

令和元年6月18日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K13623

研究課題名(和文)多機能性ペプチドのナノ構造制御による細胞剥離ファイバーの開発

研究課題名(英文) Development of cell detachment microfiber controlled by nanostructure of functional peptide

研究代表者

高井 まどか (Takai, Madoka)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授

研究者番号：40287975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コラゲナーゼ認識ペプチドを設計し、マイクロファイバーに固定化することで、細胞剥離機能をもつマイクロファイバーの開発を行った。細胞捕捉に関しては、マイクロファイバーに固定化した抗体の密度に依存すること、また抗体が認識する細胞膜抗原密度に依存することがわかった。剥離に関しては、コラゲナーゼにより剥離が可能であったが、剥離率が50%以下と十分な値でなかったため、コラゲナーゼ認識ペプチドと抗体の間にポリエチレングリコール(PEG)をリンカーとして入れて検討をした。PEGの分子量依存性を検討したところ、分子量が高いと捕捉率が低下することから、最適なPEG鎖長が存在することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中循環がん細胞(CTC)を捕捉・剥離することを第一目的として研究をしてきたが、血液がんである白血病においても白血病細胞の存在量を知ることが治療において重要であることから、CTCおよび白血病細胞をターゲットとして細胞捕捉を行なった。CTCだけでなく、本マイクロファイバーシステムで白血病細胞を捕捉、剥離することが可能であることを確かめた。さらに、このマイクロファイバーシステムを用いた分離は、他の手法と比較して、処理時間が短縮することができた。よって、簡便ながん診断への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed cell separation and detachment microfiber immobilized the peptide which has a function of cleavable by enzyme, such as collagenase. For cell separation from blood sample, we used the antibody on microfiber, the ratio of cell separation was related to the density of immobilized antibody. And the ratio of cell detachment from microfiber was less than 50% for using the peptide which has cleavable sequence. To improve the ratio of cell detachment higher, we used the cross linker of polyethylene glycol(PEG) between collagenase recognition sequence of peptide and antibody. We found that the optimum PEG chain length for higher detachment ratio of cell from microfiber.

研究分野：ナノ材料

キーワード：細胞分離 ペプチド 抗体 血液細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

血管内（血液中）を循環しているがん細胞 Circulating tumor cell(CTC)は、乳がん、大腸がん、前立腺がんなどの転移性がんにおける予後予測や治療効果判定といった臨床情報が得られる検査として有効な手段であることが認められている。しかし、CTCは、血液中（10ml）には、400億～500億個の赤血球、白血球、および血小板など多くの血球成分が存在するのに対し、数個から数十個であることから、分離がとても困難である。また検査に時間がかかるという問題点があった。2007年12月20日号のNatureの論文で、「マイクロポスト」と呼ばれる円柱状の突起物（約8万本/チップ）にCTCを吸着して分離するという技術が発表されてから、世界中で様々な研究グループが微細な孔を有したCTC検出デバイスの開発に精力を注いだ。結果として、CTCを迅速に分離し捉えるシステムが実用化された。次なる課題として、捕捉した細胞を剥離して回収し、単一細胞解析等の生検に用いる事が注目されており、細胞へのダメージを最小限にとどめ、高効率に細胞を回収する手法の確立が必須となってきている。

2. 研究の目的

高分子材料を用いてナノ～マイクロサイズのファイバー構造を作製し、このファイバーを、全ての細胞が通過できる3次元の孔をもつ厚さ数百ミクロンのフィルムとして加工することに成功した。これにCTCに特異的に発現している分子であるEpCAMを認識する抗体を固定化し、CTCを全血から1分以内で分離する技術を開発した。そこで、捕捉した細胞をファイバーから酵素を用いて剥離回収する技術開発を本研究課題で行うことを目的とする。

