

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：16201

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：17KK0135

研究課題名（和文）シングルセル空間画分析に向けたマイクロ流体前処理技術の開発

研究課題名（英文）Development of microfluidic device for spatial dissection of single cells

研究代表者

寺尾 京平（TERAO, KYOHEI）

香川大学・創造工学部・准教授

研究者番号：80467448

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間： 7ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究は1細胞レベルでの細胞解析を実現するためのマイクロ流体デバイスの開発に関するものである。国際共同研究チームとの議論を通じて、具体的なターゲットをがんの転移に関わる血中がん細胞に定め、その1細胞解析、特に血中でのがん細胞の挙動を再現するマイクロ流体デバイスを開発した。研究代表者の有する1細胞操作技術と共同研究チームの有するマイクロ流体デバイス技術を融合することで、新たな血中がん細胞1細胞解析技術の実現に取り組んだ。その結果、マイクロ流体デバイスで微小毛細血管部を再現することに成功し、がん細胞1細胞の動態をリアルタイムにモニタリングするシステムの開発を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、がんの転移の1細胞レベルでの解明を目標に設定し、転移プロセスにおけるがん細胞の血液循環に着目した。がん細胞が毛細血管の狭窄部をどのように通過し、機能を変化させるのか、という点について解析を行った。微小血管狭窄部を生体外に再現するため微細加工技術を用いて、デバイスを作製し、がん細胞の1細胞動態イメージングに取り組んだ。本デバイスを利用することで、今後がん細胞の血液循環における動態、とくに転移能の変化について新たな発見につながるとともに様々な細胞の1細胞動態の計測や、網羅解析の前処理技術への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：This research aims to develop a microfluidic device for single cell analysis. The project have been driven by the international collaboration with the research group in France. We focused on circulating tumor cells that play a significant role in cancer metastasis. We developed a microfluidic device reproducing the in vivo microenvironment to analyse the dynamics of circulating tumor cells at single cell level. The single cell manipulation technique that the principle investigator developed is integrated with the microfluidic techniques developed by the research group. We successfully reproduced blood capillary constrictions in a microfluidic device and analysed the deformation and recovery induced by the movement at the narrow space. The device will bring further insights for the understanding of cancer metastasis at single cell resolution.

研究分野：マイクロ・ナノ工学

キーワード：シングルセル解析 CTC マイクロ流体デバイス

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで、臓器を物理的に切断し、1細胞サイズまで微小分割することで、立体的な臓器を空間的に「分解」する技術の確立を目指し、微細加工技術を利用したデバイス開発に取り組んできた。これまでに実現したシングルセルの一括切断技術をベースに、脳・腎臓等の様々な臓器を細胞レベルまで空間的に分割することで、空間情報を保持した状態で臓器断片を回収することを目標として研究を開始した。回収した空間画分を網羅解析することができれば、従来法では到達できなかった臓器内の3次元的な生体分子の空間分布の解明に繋がり、医学・生物学研究に革新的な解析技術を提供できることが期待される。

研究開発当初に、臓器スライスを物理的に切断し、回収まで行う機構を確立しており、実用化に向けた研究を開始していた。その一方で、具体的な医学分野におけるターゲットを設定し、実際の解析を行うには、回収サンプルへの前処理を行うこと、特に、次世代シーケンサーなどの最先端装置で微小サンプルを解析するための技術が確立していないことが課題であった。したがって、1細胞を解析するための前処理技術の開発について、マイクロ流体デバイスを使った独自技術を有しているチームと国際共同研究で取り組むことを計画した。

## 2. 研究の目的

1細胞解析において、国際共同研究に基づき具体的な医学分野におけるターゲットを定め、マイクロ流体デバイスを用いて解析に必要な新たな技術を生み出すことを目的とした。微小サンプルのRNAをターゲットにした発現解析が様々な分野で注目されており、特にがん研究における強力な手段として期待されていることから、当初は、微量の細胞サンプル(1nl程度)について、その内部に含まれるRNA分子の網羅解析を行うことを計画していた。しかし、国際共同研究チームとの議論を通じて、当初研究計画を修正し、具体的なターゲットを血中がん細胞(CTC)に定め、その1細胞解析、特に血中でのがん細胞の挙動を再現するマイクロ流体デバイスを開発することとなった。がんの転移に関わる血中がん細胞は重要な研究ターゲットであり、診断のための様々な技術が開発される一方で、がん転移における血中がん細胞の挙動に関する基礎的な理解が進んでいないのが現状である。そのため、研究代表者の有する1細胞操作技術と共同研究チームの有するマイクロ流体デバイス技術を融合することで、新たな血中がん細胞1細胞解析技術を実現することを目標に設定した。本技術は、1細胞回収の前処理や細胞特性の把握にも応用が可能であることから、当初目的とした臓器からの1細胞解析の前処理技術の開発にも有用であることも計画修正の理由の一つである。

