

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282134

研究課題名(和文) 癌細胞の接着選択性を示す血液適合性材料の精密合成

研究課題名(英文) Design and synthesis of tumor cell adherent blood compatible materials

研究代表者

田中 賢 (Tanaka, Masaru)

九州大学・先導物質化学研究所・教授

研究者番号：00322850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌の簡便な早期診断手法の開発のためには、初期の癌組織から血液中に漏出される希少な癌細胞を選択的に補足できる血液適合性に優れた材料が必要である。本研究では、申請者が世界で初めて発見した血液適合性高分子の水和構造制御による癌細胞の選択的接着現象に着目した。高分子の化学構造と物性に変化による高分子鎖への水和状態と血液適合性・選択的癌細胞接着性との関係を調べた。新規に合成した血液適合性高分子の含水時に形成される中間水量に応じて、癌細胞がインテグリン依存および非依存の接着機構で接着することが明らかになった。これらの血液適合性表面は、血中癌細胞の分離、薬剤スクリーニング技術に有益であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To decrease the victims of cancer death, the diagnosis of cancer as well as the therapy is important. Circulating tumor cells (CTCs) have received attention for cancer diagnosis and decisions on chemotherapeutic courses. For these purposes, the isolation of CTCs has been expected. In this study, we examined the possibility of capturing CTCs via an adhesion-based method using new poly(2-methoxyethyl acrylate)(PMEA) analogous polymers by controlling the chemical structure, surface properties and intermediate water structure through precision polymer synthesis. Tumor cells can adhere blood compatible PMEA analogous polymers via integrin-dependent and independent mechanism after 30 min and 1 h of incubation, suggesting that these blood compatible polymers possess the ability to capture CTCs from peripheral blood and inform decisions on chemotherapeutic courses.

研究分野：バイオマテリアルサイエンス

キーワード：血液適合性 がん細胞 血球細胞 水和構造 中間水 表面

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会が進行している我が国の最大の死亡原因は、国民の2人に1人が罹患するがんである。したがって、初期癌細胞の検出、回収によるがんの早期診断、治療効果・予後の診断技術の開発が必要である。

がんの治療効果や予後の診断のために、血中循環癌細胞(CTC)が注目されている。これまでに検討されてきた CTC の検出方法として、上皮細胞接着分子(EpCAM)に対する抗体を用いた方法が検討されている。しかし、EpCAM を喪失したがん細胞が多く、すべての種類の CTC が検出できない問題がある。また、検出感度が十分ではなく、正確ながんの診断や治療効果・予後の診断を行うには不十分であった。さらに、CTC を生体外で増殖後に、抗がん剤の評価を行う場合、抗体との反応により、細胞の抗がん剤への応答が変化することが問題となっている。

抗がん剤治療において、その効果に個人差があることが知られている。投薬前に体内より回収した CTC を用いて、抗がん剤を評価できれば、不適切な抗がん剤の投薬による患者の身体的、経済的な負担を軽減できる。しかし、抗体を用いて回収した CTC を用いて抗がん剤の評価を行った場合、生体内とは異なる細胞の応答が惹起され、正確な抗がん剤の評価が困難である。したがって、これらの問題を解決する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がんの悪性を未然に防ぎ、医療費の社会負担を低減する健康長寿社会を実現するために、革新的な早期がん診断ヘルスケアシステムを医療材料分子設計技術により、実現することである。

本研究では、がんの簡便な早期診断手法の開発のための基盤技術として必要な、がん組織から血液中に漏出される希少ながん細胞を選択的に補足できる血液適合性(血球細胞の非粘着性)に優れた材料を設計するために、我々が世界で初めて発見した血液適合性高分子の水和構造・運動性制御できる高分子を合成する。高分子鎖への水和状態と血液適合性・選択的がん細胞接着性との関係を分子レベルで明らかにすることを目的にした。

3. 研究の方法

高分子の主鎖や側鎖に導入する置換基の構造、 Spacer 長などが制御された新規高分子の精密合成を行った。複数種の合成高分子の有機溶媒に対する溶解性を確認し、スピンコーティング法により薄膜を作製した。新規に合成した高分子の乾燥時および水和(純水、緩衝溶液)時におけるバルクおよび表面の物理化学的な性質を調べた。また、新規合成高分子の水和構造(不凍水、中間水、自由

