

令和 2 年 5 月 7 日現在

機関番号：17401
研究種目：若手研究(A)
研究期間：2016～2019
課題番号：16H06078
研究課題名（和文）血中循環腫瘍細胞をターゲットとするリキッドバイオプシーで拓く高速癌診断システム

研究課題名（英文）Development of cancer diagnostic system by liquid biopsy targeting on circulating tumor cells in blood

研究代表者
中島 雄太（Nakashima, Yuta）

熊本大学・大学院先端科学研究部（工）・准教授

研究者番号：70574341
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、低侵襲かつ簡便で高速に癌診断を行うことを目的とし、フォトリソグラフィ技術と精密電鍍技術を駆使して血中循環腫瘍細胞（CTC）を捕捉することが可能なマイクロフィルタを構築した。本マイクロフィルタは、流体力によって平面形状から立体形状に動的変形するものであり、フィルタの表面には癌細胞と特異的に結合する核酸アプタマーを修飾した。構築したフィルタを用いた実験の結果、ヒトの血液中に混入したわずかな濃度の癌細胞でも捕捉できることを明らかにした。また、FDAで承認されている CellSearch System との比較評価を行った結果、既存のシステムよりも効果的に癌細胞を捕捉できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築したデバイスは、手のひらサイズで誰でも簡単に使用できるものであり、使用する核酸アプタマーも化学合成が可能であるため抗体を使うシステムに比べて大幅にコストを下げることができる。また、数mLの血液を送液するだけの簡単操作かつ短時間で癌を検出することが可能であり、病院で行われる予後診断のみならず、職場や学校で行われる定期健診での癌検診の実現に貢献することができ、社会的意義は大きい。超高齢社会を迎えた日本の医療費高騰という課題に対しても、簡便・高速・低コストでの癌診断の意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：This research objective is to develop a microfilter for specifically capturing the cancer cells in the blood. To achieve this goal, a 3D deformable microfilters were fabricated using photolithography technique and precisely electro forming technique. The surface of this microfilter was modified the nucleic acid aptamer for selectively capture the cancer cell. The cancer cell capturing test was carried out using the fabricated microfilter. The cancer cells were significantly captured compared with the normal cells by the fabricated microfilter. Also, we carried out the cancer cell capturing test using the cancer cell spiked whole blood. As a results, we succeeded in the small amount of cancer cells in the whole blood can be captured by the fabricated microfilter. This result was also good performance compared with CellSearch System that is already commercially available apparatus.

研究分野：知能機械学・機械システム

キーワード：がん診断デバイス リキッドバイオプシー 血中循環腫瘍細胞 バイオマイクロデバイス

1. 研究開始当初の背景

癌は、早期に発見し早期に治療を行えば、完治率が大幅に上昇することが知られている。癌の早期発見・早期治療を行うためには、主として CT や MRI、PET などの画像診断を用いた癌検診を行う必要がある。しかし、医療被曝や長時間検査などが課題である。また、受診するための高額な医療費も必要となり、40～69歳の癌検診の受診率が50%に満たないのが現状である。癌の診断・治療に関しては、国が負担する高額な医療費問題にも直結する大きな課題である。したがって、癌の早期発見を実現する新しい癌診断手法の確立が望まれている。

癌を患った人の血液やリンパ液の中には、原発腫瘍から剥離した循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell: CTC) がわずかに存在することが知られている。血液中に存在する CTC の数が、癌の病態に対して高い相関を示すことが確認されており、癌の予後や治療効果を判断する材料として CTC の検出が有効であると考えられる。しかし、CTC は癌患者の 1 mL の血液中にわずか数個～10 個程度しか存在しないと言われており、血液細胞の中から CTC を検出するのは困難である。CTC を癌診断に用いることができれば、血液を用いた生体組織診断 (リキッドバイオプシー) を実現でき、低侵襲・簡便操作・高速診断が可能な低コストの癌診断技術を確立できる。

