

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：13903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06260

研究課題名(和文) 希少細胞の磁気分離に向けた機能性微粒子の開発

研究課題名(英文) Development of thermo-responsive magnetic conjugates designed for isolation and purification of circulating tumor cells

研究代表者

淵上 輝顕 (Fuchigami, Teruaki)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20756704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：全血試料から高効率で血中循環腫瘍細胞を回収でき、かつ細胞にストレスを与えない条件下で磁性粒子と細胞を分離できる磁気細胞分離プロセスの開発を目指した。フェライトナノ粒子と温度応答性高分子から磁性集積体を作製し、その表面に生体分子認識性を持つタンパク質を吸着させることで、細胞分離用磁性粒子を作製した。粒子表面のタンパク質量を制御することで細胞回収率を25%程度から最大で60%まで増加させた。光学顕微鏡を用いたその場観察により、37℃から4℃の温度変化で粒子が吸着脱離している様子が観察され、本研究で作製した細胞分離用磁性粒子が低ストレスの磁気細胞分離プロセスに応用できる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Novel thermo-responsive magnetic conjugates composed of iron oxide particles, streptavidin and thermos-responsive polymer were developed to achieve high-efficiency enrichment and purification of circulating tumor cells (CTCs) with no stress. Controlling an amount of streptavidin on a surface of the conjugates, capture efficiency of CTCs increased from 25 to 60%. Observing the conjugates motion on lung cancer cells under microscope, the thermo-responsive conjugates captured and released cancer cells by changing temperature from body temperature (37°C) to lower temperatures. According to these results, the novel thermos-responsive conjugates has an advantageous for the high-efficiency enrichment and the purification.

研究分野：nanotechnology

キーワード：磁性ナノ粒子 磁気細胞分離 血中循環腫瘍細胞 温度応答性高分子 がん早期診断

1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の死亡原因の1位であり、早期発見と治療が望まれている。近年、血中循環腫瘍細胞 (以下: CTC) を血中から分離・濃縮し解析する CTC 解析が転移性がんの検査方法として有効であることがわかってきた。しかし、早期がん診断に対しては多量の血液試料から短時間で CTC を分離する技術が必要とされている。2014年にスタンフォード大学の Wang 教授らが洗浄操作を用いない磁気分離手法と特殊な磁気分離デバイスを用いることで 10 ml/hour で 90%以上の分離効率を達成した。しかしこの手法では洗浄によって取り除かれるはずであった余剰の抗体と磁性ナノ粒子から凝集体が生成し、単一細胞解析に影響を及ぼす。そこで CTC を用いた早期がん診断のために、高効率・短時間分離が可能で、かつ細胞に損傷を与えない条件下で粒子-細胞の吸脱着が可能な機能性磁性微粒子が待ち望まれている。

2. 研究の目的

抗原抗体反応によって結合した細胞と磁性ナノ粒子の脱離には、タンパク質分子鎖の切断や親和性の差を利用した置換反応が用いられているが、余剰の抗体と磁性粒子から生成した凝集体では大きな立体障害のために細胞表面の磁性粒子を除去することが困難であった。そこで本研究では、立体障害の影響を受けずに細胞表面から磁性粒子を除去するために、温度変化による温度応答性高分子の構造変化を利用しようと考えた。腫瘍バイオマーカーとして期待される CTC を全血試料から高効率で回収でき、かつ細胞にストレスを与えない条件下で細胞との吸脱着が制御できる温度応答性磁性ナノ粒子を作製し、その細胞回収率と細胞の吸脱着能を評価して新しい磁気細胞分離システムの開発を目指した。

3. 研究の方法

磁性体である酸化鉄ナノ粒子の共沈合成反応時に、温度応答性高分子である Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid)

(以下、PNIPAM-co-AA) を添加することで、温度応答性磁性ナノ粒子集積体を作製した。その後、集積体をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に分散させ、ヒドリジド反応によって PNIPAM-co-AA にストレプトアビジンを結合させた。ストレプトアビジン結合反応時の温度、時間、添加量を変えることで結合量の異なる集積体を作製した。ストレプトアビジン結合量は蛍光色素標識ビオチンと結合させ、その蛍光強度から調べた。細胞分離の評価は、血液試料とバッファの混合溶液中に肺がん細胞 (H1650 肺がん細胞株) を 100 個程度

懸濁させ、ビオチン結合抗体 (anti-EpCAM) を 2.5 ml 加えて 4°C で 1 時間攪拌した後に、得られた磁性ナノ粒子集積体を加えて 36.5°C で 1 時間攪拌した。その後、磁気分離用の基板 (Magsifter) に 10 ml/hr の速度で混合溶液を流し、基板上に補足された細胞数をカウントした。

