

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16320

研究課題名(和文) 血中循環腫瘍細胞センシングを行うマイクロ流体デバイスの開発

研究課題名(英文) Fabrication of a microfluidic device for circulating tumor cell sensing

研究代表者

田畑 美幸 (TABATA, Miyuki)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・テニユアトラック助教

研究者番号：00636839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、電界効果トランジスタの原理を用いた超高感度電位計測バイオセンサにより血中循環腫瘍細胞(Circulating Tumor Cells: CTC)の検出と核酸解析を行う小型・可搬型デバイスの創製に関する研究を行うことを目的とした。プローブ分子を固定化した表面を用いてCTCモデルの乳がん上皮細胞をセンサに固定化し、電気計測を行った。がん細胞はシアル酸に由来する負電荷を有するため、腫瘍細胞表面のシアル酸発現量の違いに伴い、がん細胞と上皮細胞を電氣的に識別することに成功した。その中に含まれる核酸の解析を行うことにより、がんの早期診断デバイスの創製を目指した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we performed to fabricate a compact and portable device that detect circulating tumor cells (CTC) and analyze nucleic acids using ultra-sensitive biosensor based-on the principle of field effect transistors (FETs). Model breast cancer epithelial cells were immobilized on the sensor which the probe molecules were immobilized, and then electrical measurement was performed. Because cancer cells have a negative charge derived from sialic acids, we succeeded in electrically discriminating cancer cells and epithelial cells according to the difference in the amount of sialic acid expression on cell membrane. Furthermore, we tried to develop an early diagnosis device for cancer by analyzing the nucleic acid.

研究分野：バイオセンサ

キーワード：バイオセンサ 血中循環腫瘍細胞

### 1. 研究開始当初の背景

CTC とは、原発腫瘍組織から遊離し血管内に侵入した細胞のことであり、わが国の死因第一位である悪性新生物つまり悪性腫瘍の遠隔臓器への転移の主要因である。血管内へ浸潤するがん細胞の大半は自己免疫系により死滅するが、ごく一部は CTC として血液内を循環し標的臓器の毛細血管でトラップされ、基底膜を破壊して血管外へ遊出し、転移巣を形成すると考えられている。近年では、血液中の CTC の解析ががんの病態予測において有用だと認識されており、転移性乳がん、転移性結腸直腸がん、転移性前立腺がんにおける予後予測のバイオマーカーとしての有用性が示されている[1] - [4]。血液 10 mL あたりに、赤血球や白血球といった血球細胞は 10<sup>7</sup>-10<sup>10</sup> 個のオーダーで存在するのにに対し CTC は数から数百個程度しか存在せず、一般的な遠心分離法で分画化することは困難である。しかしながら、米国食品医薬品局 (FDA) により 7.5 mL の血液中の CTC 計数検査による予後予測が臨床検査として承認されており、CTC を計測することと並行したがん診断やステージングが検討されている。血球細胞から CTC を分離する技術としては、CTC 細胞膜表面上に発現している細胞接着分子である Epithelial Cell Adhesion Molecule: EpCAM を捕捉する抗 EpCAM 抗体を利用したイムノアフィニティ、また CTC が血球細胞より大きいことを利用したサイズによるフィルタリングが挙げられる。これらの原理を利用した CTC 分離分析装置は既に製品化されているが (例えば CellSearch<sup>®</sup>R (Veridex 社))、装置や検査費用が高額であり、分離後の CTC の特性解析には不向きであるなどの課題が指摘されており、これらの製品に代わる新たな検出原理を有する分離検出デバイスが求められている。

[1] M. Cristofanilli et al., N. Engl. J. Med., 2004, 351, 781-791

[2] M. Cristofanilli et al., J. Clin. Oncol., 2005, 23, 1420-1430

[3] S. J. Cohen et al., J. Clin. Oncol., 2008, 26, 3213-3221

[4] J.S. de Bono et al., Clin. Cancer Res., 2008, 14, 6302-6309

### 2. 研究の目的

本研究では、電界効果トランジスタの原理を用いた超高感度電位計測バイオセンサにより血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cells: CTC) の分離検出と核酸解析を行う小型・可搬型デバイスの創製に関する研究を行うことを目的とした。具体的には、プローブ分子を固定化した表面を用いて CTC モデルの乳がん上皮細胞を固定化し、がん細胞に由来するシアル酸負の電荷を有するため、腫瘍細胞表面のシアル酸発現量の違い及びその中に含まれる核酸の解析を行うことにより、がんの早期診断デバイスの創製を目指す

