過した後に、懸濁液を培養皿へ播種した。接着した細胞を継代し、継代数 3 回までのものを実験で用いた。高速度カメラにより記録されたデータから、ガラス界面に接着している細胞ならびにローリング細胞を評価した。

5. マイクロ流路におけるリガンド固定化と細胞ローリング挙動の解析

汎用のフローチャンバーに対して、MPC-BMA-NVA ポリマーを添加し、室温でインキュベートすることでフローチャンバーに対してポリマーを修飾した。その後、実験 4 と同様に抗 CD90 抗体を反応させて実験に用いた。細胞は、ラット脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた。フローチャンバー内に細胞懸濁液 (2×10^4 cells/ml) を注入し、ローリングしている様子を観察した。

C. 研究結果

1. MPC-BMA-NVA ポリマーの合成

GPC による分子量の測定の結果（表 1）、分子量が 28kDa 程度のポリマーを合成することができた。また、分子量分布も極めて狭いことから、今回確立した合成プロトコルを用いることで安定に目的分子量をもつポリマー

を合成することができる。溶解性試験の結果、このポリマーは、エタノールやリン酸緩衝液に安定に溶解した。モノマーの組成比を制御することで目的とする共重合体の作製を進める。

2. 新規合成ポリマーによるガラス界面へのコーティング条件の検討

ポリマー修飾後のガラス界面における XPS 解析の結果（図 2）、NVA が 0.1 から 10% 含むポリマーいずれの場合でも、C1s に由来するシグナルが観察された。さらに、N1s のピークもガラス界面への修飾によりわずかに増加していた。一方 C1s や N1s のピークの検出とは対照的に、Si2s のピークは、ポリマーの修飾により検出されなかった（表 2）。これらの結果より、ガラス界面に対してポリマーが修飾されていることが示された。

次に、水接触角測定の結果より、MPC-BMA-NVA による修飾前と比較して、接触角の有意な増加が示された（図 3）。また、ポリマーで修飾後さらに水中で十分に浸漬させた結果、NVA の組成比が 1% 以下の場合にのみ接触角の減少が示された。これは、NVA の組成比が高い場合には、界面におけるポリマーの構造転移がなく吸着しているものと考えている。また、NVA の組成比が低い場合、MPC やアミノ基が水界面側へ緩やかな構造転移を示すために、接触角が経時的に減少したものと考えている。さらに、この修飾ガラスを 1N の NaOH 水溶液に浸漬して 1 時間後における接触角を測定した結果、

いずれの MPC-BMA-NVA ポリマーで修飾した場合でも非修飾ガラス界面と同程度の水接触角まで減少した。これは、界面に吸着しているポリマーが分解され洗浄されたものであると考えられることから、ガラス界面に MPC-BMA-NVA 共重合体溶液を浸漬することで、界面へポリマーを修飾できることが示された。

3. ラジオアイソトープを用いたガラス界面へのタンパク非特異吸着量ならびにリガンド固定化量の定量

抗体の SS 結合切断反応ならびに I^{125} ラベル化反応後の精製において、Sephadex G25 カラムを用いることで目的物を精製できた (図 4 (A))。次いで、 I^{125} 標識 F(ab)'₂ 抗体をガラス界面へ滴下した結果、非修飾のガラス界面では、 $7\text{mg}/\text{m}^2$ の抗体が界面へ吸着していた。これは界面に対して多層で抗体が吸着しているものと考えられる。しかし、MPC-BMA-NVA 共重合体により修飾した界面の場合では、抗体の吸着量は 10%以下に減少した。さらに、MPC-BMA-NVA 共重合体の側鎖を活性化エステルにより活性化している場合には、 $0.84\text{mg}/\text{m}^2$ の抗体が検出された。これらの結果より、MPC-BMA-NVA 共重合体の修飾によりガラス界面へのタンパクの非特異吸着を抑制できることが示された。さらに、活性化エステルによりガラス界面へ MPC-BMA-NVA 共重合体を介して抗体を固定化できることが示された。ファンデルワールス半径を考慮すると、表面の 10%程度が

