## 平成31年度 戦略的基盤技術高度化•連携支援事業 戦略的基盤技術高度化支援事業

# 「オンサイトがん検査を実現するがん細胞の選択的捕捉が可能な 動的変形マイクロフィルターの開発」

研究開発成果等報告書

令和2年3月

担当局 九州経済産業局 補助事業者 公益財団法人くまもと産業支援財団

# 目 次

第1章 研究開発の概要	3
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	3
1-2 研究体制	7
1-3 成果概要	7
1-4 当該研究開発の連絡窓口	8
第2章 本論	9
2-1 研究内容及び成果	9
【1.技術の確立と評価】	9
【1—1】 製品(動的変形マイクロフィルター)に修飾するアプタ	マーの選定なら
びに修飾法の開発	9
【1-1-1】 基板への非特異的な細胞の吸着の抑制	9
【1-1-2】 捕捉がん細胞数の最大化	10
【1-1-3】 多様ながん種への対応	14
【1—2】がん細胞の可視化検出方法の開発	14
【2. 製品の確立と評価】	16
【2-1】動的変形マイクロフィルターのデザイン設計	
【2-1】動的変形マイクロフィルターの構造の最適化	
【2-2】動的変形やイクロフィルターの構造の最適化	
【2-4】血液中に混入させたがん細胞の選択的捕捉評価	
【3. 顧客満足評価】	24
【3-1】がん患者の血液を用いたがん細胞の捕捉評価	24
【3-2】捕捉されたがん細胞の可視化検出評価	24
学会発表実績・展示会出展実績	25
第3章 全体総括	27
3-1 研究開発成果	27
3-2 研究問発後の課題・事業化展開	27

#### 第1章 研究開発の概要

#### 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

#### ○研究開発の背景

日本人の死因の第一位は<u>がん</u>であり、全ての死因の約30%もの割合を占める(図1.2)。 男女ともに、30歳~60歳でがんによる死亡率は増え続けるにもかかわらず、この年代のがん検診受診率は40%にも満たない(図3)。その理由は、「受ける時間がない・忙しくて受診できなかった。」(図4)と言うものであり、費用の問題よりも短時間で手軽に受診できることが求められている。

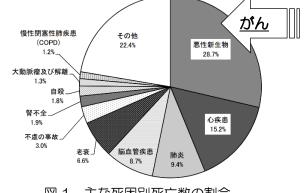


図 1 主な死因別死亡数の割合 (平成 27年)

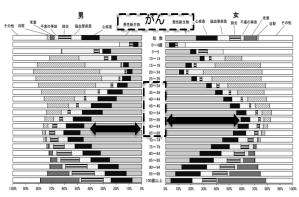


図2 性・年齢階級別に見た主な死因の 構成割合(平成27年度)

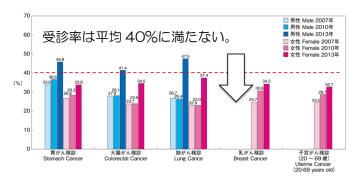


図3 男女別検診受診率(40~69歳)

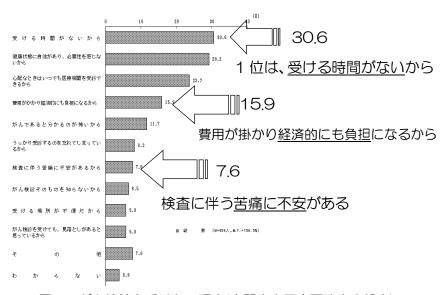


図4 がん検診を受けない理由(内閣府大臣官房政府広報室)

#### ○研究目的及び目標

現在、一般的に行われている MRI や CT (図 5) による検診は、受診時に長時間拘束されるものである。また、数ミリ以下の病変や血中に存在する微量な癌細胞を検出することは困難である。一方、Veride 社の CellSearch®システムは、血液を用いてがん検診する機器として唯一、米国 FDA (米国食品医薬品局) から承認されており、血液中に存在する循環腫瘍細胞(CTC)を検出するものである。 MRI や CT に比べて簡単に検診を受けることができるが、結果が出るまでに約 1 ヶ月の時間を要し、さらに陽性率は 25%と低い。高額でもあり、対費用効果から、本邦においては検診としても診断としても臨床に応用されていない。これらの課題を有する既存製品と本事業で開発する新製品との比較を表 1 に示す。

表 1 既存製品と新製品の比較

		既存	新製品	
		MRI, CT	CellSearch <sup>®</sup>	机袋皿
Q (機能)	陽性率	© <u>100%</u>	× <u>25%</u>	Δ <u>80%</u>
	微量がん細胞	× <u>画像診断</u>	◎ CTC 検出	◎ CTC 検出
	患部特定	0	×	×
C (コスト)	装置費用	× <u>1 億~2 億円</u>	△ <u>4 千 2 百万円</u>	◎ 1千万円以下
	検診費用 個人負担額	〇 2万~4万円	× <u>約 40 万円</u>	○ <u>千円程度</u>
D (納期)	検診時間	× 30分以上	◎ <u>採血のみ</u>	◎ 採血のみ
	判定時間	△ 2~3時間	× <u>1ヶ月</u>	◎ 1時間
S (安全性)		× <u>被爆</u>	◎ <u>採血のみ</u>	◎ <u>採血のみ</u>

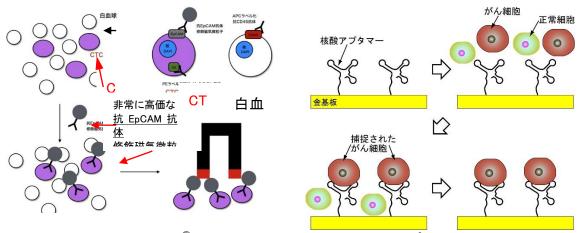
本事業では、微量の採血から CTC を検出することで、がん罹患の判定を行うものである(図6、7、8)。既存の CellSearch®システムよりもがん細胞を捕捉する技術を向上させるためにがん細胞を選択的に捕捉可能な動的変形マイクロフィルターを開発する。また、捕捉した CTC を基にして検出溶液を自発的に発光させることで容易に判定できるようにし、診断の時間を大幅に短縮することを目指す。



