

令和元年6月27日現在

機関番号：77103

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H01747

研究課題名(和文) ソフトコンピューティングと誘電泳動現象を利用した血中微量循環腫瘍細胞の早期同定

研究課題名(英文) Early-stage Identification of CTC (Circulating Tumor Cells) by Employing Softcomputing and Dielectrophoretic Phenomenon

研究代表者

山川 烈 (Yamakawa, Takeshi)

一般財団法人ファジィシステム研究所・研究部・所長

研究者番号：00005547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,300,000円

研究成果の概要(和文)：血液やリンパ液の流れに乗って体内を循環する循環腫瘍細胞(CTC：Circulating Tumor Cell)を検出するために、(1)誘電泳動現象を利用した物理的アプローチ、(2)抗原抗体反応を利用した生化学的アプローチ、(3)腫瘍細胞のもつ固有の誘電定数を利用した電気工学的アプローチを試みた。(1)については、現時点では性能は十分とは言えないが、4種類の細胞の約半数を同定できた。(2)については、従来品CellSearchよりもはるかに高い性能を示し、それは臨床実験でも示された。(3)についてはリング共振器型電極に能動回路を採用することにより、優れた性能を実験でも確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の死亡原因の第1位は悪性新生物(癌)によるもので、近年では総死亡の約3割を占めている。「原発巣」(例えば原発性肺癌)から遊離した腫瘍細胞は、血液やリンパ液の流れに乗って体内を循環し、離れた臓器に到着し、「転移巣」(例えば転移性肝臓癌)を形成する。この転移する細胞を循環腫瘍細胞(CTC：Circulating Tumor Cell)という。従来、臨床現場でCTCを検出するのに使われていた米国Veridex社製のCellSearchは、2015年3月末をもって国内でのメンテナンスのサービスが終了した。この窮状を打開するために、本研究成果のもつ学術的意義は大きいといえよう。

研究成果の概要(英文)： This research aims at detecting CTCs (Circulating Tumor Cells) which circulate in the body with the flow of blood or lymph. The attempt was made by the following three approaches; (1) Physical approach employing dielectrophoresis, (2) Biochemical approach employing an antigen-antibody reaction, (3) Electrical approach employing dielectric parameters specific to a tumor cell.

The research results are; (1) Although the performance of the system is not yet enough at the current moment, around a half number of cells examined were successfully classified to HL60, BALL-1, PC9 and normal cells. (2) The podoplanin-chip employing an antigen-antibody reaction exhibits much higher performance of trapping a specific tumor cell rather than the conventional commercial product CellSearch and it was evaluated clinically. (3) The ring resonator type of electrode with an active circuit (negative impedance) exhibits a high performance of detecting tumor cells.

研究分野：ソフトコンピューティング

キーワード：循環腫瘍細胞(CTC) 誘電泳動 ソフトコンピューティング 自己組織化ファジィシステム MEMS

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

我が国の死亡原因の第1位は悪性新生物（癌）によるものであり、近年では総死亡の約3割を占めている（厚生労働省「人口動態統計」2013）。その中でも肺癌は早期発見が困難であることから、近年、癌による死亡原因のトップとなり、いまだ増加する傾向にある。肺癌や悪性胸膜中皮腫の予後は、最新の外科手術・放射線療法・化学療法の三大治療法を施した場合でさえも、癌の転移や再発を防ぐことができないケースが後を絶たない。

「原発巣」（例えば原発性肺癌）から遊離した腫瘍細胞は、血液やリンパ液の流れに乗って循環し、離れた臓器に到着し、「転移巣」（例えば転移性肝臓癌）を形成する。この転移する細胞を循環腫瘍細胞（CTC：Circulating Tumor Cell）という。

現在、血液中のCTCを検出する装置として臨床現場で使用されているのは、米国のVeridex社が開発したCellSearch®である。これは、米国食品医薬品局（FDA）から、乳癌、大腸癌、前立腺癌に対する臨床使用を承認されている世界で唯一の装置である。しかし、CellSearch®でCTC検出を行った場合、CT/PET等で遠隔転移が認められた症例でもCTC陽性率は70%程度（Clinical Cancer Research 2009等）であり、特に中皮腫においてはCTC検出感度が30%程度と極めて低く（Ann Surg Oncol 2014等）、微小転移（検出不能なほど少数の癌細胞の転移）の指標として臨床応用するには検出感度が不十分である。さらに重大なことは、2015年3月末をもって国内でのCellSearch®測定キットの提供およびCellSearch®装置メンテナンスのサービスが停止し、メーカーによる装置の無償回収が行われた。今や、臨床現場は不気味な危機感に包まれており、新たなCTC検出装置の開発が切望されている。