細胞剥離においては、光、熱、外力などの刺激を用いることで基材の物性を変化させ細胞を剥離する技術がいくつか報告され、実用化されているものもある。しかし光、熱、外力は、材料に刺激を与えて材料の物性を変化させるだけでなく、ある条件では細胞の機能に影響を及ぼす因子となる。

そこで本研究は、細胞に無害な酵素で細胞の足場を改質し、細胞を基材から剥離する技術を、ペプチドと生体親和性高分子材料を用いて目指す。また細胞分離から剥離まで数分以内のファイバーデバイス開発を行う。

3. 研究の方法

CTCをマイクロファイバーにより分離する機構には、CTCに特異的に発現している分子EpCAMを特異的に認識できる抗体を使っている。そこで、抗体を基材に固定化させる際に、単に物理吸着で抗体を固定化させるのではなく、酵素切断部位をもつペプチド：ナノ材料を開発し、さらにペプチドの機能化を図り、細胞にダメージを与えない酵素を用いて細胞の剥離を行う。具体的な手法としては、コラゲナーゼ認識部位をもつペプチドを合成し、ナノ材料であるペプチドの機能発現に生体親和性リン脂質ポリマーを用いる。設計したペプチドがコラゲナーゼで切断できることを示し、さらに細胞がこの切断により剥離できるかを実証する。マイクロファイバーと吸引システムを用いることで溶液を強制的に移動させ、表面積増大の効果と反応率を向上の原理を用い、分離から剥離回収まで数分以内のデバイス構築の基礎を確立させる。本研究の概念図を図1に示す。

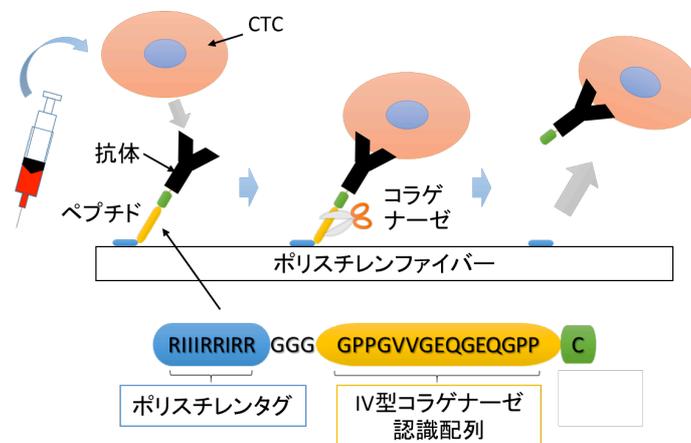


図1 CTC 捕捉・回収の概略図

4. 研究成果

【実験】

1. ペプチド結合抗体の作製とポリスチレン基板への固定化

ペプチド結合抗体の作製と固定化の手順を示す。蛍光標識抗体または抗 EpCAM 抗体と、N-Hydroxysuccinimide (NHS) エステル及びマレイミド基を有する架橋剤溶液を、モル比が 1:20 になるように混合し、室温で 30 分静置した。その後、ポリスチレンに対して高い吸着能を持つポリスチレンタグ (RIIIRRIIR) ¹⁾ と IV 型コラゲナーゼ認識部位 (GPPGVVGEQGEQGP) ²⁾ を含むペプチド (RIIIRRIIRGGGGPPGVVGEQGEQGP) を、抗体とペプチドのモル比が 1:10 になるように混合し、室温で 30 分静置した。その後、スピнкаラムにより未反応低分子を取り除き、ペプチド結合抗体を得た。Tissue culture treated polystyrene (TCPS) を基板として、10 μ g/mL のペプチド結合抗体を基板に滴下し、室温で 60 分静置して抗体の固定化を行った。

2. コラゲナーゼによる剥離能評価

ペプチド結合抗体を作製し、基板に固定化した系を評価した。TCPS に抗体を固定化し、コラゲナーゼ溶液 (100 U/mL) を滴下し室温で 60 分静置した。その後、Typhoon で蛍光強度を測定した。また、24 量体の PEG を含む架橋剤 (以下 PEG リンカーと表記) を用いて同様の評価を行った。

