

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01844

研究課題名(和文) レクチンチップを用いた血中膵がん細胞の高効率分離

研究課題名(英文) Isolating of Pancreatic Circulating Tumor Cells using Lectin Chip

研究代表者

益田 泰輔 (Masuda, Taisuke)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任准教授

研究者番号：30431513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖鎖と特異的に結合するレクチンタンパク質に着目し、細胞表面の糖鎖を認識するレクチンをマイクロピラーに固定化し、血中膵がん細胞を選択的に捕捉するレクチンアフィニティ型オープンチップ細胞分離技術を開発し、その有用性の検証を目的とする。膵がんCTCを想定して、レクチンはBC2LCN、ターゲット細胞はCapan-1(ヒト膵臓がん細胞株)を使用した細胞分離実験を行った結果、非レクチン固定化チップに対してレクチンチップのCapan-1捕捉率が約7倍向上したことが示された。このことから、マイクロピラー表面へのレクチン固定化技術は確立し、レクチンアフィニティ型オープンチップ有用性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓がんは遠隔臓器に転移する傾向があるため、多くの血中循環腫瘍細胞が存在することが知られている。しかし、これまでモノクローナル抗体を用いた分離方法では、補足効率が低く、大きな成果を得られていない。その理由は、膵がんCTCの多くは上皮間葉転換を示し、EpCAM発現が弱く(もしくは陰性)、さらにサイトケラチンも低発現であることが考えられている。本研究では、細胞表面に無数に存在する糖鎖と結合するレクチンタンパク質に着目し、レクチンをマイクロポストに固定化させたチップによる膵がん細胞の分離実験を行った。その結果、細胞サイズと標的糖鎖を用いた細胞分離の有用性が新たに見出された。

研究成果の概要(英文)：To achieve analysis of CTCs at the single-cell level, we have applied the meniscus-induced microfluidic device, rare cell sorter. However, size-based isolation causes missing of smaller cells. In this paper, we proposed an open-channel chip that immobilized a specific lectin to assist size-based cell isolation. Immobilized lectins was used to bind a glycoprotein of pancreatic cancer cell. The micropillar immobilized with specific lectins are isolated into pancreatic cancer cells and other cells. The lectin chip with BC2 lectin provided high isolation rate as around 7 times improved from negative control. We succeeded in individually isolating and recovering pancreatic circulating tumor cells using combined a novel lectin chip and a rare cell sorter. Thus, making hybrid method for cell isolation, we hope that open-channel microfluidic chip expand the application area, such as pre-treatment for single cell analysis.

研究分野：生体医工学

キーワード：BioMEMS 血中循環腫瘍細胞 レクチン

1. 研究開始当初の背景

血液中から特定の細胞を計数および特性解析することで、がんを始めとした様々な病気の早期診断が可能と言われている。とりわけ、がんは、原発巣から血液等を介して腫瘍細胞が全身へと回り、転移巣が形成されることが知られており、がん患者の末梢血流を循環する腫瘍細胞、いわゆる血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell: CTC) を迅速に調べることができれば、転移がんの早期発見や治療効果の検証に役立つとして期待が高まっている。CTC は非常に希少な細胞であり、転移性がん患者の約 60 億個の血液細胞の内わずか数個しか存在しないことが知られている。そのため、末梢血から希少な CTC を正確に検出するための技術開発に、世界的に多大な努力が注がれている。しかし、その希少さゆえ、既存技術では効率よく分取できないこと、また次世代シーケンサーに代表される微量分子の解析プラットフォームとの親和性が低いことから、臨床研究と関連付けは未だ達成できていない。

また、膵臓がんのように遠隔臓器に転移する傾向がある CTC は、高い浸潤能を獲得しており、しばしば上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) やサイズ不均一性を生じる特徴が報告されている。EMT を起こした細胞は EpCAM (上皮細胞接着分子) の発現が陰性もしくは弱陽性であるため、CTC 検出では最も難しいとされる。

2. 研究の目的

本研究では、糖鎖と特異的に結合するレクチンタンパク質に着目し、細胞表面の糖鎖を認識するレクチンをマイクロピラーに固定化し、血中腫瘍細胞を選択的に捕捉するレクチンアフィニティ型オープンチップ細胞分離技術を開発し、その有用性の検証を目的とする。ここでは、悪性度が高く、EMT やサイズ不均一性を示した血中腫瘍細胞を漏れなく捕捉する有効な手段として、細胞表面の糖鎖を対象としたレクチンアフィニティ (レクチンチップ) とサイズ分画を融合した新規分離方法を確立する (図 1)。また、分離したがん細胞の 1 細胞回収を実施し、細胞分取効率・細胞純度などの分取性能を評価する。

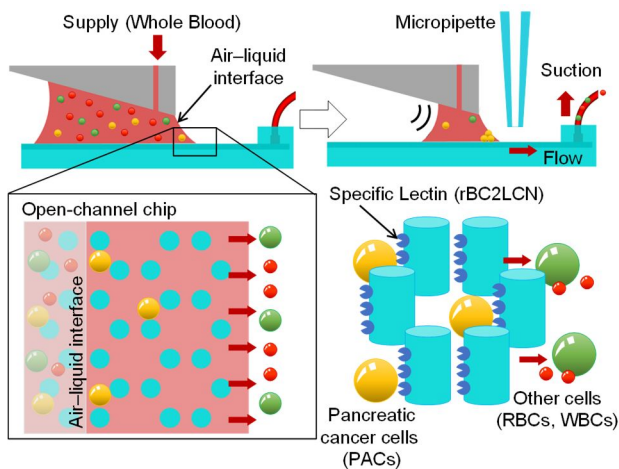


図 1 レクチンアフィニティ型オープンチップ (レクチンチップ) による血中腫瘍細胞の分離および回収のコンセプト

3. 研究の方法

(1) レクチンチップの作製

研究代表者は、細胞集団から不要な細胞を連続的に排除し、特定の細胞を分離する技術 (オープンチップ細胞分離技術) を確立し、当該技術を組み込んだオリジナルセルソーター (レアセルソーター) を開発してきた。オープンチップ細胞分離技術とは、オープン型マイクロ流体チップを用いて、気液界面 (メニスカス) に生じる力と、細胞のサイズ差を利用して分離する。オープン型マイクロ流体チップは、図 2 上段のとおり、無数のマイクロピラー (直径 18 μm) を備え、そのマイクロピラーの間隙 (7 μm) によって特定の細胞をサイズ差および変形度で捕捉する。本研究では、サイズ分離をアシストするために、新たにレクチンアフィニティ型オープンチップ (レクチンチップ) を作製した。マイクロピラー表面をシランカップリングで処理後、ストレプトアビジンを化学修飾し、ビオチン標識レクチンを反応固定化した。

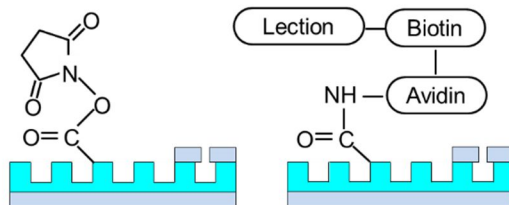
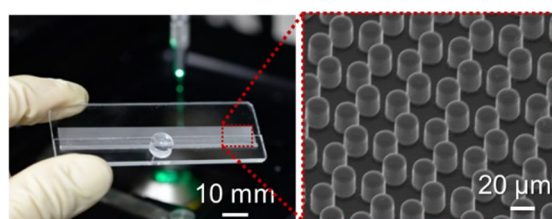


図 2 細胞表面に含まれる糖鎖を特異的に捕捉するレクチンチップのレクチン標識方法

(2) 細胞分離の安定性と 1 細胞分取性能

オープン型マイクロ流体チップにおいて環境の外乱は大きい。外乱によって、メニスカス先端の位置が大きく変動することは、上記の安定した流れの崩壊および、細胞捕捉率に低下を引き起こす。そこで、画像の輝度変化からメニスカスの位置を定義し、その位置情報をシリンジポンプにフィードバックすることによりメニスカス先端の位置制御を行った。また、新たに1細胞分取システムを構築し、その吸引特性、単一細胞分取性能の評価を行った。

4. 研究成果

(1) レクチンチップによる細胞分離実験

膵がん CTC を想定して、レクチンは BC2LCN、ターゲット細胞は Capan-1 (ヒト膵臓がん細胞株) を使用した有用性の評価実験を行った。Capan-1 細胞の分離実験による細胞捕捉率の結果を図3に示す。サンプル濃度および処理量は、それぞれ 1×10^3 cell/mL および 0.5 mL とした。図3の結果より、非レクチン固定化チップに対してレクチンチップの Capan-1 捕捉率が約7倍向上したことが示された。このことから、マイクロピラー表面へのレクチン固定化方法は確立し、さらに、レクチンチップによる標的糖鎖を有する細胞の分離性能の向上が期待できる。一方で、処理速度が増大することにより補足率が減少する影響も示された。これは、ターゲット細胞表面の糖鎖とマイクロピラー表面のレクチンの結合速度に、至適条件が存在することが新たに判明した。

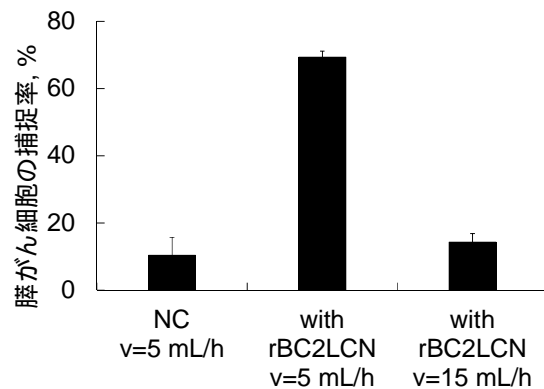
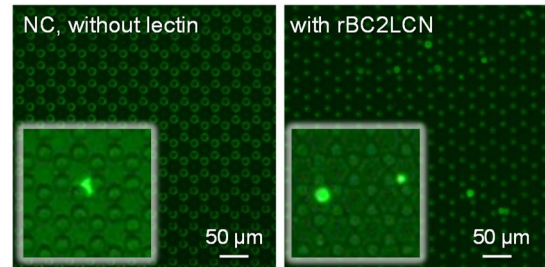


図3 レクチンアフィニティ型オープンチップにより膵がん細胞 (Capan-1) の補足率が向上することを確認した。

(2) 細胞分離の安定性

細胞分離時におけるメニスカス先端の目標値 (破線) と実効値 (実線) を計測し、その誤差量 (変動量) から、細胞分離の安定性を評価した (図4)。その結果、メニスカス先端位置における変動量の標準偏差は、最大 $= 93 \mu\text{m}$ に抑えることができた。対物レンズ 10 倍を用いたときの横幅を $720 \mu\text{m}$ とすると、今回の 3 がその視野内に収まることから、本位置制御による細胞検出時間の削減にも有効であることが示された。

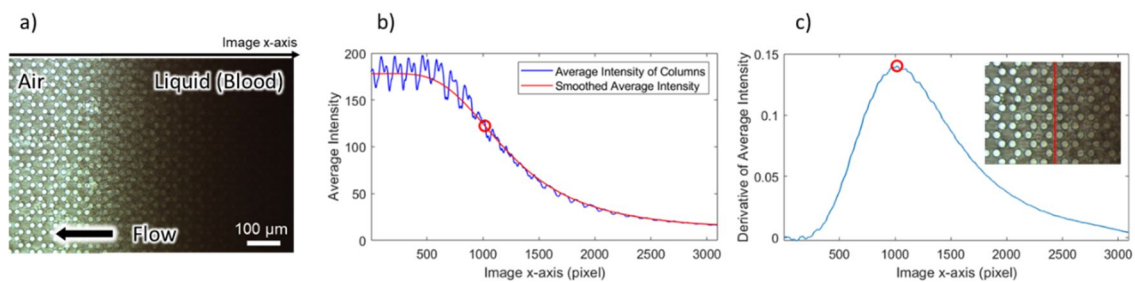


図4 メニスカス先端位置の検出方法。a) 細胞分離時のメニスカス付近の顕微画像、b) 列毎の平均輝度変化、c) 平均輝度の変化率が最大となる箇所を、メニスカス先端と同定。

(3) 1細胞分取性能

ピエゾマイクロポンプを用いた1細胞分取システムの検討を行った。ピエゾマイクロポンプ周波数一定 (1 Hz) で駆動電圧 (5, 10, 40, 60, 80, 100, 120, 150 V) を変化させたときのポンプ吸引量を計測した結果、最小分解能: 21 nL, 吸引可能量: 21 ~ 2.8×10^5 nL (印加最大電圧 150 V) を示した。現行のシリンジポンプ式が、1パルスあたりの吸引量が 850 nL 程度と分解能であることを鑑みると、圧電による応答速度の向上とともに吸引分解能が大幅に向上することが期待できる。一方、1細胞分取性能異なるマイクロピペット先端径 (30, 45, 70, 100 μm) におけるそれぞれの細胞分取成功率を評価した。その結果、ピペット先端系 45 μm において 100% (n=25) の分取成功率を示した。従来のシリンジポンプ式が約 50% の成功率だったことから比較すると、圧電マイクロポンプによる単一細胞分取操作の有効性が十分に示された。また、その時の平均純度は 93.6% (N=23) であった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Bilal Turan, Yusuke Tomori, Taisuke Masuda, Ruixuan Weng, Larina TW Shen, Satoshi Mastusaka, Fumihito Arai	4. 巻 5
2. 論文標題 Detection and Control of Air Liquid Interface With an Open-Channel Microfluidic Chip for Circulating Tumor Cells Isolation From Human Whole Blood	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IEEE Robotics and Automation Letters	6. 最初と最後の頁 5866-5872
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/LRA.2020.3007476	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 B. Turan, T. Masuda, F. Arai
2. 発表標題 Detection and Control of Air Liquid Interface with an Open-Channel Microfluidic Chip for Rare Cell Isolation
3. 学会等名 30th 2019 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Scienc（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 益田泰輔, B. Turan, 登森勇介, 松阪諭, 新井史人
2. 発表標題 全血対応が可能な細胞分取装置による癌モニタリング
3. 学会等名 日本機械学会 第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学新井研究室
<http://www.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp/>
東京大学新井研究室
<http://www.biorobotics.t.u-tokyo.ac.jp/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------