これまでに、CTC を用いた診断法として広く知られているのは、米国食品医薬品局 (FDA) が唯一承認する Veridex 社の CellSearch System である。同システムでは、多くの腫瘍細胞の細胞膜上に過剰に発現している上皮細胞接着分子 (EpCAM) に対する抗原・抗体反応を用いて捕捉し、大量に存在する細胞を 1 個 1 個識別して CTC 数をカウントするものである。これにより、再現性良く CTC を検出できるが、前処理から診断までに 4 時間以上の比較的長時間を要する点と、高価な装置や抗体を使用するために診断コストが高価な点が課題であり、普及に至っていない。1 時間以内の高速診断が可能なシステムの構築が喫緊の課題である。

2. 研究の目的

本研究では、CTC をターゲットとしたリキッドバイオプシーを実現することにより、医療現場での癌診断に貢献することを大きな目標とし、低侵襲かつ簡便で高速診断を実現する癌検出デバイスを構築することを目的とする。具体的には、フォトリソグラフィ技術と精密電鍍技術、核酸アプタマーや自己組織化単分子膜 (SAM) の修飾技術を駆使して CTC を効果的に捕捉し非特異的な吸着を抑制することが可能なデバイスを達成する。また、ヒト血液中に標的とする癌細胞を混入し、癌細胞の分離・捕捉と検出ができることを実証する。

3. 研究の方法

リキッドバイオプシーによる癌診断を実現するために、CTC の分離・捕捉デバイスの製作とサンプル溶液からの CTC の検出を対象に研究を推進した。それぞれの具体的な方法については以下に記す。

(1) CTC の分離・捕捉のためのマイクロフィルタの製作

本研究で製作するマイクロフィルタは、サイズ選択的かつアフィニティ選択的に癌細胞を捕捉できるものである。まず、CTC のサイズが正常細胞のサイズよりも大きいことを利用しサイズ選択的に捕捉可能なマイクロフィルタを製作した (図 1)。本マイクロフィルタは、流体力を受けて立体形状に動的に弾性変形するように設計されている。さらに、フィルタの表面に

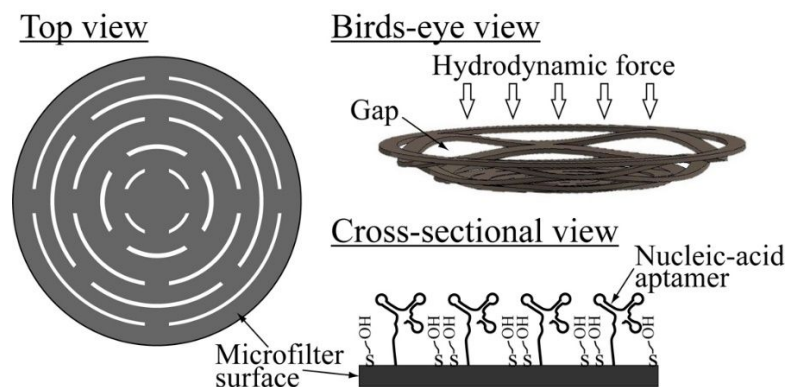


図1 マイクロフィルタの概要

は、癌細胞の表面に過剰に発現している膜タンパク質である EpCAM と特異的に結合する能力を持つ EpCAM アプタマーを修飾することにより、癌細胞とマイクロフィルタとが特異的に結合するアフィニティ選択的捕捉を可能とした。また、同時に SAM をフィルタ表面に修飾することにより、血球細胞などの非特異的な吸着を抑制する効果を付与した。構築したマイクロフィルタを用いた癌細胞の特異的捕捉方法を図 2 に示す。マイクロフィルタに血液を導入すると、全ての細胞がフィルタにトラップされる。これにより、マイクロフィルタに作用する流体力が大きくなり、マイクロフィルタが徐々に変形し、血液細胞がフィルタから放出される。この際、がん細胞はマイクロフィルタの表面に修飾された EpCAM アプタマーによって特異的に捕捉されるため、マイ

