

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630418

研究課題名(和文) 血中循環がん細胞識別・分離用マイクロチップの開発

研究課題名(英文) Development of microchip for identification and separation of circulating tumor cell in blood

研究代表者

長棟 輝行 (Teruyuki, Nagamune)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20124373

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)：本研究では、顕微鏡を用いた細胞のハイコンテンツ解析により血中循環がん細胞(CTC)を検出した後に、迅速簡便にCTCを単離可能な技術の開発を目的とした。そこで、光照射によって細胞を基板上に固定化できる光活性化PEG脂質試薬を開発した。本試薬を修飾した基板表面上で、特定の細胞に光を照射した後にバッファーで洗浄を行うと、その細胞のみを基板上に特異的、選択的に固定化することができた。担がんマウスから採取した末梢血由来サンプルを本試薬で表面を修飾したマイクロ流路内に播種し、蛍光顕微鏡観察により免疫染色されたCTCを検出、光固定化し、光未照射の細胞を洗浄除去し、CTCのみを流路内に単離することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop the speedy and easy isolation method of blood circulation cancer cell (CTC) after detecting CTC by microscopic high content analysis of cells. For that purpose we developed the photoactivatable PEG-lipid reagent, which could immobilize cells on the surface of substrate by photoirradiation. By photoirradiating a specific cell on the reagent-modified surface and subsequent washing with buffer solution, photoirradiated cell was specifically and selectively immobilized on the surface. After seeding a sample derived from the peripheral blood of tumor bearing mouse in the microflow channel of which surface is modified with this reagent, we succeeded in isolating CTCs selectively inside the channel by detecting immunostained CTCs using fluorescent microscopy, immobilizing CTCs by photoirradiation and washout of non-photoirradiation cells.

研究分野：生物工学

キーワード：血中循環がん細胞単離技術 細胞光固定化技術 光活性化PEG脂質

1. 研究開始当初の背景

近年、血液中を循環するがん細胞 (CTC) の血液中からの検出や、免疫細胞療法における活性化 T 細胞・樹状細胞の選別調製、iPS 細胞等の分化万能細胞を細胞源とした有用細胞の選別調製などの分野で、細胞集団から目的の細胞を迅速・正確に分離回収する技術が重要となっている。既存のフローサイトメトリー法では、細胞マーカーの蛍光強度の大小で細胞を解析する。そのため、バックグラウンド蛍光強度が高い擬陽性細胞も回収してしまう。また、近年、特定のマーカー分子の発現だけを指標にした評価に対し、細胞形態や細胞内分子動態なども含めた多角的な解析によって評価を行う方法の方が、分析対象を広げる点や分析精度を高める点で優位であることが報告されている。従って、個々の細胞を詳細に解析した後に目的の細胞だけを識別・選別できるような新しい技術が求められている。

2. 研究の目的

申請者は、オレイル鎖とポリエチレングリコール (PEG) 鎖との間に光分解性リンカーを導入した光分解性 PEG 脂質を開発し、これを用いた細胞の微細パターンニング、さらに、細胞を光照射によって遊離させることに成功し、細胞の選択的回収技術を確立した (Fig. 1, Yamaguchi, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 128-131 (2012))。そこで、この技術を発展させることによって、細胞を一細胞レベルでアレイ化して多角的に解析を行い、目的に合う細胞に光照射を行うことで迅速・正確に目的細胞を分離回収できる汎用的な細胞解析・選別用チップの開発を目指す。また、本研究によって開発した細胞選択技術の有用性を示すアプリケーションとして、顕微鏡観察によって CTC を検出した後に、迅速簡便に CTC を単離することを目標とした。

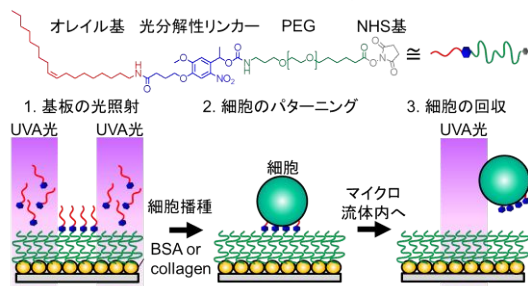


Fig. 1 光分解性 PEG 脂質を用いた細胞のパターンニングと回収

3. 研究の方法

(1) 光分解性 PEG 脂質表面を用いた一細胞アレイ作製と、迅速かつ詳細な細胞画像解析

まず、光分解性 PEG 表面を用いて一細胞アレイを作製することで、顕微鏡観察による迅速かつ詳細な細胞解析が可能となるか検証を行った。光分解性 PEG 脂質を修飾したコラーゲン基板にフォトマスクを用いたコンタクト露光によりパターン光を照射して、それぞ

