

令和元年6月20日現在

機関番号：83205

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12919

研究課題名(和文) 1滴の血液中存在する1個の血中循環腫瘍細胞を捕捉するナノファイバーフィルターの開発

研究課題名(英文) Development of nanofiber filter to capture one circulating tumor cell in a drop of blood

研究代表者

寺田 堂彦(Terada, Dohiko)

富山県産業技術研究開発センター・その他部局等・主任研究員

研究者番号：10454555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：血液中に極わずかに存在する血中循環腫瘍細胞(CTC)を分析することによって、癌の早期診断、予後診断あるいは効果的な抗癌剤の選定に役立つ情報を得ることができる。この研究では、CTCを高感度で捕捉するためのナノファイバーフィルターの開発を目指した。ナノファイバーを作製するための素材、作製方法、また、作製したナノファイバーの表面改質条件等について種々の検討を行い、癌由来の培養細胞を用いて、その捕捉性能を評価した。その結果、CTC表面マーカーに対する抗体を固定化したナノファイバーは、同抗体を平面に固定化した場合よりも、効率よくCTCを捕捉できる可能性を示す結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

標的細胞と抗体担持ナノファイバーとの接触が、たとえ短時間に限定され、かつ、接触本数が数本であっても、平面で捕捉する場合よりも、高い捕捉効率を示すことが確認された。ナノファイバーという形態を有する材料に対して、細胞がよく接着することは、従来から報告されている。これは、細胞自体がナノファイバーを能動的に認識することに起因している。本研究では、この能動的な応答性を利用することで、抗体によるCTCの捕捉効率を上げられることを示唆する結果が得られた。これは、CTC捕捉デバイスの検出感度を上げるための有用な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor cells (CTCs) are shed from the primary tumor tissues, and are circulating through peripheral blood. Although these cells are extremely rare among blood cells, CTCs could provide dynamic and thought-provoking information about the tumor. Enumeration of CTCs in a patient's bloodstream has proven prognostic value of progression of metastasis and recurrence. Furthermore, analyzing captured CTCs might help to identify the most effective or ineffective drugs. The purpose of this research project is to develop a nanofiber filter to capture CTCs with high efficiency. Different kinds of materials were tried to make nanofibers as an optimal substrate under various conditions, which were accompanied with cell capture tests by using cultured cells derived from tumor tissues. The result showed that antibodies-supported nanofibers could capture target cells more efficiently than antibodies-supported flat surface did.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：血中循環腫瘍細胞 ナノファイバー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血中循環腫瘍細胞 (CTC) は、癌の転移、拡大において重要な役を担っていることが広く認識されている。また、5 mm 以下の初期がんからも CTC は発生するため、わずかな血液から高い確率で CTC を捕捉して、低侵襲な採血により癌を早期発見することが期待されている。CTC を捕捉回収するシステムは、現状では腫瘍細胞の上皮細胞接着分子 (EpCAM) に対する抗体を利用して捕捉する方法が主流である。しかし、CTC は、上皮間葉転換 (EMT) により、上皮性を失って EpCAM 発現量が低下する場合があることが知られており、初期のがん患者の 70% で、転移がん患者では 100% で EMT を起こした CTC が生じているとの報告もある。従って、このような捕捉回収システムでは、EMT を起こした EpCAM 発現が低い CTC の捕捉確率は極端に低下することが予想され、米国 FDA 唯一の承認システムである CellSearch® (EpCAM 抗体による捕捉システム) では、肺がんや結腸がんの検出率は 20% を下回る (がん患者 100 人中の 80 人では CTC が見逃される可能性がある) という報告もある。このように、現状では、EpCAM 発現量が低い CTC は高確率で捕捉できておらず、CTC は信頼性の高い診断ツールとはなっていない。

### 2. 研究の目的

近年、EpCAM 抗体による CTC 捕捉システムの中で、マイクロ流体デバイスを利用したものが有望視されている。その特長は、マイクロ構造の大きな比表面積を利用して抗原抗体反応の効率を上げられる点にあり、臨床サンプルからの CTC 検出に成功しこのようなデバイスの有用性を実証している。しかし、EMT 等を起こした EpCAM 発現の低い CTC については未だ十分な捕捉性能を達成できておらず、改良が行われている。そこで、本研究では、ナノメトリアルの材料特性 (極端に低い流体抵抗、広大な比表面積など) を利用することにより、抗原抗体反応の反応効率の高い捕捉基材を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 試料作製

エレクトロスピンニング法により、ファイバー作製を行った。キトサン (Mv=480,000, DDA>98%; Mv=1,000,000, DDA>80%) およびポリエチレンオキシド (Mv=4,000,000) を、質量比 8 : 1 : 1 で酢酸水溶液 (90 v%) に溶解して紡糸溶液とし、エレクトロスピンニング (印加電圧 9 kV、吐出速度 0.25 ml/h、紡糸距離 170 mm、ノズル径 22G、環境温度 20±5、相対湿度<30%) を行った。紡糸時間を 20 秒として、カバーガラス (18×18 mm) 上へ紡糸した後、シリコンリング (内径 5 mm、厚さ 0.5 mm) を貼付した。

得られたキトサンファイバーを、0.05 mM 水酸化ナトリウムのエタノール溶液を用いて中和処理し、純水で十分に洗浄した後、2 種類のポリエチレングリコール (PEG) をグラフトした。末端にそれぞれビオチンと N スクシンイミドエステルを有する PEG (Mn=3,000) を、HEPES (pH=8.0) に 10 mg/ml 濃度で溶解し、シリコンリング内側へ 30 µl を滴下した。4 時間で 15 h の反応を行った後、純水で十分に洗浄した。さらに、キトサンファイバー表面の未反応アミノ基をブロッキングするために、末端がそれぞれメトキシと N スクシンイミドエステルを有する PEG (Mn=2,000) を、HEPES (pH=8.0) に 100 mg/ml 濃度で溶解し、シリコンリング内側へ 30 µl を滴下した。4 時間で 15 h の反応を行った後、純水で十分に洗浄した。アビジン/PBS (pH=7.2、160 µg/ml 濃度) を 30 µl、シリコンリング内側へ滴下し、1 h 静置した後、純水で洗浄した後、ビオチン化抗体を反応させることによって、キトサンファイバー表面に抗体を固定した。

#### 捕捉実験

30 µl の培地 (10% FBS 含有) に約 1,000 個の細胞を含む懸濁液を調製し、シリコンリング内側へ滴下して、37 °C の CO<sub>2</sub> インキュベータ内に 10 min 静置した。播種した細胞がすべて沈降した状態で、細胞数を計測するために、位相差顕微鏡下でシリコンリング内側を撮影した。その後、細胞を播種した面を下にして 37 °C PBS 中へ浸漬し、37 °C の CO<sub>2</sub> インキュベータ内に 10 min 静置して、ファイバーに捕捉されていない細胞を脱落させた。その後、再度、シリコンリング内側を撮影して細胞数を計測し、播種数と残留数の比率を捕捉率とした。臨床検体からの捕捉シミュレーションとして、30 µl の培地 (10% FBS 含有) に約 3,000 個のリンパ球 (CCRF-CEM 細胞) を含む懸濁液を調製し、そこへ 10 個の株化癌細胞を混入したモデル血液を作製し、上記と同様の操作により捕捉性能の評価を行った。実験に用いた株化ヒト癌細胞は、MCF-7 細胞、MDA-MB-231 細胞、HeLa 細胞である。また、実験に用いた抗体は、抗 EpCAM 抗体、抗 ErbB-2 抗体、抗 CD9 抗体である。ただし、抗 ErbB-2 抗体は、ErbB-2 の細胞内ドメインに対する抗体であり、ネガティブコントロールとして用いた。

### 4. 研究成果

エレクトロスピンニング法により紡糸したキトサンファイバーを、電子顕微鏡を用いて観察したところ、ビーズや粒子を含まない、ほぼ均質なファイバー (平均径 141 nm、標準偏差 21 nm、n=61) が得られていることが確認された (図 1)。ゼータ電位測定を行ったところ、PEG グラフト処理前後で大幅なゼータ電位の低下 (-14.1 ~ -34.0 mV) が認められたことから、PEG はグラフトされていると判断した。また、動的散光法により、メトキシ末端 PEG およびビ

オチン末端 PEG の流体力学半径を測定したところ、それぞれ 3 nm と 4 nm であったことから、これらの PEG をグラフトしたキトサンファイバーの表面には、3~4 nm 程度の水和した PEG 層が形成されているものと推定された。

作製されたキトサンファイバーに種々の抗体を固定し、捕捉実験を行った結果を図 2 に示す。また、抗体担持ファイバーの捕捉性能を比較評価するために、同じ素材で作製した抗体担持スピコートフィルムでも同様の試験を実施した。PEG をグラフトしない場合、ファイバー、フィルムともに、非特異的な細胞接着が生じる場合があることが確認された。これは、キトサンが細胞接着性の材料であるためであるが、この非特異接着はグラフト処理によって抑制できることが確認された。抗 ErbB-2 抗体（ネガティブコントロール）を固定した場合、ファイバーにはいずれの細胞もほとんど捕捉されなかったが、フィルムには MDA-MB-231 細胞が非常に多く捕捉された（90 %）。同様の傾向は、抗 EpCAM 抗体の場合にも認められた。すなわち、EpCAM をほとんど発現していない MDA-MB-231 細胞は、抗 EpCAM 抗体を固定したファイバーにはほとんど捕捉されない（3 %）のに対して、フィルムでの捕捉率は 67 %であった。表面抗原に対応しない抗体を用いた場合に呈される高い捕捉率は、いずれも非特異的な接着によるものと考えられる。このことから、細胞と面で接触するフィルムは、非特異的な接着を惹起する傾向がある一方、疎に分散したファイバーでは、細胞との接触面積が限定されるため、非特異接着が誘発されにくかったと考えられる。他方、抗 CD9 抗体を固定した場合、CD9 を発現しているはずの MCF-7 細胞と HeLa 細胞は、フィルムではほとんど捕捉されない（それぞれ 1 %、2 %）のに対して、ファイバーではそれを大幅に上回る捕捉率（同 43 %、46 %）となった。抗体固定フィルムで低い捕捉率となったのは、おそらく接触時間が 10 min. と限定的であったためと推察されるが、しかしながら、ファイバーという材料形態であれば、限定的な接触時間であっても、ある程度の捕捉が可能であることが示唆された。

図 3 に、抗 CD9 抗体担持ファイバーで捕捉された MDA-MB-231 細胞の走査型電子顕微鏡画像を示す。図から、細胞は、ごくわずかな本数のファイバーのみと接触していることがわかる。接着細胞は、所謂ナノファイバーや、ナノメートルスケールで表される凹凸等を有する材料表面に対して、短時間でよく接着することが一般的に知られている。これは、接着細胞の本来の生着環境に存在する生体線維（コラーゲン線維、他）が、ナノメートルスケールで表される大きさの範囲に存在するためと説明されている。本研究であられた結果も、おそらく同様の説明が適用できると考えられる。すなわち、抗体担持ファイバーに対しては、わずかな本数に対しての短時間の接触であっても、細胞のある種の能動的な応答性によって、微小な接触面積であったとしても、抗原抗体反応が効果的に生じ事により、標的細胞は効率的に捕捉された。一方で、接触面積が微小なため、非標的細胞の非特異的な接着は抑制されたと考

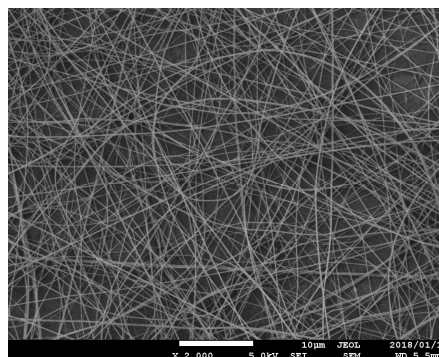


図 1 エレクトロスピンニング法によって作製されたキトサンファイバーの走査型電子顕微鏡画像

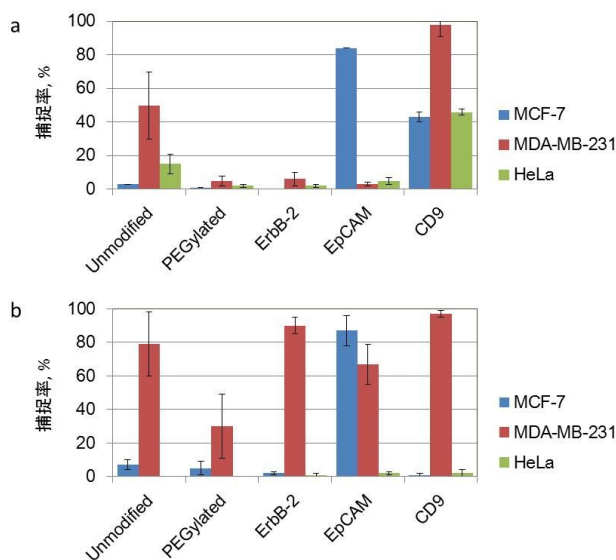


図 2 捕捉率測定の結果(a ファイバー、b フィルム)

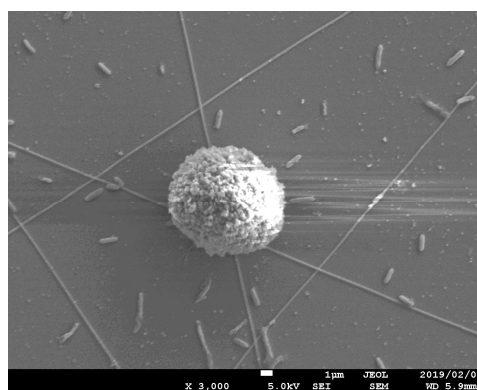


図 3 抗 CD9 抗体担持ファイバーで捕捉された MDA-MB-231 細胞の走査型電子顕微鏡画像

えられる。

臨床検体のモデルとして作製した懸濁液を用いて捕捉実験を行ったところ、抗体担持ファイバーによって、無数に存在する血球細胞の中にわずかに存在する標的細胞を捕捉することが可能であることが確認された。ただし、血球細胞が存在しない場合と比較して、捕捉率は低下する傾向が示唆された。捕捉率が低下する原因は、現時点では不明であるが、血清と血球細胞の共存下であっても、抗体担持ファイバーが機能することが確認された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

寺田堂彦、大永 崇、血中循環腫瘍細胞を高感度検出するためのフィルターの開発、第 40 回日本バイオマテリアル学会大会、ポスター発表 2P082

寺田堂彦、大永 崇、キトサンファイバーを基材とした希少細胞検出デバイスの開発、2019 年繊維学会年次大会、口頭発表 2D04

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：大永 崇

ローマ字氏名：Ohnaga Takashi

所属研究機関名：富山県産業技術研究開発センター

部局名：ものづくり研究開発センター

職名：副主幹研究員

研究者番号 (8 桁): 10416133

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。