

201220057A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 馬原 淳

平成25（2013）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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 馬原 淳

平成25（2013）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	----- 30
山岡 哲二	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 36
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 38

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 本研究課題は、がんの転移プロセスにかかわるとされている血中に存在する循環がん細胞（Circulating Tumor Cells ; CTC）を診断する新たなマイクロデバイスを開発している。血中に存在する CTC の割合は極めて低いため、高感度で、かつがん転移プロセスに類似した機構において細胞を識別出来れば診断精度の向上のみならず、初期がんの検出に伴う初期治療の対応が可能となる。24年度は、細胞を高感度に検出するためのマイクロデバイスのリガンド固定化法の構築と、マイクロチップの設計・作製による CTC 検出用マイクロチップシステムのプロトタイプ作製を進めた。

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

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 CTC の割合は、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。このような理由から、CTC を検出するためには、高感度なデバイス開発が求められており、特に非特異的な細胞の吸着を抑制する方法は極めて重要な要素となる。

これまでに我々を含む研究グループは、組織中に存在する幹細胞（間葉系幹細胞）を表面マーカーの発現有無とその密度に基づいて細部を分離できる抗体固定化用細胞分離デバイスの開発を進めてきた。これは、リガンドを固定化したチューブ構造をもつ分離カラム内において、溶媒の液流に基づく細胞ローリングにより基材と

A. 研究目的

血中で循環している循環がん細胞（Circulating Tumor Cells ; CTCs）は、がん転移という重大なイベントにかかわっており、がん患者の生存率や、治療方針に対して大きな影響を及ぼす。しかしながら、この循環がん細胞の検出は極めて難しく、その存在割合が極めて低いことが知られている。

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

回転する細胞との連続的な脱着反応のよるものであり、この現象が細胞ローリングと呼ばれている。この回転速度は、固定化されている抗体の密度や結合力、さらには細胞表面に提示されている分子の発現量にも依存する。近年、この精密な分子機構にもとづいて、血中に存在するがん細胞の転移現象が説明され、がん細胞は細胞ローリングにより血管網から特定の部位へと転移する。このような匠な分子機構は、ガン転移プロセスであり、回転速度の変化や細胞の生着ががん転移現象の本質であるという考え方もできる。このような分子メカニズムに着目し、申請者は血中に存在するCTCの検出デバイスへと応用できる可能性に着目して研究を進めている。つまり、CTCが血管内皮や他の組織細胞と細胞ローリングにより相互作用し定着することで細胞が浸潤しがんの転移巣を形成するために、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ている。

本研究プロジェクトでは、我々が開発した細胞ローリングシステムを応用した細胞分離の基礎技術を展開して、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CTC検出デバイスの開発を目指している。CTC検出デバイスにおいては、細胞を高感度で識別することが最も重要な課題となるた

めに、初年度である平成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。また、ガラスキャピラリーを用いて作製したリガンド固定化剤による細胞ローリング挙動の評価も進めると同時に、マイクロチップを作製するためのレーザー加工技術の検討なども進めてきた。

このような初年度の検討を踏まえ、2年目となる平成24年度では、リガンド固定化ポリマーコーティング剤の分子構造の最適化と細胞ローリングの観察をした。汎用のマイクロチップを用いて種々のポリマーコーティング剤を用いた時のローリング細胞、フローティング細胞、非特異吸着細胞を定量的に解析することで、細胞ローリングに適したリガンド固定化剤をスクリーニングした。さらに、マイクロチップの流路構造の検討として、定量的に検体となる細胞懸濁液を一定量、検出用流路へとインジェクト出来るような流路構造ならびにポンプシステムを用いて、CTC検出用マイクロチップシステムのプロトタイプを構築した。このプロトタイプを用いてモデル細胞となる白血病由来の血球細胞の細胞ローリングの定量や流路構造の検証を進め、最終年度に向けた基盤技術の構築を進めた。

B. 研究方法

1. 種々の組成をもつ MPC-BMA-NVA ポリマーの合成

ベタイン構造をもつ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により作製した。ジエチルエーテルによる再沈殿によりモノマーを除去後、乾燥を経て MPC-*n*BMA-NVFA からなるランダム共重合体を得た。次いで、2 N の塩酸溶液を添加することで NVFA の側鎖を加水分解することにより、側鎖に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。

2. 汎用のマイクロ流路を用いた細胞ローリング効率の定量

汎用のマイクロ流路チップをシリンジポンプに接続し、細胞ローリング効率の定量用装置を構築した。マイクロチップ内にリン酸緩衝液で溶解させた MPC- BMA-NVA ポリマーを加えて、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 溶液へ浸漬して界面へコーティングした。すでに水接触角および XPS により界面に対するコーティング効果を評価している。MPC:*n*BMA:NVF の組成比が 30:60:10 (MPC 含有量 =

