

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23710138

研究課題名（和文） 循環腫瘍細胞を検出・捕捉する導電性ソフトプラットフォームの構築

研究課題名（英文） Functionalized Conducting Polymer Nanostructures for Enhanced Capturing and Monitoring of Circulating Tumor Cells

研究代表者

羅 世強 (LUO SHYH CHYANG)

独立行政法人理化学研究所・Yu 独立主幹研究ユニット・基幹研究所研究員

研究者番号：70565051

## 研究成果の概要（和文）：

この二年の間に、バイオコンジュゲーションに向けたカルボキシル基を有する導電性高分子の合成、導電性高分子によるナノ構造の作製、循環腫瘍細胞(CTCs)の捕捉プラットフォームの構築を達成した。ナノ構造の作製では、テンプレート法、テンプレートフリー法両方のアプローチにより達成した。CTCの捕捉実験では、コントロールである平滑な表面に対し、ナノ構造表面は4-5倍高い検出能を示した。また、腫瘍細胞を捕捉、剥離可能なプラットフォームを高分子グラフトしたシリコンナノ構造により作製した。

研究成果の概要（英文）：During these two years, we have accomplished several tasks, including synthesis of functionalized conducting polymers for bioconjugation, the fabrication of conducting polymer nanostructures and the protocol design of circulating tumor cells (CTC) capturing. For nanostructure fabrication, we demonstrated both template and template-free methods. We observed that the capture efficiency was enhanced by 4 - 5 times comparing to smooth films. We also developed a cell capture and release platform using polymer-grafted silicon nanostructures as the platform.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：循環腫瘍細胞を捕捉, 導電性ポリマー, ナノ構造, スマート・マテリアル

## 1. 研究開始当初の背景

循環腫瘍細胞 (CTCs) とは、がんが始まった場所にある原発性腫瘍から、血液やリンパ液中を流れて転移を引き起こすがん細胞です。がんではこの転移が主な死亡原因となっているため、CTCsの動向を正確に把握する必要があります。一般にがんの診断では、直接組織の一部を採取する生体組織診断が行われていますが、患者の身体的負担は少なくありません。それに比べて、血液検査だけでCTCsを検出する方法は、利便性に優れ、患者に負担が少なく、また早期発見に有用です。

## 2. 研究の目的

悪性腫瘍は死因のトップであり、その早期発見やマネジメントは、悪性腫瘍の診断及び治療におけるカギを握る。循環腫瘍細胞 (CTCs) は転移性腫瘍の主な原因だと考えられているが、既存の技術ではその極端に低い血液中での数 ( $1/10^9$  blood cells) が CTCs 検出の障害となる。そこで本研究では、導電性ポリマーによるナノバイオテクノロジーを基にしたプラットフォームを構築し、CTCsの検出をする。この導電性プラットフォームはナノ構造、表面修飾さらにはソフトな力学

特性を併せ持ち、末梢血液中での数が極端に少ない CTCs の検出及び捕捉を実現する。

### 3. 研究の方法

(1) CTCs の特異的検出と非特異吸着を抑制する機能性モノマーの調製

CTCs を含む大部分の癌腫は Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) と呼ばれるタンパク質を細胞膜に過剰発現している。導電性ソフトマテリアルを用い CTCs の検出・捕捉効率を評価ため、カルボキシル基など機能性官能基を有するモノマーを合成し、プラットフォームの構築に供する。一例として、カルボキシル基を有する場合は NHS-EDC カップリングによりストレプトアビジンを経由してコンジュゲーションすることで、そこにビオチン化抗 EpCAM の固定化が可能である。また非特異吸着の抑制のため、エチレングリコールを側鎖に有するモノマーの合成も行う。それ以外にも、生体膜を模したホスホリルコリンやベタイン等の両親媒性官能基を有するモノマーについても検討する。

タンパク質の非特異吸着の抑制能は、QCM(水晶発振子マイクロバランス法)により評価する。これらのモノマーはチオフェンベースのため、電解重合により QCM チップ上に導電性ポリマー薄膜を直接調製できる。評価の対象はホモポリマーのみならず、コポリマーについても行う。抗体の密度と非特異吸着抑制の条件を検討し、CTCs を検出・捕捉のための最適化を図る。

(2) 導電性ポリマーによるナノ構造の作製

導電性ポリマーによるナノ構造は、電解重合とテンプレート法もしくはテンプレートフリー法を組合せて作製する。テンプレート法では、均一な微細孔構造をもつアルミニウム陽極酸化被膜(AAO)を利用する。AAO は陽極酸化条件を変えることで、均一な細孔の直径を 100nm~500nm の範囲でコントロールできる。また電解重合で調製する導電性ポリマー薄膜の膜厚は、重合時間によりコントロールが容易にできる。したがって、AAO の細孔内で電解重合をおこない、アスペクト比の異なるナノ構造を作製し、構造が検出・捕捉に及ぼす効果を検討する。コポリマーなども検討し、ナノ構造/表面化学/生体分子の相互作用を評価、CTCs の検出・捕捉に最適な構造を探る。