図5従来製品 (MRI、CT) の検診イメージ



図6 新製品の検診イメージ



既存技術 CellSearch<sup>®</sup>システム 新技術 核酸アプタマーによるCTC捕捉 図 7 既存技術と本研究の基盤技術の CTC 捕捉方法

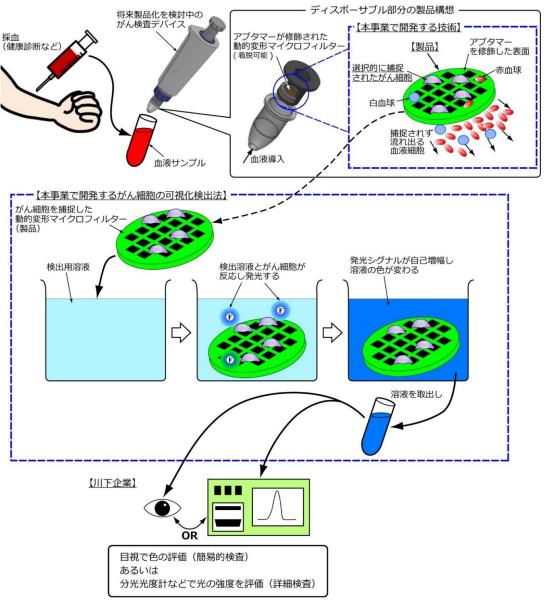
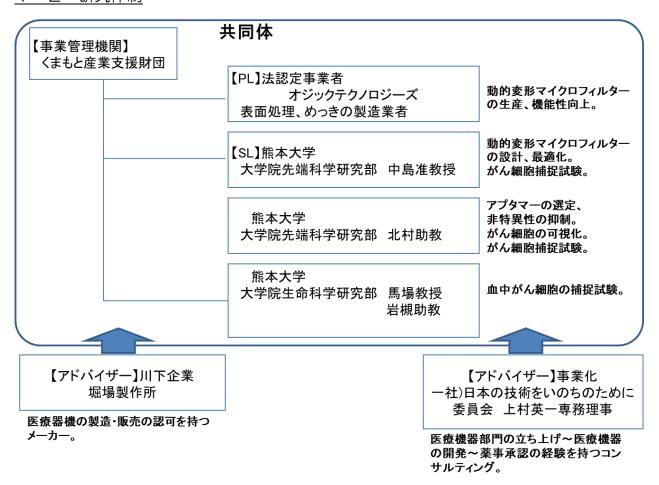


図8 本研究で開発するがん検診手法の流れ

#### 1-2 研究体制



#### 1-3 成果概要

動的変形マイクロフィルターの設計、シミュレーション、実証試験を行い、1ml 中に 1 億個もの膨大に存在する血中細胞から、数個程度しか存在しない極微量の CTC(血中循環腫瘍細胞)を捕捉可能とするデザインを考案・最適化しその効果を実証出来た。また、正常細胞の非特異的吸着を最小限に抑制し、がん細胞の特異的結合を最大限にする技術を構築した。

これら技術を構築した動的変形マイクロフィルターと既存 CellSearch®システムで、がん患者から提供頂いた血液を分析した結果、本マイクロフィルターの方が5倍以上のがん細胞を捕捉しており既存のシステムより高精度の検出が可能であることが示唆された。また、がん細胞存在下で発光する溶液を開発し、目視でも容易に判別できるほどの高発光強度が得られた。

### 1-4 当該研究開発の連絡窓口

㈱オジックテクノロジーズ

技術部次長 安田 敬一郎

Tel: 096-352-4450 Fax: 096-352-0807

kyasudaogic@outlook.jp

国立大学法人熊本大学

大学院先端科学研究部 准教授 中島 雄太

Tel: 096-342-3743 Fax: 096-342-3743

yuta-n@mech.kumamoto-u.ac.jp

#### 第2章 本論

#### 2-1 研究内容及び成果

#### 【1. 技術の確立と評価】

【1-1】 製品(動的変形マイクロフィルター)に修飾するアプタマーの選定ならび に修飾法の開発

多くの固形腫瘍は、図 9 に示すように細胞膜上に EpCAM (上皮細胞接着分子) という膜タンパクを高発現していることが知られている(1細胞あたり約 40 万個以上)。ここではこの EpCAM に結合する核酸アプタマー(以下 EpCAM アプタマーと称す)を修飾した金めっき基板を用いて特異的にがん細胞を捕捉するシステムを構築する。そのためには以下の3つの重要な構成技術要素を最適化する必要がある。

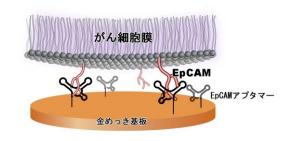


図9 がん細胞膜上に高発現している EpCAM と基板上に修飾された EpCAM アプタマーの結合を介した細胞の捕捉

#### 【1-1-1】 基板への非特異的な細胞の吸着の抑制

CTC 捕捉基板として金めっき処理が施された基板を用いる。コーティング金上にがん細胞を選択的に捕捉可能な仕組みを構築できれば、用途やニーズに応じて基板の基体となる素材をフレキシブルに選択可能となる。また、金表面は、蛍光法や電気化学測定法、SPR、

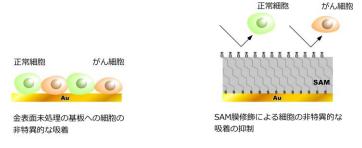


図 10 SAM 膜修飾による細胞の非特異的な吸着の抑制

QCM などの様々な分析手法と相性が大変よく、これらに応用可能となることも利点である。がん細胞を選択的に捕捉するためには、まず、基板上への細胞の非特異的な吸着を効果的に抑制するために細胞の非特異的な吸着が少ないと言われている6-Hydroxy-1-hexanethiol(6-HHT)、Sulfobetain3-undecanethiol(SB3UT)、Hydroxy-EG3-hexadecanethiol(H-EG3HDT)の3種類の鎖長が違うアルカンチオール類(それぞれ末端までの距離が8原子分、17原子分、27原子分)を用い、金基板上にピラニア溶液(硫酸:過酸化水素水=3:1)にてクリーニングした後、金一チオール結合を介しSAM膜を形成させた。評価は、修飾基板上に核をHoechst33342にて染色したMDA-MB-453細胞(がん細胞)、ならびにHEK293T(正常細胞)の非特異的な吸着学動を蛍光顕微鏡により観察した。

この結果を以下に示す。SAM の長さが最も長く、エチレングリコール構造を有する H-EG<sub>3</sub>HDT(27 原子分)が最も両細胞の非特異的な吸着が少ないことがわかった。

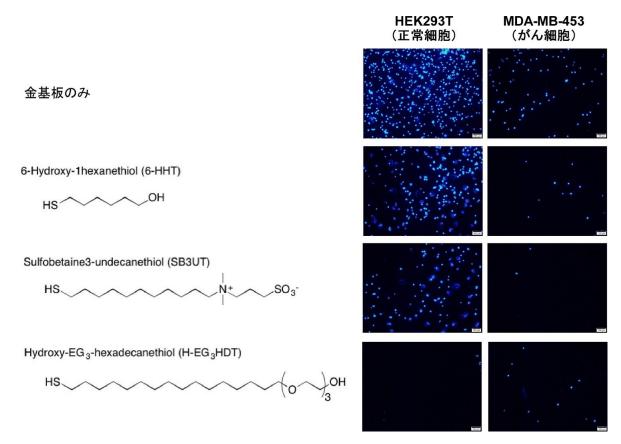


図 11. 自己組織化単分子膜を修飾した金基板上への細胞の非特異的な吸着

#### 【1-1-2】 捕捉がん細胞数の最大化

図 12 (a) に示すように 5'末端チオール化 EpCAM アプタマーを用いて金ーチオール結合にて基板に修飾する。その後、上記【1-1-1】で最適化したヒドロキシアルカンチオールを用い、EpCAM アプタマーが修飾されていない基板の残存面をマスキングすることによって、基板への細胞の非特異的吸着の抑制を試みた。また、正常細胞が基板上に結合してしまうと、EpCAM アプタマーががん細胞を認識するのを阻害するおそれがあるため、作製した基板を用いて、図 12 (b) に示すようにアプタマー修飾基板にがん細胞が特異的に捕捉されること、並びに正常細胞が非特異的に結合しないことを確認した。また、EpCAM の周辺には様々なタンパクや糖、脂質が存在し、大変込み入った環境となっている。よって、アプタマーの修飾密度並びに、アプタマーと基板を連結するリンカー部位の長さ、固さは、高い細胞捕捉効率を達成するために重要なパラメータとなる。これらの重要な実験因子となるアプタマーの修飾密度を測る方法として、クロノクーロメトリーという電気化学的手法によって評価が可能か確認を行った。その結果、金基板上に修飾されたアプタマーを定量可能であることを確認した。

次に、リンカーの構造や長さ、アプタマー修飾時の濃度を変化させ、修飾密度と細胞捕捉数の相関を確認した。アルカンチオールだけを修飾した基板と比較すると、アプタマーをさらに修飾した基板はいずれにおいても非特異的な細胞の吸着が少ないことがわかった。

よって、【1-1-1】にて最も非特異的な細胞の吸着が少なかった H-EG3HDT だけでは なく、6-HHT、SB3UT もマスキング材として再検討することにした。また、アプタマー とチオール末端までのリンカーとしてヘキサメチレン構造を有する SH-C6-aptamer、並 びにさらにフレキシブルで長い構造を追加した SH-C6-SP18-aptamer をアプタマーと して用いた。図 13 に示すように、SH-C6-SP18-aptamer は、他と比較して固定化率 が多少低かったが、これを修飾し、H-EG₃HDT でマスキングした基板には、多くの細胞 が捕捉されることがわかった。10 μΜの濃度で修飾した場合に最も高い細胞捕捉率が得 られ、それ以上の濃度で修飾するとむしろ細胞捕捉率が低下することがわかった。しかし ながら、いずれの濃度で修飾した場合でも、アプタマーの配列をランダムに入れ替えた scrambled DNAにも非特異的に多く結合した。一方、同じくSH-C6-SP18-aptamer を 修飾した基板でも SB3UT にてマスキングした場合、アプタマーの修飾率は高いにも関わ らず、全く細胞が捕捉されないことがわかった。図 14 に示すように、SH-C6-aptamer においては、リンカーが短いため、マスキング材として 6-HHT を選択し、がん細胞の特 異的捕捉を試みた。結果、こちらも 10 μΜの濃度で修飾した場合に最も高い細胞捕捉率 が得られることがわかった。また、scrambled DNA を修飾した基板にもほとんど細胞が 非特異的に結合しないことも併せてわかった。

これらの結果より、SH-C6-aptamer 修飾 6-HHT マスキング基板が最もがん細胞を選択的に捕捉可能であることがわかった。また、修飾時のアプタマー濃度が 50  $\mu$ M では捕捉効率が低下していたため、基板上で高密度となり過ぎて立体障害を起こし、捕捉に不利にはたらいていると考えられる。

なお、クロノクーロメトリーの結果より、条件での基板修飾時、アプタマーは約 15%の バラツキで修飾できていることがわかった。

次に SH-C6-aptamer 修飾 6-HHT マスキング基板で MDA-MB-453 細胞と HEK-293T 細胞の混合懸濁液を用いて細胞捕捉実験を行ってみたところ、100倍の HEK-293T 細胞が存在する溶液中からも目的とする MDA-MB-453 細胞が捕捉されることがわかった。目標の70%以上の選択性での捕捉率は4倍のがん細胞共存下でも達成できた(図 15)。

また、同様の基板にて KATOIII 細胞(ヒト胃癌細胞)と HEK-293T 細胞の混合懸濁液を用いて細胞捕捉実験を行ってみたところ、100 倍の HEK-293T 細胞が存在する溶液中からも目的とする KATOIII 細胞が捕捉されることがわかった。目標の 70%以上の選択性での捕捉率は 5 倍のがん細胞共存下でも達成できた(図 16)。

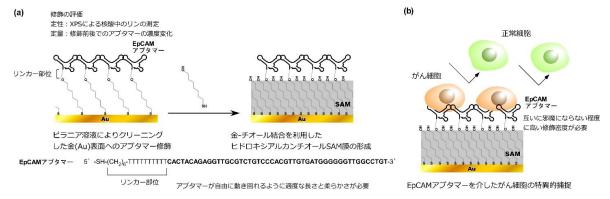


図 12 (a) がん細胞捕捉基板の作製法 (b) EpCAM アプタマー修飾基板に対するがん細胞の特異的捕捉

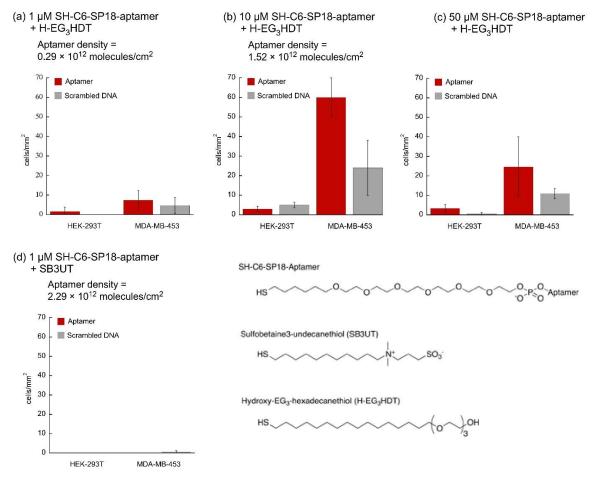


図 13. (a) 1  $\mu$ M SH-C6-SP18-aptamer 修飾H-EG $_3$ HDT マスキング基板による細胞捕捉結果。 (b) 10  $\mu$ M SH-C6-SP18-aptamer 修飾 H-EG $_3$ HDT マスキング基板による細胞捕捉結果。 (c) 50  $\mu$ M SH-C6-SP18-aptamer 修飾 H-EG $_3$ HDT マスキング基板による細胞捕捉結果。 (d) 1  $\mu$ M SH-C6-SP18-aptamer 修飾 SB3UT マスキング基板による細胞捕捉結果。

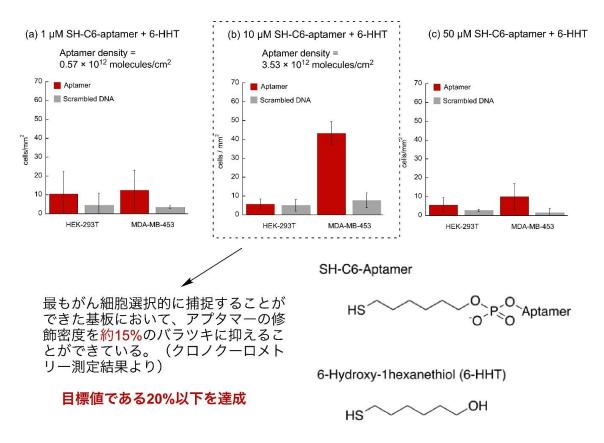


図14. (a) 1  $\mu$ M SH-C6-aptamer 修飾 6-HHTマスキング基板による細胞捕捉結果。(b) 10  $\mu$ M SH-C6- aptamer 修飾 6-HHT マスキング基板による細胞捕捉結果。(c) 50  $\mu$ M SH-C6-aptamer 修飾 6-HHT マスキング基板による細胞捕捉結果。

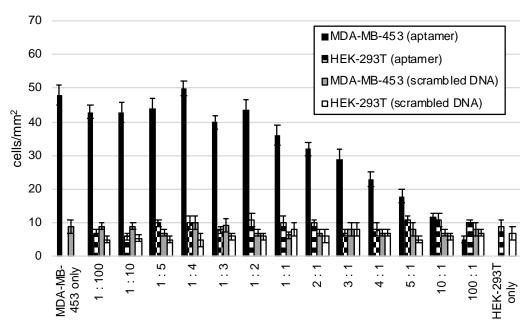


図 15. HEK-293T 細胞と MDA-MB-453 細胞との混合懸濁液(総数 40,000 個)からの MDA-MB-453 細胞の捕捉。

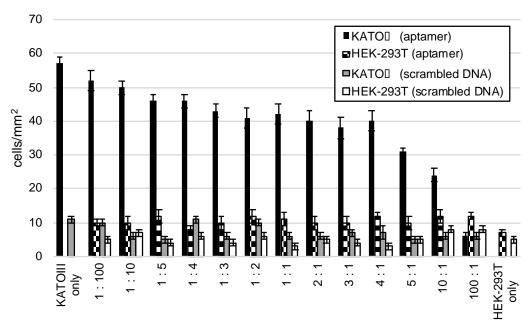


図 16. HEK-293T 細胞と KATOIII 細胞との混合懸濁液(総数 40,000 個) からの KATOIII 細胞の捕捉

#### 【1-1-3】 多様ながん種への対応

細胞種によっては EpCAM の発現量が若干少ないがん細胞もあると予想していた。 EpCAM のみで十分な捕捉効率が得られない場合は、他のがん細胞表面のマーカーとなる タンパク(ヌクレオリン、HER2、EGFR、MUC1、c-Met、CD44、CD133)のアプタマーを補助役として併用する予定としていたが、現在調査した細胞では EpCAM で十分 捕捉されることがわかった。

#### 【1-2】がん細胞の可視化検出方法の開発

本研究では、細胞を直接観察するのではなく、標的細胞がきっかけとなり、その溶液中に自発的にシグナルが増幅されるシステムの構築を目指した。細胞表層に特異的に高発現している EpCAM のようなタンパクを標的し、これをきっかけとして、シグナルを増幅する機構が多点で進行すれば、1 細胞からでも多くのシグナルを得ることができると考えた。 具体的には図 17(a)に示すように基板に捕捉されたがん細胞に「タグ付き」EpCAM アプタマーを結合させ、洗浄した後、特定の二本鎖 DNA 溶液を添加すると、その二本鎖 DNA から EpCAM アプタマーの「タグ」に応答して一本鎖 DNA が放出されることが期待される。この一本鎖がトリガーとなり、後に続く発光シグナルの増幅機構(図 17(b))が動作する仕組みである。ここでは DNA サーキットを用いたシグナル増幅を検討した。

# | タグ付きpCAMアプタマー | タグ付きpCAMアプタマー | アプタマーが有するタグに | 応答して一本鎖が放出される | アプタマーが有するタグに | 応答して一本鎖が放出される | アプタマー | 上澄の回収 | シグナル増幅(b)へ

#### (b) トリガーをきっかけとしたシグナル増幅



図 17 (a) 基板に捕捉されたがん細胞に結合する「タグ付き」EpCAM アプタマーのタグを介して放出される一本鎖 DNA(トリガー)と(b) 放出されたトリガーを起点として開始されるシグナル増幅

図 17 (b) 左図に示すように蛍光色素(FAM)または消光剤(BHQ)を修飾した 2 種の DNA プローブを作製した。予め、互いの修飾部位が近接するように相補鎖であるプラットホーム DNA とタンデム二本鎖複合体を形成させた(蛍光オフ)。がん細胞に応答して放出されたトリガーDNA は、その複合体末端の突出部位(図 17 (b) 左図中の 4\*)をきっかけとし、鎖交換反応を引き起こす。結果、消光剤修飾プローブが二本鎖複合体から放出され、蛍光プローブが発光する設計とした。ここにサーキットを回転させるための燃料となる DNA を加えておくと、新たに出現した突出部位(図 17 (b) 左図中の 2\*)をきっかけとした鎖交換反応が起こり、蛍光プローブのみならずトリガーDNA も溶液中に放出され、結果、トリガーDNA が再利用可能となる設計とした。

得られた結果を図18に示す。MDA-MB-453細胞の上澄みを加えた溶液は添加後から速やかに発光強度が増加することがわかった。また、HEK-293Tにおいては非特異的に結合したアプタマーによって放出されたと考えられるトリガーから増幅されるシグナルが若干確認された。しかしながら、その発光強度には約3.5倍以上の明確な差が確認され、目視でもその差は容易に確認できた。

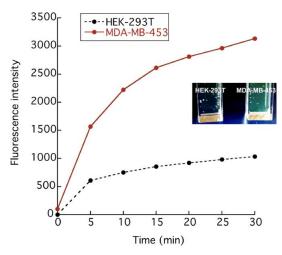


図18. DNA サーキットの回転にともなう発光強度の増加。図中の写真は暗室にてハンディーランプをかざして撮影した。

#### 【2. 製品の確立と評価】

#### 【2-1】動的変形マイクロフィルターのデザイン設計

血液中にわずかに存在するがん細胞を効率的に捕捉するために、EpCAM アプタマーに よるがん細胞の選択的捕捉をアシストする動的変形マイクロフィルターを構築した。本マ イクロフィルターはマイクロ加工技術と精密電鋳技術によって製作される。流体力によっ て平面形状から立体形状に動的に弾性変形するように設計されている。 図 19 に示すよう に、マイクロフィルターに作用する流体力が大きくなるとマイクロフィルターが徐々に変 形し、血液細胞が解放される。この際、がん細胞はマイクロフィルターの表面に修飾され た EpCAM アプタマーによって選択的に捕捉されているため、マイクロフィルターにはが ん細胞のみが捕捉される仕組みである。本マイクロフィルターを実現するためにフィルター 形状の考案を行い、試作品の製作を開始すると共に、数値解析ソフトを用いて構造一流体 の連成解析を行った。試作品を図 20 に、数値解析ソフトによる構造解析と流体解析の準 備状況を図21、22に示す。試作品を用いた実証実験を行った結果、目的の細胞を選択的 に捕捉することが可能なフィルターを製作することに成功した。これにより、本設計で考 案した通りにフィルター動作し、目的を達成できることが示唆された。一方で、目的の細 胞の選択的捕捉はできるものの、捕捉数が少ないという課題が明らかになった。このため、 数値解析ソフトを用いて構造-流体の連成解析を行い、効果的に捕捉できるマイクロフィ ルターの形状やフィルターの開口部の形状やサイズなどの設計指針を得、フィルター構造 の再設計を行った。さらに捕捉実験を重ねると共に、実際の血液サンプルを用いた実験の 結果をフィードバックした。また、その結果と FEM による構造解析結果を照らし合わせ て検討することにより、フィルター形状を最終形状に決定した。

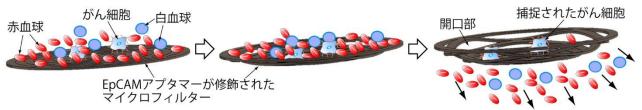


図 19 動的変形マイクロフィルターを用いたがん細胞の捕捉方法

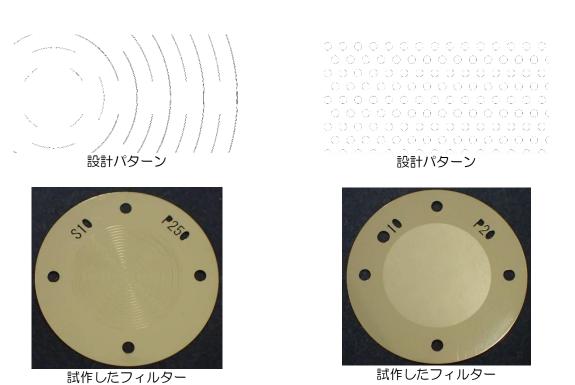


図20 試作した動的変形マイクロフィルター

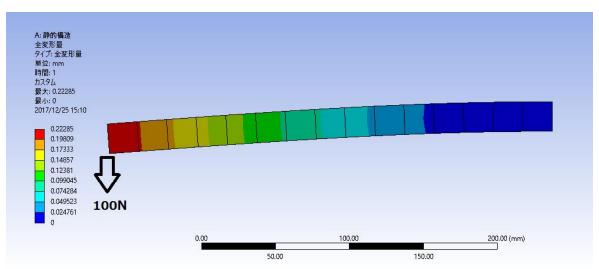


図 21 構造解析の検証結果

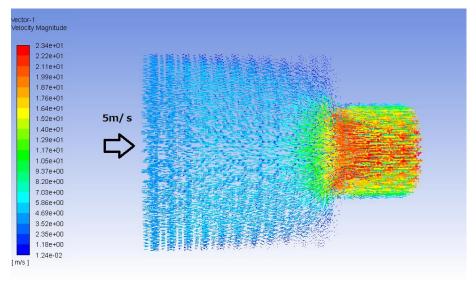


図 22 流体解析のそれぞれの検証結果

#### 【2-2】動的変形マイクロフィルターの構造の最適化

マイクロフィルター自身の剛性は変形量に大きく影響する。このため、製作したマイクロフィルターの剛性が均質であることが重要である。均質なフィルター構造物を製作するためにめっき技術を用いた精密電鋳によりマイクロフィルターを製作した。製作したマイクロフィルターの硬度を測定し、製造方法や前処理・後処理方法をフィードバックすることによってマイクロフィルターの剛性を最適化する。また、図23、24に示すような数値解析を行うことにより、マイクロフィルターの剛性と流体力によるフィルターの変形量の相関を得た。さらに、血液などの液体をマイクロフィルターに通す際の流体導入速度や圧力、フィルターに負荷される流体力分布などによって、捕捉の効率が変わることが予想できる。実験と数値解析とを組み合わせることにより、各種流体のパラメータの最適化を行った。

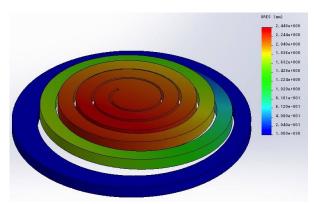


図 23 マイクロフィルター構造の最適化を 行うための数値解析の例

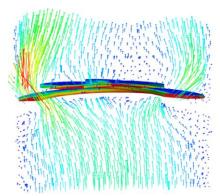


図 24 流体パラメータの最適化を行う ための数値解析の例

マイクロフィルターは、精密電鋳の技術を用いて製作した。精密電鋳では、電流分布の 問題で端の方が厚くなってしまい、膜厚のバラツキがフィルター製作において致命的欠点 となるため、パターン寸法および膜厚の実力値把握とバラツキ低減を行った(図 25、26)。

その結果、パターン寸法については、実力値で問題ないことが確認できた。膜厚については、設計に大きく影響するほどであったので、精密電鋳の作製条件の改善を行い、2-2-3がん細胞選択的捕捉評価に適用した。また、マイクロフィルターの設計期間を短縮するため、図 27 に示す直接描画装置を導入し、フィルターの作製検討を進めた。直接描画装置を用いて、レジストパターンの寸法精度を向上させ、設計〜製作完了までの期間を1ヶ月から2週間に短縮することが可能になった。次に、マイクロフィルターの剛性を向上するため、フィルターの合金化検討をおこなった。フィルターの合金化検討では、図 28に示すように、平滑な Cu 基材に対して3種の試料を作製し、硬度バラツキ評価をおこなった。バラツキの大きいものでも10%で、目標値20%を達成した。

また、各種電鋳浴評価で Ni-Mn、Ni-Co、Ni-Fe、Ni-P 電鋳浴によるめっき条件検討をおこなった。その結果、めっき硬度 600H~1000HV の特性を持つフィルター剛性のラインナップ化を図ることが出来た。さらに、フィルター表面形態のラインナップ充実化を検討した。これは、マイクロフィルターの表面積を増やすことを目的としている。具体的には、図 29 に示すような細孔 1 μm 以下のポーラス構造や、表面を粗化したサテン構造を持つ表面形態の形成が実現でき、表面形態のラインナップの充実が図れた。



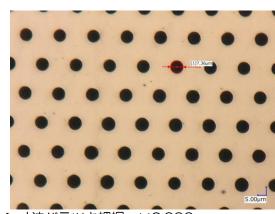
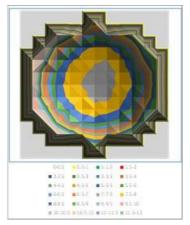


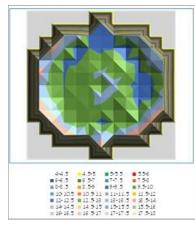
図 25 マイクロフィルターのパターン寸法バラツキ把握 ×2.000

#### 6 種類のパターンについて評価実施(1 パターン n=12)

	1	2	3	4	5	6
平均	8.28 $\mu$ m	8.05 $\mu$ m	18.29 <i>μ</i> m	18.06 <i>μ</i> m	7.31 <i>μ</i> m	18.65 <i>μ</i> m
Σ	0.37	0.35	0.34	0.34	0.26	0.25
Max	8.64 μ m	8.80 μ m	18.65 μ m	18.40 <i>μ</i> m	7.91 μ m	19.07 μ m
Min	7.61 <i>μ</i> m	7.54 μ m	17.60 <i>μ</i> m	17.41 μ m	$6.99\mu$ m	18.24 <i>μ</i> m
R	1.03 μ m	1.26 μ m	1.05 μ m	$0.99\mu$ m	0.92 μ m	0.83 <i>μ</i> m
バラツキ	12%	16%	6%	5%	13%	4%



実力値 4inchWafer n=89 平均  $6.69\,\mu$  m  $\sigma$  2.04 Max  $10.74\,\mu$  m Min  $4.32\,\mu$  m R 6.42 バラツキ 96%



改善後 4inchWafer n=89 平均 12.92 μ m σ 0.49 Max 14.13 μ m Min 12.11 μ m R 2.02 μ m バラツキ 16%

図 26 基板(4inchWafer)面内の膜厚バラツキ把握と改善



直接描画装置 図 27 直接描画装置によるフィルターのレジストパターン試作

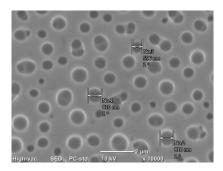
#### 3種の試料について硬度測定実施(1サンプル n=9)

- 1= -0-11		137-27-18-0-1	
	Ni 電鋳	Ni-P 電鋳 (熱処理な し)	Ni-P 電鋳 (熱処理あ り)
平均	597.9HV	661.1HV	949.9HV
σ	8.1	13.9	32.3
Max	607.2HV	689HV	995.7HV
Min	588HV	638.5HV	900HV
R	19.2HV	50.5HV	95.7HV
バラツ キ	3%	8%	10%

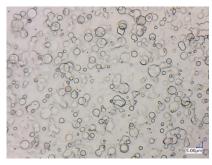


硬度測定試料(Cu材へのNi-P電鋳)

図 28 剛性向上を目的とした硬度バラツキ把握



ポーラス構造(細孔く1 µm)



サテン構造(Ra=0.10,Rz=0.83 μ m)

図 29 マイクロフィルター表面形態のラインナップ充実化

#### 【2-3】がん細胞選択的捕捉評価

がん細胞選択的捕捉評価を行うための準備として、マイクロフィルター把持デバイスの設計・製作を行った。また、マイクロフィルターの表面にアプタマーを修飾するための治具を考案し製作したことにより、使用する試薬量の削減と作業の効率化を達成した。次にがん細胞と正常細胞を含むサンプル溶液をそれぞれ準備し、評価を行った。評価を行う際の各種条件は、2-2-2で検討した条件により設定した。構築したマイクロフィルターを通過させた際のそれぞれの細胞の捕捉量を検証し、正常細胞に比べてがん細胞が選択的に捕捉されることを実証した。また、この実験結果はマイクロフィルターの設計や流体パラメータの設定にフィードバックし、さらなる効率化を目指すためのデータとした。

次に、がん細胞の選択的捕捉が可能であることを実証するために主にがん細胞としてヒト乳がん細胞である MDA-MB-453 細胞と正常細胞としてヒト胎児腎細胞である HEK293T 細胞を用いて実験を行った。また、その際に、フィルター上に核酸アプタマーを修飾したものと、核酸アプタマーと同じ塩基数であるがその配列に全く意味を持たない スクランブル DNA を修飾したものを用いて検証した。その結果、図 30 に示す通り、フィルター上に核酸アプタマーを修飾した場合に選択的にがん細胞を捕捉できることを実証した。さらに、正常細胞とがん細胞の比率を 10:1、100:1、1000:1に調整して混合したサンプルを用いて捕捉実験を行った結果、図 31 に示す通り開発したフィルターを用いることによってがん細胞を選択的かつ効果的に捕捉可能であることを示した。さらに、フィルターの改良やシステム全体の条件検討により捕捉効果や精度を上げることを目指し研究を推進した。3 種類のフィルターの形状を用いて MDA-MB-453 細胞と HEK293T細胞の捕捉実験を行った。その結果、図 32 に示す通り、(c)のフィルターが最も多くのがん細胞を捕捉することができ、さらに正常細胞の非特異吸着を抑制できることを実証した。このため、本フィルター形状を最終形状とし、今後の検証ではこのフィルターを用いることとした。

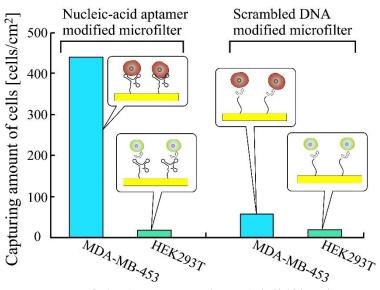


図30 設計したフィルターを用いた細胞捕捉評価

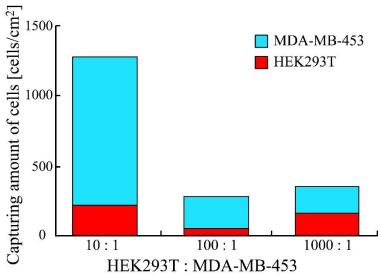


図31 正常細胞とがん細胞を混合した際の捕捉評価

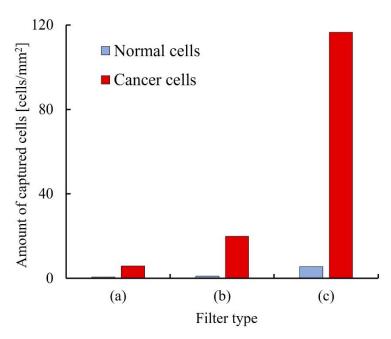


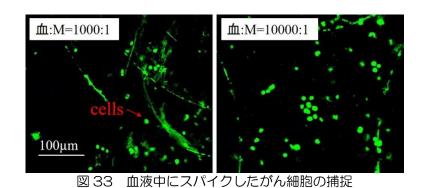
図32 フィルター形状と細胞捕捉量

#### 【2-4】血液中に混入させたがん細胞の選択的捕捉評価

血液中のがん細胞を選択的に捕捉可能であることを実証するために、健常者の血液に一定数のがん細胞を混入したサンプルを用いて検証した。本検証により、血液中に含まれるがん細胞の捕捉効率を求めた。血液に混ぜ込むがん細胞は、実験ごとに 1 種類のヒト由来のがん細胞を用いて評価を行い、提案する動的変形マイクロフィルターの有効性を示す。

実際の診断には採血して取り出したままの全血を使うのが望ましいが、血液中には多くの血球細胞(赤血球、白血球、血小板など)やタンパク成分などの生体分子が含まれているため、血液中のがん細胞を捕捉しようとする際、これらの生体分子が、がん細胞の選択的捕捉を阻害する可能性が考えられる(川下企業からの助言)。血液サンプルを用いた検証

には、羊の保存血を購入し、その血液の中にがん細胞をスパイクした。スパイクする量をコントロールすることによって、血液中に存在するがん細胞の量を調整した。その結果を図 33、34 に示す。このように、血液中からでも目的の細胞を捕捉することに成功した。さらに、血液中のがん細胞の濃度をさらに低くした検証を行った。具体的には、血球細胞と癌細胞との比率が 10,000:1~100,000,000:1 の濃度になるように健常者の血液サンプルにがん細胞をスパイクしたサンプルを調整し、最適化したフィルターを用いて検証を行った。その結果を図 35 に示す。がん細胞の濃度が薄くなるにつれて、フィルターによって捕捉される量が減少するものの、血球細胞 1 億個に対して 1 個の割合で混入したがん細胞でも本フィルターを用いることによって捕捉可能であることを実証した。この濃度は、実際のがん患者の血液中に含まれる CTC の濃度と同程度だと言われており、本プロジェクトが開発したフィルターが実臨床に適用可能であることが示唆された。



| Tool | Tool

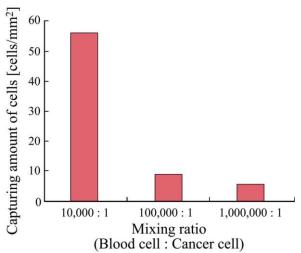


図35 血液中にスパイクしたがん細胞の捕捉結果(10,000:1~1,000,000:1)

#### 【3. 顧客満足評価】

#### 【3-1】がん患者の血液を用いたがん細胞の捕捉評価

実際のがん患者から採取した血液を用いて、がん細胞の捕捉実験を行う。熊本大学附属病院消化器外科では、年間 700 例近くの消化器癌(食道癌、胃癌、大腸癌、肝癌、膵癌など)を切除しており、早期から進行癌までのいずれの進行度の癌を扱っている。がん患者の血液中に含まれるがん細胞数は、がんの進行度(ステージ)が高いほど多いことが知られている。このため、まずはがんのステージが IV あるいは比較的高い患者の血液を用いてがん細胞の捕捉実験を行い、捕捉数を求める。がん患者の血液中のがん細胞の数や濃度は不明である。このため、本マイクロフィルターの有効性を検証するための比較対象として、唯一 FDA の承認を受けている CellSearch®システムで同じ患者の血液を分析したものを用いる(外注)。preliminary に胃癌、多発肝転移症例で、本マイクロフィルターとCellSearch®システムを用いて測定した。本マイクロフィルターでは平均 22 個(3 枚のフィルタを用いた試行)、CellSearch®システムでは 4 個の CTC を検出し、既存のシステムと比較し、より精度の高い検出が可能であることが示唆された。今後も、より多くの症例数で検証し、画像では明らかではない転移・再発が疑われる症例においても検証を進め、既存の腫瘍マーカーを凌駕しうるかを検討する予定である。

#### 【3-2】捕捉されたがん細胞の可視化検出評価

今後、がん患者の血液中のがん細胞を捕捉した動的変形マイクロフィルターを細胞の可 視化検出溶液に浸漬し、発光からがんを検出できることを実証する予定である。また、が んの進行度もその発光強度から検査できることを実証するために、分光光度計を用いた光 学測定を実施し、目視による簡易診断と測定器を用いた詳細診断が可能であることを示す。

#### 学会発表実績 • 展示会出展実績

#### 国際学会

- 1. Kenshiro Nakatake, Yuta Nakashima, Ryo Iwamoto, Ayase Tashima, Yusuke Kitamura, Keiichiro Yasuda, Masaaki Iwatsuki, Hideo Baba, Toshihiro Ihara, and Yoshitaka Nakanishi, "Fabrication of Three-dimensional Deformable Microfilter for Capturing Target Cells," Proceedings of 2017 IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, pp. 35-36, 2017. (查読有)(DOI: 10.1109/MHS.2017.8305259)
- Yuta Nakashima, Kenshiro Nakatake, Keiichiro Yasuda, Yusuke Kitamura, Masaaki lwatsuki, Hideo Baba, Toshihiro Ihara, and Yoshitaka Nakanishi, "Dynamic Deformable Microfilter for Capturing Circulating Tumor Cells," Proceedings of μTAS 2017, pp. 866-867, 2017 (查読有)
- 2017, pp. 866-867, 2017. (查読有)
  3. Yusuke Kitamura, Ayase Tashima, Miho Nakamura, Yuta Nakashima, Keiichiro Yasuda, Masaaki Iwatsuki, Yousuke Katsuda, Hideo Baba, Yoshitaka Nakanishi, Toshihiro Ihara," Capture of cancer cells on a gold substrate modified with DNA aptamer", The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 東京理科大学@東京, 2017年11月11日
- 4. Yusuke Kitamura, Hiroshi Goto, Yousuke Katsuda, and Toshihiro Ihara, "Generation of anti-CD24 aptamer by crossover SELEX", The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 京都大学@京都, 2018年11月8日
- 5. Soichiro Fukuyama, Souma Hitotsuya, Seitaro Kumamoto, Keiichiro Yasuda, Yusuke Kitamura, Masaaki Iwatsuki, Hideo Baba, Toshihiro Ihara, Yoshitaka Nakanishi, and Yuta Nakashima, "Dynamic deformable microfilter modified with nucleic-acid aptamer for selective capturing a target cell," The 8th International Conference on BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices, BioMEMS/NEMS & Applications 2019, pp. 60-61, 2019. (查読有)
- 6. Yuta Nakashima, Soichiro Fukuyama, Seitaro Kumamoto, Keiichiro Yasuda, Yusuke Kitamura, Masaaki Iwatsuki, Hideo Baba, Toshihiro Ihara, and Yoshitaka Nakanishi, "Separation/capture of Cancer Cells in Blood Using a Nucleic-acid Aptamer Modified Dynamic Deformable Microfilter," Proceedings of μTAS 2019, pp. 636-637, 2019. (查読有)
- 7. Ayase Tashima, Yusuke Kitamura, Yuki, Kudo, Yuta Nakashima, Keiichiro Yasuda, Masaaki Iwatsuki, Yousuke Katsuda, Hideo Baba, Yoshitaka Nakanishi, Toshihiro Ihara, "Fabrication of EpCAM aptamer-modified gold substrate and specific capture of cancer cells on it",第24回日本化学会九州支部 韓国化学会釜山支部合同セミナー,熊本大学@熊本,2019年6月8日
- 8. Yusuke Kitamura, Yuki Kudo, Ayase Tashima, Yuta Nakashima, Keiichiro Yasuda, Masaaki Iwatsuki, Yousuke Katsuda, Hideo Baba, Yoshitaka Nakanishi, Toshihiro Ihara, "Amplified detection of cancer cells by DNA circuit", The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 小金井シビックセンター@東京, 2019年10月30日
- 9. Ayase Tashima, Yuki Kudo, Yusuke Kitamura, Yuta Nakashima, Keiichiro Yasuda, Masaaki lwatsuki, Yousuke Katsuda, Kenshiro Nakatake, Hideo Baba, Yoshitaka Nakanishi, Toshihiro Ihara, "Fabrication of anti-EpCAM aptamer-modified gold substrate for capturing cancer cells", The 14th International Student Conference on Advanced Science and Technology (ICAST) Kumamoto, 熊本大学@熊本, 2019年11月29日

#### 国内学会

- 1. 中竹拳志郎, 中島雄太, 岩本凌, 田島彩瀬, 北村裕介, 安田敬一郎, 岩槻政晃, 馬場秀夫, 井原敏博, 中西義孝, "核酸アプタマーと3次元変形能を持つマイクロフィルタを用いた標的細胞捕捉", バイオマイクロデバイス研究会 電気学会研究会資料 pp.19 21, 東京大学, 2018年3月5日.
- 2. 田島 彩瀬、北村 裕介、勝田 陽介、中島 雄太、安田 敬一郎、岩槻 政晃、中竹 拳志郎、馬場 秀夫、中西 義孝、井原 敏博," EpCAM アプタマーを利用した金基板へのがん細胞捕捉に関する研究",第55回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場@北九州、2018年6月30日
- 研究",第55回化学関連支部合同九州大会,北九州国際会議場@北九州,2018年6月30日3. 後藤 広志、北村 裕介、勝田 陽介、井原 敏博," In vitro selection 法を用いた抗 CD24 アプタマーの取得",第55回化学関連支部合同九州大会,北九州国際会議場@北九州,2018年6月30日
- 4. 田島 彩瀬、北村 裕介、中島 雄太、安田 敬一郎 岩槻 政晃、勝田 陽介、 中竹 拳志郎、馬場 秀

- 夫、中西 義孝、井原 敏博," EpCAM アプタマーを用いた金基板へのがん細胞捕捉",生体機能 関連化学若手の会 第30回サマースクール, ANAホリデイインリゾート宮崎@宮崎, 2018年7 月20日
- 田島 彩瀬、北村 裕介、中島 雄太、安田 敬一郎、岩槻 政晃、勝田 陽介、中竹 拳志郎、馬場 秀 夫、中西 義孝、井原 敏博," 抗 EpCAM アプタマー修飾金基板へのがん細胞補足に関する研究", 第36回九州分析化学若手の会 夏季セミナー, 荒木観光ホテル@熊本, 2018年7月28日
- 中島雄太,中竹拳志郎,田島彩瀬,北村裕介,安田敬一郎,岩槻政晃,馬場秀夫,井原 敏博,中西義孝,"標的細胞を分離・取得するための動的変形可能なマイクロフィルタ"、日本機械学会
- 2018 年度年次大会, 関西大学, 2018 年 9 月 9-12 日 北村 裕介、後藤 広志、勝田 陽介、井原 敏博,"ハイブリッド SELEX 法を用いた抗 CD24 アプタマーの取得",第12回バイオ関連化学シンポジウム,東北大学@仙台,2018 年 9 月 10 日北村 裕介、倉本 諒、勝田 陽介、井原 敏博," 核酸の動的構造のプログラミングを利用した電気化学シグナル増原型核酸検出法の開発" 日本分析化学会第67 年会、東北大学@仙台、2018 年
- 化学シグナル増幅型核酸検出法の開発", 日本分析化学会第67年会, 東北大学@仙台, 2018年 9月14日
- 岩槻 政晃,中島 雄太,北村 裕介,安田 敬一郎,馬場 秀夫," 3次元変形能を持つ DNA アプタマー修飾マイクロフィルタ用いた癌細胞検出機器の開発",第77回 日本癌学会学術総会,大阪国際会議 場, 2018年9月29日
- 10. 中島雄太、福山創一朗、中竹拳志郎、田島彩瀬、北村裕介、安田敬一郎、岩槻政晃、馬場秀夫、井原敏博、中西義孝, "核酸アプタマーを表面に修飾した3次元変形能を持つマイクロフィルタによるターゲット細胞の分離",化学とマイクロ・ナノシステム学会第38回研究会,札幌市民交 流プラザ,2018年10月30日
- 11. 福山創一朗, 熊本清太郎, 安田敬一郎, 北村裕介, 岩槻政晃, 馬場秀夫, 井原敏博, 中西義孝, 中島雄太, "核酸アプタマー修飾マイクロフィルタを用いた血中腫瘍細胞の捕捉評価"、化学とイクロ・ナノシステム学会第39回研究会, pp.24, 金沢大学, 2019年5月27-28日.
- 12. 工藤 悠暉, 北村 裕介, 田島 彩瀬, 勝田 陽介, 安田 敬一郎, 中島 雄太, 岩槻 政晃, 馬場 秀夫, 中西 義孝, 井原 敏博, "DNA サーキットによるシグナル増幅を利用したがん細胞の検出", 第56 回化学関連支部合同九州大会, 北九州市, 2019年7月13日
- 13. 福山創一朗, 熊本清太郎, 安田敬一郎, 北村裕介, 岩槻政晃, 馬場秀夫, 井原 敏博, 中西 義孝, 中島雄太, "ターゲット細胞の選択的分離のための核酸アプタマーを修飾した動的変形能を持つマ イクロフィルタの構築", 日本機械学会第30回バイオフロンティア講演会, 1B22(3 pages), 霧島, 2019年7月19-20日.
- 14. 工藤 悠暉, 北村 裕介, 田島 彩瀬, 勝田 陽介, 安田 敬一郎, 中島 雄太, 岩槻 政晃, 馬場 秀夫, 中 西 義孝, 井原 敏博, "DNA サーキットによるシグナル増幅を利用したがん細胞の検出に関する 基礎的検討",第37回九州分析化学若手の会 夏季セミナー, 唐津, 2019年7月26日
- 15. 田島 彩瀬, 工藤 悠暉, 北村 裕介, 中島 雄太, 安田 敬一郎, 岩槻 政晃, 勝田 陽介, 馬場 秀 中西 義孝, 井原 敏博, "抗 EpCAM アプタマー修飾金基板上へのがん細胞の捕捉", 第13回バ イオ関連化学シンポジウム 2019, 東北大学@仙台市, 2019 年9月4日
- 16. 北村 裕介, 後藤 広志, 林田 泰起, 勝田 陽介, 井原 敏博, "クロスオーバーSELEX による抗 CD24DNA アプタマーの取得とその機能評価", 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019, 東 北大学@仙台市, 2019年9月4日
- 17. 熊本清太郎,福山創一朗,安田敬一郎,北村裕介,岩槻政晃,馬場秀夫,井原敏博,中西義孝,中島雄太,"動的変形マイクロフィルタ を用いた血中ターゲット細胞の特異的捕捉",日本機械学会2019年度年次大会、J02815(3 pages)、秋田大学、2019年9月8-11日.
- 18. 岩槻 政晃,中島 雄太,北村 裕介,安田 敬一郎,馬場 秀夫," 核酸アプタマーと3次元変形能を持つマイクロフィルタのよる癌細胞の検出機器の開発",第57回 日本癌治療学会 学術集会,福岡国 際会議場, 2019年10月25日
- 19. 福山創一朗, 一家翔真, 熊本清太郎, 安田敬一郎, 北村裕介, 岩槻政晃, 馬場秀夫, 井原敏博, 中西義孝, 中島雄太, "動的変形可能なマイクロフィルタを用いたヒトの血液中に含まれる腫瘍細胞の捕捉," 2020 年日本生体医工学会九州支部学術講演会, KKR ホテル熊本, 2020 年 1 月 25 日.

#### 展示会実績

- 1 本郷展示会,日本医科器械会館,2018年3月1日
- ネプコンジャパン 2019,東京ビッグサイト,2019 年 1 月 16~18 日
- 2. 3. SURTECH2019,東京ビッグサイト,2019年1月30日~2月1日
- 4.
- 本郷展示会,日本医科器械会館,2019年2月28日 中島雄太, "細胞を測る・調べる・操る・管理する" イノベーションジャパン, 東京ビッグサイト, 2019年8月29日~8月30日.
- 日本癌治療学会学術集会,マリンメッセ福岡,2019年10月24日~26日
- 本郷展示会,日本医科器械会館,2019年12月13日
- ネプコンジャパン 2020,東京ビッグサイト,2020 年 1 月 15 日~17 日 SURTECH2020,東京ビッグサイト,2020 年 1 月 29 日~31 日

#### 第3章 全体総括

#### 3-1 研究開発成果

#### 技術の確立と評価

- 捕捉基板への不必要な正常細胞の非特異吸着を、がん細胞の特異的結合に対して 13% 以下に抑制することが出来た。
- •正常細胞ががん細胞の 100 倍多く共存する溶液からも、がん細胞を特異的に捕捉する ことが出来た。
- がん細胞存在下の発光強度は、目視で容易に確認できるほどの強度を得ることが出来 た。

#### 製品の確立と評価

- シミュレーションと実験によるフィルター形状の最適化により、正常細胞と比較して 20 倍以上のがん細胞を捕捉可能になった。
- ・人血を用いた実験で、実際のがん患者を想定した 1 億:1 の細胞数割合の中から、90% の血中がん細胞を捕捉可能なことを実証した。

#### 顧客満足評価

• がん患者から提供頂いた血液で、本マイクロフィルターと CellSearch®システム分析 した結果、本マイクロフィルターの方が 5 倍以上のがん細胞を捕捉しており既存のシ ステムより精度の高い検出が可能であることが示唆された。

#### 3-2 研究開発後の課題・事業化展開

今後は、さらに患者の年齢、性別、がん種別、ステージなど様々なケースの患者の治験を行い、がん細胞が捕捉可能なことを実証する。

本研究成果を利用した検査装置を用いれば、溶液の発光を測定することでがん診断が可能であると想定しており、非常に小型で安価な検査機器が実現できる。診療所の規模でも導入・設置が可能で、健康診断でも診断が可能となり、手軽にがん検診が可能になる。健康診断でも診断が可能となり、がん検診率の向上とがんの早期発見につながる。

また、繰り返し測定しても非侵襲的(採血)であることから、当初想定していた診断だけでなく、化学療法などによる治療効果の判定や、術後のフォローアップなど患者に合わせた個別化治療が可能となる。

医療器機製販企業の川下企業と国内の医療機器承認に向け、装置開発を進める計画である。