22.8%) ならびに、40:50:10 (MPC 含有量 = 36%) を作製し、リガンドとなる抗体を固定化するためのポリエチレングリコールリンカーを側鎖のアミノ基に対して 1、0.5、0 mol 当量、となるように加えることで、6 種の界面コーティング条件を作製した。この流路に対して、脂肪由来間葉系幹細胞 (継代数 3-7 代) のものをインジェクトし、ローリング細胞数を高速度カメラにより定量した。用いた固定化抗体は、antiCD90 抗体であり、間葉系幹細胞において発現していることは既に FACS により認めている。

3. マイクロ流路構造の設計と作製

効率的に細胞ローリングを誘起できるような流路幅、検体となる細胞懸濁液をサンプルポートから容易にコンピュータ制御により検査用流路へとインジェクト出来るような流路構造について検討し、マイクロ流路を設計した。流路幅は検体となる細胞のつまりなどを防止するために 300 μ m の幅として、サンプル用の流路と検査用の流路を交差させポンプの加圧によりインジェクトをコントロールするシステムとした。

4. ガラス界面に対する MPC-BMA-NVA ポリマーの界面固定化の検討

3) で設計した新たなマイクロ流路にガラス界面に対するリガンド固定化ポリマーを最適化するために、MPC:*n*BMA のモル比を 30:60 と固定し、それに対して NVF を 10, 5, 1, 0.5, 0.1,

0mol 当量反応させたランダム共重合体を作製した。合成した分子量ならびに分子量分布は GPC により評価した。また、組成については NMR により評価した。接触角測定によりガラス界面に対するポリマーのコーティング効果について評価した。NaOH 水溶液による洗浄によって、コーティングの確認をした。さらに、X 線光電子分光法によって界面に固定化されている分子の構造を確認した。

5. ガラス製の CTC 検査用マイクロ流路内での細胞ローリング挙動の観察とメカニズムの検証

ガラス製のマイクロチップ内部においてローリングしている細胞を高速度カメラによって追跡しモニターした。これによって、細胞ローリング時の形状変化などからガラス界面において細胞自身が回転運動しているかどうかについて直接観察を試みた。

6. CTC 検査用マイクロチップシステムのプロトタイプを用いたモデル細胞のローリング速度解析

化学的安定性や、物質の非特異吸着性も抑制できるガラス製のマイクロ流路に対して、(幅 $300\ \mu\text{m}$ 、深さ $150\ \mu\text{m}$ の交差流路)、ポリマーをコーティングし、antiCD34 抗体を固定化した。次いで、モデル細胞として、KG-1a (CD34 陽性) と、HL60 (CD34 陰性) 細胞を用いて、流路内で細胞ローリング速度をコンピュータ上で定量した。

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. 種々の組成をもつ MPC-BMA-NVA ポリマーの合成

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) を用いて合成した。組成比として、MPC:*n*BMA:NVF = 30:60:10 ならびに 40:50:10 を合成した。MPC の含有率として、22.8% と 36.0% に相当する。これらの 2 種のポリマーに対して、サクシイミドとマレイミド基を両末端にもつポリエチレングリコールリンカー (NHS-PEG-Mal) を側鎖のアミノ基に対して 1, 0.5, 0mol 当量添加して反応させ、還元化した抗体を添加することで、6 種類の構造をもつリガンド固定化界面を構築できた。このような種々のポリマーにより、MPC の導入効果のみならず、リガンド固定化密度も同時に制御することが出来るため、これらの因子に対する細胞ローリング挙動について検討することが可能となった。

2. 汎用のマイクロ流路を用いた細胞ローリング効率の定量

汎用のマイクロ流路チップを用いて、細胞懸濁液を連続的に流した時に

流路内にある「ローリング細胞」、「フローティング細胞」、「界面に吸着した細胞」を高速カメラによって識別して定量化した。その結果、リガンドの固定化の有無によりローリング細胞数が有意に増加していることが確認できた。さらに、ポリマーコーティングされていない界面では、ローリング細胞は見られず、フローティングしているか、あるいは非特異的に界面へ接着している細胞が認められた。このような検討から MPC による非特異吸着抑制効果や、リガンドの固定効果による細胞ローリングを確認できた。一方で、市販の流路サイズでは細胞に対する流路幅が大きく、フローティング細胞数が半分程度であったことも問題点として見出されている。

3. マイクロ流路構造の設計と作製

細胞ローリングを一定量の細胞検体において観察するためには、一定量の細胞をマイクロ流路内へ誘導することが必要である。このような問題に対して交差型の流路構造を設計し、圧力で液体の微量な液体をコントロールできるポンプシステムを接続した。交差型構造を持つことでその部分の体積の細胞がマニピレートできる。このような構造を基礎骨格として設計すれば、必要な液体量を正確に細胞ローリング検査用流路へと導入することが可能であり、このような構造の設計は、今後のマイクロチップ設計においても極めて汎用性が高いものである。