2. 研究の目的

血液中に存在する循環腫瘍細胞（CTCs）を同定するための手法について多角的な検討を行う。具体的には、①HL60（前骨髄球性白血病細胞：顆粒球系の白血病細胞）、②BALL-1（Bリンパ球性白血病細胞：単核球中のBリンパ球系の白血病細胞）、③PC9（肺癌細胞）、④正常な単核球、⑤正常な顆粒球、の各細胞を同定するために、

- (1) 誘電泳動現象を利用する方法、
- (2) 細胞を捕捉するための様々な抗体を利用する方法、
- (3) 各細胞に固有の誘電定数に基づく共振現象を利用する方法、

について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 循環腫瘍細胞1個を同定するために、その誘電特性を利用する。具体的には、河口の形状に2次的に電極間隔が広がった図1(a)の「クリークギャップ電極」からなる誘電泳動デバイス（誘電泳動空間：厚さ100マイクロン、直径6mm）を構成する。そのデバイスに誘電泳動のために調整した誘電泳動溶液（ショ糖7.5g、マンニトール1gをpH6.4のリン酸緩衝液の100倍希釈液100mlに溶かしたもので、電気伝導度は15~20mS/m）とターゲット細胞を注入し、図1(b)および(c)に示すような角度可変の斜面に固定し、周波数 f (Hz)、電圧値 $5V_{rms}$ の交流電圧を誘電泳動デバイスに印加すると、細胞の誘電特性に応じて、生じる誘電泳動力 F_{DEP} （フェムトニュートン・オーダー）と斜面重力 $F_g \sin \theta$ とがデバイスの幾何学的基準点で釣り合うように、斜面の角度 θ （°）を調整する。力のバランスの取れたところでターゲットの細胞が静止するので、その時の角度 θ （°）と周波数 f (Hz)を測定する。また、細胞の密度（比重）も細胞同定の重要な物理パラメータである。誘電泳動デバイスを垂直に立て、その内部で細胞が

自由落下する時のターミナル速度と顕微鏡で計測した細胞の寸法からその細胞 1 個の比重が求まる．ここでは，細胞の密度を計算によって求める代わりに，ターミナル速度を細胞の直径の二乗で除したセル・ファクターCF ($1/\mu\text{m}\cdot\text{sec}$) で，密度に関する情報を表現する．かくして，角度 θ ($^\circ$)，周波数 f (Hz)，セル・ファクターCF ($1/\mu\text{m}\cdot\text{sec}$) の 3 つのパラメータからなる入力ベクトルと細胞の種類を出力ベクトルとして，図 2 に示す自己組織化ファジィシステムを学習させ，同定機能を確立する．

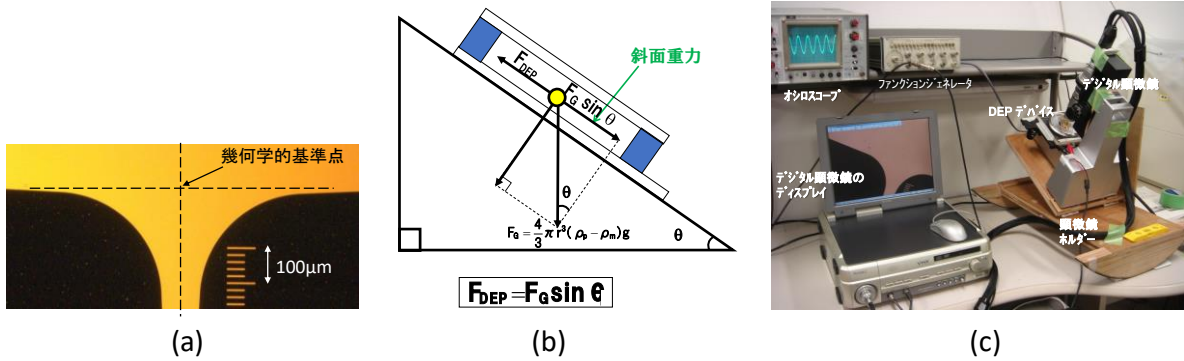


図 1 (a) クリークギャップ電極形状．(b) 斜面重力から細胞 1 個に働く誘電泳動力が求まる．(c) 斜面重力を作り出す自作の顕微鏡ホルダーと実験環境．

(2) 現在，血液中に存在する循環腫瘍細胞 (CTCs) の分離検出に標準的に用いられる機器は，CellSearch®である．CellSearch®は典型的な上皮性癌細胞の表面抗原を標的に分離するため，悪性化に伴い性質の変化した細胞や非上皮性腫瘍細胞は原理的に検出できなかった．これを克服するために樹脂製マイクロ流路装置“CTC-chip”と，細胞を捕捉するための様々な抗体を組み合わせ，癌細胞株を用いた細胞捕捉性能の検討を行う．

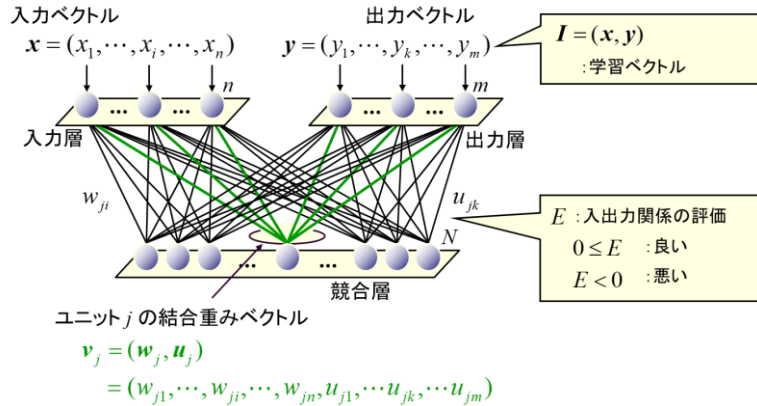


図 2 自己組織化ファジィシステム

(3) CTC 検出の初期検討として，各細胞に固有の誘電定数に着目し，平行電極にリング共振器を並列に装荷したリング共振器型電極を用いて，細胞固有の誘電定数を共振周波数として測定する．理論的検討においては，平行電極間に B リンパ球，T リンパ球を挿入し共振周波数を計算する．

4. 研究成果

(1) ①HL60 (前骨髄球性白血病細胞：顆粒球系の白血病細胞)，②BALL-1 (B リンパ球性白血病細胞：単核球中の B リンパ球系の白血病細胞)，③PC9 (肺癌細胞)，④正常な単核球，⑤正常な顆粒球，の 5 種類の細胞について，角度 θ ($^\circ$)，周波数 f (Hz)，セル・ファクターCF ($1/\mu\text{m}\cdot\text{sec}$) の 3 つのパラメータを計測し，これを図 2 の自己組織化ファジィシステムの 3 次元入力ベクトルとした．また，その出力ベクトルは，HL60, BALL-1, PC9, 正常細胞 (単核球，顆粒球) からなる 4 次元ベクトル (各要素は，該当する細胞の場合 1，該当しない場合 0) と

し、学習を行った。学習により同定機能が構築された後、新しい未知の細胞に関する3次元の入力ベクトルを入れると、ファジィ推論により、HL60, BALL-1, PC9, 正常細胞のそれぞれの可能性を0~1の値で出力する。実験の結果、このシステムは、HL60, BALL-1, PC9, 正常細胞(単核球, 顆粒球)に対する正答率は、それぞれ52%, 44%, 30%, 58%であった。

(2) 現在CTCの分離同定に標準的に用いられているCellSearch®は典型的な上皮性癌細胞の表面抗原を標的として分離するので、悪性化に伴い性質の変化した細胞や非上皮性腫瘍細胞は、原理的に検出できなかった。これを克服するために、樹脂製マイクロ流路装置“CTC-chip”と、細胞を捕捉するための様々な抗体を組み合わせ、癌細胞株を用いた細胞

podoplanin-chip vs CellSearch

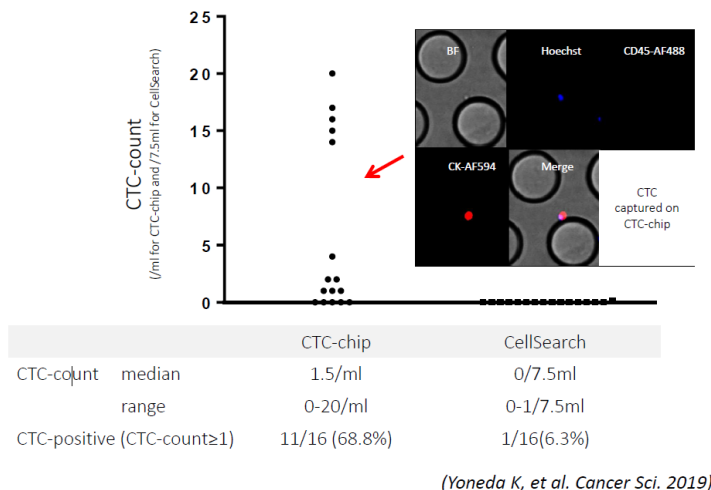
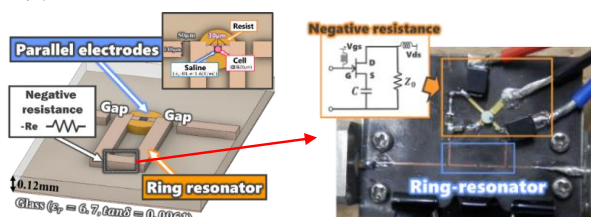


図3 podoplanin-chipとCellSearch®の性能比較。

捕捉性能の検討を行った。その中で、非上皮性の中皮腫細胞株を用いた検討において、CellSearch®ではほとんど捕捉されないのに対し、抗 podoplanin 抗体を結合した chip (podoplanin-chip) により優れた捕捉性能が得られた。そこで実際の中皮腫患者のCTC検出個数を両者で比較したところ、同様に podoplanin-chip により圧倒的多数のCTCが検出された(図3参照)。更に中皮腫患者で検出されたCTCは進行例が多く、CTCを指標にして手術可否を区別するのに有用であった。また、CTCが血液1mL中2個以上検出された例では、1個以下と比較し有意に予後が悪いことも示された(Yoneda K, et al. Cancer sci 2019)。

(3) 平行電極にBリンパ球, Tリンパ球を挿入して共振周波数を計算した結果、共振周波数に差異が生じ細胞同定が可能なことを数値的に確認したが、細胞や血液による損失が大きいため共振時の分解能(共振回路のQ値)が乏しいことが課題となった。そこでこの課題を解決するため、負性抵抗素子に着目し、図4のようにソース端子に並列に受動素子を接続したFETを用いたリング共振器型電極のQ値改善に関して検討し、その負性抵抗素子の効果を計算で評価した。さらに初期実験として、本電極を設計試作し、負性抵抗を実装して、細胞の代わりにチタン酸バリウム粒子を用いた。その周波数特性をFETに印加するバイアス電圧を変化することにより評価した。図5に示す実験結果から、負性抵抗を実装した場合には、実装していない場合に比べて、本電極のQ値が24倍にも向上し、かつ計測分解能が向上し、リング共振器型電極の損失も抑制できることを確認した。



リング共振器型電極の概要

試作負性抵抗回路

図4 負性抵抗回路実装リング共振器型電極

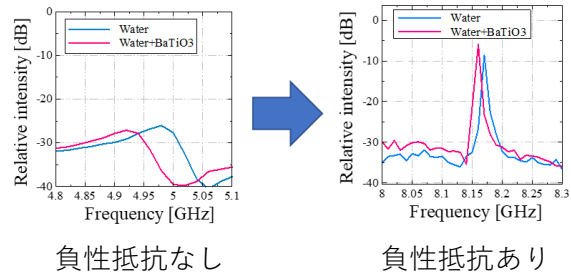


図5 リング共振器型電極の共振特性実験値

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 16 件)

- ①Yoneda K, Imanishi N, Ichiki Y, Tanaka F, “A liquid biopsy in primary lung cancer,” *Surgical Today*, Vol. 49, 1563–1569, 10.1007/s00595-018-1659-2., 査読有, 2019.
- ②Tomoki Sakogawa, Katsuyoshi Aoki, Futoshi Kuroki, Masanori Eguchi, Takeshi Yamakawa, “Considerations on Monopulse-Based Antenna System for Security Gates,” *IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems 電気学会論文誌C(電子・情報・システム 部門誌)*, Vol. 138, 100–105, <https://doi.org/10.1541/ieejieiss.138.100>, 査読有, 2018.
- ③Kousei Kumahara, Kengo Nakajima, Futoshi Kuroki, Masanori Eguchi, Takeshi Yamakawa, “Measurement on Complex Permittivities of Hydrated Soil, Live and Dead Leaves, Woods, and Stones at Frequency Bands from LF to MF for Landslides Prognostication,” *IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems 電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌)*, Vol. 138, 94–99, <https://doi.org/10.1541/ieejieiss.138.94>, 査読有, 2018.
- ④Chikaishi Y, Yoneda K, Ohnaga T, Tanaka F, “EpCOM-independent capture of circulating tumor cells with a universal CTC-chip,” *ONCOLOGY REPORTS*, Vol. 37.1, 77–82, 10.3892/or.2016.5235, 査読有, 2017.

〔学会発表〕 (計 51 件)

- ①Shouta Sora, Kousei Kumahara, Masanori Eguchi, Futoshi Kuroki, Takeshi Yamakawa, Fumihiro Tanaka, “Numerical and Experimental Investigations on Ring Resonator Type of Electrode for Circulating Tumor Cell Detection,” 2019 Radio and Wireless Week, 2019.
- ②Shouta Sora, Kousei Kumahara, Futoshi Kuroki, Masanori Eguchi, Hiroko Imasato, Takeshi Yamakawa, Kazue Yoneda, Fumihiro Tanaka, “A Consideration on Detection of Circulating Tumor Cells Using Ring Resonator Type of Electrode,” International Symposium on Antennas and Propagation and USNC-URSI Radio Science Meeting (AP-S/URSI2019), 2018.
- ③Masanori Eguchi, Futoshi Kuroki, Hiroko Imasato and Takeshi Yamakawa, “Development of Microwell Array for Dielectric Characterization of Circulating Tumor Cells,” World Automation Congress 2016 Japan Satellite Session, 2016.

〔その他〕

ホームページ等

- ①一般財団法人ファジィシステム研究所 <<http://flsi.cird.or.jp>>, 山川 烈 researchmap <<https://researchmap.jp/T.Yamakawa>>,
- ②産業医科大学 医学部 第2外科 <<http://www.kitakyusyu-gan.jp>>,

米田 和恵 researchmap <<https://researchmap.jp/kae>>

③九州工業大学生命体工学研究科 <<http://www.lsse.kyutech.ac.jp>>,

堀尾 恵一 researchmap <<https://researchmap.jp/read0161062>>,

④呉工業高等専門学校 <<https://www.kure-nct.ac.jp>>,

黒木 太司 researchmap <<https://researchmap.jp/read0168668>>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：田中文啓

ローマ字氏名：Tanaka, Fumihiro

所属研究機関名：産業医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：10283673

研究分担者氏名：堀尾恵一

ローマ字氏名：Horio, Keiichi

所属研究機関名：九州工業大学

部局名：大学院生命体工学研究科

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：70363413

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：黒木太司

ローマ字氏名：Kuroki, Futoshi

所属研究機関名：一般財団法人 ファジィシステム研究所

部局名：研究部

職名：主席研究員

研究者番号 (8 桁)：30195581

研究協力者氏名：米田和恵

ローマ字氏名：Yoneda, Kazue

所属研究機関名：産業医科大学

部局名：医学部

職名：学内講師

研究者番号 (8 桁)：80724806

研究協力者氏名：今里浩子

ローマ字氏名：Imasato, Hiroko

所属研究機関名：一般財団法人 ファジィシステム研究所

部局名：研究部

職名：主任研究員

研究者番号 (8 桁)：70412682

研究協力者氏名：江口正徳

ローマ字氏名：Eguchi, Masanori

所属研究機関名：一般財団法人 ファジィシステム研究所

部局名：研究部

職名：主任研究員

研究者番号 (8 桁)：60613594