抗体で占有されている密度となる。

4. ガラスキャピラリーによるガラス界面における細胞ローリング挙動の観察

脂肪組織由来間葉系幹細胞をガラスキャピラリーへ流した結果、ポリアクリル酸のグラフト表面においては細胞が界面へ吸着している様子が認められた (図 5 (A))。一方、スルホプロピルベタインにより修飾されたガラスキャピラリーでは、細胞はほとんど界面へ吸着することなく流れる様子が示された。細胞がガラスキャピラリーから溶出した時の溶出量とフラクションをプロットし、それぞれのフラクションにおける細胞ローリング速度を定量化した結果、ローリング速度は溶出時間が遅延するに従って $1.14\text{mm}/\text{sec}$ から $0.1\text{mm}/\text{sec}$ まで減少した。すなわち、ローリング速度が $0.1\text{mm}/\text{sec}$ 程度異なる細胞を分離できる可能性が示唆された。

5. マイクロ流路におけるリガンド固定化と細胞ローリング挙動の解析

MPC-BMA-NVA 共重合体によりマイクロチャンバー内部が修飾された界面を観察した結果、細胞は界面に吸着することなく流れていた。(図 6)。一方、抗体を固定化した界面では流れる速度は大きく減少しローリングしている細胞が多く観察された。すなわち、MPC-BMA-NVA 共重合体により抗体を固定化することにより、その界面で非特異吸着を抑制しながら細胞ローリン

グを誘起できることが示された。

D. 考察

23年度の研究においては、細胞の非特異吸着を抑制し、かつリガンドの固定化により細胞ローリングを効率的に誘起する界面の創成を中心として研究を進めた。これは、血中に存在するわずかな循環がん細胞を検出する上で極めて必要な特性となる。分担研究者とともに、ベタイン構造を基礎骨格とする2種類のポリマーを設計し、その効果についてガラスキャピラリーあるいはマイクロ流路において検討した。スルホプロピルベタインは、タンパク吸着能をおさえて末端のリガンド活性を保持することで知られており、本実験系においてもこのポリマーが細胞ローリング界面として有効に機能していることが示された。また、コーティングにより界面へリガンドが固定化できるMPC-BMA-NVA共重合体も同様に、タンパクの非特異吸着能を抑制することがラジオアイソトープ実験により示された。CTC検出用のマイクロチップを設計する上で、微小な流路系に対して効率的にリガンドを固定化することが重要な要素になる。開発したポリマーにより、マイクロ流路内へのリガンド固定化が可能となり、今後のCTC検出マイクロデバイスの開発において有用であることが期待される。23年度の成果を踏まえて、次年度では、MPC-BMA-NVA共重合体によるリガンド固定化法を中心として、デバイスを設計し検出感度等の検討を進めていく予定である。

E. 結論

23年度の実験計画において予定していたリガンド固定化界面の作製を中心に研究を進めた。MPC-BMA-NVA共重合体によるリガンド固定化法により非特異吸着を抑制しかつ細胞ローリングできる界面を作製することに成功した。今後、固定化抗体量を制御するための種々のMPC-BMA-NVA共重合体の合成を進め、高感度なCTC検出デバイスの構築につなげていく。

F. 健康危険情報

現在までのところ、本研究は人間を対象としたものではないため、健康に対する害は生じない。

G. 研究発表

1. 発表論文

1) Yamaoka T., Mahara A., Cell rolling column in purification and differentiation analysis of stem cells, *Reactive & Functional Polymers* 2011, **71**:362-366.

2) Mahara A., Kiick LK, and Yamaoka T., Three-dimensional culture and differentiation of stem cells in elastin-like polypeptide hydrogels, *ICBS2011*, 2011:313-314.