4. ガラス界面に対する MPC-BMA-NVA ポリマーの界面固定化の検討

設計した新たなガラス製マイクロチップ界面に対するリガンド固定化剤として、MPC:nBMA の組成は 30:60 と固定し、NVF の組成を 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0 mol 当量とすることで、側鎖のアミノ基導入率が様々になるコーティング剤を設計することができた。また、GPC 測定の結果、分子量は約 $3.2 \sim 6.5 \times 10^4$ であり、分子量分布も 1.1 ~ 1.3 程度と、極めて狭い分布であることから均一なポリマーを合成することに成功している。このような均一なコーティング剤を用いることで、精密にリガンド導入率をコントロールすることができ、また MPC の組成比も安定することで非特異的な細胞の吸着抑制に繋がるものと期待できる。

次に、このポリマーをガラス界面へ固定化し、接触角の変化を測定した結果、いずれも 3 倍から 4 倍程度の接触角の増加が示されている。また、いずれの接触角の増加も、NaOH 溶液によって完全に剥離することができ、コーティングしたポリマーを剥離しマイクロチップを再生させる条件の検討もできた。X 線光電子分光法においても界面にポリマーが固定化できていることを認めており、接触角のデータも含め、コーティングのキャラクタライゼーションを完了することができた。

5. ガラス製の CTC 検査用マイクロ流路内での細胞ローリング挙動の観察とメカニズムの検証

ガラス製のマイクロチップ内に antiCD34 抗体を固定化し、KG-1a (CD34 陽性) 細胞を流路のスイッチングにより導入し、高速度カメラにより細胞ローリングの様子を追跡した。その結果、細胞がガラス界面において構造を少し歪ませながら回転運動している様子を直接モニターすることができた。このような回転運動の直接的な観察からも、マイクロチップ内部において細胞ローリングを誘起していることを証明することができた。

6. CTC 検査用マイクロチップシステムのプロトタイプを用いたモデル細胞のローリング速度解析

作製したガラス製マイクロチップ内部に、MPC-nBMA-NVA のコーティングを介して、anti-CD34 抗体を固定化した界面を作製した。この界面に対して、KG-1a 細胞ならびに HL-60 細胞をインジェクトして、細胞ローリング速度を定量した結果、抗体固定化量の増加に伴って、ローリング速度の差は大きくなり、最大で $10 \mu\text{m}/\text{sec}$ 程度の差を示した。具体的には、KG-1a 細胞において $40 \mu\text{m}/\text{sec}$ であるのに大して、表面マーカーを発現していない HL-60 細胞では平均速度が $50 \mu\text{m}/\text{sec}$ となり有意な差が示された。また、交差流路から、一定の細胞懸濁液を一定量、検査流路へと誘導できることも確認できており、今後このマイクロチップシステム

の系を用いて、CTC 検査用の標準サンプルの検査精度を検討する。

D. 考察

MPC を基礎骨格として、リガンド固定化用の種々のランダム共重合体を検討した。MPC フラグメントの含有率が 20-30%程度含むことで、ガラス界面へのポリマーコーティング効果ならびに、細胞の非特異吸着抑制効果に関して有意に低下させられることが示された。また、リガンドの固定化に用いた 1 2 量体の PEG リンカーを用いることで、抗体の配向性を界面から内部方向へとコントロールできているものと考えている。これは PEG の水和能が高いために、抗体の疎水基部分を界面から遠ざける効果が働いたものではないかと考察している。また、細胞ローリング効果については、いずれの条件でもローリングの誘起に繋がっており、リガンド固定化率にのみ依存する傾向であった。つまり、MPC の組成をある程度自由に設計できるために、今回作製したポリマーは細胞の非特異吸着の抑制と、細胞ローリング誘起の為のリガンド固定という点で優れた分子であると考えている。

交差型のマイクロチップ構造をもつ CTC 検出用マイクロチップシステムについては、交差流路構造により細胞懸濁液を一定量インジェクトすることが可能となった。従来までのマイクロチップシステムでは、微小な機械的な細胞懸濁液のインジェクト機構を有しているが、そのような構造では、

検体となる血液のクロスコンタミネーションの危険性が高い。本システムでは、検体となる細胞懸濁液のインジェクト機構をチップ内部にシンプルな機構において制御できるために、CTC 検査においてもコンタミネーションの危険性も少なく、1 検体ごとに1 枚のチップをつかうことで簡便に、かつ安定に診断できるシステムになりうるものと考えている。また、細胞ローリング挙動については、先述したポリマーコーティングと併用することで極めてよいローリング条件を達成できており、今後、最終年度に予定しているプロトタイプシステムを用いた検査精度の検証実験において有効に機能するものと考えている。

E. 結論

本申請プロジェクトの2 年目である2 4 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予定通りに実施しており、初年度で得られた実験成果を基に、リガンドを効率的に固定化するためのポリマー分子を設計することができた。またこのポリマー分子をマイクロチップにおいて評価することもでき、細胞ローリングに最適な分子構造を見出すところまで至っている。さらに、本申請プロジェクトにおいて新たに設計した交差型マイクロ流路では、検体となる細胞懸濁液をスムーズに検査用流路へと誘導でき、コンピュータ制御型の圧力変動型の液流コントロールユニットによってこのような微量液体の制御が達成

