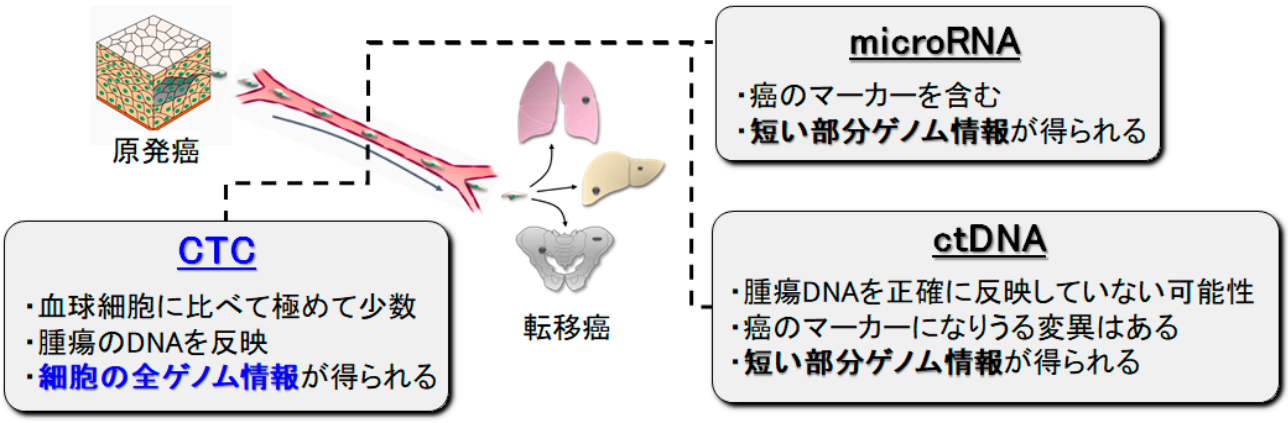
| 88　がん早期診断用の選択的分離バイオマテリアルの設計 | 田中　賢 |
|---|---|

【目的】健康長寿社会の実現のために、がんの超早期診断技術のニーズが高まっている。近年、がん診断の液体生検（リキッドバイオプシー）として、原発腫瘍から血管内に浸潤した、血中循環癌細胞（CTC）や細胞外小胞のエクソソームが注目を集めている。CTC やエクソソームは、ステージ 0 や 1 においても血管中に浸出している一方で、MRI、CT、PET では容易に検出できない。例えば、CTC を血中から分離回収することにより、がんの超早期診断に使うバイオマーカーとして利用することが期待されている。また、患者個人に適した抗がん剤を選択するための検査をすることも期待されている。がん患者の多くは、原発腫瘍ではなく転移がんにより亡くなるので、CTC を対象とした検査は、抗がん剤の効果を直接的かつより正確に評価できる。患者個人に適した抗がん剤を選択する技術が開発されれば、患者 QOL の向上と国民医療費の低減が期待できる。本研究では、物質や細胞の選択的な分離に大きな役割を担う生体表面の水分子に着目し、独自に発見した生体物質の人工材料への吸着性を制御可能な中間水のコンセプトをもとに、全血からハイスループットかつ選択的にがん細胞を分離回収する技術を構築する。さらに、吸着・接着選択性の発現機構を明らかにするために、中間水の役割を解明することにより、さらに高機能なバイオマテリアル開発のための設計指針の構築を目指した。

【方法】主鎖・側鎖構造の異なる高分子を新規に精密合成し、血液中の血漿タンパク質、血球細胞、がん細胞の吸着・接着性を調べた。目的の吸着・接着選択性を示す中間水量を有する材料の精密合成手法の検討を行った。目的細胞を含む血液と材料の接触時間、接触条件（静置、撹拌速度）との関係を検討した。また、CTC の接着・回収効率を向上させるために、特定の中間水量を有する高分子を用いた微粒子を作製した。

