

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 年度～2012 年度

課題番号：23790023

研究課題名（和文）サイズ選択と光反応を利用した新規血中循環癌細胞回収チップの開発

研究課題名（英文）Development of Novel Chip for Isolation of Circulating Tumor Cells Using Size-Selection and Photochemical Reaction

研究代表者

有安真也 (ARIYASU SHINYA)

東京理科大学・総合研究機構・ポスドクトラル研究員

研究者番号：50586998

研究成果の概要（和文）：血中循環癌細胞（CTC）の回収は癌の超早期診断や癌の個別医療化につながる。しかし、現状では CTC の検出に留まり、無傷での回収は実現されていない。そこで本計画では、癌細胞の大きさを利用したサイズ選択マイクロ流路と光切断反応を利用した光応答性抗体修飾シリコン基板を作製した。本計画で作成した光応答性抗体修飾シリコン基板は、基板上の抗体により、細胞混合液からモデル細胞を選択的に捕捉可能であり、その後、光照射によって、細胞を生きたまま回収できることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：The isolation of circulating tumor cells (CTCs) is expected to early-diagnosis and tailor-made care of cancer. However, although the detection of CTCs was reported, the collection of living CTCs have been not realized. In this project, we developed microfluidic device composed of size-selection and IgG-coated photoreactive silicon device. This photoreactive IgG-coated silicon device can capture the target cells from cell-mixture and collect the living target cells by photoirradiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：光切断リンカー、血中循環癌細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、我が国で最も死亡原因が高いものは癌であり、その解決には、癌の超早期診断、テーラーメイド医療化が必要不可欠である。このような中で、近年、血中循環癌細胞（CTC）が着目されている。CTC は癌が転移のために、原発巣から血流にのり、体内を循環している細胞のことを示す。

CTC は早期癌患者の血液にも存在が確認され、また、癌の進行度と血中の CTC 数の間に相関があることから、CTC の検出、単離は、癌の超早期診断、予後追跡、癌の遺伝子解析

による癌テーラーメイド医療につながる。しかし、血液中に含まれる CTC 数は癌患者の血液であっても、非常に少なく、CTC の検出、単離は非常に困難で、Nagrath のグループを始め、いくつかのグループで CTC の検出に成功しているのみで、CTC の単離回収に成功した例はなかった。

2. 研究の目的

患者の末梢血から、CTC を前処理なしで、迅速に捕捉でき、かつ、無傷での回収を目指し、細胞の大きさを基にした分離手段である

サイズ選別マイクロ流路と、光分解性リンカーの光反応を利用した光応答性抗体修飾シリコン基板を組み合わせた新規血中循環癌細胞回収チップの開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) サイズ選別マイクロ流路の細胞吸着抑制のための化学修飾

サイズ選別流路においては、細胞が流体力学的に理想的な層流にのって流れることを前提としている。そのため、流路内における細胞の非特異的吸着を抑制する化学修飾を検討した。

(2) 高効率、長波長光で光切断可能な光切断部の合成

光応答性抗体修飾シリコン基板を構成する光分解性リンカーの設計と合成を行った。骨格には、Aoki らのグループで見出された 8-quinolinyll sulfonate (8QS) と光分解化合物として広く用いられている 3-amino-3-(2-nitrophenyl)propionic acid (ANP) を基に、官能基導入、もしくは、三重項増感剤を組み合わせることで、長波長光での効率的な光切断が可能な光分解部分の合成を行った。

(3) シリコン基板上での光切断リンカーの性能評価

(1) で合成を行った光分解部分に抗体結合部、シリコン基板結合部を連結させて光切断リンカーの設計と合成を行う。その後、リンカーをシリコン基板に修飾し、シリコン基板上での光分解特性を評価した。

(4) 新規光応答性抗体修飾シリコン基板の作成

(3) の結果を基に、最適化したリンカー構造と修飾方法を用いて、シリコン基板-光分解性リンカー-抗体を連結させた光応答性抗体修飾シリコン基板を作成した。作成した基板において、照射による基板上的抗体の脱離能を検討した。

(5) CTC モデル細胞を用いた新規 CTC 回収チップの性能評価

モデル細胞を用いて、(4) で作成した抗体修飾シリコン基板にて、細胞混合液から、モデル細胞を選択的に捕捉可能かを分析した。また、その後、基板上に固定したモデル細胞の照射による回収を検討した。

