

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651158

研究課題名(和文) マイクロファイバーを用いた超高速血中がん細胞分離システムの開発

研究課題名(英文) Rapid Capture System of Circulating Tumor Cells by use of Microfiber

研究代表者

高井 まどか (Madoka, Takai)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40287975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：20 wt%のポリスチレン(PS)溶液から平均でおよそ12 μm の空隙のある不織布を作製した。この不織布にヤギ全血を透過させたが溶血が認められなかった。抗EpCAM抗体を固定化したPSファイバー不織布に対して、EpCAMが発現しているMCF7細胞を反応させると、ファイバー上への捕捉がみられ、また、EpCAMが発現していないHeLa細胞の場合では、捕捉が見られなかった。このことから、EpCAMを介した特異的な抗原抗体反応により、マイクロファイバー上へ細胞の捕捉が起きていることが分かった。これらの結果から、血中からCTCsの捕捉が可能なマイクロファイバーシステムが作製できた。

研究成果の概要(英文)：Three-dimensional polystyrene (PS) microfiber fabric with vacuum system was developed for capturing circulating tumor cells (CTCs) within a short time. Various microfiber fabrics with different diameters were prepared by the electrospinning method and optimized for contact frequency of cells. The vacuum filtration utilizing these microfiber fabrics could filter cells without mechanical damage. The fabric system with immobilized anti-EpCAM antibodies was able to specifically capture MCF-7 cells that express EpCAM on their cell fabric within seconds. Also, the specificity of the system was tested by monitoring the ability to isolate MCF-7 cells from a mixture with CCRF-CEM cells that do not express EpCAM. Furthermore, the capture ability of the microfiber remained intact even when tested with whole blood of pigs spiked with MCF-7 cells.

研究分野：ナノ・マイクロ科学

キーワード：マイクロファイバー 血中循環がん細胞 イムノアッセイ

1. 研究開始当初の背景

我が国における死亡の原因の第一位は癌であり、年間 30 万人以上の人々が命を落としている。世界規模でも癌によって死亡する患者数は多く、癌という病気の克服は長年の人類の目標となっている。その為に世界各国で癌に関する研究が多く行われており、がんの効果的な治療法の確立を日々目指している。近年の研究から血中を循環している癌細胞 (CTCs) は、新たな腫瘍マーカーとして利用できることが期待されている。これは腫瘍の進行度と血中細胞数とが相関関係にあることが近年示されたためである。しかし、血中に存在する CTCs の数が、血中成分 10^9 個中に 10^2 個程度と非常に少ないことが報告されているため、血中から効率的に CTCs を捕捉し定量化することが重要になる。これまでに、基板表面にマイクロポストを構築したマイクロチップを用いて、細胞膜タンパク質である EpCAM が発現している細胞を高い捕捉率で捕えた例(1-3)など、マイクロチップを利用した研究が多数報告されてきた。

2. 研究の目的

マイクロチップでは 1 時間当たり数 mL 程度の血液しか分析できないことが報告されており²、血中に微量しか存在しない CTCs の細胞数を定量的に計測するためには、比較的大量の血液が必要であると考えられる。また、CTCs はアポトーシスにより細胞が死滅することも知られているため、血中から迅速に捕捉することも重要である。従って、CTCs を腫瘍マーカーとして利用するためには、効率的かつ迅速に捕捉するデバイスの開発が必要であると考えた。

3. 研究の方法

本研究では、細胞との接触面積を大きくするためにマイクロファイバーからなる不織布を作製し、CTCs 上に異常発現している EpCAM と特異的に反応する抗体(抗 EpCAM 抗体)を基板上に固定化し、吸引装置を共に用いる事で、大量の血液から簡便、迅速かつ効率的に CTCs を捕捉できるデバイスを作製することを目的とした。図 1 にデバイスのシステム概念をまとめた。

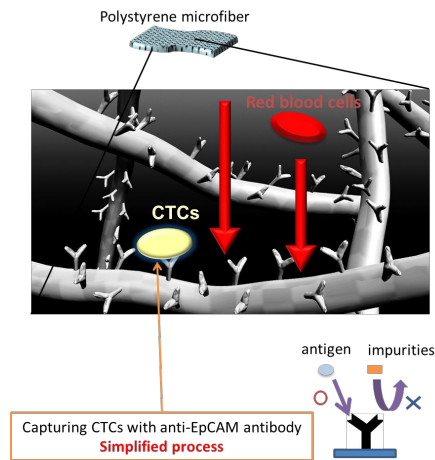


図 1 CTC 検出マイクロファイバーのシステム概念図

4. 研究成果

【実験】

20 w/v%のポリスチレン溶液 (PS、 $M_w = 9.0 \times 10^5$ 、 N, N' -ジメチルホルムアミド:テトラヒドロフラン = 1:1 (v/v)) から、エレクトロスピニング法を用いて PS ファイバー不織布を作製し、その微細構造を SEM により観察した。また、ヘパリンを添加したヤギ全血を PS ファイバー不織布に透過させ、透過前後の構造観察をおこなった。

CTCs に発現している表面レセプターである EpCAM に対する抗体(抗 EpCAM 抗体)を PS ファイバー不織布表面に固定化し、あらかじめ Celltracker green により蛍光標識した転移性の乳癌細胞 (MCF7 細胞) を用いて、結合試験を行った。コントロールの細胞として、子宮頸癌由来細胞 (HeLa 細胞) を使用した。システムによる細胞の捕捉率は WST アッセイを用いる事で行った。