【結果】高分子の側鎖官能基の密度、側鎖の運動性の変化によって水和状態が受ける影響を検討するために、モデル高分子の合成を行った。regio 選択的開環メタセシス重合にて血球細胞の非接着性を示す poly（2-methoxyethyl acrylate）（PMEA）の主鎖ポリエチレン骨格に対する側鎖導入間隔（X）を変更した新規高分子（HPXs）を合成した。側鎖導入間隔（X）を拡大することで含水時の中間水量が変化することが分かった。したがって、HPXs は、水和状態と血球細胞やがん細胞の接着状態を理解するための高分子であることが明らかになった。ついで、血球細胞の接着実験を行ったところ、中間水量の増加に伴って血球細胞の接着数が減少することが分かった。一方、がん細胞の接着実験を行ったところ、接着することを確認した。以上の結果から、目的細胞以外の非特異吸着を防止し、目的の CTC の分離を行うために必要な合成高分子の中間水量制御のための指針が得られた。本研究の結果より、ラベルフリー技術による「CTC 分離培養キット」、医療機関によるがん診断に用いられる「がん診断用キット」、抗がん剤治療に用いられる「抗がん剤感受性診断用キット」を作製するために、PMEA 誘導体をプラスチックチップもしくは微粒子に被覆した、CTC を分離・回収可能な全く新しいバイオマテリアルを提唱した。

リキッドバイオプシーの対象と CTC の有用性



# 88. がん早期診断用の選択的分離バイオマテリアルの設計

田中　賢

九州大学 先導物質化学研究所 ソフトマテリアル学際化学分野

Key words：バイオマテリアル，血中循環癌細胞（CTC），癌細胞接着，中間水，水和構造

## 緒　言

健康長寿社会の実現のために、がんの超早期診断技術のニーズが高まっている。近年、がん診断の液体生検（リキッドバイオプシー）として、原発腫瘍から血管内に浸潤した、血中循環癌細胞（CTC）や細胞外小胞のエクソソームが注目を集めている。CTC やエクソソームは、ステージ 0 や 1 においても血管中に浸出している一方で、MRI、CT、PET では容易に検出できない。例えば、CTC を血中から分離回収することにより、がんの超早期診断に使うバイオマーカーとして利用することが期待されている。また、患者個人に適した抗がん剤を選択するための検査をすることも期待されている。がん患者の多くは、原発腫瘍ではなく転移がんにより亡くなるので、CTC を対象とした検査は、抗がん剤の効果を直接的かつより正確に評価できる。患者個人に適した抗がん剤を選択する技術が開発されれば、患者 QOL の向上と国民医療費の低減が期待できる。本研究では、物質や細胞の選択的な分離に大きな役割を担う生体表面の水分子に着目し、独自に発見した生体物質の人工材料への吸着性を制御可能な中間水のコンセプトをもとに、全血からハイスループットかつ選択的にがん細胞を分離回収する技術を構築する。さらに、吸着・接着選択性の発現機構を明らかにするために、中間水の役割を解明することにより、さらに高機能なバイオマテリアル開発のための設計指針の構築を目指した。

その結果、主鎖・側鎖構造の異なる高分子を新規に精密合成し、血液中の血漿タンパク質、血球細胞、がん細胞の吸着・接着性が変化することを明らかにした[1, 2]。血球細胞の非接着性を示す poly (2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) の主鎖ポリエチレン骨格に対する側鎖導入間隔（X）を変更した新規高分子（HPXs）が示す中間水量が、フィブリノーゲン、フィブロネクチンの吸着・変性、血球細胞、がん細胞の接着性に強く影響する因子であることがわかった。以上の結果から、目的細胞以外の非特異吸着を防止し、目的の CTC の分離を行うために必要な合成高分子の中間水量制御のための指針が得られた。