4. 研究成果

作製した温度応答性磁性ナノ粒子集積体の TEM 像を図 1 に示す。平均一次粒子径 14 nm の酸化鉄粒子が凝集した 200 nm 程度のコアの上に、厚さ 3-10 nm のポリマーシェルが形成している様子が観察された(図 1b,c)。細胞分離では単位体積当たりの磁気モーメント量が高いことが望ましいため、このような集積構造は高速分離 (10 ml/hr) の際に有利であると考えられる。

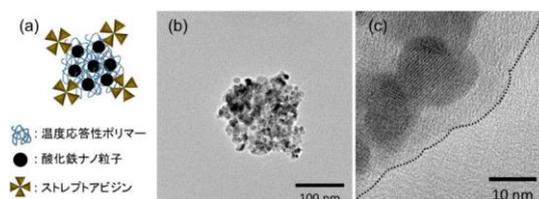


図 1 (a)温度応答性磁性ナノ粒子集積体の模式図。(b,c)温度応答性磁性ナノ粒子集積体の透過型電子顕微鏡像。10 nm 程度の酸化鉄ナノ粒子が集積している様子がわかる。

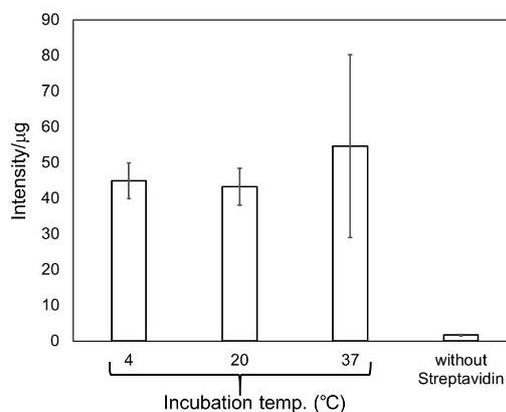


図 2 ストレプトアビジン結合集積体に蛍光標識ビオチンを結合させ測定した蛍光強度。温度によって結合量に変化している。

図 2 にヒドリジド反応によりストレプトアビジンを結合させ、蛍光色素標識ビオチンと反応させた集積体の蛍光強度測定結果を示す。ヒドリジド反応を行った全ての試料から蛍光が観測されストレプトアビジンの結合が確認できた。また、37°C で反応させた試料はわずかに高い蛍光強度を示した。本実験で用いた温度応答性ポリマーは 32°C 以上で疎

水性を示す。したがって、37°CのPBS中でストレプトアビジンヒドラジドとの反応サイトであるイソプロピルアクリルアミド(疎水基)が集積体表面により多く露出したために、多くのストレプトアビジンが結合したと考えられる。

図3に細胞分離実験の結果を示す。この時に用いた磁性ナノ粒子集積体は、4°Cでストレプトアビジンを結合させたものである。集積体作成時の酸化鉄ナノ粒子懸濁液濃度とポリマー溶液濃度を調整することにより、集積体の二次粒子径を150–2000 nm程度まで制御した。粒子径が増大するにしたがって細胞回収率も増大し、最大で20%程度の回収率が得られた。また、細胞回収時の温度を4°Cに変えたところ、細胞回収率が減少していることから、温度応答性高分子の構造変化によって細胞認識性が変化することが示唆された。粒子サイズの増大に伴い比例的に細胞回収率が増大しなかった原因として、ストレプトアビジン結合量の影響が考えられる。そこで、図2の実験で最も高いストレプトアビジン結合量を示した試料を用いて、細胞分離実験を行った。

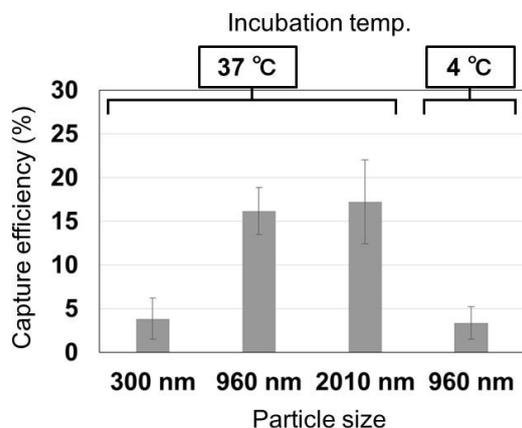


図3 Magsifterを用いた細胞分離実験。集積体の粒子サイズ増大に伴い回収率が増加していることがわかる。

37°Cでストレプトアビジンを結合させた集積体を用いて肺癌細胞の磁気分離を行った結果を図4に示す。試料依存はあるものの、最大で60%以上の細胞回収率が得られた。このことから、ストレプトアビジンの結合量が細胞認識性に大きく影響していることがわかった。また、集積体の添加量を10 µgから40 µgまで変えて細胞分離を行ったところ、20 µg添加した時に細胞回収率が最大となることがわかった。このことから、洗浄操作を用いない磁気分離プロセスでは磁性ナノ粒