2. 学会発表

1) 馬原 淳、山岡哲二, Novel cell rolling column for stem cell separation, 1st International congress on Advanced Materilas 2011

(中国济南) (2011) [国際学会 口頭発表]

2) 馬原 淳、カルロス アグデロ、北野 博巳、山岡 哲二, 抗体固定化スルホベタイン界面を用いた細胞分離カラムの応用, 第 60 回 高分子討論会 (岡山) (2011) [国内学会 口頭発表]

3) 馬原 淳, アグデロ カルロス, 北野 博巳, 山岡 哲二, 抗体固定化スルホベタイン界面をもつ細胞分離カラムの開発, 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会 (京都) (2011), [国内学会、口頭発表]

4) A. Mahara, C. Agudelo, H. Kitano and T. Yamaoka, Development of antibody-immobilized interface for cell-rolling column, 15th International Conference on Thin Films, 2011 (京都) (2011) [国際学会、口頭発表]

5) 馬原 淳、山岡 哲二, 細胞分離技術の現状と新展開, 第 28 回医用高分子研究会 (東京) (2011) [国内学会、口頭発表]

6) A. Mahara, C. Agudelo, H. Kitano, and T. Yamaoka, Sulfopropyl betain surface suppressed the nonspecific cell binding of the cell-rolling column, 第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム (横浜) (2011) [国内学会、口頭

発表]

7) C. Agudero, A. Mahara, H. Kitano, and T. Yamaoka, Design of antibody-immobilized zwitterionic telomere brush surface for stem cell separation system, Termis-NA 2011 (米国) (2011) [国際学会、口頭発表]

H. 知的財産権の出願・登録情報
該当なし

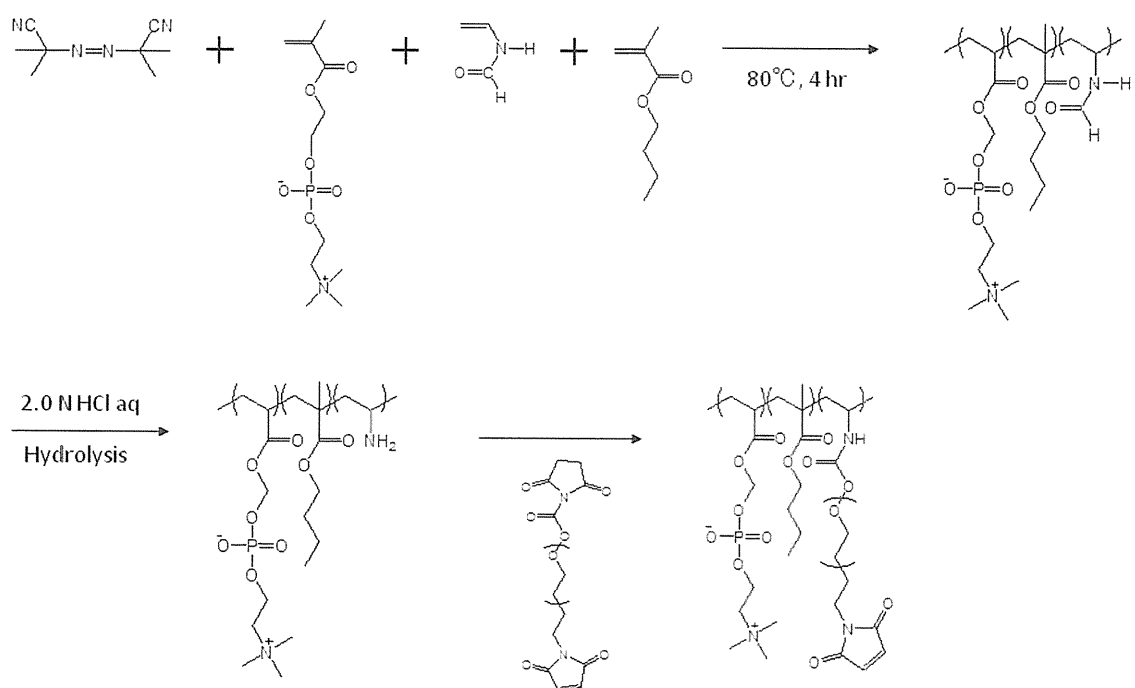


図 1 MPC-nBMA-NVA 共重合体の合成経路

表 1 GPC により測定した MPC-BMA-NVA 共重合体の分子量と分子量分布

MPC:BMA:NVA (mol ratio)	Mn	Mw	Mw/Mn
30:59:1	28717	29004	1.01
30:59.5:0.5	28729	29016	1.01
30:59.9:0.1	28618	28904	1.01