とともに、CTC に関する新たな生理機能探究を実現するデバイス作製に取り組んだ。

### 3. 研究の方法

本研究では、FET とマイクロサイズのセンサを利用した CTC の分離検出デバイスの構成を確立し、CTC の分離検出とその核酸解析を行う評価系の創製について提案する。電気化学的な計測法は非標識で蛍光ラベル等を必要としないため光学的検出装置が不要である他、半導体技術を駆使してセンサ部を高度に集積化できることから、システムの小型化・高感度化に有利である。FET 延長ゲート表面で CTC を高 S/N に検出するために、1) CTC の直径と同程度の電極を有するマイクロセンサの設計・製作、2) プローブ分子固定化ゲート表面の構築、3) 核酸の増幅と検出を行うバイオセンサの作製を実施した。その後得られた結果をフィードバックし、ゲート表面に捕捉した CTC を融解し、放出された核酸を電気的に簡易解析してがんの原発部位などの情報を得るため 3) 核酸の増幅と検出を行うバイオセンサの作製を行った。

### 4. 研究成果

1) CTC の直径と同程度の電極を有するマイクロセンサの設計・製作

小型バイオセンサシステムの構築のために、センシングエリアの最適化を実施した。具体的には、単一細胞を捕捉し (Fig. 1) 分子認識を行うセンサの構築を行った。

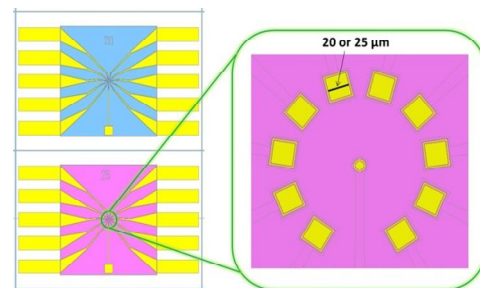


Fig. 1 センサのデザイン

早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構の微細加工施設を使用させて頂き、ゲート材料は Au とし、20 または 25 μm の大きさの電極構造をガラス基板上にパターン化した。電極部分の大きさは SiO<sub>2</sub> で規格化し、絶縁層として SU-8 を用いた。本バイオセンサは水系にて用いるため、SU-8 の抜けを三電極系のインピーダンス測定にて確認し、プロセスへとフィードバックを繰り返した。

実施年度 2 年目にプロトタイプが出来上がり、評価用マイクロチップの作製に成功した。

2) プローブ分子固定化ゲート表面の構築

ターゲットであるヒト乳がん細胞の

MDA-MB-231 (MM231) および正常ヒト乳腺細胞の MCF-10A に関して、ゼータ電位を計測したところ、MM231 に関してより負の電荷を有していることがわかり、正常乳腺細胞との違いは 1 mV 程度であることが明らかとなった。また、 $10^7$  cells あたりの細胞表面のシアル酸発現量を定量したところ MM231 では  $5.12 \text{ nmol}/10^7 \text{ cells}$  という値が得られたことに対して MCF10A では検出に有効な数字が得られなかった。これらの結果から両者のシアル酸発現量の違いがゼータ電位の違いをもたらしていることを見出した。

バイオセンシングにおいて、延長ゲート型 FET センサ表面の機能化および最適化は、高い信号/雑音 (S/N) 比を実現する上で欠かせない。シアル酸由来の負電荷により変化する界面電位すなわちがん組織の有無を、電位差として判断するためプローブ分子の検討を行った。Fig. 2 には用いた Au パターン化電極 (直径 0.5  $\mu\text{m}$ 、10 チャンネル計測) と、構築した機能性界面の例としてフェニルボロン酸 (PBA) 誘導体を固定化したイメージを示した。

