

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H00228

研究課題名（和文）がん微小環境研究のための細胞探査システム

研究課題名（英文）Cell selective analysis system for cancer microenvironment studies

研究代表者

小俣 透 (Omata, Toru)

東京工業大学・工学院・教授

研究者番号：10262312

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ファージディスプレイ法によるがん細胞表面分子に結合する抗体スクリーニングを主たる応用として、単一または小集団の接着細胞を対象としたがん微小環境の分子生物学的な解明のための細胞探査装置を開発した。目的とする抗体スクリーニングを実現するためには、選択した細胞だけ局所的にファージを溶出するための試薬を作用させる必要がある。その方法として、先端径が細胞よりやや大きいピペットにより、単一または小集団の細胞を密閉する方法を考案した。イオン伝導法を用いて密閉の達成を確認するとともに、密閉が達成される条件を明らかにした。また、3次元培養へ拡張する方法を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内の腫瘍は均一ながん細胞の集団ではなく、がん細胞が複雑に分化していること、正常細胞が腫瘍に取り込まれがん細胞の生存に利用されること、酸素と栄養が行き渡らない低酸素低栄養領域があり、その細胞は休眠状態になり抗がん剤や放射線に耐性を持つことが明らかになってきた。そのため、腫瘍の微小環境を研究することの重要性が認識されている。そのためには、単一または小集団の細胞を選択する方法を開発する必要がある。本研究の意義は、工学的な手法により、がん微小環境の分子生物学的な解明のための選択的細胞探査方法を開発したことである。

研究成果の概要（英文）：This study developed a cell exploring device targeting a single or small group of adhered cells for the understanding of the molecular biology of the cancer microenvironment. The main application is the screening of antibodies that bind to the surface molecules of cancer cells based on the phage display method. To achieve the desired antibody screening, an elution reagent needs to be delivered locally to selected cells. A ceiling method using a pipette with tip diameter slightly larger than the cell or group of cells was proposed. The achievement of the ceiling was confirmed with the ion-conductance method and the conditions under which the ceiling could be achieved were clarified. A way to extend the method to three-dimensional culture was also devised.

研究分野：知能機械

キーワード：知能機械

様式 C-19, F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体内の腫瘍は均一ながん細胞の集団ではなく、がん細胞が複雑に分化していること、正常細胞が腫瘍に取り込まれがん細胞の生存に利用されること、酸素と栄養が行き渡らない低酸素低栄養領域があり、その細胞は休眠状態になり抗がん剤や放射線に耐性を持つことが明らかになってきた。腫瘍の微小環境を研究することの重要性が認識されているが、その詳細は解明されていない。細胞表面に発現する膜タンパク質を同定することは細胞の活動を解明するために役立つとともに、それが見つかれば抗体医薬の標的抗原になりうる。そのためにファージディスプレイ法による抗体スクリーニングがこれまでに行われてきたが、従来の方法は多数の細胞集団を対象としているので、単一あるいは小集団の細胞の情報を得ることはできない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ファージディスプレイ法による抗体スクリーニングを主たる応用として、単一あるいは小集団の細胞を対象としたがん微小環境の分子生物学的な解明のための細胞探査装置を開発することである。目的とする抗体スクリーニングを実現するためには、選択した細胞だけ局所的にファージを溶出するための試薬を作用させる必要があり、その方法を考案する必要がある。

3. 研究の方法

(1) 平面培養を対象とした細胞探査装置

図1に示すように、平面培養した細胞を対象として、細胞と同程度かやや大きい先端径のピペットを用いて、目標とする単一あるいは小集団の細胞を取り囲み密閉することにより、選択した細胞だけ局所的に試薬を作用させる方法を考えた。(a)は細胞を密に培養した場合であり、(b)は細胞を整列させて培養した場合である。ファージディスプレイ法による抗体スクリーニングを実現する方法は次のとおりである。(i)細胞にファージを付着させる。(ii)つぎにピペット(以下ではアウターピペットと呼ぶ)で目標とする範囲を覆い密閉する。(iii)その中に別の相対的に細いピペット(インナーピペットと呼ぶ)を入れ、ファージを溶出するための試薬の送液し、(iv)吸引により溶出したファージを回収する。