れ一細胞のみが固定化されるスポットをアレイ状に作製した。細胞を播種したところ、非接着性・接着性細胞どちらの一細胞アレイも構築することができた (Fig. 2, Yamahira, *et al.*, *Macromol. Biosci.*, **14**, 1670-1676 (2014))。

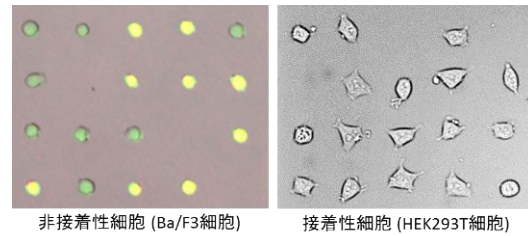


Fig. 2 光分解性 PEG 脂質による一細胞アレイ

この時、接着性細胞の一細胞アレイでは、細胞の伸展・運動・細胞間接触といった通常培養環境と同様の細胞活性が観察された。そこで、核の位置を指標に、画像解析プログラムにより細胞のランダムウォークを解析したところ、個々の細胞の移動速度や移動経路といった多角的なパラメーターを迅速に定量できた。また、非接着性のマウスリンパ系細胞株では、抗原特異的なキメラ受容体を発現させた細胞株の抗原応答による形態変化を定量可能であった。さらに、重要な創薬ターゲットである GPCR の局在性を一細胞アレイ上で解析したところ、蛍光標識 GPCR の細胞内輸送が pH に応答して変化し、細胞膜と細胞質内コンパートメントの局在量が変化することを定量的に明らかにした (Fig. 3)。このように、本一細胞アレイを用いることによって、様々な複雑な生命現象を迅速かつ定量的に解析可能であることが示された。

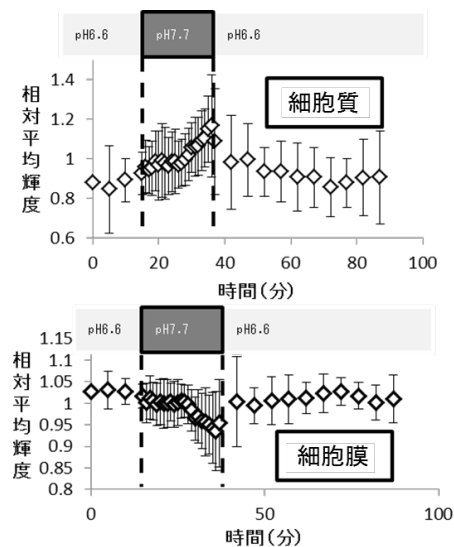


Fig. 3 GPCR 局在量の定量

(2) 光分解性 PEG 脂質表面上での、一細胞アレイからの細胞光遊離

細胞の光回収のために、これまでの研究で開発した光分解性 PEG 脂質を用いたところ、一細胞アレイの構築のみ、もしくは細胞光遊離のみが可能なる表面を作製することができた。しかし、光分解性 PEG 脂質を修飾する材料や修飾条件の検討を行ったが、一細胞アレイの構築と細胞光遊離の両方を同時に達成

することができなかつた。そこで、新規光分解性細胞固定化剤として、光分解性 PEG 脂質コポリマーを開発した。このコポリマーをコートした基板表面を用いたところ、精密な一細胞アレイの作製と細胞の光遊離を同時に達成できることが確認された。実際に、このコポリマーを修飾した基板表面上で緑色の Ba/F3(EGFP)細胞と赤色の Ba/F3(KO)細胞からなる一細胞アレイを作製し、Ba/F3(KO)細胞にのみ光を照射し、シリンジポンプにより流束を負荷したところ、Ba/F3(KO)細胞のみを基板より遊離できた(Fig. 4)。細胞遊離のスループットを計算したところ一細胞あたり 5 秒であり、市販されているマイクロマニピュレーターによる細胞回収システムの一細胞あたり 30 秒以上を大きく上回った。以上の結果から、光分解性 PEG 脂質コポリマー表面を用いることによって、ハイスループットに一細胞アレイから目的細胞を一細胞単位で

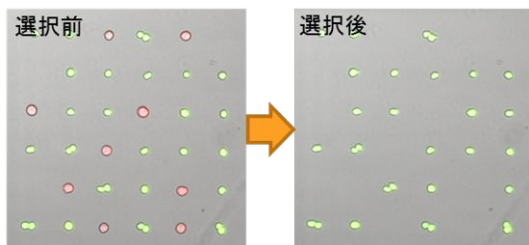


Fig. 4 光分解性 PEG 脂質コポリマーを用いた一細胞アレイからの細胞光遊離回収できることが示された。

(3) 光活性化 PEG 脂質を用いた細胞選択法

光分解性 PEG 脂質コポリマーを用いた一細胞アレイは、前述のとおり、非常に強力な個々の細胞の詳細解析機能を持つ。一方、細胞選択においては、シリンジポンプによって精密な流速制御が必要であるなど、複雑なシステムや煩雑な操作が必要となる問題点があった。そこで、シリンジポンプ等を用いずとも、簡便に目的細胞を選別可能な技術の開発を目指した。そのような細胞選択を可能とする新規化合物として、光照射によって細胞