CTC は、患者個人に適した抗がん剤を選出する検査への応用も期待されている。がん患者の多くは、原発腫瘍ではなく転移がんにより亡くなるので、CTC を対象とした検査は、抗がん剤の効果を直接的かつより正確に評価できる。抗がん剤の奏功は患者個人によって大きく異なり、効果は投与しないとわからない。したがって、患者個人に適した抗がん剤を選択する技術の開発により、患者 QOL の向上と国民医療費の低減が期待される。

## 方　法

### 1. 主鎖・側鎖構造の異なる高分子の精密合成

開環メタセシス重合により、regio 選択的な重合を達成することで、PMEA の側鎖官能基を主鎖ポリエチレン骨格に対して 2、4、5、7、8 炭素おきに導入したモデル高分子を合成した（図 1）。生成物の同定は NMR 法（400 MHz、AVANCE III、Bruker）と高速原子衝突イオン化質量分析法（FAB-MS、JMS-700、日本電子株式会社）により行った。本研究で目的とした最終生成物である HPXs は、NMR 測定による構造同定に加え、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC、Prominence system、株式会社島津製作所）による分子量評価、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI TOF MASS、Autoflex II、Bruker）による構造同定も行った。

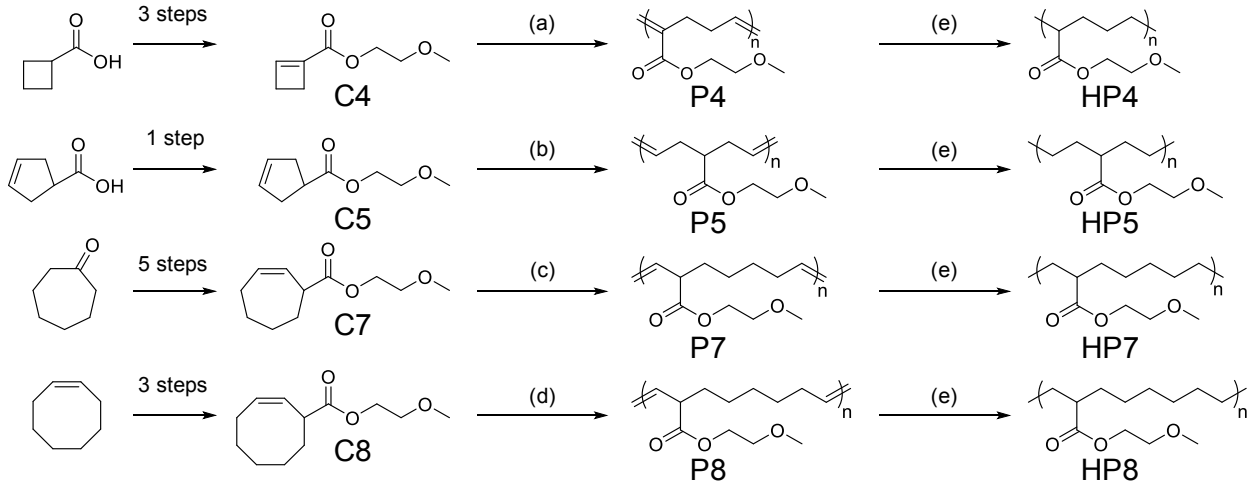



図 1. 側鎖間隔の異なる新規 PMEA 誘導体（HPXs）の合成

高分子の主鎖に対する側鎖の密度を系統的に変化させることで、高分子に形成される水和状態を制御し、血球細胞の接着を低減し、CTC の接着を向上させる。

**2. 水和状態の解析とタンパク質吸着および細胞接着実験**

水和状態の解析は示差走査熱量計（DSC）により行った。また、ヒト血小板粘着試験に加え、QCM 法による血漿タンパク質の吸着量の定量と、ELISA による細胞接着に寄与する吸着タンパク質の特定のアミノ酸配列（hFng γ' chian）を評価した。さらに、健常者の全血を使用して、同全血に癌細胞株を添加した際の回収効率の確認を行った。ポリエチレンテレフタラート（PET）基板上に PMEA 誘導体をスピンコーティングすることで基板を作製した。購入ヒト全血から比重調整剤により単離した単核分画および細胞培養培地に、任意数のヒトがん株細胞を添加した。各細胞懸濁液を各基板に対して播種し、静置またはシーソー振振盪下において 1 時間培養した。その後、cell counting kit-8 または免疫染色による画像解析によって接着細胞数を評価した。