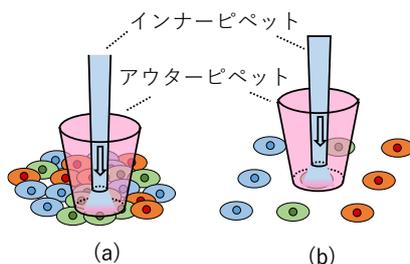


図1 密閉による細胞選択：(a)密に培養した場合、(b)整列して培養した場合

既存の方法として、非接触で送液と吸引により流れを作り、選択した領域に局所的に試薬を作用させる **Hydrodynamic Flow Confinement** と呼ばれる方法があり、細胞の局所的な回収が可能であることが示されている。しかし、ファージのようなナノパーティクルを対象とした場合、送液と吸引の流れによって周囲の細胞に付着したファージを剥がしてしまうことが考えられるので不適である。

図2に開発したシステムを示す。(a)に示すように、2重管を構成したピペット、その位置決めを行うマイクロマニピュレータ (MP-285A, Sutter Instrument)、送液のためのシリンジポンプ、観察のための蛍光顕微鏡 (IX83, オリンパス) からなる。(b)にシステムの写真を示す。

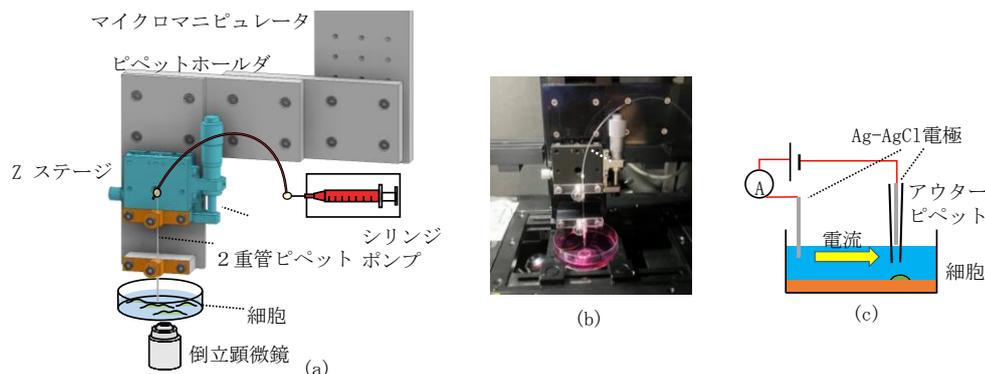


図2 開発したシステム：(a)概念図、(b)写真、(c)イオン伝導法

ピペットには、ガラスピペットを用いた。中空のガラス管を熱しながら引き延ばすことにより、先端径を数マイクロから数十マイクロメートルに加工することができる。

細胞の培養に関しては、ポリスチレンシャーレの底面にコラーゲンコート塗布し、そのうえで培養した。コラーゲンコートは細胞の成長を促進するとともに、柔らかさにより、ガラスピペットによる密閉を行いやすくなるという利点がある。アウターピペットの密閉性の検証には、図2(c)のようにイオン伝導法を用いた。Ag-AgCl 電極をシャーレとアウターピペットに挿すことで回路を作り、その電流を測定した。ただし微小な電流であるため、電流増幅器で10000 V/Aのゲインで増幅した。マイクロコンピュータを用いてガラスピペットを選択した範囲に押し付け、密閉による電流が低下することを利用して密閉性を検証した。