具体的な研究目的は、血液中での循環が血中がん細胞にどのような影響を与えるかという点、特に転移能への影響を調べるため、マイクロ流体デバイスで微小毛細血管部を再現し、1細胞の動態をリアルタイムにモニタリングする技術の開発を行うこととした。

## 3. 研究の方法

フランス・キュリー研究所 Jean Louis Viovy 博士(CNRS ディレクター)のチームとの国際共同研究に取り組んだ。マイクロ流体デバイスについては、Viovy 博士のチームで独自技術として様々なノウハウを保有していることから、代表者が渡航し、それらの技術と代表者の1細胞解析技術を生かし、血中がん細胞の挙動解析の実現に向けた開発を行った。Viovy 博士のチームでは、以前から血中がん細胞の解析や診断への応用の取り組んでおり、必要な細胞サンプル、および研究所が併設する病院からがん患者の臨床サンプルが容易に手に入ることから、がんをターゲットにした研究を行うのに適した環境である。

研究の実施は、2015年に完成した研究所 Institut Pierre-Gilles de Gennes (IPGG)において行った。本研究所はマイクロ流体デバイスをベースにした異分野融合研究を志向して設立されており、Viovy 博士チームが中心的な存在となっている。ワンフロアをチームで占有しており、居室、試料調製室、最新顕微鏡が設置された評価計測室が隣接した環境にあるため、コンタミや生体サンプルの劣化を抑えられる機能的な配置となっている。さらに、一つ上の階にはコンパクトながら必要十分なクリーンルームを備えており、最新の3Dプリンタやリソグラフィ装置をはじめとする先端的な微細加工装置群が共同で利用できるプラットフォームがある。近隣にはキュリー研究所が運営するがん診断・治療を専門とする病院があり、貴重な臨床サンプルを手に入れることができる。本課題を実行する上で機能的な環境にあった。代表者の渡航期間は2018年8月末から2019年4月初めまでの約7ヶ月間である。渡航前に、Web会議を通じて、研究ターゲットと方法論について議論を進め、研究目的に示した課題を具体化した。渡航後、マイクロ流体デバイスの設計、微細加工条件の検討、流体操作システムの構築、細胞動態解析に取り組んだ。帰国後は、開発したデバイスの改良に取り組み、国際共同研究を継続した。具体的な取り組みを以下に示す。

1) マイクロ流体デバイスの設計: 血中がん細胞の毛細血管部での動態をリアルタイム・その場観察するためのマイクロ流体デバイスの開発を行った。具体的にはPDMS樹脂を利用した一般的な作製法によるマイクロ流体デバイスを設計し、同時にプレス成形にも展開可能なものとした。毛細血管の狭窄部を再現する微小構造に隣接する形で細胞を捕捉する構造を形成し、狭窄部通過後の細胞内の様々なダイナミクスをリアルタイムで1細胞観察可能なデバイスを設計した。

2) 微細加工条件の検討: 共用プラットフォーム装置を利用し、通常のフォトリソグラフィーによってパターン形成を行い、PDMS樹脂に形状を転写した。数種類のデバイスを作製し、そのう

ち狭窄部の最小サイズ 3 $\mu$ m のデバイスについては通常のリソグラフィでは作製が困難であったため、渡航先機関でのレーザーによる3次元パターン形成の検討と、それと並行し代表者所属機関でのSiマイクロマシニングによる作製法を検討した。

3) 流体操作システムの構築：流体操作にはViovy博士の開発した、空圧駆動式の微小流量ポンプを利用し、細胞の血管再現部への導入と捕捉、実験後の細胞排出の一連の作業を繰り返し実施できるように、等価回路を用いた簡易計算と流体シミュレーションを行い、流体操作条件を設定した。

4) 細胞動態解析：渡航先プラットフォームのライブセルイメージング用顕微鏡を用いて、狭窄部通過時の細胞動態と通過後の細胞動態、特に核の変形挙動や内部DNA損傷の可視化計測実験を行った。その際、同IPGG内のチームのPiel博士のチームからの細胞株提供や可視化計測に関する技術提供を受けた。

以上、4つの課題について、渡航期間中に代表者自身が実験を行った。

#### 4. 研究成果

がんによる死亡は多くの場合、転移を伴っており、転移プロセスの解明ががんの予防・診断・治療の観点から強く望まれている。中でも血中を循環するがん細胞については、転移に重要な役割を果たすが、生体内では極めてレアな存在であることから、生体内でのがん転移現象の解析は困難である。通常、転移に関する解析は培養細胞やマウスなどのモデル生物を用いた実験が広く行われている。しかし、生物種、および実際の生体内環境との違いによって解析を困難にしている。そこで本研究では微細加工技術を用いて、生体外に生体内と同様の環境を再現し、細胞機能の計測を行うことでがんの転移プロセスの解明に資する微細構造デバイスの開発に取り組んだ。特に、転移プロセスにおける、がん細胞の毛細血管における血液循環に着目し、毛細血管を通過する際に生じるがん細胞の機能変化について前章に示した方法で解析を行った。

がん細胞は毛細血管の狭窄部より小さく、細胞は変形しながら通過する。この血液循環過程ががんの転移にどのように関わるのかこれまで明らかになっていない。毛細血管狭窄部を通過する前後でがんの転移に関わる遺伝子発現が変化するという研究が報告されており、狭窄部通過とがんの転移の関係性が示唆される。そこで、微細加工技術により毛細血管狭窄部を模倣したマイクロ構造を作製し、そこを通過するがん細胞の形態・機能変化をリアルタイムでその場観察する手法を開発した。

毛細血管を再現するデバイスの作製に成功し、最小狭窄部3 $\mu$ m幅の構造形成を達成した(図1)。さらに実験の結果、狭窄部を通過する細胞だけではなく、通過後の細胞の細胞の回復挙動を初めて観察することに成功した(図2)。それらの観察の結果、細胞および細胞内の核は狭窄部通過時に大きく変形し、細胞については通過後10秒程度、細胞核はそれより早く1秒以内に形状が回復することが明らかとなった。また、核内のDNAは通過後に二本鎖切断箇所が増加しており、DNAへのダメージが確認された。生体内の血液循環時の通過時間が1秒以内であるのに対して細胞の形状回復は十分遅く、変形した状態で循環することで通過スピードを速めていると考えられる。また、核の変形・回復やDNA損傷の発生は遺伝子自体と遺伝子発現への影響を示唆している。本モデルを使用することで、がん細胞1細胞に生じる様々な動態が可視化され、血液循環とがん転移の関係性の解明に近づくことが期待される。

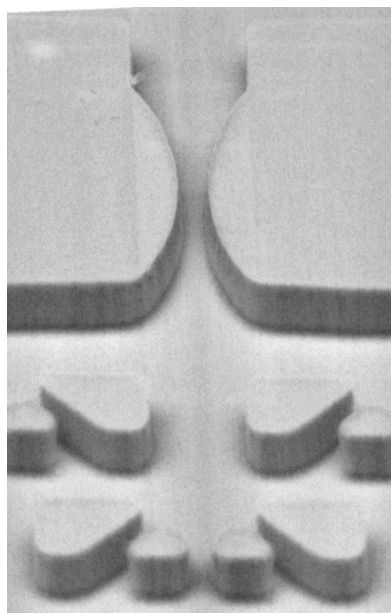


図1. 毛細血管微小狭窄部モデル

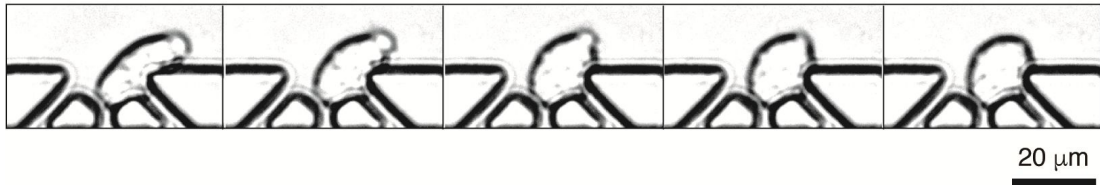


図2．細胞変形回復挙動のイメージング

本研究では、がんの転移の1細胞レベルでの解明を目的として、転移プロセスにおけるがん細胞の血液循環に着目し、がん細胞が毛細血管の狭窄部をどのように通過し、機能を変化させるのか、という点について解析を行った。微小血管狭窄部を生体外に再現するため微細加工技術を用いて、デバイスを作製し、がん細胞の1細胞動態イメージングに取り組んだ。本デバイスを利用することで、今後がん細胞の血液循環における動態、とくに転移能の変化について新たな発見につながるとともに様々な細胞の1細胞動態の計測や、網羅解析の前処理技術への展開が期待される。

本研究について当初計画とは異なるアプローチでのデバイス開発を国際共同研究に基づき行うこととなったが、結果的に新たな技術シーズを生み出し、国際共同研究の体勢を構築できたことから、十分な進展があったと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kyohei Terao, Hamizah Cognart, Jean Louis Viovy, Catherine Villard
2. 発表標題 Cancer cell deformation and recovery within microvascular in vitro constriction model
3. 学会等名 Cancer Cell on Chip (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kyohei Terao, Hamizah Cognart, Jean-Louis Viovy, and Catherine Villard
2. 発表標題 MICROVASCULAR IN VITRO CONSTRICTION MODEL FOR IMAGING CANCER CELL DAMAGE AND RECOVERY
3. 学会等名 MicroTAS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺尾 京平、Cognart Hamizah、Viovy Jean Louis、Villard Catherine
2. 発表標題 in vitro 血管微小狭窄モデルによるがん細胞動態解析
3. 学会等名 第20回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ヴィオヴィ ジャンルイ  (Viovy Jean-Louis)	キュリー研究所・Physico-Chimie Curie Lab・CNRS Director	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ヴィラード キャトリーヌ  (Villard Catheline)	キュリー研究所・Physico-Chimie Curie Lab・CNRS Director	