された。プログラミングすることで、液体の動きも制御することができるために、汎用性に優れた検査装置としての検討も視野に入る。今後、最終年度では、米国 FDA において既に臨床で用いられている CTC 検査装置の標準サンプルを用いて、新たに設計した本システムのプロトタイプにおいて、どの程度の検査精度が達成できるのか検討を進めていく必要がある。さらに、ボランティアなどの血液検体を入手することにより、検査装置の臨床における実用性についても、検討を進めていくことも重要な問題であり、このような課題を通して、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) Chen H., Mahara, A., Carlos A., Ishihara K., Yamaoka T., Efficient cell rolling for adipose derived stem cell purification on antibody-immobilized microfluidic chamber with amphiphilic phospholipid polymer coating, submitted
- 2) Chen H., Mahara, A., Carlos A., Ishihara K., Yamaoka T., Vertical crossed micro-chamber for cell rolling column to lead definite cell

rolling, in preparation.

2. 学会発表

1) Hao CHEN, Atsushi MAHARA, Carlos AGUDELO, Hiromi KITANO, Tetsuji YAMAOKA, Development of cell rolling column modified with betain polymers,第6 2回高分子討論会(名古屋)(2012)「国内学会、口頭発表」

2) Atsushi MAHARA, Kristi L KIICK, Tetsuji YAMAOKA, Elastin-like polypeptide hydrogel for vascular tissue reconstruction based on the guided-tissue regeneration, ACS fall meeting (Philadelphia, USA) (2012)「海外学会、ポスター発表」

3) 馬原淳、再生医療の実用化を目指した循環器疾患に対する新たな医療デバイスの開発、北陸先端科学技術大学院大学 藤本研究室セミナー(石川)(2012)「国内講演、口頭発表」

4) 馬原淳、ソフト界面の構築に基づく新たな医療デバイスの開発～細胞分離カラムと小口径人工血管の開発、ソフトインターフェースの分子科学 武田研・吉本研 Joint Seminar 2012(東京)(2012)「国内講演、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。24年度では、これまでの研究成果を基にして細胞の非特異吸着を抑制する 2-methacryloyloxyethyl 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合成し、汎用マイクロチップにおいて細胞ローリング挙動を検討した。さらに、交差型の流路構造をもつマイクロチップも設計し、CTC 検査用システムを構築する基礎技術を構築した。

A. 研究目的

細胞表面の分子と固定化されているリガンドとの連続的な相互作用によって誘起される細胞ローリングは、高い分子認識能と精密な相互作用によって回転速度を維持している。生体内では、血管内皮細胞によって提示される分子が固定化リガンドとなり、血球表面の分子との相互作用によって炎症部位付近へリクルーティングされる。このような生体内の分子間相互作用を模倣することが、細胞ローリングの効率的な誘起に繋がるものと考えられる。平成23年度までにベタイン構造をもつポリマーをリガンド固定化分子の候補として検討を続けてきた。これは、細胞表面もリン脂質2重膜でありベタイン構造である。このような分子は細胞と外界とを効率的

に分けて、提示するタンパク分子認識能を妨げない。平成23年度から引き続き、MPCポリマーを基礎骨格としたランダム共重合体を作製し、その組成が細胞ローリングや細胞の非特異吸着抑制能に与える影響について検討を進めた。本プロジェクトでは、血中に存在している微量な細胞、循環がん細胞 (Circulating Tumor Cells; CTCs) をターゲットとしているため、検出感度の向上や精度の確保のためにも、細胞の非特異吸着などの感度低下となる因子を完全に除去する必要がある。このような観点から、本年度では、種々の組成をもつ MPC-nBMA-NVF ポリマーを作製して、汎用のマイクロチップにより細胞ローリングを誘起するのに有効なコーティング剤について検討した。さらに、細胞ローリン

グによる CTC の検査を達成するマイクロチップとして、流路が交差している構造を設計し、一定量の検体を検査用流路へと誘導できるようなシステムの構築を進めた。以下にその詳細について記述する。

B. 研究方法

1. 種々の組成をもつ MPC-BMA-NVA ポリマーの合成

2-methacryloyl- oxyethyl phosphorylcholine (MPC) と疎水鎖を持つメタクリル酸 n-ブチル(nBMA)、そして N-ビニルホルムアミド(NVFA) のランダム共重合体をラジカル重合により合成した。開始剤として、アゾビスイソブチロニトリル (AIBN) を用いた。いずれのモノマーもエタノールに溶解し、アルゴンバブリングにより脱酸素化した。その後、この混合溶液を 60°C で 6 時間反応させた。反応後、溶液を冷却し溶媒をエバポレートすることにより反応を停止させた。得られたポリマーをヘキサノールとジエチルエーテルにより再沈殿し、減圧乾燥により目的物を得た。ポリマーの組成比として、MPC:nBMA:NVF = 30:60:10 ならびに 40:50:10 を合成した。MPC の含有率として、22.8% と 36% に相当する。その後、NVF の側鎖を加水分解するために、2N の塩酸溶液を加えて、室温でオーバーナイトインキュベートした。その後、セルロースの透析膜にて精製した。