(2) 3次元培養への拡張

一方、3次元培養のがん細胞は生体内のがん細胞に特性に近いことが知られている。球状に細胞の塊を培養するスフェロイドが標準的な3次元培養方法である。その一部の細胞を選択する方法として、2重管のピペットを用いた方法を考案した。また、スフェロイドの100 μm 以上の内部には培養液が届かず、細胞が低酸素低栄養状態になることが知られている。その特性を調べることは重要であるが、内部にあるため観察やアクセスが難しい。さらに、高酸素高栄養領域から低酸素低栄養領域の勾配を生成できれば、両者の違いを調べるのが可能になる。そこで、観察やアクセスがしやすい底面部に酸素と栄養の勾配を生成する細胞培養装置を考案した。

4. 研究成果

本研究の研究成果は以下のとおりである。

(1) 平面培養を対象とした密閉選択

先端径40~80 μm のガラスピペットで、密閉により電圧を0にしたレベルまでイオン電流を低下させることができることを確認した。図3はイオン電流の一例である。図から分かるように、イオン電流の変化がほぼなくなる点が存在する(変化点と呼ぶ)。その後、ガラスピペットをさらに底面に押し付けることにより、ガラスピペットが割れることが判明した。すなわち、変化点を目安に押し付ければ、割れることなくイオン電流を低下させることができることが分かった。ガラスピペットの先端がいびつな場合や欠けがある場合は例外であるが、それらは事前に除外することができる。

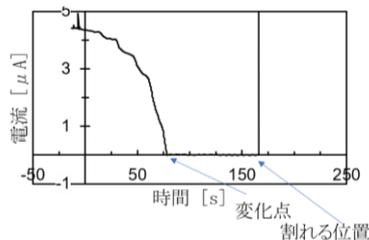


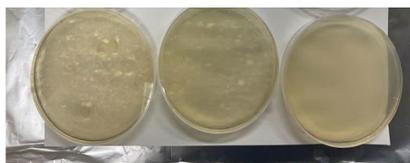
図3 イオン電流の例

また、アウターピペットで密閉したのち、内部にファージを導入し、漏れがないかをプラークアッセイにより検証した。プラークアッセイとは、ファージを大腸菌に感染させ、ファージが増殖した領域にプラークという視認可能な箇所が発生することを利用して、プラークをファージの個数の代替とする手法である。図4(a)は内側から回収した原液をそれぞれ 10^6 倍希釈、 10^7 倍希釈して観察したものであり、(b)は外側の液体から回収したものをそれぞれ左側から 10^2 、 10^3 、 10^4 希釈してプラークを観察したものである。プラークアッセイの精度内で、外側からはプラークが確認されなかった。図5はN87細胞を密閉した後、ピペットを引き上げたときの細胞である。密閉により物理的に細胞が剥がれることはなかった。

このほか、ガラス以外の材質のピペットについても検討した。



(a)



(b)

図4 プラークアッセイ：(a)ピペット内から採取(プラークに黒でマーキングしてある)、(b)ピペット外から採取

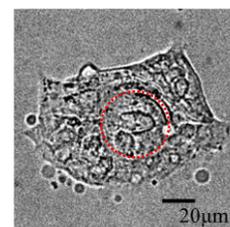


図5 N87細胞の密閉

(2) 3次元培養への拡張

アルギン酸ゲルファイバを用いた栄養供給流路を持つデバイスを開発し、底面部に酸素と栄養の濃度勾配を生成した。図6はデバイスの概念図である。アルギン酸ゲルファイバに近い領域が高酸素高栄養になり、遠い領域が低酸素低栄養になる。底面部へのアクセス方法については、

一重管のピペットを刺すだけでは、内部に細胞が詰まってしまう。そこで、この場合もアウターピペットとインナーピペットの2重管を用いることにより、インナーピペットにより詰まった細胞を回収することや取り除くことが可能になる。

デバイスの作製方法については、アルギン酸ゲルファイバを作製してから、組立工程において設置することは、正確な位置決めが困難であり、また乾燥して脆くなってしまおうという問題点があった。そこで本研究では、アルギン酸ファイバをデバイス内部で作製する方法を考案した。一般的に、アルギン酸ゲルは、アルギン酸 Na 水溶液と塩化 Ca 水溶液を反応させることで作製するが、この方法ではアルギン酸 Na と塩化 Ca が接触すると瞬時にゲル化するため、デバイス内部でのゲル作製には不向きである。そこで、本研究では Ca 塩として水に不溶性の炭酸 Ca を用いることでゲル化時間を遅らせる方法を採用した。この方法では、アルギン酸 Na 水溶液、炭酸 Ca 懸濁液、炭酸水を混合することで、混合から一定時間経過後にゲル化させることができる。

