

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H02320

研究課題名(和文)がん細胞結合ペプチドの高効率自動探索とその多様な条件への適用

研究課題名(英文)High efficiency automatic screening for cancer cell binding peptides and its application to various conditions

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) 33,300,000円

研究成果の概要(和文)：膨大な種類のペプチドの中からがん細胞に特異的に結合するペプチドを探索するペプチド探索は、従来人手で行われていたため、時間と手間を要していた。本研究では、MEMSデバイスの工夫、計測・制御技術により、ペプチド探索を自動化するデバイスを開発した。平面培養されたがん細胞を対象として、正常細胞に結合するペプチドを除去する機能を持つデバイスを開発した。また、生体内の腫瘍に性質がより近いと言われている3次元培養の一種であるスフェロイドを対象としたペプチド探索デバイスを開発した。さらに、低酸素低栄養状態で培養したがん細胞を対象とする方法を考案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実験装置の設計製作の工夫や計測・制御技術の導入により、ペプチド探索を自動化するデバイスを開発したことや、これまで平面培養に限られていた標的がん細胞を3次元培養に拡張することができたことは学術的な意義が大きい。がん細胞を対象とした研究はバイオ系の研究と考えられていたが、健康・医療の向上を目指すがん細胞研究という異分野の研究領域に機械工学を拡大したことが社会的な意義である。

研究成果の概要(英文)：Since screening for a peptide that specifically binds to cancer cells among a huge number of peptides has been conventionally performed manually, it took time and effort. In this study, we have developed microfluidic devices that automate peptide screening by devising MEMS devices and using measurement and control technologies. For a screening device against two dimensional-cultured cancer cells, we have developed a device that can remove peptides binding to normal cells. Spheroids, a type of three-dimensional culture, is said to be closer in nature to tumors in the body. We have developed a screening device against spheroids. In addition, a method for targeting cancer cells cultivated under hypoxia and undernutrition is devised.

研究分野：機械工学

キーワード：知能機械

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高価な抗体に代わるがん細胞への特異的結合物質としてペプチドが注目されている。膨大な種類のペプチドの中から目的のペプチドを探索するペプチド探索は、同じプロセスを何度も繰り返す必要があり、従来人手で行われていたため、時間と手間を要していた。これを改善するマイクロ流路デバイスが提案されていたが、正常細胞に結合するペプチドを除去する機能がなく、また、がん細胞の培養方式として、平面培養に限られていた。平面培養のがん細胞は生体内の腫瘍と特性が異なることが知られていた。さらに、低酸素状態ではがん細胞がさらに悪性化することが知られていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、人手による非効率なペプチド探索を改善するペプチド探索デバイスを開発するとともに、3次元培養など多様な条件でのペプチド探索を可能にするデバイスを開発することである。MEMS デバイスの工夫、計測・制御など工学技術により、そのようなデバイスを開発する。平面培養されたがん細胞を対象としたデバイスでは、正常細胞に結合するペプチドを除去する機能を持つデバイスを開発する。また、3次元培養の一種であるスフェロイド(がん細胞の数百 μm の球状の塊)を対象としたペプチド探索デバイスを開発する。さらに、低酸素低栄養状態のがん細胞を対象とすることも考える。

3. 研究の方法

平面培養されたがん細胞を対象としたデバイスに関しては、正常細胞に結合するペプチドを除去する機能を持つデバイスを設計した。細胞を均一に播種する方法(参考文献[1])をすでに開発していたので、それを組み込むことを考えた。このデバイスでは、流路の切り替えが必要であったため、要素技術としてバルブの開発に取り組んだ。能動バルブだけでなく、制御や実装が容易な受動バルブについても要素技術として並行して研究した。スフェロイドを対象としたデバイスに関しては、スフェロイドを液滴の中に入れ、液滴を操作することで、ペプチド探索を実現できると考えた。そのためには、液滴の位置と速度を制御する必要があり、画像処理を用いた能動制御の方法を研究した。