クロフィルタ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はフォトリソグラフィを中心としたマイクロ加工技術と精密電鍍技術によって製作した。マイクロフィルタは形状の異なる複数種類を検証し、最も効果的に CTC を捕捉できる形状を選定した。

また、製作したマイクロフィルタを把持し、マイクロフィルタへの送液が可能となるポータブル型のデバイスを製作した。本デバイスは、2つのパーツから構成されており、これらのパーツの間にマイクロフィルタを挿入できる構造である。3DCADにてモデリングしたものを3Dプリンタにて成型することによって製作した。

(2) サンプル溶液からの CTC 捕捉

構築したデバイスを用いることによって、CTC を特異的に捕捉できることを実証するために、以下の3種類のサンプルを用いて評価を行った。

- ・ヒト乳癌細胞 (MDA-MB-453) とヒト胎児腎細胞 (HEK293T) を用いたサンプル。
- ・羊の保存血に様々な濃度で MDA-MB-453 をスパイクしたサンプル
- ・様々な混合比で MDA-MB-453 を健常者の血液サンプルにスパイクしたサンプル。

まず、MDA-MB-453 と HEK293T を用いてマイクロフィルタ構造の検証を行った。複数種類の形状を持つマイクロフィルタをそれぞれ製作し、そのマイクロフィルタに対して、MDA-MB-453 のみと HEK293T のみをそれぞれ導入することによって、癌細胞の特異的捕捉効果と正常細胞の非特異的吸着阻害効果を評価した。この実験の結果から、複数種類のフィルタ形状から最も効果的に癌細胞を捕捉可能なマイクロフィルタを決定した。次に、羊の保存血に対して様々な混合比で MDA-MB-453 をスパイクしたサンプルを用いて癌細胞の捕捉評価を行った。上記実験で決定したマイクロフィルタを用いて、血液に含まれる癌細胞の捕捉効果を評価した。血液中には大量の血球細胞とともにたんぱく質などの多くの夾雑物が存在すると共に、DNA 分解酵素なども混入している。このような状況下でも、目的とする癌細胞を特異的に捕捉できることを評価した。最後に、健常者の血液に対して様々な混合比で MDA-MB-453 をスパイクし、実際のヒトの血液中にわずかに含まれる癌細胞を捕捉できることを評価した。また、構築したデバイスが実用可能であることを評価するために、CTC を検出する装置として FDA に唯一認められている CellSearch System との比較評価を行った。本評価に用いるサンプルは同じサンプルを分注したものであり、全く同じサンプルを用いた。

4. 研究成果

(1) CTC 分離・捕捉のためのマイクロフィルタの評価

製作したマイクロフィルタの一例を図3に示す。複数種類の形状の異なるマイクロフィルタを製作し、それぞれに対してターゲットとなる癌細胞のみと非ターゲットである正常細胞のみをそれぞれ送液した。代表的な例として3種類のフィルタに関して実験の結果を図4に示す。マイクロフィルタの形状によって、癌細胞の特異的捕捉能に差が出ることがわかった。具体的には、IIのフィルタを用いた場合、Iのフィルタよりも多くの癌細胞を捕捉し、約3倍の捕捉量を達成した。また、IIIのフィルタはIのフィルタに比べて20倍程度の癌細胞を捕捉することができた。正常細胞に関しては、I~IIIのどのフィルタを用いた場合でも非特異的な吸着を抑制できることを実証した。これは、フィルタ表面に修飾したSAMが目的通りに正常細胞の吸着を阻害したことが考えられる。これらの結果より、マイクロフィルタ上の核酸アプタマーが癌細胞とのみ特異的に結合することが証明でき、IIIのマイクロフィルタを用いることによって多くのがん細胞を捕捉できることを実証した。各種のフィルタで癌細胞の捕捉量に違いが生じた理由としては、フィルタが流体を受けた場合の変形量の違いが考えられる。これについて有限要素法解析により評価を行った。その結果、Iのマイクロフィルタは、フィルタ全面において変位量に分布が存在し、特にフィルタ外周部が大きな変位を生じることがわかった。このため、外