水)を熱分析および分光分析により定量化した。さらに、各高分子表面に吸着した主要なタンパク質であるアルブミン、フィブリノーゲン、フィブロネクチンの吸着量と吸着したタンパク質の変性度を調べた。

がん細胞の培養には、中間水含量の異なる複数種の合成高分子として、例えば、poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA)およびその類似体である PTHFA、PEt2A、P(Et2A-Me2MA)および 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine と *n*-butyl methacrylate の共重合体(PMPC、共重合比=30:70 mol%)を使用した(図1)。これらを PET 上にスピンコーティングすることで高分子基板を作製した。モデル細胞として HT-1080(線維肉腫細胞株)、HepG2(肝がん細胞株)、MKN1(胃がん細胞株)などを用いた。各細胞の接着性を評価するために、作製した基板に各細胞を播種し、30分および1時間培養した。培養後、接着細胞数を計測した。

高分子コーティング基板表面の乾燥時、含水時の物理化学物性と水和構造・運動性と血液中の血小板、白血球、赤血球の接着数、血漿タンパク質の吸着量、変性度との関係を調べた。また表面抗原の異なる複数タイプのがん細胞の接着数に関しても実験を行った。これらの相関をもとに、血球細胞とがん細胞に対する接着性の異なる高分子表面に対して、がん細胞をスパイクした血液や血漿を接触させることで、接着選択性と培地組成、培養時間との関係を検討した。

4. 研究成果

細胞培養に用いた合成高分子を図1に示す。

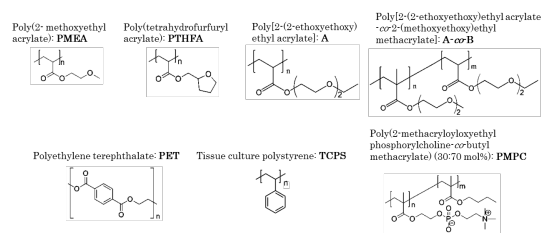


図1 細胞培養に使用した高分子の化学構造

細胞培養に使用した各高分子が含水した際の中間水量は PET < PTHFA < Pet2A < PMEA < P(Et2A-Me2MA) << PMPC であった。各高分子基板への接着数を計測した結果、PMPC 以外の基板で細胞が接着した。がん細胞の接着に関するデータを図2に示す。

培養30分と1時間を比較すると、培養時間が延びることで接着細胞数は1.2~3.1倍に増加した。しかし、全てのがん細胞において30分と1時間後における各基板間での接着細胞の相対的な数がほぼ同様であり、A, PMEA, A-co-B > PET, PTHFA > PMPC の順で接着細胞数が減少した。1時間培養後の細胞接着数は、

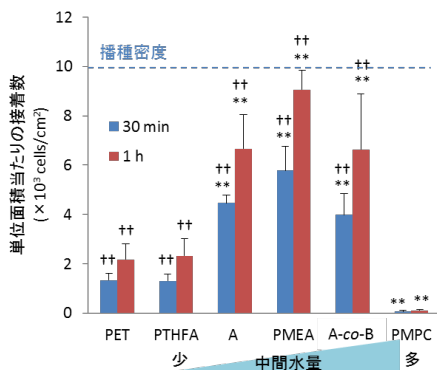


図2 各高分子基板上へのHT-1080細胞の接着数

細胞接着の陰性コントロールであるPMPC上では、全がん細胞において 1.0×10^4 cells/cm²で播種したうち1%ほどしか接着せず、PMPC上ではがん細胞が接着しないことが確認された。一方、PMPCを除く検討した全ての高分子基板上で今回使用した8種類全てのがん細胞が接着することが確認された。陽性コントロールであるPET上には、播種した細胞数の最低5%(MCF-7細胞)から最大46%(HeLa細胞)のがん細胞が接着した。今回使用した高分子のうち、中でもPMEA上でがん細胞がよく接着した。PMEA上では少なくとも27%(MKN1細胞)から最大で91%(HT-1080細胞)のがん細胞が接着し、PETと比較すると、全てのがん細胞で有意に接着数は高い値を示した($P < 0.05$)。PMEAと同程度の接着率を示したのはAとA-co-Bであり、最低20%(MCF-7細胞)から最高70%(HT-1080細胞、HeLa細胞)のがん細胞が接着した。PMEA類似体であるPTHFAの接着細胞数は、PETとほぼ同等であった。