4. 研究成果

4.1 平面培養がん細胞を対象としたデバイス

・構成と動作原理 平面培養がん細胞を対象としたペプチド探索デバイスの概念図を図1に示す。標的であるがん細胞チャンバの上流側に正常細胞チャンバを配置し、そこで正常細胞結合ペプチドを取り除く。正常細胞結合ペプチドを十分に取り除くために、正常細胞チャンバを三つ直列に並べる。細胞を播種する際に、細胞が重なると細胞表面の結合分子を減少させることになる。細胞を均一に播種する必要があるが、そのために、マイクロピラーアレー(MPA)を各チャンバの細胞導入口側に配置した(参考文献[1])。

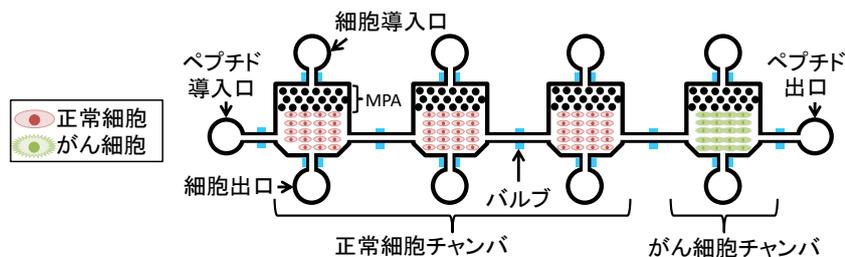


図1 平面培養がん細胞を対象としたペプチド探索デバイス

図2にこのデバイスの動作を示す。

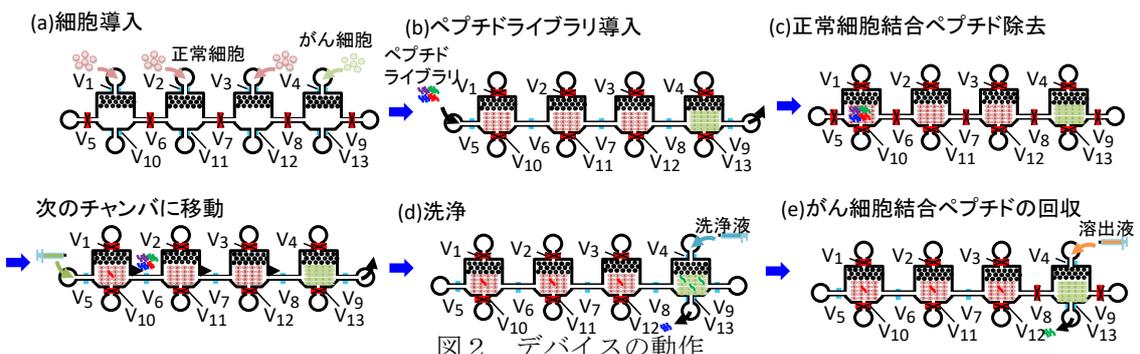


図2 デバイスの動作

$V_1 \sim V_{13}$ の合計13個のバルブを使用し、赤で示すバルブを閉じる。(a)で正常細胞、がん細胞を各チャンバに導入し、(b)で初段の正常細胞チャンバへペプチドライブラリ(多種類

のペプチドを含む溶液)を導入し、正常細胞結合ペプチドを取り除く。(c)で次段の正常細胞チャンバへペプチドライブラリを移動させ、さらに正常細胞結合ペプチドを取り除いた後、がん細胞チャンバにペプチドライブラリを送る。(d)でがん細胞に結合しなかったペプチドを洗浄し、(e)で溶出液を導入し、がん細胞結合ペプチドの回収する。

・バルブ 図2に示す動作を実現するためには、チャンバに接続する流路を切り替えるバルブが必要である。本研究では図3に示すような平行四辺形の流路断面を持つ空圧バルブを提案した。