4. 研究成果

(1) サイズ選別マイクロ流路の細胞吸着抑制のための化学修飾

細胞-基板間の吸着力を測定したところ、

大部分の血球成分は、未修飾のシリコン基板においても、その非特異吸着による吸着力は非常に低く、低流速での緩衝液の洗浄で、用意に細胞をはがすことが可能であった。しかし、これとは別に、血液自体の凝結が問題となり、現在、化学修飾と基板形状の両方の最適化を行っている。

(2) 新規光応答性抗体修飾シリコン基板の作成

骨格として7位にニトロ基を有する光切断リンカーの設計と合成を行ったが、目的とする長波長光での光分解は確認されたものの、分解効率の向上には至らなかった。

また、従来の 8QS を基にした光切断リンカーに三重項増感剤の1つである Thioxanthone を共存させた光応答性抗体修飾シリコン基板を作成したが、効率的な励起エネルギーの移動が起こらず、光切断効率の向上は見られなかった。

一方、ANP を骨格とした光切断リンカーを用いた光応答性抗体修飾シリコン基板は、照射により、基板上的抗体が脱離可能であった。確認には、高速原子間力顕微鏡 (FS-AFM) を用いた基板上的直接観察を行い (図 1)、FS-AFM 特有の高速スキャンにより、照射による抗体の脱離をリアルタイム動画観測に

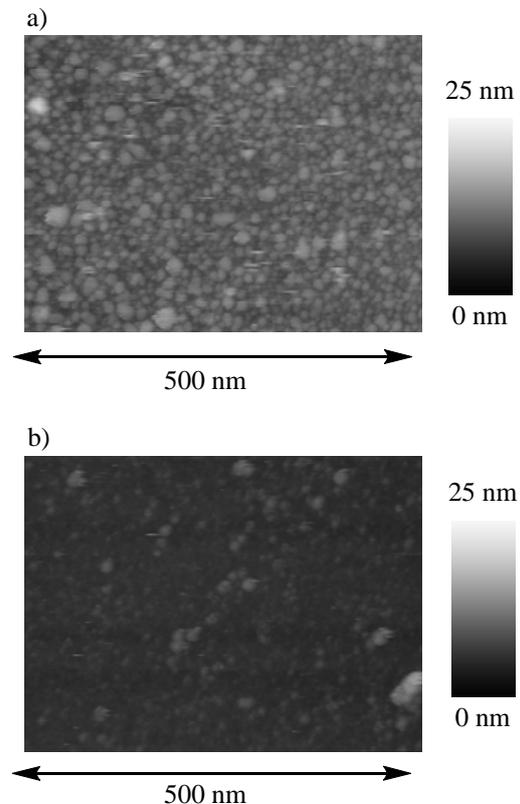


図 1 光応答性抗体修飾シリコン基板表面の AFM 観察像 (a) 照射前、(b) 照射後

も成功した。今回のような、固相上での光分解反応の直接観察は、過去に例がなく、FS-AFM を用いた新しい評価法の可能性を示した。

また、基板上に固定したモデル抗体に対する2次抗体を用いて、照射による基板上タンパク質への影響を検証したところ、基板上のタンパク質の活性低下は見られず、本計画で作成した光応答性抗体修飾シリコン基板は、照射により、タンパク質を傷つけることなく、回収可能であることを明らかとした。

続いて、モデル抗体として Hen egg lysozyme (HEL) に対する抗体 (Anti-HEL-IgG) で作成した光応答性抗体修飾シリコン基板による、目的細胞の選択的捕捉を検討した。モデル細胞として、細胞表面に HEL を強制発現させた SP2/O 細胞 (SP2/O-HEL 細胞) を用い、これとほぼ同数の HEL を持たない SP2/O の混合液から、SP2/O-HEL を選択的に捕捉可能であった (図 2)。また、SP2/O-HEL を正常マウス血液に混合し、本基板に導入した際にも、SP2/O-HEL の選択的捕捉を確認した。以上のことから、本計画で作成した抗体修飾基板は、基板上での抗原-抗体反応に基づく、目的細胞の選択的捕捉が可能であることが明らかとなった。