## 結果および考察

**1. 主鎖・側鎖構造の異なる高分子の精密合成**

本研究で特に新規性の高い合成結果としては、1-（2-methoxyethoxycaebonyl）-1-cyclobutene の重合を達成したことがあげられる。この構造のモノマーは、これまでの報告で重合活性を示さないことが予想されていた。本研究では、重合条件を最適化することで、高分子量体を得ることに初めて成功した。同一の側鎖官能基の高分子主鎖に対する導入間隔を厳密に制御できた。新規 PMEA 誘導体の重合条件、分子量、分子量分布、構造規則性を表 1 にまとめた。

以上の結果より、目的とする HPXs が分子量 17,000 g/mol 以上、分子量分布 2.2 以下で得られ、H-T 規則性が 94% 以上で制御された高分子が得られたことを確認できた。また、重合活性がないと予想されていた C4 の重合によって P4 を重合することに成功し、分子量は 19,000 g/mol と十分大きく、H-T 規則性も 94%で制御された高分子を得ることができた。GPC による分子量評価の結果を見ると、主鎖二重結合の有無で分子量と分子量分布は大きく変化しないはずであるが、評価結果には大きな変化が認められた。これは、主鎖二重結合によって主鎖の回転の自由度が大きく制限されることで、流体力学半径が影響を受けたことによると推定される。したがって、GPC の溶離時間が影響を受け、polystyrene standards により校正された分子量が主鎖二重結合の有無で大きく変化したと推察される。

表 1.　新規 PMEA 誘導体の重合条件と合成結果

| X | [M]/[G2] | [M]/[CTA] | solvent | [M] | time [h] | conv.[b] [%] | yield [%] | $M_n$[c] [kg/mol] PXs | $M_n$[c] [kg/mol] HPXs | PDI[c] PXs | PDI[c] HPXs | regularity[b] [%] H-T[d] | regularity[b] [%] *trans* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | 500 | --- | $CHCl_3$ | 4.0 | 28 | 38 | 38 | 19 | 27 | 1.6 | 1.5 | 94 | 27 |
| 5 | 2500 | 179 | Bulk | 5.9 | 112 | 52 | 52 | 17 | 17 | 1.7 | 2.0 | 100 | N/A |
| 7 | 2000 | 211 | $CHCl_3$ | 2.0 | 48 | 87 | 79 | 38 | 65 | 2.0 | 1.6 | 97 | 77 |
| 8 | 1000 | 200 | $CHCl_3$ | 2.0 | 44 | 86 | 80 | 45 | 58 | 2.0 | 2.2 | 98 | 96 |

[a] すべての重合は室温で行った。 [b] $^1$H NMR で決定した。 [c]GPC 測定により決定した（polystyrene standards , THF, 40℃）。 [d]Head-to-Tail 規則性は$^1$H NMR. で決定した。

## 2. 水和状態の解析とタンパク質吸着および細胞接着

CTC をがんの診断に用いるには、血液中に極僅かしか含まれない CTC の選択的な回収技術が必要となる。対象がん患者から CTC を取りこぼしなく分離回収し、さらに分離回収した CTC が培養できる必要がある。しかし、既存の CTC 分離回収技術には大きな課題がある。CTC を分離回収する既存技術として、(1) 生物的方法と (2) 物理的方法があるが、CTC の培養が可能な状態で、ハイスループットに分離回収することは困難である。