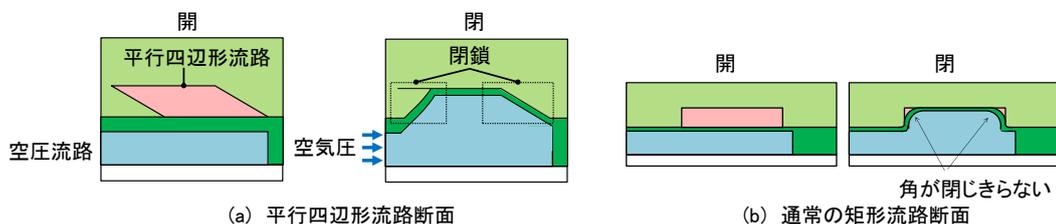


図3 提案した平行四辺形バルブ

一般的なフォトリソの鋳型で型取りしたPDMS製流路は、多くの場合矩形断面を持つ。しかし、矩形断面流路を積層して作製したバルブは、空圧流路に加圧したとしても、図3(b)のように液流路の角の部分を中心に閉鎖することができない。これは、液流路と空圧流路の間の膜の変形が、矩形流路の角の直角に対し十分ではなく、隙間が生じることが原因である。本研究で用いる細胞は、数 μm 程度の隙間であっても容易に変形して通過する。液流路の断面を平行四辺形にすることで矩形断面では流路の角が閉じ切らない問題を解決した。

・設計・製作 本デバイスは、(1)細胞やサンプルの導入を行う液流路層、(2)それを仕切る薄膜層、(3)空圧バルブに空圧印加を行う空圧流路層からなる。液流路層と空圧流路層は型取り成形によって製作し、三つの層を接合することによりデバイスを製作した。材料には、空圧による変形が容易であり、倒立顕微鏡での観察のために透明度が高いPDMSを用いた。

製作したマイクロ流路デバイスを図5に示す。赤色水で着色した部分が液体を流すための液流路で、青色水で着色した部分がバルブ制御用の空圧流路である。

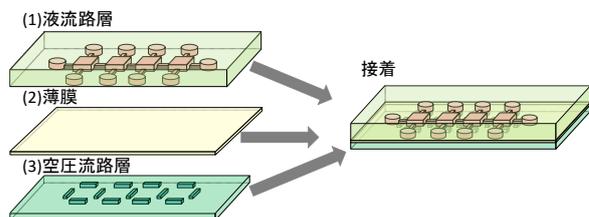


図4 製作方法

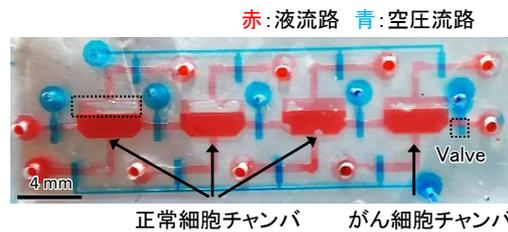


図5 製作したデバイス

・実験 HER2を発現しているN87細胞を標的がん細胞、Integrinを発現しているHeLa細胞を正常細胞の代替とし、緑色で蛍光標識した抗HER2抗体をがん細胞結合ペプチド、赤色で蛍光標識した抗Integrin抗体を正常細胞結合ペプチドの代替とし、抗Integrin抗体がどの程度取り除けるか実験した。IntegrinはN87細胞にも発現している。

抗HER2抗体と抗Integrin抗体を通過させるHeLa細胞チャンバの数を0, 1, 3個とした場合の、N87細胞に付着した抗HER2抗体と抗Integrin抗体の赤/緑の輝度比率を測定した。また、コントロールとして、抗HER2抗体をN87細胞に付着させ自家蛍光との赤/緑の輝度比率を測定した。HeLa細胞チャンバの数を0, 1, 3個とした場合とコントロールの赤/緑の輝度比率はそれぞれ、0.37, 0.2, 0.14, 0.14であった。HeLa細胞チャンバの数が増加するとともに、抗Integrin抗体が取り除かれ、輝度比率が減少した。また、HeLa細胞チャンバが3段の場合は、コントロールと同程度に低下し、抗Integrin抗体が十分に取り除けることを確認した。