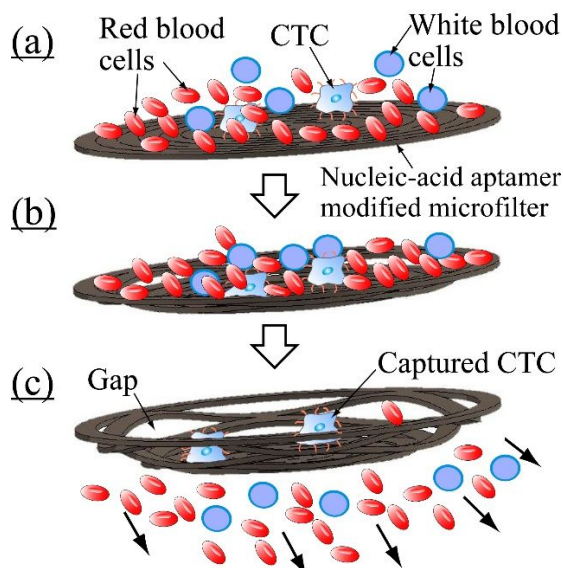


図2 癌細胞特異的捕捉方法

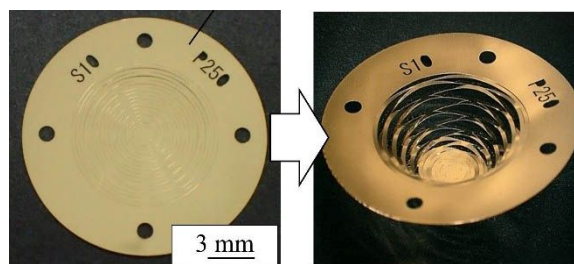


図3 製作したマイクロフィルタ

周部では大きな流量が生じており多くのがん細胞がトラップできなかったことや、トラップされたとしても流量によってはがされたことが考えられる。II のフィルタは I のフィルタに比べて変位量に大きな分布は見受けられなかったが、中心部と外周部の変位量に差が出るのがわかった。これらの原因により、細胞がフィルタに結合せずにフィルタを通過し捕捉量が少なくなったものと考えられる。III のフィルタに関しては、フィルタ全面において分布がほとんど生じることはなく、均一に変形することがわかった。このため、フィルタ全面で均一に癌細胞を捕捉することが可能となり、他のフィルタに比べて多くの癌細胞を捕捉できたものと考えられる。

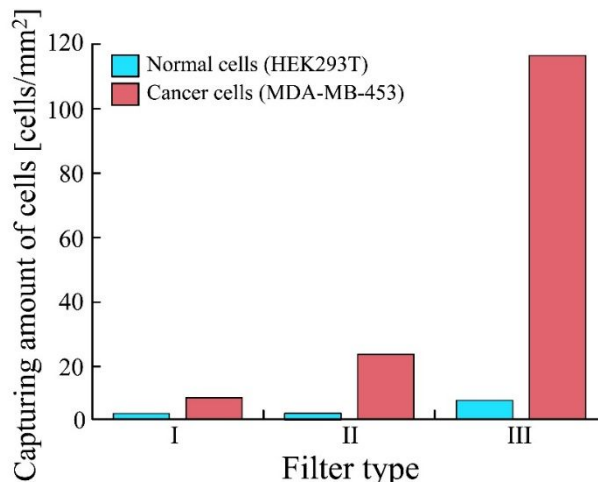


図4 マイクロフィルタの形状と細胞の捕捉量

(2) 血液中からの癌細胞捕捉実験

上記実験において、もっとも多くの癌細胞を捕捉したフィルタ III を用いて血液中からの癌細胞捕捉実験を行った。本実験では、羊の保存血を用い血球細胞と癌細胞の割合が 10,000 : 1、100,000 : 1、1,000,000 : 1 となるように濃度を調整した。10,000 : 1 の場合、単位面積当たり 55 個程度の癌細胞を捕捉し 100,000 : 1 の場合では 10 個程度、1,000,000 : 1 の場合は 5 個程度の癌細胞を捕捉することに成功した。がん細胞の濃度が薄くなるにつれて、フィルタによって捕捉される量が減少するものの、血液中の癌細胞の濃度が低い場合でも癌細胞を捕捉できることを実証した。

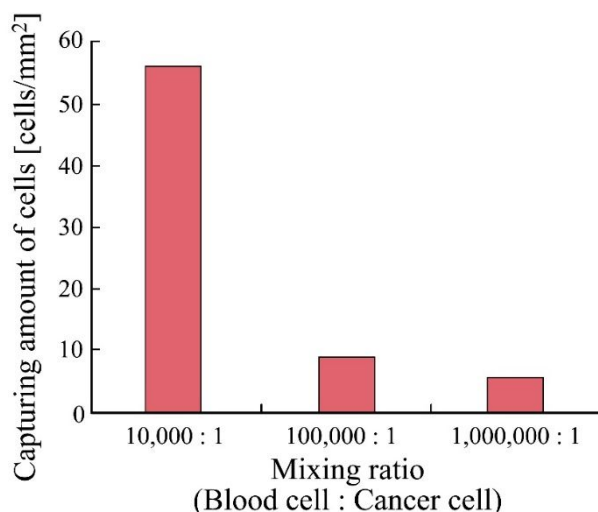


図5 羊の保存血中にスパイクした癌細胞の捕捉

次に、健常者から採取した血液サンプルに対して、癌細胞をスパイクし、血球細胞との比率が 10,000 : 1、100,000 : 1、1,000,000 : 1 となるように濃度を調整した。癌細胞を混合した 1mL の血液サンプルを用いて実験を行った結果、癌細胞の濃度が高い方が捕捉される量が多いが、濃度を低くした場合でも血液に含まれる癌細胞を確実に捕捉できることが示された。実際のヒトの血液中には、DNA 分解酵素やたんぱく質などが多量に含まれており、本フィルタを用いた癌細胞の捕捉に悪影響を及ぼすことが懸念されたが、大きな影響を受けることなく癌細胞の捕捉が可能であることが示唆された。

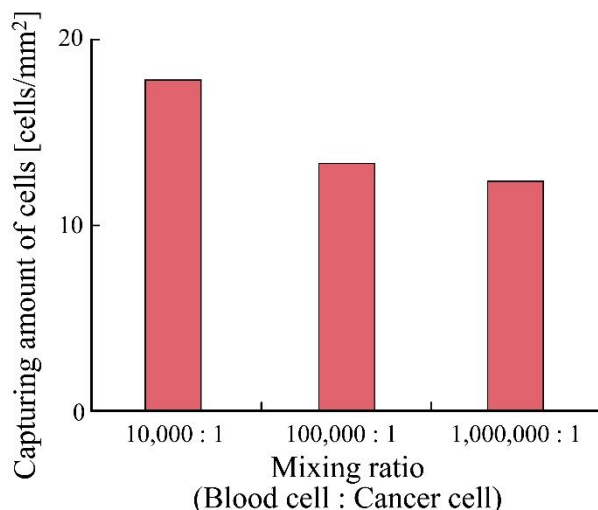


図6 健常者の血液中にスパイクした癌細胞の捕捉

さらに、構築したデバイスが実用可能であることを評価するために、CTC を検出する装置として FDA に唯一認められている CellSearch System との比較評価を行った。具体的には、健常者の血液サンプルに対して、血球細胞と癌細胞の割合が 100,000,000 : 1 個となるように癌細胞をスパイクし、このサンプルを分注して CellSearch System での評価と構築したマイクロフィルタでの評価を行った。その結果、3 回の試行に対して、いずれの場合も CellSearch System よりも本マイクロフィルタを用いた方が多くの癌細胞を捕捉できた。したがって、本マイクロフィルタは実用の面でも有用であることを証明できた。今後は、実際の癌患者の血液サンプルを用いた臨床試験を行う予定である。

具体的には、健常者の血液サンプルに対して、血球細胞と癌細胞の割合が 100,000,000 : 1 個となるように癌細胞をスパイクし、このサンプルを分注して CellSearch System での評価と構築したマイクロフィルタでの評価を行った。その結果、3 回の試行に対して、いずれの場合も CellSearch System よりも本マイクロフィルタを用いた方が多くの癌細胞を捕捉できた。したがって、本マイクロフィルタは実用の面でも有用であることを証明できた。今後は、実際の癌患者の血液サンプルを用いた臨床試験を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kenshiro Nakatake, Yuta Nakashima, Ryo Iwamoto, Ayase Tashima, Yusuke Kitamura, Keiichiro Yasuda, Masaaki Iwatsuki, Hideo Baba, Toshihiro Ihara, Yoshitaka Nakanishi	4. 巻 1
2. 論文標題 Fabrication of Three-dimensional Deformable Microfilter for Capturing Target Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Micro-NanoMechatronics and Human Science	6. 最初と最後の頁 35-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/MHS.2017.8305259	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuta Nakashima, Kenshiro Nakatake, Hiroto Chikaura, Yusuke Kitamura, Keiichiro Yasuda, Masaaki Iwatsuki, Hideo Baba, Toshihiro Ihara, Yoshitaka Nakanishi	4. 巻 -
2. 論文標題 Deformable microfilter for separating target substance in fluid	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Proceedings of International Symposium on Transport Phenomena	6. 最初と最後の頁 No.198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Masaaki Iwatsuki, Yuta Nakashima, Yusuke Kitamura, Keiichiro Yasuda, Hideo Baba
2. 発表標題 Development of a three-dimensional deformable microfilter with a DNA aptamer for capturing cancer cells
3. 学会等名 The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本機械学会2018年度年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中竹 拳志郎、中島 雄太、中村美穂、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
2. 発表標題 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の捕捉
3. 学会等名 日本機械学会2017年度年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuta Nakashima, Kenshiro Nakatake, Keiichiro Yasuda, Yusuke Kitamura, Masaaki Iwatsuki, Hideo Baba, Toshihiro Ihara, Yoshitaka Nakanishi
2. 発表標題 DYNAMIC DEFORMABLE MICROFILTER FOR CAPTURING CIRCULATING TUMOR CELLS
3. 学会等名 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 マイクロ・ナノバイオ医療デバイス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuta Nakashima
2. 発表標題 Capture of Target Cell Using a Nucleic Acid Aptamer-Modified Device
3. 学会等名 The 16th International Conference on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yuta Nakashima
2. 発表標題 Separation/capture of Cancer Cells in Blood Using a Nucleic-acid Aptamer Modified Dynamic Deformable Microfilter
3. 学会等名 23st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福山創一朗
2. 発表標題 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
3. 学会等名 2020年日本生体医工学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaaki Iwatsuki
2. 発表標題 Development of a three-dimensional deformable microfilter with a gold substrate modified with a DNA aptamer for capturing cancer cells
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊本清太郎
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本機械学会2019年度年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田島彩瀬
2. 発表標題 抗EpCAM アプタマー修飾金基板上へのがん細胞の捕捉
3. 学会等名 バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福山創一朗
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本機械学会第30回バイオフロンティア講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福山創一朗
2. 発表標題 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
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第39回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島雄太
2. 発表標題 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
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第38回研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 標的細胞捕捉フィルター及び標的細胞捕捉方法	発明者 中島雄太, 安田敬一 郎, 北村裕介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-098037	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----