

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790156

研究課題名（和文）マイクロチャンバーを用いたトランスポーター輸送効率スクリーニングシステムの構築

研究課題名（英文）Development of measurement system of drug efflux transporter activity using microchamber array

研究代表者

津金 麻実子（TSUGANE MAMIKO）

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：00469991

研究成果の概要（和文）：本研究では、半導体微細加工技術により作成したマイクロチャンバーアレイを用いて、薬剤耐性に関与する ABC（ATP-Binding Cassette）トランスポーターを介した抗がん剤の排出を蛍光イメージングにより計測するシステムを開発した。培養細胞を用いた初期的なシステムの条件検討を行ったが、本システムは患者から採取したがん細胞に対する薬剤の輸送効率を検出するアッセイ系の基盤となり得ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this research, a system to measure the transportation efficiency of anti-cancer agents via ATP-binding cassette (ABC) transporter, which is involved in drug resistance, was developed. This system utilizes fluorescent imaging from a microchamber array fabricated using semiconductor microfabrication technology. Although a preliminary study of the system conditions was conducted using cultured cells, this system may possibly become the basic assay system for determining the drug transportation efficiency in cancer cells harvested from patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：マイクロチャンバー、トランスポーター、抗がん剤、臨床薬学

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤治療においては標準的レジメンが設定されているが、効果不十分な例、また初回は効果を示しても後に薬剤耐性となって奏効しない例があり、がんの完全治癒は困難で、副作用に苦しむ患者も多いのが現状である。これは、抗がん剤による治療効果や副作用発現の個人差、がん細胞の耐性獲得に起因する。臨床上問題となるのが、がん細胞がある抗がん剤に対して耐性を獲得すると、構造や作用機序が異なる抗がん剤にも耐性を示す多剤耐性である。薬剤耐性の発現に寄与する主要な因子として ABC (ATP-Binding Cassette) トランスポーターが挙げられる (Haimeur et al., *Cur Drug Metabol.* 5, 21-53, 2004)。ABC トランスポーターは細胞膜上に発現し、ATP を利用して生理活性物質や薬剤を細胞内から細胞外へ排出する膜輸送タンパク質である。効果が期待できない投薬や副作用を回避し、より有効性の高い薬物療法を行うには、臨床現場において個々の患者のがん細胞に対する薬剤の応答性を直接検出できるツールが必要であると考えられる。そこで、抗がん剤の排出に関与するトランスポーターの機能を検出可能なデバイスを提案するに至った。このようなデバイスの確立にあたり、着目したのがマイクロチャンバーである。マイクロチャンバーはガラス基板上に、細胞より小さい直径数マイクロメートル、深さ数マイクロメートルの微小チャンバーアレイを構築して作成した、体積ピコリットルオーダーの微小空間である。このマイクロチャンバーに細胞を密着させて閉じられた微小空間とすれば、細胞膜を介して排出され、この空間内に蓄積された薬剤を定量的に検出できるのではないかと推測される。近年、半導体微細加工技術などのナノテクノロジーの技術を生体分子解析に応用したナノバイオデバイスの研究が進展し、製造技術の専門家だけでなく、生物分野の研究開発にも利用されている。ナノオーダーのポア (穴) が開いたアレイに細胞膜断片を接着させることが可能で、 σ -hemolysin を導入した人工脂質膜をアレイ上に作成し、蛍光物質がその膜を通過する様子を計測可能との報告がある (Danelon et al., *Lungmuir* 22, 22-25, 2005; Hemmler et al., *Biophys J.* 88, 4000-4007, 2005)。しかし、マイクロチャンバーアレイを用いて、インタクトな細胞での膜タンパク質で実際に薬物輸送の機能を測定したとの報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、微細加工により作成したマイクロチャンバーアレイを用いて、抗がん剤の多剤耐性に関与する ABC トランスポーターを介した、抗がん剤の排出を検出する新規スクリーニングシステムの構築を目的とする。抗がん剤の個別化療法 (オーダーメイド医療) を見据えて、患者から採取したがん細胞の薬剤排出活性を直接計測し、抗がん剤選択の指標として使用可能なアッセイ系の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) マイクロチャンバーの作製

①PDMS (ポリジメチルシロキサン) 製チャンバーの作製

直径 2 インチのシリコン基板上に、ネガ型の高アスペクト比フォトリソグレイ (SU-8) をパターンニングし、チャンバーの鋳型を作製した。測定に使用する HeLa 細胞の大きさは直径 30 マイクロメートル程度であるため、細胞がチャンバーの中に入り込まない大きさ (直径が数~十マイクロメートル程度、深さも同様に数~数十マイクロメートル) のチャンバーを設計した。その鋳型に PDMS 樹脂を流し込み、硬化させることでチャンバーを作製した。鋳型から剥がしたチャンバーは、カバーガラスに接着させて測定に使用した。

②パリレン (ポリパラキシリレン) 製チャンバーの作製

ガラス基板にポリパラキシリレンを 2-3 マイクロメートルの厚さで気相蒸着した後、アルミの薄膜を蒸着・パターンニングし、これをマスクとして酸素プラズマによるドライエッチングを行った。これにより、直径が数~数十マイクロメートル、深さが 2-3 マイクロメートルのチャンバーを作製した。

(2) マイクロチャンバーへの細胞接着に対するコーティング剤の検討

PDMS チャンバーおよびパリレンチャンバーを、希釈したフィブロネクチン、コラーゲン I、ポリ-D-リジンでコーティング後、HeLa 細胞を播種して細胞の接着性を比較した。