図7はヒト大腸がん由来する HCT116 細胞のスフェロイドをチャンバーに入れて作成した細胞凝集体の例である。HCT116 には FUCCI(Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) が導入されているため、細胞周期における G1 期は励起波長 561 nm で蛍光を示し、S/G2 期は励起波長 488 nm で蛍光を示す。ただし、両方の波長で蛍光する領域は G1 期から S/G2 期への移行期の細胞である。相対的に 561 nm の蛍光の割合が多い領域は休眠領域、すなわち低酸素低栄養の領域であることが示唆される。アルギン酸ゲルファイバに近い領域で 488 nm の蛍光が強くなり、遠い領域で 561 nm の蛍光が強くなることを確認した。

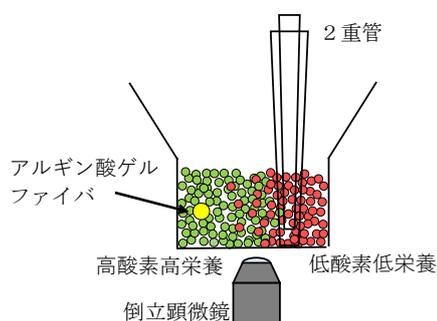


図6 3次元培養デバイス

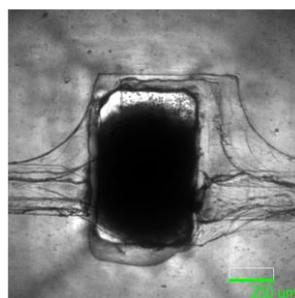


図7 3次元培養の例

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuyohi Sato, Akira Hamai, Tetsuya Kadonosono, Shinae Kizaka-Kondoh, Toru Omata	4. 巻 16
2. 論文標題 Droplet-based valveless microfluidic system for phage-display screening against spheroids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomicrofluidics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0085459	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角崎青周, 大友秀太, 門之園哲哉, 小俣透
2. 発表標題 低酸素低栄養領域の観察とアクセスが容易ながん細胞培養デバイス
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第46回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊本要, 門之園哲哉, 小俣透
2. 発表標題 がん細胞スフェロイドを対象としたエンドサイトーシス抑制ファージディスプレイスクリーニングマイクロ流体デバイス
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第46回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤充, 宮路克弘, 小俣透
2. 発表標題 接着細胞の局所的解析のための密封による細胞小領域の選択
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第46回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上明弘, 小俣透
2. 発表標題 スフェロイド内部への送液・吸引システムの開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第46回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神永 真帆, 中村 哲也, 小俣 透
2. 発表標題 がん細胞 3 次元培養デバイスへの栄養供給アルギン酸ゲルファイバ 組込方法の検討
3. 学会等名 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原凜一朗, 神永真帆, 小俣透
2. 発表標題 低栄養領域へ送液可能ながん細胞 3 次元培養デバイス
3. 学会等名 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横坂豪大, 小俣透
2. 発表標題 単一細胞探査のための同心二重マイクロピペットの製作
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第44回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原滉一朗, 神永真帆, 小俣透
2. 発表標題 低栄養領域へ送液可能ながん細胞3次元培養デバイス
3. 学会等名 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス部門講演会2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京工業大学STARサーチ https://search.star.titech.ac.jp/titech-ss/search.act</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	門之園 哲哉 (Kadonosono Tetsuya) (10510282)	東京工業大学・生命理工学院・准教授 (12608)	
研究分担者	神永 真帆 (Kaminaga Maho) (20879986)	豊田工業高等専門学校・機械工学科・助教 (53901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------