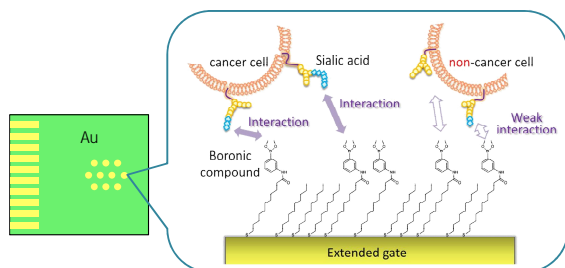


Fig. 2 Au 基板とフェニルボロン酸固定化界面

他に細胞架橋剤として知られる脂質二分子膜にアンカリングするオレイル基を有しておりリンカーとして疎水性のアルキル鎖を持つ場合 (C6\_Oleyl) と親水性の PEG を持つ場合 (PEG\_Oleyl)、コントロールとして修飾していない金電極 (bare) の 4 種の界面について、MM231 および MCF10A との相互作用を電位計測にて確認した。測定には 1 mM Bis-tris-propane (BTP) buffer (pH =7.2) を用いて細胞懸濁液を調製し、連続して BTP buffer 10 min、0 cells/mL in BTP buffer 10 min、 $1 \times 10^4$  cells/mL in BTP buffer 10 min、 $1 \times 10^5$  cells/mL in BTP buffer 10 min、 $1 \times 10^6$  cells/mL in BTP buffer 10 min の順で電位モニタリングした。どちらの細胞の場合においても bare の場合はドリフトに大きく影響された挙動を示し、Oleyl 基で修飾した界面は細胞に応答を示さなかった。一方で PBA 修飾界面の場合、細胞の添加に応じた応答を示し、MM231 において MCF10A より多く存在しているシアル酸由来の負電荷を検出可能であることが分かった。

引き続き上記で最適化した機能化界面構築条件を、1)の項で作製したマイクロセンサに適用し、電位計測実験を行った。1)では 20  $\mu\text{m}$  と 25  $\mu\text{m}$  の二種類の大きさを有するマイ

クロセンサを作製したが、細胞の平均の大きさが 15  $\mu\text{m}$  であったことに由来して、25  $\mu\text{m}$  のセンサの方がより正確に機能し、がん細胞を電気的に見分けることが可能だということを見出した。

### 3)核酸の増幅と検出を行うバイオセンサの作製

核酸を定量的に検出する技術開発は現在でも活発に検討されており、一般的にリアルタイム PCR が遺伝病や感染症検査の有用な診断ツールとして用いられている。しかし PCR 法は正確な温度制御装置や蛍光ラベリングによる光学的検出装置が必要であり小型化に不利である。光学的検出が主流である一方で、高感度検出を実現することから電気化学的な核酸定量技術も注目されており、半導体技術を駆使することによりセンサを高度に集積化した電気化学的アプローチもなされている。核酸定量技術は核酸の抽出・増幅・検出といった 3 つのステップから構成され、近年ではサーマルサイクラーを必要としない等温核酸増幅法が盛んに研究されている。半導体は温度変化により電気特性が著しく変化する性質を持っているため、低消費電力化とともに測定中に生じる電位不安定性、ノイズの低減が課題とされている。そこで、電位安定性向上およびデバイスの小型化・低コスト化を目指し、等温核酸増幅反応と電気化学計測を組み合わせた、定量核酸検出デバイスの開発を試みた。

等温核酸増幅法には Primer-generation rolling circle amplification (PG-RCA) を利用した。PG-RCA の特徴は phi29 polymerase により、室温に近い 30°C 付近で strand displacement タイプの増幅を行うことにあり、サーマルサイクラーが不要なので、デバイスの小型化に有利である。環状 DNA プローブと DNA 合成酵素・制限酵素により合成物が指数関数的に増幅する反応であり、target DNA は既知の配列のものを用いている。まずは直線的な RCA が進行した後、DNA 制限酵素の働きにより新たに複数の primer が生じ、理論的には増幅の原料となる dNTP が枯渇するまで指数関数的な増幅反応を行う。増幅の進行を確認する従来法として、SYBR Green を用いた蛍光リアルタイムモニタリングを行ったところ、target DNA の濃度に依存して増幅速度は増加することを確認した。一方で、核酸増幅反応のリアルタイム検出を実現するため、増幅反応産物としてピロリン酸とともに放出されるプロトンを選択した電位計測を試みた。プロトン感応材料としてはイリジウムオキサイドを選択し、熱酸化法により作製し、参照電極と一体化した微小電極システムを構築した。横軸に pH、縦軸にポテンシャルを取ったグラフを作製し感度を評価したところ 57.4 mV/pH という傾きが得られ、Nernst の式から考えると室温での理論値が -59.2 mV/pH であるため、pH 感度の良いシ