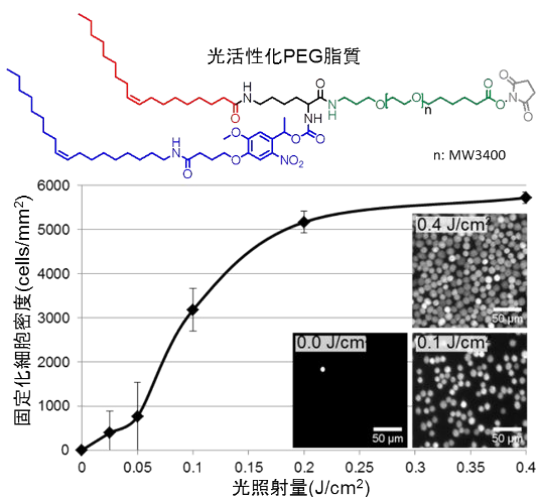


Fig. 5 光活性化 PEG 脂質の構造とその光依存的細胞固定化機能が固定化されるようになる光活性化 PEG 脂

質を開発した(Fig. 5)。

本分子を修飾した基板表面に、少数の Ba/F3(EGFP)細胞を Ba/F3(KO)細胞に混和したサンプルを播種し、Ba/F3(EGFP)細胞のみを光を照射したところ、Ba/F3(EGFP)細胞のみを基板上に固定化できた。さらにポンプを用いない穏やかな洗浄操作を行ったところ、Ba/F3(KO)細胞は全く非特異吸着を起こさず、容易に洗浄除去できた。その結果、細胞集団中に 1%以下しか存在しない Ba/F3(EGFP)細胞を単離することに成功した。

(4) 光活性化 PEG 脂質を用いた CTC の単離

最後に、光活性化 PEG 脂質表面を用いて CTC の単離を行った。具体的には、モデル実験として、担ガンマウス末梢血からの CTC の光捕捉を行った。DLD1 細胞を担ガンマウスの心臓から末梢血を採取し、前処理を施した後に、DLD1 細胞に特異的な抗体で CTC を蛍光標識した。この末梢血サンプルを光活性化 PEG 脂質修飾マイクロ流路チップに播種し、顕微鏡観察により蛍光を指標に CTC を検出した。CTC に光を照射したところ、CTC は迅速に基板へ固定化された。PBS により基板表面を穏やかに洗浄した結果、数万以上におよぶ CTC 以外の細胞は全て容易に基板上から除去され、数細胞の CTC のみが固定化・単離された(Fig. 6)。また、細胞を精密に配置可能なチップ(2.8×10^5 cells/cm²)に光活性化 PEG 脂質を修飾することにより、精密配置された細胞に対しても上記の細胞光単離が可能であることが確認された。

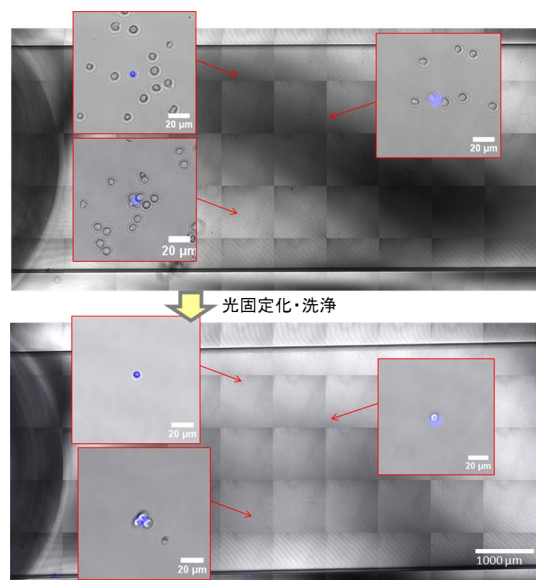


Fig. 6 光活性化 PEG 脂質を用いた CTC の単離

4. 研究成果

本研究では、PEG 脂質を骨格とした新規の機能性分子を開発し、顕微鏡観察後に一細胞単位で細胞を単離可能な技術の開発に成功した。さらに、近年非常に注目されている CTC の単離に成功し、本技術の有用性を示した。本技術は特許申請を完了し、東京大学

TLO によるマーケティングの段階にあり、商品化に向けて展開中である。

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1件)

S. Yamahira, S. Yamaguchi, M. Kawahara and T. Nagamune, "Collagen Surfaces Modified with Photo-Cleavable Polyethylene Glycol-Lipid Support Versatile Single-Cell Arrays of Both Non-adherent and Adherent Cells", *Macromol. Biosci.*, **14**, 1670-1676 (2014).