作製したこれらの 2 種のポリマーに対して、サクシイミドとマレイミド

基を両末端にもつポリエチレングリコールリンカー (NHS-PEG₁₂-Mal) を側鎖のアミノ基に対して 1, 0.5, 0mol 当量添加して反応させ、還元化した抗体を添加することで、6 種類の構造をもつリガンド固定化界面を構築できた。

抗体の還元化法として、antiCD90 抗体を用いた。2-メルカプトエチルアミンを添加して、37°C で 90 分インキュベートした後に、PD-10 カラムにて分離・精製した。一般的な BCA 法に従って、タンパク濃度を決定し、PEG リンカーにより活性化されたポリマーと反応させた。

2. 汎用のマイクロ流路を用いた細胞ローリング効率の定量

汎用のマイクロ流路チップ (Model ib80501; ibidi GmbH, Martinsried, Germany) の流路に対して、0.1mg/mL の濃度で調整したポリマー溶液を加えて 5 分インキュベートして、流路界面にポリマーをコートした。洗浄後さらに、同様の手法でポリマー溶液を添加してポリマーをコートした。次いで、還元処理された antiCD90 抗体をポリマーでコートした流路内へと導入し、室温で 1 時間インキュベートした。その後未反応の抗体をリン酸緩衝液により洗浄して、抗体固定化流路を作製した。MPC:nBMA:NVF の組成比が 30:60:10 (MPC 含有量=22.8%) ならびに、40:50:10 (MPC 含有量=36%) を作製し、リガンドとなる抗体を固定化するためのポリエチレングリコールリ

ンカーを側鎖のアミノ基に対して1、0.5、0mol 当量、となるように加えることで、6種の界面コーティング条件を用いた。

細胞ローリングの実験において用いる細胞として、ラットの脂肪組織由来の間葉系幹細胞を用いた。ラット (SD rat, 7week) の腹部脂肪組織を採取し、コラゲナーゼによって処理し濾過後、接着細胞培養皿へ播種して培養した (培養液: α -MEM, 10%FBS)。その後、接着した細胞分画のみを培養した。表面マーカーの発現はフローサイトメトリー (FACScaliber, BD) により検討した。作製した流路に対して、脂肪由来間葉系幹細胞 (継代数3-7代) をディスポーザブルシリンジによりインジェクト (3.0×10^3 cells/ μ L) し、シリンジポンプからリン酸緩衝液を流速 30μ l/min の速度でチャンバーへ流し、その時のローリング細胞数を高速度カメラ (EM-CCD デジタルカメラ; Hamamatsu フォトニクス; Shizuoka, JAPAN) により定量した。

3. マイクロ流路構造の設計と作製

細胞ローリングをマイクロチップで安定に誘導するためには、一定量の検体となる細胞懸濁液を検査用流路へ流す必要がある。この条件を達成するために、幅 300μ m、深さ 150μ m のサイズをもつ流路を交差させた構造をもつチップを設計した。検体を一定の速度で循環させておく流路に対して、直交する形で検査用の流路を配置する。これにより、液の流れ方向をス

イッチすることにより、流路が交差している箇所の細胞懸濁液が検査用の流路へとインジェクトされる。また、検査用の流路長さとして 23cm の長さをもたせた。これは細胞懸濁液がインジェクトされてから、ローリングするための必要距離として設定してある。また、流路サイズが極めて小さいため、液の流速を一定にコントロールすることは極めて重要である。そこで、加圧式のポンプシステム (FLOWWELL and MFCS システム (FLUIGENT, Paris, France)) を用いて流速をコントロールした。

4. ガラス界面に対する MPC-BMA-NVA ポリマーの界面固定化の検討

交差型流路をもつガラス製マイクロチップ界面に対するリガンド固定化剤として、MPC:nBMA の組成を 30:60 としたポリマーを用いた。NVF の組成を 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0 mol 当量となるように種々のポリマーを作製した。ポリマーの合成に関しては、NMR および GPC により評価した。ガラス界面に対するポリマーの修飾効果の検討として、水接触角測定、X線光電子分光法により検討した。

C. 研究結果

1. 種々の組成をもつ MPC-BMA-NVA ポリマーの合成

図 1 に MPC-BMA-NVA の合成スキームを示す。また、合成後の NMR チャートを図 2 に示した。メタノール溶媒により AIBN を開始剤として合成することで、目的とする組成をもつ共重合体を合成することができた。また、塩酸による加水分解後においても、NMR チャートより、ポリマー主鎖の分解は認められず、側鎖のアミノ基を導入することができた。このプロトコールによって目的とするポリマーを合成することができた。

MPC:nBMA:NVF = 30:60:10 ならびに 40:50:10 を図 1 の合成スキームに従って作製し、MPC の含有率として、22.8%と 36%に相当する共重合体を作製した。これらの 2 種のポリマーに対して、サクシイミドとマレイミド基を両末端にもつ 1 2 量体のポリエチレングリコールリンカー (NHS-PEG-Mal) を側鎖のアミノ基に対して 1, 0.5, 0mol 当量添加して反応させ、還元化した抗体を添加することで、6 種類の構造をもつリガンド固定化界面を構築している (Table 1)。このような種々のポリマーにより、MPC の導入効果のみならず、リガンド固定化密度も同時に制御することが出来るため、これらの因子に対する細胞ローリング挙動について検討することが可能となった。

2. 汎用のマイクロ流路を用いた細胞ローリング効率の定量

市販のマイクロチップを用いて (図 3)、流路内に Table 1 に従って界面を構築した。この界面をもつマイクロチップを用いて、図 3 のようなシステムにより、細胞懸濁液を連続的に流した時に流路内にある「ローリング細胞」、「フローティング細胞」、「界面に吸着した細胞」を高速度カメラによって識別して定量化した (図 4)。Table 2 には、定量した細胞の速度について示している。その結果、リガンドの固定化の有無によりローリング細胞数が有意に増加していることが確認できた。さらに、ポリマーコーティングされていない界面では、ローリング細胞は見られず、フローティングしているか、あるいは非特異的に界面へ接着している細胞が認められた。しかし、市販の流路サイズでは細胞サイズと比較して流路幅が極めて大きく、フローティング細胞数が半分程度であったことも問題点として見出されている。

このような検討から MPC による非特異吸着抑制効果や、リガンドの固定効果による細胞ローリングを確認できた。また、流路サイズに関してはもう少し幅や深さを小さくしたサイズを用いることで、細胞ローリングをする割合を向上させる可能性が見られている。このような市販の細胞ローリング解析の結果に基づいて、CTC 検出用のマイクロチップの流路サイズや、その形状について検討を進めていく必

要がある。また、サンプル4とサンプル5の条件で作製した界面においては、図5で示すように、抗体の密度によってローリング速度の有意な減少が示された。これは、固定化されている密度が増加することで、細胞表面とその相互作用するリガンド-レセプター数が増加し、これにより速度が減少したものと考えている。このような傾向から、一定のリガンド固定化密度界面において、種々の細胞のローリング速度を定量することで、細胞表面レセプターに応じたローリング速度の違いを定量できる可能性を示唆しているものと考えている。

3. マイクロ流路構造の設計と作製

市販のマイクロチップを用いた予備実験から、マイクロチップのサイズが及ぼすローリング効率の影響について検討することができた。そこで、マイクロ流路幅を $300\ \mu\text{m}$ 、深さ $150\ \mu\text{m}$ のサイズとした。これにより、細胞がリガンド固定化界面に対して一定に相互作用できる確率が向上し、効率的な分析につながるものと考えられる(図6、7)。また、細胞ローリングを一定量の細胞検体において観察するためには、一定量の細胞をマイクロ流路内へ誘導することが必要である。このような問題に対して交差型の流路構造を設計し、圧力で液体の微量な液体をコントロールできるポンプシステムを接続した。交差型構造を持つことでその部分の体積の細胞がマニピレートできる(図6)。このよ

うな構造を基礎骨格として設計すれば、必要な液体量を正確に細胞ローリング検査用流路へと導入することが可能となる。また検体となる細胞懸濁液を循環させておいて、1回目の分析終了と同時に、再びコンピュータの圧切り替えにより、検体分析流路へと細胞懸濁液を導入することができる(図7)。コンピュータにより圧の変化と、カメラでの取り込みなどをプログラミングすることで、分析プロトコルを一定にしてCTCの解析につなげることが出来る。

4. ガラス界面に対する MPC-BMA-NVA ポリマーの界面固定化の検討

設計したガラス製マイクロチップに対するリガンド固定化剤として、MPC:nBMAの組成は30:60と固定し、NVFの組成を10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0 mol当量とすることで、側鎖のアミノ基導入率が異なるコーティング剤を設計した。Table 3には、合成したポリマーの組成、GPCにより測定した分子量と分子量分布、NMRより決定したMPCの組成比を示している。分子量は $3\text{--}7 \times 10^4$ 程度となり、固定化するために十分な分子量であった。また分子量分布は極めて狭い幅をもっており、均一なポリマーが合成できたものと考えている。また、MPCドメインの含有率も、20-40%程度のポリマーが合成できており、非特異吸着の抑制には十分な組成比であると考えている。

次に、このポリマーをガラス界面へ固定化し、接触角の変化を測定した結

果(図9)、修飾前では20度程度であったのに対して、修飾後60-80度まで増加した。またその後NaOH水溶液にて洗浄した結果、10度以下まで接触角が減少した。つまり、コーティングしたポリマー層を洗浄により再利用できることを示している。次いで、X線光電子分光法によりコーティングされたポリマーの組成について評価した(図10)。カーボンを基準として、酸素、窒素、リン、シリコンのピークを測定した結果、いずれもポリマーに由来する値を示した(Table 4)。以上の結果より、構築したプロトコルによってガラス界面にポリマーをコーティングできることが示された。