[monomer] = 1.0 molL⁻¹, [AIBN] = 10 mmolL⁻¹, 80°C for 4 hr,
solvent:phosphate buffer (0.2M, pH=6.8)

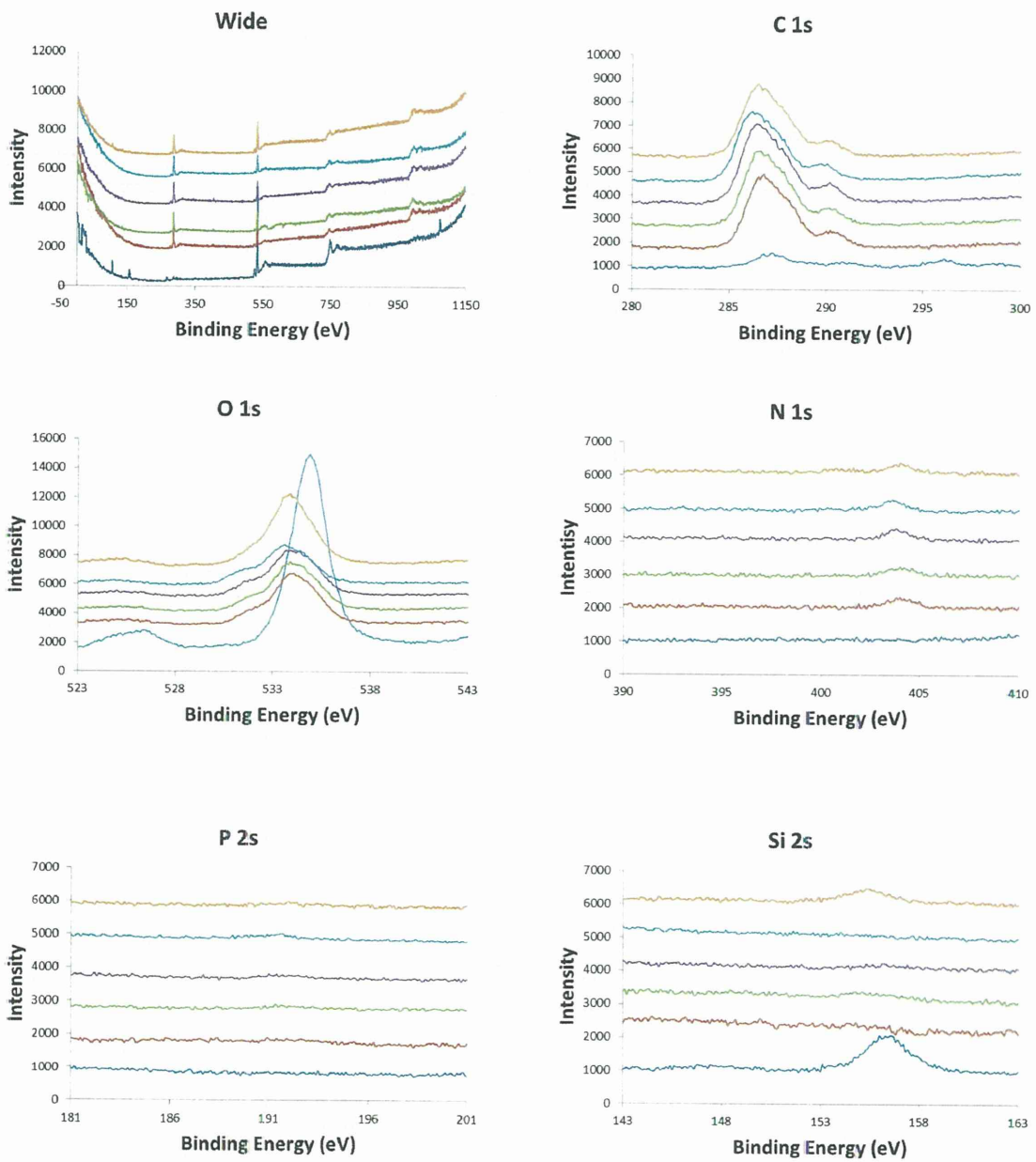


図2 X線光電子分光法により評価した MPC-BMA-NVA 修飾ガラス表面における原子組成