ステムが構築できた。target DNA の濃度を 0 (Negative control), 10 pM, 100 pM, 1 nM と設定し PG-RCA の電位計測を行った結果、target DNA 濃度に依存して電位の振る舞いに大きな違いがみられた。通常 PCR 法が 1 時間以上の反応時間を要するのに対し、本方式を用いると開始から数 10 分後には定量解析を実現できる可能性を見出した。

がんマーカーの検出によるがん検査の現状は、擬陽性・擬陰性が多く、まだ理想的な検査とはいえ、より高感度、高精度な検査を可能にするセンシングデバイスが求められている。本研究で得られた基盤技術は、がんの早期診断や予後診断への展開が見込まれるだけでなく、ポイントオブケアを目指した医療システムのイノベーションにつなげていくことが可能である。エレクトロニクスと医療・生命科学分野の融合という観点において特徴的である本研究は、一見対称的な学問領域の技術・概念を融合しており、国中の技術開発が向かっている Society 5.0 と同一の方向を向いている。未来型医療、先生医療、AI 医療という言葉が使われているが、本センサは幅広い未来型医療に貢献していくと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Miyuki Tabata, Yurika Katayama, Fahmida Mannan, Ayaka Seichi, Koji Suzuki, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, "Label-free and Electrochemical Detection of Nucleic Acids Based on Isothermal Amplification in Combination with Solid-state pH Sensor", *Procedia Eng.*, 2016, 168, 419-422. DOI: 10.1016/j.proeng.2016.11.534. (査読有)

〔学会発表〕(計 23 件)

田畑美幸, 合田達郎, 松元亮, 宮原裕二, 吉岡祐亮, 落谷孝広, パターン化 Ir/IrOx センサの作製とリキッドバイオブシーへの応用, 平成 29 年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会, 東京工業大学すずかけ台キャンパス(東京都町田市), 2018 年 3 月 9 日

田畑美幸, 吉岡祐亮, 合田達郎, 松元亮, 落谷孝広, 宮原裕二, リキッドバイオブシーを指向した microRNA 定量検出デバイス, 第 2 回 Liquid Biopsy 研究会, 京王プラザホテル(東京新宿区), 2018 年 1 月 20 日

Miyuki Tabata, Electrical detection of nucleic acid amplification for point-of-care

testing, 4th Joint Symposium between IBB/TMDU and Chulalongkorn University on Biomedical Materials and Engineering, Bangkok, Thailand, January 12, 2018

田畑美幸, 第 34 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム・参加報告(バイオ), 有機機能材料のリソグラフィ加工コンソーシアム第 26 回定例会, メルパルク京都(京都市), 2017 年 12 月 18 日

Miyuki Tabata, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, Label-free electrochemical monitoring of isothermal nucleic acid amplification using micro pH sensors, 4th COINS symposium, Kawasaki, Japan, December 8, 2017

Miyuki Tabata, Yusuke Yoshioka, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto, Takahiro Ochiya, Yuji Miyahara, Label-free microRNA detecting sensors for liquid biopsy, The 2nd International Symposium on Biomedical Engineering, Tokyo, Japan, November 9-10, 2017

Miyuki Tabata, Enrico Tenaglia, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto, Calotta Guiducci, Yuji Miyahara, pH detecting devices for label-free electrochemical monitoring of isothermal nucleic acid amplification, The 2nd International Symposium on Biomedical Engineering, Tokyo, Japan, November 9-10, 2017

田畑美幸, 合田達郎, 松元亮, 宮原裕二, pH 検出に基づく核酸の増幅と検出を行う小型デバイスの創製, 第 34 回センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウム, 広島国際会議場(広島市), 2017 年 10 月 31 日-11 月 2 日

Miyuki Tabata, Enrico Tenaglia, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto, Carlotta Guiducci, Yuji Miyahara, Label-free nucleic acid amplification detection using micro pH devices, European Advanced Materials Congress 2017, Stockholm, Sweden, August 22-24, 2017

田畑美幸, 電気化学検出による小型・可搬型核酸定量デバイスの創製, 平成 29 年度 E 部門総合研究会, イーグレ姫路(兵庫県姫路市), 2017 年 6-28 月-29 日

田畑美幸, Enrico Tenaglia, 合田達郎, 松元亮, Carlotta Guiducci, 宮原裕二, pH 検出に基づく小型核酸定量デバイスの創製, 生体医歯工学共同研究拠点成果報告会, 東京医科歯科大学(東京都文京区), 2017 年 3 月 24 日