D. 考察

24年度においては、細胞の非特異吸着を抑制できる組成をもつコーティング剤の合成と、市販のマイクロ流路を用いて定量的なローリング細胞の解析を中心に研究を進めた。MPCセグメントをもつポリマーを設計することで、細胞ローリングにおいて界面への非特異吸着をほぼ完全に抑制でき、またリガンドにより細胞ローリングを効率的に誘起していることが明らかとなった。このような特性は、検体となる血液サンプルから微量のCTCを高感度で検出するためには極めて重要な特性であり、このような問題を達成できたことは、プロジェクトを遂行する上で重要な結果であると考えている。また、定量的な細胞ローリング効率も、算出できたことから、マイク

ロチップの流路サイズなどを設計する上で有用な情報となった。

今後、リガンドを固定化するためのコーティング剤についてはこのポリマーを今後用いていく。また、ガラス製のマイクロ流路を用いた実験系とともに、リガンド固定化密度などの向上が必要な場合は、NVFドメインが多いようなポリマー設計など、フィードバックして検討を進めていく予定である。

E. 結論

平成24年度は、リガンドを固定化するための固定化剤の設計と市販の流路を用いた実験を中心に進めた。定量的な解析も終わり、最終年度に向けたCTC検出デバイスの構築へとつなげていく。

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) Chen H., Mahara, A., Carlos A., Ishihara K., Yamaoka T., Efficient cell rolling for adipose derived stem cell purification on antibody-immobilized microfluidic chamber with amphiphilic phospholipid polymer coating, submitted

2) Chen H., Mahara, A., Carlos A., Ishihara K., Yamaoka T., Vertical crossed micro-chamber for cell rolling column to lead definite cell rolling, in preparation.

2. 学会発表

1) Hao CHEN, Atsushi MAHARA, Carlos AGUDELO, Hiromi KITANO, Tetsuji YAMAOKA, Development of cell rolling column modified with betain polymers,第62回高分子討論会(名古屋)(2012)「国内学会、口頭発表」

3) Atsushi MAHARA, Kristi L KIICK, Tetsuji YAMAOKA, Elastin-like polypeptide hydrogel for vascular tissue reconstruction based on the guided-tissue regeneration, ACS fall meeting (Philadelphia, USA) (2012)「海外学会、ポスター発表」

2) 馬原淳、再生医療の実用化を目指した循環器疾患に対する新たな医療デバイスの開発、北陸先端科学技術大学院大学 藤本研究室セミナー(石川)(2012)「国内講演、口頭発表」

3) 馬原淳、ソフト界面の構築に基づく新たな医療デバイスの開発～細胞分離カラムと小口径人工血管の開発、ソフトインターフェースの分子科学 武田研・吉本研 Joint Seminar 2012(東京)(2012)「国内講演、口頭発表」