3. マイクロファイバー吸引システムを用いた細胞の捕捉と回収

吸引システムを用いて抗体固定化ファイバーの細胞捕捉の特異性を評価した。ポリスチレンファイバーは、細胞捕捉において最適化されたものを使用した⁷⁾。ペプチド及び PEG リンカーにより抗 EpCAM 抗体を固定化したポリスチレンファイバー不織布に、予め Cell Tracker Green で蛍光標識した EpCAM 発現細胞 (MCF-7) と、Cell Tracker Orange で蛍光標識した EpCAM 非発現細胞 (CCRF-CEM) の混合懸濁液を吸引により透過させ、共焦点顕微鏡でファイバーを観察した。混合懸濁液における MCF-7 細胞 : CCRF-CEM 細胞数は、(a) 2×10^6 : 2×10^6 、(b) 2×10^5 : 2×10^6 、(c) 2×10^4 : 2×10^6 、(d) 2×10^3 : 2×10^6 、(e) 2×10^2 : 2×10^6 、とした。

また、ポリスチレンファイバーの膜厚を変化させたときの捕捉細胞数の変化を評価した。厚さがそれぞれ 2 mm、1.3 mm、0.7 mm のポリスチレンファイバーに、ペプチド及び PEG リンカーにより抗 EpCAM 抗体を固定化し、MCF-7 細胞の懸濁液を吸引により透過させ、透過した懸濁液に残った細胞数を測定した。捕捉細胞数は、透過前と透過後の懸濁液中の細胞数の差分として評価した。

更に、抗体固定化ファイバー上に捕捉された細胞の剥離能を吸引システムにより評価した。ペプチド及び PEG リンカーにより抗 EpCAM 抗体を固定化したポリスチレンファイバー不織布に、蛍光標識した MCF-7 細胞の懸濁液を吸引により透過させ、共焦点顕微鏡でファイバーを観察した。また、懸濁液透過後のファイバーに IV 型コラゲナーゼ溶液を 30 分作用させた後、コラゲナーゼ溶液をファイバー不織布越しに吸引し、同様にファイバーを観察した。

【結果】

1. ペプチドの機能評価

ポリスチレンタグを結合させた抗体の固定化量を蛍光強度により評価した (図 2)。タグなしに比べ、タグ有りのペプチドでは抗体の固定化量が大きく増加したことから、ポリスチレン基板に対するポリスチレンタグの吸着能が高いことが分かった。また、予め IV 型コラゲナーゼを作用させたペプチド結合抗体の基板への固定化抗体量を蛍光強度により評価した (図 3)。いずれの温度においても、事前にコラゲナーゼを作用させることでポリスチレン基板への固定化抗体量が減少したことから、ペプチドに含まれるコラゲナーゼ認識配列は IV 型コラゲナーゼによって分解されることが示唆された。

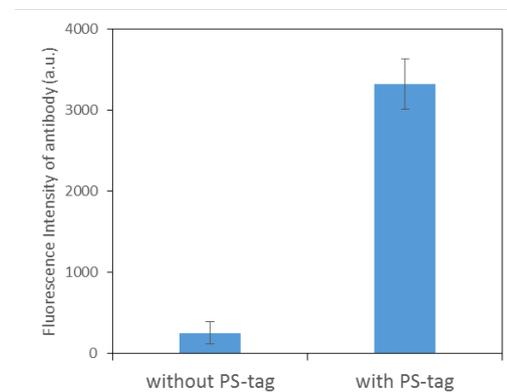


図 2. ポリスチレンタグの有無による固定化抗体量

2 コラゲナーゼによる剥離能評価

ペプチド結合抗体を固定化した基板に IV 型コラゲナーゼを作用させる前後の固定化抗体量を蛍光強度により評価した (図 3)。PEG なしでは剥離率が約 25%であったのに対し、PEG リンカーを使用した場合は剥離率が約 50%であった。これは、PEG の水溶性によりコラゲナーゼがペプチドに届き易くなったためと考えられる。