我々は、血球細胞の接着性が低い合成高分子である PMEA などの抗血栓性材料をコーティングした各種医療製品（人工心肺、ECMO、カテーテル、ステントなど）を開発してきた。また、合成高分子と血液の界面に存在する水の状態に着目することで、抗血栓性発現機構の解明に取り組んできた。人工材料が生体に接触すると、直ちに水分子が材料表面に吸着する。吸着した水分子は、以下の 2 種類に分けられる。材料に強く結合し分子運動性が低下した不凍水と材料に弱く結合し分子運動性が高い自由水である。さらに、自由水と不凍水の中間的な性質を示す中間水が形成される。この水和状態が選択的ながん細胞接着性能に大きな影響を与えることがわかった。

具体的には、DSC 測定の結果、側鎖導入間隔に応じて中間水の発現量が単調に変化することが明らかとなった。また、今回評価した高分子は、含水する際のイオンの有無によって観測される中間水量が大きく変化することが示された（図 2）。

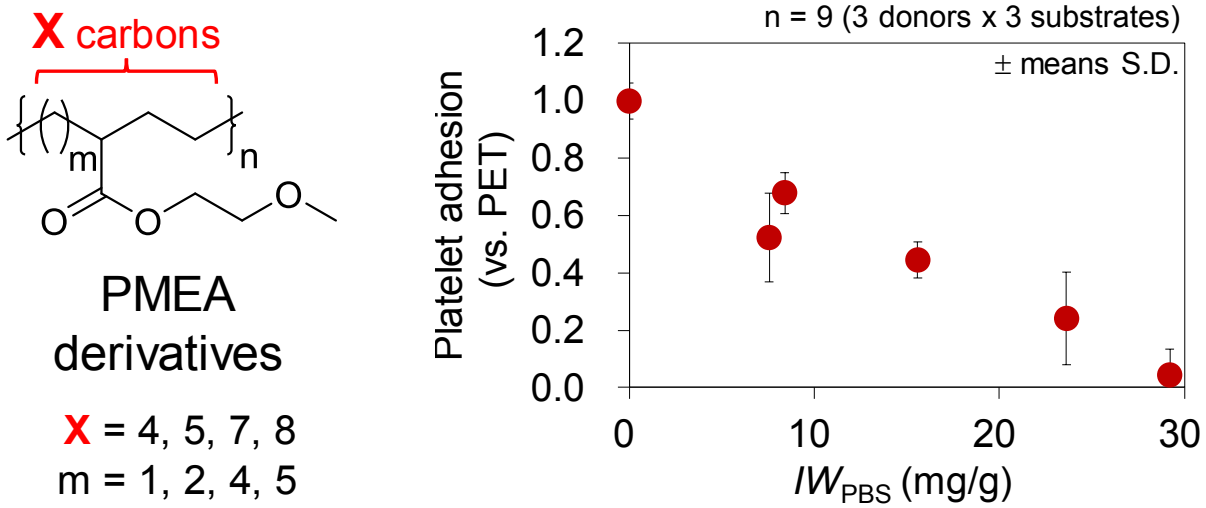



図 2.　側鎖間隔の異なる PMEA 誘導体と生理イオン環境下で形成される中間水の量（$IW_{PBS}$）と血小板粘着の関係
生理環境下の高分子に形成される中間水が増加するほど血小板の粘着を抑制できる。

ヒト血小板の粘着数や ELISA の結果は DSC による中間水の定量結果と相関がみられた（図 3）。以上の結果より、高分子の一次構造制御による中間水量の制御を達成した上で検討を行った結果、中間水の発現によってタンパク質の構造変化が抑制され、それによって細胞接着性が制御されることが示唆された。また、HPXs の解析結果を受け、$IW_{PBS}$

を増加させることを目的に HPXs の側鎖末端のメトキシ基を強力な水素結合受容性官能基である三級アミノ基に変更した新規高分子を合成した。新規高分子が多量の $IW_{PBS}$ を発現していることが確認された。本研究で提案した側鎖導入間隔を制御する構造設計によって、非水溶性を維持しながら中間量を変化できることが明らかになった。