【結果および考察】

エレクトロスピニング法により様々な濃度の PS 溶液から作製したマイクロファイバーの構造を図 2 に示す。20 wt%の PS 溶液から作製された不織布は平均でおよそ $12 \mu\text{m}$ の空隙があることから、細胞が通過する事が可能なポアサイズを有しているものと考えられた。実際、ヤギ全血を透過させた際に溶血を認めず、不織布へ残存している血球成分は見られなかった。また、全血透過後の不織布では、3 次元構造が保持されている事が分かった。これらの結果から、作製された不織布が本実験で使用するのに適しているものと考えた。





PSt concentration (w/v%)	10	15	20	25
SEM ($\times 1000$)				
Diameter (μm)	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.9 ± 0.1	2.2 ± 0.1
Size of pore (μm)	-	10.5 ± 5.8	12.4 ± 7.0	12.5 ± 8.4

図 2 種々の濃度で作製したマイクロファイバーの構造と孔径

抗 EpCAM 抗体を固定化した PS ファイバー不織布に対して、EpCAM が発現している MCF7 細胞を反応させると、ファイバー上への捕捉がみられ、また、EpCAM が発現していない HeLa 細胞の場合では、捕捉が見られなかった。(図 3) このことから、EpCAM を介した特異的な抗原抗体反応により、マイクロファイバー上へ細胞の捕捉が起きていることが分かった。これらの結果は、血中から CTCs の捕捉が可能であることを示唆する結果である。図 4 に MCF7 の補足率を測定した結果を示す。ここでは、エレクトロスピンニングにおける時間により膜厚を変化させた。

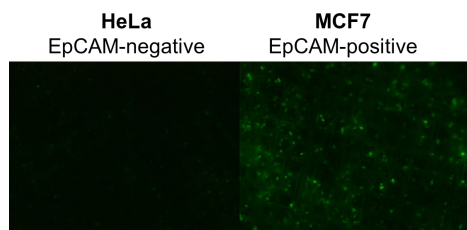


図 3 EpCAM 発現細胞 (MCF7) と EpCAM の発現がない細胞 (HeLa) によるマイクロファイバーへの補足

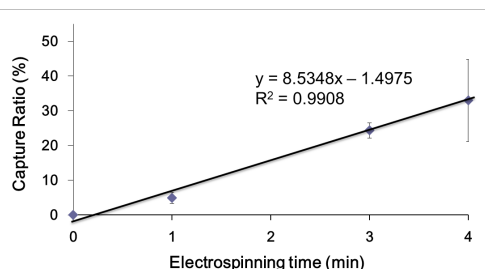


図 4 エレクトロスピンニング時間と細胞補足率の関係

細胞の捕捉率は 30%程度と低かったが、これは基盤である不織布の膜厚を厚くすることで改善できると考える。

【結論】

抗 EpCAM 抗体を固定化した PS ファイバー不織布に対して、EpCAM が発現している MCF7 を反応させると、ファイバー上への捕捉がみられ、また、抗-EpCAM が発現していない HeLa の場合では、捕捉が見られなかった。このことから、EpCAM を介した特異的な抗原抗体反応により、細胞の補足が起きていることが分かった。

参考文献)

- 1) Sunitha Nagrath *et al.*, Nature 450, 1235-1239 (2007)
- 2) Shuang Hou *et al.*, Advanced Materials 25, 1547-1551 (2013)
- 3) Emre Ozkumur *et al.*, Sci. Transl. Med. 5, 179ra47 (2013)

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 0 件)

[学会発表](計 8 件)

- 1) Madoka TAKAI, Tatsuro FUKUSHIMA, Ultra-Fast Immunoassay with 3D Structured Microfiber, Collaborative Conference of Materials REsearch (CCMR) 2012, Korea
- 2) MADOKA TAKAI, High Sensitive and Rapid Immunoassay Based on 3D Nanostructured Interface, PITTCON 2013, USA
- 3) 植木貴之、高井まどか, CTC 検知デバイスに向けたマイクロファイバー創製, 第 27 回 化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2013, 仙台、東京
- 4) 血中循環がん細胞の特異的捕捉を目指したマイクロファイバー表面の創製、植木貴之・寺村裕治・高井まどか、第 35 回日本バイオマテリアル学会 2013, 東京
- 5) マイクロファイバーを用いた迅速血中循環腫瘍細胞捕捉デバイスの構築、植木貴之・寺村裕治・高井まどか、バイオテクノロジー・研究討論会、2013, 東京
- 6) マイクロファイバーを用いた血球がん細胞分離システムの開発、高井まどか, 植木貴之, 寺村裕治、分離技術会年会 2014, 名古屋
- 7) 3次元構造ファイバーによる血中循環腫瘍細胞の迅速見地に向けたシステムの創製、植木貴之、寺村裕治、高井まどか, 第 36 回

日本バイオマテリアル学会大会,東京,2014
8) 3D Microfiber Membrane Device for
Rapid Capture of Circulating Tumor
Cells, T.Ueki, Y.Teramura and M.Takai,
24th Annual Meeting of MRS-Japan
2014, Yokohama Port Opening Plaza,
Yokohama Media & Communications
Center, 2014

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高井まどか (Madoka TAKAI)
東京大学大学院工学系研究科・教授
研究者番号 : 40287975