各高分子基板上においてインテグリンを介した接着が行われているかどうかを評価するために、EDTA存在下における接着細胞数を計測した。HT-1080細胞において、EDTAを添加して1時間後のPET、PTHFA上への細胞接着数は、細胞が接着しないPMPCと同程度の接着数であった。EDTA無添加時と比較

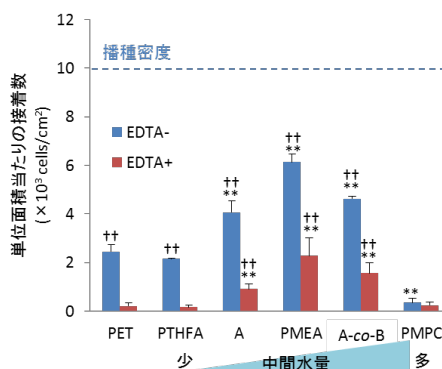


図3 HT-1080細胞のインテグリンを介した接着の阻害

して、接着阻害率はいずれも92%と、細胞接着がほぼ阻害された。

一方、EDTA添加時のA、PMEA、A-co-B上での接着阻害率は各々78%、63%、66%と、EDTA無添加時と比較して細胞接着数は有意に少なくなったが、PMPCよりも有意に接着していることから、インテグリンを介した接着を阻害した場合でもA、PMEA、A-co-B基板上では細胞が接着することが示された。以上の結果から、HT-1080細胞は、PET、PTHFA上では、インテグリンを介した接着、A、PMEA、A-co-B上ではインテグリンを介した接着とインテグリンを介さない接着が生じることが示された。

これらの結果から中間水量の異なるPMEA類似体基板上では細胞の種類によりその接着細胞数が異なることが示された。PMEAの類似体表面には、血球細胞の血小板は粘着しないもののがん細胞は接着することが分かった。また、各細胞の基板への接着性の違いを利用して細胞分離/濃縮の可能性があると考えられる。つまり、中間水量の異なるPMEA類似体を培養基板として用いることで、インテグリンを介した接着の依存性が変化し、インテグリンを介さない接着機構が生じることが分かった。細胞のインテグリンの発現量に応じてインテグリン依存的な接着の違いがあると期待される。PMEA類似体を用いた、基板へのインテグリン依存的/非依存的な接着機構の制御による細胞の分離/濃縮への応用の可能性が考えられる。

現在分離/濃縮に用いられる方法は、目的細胞を抗体により標識し分離するフローサイトメトリー法や、目的細胞に対して特異的なリガンドを修飾した基板上に細胞を接着させる方法が用いられている。しかし、特異的な表面抗原やリガンドが存在しない場合は分離が困難であり、さらに抗体を用いる場合は高コストで大規模な分離に向かないことから、本研究の結果は、新しい原理による細胞分離方法の開発が期待できる。

以上のように、細胞接着の上位因子となる中間水含量の異なる複数種の合成高分子に合成に成功し、細胞接着性との関係を明らかにし、論文化を行った。一部の材料に関しては、企業との共同研究が進行しており、将来の製品化に向け、モノマーや高分子合成条件の改良、大量合成方法の検討、分子量や分子量分布などの品質保証方法、滅菌方法の確立を進めている。また、基材へのコーティング方法やコーティング層の物性確認も進めている。また、動物実験レベルの評価に移行した材料もあり、従来型の合成高分子に対する優位性があきらかになってきている。今後、機能発現のメカニズムの解明と安全性試験も進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)すべて査読あり