(3) マイクロチャンバーへ播種した細胞における蛍光イメージングシステムの妥当性の検討

マイクロチャンバーに接着させた HeLa 細胞において、蛍光顕微鏡、CCD カメラを使用して、トランスポーターを介してマイクロチャンバー内に排出された抗がん剤パクリタ

キセルの蛍光イメージングを実施し、そのシステムの妥当性を検討した。

まず、HeLa 細胞に緑色蛍光タンパク質 GFP が付加した ABC トランスポーターMDR1 のプラスミドをトランスフェクションして MDR1 を過剰発現させ、フィブロネクチンコーティングした PDMS チャンバーに播種した。その際、細胞より径の小さいチャンバー上の基盤に細胞が密着し、チャンバー内が閉じられた空間となっていることを確認するため、蛍光デキストランをバッファに添加した。細胞接着後、顕微鏡観察して GFP を発現した細胞が密着し、蛍光デキストランが封入されているチャンバーを特定した。続いて、蛍光標識パクリタキセルをチャンバー上部のバッファに加えてインキュベーションすることで細胞内に取り込ませた。バッファを洗浄後、先ほど特定したチャンバーにおいてトランスポーターを介したパクリタキセルのチャンバー内への排出をタイムラプスで経時的に観察した。また、MDR1 阻害剤のベラパミルを用いて、パクリタキセルとの併用時に MDR1 発現細胞において細胞内からのパクリタキセルの排出が抑制されるかを検討した。

4. 研究成果

(1) マイクロチャンバーアレイの作製

マイクロチャンバーアレイの材質を2種類検討したが、作製や取り扱いの簡便性から PDMS を選択した。実験に使用する HeLa 細胞の大きさを考慮して、チャンバーの直径は 5-15 μm 、深さは 20-40 μm の数種類を、細胞の接着状態やチャンバー内に閉じ込めた蛍光試薬の検出をもとに検討し、サイズを決定した。また、薬物処理、インキュベート、顕微鏡観察を繰り返す際に目的としている細胞を見失わないために、チャンバーの配列や番号を記すなどのデザインを追加したマイクロチャンバーアレイを作製した。

(2) マイクロチャンバーへの細胞接着に対するコーティング剤の検討

本研究における抗がん剤排出アッセイでは、細胞がチャンバー上に広がって接着し、閉じた空間をつくる必要がある。PDMS はマイクロ構造の作製法の中で最も簡便であるが、細胞の接着性に難ありとの報告もあるため、PDMS とパリレンの2種類についてコーティング剤を検討した。ポリ-D-リジン、コラーゲン I、フィブロネクチンで比較した結果、

PDMS とパリレンのいずれの材質においても、フィブロネクチンをコートすると HeLa 細胞は基板上によく広がり、目的の接着状態を得られることがわかった。コーティング剤溶液にチャンバー全体を浸すコーティング方法であっても、チャンバーの直径が 15 μm 以下であれば、細胞がチャンバーの内に侵入することはなかった。

(3) マイクロチャンバーへ播種した細胞における蛍光イメージングシステムの妥当性の検討

蛍光イメージングを実施する際、GFP の蛍光融合タンパク質タグを付加したプラスミドを使用することで、MDR1 が発現した細胞を判別し、その細胞が接したマイクロチャンバーに焦点を当てることができた。また、MDR1 発現細胞と非発現細胞におけるチャンバー内の蛍光強度変化を比較することで、MDR1 特異的なパクリタキセルの排出が検出可能となった。

また、細胞を播く際に添加した蛍光デキストランが、細胞でふたがされているチャンバーにおいては細胞接着後にバッファを洗浄してもチャンバー内に留まっていることで、チャンバー内が細胞で密閉されていることを確認した。

本システムにおいて、パクリタキセルが細胞内に取り込まれる量、トランスポーターを通過してマイクロチャンバーに排出される量に関しては全く未知であるため、パクリタキセル処理濃度や、蛍光検出可能なパクリタキセルのチャンバー内への蓄積に要する時間と、時間経過に伴うパクリタキセルの蛍光の退色、細胞にダメージを与えないタイムラプス観察の時間間隔とのバランスを考慮した観察時間について検討し、条件を設定した。

マイクロチャンバー内の蛍光強度の上昇を確認できたとしても、それが蛍光標識パクリタキセルのトランスポーターが関与しない非特異的な蓄積、例えば細胞の不十分な密着による漏れの可能性も否定できないため、MDR1 阻害剤のベラパミルを用いた薬理的検討で確認した。

これまでのトランスポーターの機能解析は、蛍光・RI 標識薬剤を予め細胞内に取り込ませた後、細胞内に残存した量を測定する方法などであったのに対し、本システムは細胞外に排出された薬剤を微小空間に留めて、トランスポーターを介した排出をリアルタイムで直接観察する新たな方法である。

本研究では、トランスポーターを過剰発現させた培養細胞を用いてシステムの初期的

な基盤を構築した。将来的に臨床現場において、患者の腫瘍組織から分離した細胞で計測可能なツールとして発展させるには、トランスポーターのターンオーバーを考慮したチャンバーの設計など検討の余地があるが、本システムは、細胞内からトランスポーターを通過して排出される薬剤を定量的に評価するアッセイ系の基礎となり得ると考えられる。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津金 麻実子 (TSUGANE MAMIKO)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：00469991