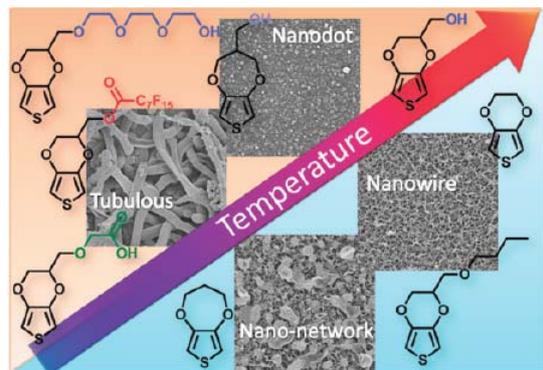
### 4. 研究成果

研究成果は大きく二つの分野に分けられる。前半は、導電性高分子によるナノ構造の創製。後半は CTCs の検出・捕捉にむけた基盤の設計である。以下に詳細を述べる。

#### テンプレートフリーな導電性高分子ナノ構造の合成

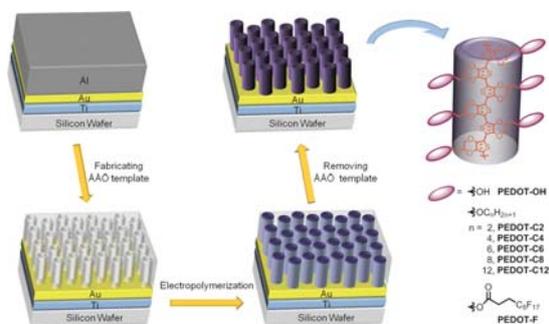
機能性官能基により修飾した

poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (EDOT)、poly(3,4-propylenedioxythiophene) (ProDOT) の多様なナノ構造を合成した。(ナノファイバー、ナノドット、ナノネットワーク、ナノマクロチューブ) これらのナノ構造をテンプレートフリーな電界重合により、ITO 基板上に調製した。異なる温度で調製した、導電性高分子のナノ構造を精査することで、テンプレートフリーな電界重合によるナノ構造の合成において、側鎖官能基と調製温度に相関があることが分かった。非修飾の EDOT、ProDOT、アルキル基を付加した EDOT は、ナノファイバー、ナノポーラス構造を形成した。興味深いことに、極性基を付与した場合、常温ではナノドット、低温ではチューブ状の構造を形成した。



#### 陽極酸化アルミナ (AAO) によるテンプレートを用いた導電性高分子ナノ構造の合成

Au コートしたシリコンウェハ上に調製した AAO を利用し、PEDOTs のナノ構造を作製した。非修飾の PEDOT、ヒドロキシ基を有する PEDOT はチューブをテンプレート内で形成した。アルキル基、ペルフルオロアルキル基を有するものはナノロッドを形成した。この方法では分子構造とナノ構造が表面ぬれ性に及ぼす影響に関する知見を得た。水/空気界面では、接触角は側鎖アルキルの長さに応じて大きい値を示した。また、導電性高分子ナノアレイ上の接触角は 130 度で飽和した。

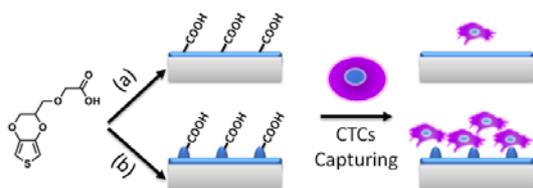


#### 導電性高分子ナノ構造による CTC の高効率な捕捉

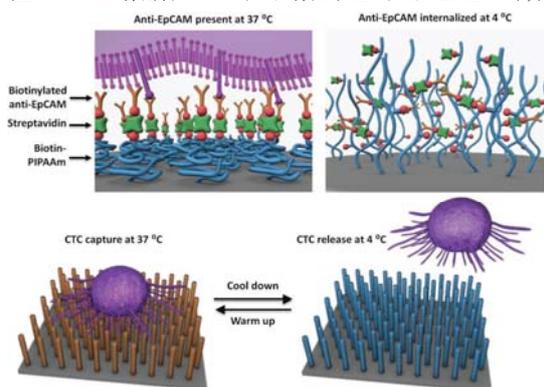
導電性高分子のナノ構造を標的細胞の捕捉

効率の向上に応用した。PEDOT-COOH によるナノドットを ITO ガラス上に、電解重合により調製した。ナノドットのサイズと密度は、重合中にかかる電圧により制御した。PEDOT-COOH を EpCAM 抗体で修飾し、5 種類の腫瘍細胞を用いデバイスの評価をした。デバイスは抗原を提示している腫瘍細胞に対し、高い検出能と特異性を示した。ナノ構造表面は、平滑な表面と比較し、4~5 倍の捕捉能を示した。