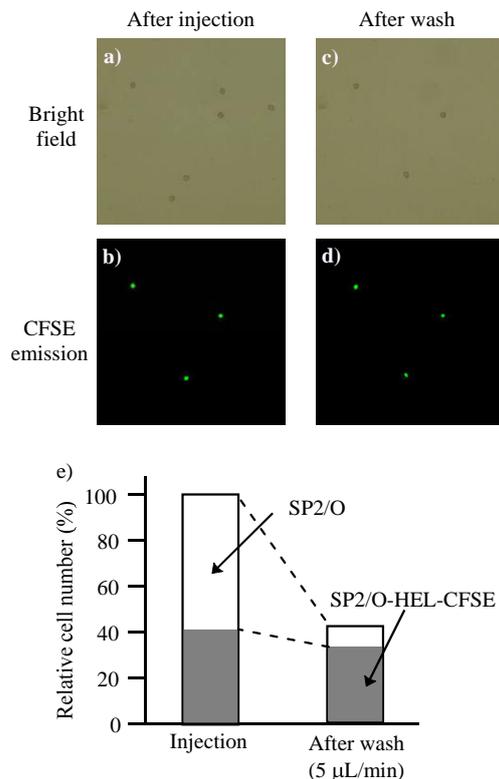


図 2 光応答性抗体修飾シリコン基板による目的細胞の選択的捕捉
細胞導入直後の明視野像(a), 蛍光像(b), 基板洗浄後の明視野像(c), 蛍光像(d), 各段階における基板上の細胞数 (e)

さらに、抗体修飾基板にて捕捉した目的細胞の照射による回収を検討した。この際、基板-細胞間吸着力を計測するために、作成した光応答性抗体修飾シリコン基板と顕微鏡、シリンジポンプを組み合わせたマイクロデバイスの作成を行った。このデバイスは、基板上にシリンジポンプで厳密に制御した流速の緩衝液を送液することが可能であり、目的細胞の基板上への捕捉後、緩衝液の流速を徐々に上げていき、物理的に基板-細胞間の吸着をはがすことが可能である。得られた流速プロファイルを用い、マイクロ流路内の流速分布を二次元ポアズイユ流れと仮定したストークスの抵抗則によって、基板-細胞間の吸着力を算出した。その結果、細胞吸着後、365 nm の照射を 30 分行った基板では、未照射の基板と比較して、基板-細胞間吸着力は約 3 分の 1 にまで、低下し、照射による目的細胞の回収が有効な手段であることが明らかとなった (図 3)。また、照射を行って、回収した細胞は、回収前の細胞と比較して遜色ない細胞増殖率を示し、照射によるダメージも問題にならないレベルであることが分かった。

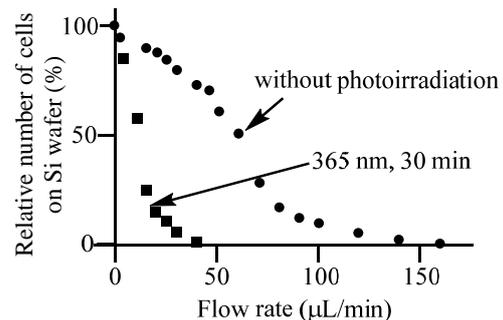


図 3 光応答性抗体修飾シリコン基板で捕捉したモデル細胞の基板-細胞間吸着力の測定

以上の成果をまとめ、投稿論文 (Ariyasu et al. *Langmuir* 2012) として発表し、また、国際学会 (13th Tetrahedron Symposium Asia Edition) にて、発表をした際には、Best Poster Prize として表彰を受けた。

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 8 件)

[1] S. Ariyasu, K. Hanaya, E. Watanabe, T. Suzuki, K. Horie, M. Hayase, R. Abe, S. Aoki, The Selective Capture and Collection of Live

Target Cells Using a Silicon Wafer Device Modified with Antibodies via a Photocleavable Linker. *Langmuir*, 査読有, 28 巻, pp13118-13126, 2012 年

[2] S. Ariyasu, K. Hanaya, M. Tsunoda, M. Kitamura, M. Hayase, R. Abe, S. Aoki, Photochemical Cleavage Reaction of 8-Quinolinylnyl Sulfonates That Are Halogenated and Nitrated at the 7-Position. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 査読有, 59 巻, pp1355-1362 (front cover), 2011 年

[3] T. Yamamura, S. Ariyasu, R. Sakamoto, Affinity Clusters: An Adenine-Coated Gold Cluster Binds to Thymine Loops in DNA. *Chemistry an Asian Journal*, 査読有, 6 巻, pp1761-1765, 2011 年

[4] T. Yamamura, S. Ariyasu, Inorganic Bioconjugates of Gold Clusters and Nanoparticles -Briefly History and Recent Development-, *Bulletin of Japan Coordination Chemistry*, 査読有, 55 巻, pp71-77(review), 2010 年