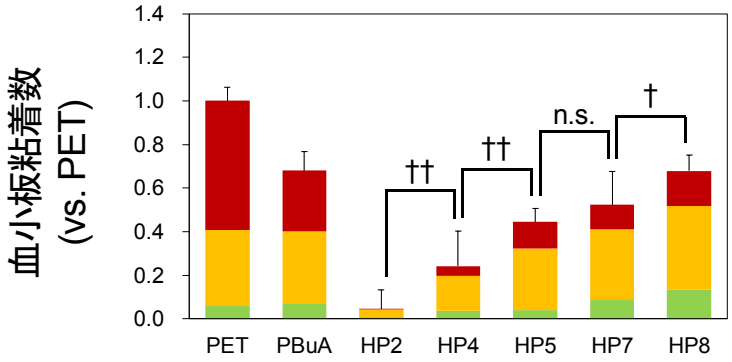



図 3. ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリ（n-ブチルアクリレート）（PBuA）および側鎖間隔の異なる PMEA 誘導体表面への血小板の粘着数

比較した高分子の中で中間水量が最も多い HP2（PMEA）は、血小板粘着数が少ないが、CTC の接着性が高いことが分かった。

この中間水量を制御することで、血液成分の吸着や血球細胞の接着は起こらないものの、がん細胞が選択的に接着する現象を明らかにした。CTC は、原発腫瘍組織または転移腫瘍組織から血中へ遊離したがん細胞である。CTC はがん患者の末梢血に存在するため、身体への侵襲が少ない血液検査による検出が可能であり、がんの進行や転移を診断する優れたバイオマーカーとなる。これまでにいくつかの CTC 検出の手法が提案されており、中でも有用な手法はがん細胞表面に発現する上皮細胞接着分子（EpCAM）のモノクローナル抗体を修飾した粒子を用いるものである。しかし、この手法では EpCAM ネガティブの CTC は回収できない。抗体を使わない回収システムの構築を目指し、PMEA 誘導体による微粒子を作製した。微粒子上にはがん細胞が接着し、がん細胞回収率は約 80%であった。この微粒子を足場に用いることで、回収したがん細胞をさらに増殖させることも可能であった。今後、癌患者から採血した検体やがん切除臨床検体から CTC の回収を実施し、免疫組織学的解析や DNA／RNA 解析を通して CTC 分離法を確立する予定である。

## 3. まとめ

以上のように、実使用環境で観測される中間水の量は、細胞接着性との間に高い相関を示し、側鎖導入間隔を拡大することで変化することが確認された。したがって、HPXs は、水和状態と細胞接着性との関係の解明に資するべきモデル高分子であることが明らかとなった。本研究で行った高分子合成では、これまでに達成されていなかった 1-cyclobutene-1-carboxylate や三級アミンを有する単環式 cycloolefin の開環メタセシス重合を達成し、regio 選択性の高い重合が進行し高分子量体が得られたことを確認した。これらの結果は、単に目的とする新規高分子の合成に成功しただけでなく、ROMP において側鎖官能基が重合挙動に与える影響やその機構を理解し、選択的細胞接着のための新たな合成戦略へと繋がるものである。今後、精密制御された高分子バイオマテリアルによるラベルフリーの CTC 分離回収技術の確立が期待できる。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学先導物質化学研究所の小林慎吾特任准教授および園田敏貴氏である。ここに深く感謝する。

## 文　献


1) T. Sonoda, S. Kobayashi, K. Herai, M. Tanaka, Side chain spacing control of derivatives of poly(2-methoxyethyl acrylate): impact on hydration states and antithrombogenicity, *Macromolecules*, 53, 8570-8580 (2020) 10.1021/acs.macromol.0c01144

2) T. Sonoda, S. Kobayashi, M. Tanaka, Periodically Functionalized Linear Polyethylene with Tertiary Amino Groups via Regioselective Ring-Opening Metathesis Polymerization, *Macromolecules*, 54, 2862–2872 (2021) 10.1021/acs.macromol.0c02611