1. T. Hoshihara, T. Orui, C. Endo, K. Sato, A. Yoshihiro, Y. Minagawa, M. Tanaka, Adhesion-Based Simple Capture and Recovery of Circulating Tumor Cells Using a Blood-Compatible and Thermo-Responsive Polymer-Coated Substrate, *RSC Advances*, 6, 89103-89112 (2016), DOI:10.1039/C6RA15229E.
2. T. Hoshihara, M. Nikaido, S. Yagi, I. Konno, A. Yoshihiro, M. Tanaka, Blood compatible poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) for the adhesion and proliferation of lung cancer cells toward the isolation and analysis of circulating tumor cells, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 31, 361-372 (2016), DOI: 10.1177/0883911515618976.
3. T. Hoshihara, E. Nemoto, K. Sato, H. Maruyama, C. Endo, M. Tanaka, Promotion of adipogenesis of 3T3-L1 cells on protein adsorption-suppressing poly(2-methoxyethyl acrylate) analogous polymers, *Biomacromolecules*, 17, 3808-3815 (2016), DOI: 10.1021/acs.biomac.6b01340.
4. D. Murakami, S. Kobayashi, M. Tanaka, Interfacial Structures and Fibrinogen Adsorption at Blood-Compatible Polymer/Water Interfaces, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2, 2122-2126 (2016), DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00415.
5. K. Osawa, S. Kobayashi, M. Tanaka, Synthesis of Sequence-Specific Polymers with Amide Side-chains via Regio-/stereoselective Ring-opening Metathesis Polymerization of 3-Substituted *cis*-Cycloocte, *Macromolecules*, 49, 8154-8161 (2016), DOI: 10.1021/acs.macromol.6b01829.
6. S. Kobayashi, K. Fukuda, M. Kataoka, M. Tanaka, Regioselective Ring-Opening Metathesis Polymerization of 3-Substituted Cyclooctenes with Ether Side-Chains, *Macromolecules*, 49(7), 2493-2501 (2016), DOI: 10.1021/acs.macromol.6b00273.
7. C. Sato, M. Aoki, and M. Tanaka, "Blood-compatible Poly(2-methoxyethyl acrylate) for the Adhesion and Proliferation of Endothelial and Smooth Muscle Cells", *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 145, 586-596 (2016), DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.05.057.
8. 田中賢, 小林慎吾, 村上大樹, 荒津史裕, 干場隆志, 福島和樹, <特集: 透析膜 update: 生体適合性からみた評価法と特

性>「総論 生体適合性材料の設計概念」*「臨床透析」*, Vol32(5), 521-529 (2016).

9. M. Tanaka, K. Sato, S. Kobayashi, T. Hoshihara, and K. Fukushima, "Design of Biocompatible and Biodegradable Polymers Based on the Intermediate Water Concept", *Polym. J.*, 47, 114-121 (2015), DOI: 10.1038/pj.2014.129.
10. T. Hoshihara, T. Otaki, E. Nemoto, H. Maruyama, and M. Tanaka, "Blood Compatible Polymer for Hepatocyte Culture with High Hepatocyte-specific Functions toward Bioartificial Liver Development", *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7, 18096-18103 (2015), DOI: 10.1021/acsami.5b05210.

[学会発表](計 16 件)

1. Design of Blood Compatible Polymers Based on the Intermediate Water Concept, 口頭, 田中賢, 第 26 回日本 MRS 年次大会, 横浜市開港記念会館他(神奈川県横浜市), 2016/12/19.
2. Synthesis and blood compatibility evaluation of novel PMEA analogs having precisely placed side-chain branches via regio/stereo-selective ring-opening metathesis polymerization, ポスター, 園田敏貴, 小林慎吾, 田中賢, The 11th SPSJ International Polymer Conference (IPC 2016), 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 2016/12/15.
3. Synthesis of aliphatic polycarbonates with a cyclic ether moiety at the side chain and evaluation of the blood compatibility, 口頭, 高岡駿矢, 田中賢, 福島和樹, The 11th SPSJ International Polymer Conference (IPC 2016), 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 2016/12/14.
4. Design of Blood Compatible Polymers Based on the Biomimetic Intermediate Water Concept, 口頭, 田中賢, 3rd International Conference on Biomaterials Science (ICBS2016), 東京大学本郷キャンパス内伊藤謝恩ホール(東京都文京区), 2016/11/28.
5. Role of Intermediate water in Biopolymers and Biocompatible Synthetic Polymers, 口頭, 田中賢, 2nd International Aquaphotomics Symposium, 神戸大学百年記念館(兵庫県神戸市), 2016/11/27.
6. PMEA 類似体基板への接着性違いを利用した細胞分離/濃縮の試み, 口頭, 遠藤千穂, 大類寿彦, 佐藤一博, 崔賢美, 干場隆志, 田中賢, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 2016/11/22.