〔学会発表〕(計13件)

- (1) 山平 真也, 山口 哲志, 長棟 輝行, 「Turn on 型 PEG 脂質表面の開発と複数種細胞の光配置技術」, 『日本化学会第 96 春季年会』, 同志社大学京田辺キャンパス (京都府京田辺市), 2016 年 3 月 27 日
- (2) 泉田 森, 山口 哲志, 三澤 龍志, 山平 真也, 長棟 輝行, 岡本 晃充, 「細胞膜内部ドメインの解析を志向した細胞膜シートの開発」, 『日本化学会第 96 春季年会』, 同志社大学京田辺キャンパス (京都府京田辺市), 2016 年 3 月 27 日
- (3) 山平 真也, 山口 哲志, 長棟 輝行, 「光活性化 PEG 脂質の開発と、複数種細胞の光配置技術」, 『化学工学会第 81 年会』, 関西大学千里山キャンパス (大阪府吹田市), 2016 年 3 月 14 日
- (4) 三澤 龍志, 山平 真也, 山口 哲志, 長棟 輝行, 「新規光応答性 PEG 脂質を用いた多種細胞パターンニング及び細胞回収」, 『化学工学会第 81 年会』, 関西大学千里山キャンパス (大阪府吹田市), 2016 年 3 月 13 日
- (5) S. Yamahira, S. Yamaguchi, M. Kawahara, T. Nagamune, 「Collagen surfaces modified with photo-cleavable polyethylene glycol-lipid for versatile single-cell array available for both non-adherent and adherent cells」, 『Pacifichem 2015』, Honolulu, USA, 2015 年 12 月 18 日
- (6) M. Tan, S. Yamahira, S. Yamaguchi, M. Nakamura, T. Nagamune, 「Development of the image cytometry method to analyze G-protein coupled receptor kinetics in the cell」, 『Pacifichem 2015』, Honolulu, USA, 2015 年 12 月 18 日
- (7) 泉田 森, 山口 哲志, 三澤 龍志, 山平 真也, 長棟 輝行, 岡本 晃充, 「光応答性表面を用いた細胞膜フラグメントの微細パターンニング」, 『第 67 回日本生物工学会大会』, 城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市), 2015 年 10 月 28 日
- (8) 談 莫東, 山口 哲志, 山平 真也, 中村 元直, 長棟 輝行, 「一細胞アレイを用いた pH 応答性 GPCR の細胞内動態解析」, 『第 67 回日本生物工学会大会』, 城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市), 2015 年 10 月 26 日

(9) S. Yamahira, S. Yamaguchi, M. Kawahara, T. Nagamune, 「Single cell array on photo-cleavable PEG-lipid surface for high-throughput cell imaging analysis」, 『YABEC 2015 Symposium』, Chuncheon, Korea, 2015 年 10 月 16 日

(10) 三澤 龍志, 山口 哲志, 山平 真也, 長棟 輝行, 岡本 晃充, 「光応答性表面を用いた細胞膜フラグメントの微細パターンニング」, 『日本化学会第 95 春季年会』, 日本大学 船橋キャンパス(千葉県船橋市), 2015 年 3 月 27 日

(11) 山平 真也, 山口 哲志, 河原 正浩, 長棟 輝行, 「光分解性 PEG 脂質修飾コラーゲン表面を用いた一細胞アレイ作製と定量的イメージサイトメトリー」, 『細胞アッセイ技術の現状と将来』, 東京大学駒場キャンパス (東京都渋谷区), 2015 年 1 月 13 日

(12) 談 莫東, 山口 哲志, 蘭 婉君, 山平 真也, 山本 晃康, 中村 元直, 長棟 輝行, 「GPCR 動態解析のためのイメージサイトメトリー技術の開発」, 『細胞アッセイ技術の現状と将来』, 東京大学駒場キャンパス (東京都渋谷区), 2015 年 1 月 13 日

(13) T. Nagamune, S. Yamahira, S. Yamaguchi, 「Dynamic micro-patterning and sorting of mammalian cells on photo-cleavable PEG-lipid modified surface」, 『15th International Conference on ORGANIZED MOLECULAR FILMS』, Jeju Island, Korea, 2014 年 7 月 10 日

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 脂質膜含有物を固定化するための化合物、当該化合物で修飾された基材、当該基材上に脂質膜含有物をパターンニングする方法及び脂質膜含有物を当該基材上で単離する方法

発明者: 長棟 輝行、山口 哲志、山平 真也

権利者: 東京大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/57852

出願年月日: 平成 28 年 3 月 11 日

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

東京大学工学系研究科 長棟研究室のホームページ

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/nagamune/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長棟 輝行 (NAGAMUNE, Teruyuki)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号: 20124373