Tabata M, Tenaglia E, Goda T, Matsumoto A, Guiducci C, Miyahara Y, pH-based nucleic acid amplification detection on a silicon nanowire chip, International Symposium on Biomedical Engineering, Tokyo, Japan, November 10-11, 2016

Tabata M, Katayama Y, Mannan F, Seichi A, Suzuki K, Goda T, Matsumoto A, Miyahara Y, Label-free and electrochemical detection of nucleic acids based on isothermal amplification in combination with solid-state pH sensor, EuroSensors2016, Budapest, Hungary, September 4-7, 2016

Tabata M, Ratanaporncharoen C, Asano A, Kitasako Y, Ikeda M, Goda T, Matsumoto A, Tagami J, Miyahara Y, Miniaturized Ir/IrOx pH sensor for quantitative diagnosis of dental caries, EuroSensors2016, Budapest, Hungary, September 4-7, 2016

Tabata M, Goda T, Matsumoto A, Miyahara Y, Development of mixed nano-structure composed of self-assembled monolayer and ultra-thin silver chloride for electrochemical biosensing, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Hawaii, USA, December 15-20, 2015

田畑美幸, 合田達郎, 松元 亮, 宮原裕二, 細胞機能の非破壊定量評価と医療への応用, ソニーサポートファンドオープンハウス, 東京医科歯科大学M & Dタワー 2 6階 ファカルティラウンジ, 2015年11月24日

田畑美幸, 由比藤勇, 加藤邦男, 関口哲史, 合田達郎, 松元 亮, 宮原裕二, 微細加工技術による機能性電極材料の開発, 第6回6大学6研究所連研プロジェクト公開討論会, 東北大学, 2015年11月20日

田畑美幸, 合田達郎, 松元 亮, 宮原裕二, 自己組織化膜/塩化銀ナノ混合表面の構築と核酸検出バイオセンサへの応用, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ, 2015年11月9-10日

田畑美幸, 合田達郎, 松元 亮, 宮原裕二, 自己組織化有機単分子膜/AgCl ナノ混合表面の構築と核酸検出バイオセンサへの応用, 第32回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 朱鷺メッセ, 2015年10月28-30日

田畑美幸, 片山由梨佳, マンナン・ファミリーダ, 星地彩花, 鈴木孝治, 合田達郎, 松元亮, 宮原裕二, 電気化学的核酸定量デバイスの開発, 戦略的創造研究推進事業(JST CREST・さきがけ)戦略目標「プロセスインテグレーションによる次世代ナノシステムの創製」3 研究領域第3 回合同公開シンポジウム, 品川コクヨホール, 2015年9月29日

⑳ Tabata M, Goda T, Matsumoto A, Miyahara Y, Electrochemical label-free degranulation monitoring for in-situ evaluation of cellular function, the 37th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Milan, Italy, August 25-29, 2015

㉑ Tabata M, Yang H, Mannan F, Katayama Y,

Goda T, Matsumoto A, Seichi A, Suzuki K, Miyahara Y, Electrochemical real-time monitoring of isothermal nucleic acid amplification for quantitative analysis, The 18th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS 2015), Anchorage, Alaska, June 22, 2015

㉒ Tabata M, Yuitoo I, Katou K, Sekiguchi T, Goda T, Matsumoto A, Miyahara Y, Design and fabrication of functional solid-state electrodes for liquid biopsy, The 6th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials (AMDI-6), Tokyo, Japan, June 9, 2015

#### 〔図書〕(計3件)

田畑美幸, 宮原裕二, "バイオトランジスタ界面への生体分子固定化技術と機能解析" (in Japanese) in 細胞・生体分子の固定化と機能発現 (ed.: A. Kuroda), CMC publishing Co., Japan, Chapter 27, 265-273 (2018).

田畑美幸, 宮原裕二, "Liquid biopsy にも有用な miRNA の検出方法" (in Japanese) in Liquid biopsy への期待と限, 医学のあゆみ, 医歯薬出版株式会社, 265 (6), 504-508 (2018).

田畑美幸, 宮原裕二, "がんの簡易検査を目指した体液中循環核酸の電気化学的解析技術" (in Japanese) in リキッドバイオプシー (ed.: T. Ochiya), CMC publishing Co., Japan, Chapter 4.3, 226-237.

#### 〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

#### 〔その他〕

ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/bsr/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

田畑 美幸 (TABATA, Miyuki)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・  
テニユアトラック助教  
研究者番号: 00636839

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし

(4)研究協力者  
なし