7. 側鎖にPMEA構造をもつEVOHの合成とそれら抗血栓性評価, ポスター, 佐藤力哉, 吉田航, 鈴木祥平, 田中賢, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 2016/11/22.
8. 開環メタセシス重合による側鎖間隔を制御した新規PMEA類似体の合成と抗血栓性評価, ポスター, 園田敏貴, 小林慎吾, 田中賢, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 2016/11/21.
9. 中間水含有高分子による軟骨細胞の形態制御を通じた機能維持可能な継代培養基板開発, 口頭, 丸山寛花, 干場隆志, 佐藤一博, 陳国平, 田中賢, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 2016/11/21.
10. Poly(ω -alkoxyalkyl acrylate)類の合成および抗血栓性評価, 口頭, 泉井美幸, 小林慎吾, 佐藤力哉, 田中賢, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 2016/11/21.
11. ヘルスケア-医療用製品向けの高分子材料-中間水コンセプトによる生体親和性高分子の設計-, 招待講演, 田中賢, 第345回光ナノサイエンス特別講義, 奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科大講義室(奈良県生駒市), 2016/10/14.
12. 開環メタセシス重合による側鎖間隔を制御した新規PMEA類似体の合成と抗血栓性評価, ポスター, 園田敏貴, 小林慎吾, 田中賢, 第6回日本バイオマテリアル学会九州講演会, 熊本大学大江地区宮本記念館(熊本県熊本市), 2016/9/23.
13. poly(ω -methoxyalkyl acrylate)類の合成と抗血栓性評価, 口頭, 泉井美幸, 佐藤力哉, 小林慎吾, 田中賢, 平成28年度繊維学会秋季研究発表会, 山形大学米沢キャンパス4号館(山形県米沢市), 2016/9/20.
14. 開環メタセシス重合による側鎖間隔を制御した新規PMEA類似体の合成と抗血栓性評価, 口頭, 園田敏貴, 小林慎吾, 田中賢, 第65回高分子学会討論会, 神奈川大学横浜キャンパス7号館(神奈川県横浜市), 2016/9/14.
15. 生体親和性合成高分子の水和構造の理解とヘルスケア分野への展開, 招待講演, 田中賢, 第54回高分子材料自由討論会, 鹿児島サンロイヤルホテル(鹿児島県鹿児島市), 2016/7/4.
16. 開環メタセシス重合による側鎖間隔を制御したPMEA類似体の合成, ポスター, 園田敏貴, 小林慎吾, 田中賢, 第65回高分子学会年次大会, 神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市), 2016/5/25.(優秀ポスター賞受賞)

〔図書〕(計 2件)

1. M. Tanaka, 2D and 3D Biocompatible Polymers for Medical Devices, Chapter 6, *Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science*, Wiley, Chapter 6, p.82-93 (2016).
2. 田中賢, 細胞培養の基礎知識と細胞培養基材の利用・開発の留意点, 第8章 細胞培養基材表面で起こる初期現象, 情報機構, p111-123 (2016).

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2件)

名称: がん細胞捕捉方法
 発明者: 田中賢
 権利者: 山形大学
 種類: 特願
 番号: 2016-191618
 出願年月日: 2016/9/29
 国内外の別: 国内

名称: 溶液から細胞を分離する細胞分離方法、および、細胞分取用水和性組成物
 発明者: 田中賢
 権利者: 山形大学
 種類: 特願
 番号: 2016-024048
 出願年月日: 2016/2/10
 国内外の別: 国内

○取得状況(計 0件)

〔その他〕
 ホームページ等
<http://www.soft-material.jp/>

6. 研究組織

- (1)研究代表者
 田中賢(TANAKA MASARU)
 九州大学・先導物質化学研究所・教授
 研究者番号: 00322850
- (2)研究分担者
 なし
- (3)連携研究者
 なし
- (4)研究協力者
 小林慎吾(KOBAYASHI SHINGO)
 九州大学・先導物質化学研究所・特任准教授
 研究者番号: 70625110
 干場隆志(HOSHIBA TAKASHI)
 山形大学・有機材料システム研究推進本部
 研究者番号: 00469769