H. 知的財産権の出願・登録情報
該当なし

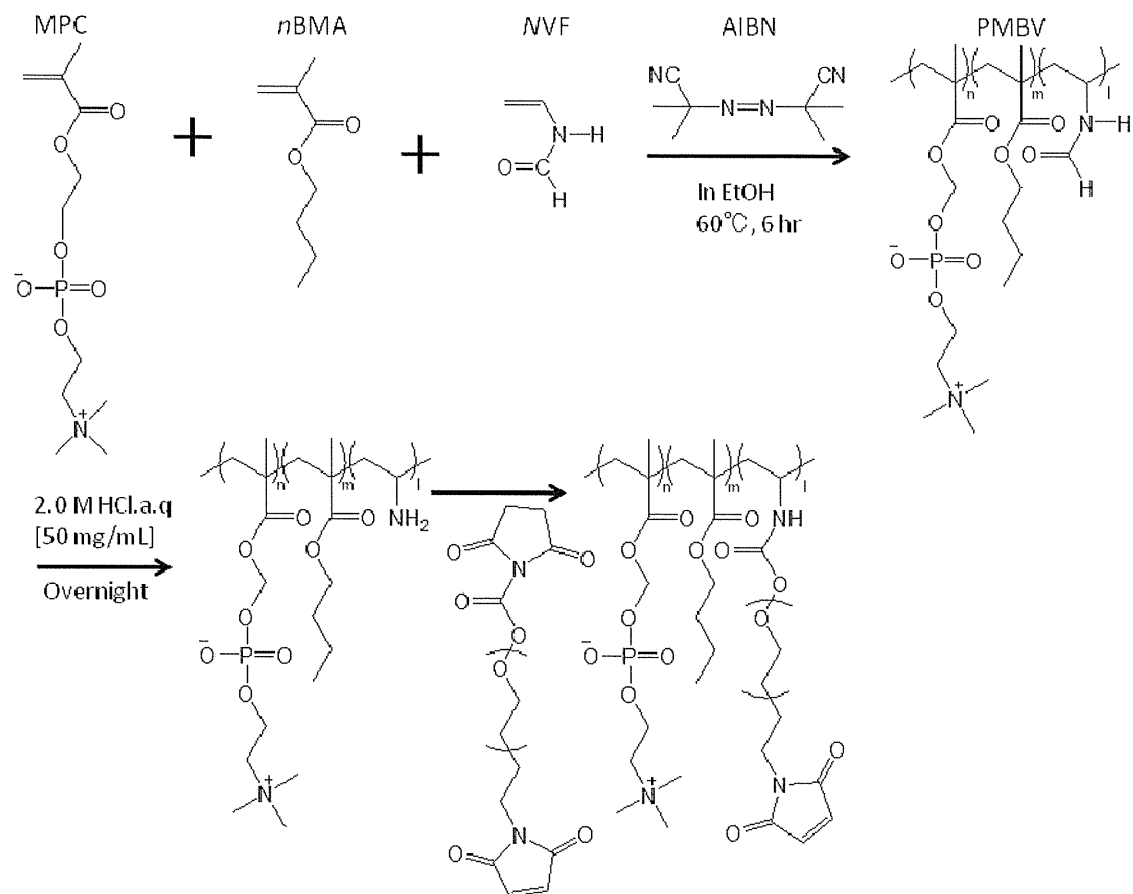


図1 MPC-BMA-NVA ポリマーの合成経路 [Monomer]=1.0m, [AIBN]=10m

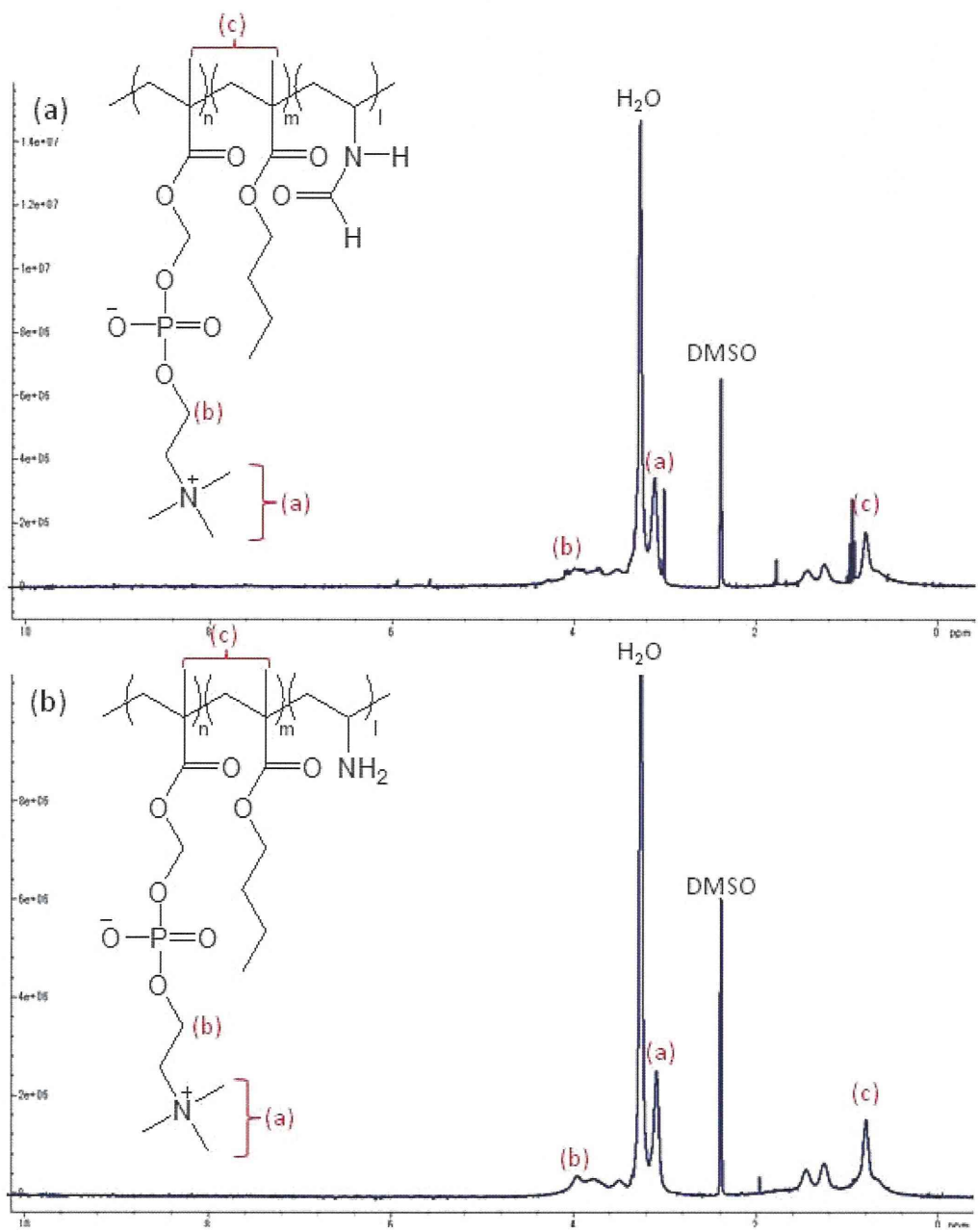


図2 合成した(A) MPC-BMA-NVF, (B) MPC-BMA-NVA の NMR チャート