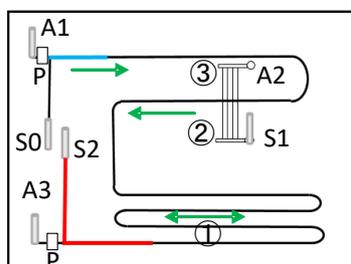
4.2 スフェロイドを対象としたデバイス

・構成と動作原理 スフェロイドを対象としたペプチド探索デバイスの概念図を図6に示す。このデバイスの動作はつぎの通りである。

付着：スフェロイドを含む液滴を図中のシリンジS0より導入し、エアポンプA1により空気を送り、液滴を生成する。次にエアポンプA1, A3を用いて、液滴を①のジグザグ部で往復させ、適度な速さの内部循環流を発生させスフェロイドにペプチドを付着させる。

洗浄：付着しなかったペプチドを含む液を抜き、希釈液と混合攪拌することにより、洗浄を実現する。次の3つの手順を繰り返す。

- 液抜き流路②で、シリンジポンプ S1 で陰圧をかけることにより一定量の液抜きを行う。この際、液抜き流路に空気が流入すると一定量の液抜きを行うことができないため、常に液滴と液抜き流路が接するようにエアポンプ A1 で液滴の位置制御を行う。
- シリンジポンプ S2 で希釈液をデバイス内に投入し、スフェロイドを含む液滴間との空気を空気抜き流路で抜き、それらを合体させる。
- ジグザグ部の流路で、エアポンプ A1, A3 を用いて液滴を往復させ内部循環流を用いて混合攪拌させ希釈させる。この時空気抜き流路より空気が漏れないようにエアポンプ A2 を駆動させる。
- エアポンプ A3 で液滴を液抜き流路の位置まで戻し、所定の希釈が達成されるまで a, b, c を繰り返す。



- ① : 混合用ジグザグ部
- ② : 液抜き流路
- ③ : 空気抜き流路

A1～A3 : エアポンプ S0 : シリンジ
 S1, S2 : シリンジポンプ
 P : 逆流防止受動バルブ

図6 スフェロイドを対象としたペプチド探索デバイス

開発したシステムを図7に示す。液抜きと希釈液との混合による洗浄動作の一例を図7に示す。ファージが流路に付着すると、探索の妨げになる。そこで、流路のブロッキングができるかを調べた。ブロッキング後にファージを導入し、洗浄後にファージを回収し、プラークアッセイを行ったところ、検出されるファージがブロッキングしない場合と比較して1/10以下に減少することを確認した。



図7 開発したシステム

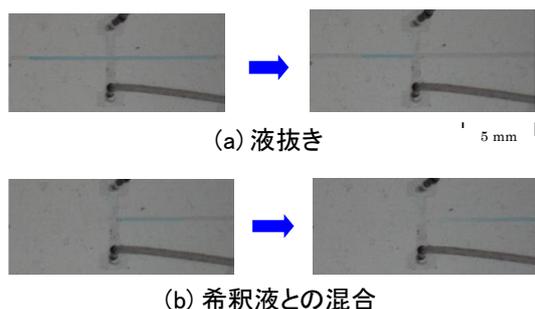


図8 液抜きと希釈液との混合の例

4. 3 低酸素低栄養状態のがん細胞を対象とするデバイス

低酸素状態でがん細胞が悪性化し、その遊走能が高まることが知られていた。一方、低グルコース状態でがん細胞の遊走能が高まるかを調べた。そのためのデバイスを開発し、遊走能が高まることを明らかにした。また、平面培養下で、遊走能の高いがん細胞を回収するデバイスを開発し、遊走能の高いがん細胞を選別することができた。3次元培養に関しては、従来のスフェロイドでは、低酸素低栄養状態のがん細胞はスフェロイドの内部に形成される。そのため、それらの細胞にアクセスすることができず、ペプチド探索に利用することもできなかった。そこで、低酸素低栄養状態のがん細胞を外側に形成する培養デバイスを開発した。

このほか、ファージを可視化できれば実験の効率を改善できると期待できる。そこで、蛍光ビーズをT7ファージに結合させることにより、検出できることを確認した。また、これまでペプチドの結合力が抗体に比べて弱いことが問題になっていた。まず、ある種のがん細胞に高発現する膜タンパク質の膜透過ドメインを支持体とし、任意のタンパク質を細胞膜上にディスプレイする技術を開発し、標的結合ドメインをがん細胞膜にディスプレイすることに成功した。また、小型足場タンパク質に抗原結合ペプチドを組み込み、抗原に結合する小型タンパク質をデザインする技術を確立した。これにより、取得した抗原ペプチドの構造を安定化させ、結合力や体内安定性を向上させることが可能になった。

参考文献 [1] M. Kaminaga, T. Ishida, T. Kadonosono, S. Kondoh, and T. Omata, Uniform Cell Distribution Achieved by Using Cell Deformation in a Micropillar Array, Micromachines, MDPI, Vol. 6, No. 11, pp. 409-422, Apr. 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tadashi Ishida, Takuya Shimamoto, Maho Kaminaga, Takahiro Kuchimaru, Shinae Kizaka-Kondoh, Toru Omata	4. 巻 10
2. 論文標題 Microfluidic High-Migratory Cell Collector Suppressing Artifacts Caused by Microstructures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 micromachines	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） 10.3390/mi10020116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Maho Kaminaga, Tadashi Ishida, Tetsuya Kadonosono, Shinae Kizaka-Kondoh, Toru Omata	4. 巻 10
2. 論文標題 Microfluidic Device for Screening for Target Cell-Specific Binding Molecules by Using Adherent Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 micromachines	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） 10.3390/mi10010041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tadashi Ishida, David McLaughlin, Yuya Tanaka, Toru Omata	4. 巻 254
2. 論文標題 First-come-first-store microfluidic device of droplets using hydrophobic passive microvalves	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical	6. 最初と最後の頁 1005-1010
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.snb.2017.07.154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tadashi Ishida, Takuya Shimamoto, Nobuya Ozaki, Satoshi Takaki, Takahiro Kuchimaru, Shinae Kizaka-Kondoh and Toru Omata	4. 巻 7
2. 論文標題 Investigation of the Influence of Glucos Concentration on Cancer Cells by Using a Microfluidic Gradient Generator without the Induction of Large Shear Stress	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 155-1, 155-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi7090155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maho Kaminaga, Tadashi Ishida and Toru Omata	4. 巻 7
2. 論文標題 Fabrication of Pneumatic Microvalve for Tall Microchannel Using Inclined Lithography	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 224-1, 224-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi7120224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計25件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Tadashi Ishida, Kunitoshi Ikeda, Toru Omata
2. 発表標題 In-DropLet Peptide Screening Microfluidic Device Targeting Cancer Cell Spheroids
3. 学会等名 microTAS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神永 真帆, 石田 忠, 門之園 哲哉, 近藤 科江, 小俣 透
2. 発表標題 ペプチド探索マイクロ流路デバイスにおける 非標的細胞結合ペプチド除去性能の向上
3. 学会等名 第35回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松枝 遥, 石田 忠, 小俣 透
2. 発表標題 上下空圧バルーン構造を有するマイクロ流体デバイス
3. 学会等名 第9回 マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱井 瞭, 石田 忠, 小俣 透
2. 発表標題 スフェロイドを対象としたがん細胞結合ペプチド探索デバイスのための液滴制御
3. 学会等名 日本機械学会 2018 年度年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗生 謙, 石田 忠, 小俣 透
2. 発表標題 がん細胞スフェロイド群を用いた抗がん剤ペプチド探索デバイス-流体挙動の観察とスフェロイド群の構築-
3. 学会等名 ロボティクス・メカトロニクス講演会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田 忠, 池田 国利, 小俣 透
2. 発表標題 がん細胞スフェロイドを対象とした液滴内ペプチド探索のための未付着ペプチド洗浄デバイス
3. 学会等名 ロボティクス・メカトロニクス講演会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 門之園 哲哉
2. 発表標題 抗体医薬品を代替する標的結合小型タンパク質デザイン
3. 学会等名 バイオフィーマージャパン2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Kadonosono
2. 発表標題 A design strategy for creating antibody mimetic small proteins for cancer treatment
3. 学会等名 Japan-Taiwan International Engineering Forum 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Kadonosono, Wanaporn Yimchuen, Kyra See, Yumi Ota, Marina Katsumi, Takahiro Kuchimaru, and Shinae Kizaka-Kondoh
2. 発表標題 A design strategy for creating practical middle-molecular-mass antibody mimetics having structurally constrained HER2-binding peptides
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田 忠, 田中 優弥, 門之園 哲哉, 近藤 科江, 小俣 透
2. 発表標題 スラグ内部循環流によるペプチドのがん細胞スフェロイドへの付着効率の向上
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ROBOMECH2018
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池田 匡利, 石田 忠, 小俣 透
2. 発表標題 スフェロイドを対象としたがん細胞結合ペプチド探索の洗浄過程デバイス
3. 学会等名 第34回センサシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 栗生 識, 石田 忠, 門之園 哲哉, 近藤 科江, 小俣 透
2. 発表標題 がん細胞スフェロイド群を用いた抗がん剤ペプチド探索デバイス
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第35回研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 門之園 哲哉
2. 発表標題 構造ゆらぎ制御による小型抗体代替分子の創出
3. 学会等名 日本蛋白質科学会第3回蛋白質工学研究会ワークショップ『小分子抗体関連技術』（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石田忠、田中優弥、門之園哲哉、近藤科江、小俣透
2. 発表標題 スラグ内部循環流によるペプチドのがん細胞スフェロイドへの付着効率の向上
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
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中 優弥, 石田 忠, 門之園 哲哉, 近藤 科江, 小俣 透
2. 発表標題 スフェロイドを対象としたスラグ流内ペプチドスクリーニング手法
3. 学会等名 第33回センサ・マイクロマシンとその応用シンポジウム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 門之園 哲哉
2. 発表標題 化学合成可能な高性能抗体代替分子の開発技術
3. 学会等名 ペプチド医薬品の市場予測・事業化戦略と製剤化技術の開発（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 濱井 瞭, 石田 忠, 小俣 透
2. 発表標題 スフェロイドを対象としたがん細胞結合ペプチド探索デバイスの自動化：洗浄過程の評価
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松 和樹, 小俣 透
2. 発表標題 栄養状態を反転させた細胞凝集体の形成を可能にするデバイス
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱井 瞭, 石田 忠, 小俣 透
2. 発表標題 スフェロイドを対象としたがん細胞結合ペプチド探索デバイスの自動化
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2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神永 真帆, 石田 忠, 小俣 透
2. 発表標題 標的細胞特異的結合分子付着効率向上のためのマイクロ流路高さ切り替え
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2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田 忠, 松枝 遥, 小俣 透
2. 発表標題 大断面マイクロ流路のための上下空圧バルーン型バルブの開発
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2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門之園 哲哉
2. 発表標題 標的結合ペプチドを利用する小型タンパク質医薬デザイン
3. 学会等名 第2回モダリティ創薬デザイン研究会シンポジウム『成長するモダリティ創薬の展望』（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuya Kadonosono
2. 発表標題 A design strategy for generating cancer marker-binding small proteins
3. 学会等名 Nano-Bio Research-Industry International Symposium 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門之園 哲哉
2. 発表標題 抗体医薬の代替となる小型タンパク質の半合理デザイン
3. 学会等名 第71会日本生物工学会 シンポジウム『タンパク質工学におけるドライ-ウェット技術融合の新展開』（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門之園 哲哉
2. 発表標題 標的結合ペプチドを搭載した小型タンパク質FLAPのデザイン
3. 学会等名 第51回若手ペプチド夏の勉強会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

小俣・石田研究室 http://www.bmm.mech.e.titech.ac.jp/

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・助教 (12608)	