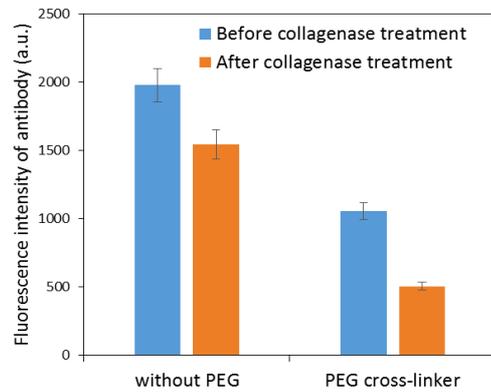


図 3. PEG の有無による固定化抗体量

3. マイクロファイバー吸引システムを用いた細胞の捕捉と回収

作製したポリスチレンファイバー (図 4) を用いて、MCF-7 細胞捕捉の特異性を評価した。濃度比の異なる MCF-7 細胞と CCRF-CEM 細胞の混合懸濁液を透過させたポリスチレンファイバーを共焦点顕微鏡で観察した (図 5)。

この結果から、ペプチド結合抗体固定化ポリスチレンファイバーによって、全体の $1/10^4$ の数の MCF-7 細胞を特異的に捕捉可能であることが示された。これは、ポリスチレンファイバーが細胞の通り抜け易い大きさに設計されており、CCRF-CEM 細胞はファイバーに捕捉されることなく透過した、または捕捉されても吸引によるリンスにより容易に剥離されたため、抗体で捕捉した MCF-7 細胞のみがファイバーに残ったものと考えられる。また、MCF-7 細胞を透過させた後の細胞懸濁液から捕捉細胞数を計算し、ポリスチレンファイバーの膜厚との関係性を評価した (図 6)。この結果から、ポリスチレンファイバーの膜厚が増加すると捕捉される細胞数も増加する傾向が見られた。また、膜厚 2 mm のポリスチレンファイバーを用いると、ファイバーに透過させた MCF-7 細胞のうちの約 80%の細胞を捕捉可能であることが示唆された。更に、細胞懸濁液を透過させた後、コラゲナーゼを作用させる前後のポリスチレンファイバーを共焦点顕微鏡にて観察した (図 7)。この結果から、EpCAM 発現細胞をポリスチレンファイバーに捕捉し、IV 型コラゲナーゼによって細胞が剥離できることが示された。これは、細胞と基板はペプチド結合抗体を介して複数点で結合しているが、コラゲナーゼがペプチドに作用することで結合点が減少し、吸引により細胞に働く力が閾値を上回ったためと考えられる。

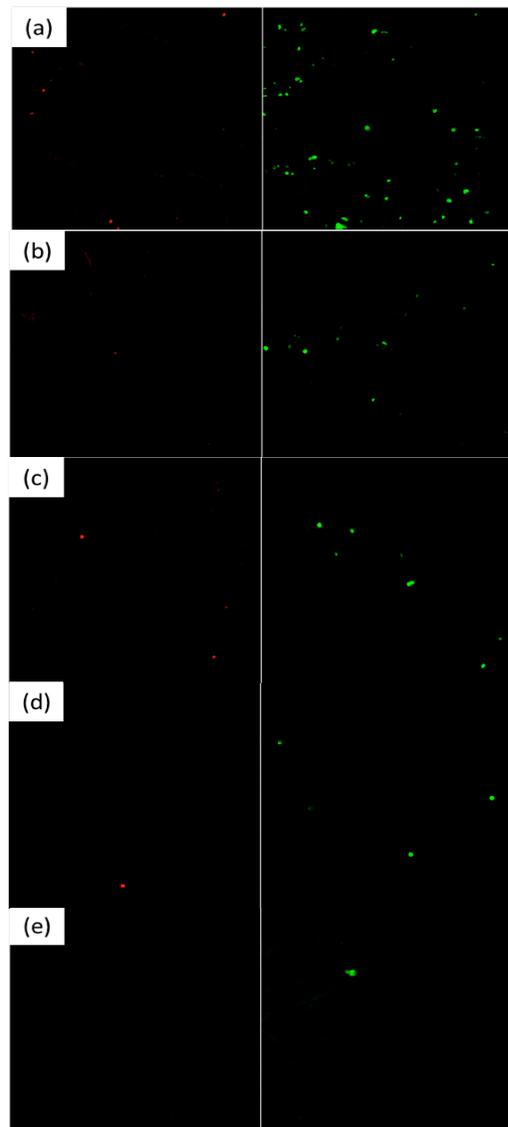


図 5. ポリスチレンファイバーに捕捉された CCRF-CEM 細胞 (左) と MCF-7 細胞 (右)。透過させた懸濁液の細胞数は、CCRF-CEM : MCF-7=(a) $2 \times 10^6 : 2 \times 10^6$ 、(b) $2 \times 10^5 : 2 \times 10^6$ 、(c) $2 \times 10^4 : 2 \times 10^6$ 、(d) $2 \times 10^3 : 2 \times 10^6$ 、(e) $2 \times 10^2 : 2 \times 10^6$

【結論】

設計した細胞剥離ペプチドの機能を確認した。また、抗体-ペプチド間に PEG を挿入すると、コラゲナーゼのアクセス率が向上することが示唆された。PEG リンカーとペプチドを用いてポリスチレンファイバーに抗体を固定化すると、吸引により細胞の特異的な捕捉及び回収が可能であることが示された。この結果から、本研究で提案する手法により CTC の回収及びがん診断への応用が可能であることが示唆された。血液中の白血病細胞の診断にも応用が期待される。

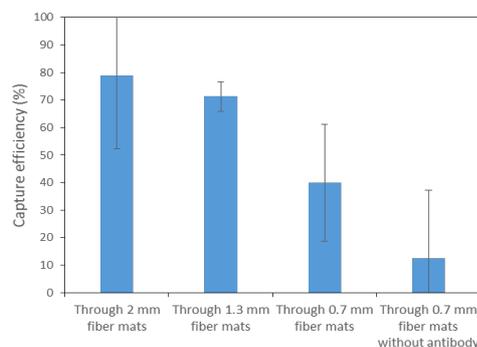


図 6. ポリスチレンファイバーの細胞捕捉率と膜厚の関係

参考文献

- 1) Y. Kumada, *et al.*, *Biotechnol.* **2009**, 4, 1178-1189.
- 2) J. L. Lauer-Fields, *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 18140-18145.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計 4 件

1. Electrospun Polymeric Microfiber Substrates for Rapid Protein and Cell-based Assays, Madoka Takai, Carlton F. O. Hoy, and Akifumi Yoshihara, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, 31, **1**, 65-69, (2018) DOI: <https://doi.org/10.2494/photopolymer.31.65>
2. Highly sensitive and rapid biosensing on a three-dimensional polymer platform, Madoka Takai, *Polymer Journal*, **50**, 847-855, (2018) DOI: <https://doi.org/10.1038/s41428-018-0049-3>
3. Rapid and highly efficient capture and release of cancer cells using polymeric microfibers immobilized with enzyme-cleavable peptides, Akifumi Yoshihara, Ryota Sekine, Takayuki Ueki, Yasuhito Kondo, Yoshiyuki Suanga, Tadashi Nakaji-Hirabayashi, Yuji Teramura and Madoka Takai, *Acta Biomater.*, 67, 32-41(2018), DOI: 10.1016/j.actbio.2017.11.055
4. Fabrication and assessment of an electrospun polymeric microfiber-based platform under bulk flow conditions with rapid and efficient antigen capture, Carlton Fune Ogasawara Hoy, Keiichiro Kushiro and Madoka Takai, *Analyst*, 143, 865-873, (2018) DOI: 10.1039/C7AN01366C