高分子をグラフトしたシリコンナノ構造による CTCs の捕捉と外部刺激によるリリース 抗体修飾による標的細胞に対する特異性と、ナノ構造由来の高い捕捉能、温度応答性高分子ブラシによる細胞のリリースを併せた革新的なプラットフォームを構築した。このデバイスは優れた特徴 (1)37 度で高効率に腫瘍細胞を捕捉、(2)4 度で捕捉した細胞の生存率を維持したままでの回収、を達成した。コンタミネーション無く CTCs のみの選択的な検出、CTCs の生存率、機能を保つことは、回収した腫瘍細胞の解析を可能にする。この検出方法により、回収した細胞の情報抽出が可能



になり、生化学的により有益な解析が期待される。この技術の発展により、腫瘍の進行、転移の高精度なモニタリング、ひいては転移性のがん治療における指針となることが期待される。



待される。

## 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)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Lin, H. -A.; Luo, Shyh-Chyang;\* Zhu, B.;\* Chen, C.; Yamashita, Y.;\* Yu, H. -h.\* “Molecular or Nanoscale Structures? The Deciding Factor of

Surface Properties on Functionalized Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)

Nanorod Arrays” **2013** Published Online DOI: 10.1002/adfm.201203006 (Corresponding author; IF: 10.179; with referee reading)

- ② Hou, S.; Zhao, H.; Zhao, L.; Shen, Q.; Wei, K. S.; Suh, D. Y.; Nakao, A.; Garcia, M. A.; Song, M.; Lee, T.; Xiong, B.; Luo, Shyh-Chyang;\* Tseng, H. -R.;\* Yu, H. -h.\* “Capture and Stimulated Release of Circulating Tumor Cells on Polymer Grafted Silicon Nanostructures” *Advanced Materials*, **2013**, *25*, 1547-1551. (Corresponding author; IF: 13.877; with referee reading)
- ③ Luo, Shyh-Chyang; Sekine, J.; Zhu, B.; Zhao, H.; Nakao, A.; Yu, H. -h. “Polydioxithiophene Nanodots, Nanowires, Nano-Networks, and Tubular Structures: The Effect of Functional Groups and Temperature in Template-Free Electropolymerization” *ACS Nano*, **2012**, *6*, 3018-3026. (Corresponding author; IF: 10.774)
- ④ Luo, Shyh-Chyang; Kantchev, E. A. B.; Zhu, B.; Siang, Y. W.; Yu, H. -h. “Tunable, Dynamic and Electrically Stimulated Lectin-Carbohydrate Recognition on a Glycan-Grafted Conjugated Polymer” *Chemical Communication* **2012**, *48*, 6942-6944. (1<sup>st</sup> author; IF: 6.169; with referee reading)
- ⑤ Sekine, J.; Luo, Shyh-Chyang; Zhu, B.; Wang, S. T.; Tseng H. -R.; Yu, H. -h. “Functionalized Conducting Polymer Nanodots for Enhanced Cell Capturing: the Synergistic Effect of Capture Agents and Nanostructures” *Advanced Materials*, **2011**, *46*, 4788-4792. (Equal contribution as 1<sup>st</sup> author; IF: 13.877; with referee reading)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Luo, Shyh-Chyang, Sekine, J.; Zhu, B.; Zhao, H.; Nakao, A.; Yu, H. -h. : “The Formation of Nanostructure of Functionalized Polydioxithiophene by Template-free Electropolymerization and Its Biomedical Application” Molecular Materials Meeting (M3), **2013**, January 14-16, Biopolis, Singapore.

- ② Luo, Shyh-Chyang, Zhu, B., Siang, Y. W., Kantchev, E. A. B., Yu, H. -h. : “Tunable, Dynamic and Electrically Stimulated Lectin-Carbohydrate Recognition on a Glycan-Grafted Conjugated Polymer” International Conference on Bioinspired and Biobased Chemistry & Materials, **2012**, October 3-5, Nice, France.
- ③ Luo, Shyh-Chyang, Zhu, B., Kantchev, E. A. B., Yu, H. -h. : “Tunable and Dynamic Lectin-Carbohydrate Recognition on the Surface of Conducting Polymer-bound Glycan Mimic Substrates” 61th Society of Polymer Science, Japan, **2012**, May 29-31, Yokohama, Japan.
- ④ Luo, Shyh-Chyang, Sekine, J., Zhu, B., Yu, H. -h. : “Nanostructured PEDOT Biointerfaces for Enhanced Efficiency of Cell Capturing” International Union of Materials Research Societies- 12th International Conference in Asia, **2011**, September 19-22, Taipei, Taiwan.
- ⑤ Luo, Shyh-Chyang, Zhu, B., Sekine, J., Zhao, H. C., Yu, H. -h. : “Nanostructured PEDOT Thin Films by Electropolymerization- Understanding Structure and Temperature Effect” 60th Society of Polymer Science, Japan, **2011**, May 25-27, Osaka, Japan.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

羅 世強 (LUO SHYH CHYANG)

独立行政法人理化学研究所・Yu 独立主幹研究  
ユニット・基幹研究所研究員

研究者番号：7 0 5 6 5 0 5 1

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし