

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20933

研究課題名(和文)CTC分離検出用マイクロ流体ウェルプレート

研究課題名(英文)Development of a microfluidic well plate for CTC detection

研究代表者

金田 祥平 (Kaneda, Shohei)

東京大学・生産技術研究所・助教

研究者番号：10542467

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、血中を循環する腫瘍細胞(Circulating Tumor Cell)を高感度に血中から分離し、分離した細胞に対して、複数種類の解析を実施可能なマイクロ流体ウェルプレートを開発した。マイクロ流体ウェルプレートは、マイクロ流路ネットワークで接続された96個のCTC分離用ウェルがアレイ化されており、分離ウェルごとに異なる解析が可能である。デバイスの評価試験では、健常者の血液に懸濁したCTCのモデルである前立腺癌細胞(PC3細胞)を分離可能であることを、また分離した細胞に対して、蛍光試薬を用いた生存率アッセイと蛍光免疫染色による解析が可能であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In this project, a microfluidic well plate to separate circulating tumor cell (CTC) from peripheral blood were developed. The microfluidic well plate has 96 wells for CTC separation and each well connected to a single outlet via a microfluidic network. Different kinds of cell analysis against separated CTCs can be independently performed depending on each well. In evaluation tests, separation of PC-3 cells (prostate cancer cell line) spiked into peripheral blood obtained from healthy donor, and following viability assay using fluorescent stain (Calcein AM and Propidium Iodide) and immunofluorescence (FITC labeled anti-EpCAM antibody) had been successfully performed on the plate.

研究分野：応用マイクロ流体システム

キーワード：バイオ関連機器 がん マイクロ・ナノデバイス マイクロ流体デバイス

1. 研究開始当初の背景

本邦においてがんによる死亡者数は 2010 年の時点で 35 万人を超え、がんは 1981 年以降、最多の死因疾患であり、男性の 4 人に 1 人、女性の 6 人に 1 人ががんで死亡している[1]. がんでの死亡にはその 9 割以上に転移が関与しており、血中を循環する腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell) は血行性転移の主因と考えられている[2]. 血中の CTC を分離検出することで転移の有無を判別できる他、患者によっては CTC 数(個/mL)とがん原発巣の大きさ(cm^3)に相関があることから[3], 血中 CTC 濃度の増減ががん治療の奏功を予測する、すなわち CTC をバイオマーカーとして利用しようとする試みがなされている. このように CTC はがん診断・治療の両面において有用な情報をもたらすが、血球成分と比較して CTC は血中に非常に稀にしか存在しないため(数個~数百個/mL), その検出が非常に困難である. 一方で、従来の 7.5mL の血液を処理する CTC 検査装置(CellSearch System, Veridex 社製, 米国食品医薬品局が認可)は感度が不足している(検出率約 80%), 検出に時間がかかる(~半日), および装置が高価であるなど問題が指摘されていた. 上記の克服に、マイクロ流体技術を用いる試みが注目を集めており、CTC の細胞表面に特異抗原と結合する抗体をマイクロ流路内に修飾し、アフィニティにより CTC を分離するデバイス[4]や CTC の細胞サイズが血球細胞より大きいことを利用し CTC を分離するマイクロフィルタ[5] などが報告されていたが、実用には至っていなかった.

2. 研究の目的

本研究では、血中に稀に存在する CTC を、従来の検出装置と比較し、高感度に血中から分離し、複数種類の細胞解析を分離した CTC に対して個別に実施するためのマイクロ流体ウェルプレートを開発することを目的とする. 具体的には、7.5 mL 以上の血液を貯めることが可能な血液リザーバーを有し、96 個の CTC 分離用ウェルがマイクロ流路ネットワークで接続されたウェルプレートを設計・製作する. 分離用ウェルは、血球細胞と CTC を分離するためのマイクロフィルタ構造を持つ. また、分離用ウェルごとに個別の CTC 解析操作が実施可能な形式とすることで、従来の装置では困難であった、分離後の CTC に対して、蛍光免疫染色や生存率アッセイなど、複数種類の解析をウェルごとに並列的に実施可能とすることを目指す.

3. 研究の方法

初年度に、分離用ウェル内のマイクロフィルタ、マイクロ流路ネットワーク、血液リザーバー等のマイクロ流体ウェルプレートの構成要素の設計・製作を行った. 残りの期間でプレートの細胞分離ならびに CTC 解析における評価を行なった. 開発サ

イクルとしては、CTC の検出率が従来装置を上回るようにマイクロフィルタ寸法や血液処理条件の最適化を行った. プレート上での分離能評価試験にはセルライン化されたがん細胞を健常者の血液(所属研究機関の倫理審査の承認取得済)に懸濁したモデル系を用いた. プレート完成後、細胞解析操作を並列的に実施可能かどうか、プレート上での細胞培養が可能かどうかの実証試験を実施した.

4. 研究成果

4.1. CTC 分離検出用マイクロ流体ウェルプレート

分離用ウェル、マイクロ流路ネットワーク、血液リザーバーを持つ、マイクロ流体ウェルプレートの設計を行い、研究室内で製作したウェルプレートと、精密ゴム部品製造会社の受託サービスを利用し、製作したウェルプレート(図 1 上)のふたつを開発した. 血液リザーバーは、最大約 42 mL の血液を貯めることが可能であり、プレート内には 96 個の CTC 分離用ウェルが区画化ならびにアレイ化されている. 各分離用ウェルはマイクロ流路ネットワークを介して、ひとつの出口に接続している(図 1 下).

プレートの出口にテフロンチューブを介

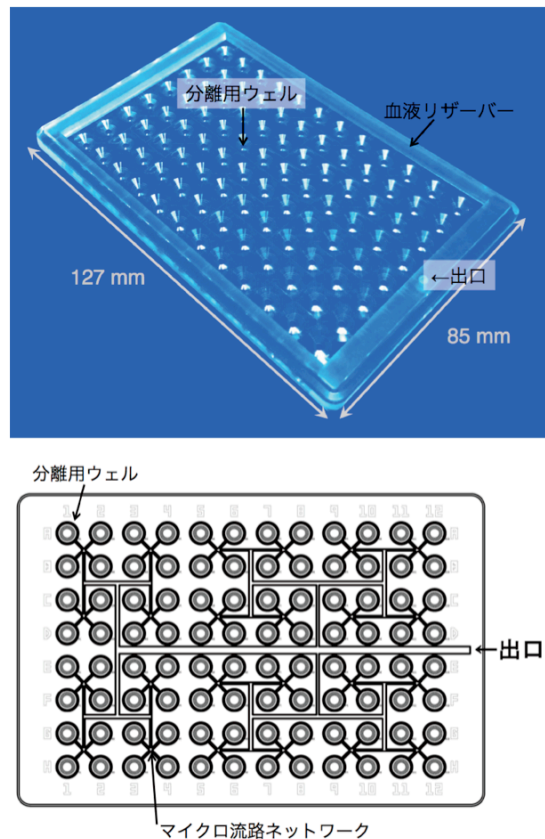


図 1. (上) CTC 分離検出用マイクロ流体ウェルプレート. ウェルプレートはシリコンゴム製. (下) 分離用ウェル(96 個)・マイクロ流路ネットワーク・出口のデザイン. 出口から各ウェルまでの流路抵抗が同等となるよう、流路ネットワークは設計されている.

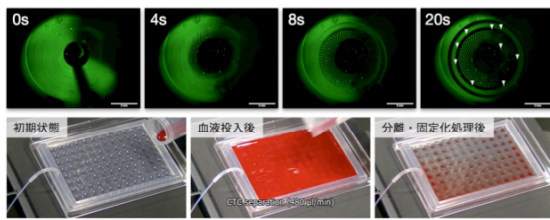


図 2. (上) ウェル内での PC-3 細胞の分離処理. 図中の矢印が分離フィルタにて捕捉された PC-3 細胞. スケールバーは 2 mm. (下) 分離から固定化処理までの様子. 50 分以内に処理を完了可能.

して 50 mL シリンジを接続し, シリンジポンプを用いて血液を吸引することで, 分離用ウェル内の血液サンプルから CTC を分離する. ウェル内には, 高さ 7.5 μm , 幅 25 μm の寸法のマイクロフィルタがあり, 細胞サイズの違いで, CTC を血球細胞群から分離することができる (CTC は血球細胞群よりサイズが大きい). また, マイクロフィルタ表面を CTC の表面マーカーである EpCAM に対する抗体で修飾することで, 細胞サイズとイムのアフィニティの両方を利用し, 検出率約 90% で, 血中から CTC のモデル細胞である PC-3 細胞 (前立腺がんセルライン) を分離することが可能であった (図 2 上). 米国食品医薬品局に認可された CTC 検査では, 7.5 mL の血液サンプルが用いられるが, 本研究で開発したプレートでも同等量の血液サンプルを処理可能であり, 8 mL の血液サンプルの細胞分離から細胞固定までの処理を 50 分以内に完了できることを確認している (図 2 下). また, 所属部局の日仏共同研究拠点 SMMiL-E の支援とフランス・リールにあるがん専門病院のオスカー・ランプレセンターの協力を得て, 乳がん患者 (エストロゲン受容体・プロゲステロン受容体・HER2 陰性) の血液を用いた評価試験を現地で実施した (センター内倫理審査委員会の承認のもと).

4.2. マイクロ流体ウェルプレートを用いた複数種類の解析の並列的な実施

蛍光染色試薬を用いた生存率アッセイと, 蛍光標識抗体を用いた免疫染色を並列的に実施した結果を図 3 に示す. これにより, 従

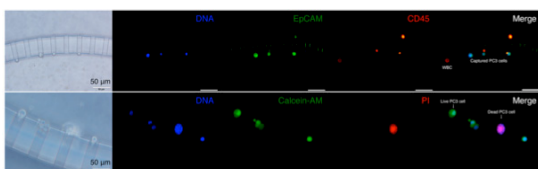


図 2. (上) 蛍光免疫染色による EpCAM 発現解析. 有核・EpCAM 陽性・CD45 陰性が分離された PC-3 細胞. 有核・EpCAM 陰性・CD45 陽性が白血球. (下) Calcein AM と Propidium Iodide による分離細胞の生存率アッセイ. スケールバーは 50 μm .

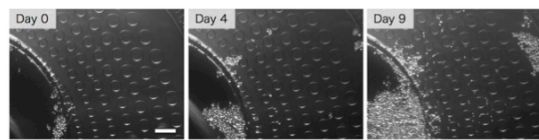


図 4. マイクロ流体ウェルプレート上での PC-3 細胞の培養の様子. スケールバーは 200

来装置では難しかった複数種類の CTC 解析を, 分離用ウェルごとに並列的に実施可能であることが示された.

4.3. マイクロ流体ウェルプレート上でのがん細胞培養

CTC はその希少性ゆえ, 培養することで増殖させることができれば, その後の解析が容易となり, その生物学的特性の把握に大いに役立つことが予想される. 以上の背景から, 開発したウェルプレート上で PC-3 細胞の培養ならびに増殖が可能かを評価した. ウェルプレート上では, 出口から培養液を吸引することで, 灌流培養が可能である. 9 日間の培養の結果, ウェルプレート上での PC-3 細胞の増殖が確認できた (図 3).

参考文献

- [1] 公財)がん研究振興財団, がんの統計 '15.
- [2] N. Reymond *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* 2013.
- [3] S. Nagrath *et al.*, *Nature* 2007.
- [4] S. Stott *et al.*, *PNAS* 2010.
- [5] S. Zheng *et al.*, *Biomed. Microdevices* 2011.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Kaneda, S. "Microfluidic and Cell Manipulation", Workshop on BioMEMS and Cancer -Structuration with CPER Cancer -, 2015 年 12 月 17 日, Institute of Biology of Lille, リール (フランス). [口頭発表]
- ② Kaneda, S. "SMMiL-E WP2: Cellular evaluation and diagnosis", Workshop on BioMEMS and Cancer -Structuration with CPER Cancer -, 2015 年 12 月 17 日, Institute of Biology of Lille, リール (フランス). [ポスター発表]
- ③ 金田祥平, "細胞培養・分離・解析用マイクロ流体技術," 次世代マイクロ化学チップコンソーシアム第 37 回研究会, 2016 年 11 月 21 日, 東京大学浅野キャンパス (東京都文京区). [口頭発表]

[図書] (計 1 件)

- ① Kawada, J., Kaneda, S., Kim, SH., Fujii, T.: "Microfluidic Approach to Cell Handling and Measurement," Sone, J.eds, Intelligent Nanosystems for Innovations in Energy, Environment, and Biotechnologies, Springer-Verlag, pp 85-106, (2016).

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

- ① http://www.microfluidics.iis.u-tokyo.ac.jp/index_j.html
- ② <http://limmshp.iis.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 祥平 (KANEDA, Shohei)
東京大学・生産技術研究所・助教
研究者番号：10542467

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

藤井 輝夫 (FUJII, Teruo)
ドミニク・コラル (Dominique,
COLLARD)
シヨン・ラガデック (Chann, LAGADEC)
サミュエル・メイニャン (Samuel,
MEIGNAN)