子添加量が回収率に影響することが示唆された。

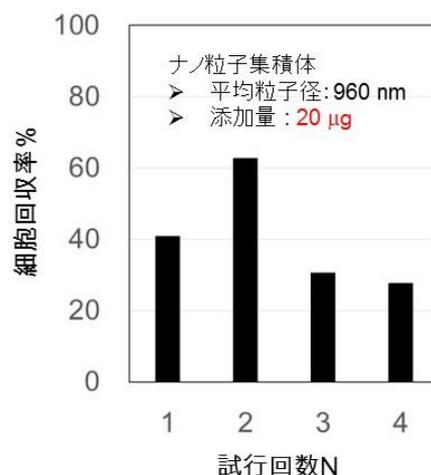


図4 37°Cでストレプトアビジンを結合させた温度応答性磁性ナノ粒子集積体を用いた肺癌細胞の磁気分離。

温度応答性磁性ナノ粒子集積体のがん細胞との吸脱着能を調べるために、図5に示すような実験を行った。まず、37°Cで温度応答性磁性ナノ粒子集積体と肺癌細胞を結合させ、その懸濁液をスライドガラスに滴下した。その後、ネオジム磁石をスライドガラス上の懸濁液に近づけ、磁場誘導による細胞の動きを光学顕微鏡によりその場観察した。同様の実験を同じ試料を用いて4°Cの環境下で行った。

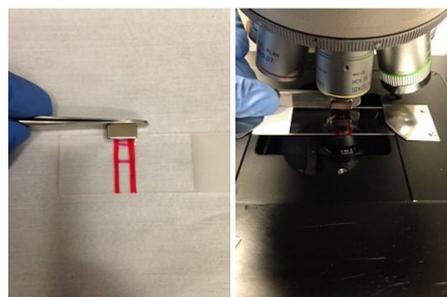
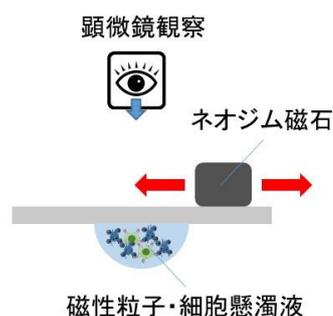


図5 温度応答性磁性ナノ粒子集積体/がん細胞懸濁液の磁場誘導実験概要図。

その結果、37℃の環境下で細胞の動きを観察した際には、細胞はネオジム磁石の報告に移動している様子が観察された。一方で、4℃の環境下では細胞は磁石の方向に動かず、重力方向にゆっくりと沈降していく様子が観察された。つまり、37℃の温度下でのみ細胞が磁場によって誘導されているということである。これらの結果は、体温程度から4℃までの温度変化で、温度応答性磁性ナノ粒子集積体表面の高分子構造が変化し、細胞表面と結合している抗体が脱離したために、粒子が細胞から脱離しているためであると考えている。

以上の実験から、本研究で作製した温度応答性磁性ナノ粒子集積体を用いることで、細胞にストレスを与えない条件下で細胞との吸脱着が制御できる可能性を示すことができた。細胞回収の効率は60%程度と実用レベルには至らなかったが、洗浄操作無しという特異な条件下において、磁性粒子表面のアビジン量、磁性集積体の添加量が細胞回収率に大きく影響を及ぼすことがわかり、今後の磁気分離システムの開発に対して貴重な知見を得ることができたと考えている。

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0件)

[学会発表] (計6件)

1. (Invited) International Conference of Young Researchers on Advanced Materials, December 11-15, 2016, Bangalore, India, Hybrid magnetic nanomaterials designed for biomedical applications, Teruaki Fuchigami
2. (Invited) Japan-Taiwan International Conference on Magnetic Fluids 2016, December 08-10, 2016, Sapporo, Japan, Design and Fabrication of Three-dimensional Magnetic Nanomaterials for Rare cell Isolation and Drug Delivery System, T. Fuchigami, Y. Kitamoto, S. X. Wang
3. 公益社団法人日本セラミックス協会 東海支部 支部大会、2016年12月10日、愛知、希少細胞の磁気分離精製に向けた温度応答性/磁性複合機能ビーズ、瀧上輝頭、柿本健一
4. 33rd International Korea-Japan Seminar on Ceramics, 2016.11, Daejeon, Korea, Thermo-Responsive Magnetic Particles Designed for Isolation and Purification of

Circulating Tumor Cells, Teruaki Fuchigami and Ken-ichi Kakimoto

5. 公益社団法人日本セラミックス協会 2016年年会 2016年03月、免疫磁気細胞分離に向けた温度応答性酸化鉄ナノ粒子集積体の作製、瀧上輝頭、柿本健一
6. 公益社団法人日本セラミックス協会 東海支部 支部大会 2015年12月、温度応答性酸化鉄ナノ粒子を用いた血中循環腫瘍細胞の磁気分離、瀧上輝頭、柿本健一

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

瀧上輝頭 (FUCHIGAMI, Teruaki)

名古屋工業大学 生命・応用化学専攻・助教
研究者番号: 20756704

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし