

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：82626
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：20H02597
研究課題名（和文）1細胞単位電気化学発光計測技術によるマーカー分子微量発現がん細胞の超高感度検出

研究課題名（英文）Detection of target molecules expressed on a cell surface based on electrochemiluminescence

研究代表者
金 賢徹（Kim, Hyonchol）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：70514107
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では(1)電気化学発光(ECL)計測による標的細胞表面マーカー分子検出技術の改良、(2)血中循環がん細胞検出をモデルケースとした標的細胞の検出実証の、2つの課題を設定した。技術開発の中心は(1)であり、ECL計測チップと検出プローブ双方の改良を推進した。計測チップは、基板上に細胞と同直径程度の半球凹状窪みを多数配置したカップ型微小電極アレイを作製し、細胞を効率的に捕捉することに成功した。検出プローブは、直径数十nmのナノ粒子にルテニウム錯体と抗体を同時標識した微粒子プローブを新たに開発することで、ECL輝度の向上に成功した。以上の結果、標的細胞のECL検出感度を向上させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中循環がん細胞検出など、血液中の特定の細胞を検出し診断する技術は、検査時の身体的な負担が少ないことから開発が盛んに行われているが、一方で課題も残る。そのひとつは検査時の偽陰性の問題であり、具体的には細胞の特性変化などによりマーカー分子の発現量が変化し、標的細胞を見逃してしまうものである。本研究は、標的細胞の検出感度を極限まで向上させることにより、これまで見逃されていたマーカー分子微量発現細胞を検出することで、血中標的細胞検査の信頼性を向上させることに貢献すると考えている。これにより、例えば転移がんなどを早期に検出することで治療の奏効率を向上させ、人々のQOL向上に貢献できると考えている。

研究成果の概要（英文）：The main objectives of this work were: (1) improvement of the detection technology of target marker molecules on a cell surface by electrochemiluminescence (ECL), and (2) evaluation of the detection of target cells, such as circulating tumor cells, as a model case. Main topic of technological development was (1), and the improvements were performed on both the chip in ECL measurement and the probe in ECL detection. The chip was fabricated by creating cup-shaped microelectrode array on a substrate with many hemispherical concaves with almost same diameter as target cells, and successfully captured cells efficiently. In the development of ECL probe, we succeeded to improve ECL brightness by developing a new nano-particle probes on which both ruthenium complexes and antibodies were simultaneously immobilized. In results of the above improvements, we succeeded to improve the sensitivity of ECL detections of target cells.

研究分野：バイオセンシング

キーワード：電気化学発光 がん細胞 微小電極 微粒子 ナノ粒子

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

血中循環がん細胞（Circulating tumor cell, CTC）の検出によるがん検査は、身体的・経済的負担が少ない検査法として注目されている。その代表的検査法の概要は、EpCAM（上皮細胞接着因子）など正常血液細胞では発現しておらずがん細胞でのみ発現していると考えられるマーカー分子を指標として CTC を標識し、蛍光計測により CTC を検出する。一方、この検査法では、マーカー分子の発現量が極めて低いがん細胞をいかに見逃さず検出するかが課題である。例えば、がん細胞の転移能上昇に深く関わる性質変化と考えられている上皮間葉転換（epithelial-mesenchymal transition, EMT）が進行したがん細胞では EpCAM 発現量が低下し、EMT 前後のモデルがん細胞を用いた比較結果では、EpCAM タンパク質発現量が約 1 桁低下することが報告されている。EpCAM などのマーカー分子を蛍光計測する現在の CTC 検査法では、この発現量低下により CTC を見逃してしまう擬陰性の問題がある。この解決を目指して、EpCAM など既存マーカー分子に加え、CTC をより正確に捉えるための様々なマーカー分子の併用が提案されているが、がん細胞の多様性のため如何なるマーカー分子セットを用いても微量発現がん細胞は生じる。この問題を本質的に解決するには、マーカー分子発現量が低下した CTC を検出できる水準にまで、計測技術を高感度化する必要がある。

蛍光法の検出感度を凌駕する技術のひとつに、電気化学発光（Electrochemiluminescence, ECL）による計測法がある。ECL は、電圧が印加された電極近傍にレドックス活性を有する基質と共反応物が存在した際、酸化還元反応の結果として発光する現象で、例えばルテニウムトリスピリジン錯体（以下、Ru 錯体）とトリプロピルアミン（共反応物、以下 TPA）を用いた場合、波長約 620nm の ECL が生じる。励起光が不要であることから背景光ノイズを極限まで抑えられるため、極めて高い検出感度が達成されている。一方、ECL は一般的に電極ごく近傍のみで生じる発光現象であるため、背景ノイズが低減されるという利点の反面、細胞（直径約 10 μ m）のような大きな物体に対して相性が悪く、ECL による細胞表面分子の直接計測例はこれまでにほとんど無い。しかし、もし EpCAM など細胞表面マーカー分子の検出に ECL 計測を適用できれば、CTC 検査での課題克服に繋がると期待できる。この実現策のひとつは、細胞と同程度の曲率を持つ曲面電極を作製して、細胞表面の広範囲を電極表面と密接させた状態で ECL 計測を行うことが考えられる。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、細胞と同程度の直径でお椀（カップ）形状の微粒子を作製し、細胞をカップ窪み部分にサイズ選択的に捕捉することで回収する技術を開発した。さらに、本カップ形状微粒子の凹面側に、超低ノイズ薄膜電極であるナノカーボン（NC）電極を構成した「カップ型 NC 電極」を作製した。本研究では、この微小電極の特徴的な構造を活かし、がん細胞などの標的細胞を Ru 錯体修飾抗体で標識し、カップ型 NC 電極の凹面窪みに捕捉して電圧を印加することで、ECL 計測により検出する基盤技術を開発することを目的とした。具体的には、CTC 検出の際にマーカー分子のひとつとして用いられる EpCAM をモデルマーカー分子とした上で、以下の 2 つの課題を設定し研究を推進した。

課題①：カップ型 NC 電極を用いた ECL 計測による標的細胞検出技術に対して、特にマーカー分子標識プローブの改良を行うことで、選択性の向上、ECL 検出感度の向上を実現する。

課題②：計測チップデザインやカップへの細胞捕捉法の改良を行うことで、多数の細胞を迅速に計測し標的がん細胞を高効率に検出する基盤技術を確立する。

3. 研究の方法

【①マーカー分子標識プローブの改良による ECL 検出感度の向上】

カップ型 NC 電極を用いて、ECL によりがん細胞表面マーカー分子である EpCAM を検出する概要は、以下のとおりである（図 1）。はじめに、ECL 発光プローブである Ru 錯体が結合した抗 EpCAM 抗体でがん細胞表面の EpCAM を標識する。このがん細胞を、ECL 共反応物である TPA を添加したリン酸緩衝液に懸濁し、基板上に多数整列配置したカップ型 NC 電極の上に滴下して捕捉する。電極（カップ）と溶液間に電圧を印加すると、がん細胞が捕捉されたカップから ECL が生じる。

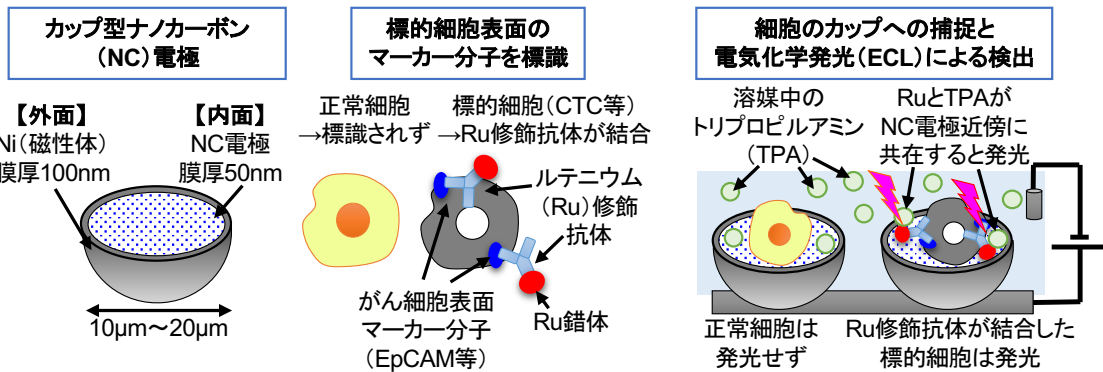


図1 カップ型ナノカーボン(NC)電極による標的細胞検出技術の概要

予備検討では図1に示すように、抗EpCAM抗体に対してRu錯体を直接修飾していたが、抗体1分子あたり修飾可能なRu錯体数は限られており、また多数のRu錯体を抗体に修飾すると抗体の標的結合能が低下する課題があった。そこで本研究では、ナノ粒子を標識プローブとして用いる方法を新たに開発した。具体的には、表面にカルボキシル基が導入されたシリカナノ粒子に対して、アミノ基を導入したRu錯体および抗体を共有結合により修飾した。このRu錯体/抗体同時修飾ナノ粒子（以下ナノ粒子プローブ）をEpCAM発現ヒト乳がん細胞株と混合することで、がん細胞表面のEpCAMをナノ粒子プローブで標識した。Ru錯体はECLを生じることに加えて励起光照射により蛍光も発する性質を有するため、ナノ粒子プローブ1粒子あたりのRu錯体修飾数は、同粒子懸濁液の蛍光スペクトルを計測することで定量化した。

【②】細胞前処理法と電極への細胞捕捉法の改良による多数細胞の迅速計測技術の開発

CTC検出のような応用用途を見据えた場合、多数の細胞を迅速に計測し標的細胞を検出する必要がある。この実現のためには、細胞を確実にカップ型NC電極に捕捉し、かつ捕捉された細胞が標的細胞である場合、確実にECLを生じるよう計測前処理を工夫する必要がある。予備検討では図1に示すように、導電性を有する粘着材の表面にカップ型NC電極を開口部を露出した状態で多数配置し、そこに細胞懸濁液を滴下してECL計測を行った。この方法では、カップが基板表面から突出している構造となるため、カップに細胞が捕捉されず基板にこぼれ落ち、結果的に細胞捕捉率が低下する課題があった。そこで本研究では、三次元微細加工技術を応用して基板表面に半球状の窪みを多数作製し、そこにNC電極を成膜したディンプル状NC電極を作製した。次に、捕捉した標的細胞から確実にECLが生じるよう改良を行った。具体的には、ECLは電極表面ごく近傍でのみ生じる現象であることから、ECL計測時に電極と細胞表面間の距離が密接している必要があるため、遠心操作による細胞の電極表面への密着処理を検討した。

4. 研究成果

【①】マーカー分子標識プローブの改良によるECL検出感度の向上

ECL計測による標的マーカー分子の検出感度を向上させるためには、標的マーカー分子1分子あたりに標識するRu錯体数を増やすことが効果的である。本研究では、ヒト乳がん細胞株表面のEpCAMをモデルマーカー分子として評価を推進した。本研究でははじめに、EpCAMと選択的に結合する抗体にRu錯体を標識し、細胞表面のEpCAMを標識した。抗体へのRu錯体修飾では、抗体のEpCAM結合能をなるべく保った状態であるべく多数のRu錯体を抗体1分子に修飾する必要があると見積もることができた。しかし、この方法ではEpCAM発現量が少ないがん細胞を検出するには十分とは言えず、さらにECL輝度を向上させる必要があった。そこで、シリカナノ粒子表面にRu錯体と抗体を同時に修飾した、ナノ粒子プローブを新たに開発した。本プローブは、粒子表面の異なる部位にRu錯体と抗体をそれぞれ修飾するため、抗体にRu錯体が直接結合することがなく、そのため抗体のEpCAM結合能低下の恐れが小さくなる。また、粒子表面に多数のRu錯体を修飾することで、EpCAM1分子あたりのRu錯体標識数を増加させられると期待できる。Ru錯体の蛍光スペクトルを計測からナノ粒子プローブ1粒子あたりのRu錯体修飾数を定量化した結果、1粒子あたり500分子以上のRu錯体が修飾されていると見積もることができた。この結果は、単純計算でECL計測時の発光輝度が50倍以上向上すると期待できることを示している。

【②】細胞前処理法と電極への細胞捕捉法の改良による多数細胞の迅速計測技術の開発

CTC検出のように多数の細胞を迅速に計測する必要がある場合、多数のカップ型微小電極を配置し、そこに細胞を高効率で捕捉し、捕捉した標的細胞からは確実にECLが生じるようにする必要がある。この実現のためには、はじめに電極形状の改良を行った。三次元微細加工技術を応

用することにより、基板上に直径 10~30nm の半球状窪みを多数配置した、ディンプル状 NC 電極を作製した (図 2)。従来型電極ではカップが基板表面から突出している構造であったため細胞捕捉効率に課題があったが、本ディンプル状 NC 電極を用いることにより、細胞捕捉率が 7 倍以上に向上した。

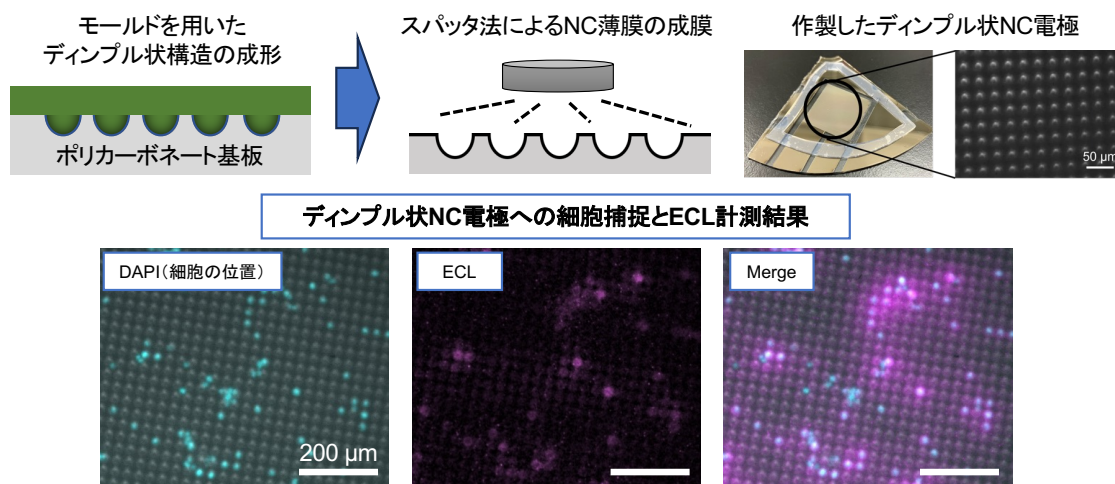


図2 ディンプル状NC電極への細胞捕捉とECL計測結果

ECL 計測では、Ru 錯体が電極表面に近接しているほど効率的に発光することが知られている。すなわち、マーカー分子を Ru 錯体で標識した細胞表面と電極表面の距離が近いほど、ECL が確実に生じると期待できる。これまでは Ru 錯体で標識した細胞懸濁液をカップ型電極上に滴下し、細胞が自発的にカップに捕捉された後に計測を行っていたが、カップ (電極) 表面と細胞表面の密着性が乏しく、ECL 発光効率が悪い課題があった。この解決のために、細胞懸濁液を滴下した後に遠心処理を行うことで、カップ表面と細胞表面の密着性を高めることを試みた。その結果、ECL が生じる細胞の割合が 20 倍以上に向上し、多数の細胞を迅速に検査する基盤を整えることに成功した。

以上のように、本研究ではカップ型微小電極を用いて、血液中の細胞のような接着性に乏しい細胞を ECL 計測により高感度かつ迅速に計測する基盤技術開発に成功した。今後は、臨床血液サンプルを用いた CTC 計測に本技術を適用するなど、成果の社会実装に向けて開発を推進することを目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 佐々木 太朗、内山 臯生、鎌田 智之、加藤 大、小島 直、山村 昌平、金 賢徹
2. 発表標題 Development of a technology to detect surface molecules on non-adherent cells by using Cup-shaped microelectrodes
3. 学会等名 The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木 太朗、内山 臯生、鎌田 智之、加藤 大、小島 直、山村 昌平、金 賢徹
2. 発表標題 カップ型微小電極を用いた非接着細胞表面分子計測技術の開発
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗山 愛理、鎌田 智之、加藤 大、小島 直、山村 昌平、金 賢徹
2. 発表標題 Detection of target biomolecules expressed on a cell surface based on electrochemiluminescence by using cup-shaped microelectrode
3. 学会等名 Biosensors 2021, 31st Anniversary World congress on Biosensors (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内山 臯生、栗山 愛理、鎌田 智之、加藤 大、小島 直、山村 昌平、金 賢徹
2. 発表標題 電気化学発光計測によるがん細胞表面発現マーカー分子検出技術の開発
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金 賢徹
2. 発表標題 Detection and evaluation of specific single cell by using "magcup"
3. 学会等名 12th ISAJ Annual Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗山 愛理、鎌田 智之、加藤 大、小島 直、山村 昌平、金 賢徹
2. 発表標題 Electrochemiluminescence-Based Detection of Cell Surface Biomolecules by Using Cup-Shaped Microelectrodes
3. 学会等名 PRiME2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗山 愛理、内山 皇生、鎌田 智之、加藤 大、小島 直、山村 昌平、金 賢徹
2. 発表標題 カップ形状微小電極への細胞捕捉と電気化学発光計測による細胞表面発現分子検出技術の開発
3. 学会等名 日本応用物理学会第81回秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	加藤 大 (Kato Dai) (80533190)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長 (82626)	

6. 研究組織（つづき）

	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	小島 直 (Kijima Naoshi) (30356985)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	
研究分担者	山村 昌平 (Yamamura Shohei) (50432141)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究 グループ長 (82626)	
研究分担者	中村 史 (Nakamura Chikashi) (40357661)	東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・客員教授 (12605)	

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