〔学会発表〕 計 21 件

1. Rapid Protein and Cell Assay Based on Polymeric Microfiber Technology, Madoka Takai, The Ninth International Forum on Chemistry of Functional Organic Chemicals (IFOC-9), University of Tokyo, Tokyo Japan, 2018/11/18 (invited)
2. 高分子マイクロファイバーを用いた血液細胞の捕捉分離デバイス、高井まどか、吉原彬文、分子ナノテクノロジー第174委員会 第63回研究会、2018.9.3 (招待講演)
3. Three dimensional micro/nano structured polymer for bioassay, Madoka Takai, MIRAI Materials Science Workshop, Fukuoka, Japan, 2018/5/15(invited)
4. Effective rapid bulk flow microfiber immunoassay systems compared to conventional diffusion-based immunoassay systems, Carlton F.O. Hoy, Keiichiro Kushiro, Madoka Takai, 10th International Symposium on Microchemistry and Microsystems 2018, Hanwha Resort Haeundae Tivoli, Busan, Korea, 2018/06/19 (oral)
5. Specific detection of circulating tumor cells on peptide-linked antibody modified microfiber, Akifumi Yoshihara, Yasuhito Kondo, Yoshiyuki Sunaga, Tadashi Nakaji Hirabayashi, Yuji Teramura and Madoka Takai, 10th International Symposium on Microchemistry and Microsystems 2018, Hanwha Resort Haeundae Tivoli, Busan, Korea, 2018/06/20 (poster)
6. マイクロファイバーを用いた迅速タンパク質・細胞アッセイ、高井まどか、近畿化学協会 近化高機能材料セミナー「絶対に負けない日本の医療材料技術」、2018.01.24(招待講演)
7. Detection of cancer cells using the device of 3D microfiber with multi-functional peptides, Akifumi Yoshihara, Yuji Teramura, Yasuhito Kondo, Yoshiyuki Sunaga, Madoka Takai, RSC Tokyo International conference 2017, Chiba, Japan, 2017/9/7(poster)
8. Fabrication of electrospun polymeric fiber mats for the rapid and sensitive capture of antigen components, Carlton F.O. Hoy, Keiichiro Kushiro, Madoka Takai, RSC Tokyo International conference 2017, Chiba, Japan, 2017/9/8(poster)

9. マイクロファイバーと機能性ペプチドを用いた細胞分離回収デバイス、第22回 関西地区分離技術講演会、高井まどか、2016/12/9、大阪市立大学文化交流センターホール(招待講演)

〔図書、解説論文〕計2件

1. リキッドバイオプシー ー体液中腫瘍マーカーの検出・解析技術ー、第5章 マイクロファイバー技術を用いたCTC迅速高感度検出デバイス、高井まどか、落谷孝広監修、シーエムシー出版、P109-114(2017)
2. マイクロファイバーと機能性ペプチドを用いた細胞分離回収デバイス、高井まどか、吉原彬文、分離技術、第46巻6号、P372-376 (2016)

〔受賞〕計2件

1. ISMM 2018 Award, Akifumi Yoshihara, Madoka Takai, Specific Detection of Circulating Tumor Cells on Peptide-Linked Antibody Modified Microfiber, The 10th International Symposium on Microchemistry and Microsystems, 2018.06.21
2. Best Poster Award, (Royal Society of Chemistry Tokyo International Conference 2016), Carlton F. Hoy, Madoka Takai, Rapid Antigen Detection through Electrospun Microfibers with Vacuum Pump Technology, 2016/9/9

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：マイクロファイバーを用いた血中循環細胞の捕捉及び回収用材料及び当該材料を用いる方法

発明者：高井まどか、寺村裕治、植木貴之 吉原彬文

権利者：東京大学

種類：特願

番号：2016-89023

出願年：2016年4月27日

国内外の別：JP 2017/16623 PCT 出願

6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。