[5] S. Ariyasu, A. Onoda, R. Sakamoto, T. Yamamura, Alignment of Gold Clusters on DNA via a DNA-recognizing Zinc Finger-Metallothionein Fusion Protein, *Bioconjugate Chemistry*, 査読有, 20 巻, pp2278-2285, 2009 年

[6] S. Ariyasu, A. Onoda, R. Sakamoto, T. Yamamura, Conjugation of Au11 Cluster with Cys-rich Peptides Containing the α -Domain of Metallothionein, *Dalton Transactions*, 査読有, pp3742-3747. 2009 年

[7] A. Onoda, M. Igarashi, S. Naganawa, K. Sasaki, S. Ariyasu, T. Yamamura, Circular Dichroism of Neutral Zinc Porphyrin-Oligonucleotide Conjugates Modified with Flexible Linker, *Bulletin of the Chemical Society Japan*, 査読有, 82 巻 pp1280-1286, 2009 年

[8] A. Onoda, T. Suzuki, H. Ishizuka, R. Sugiyama, S. Ariyasu, T. Yamamura, Minimal motif peptide structure of metzincin clan zinc peptidases in micelles, *Journal of Peptide Science*, 査読有, 15 巻, pp832-841, 2009 年

[学会発表] (計 33 件)

[1] S. Ariyasu, K. Hanaya, E. Watanabe, M. Hoshi, T. Suzuki, K. Horie, M. Hayase, R. Abe, S. Aoki, The Selective Capture and Collection of

Live Target Cells Using a Photoreactive Silicon Wafer Device Modified with Antibodies via Photocleavable Linkers. 13th Tetrahedron Symposium Asia Edition (ポスター), 中国台湾台北市, 11 月, 2012 年

[2] 有安真也、花屋賢悟、渡邊瑛太、星美里、鈴木利宙、堀江和峰、早瀬仁則、安部良、青木伸、光分解可能なケミカルリンカーを用いた目的細胞の選択的捕捉、回収用デバイスの開発(ポスター), 第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム, 東京都, 11 月, 2012 年

[3] 有安真也、花屋賢悟、渡邊瑛太、星美里、鈴木利宙、堀江和峰、早瀬仁則、安部良、青木伸、光分解性リンカーを介した抗体修飾デバイスによる目的細胞の選択的捕捉と回収(口頭), 第 6 回バイオ関連化学シンポジウム, 北海道, 9 月, 2012 年

[4] S. Ariyasu, K. Hanaya, M. Hoshi, E. Watanabe, T. Suzuki, M. Hayase, R. Abe, S. Aoki, Development of the Specific Antibodies-Coating Photoreactive Silicon Devices for Efficient Detection and Collection of Target Cell (口頭). 8th AFMC International Medicinal and Chemical Symposium (AIMECS11), 東京都, 11 月, 2011 年

[5] S. Ariyasu, T. Yamamura, S. Aoki, Alignment of Gold Clusters on DNA via a Zinc Finger-Metallothionein Fusion Protein (ポスター), 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACICHEM2010), アメリカハワイ州, 12 月, 2010 年

[6] S. Ariyasu, R. Sakamoto, T. Yamamura, Location of a gold cluster at the desired position of DNA via a zinc finger-metallothionein conjugate (口頭、招待講演), 2nd International Symposium on Bioinorganic Chemistry of the New Era, 岐阜県, 8 月, 2009 年

[7] S. Ariyasu, A. Onoda, R. Sakamoto, T. Yamamura, Conjugation of Au11 Cluster with Cys-rich Peptides Containing the α -Domain of Metallothionein (ポスター), International Conference on Biological Inorganic Chemistry 2009, 愛知県, 7 月, 2009 年

[8] S. Ariyasu, R. Sakamoto, T. Yamamura, Location of a gold cluster at the desired position of DNA via a zinc finger-metallothionein conjugate (ポスター), International Union of Materials Research Societies-International Conference in Asia 2008, 愛知県, 12 月, 2008 年

[9] ○有安真也, ジンクフィンガー・メタロチオネイン融合蛋白質を用いた Au クラスターの DNA 上への配列(口頭、招待講演), 錯体化学若手の会勉強会, 東京都, 12月, 2007年

他 24 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有安 真也 (ARIYASU SHINYA)

東京理科大学・総合研究機構・ポストドクトラル研究員

研究者番号 : 50586998

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :