

令和 4 年 6 月 12 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03728

研究課題名(和文) 血中循環腫瘍細胞の新規検出方法の開発と臨床応用

研究課題名(英文) Development and clinical application of novel detection technologies for circulating tumor cells

研究代表者

竹内 裕也 (Takeuchi, Hiroya)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：20265838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,420,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の形態情報に基づいた血中循環腫瘍細胞(CTC)の同定を目的とし、定量位相顕微鏡を用いた2次元像位相イメージングフローサイトメーター(2D-IFCM)を実現し、さらに高分解能な3D-IFCMと2D-IFCMと組み合わせたハイブリッドIFCMの開発を行い、試作機を完成させた。健康人および消化器癌患者さんから同意を得て末梢血液を採取し、2D-IFCMおよびハイブリッド試作機で観察し、末梢血有核細胞中のCTC候補細胞を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存のCTC検出方法のほとんどは表面マーカーを用いた細胞の選別であるのに対し、本手法は光学的技術を用いた細胞形態の詳細な観察と人工知能(AI)を用いた画像認証システムを組み合わせた全く新しいCTC検出法であり極めて独創的である。本手法は細胞表面マーカーを用いないため細胞に与える影響が最小限であり、新たなCTCの生物学的解析を可能とする。CTCの基礎研究の飛躍的な発展が期待されるのみならず、臨床応用によって癌診療に革命を起こす可能性もあり、世界に与えるインパクトは非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：We developed a two-dimensional imaging flow cytometry (2D-IFCM) for the detection of circulating tumor cells (CTCs) based on the subcellular structure of the quantitative phase microscopy images. We further developed a prototype of hybrid IFCM consisting of 2D-IFCM and 3D-IFCM. Using 2D- and hybrid IFCMs, CTC candidate cells were detected within peripheral blood nucleated cells obtained from healthy volunteers and cancer patients.

研究分野：消化器外科学

キーワード：循環腫瘍細胞 定量位相顕微鏡 フローサイトメーター negative selection 人工知能 画像認証

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

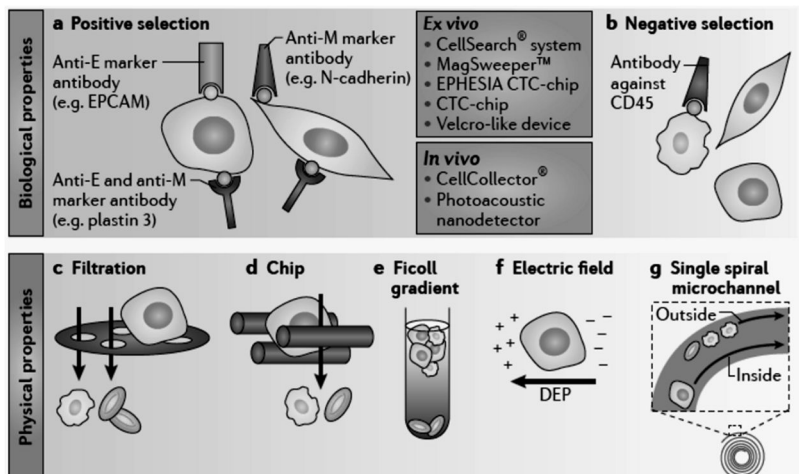
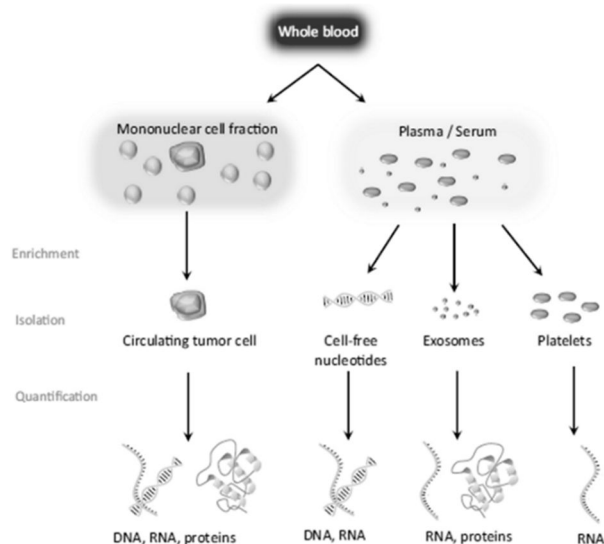
1. 研究開始当初の背景

近年の化学療法や分子標的療法などの発展により、癌に対する治個別化の必要性が増しているが、生検や切除検体の分子生物学的解析に基づいた biomarker の探索研究のうち、治療個別化に直結するものは僅かしかないのが現状である。その理由の一つとして癌の不均一性がある。例えば癌組織の一部の遺伝子発現変化を解析しても、癌の転移や治療抵抗性に関与する細胞集団が少なければその存在を必ずしも同定できない。特に生検による組織診断では、不均一な癌組織の全体像を捉えることが容易ではない。また、原発巣の切除検体を用いて転移巣に対する治療効果予測を行う場合、原発巣と転移巣の生物学的性質が必ずしも同一ではない点が問題となる。多発転移例では転移巣間での不均一性もあり、仮に一部の転移巣の詳細な解析を行ったとしても病変全体の治療効果を十分に予測し得ない。また、転移巣の組織採取は必ずしも容易ではない。

そこで近年、新たな癌診断法として、生検や手術で得られる組織ではなく血液検体を用いた液体生検 (liquid biopsy) の開発が急速に行われている。その有用性は低侵襲な方法で迅速かつ簡便に行えることに加え、原発巣や再発巣の組織採取が簡単に行えない場合や、多発転移など病変が複数存在する場合の全体像の把握にも利用できる点がある。また、繰り返し測定することにより、癌の存在診断や癌の形質変化の観察を経時的に行うことも可能であり、癌治療のモニタリングへの応用が期待される。Liquid biopsy は、末梢血中の有核細胞を用いる方法と血清や血漿中の成分を用いる方法に大別され、前者の代表は循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell: CTC) である。

CTC を用いた liquid biopsy 法は癌細胞そのものの解析であり、癌の確定診断を行いやすいことに加え癌細胞 1 つ 1 つの質的診断が可能となるため、最も有用な手法として期待される。しかし、CTC は末梢血液中の有核細胞 $10^6 \sim 10^8$ 当たり 1 個の割合しか存在せず、その検出は困難であり、これまでに様々な手法が開発されてきた。

最も汎用されてきた Cell Search®をはじめとする多くの手法は、EpCAM など上皮細胞の表面マーカーを用いて CTC を同定している。一方、癌の転移における重要な細胞の形質変化である上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) によって生じたと考えられる間葉系細胞が CTC として存在することが示され、上皮細胞の表面マーカー依存的な従来の検出法では臨床重要な CTC の取りこぼしがあることが懸念されるようになった。そこで EMT を起こした細胞も含め CTC を漏れなく検出する方法として、血液中の有核細胞から白血球のみを除去し CTC の取りこぼしを減らす試み (negative selection) が行われている。しかし negative selection 法の多くは CD45 等の細胞表面マーカーに依存しているため、抗体処理等によって細胞に形態や機能の変化が生じる可能性があり、分子生物学的解析等による CTC の質的診断を行う際に問題となる。このため、細胞表面マーカー非依存的な CTC の negative selection 法が開発が期待されているが、これまで広く臨床応用に至った方法はない。



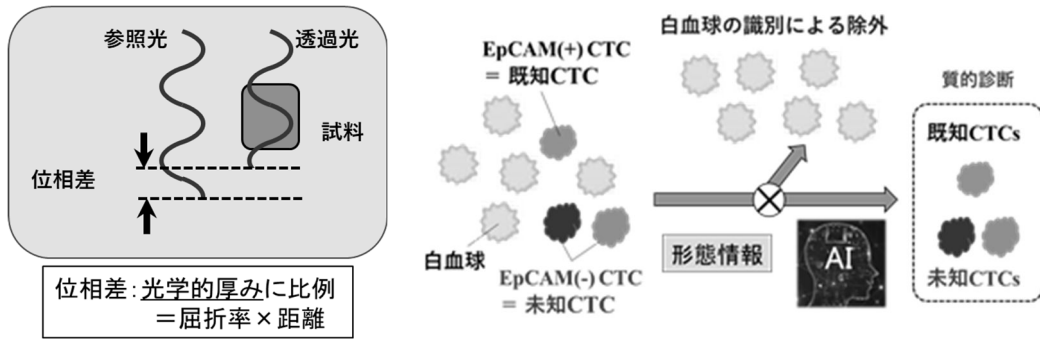
2. 研究の目的

形態学的な情報が既知である血球を定量位相顕微鏡 (quantitative phase microscopy: QPM) で観察し、その形態情報に基づいて識別し血液から除去することによって (negative selection) 残った CTC を生きたまま得ることができる、細胞表面マーカー非依存的な全く新しいコンセプトに基づく CTC 分取方法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

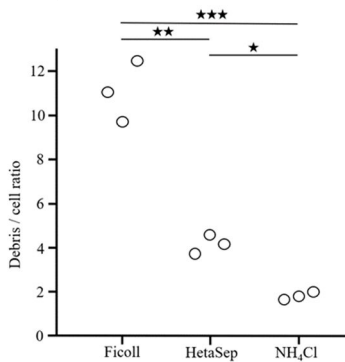
これまで、QPM を用いた 2 次元像位相イメージングフローサイトメーターによる「細胞を流す」「細胞を撮影」を実現し、さらに高分解能解析を可能とする 3 次元像位相イメージングフローサイトメーターの研究開発を平行して行ってきた。前処理した血液サンプルを流路に流し、2 次元像位相イメージングフローサイトメーターによって、白血球と非白血球を識別する。さらに非白血球と識別された細胞 (CTC 候補) を 3 次元像位相イメージングフローサイトメーターで二次解析することにより、従来の上皮マーカーを用いた手法でも同定できる既存 CTC に加え、従来法では同定できなかった新規 CTC の形態情報に基づく識別の実現を目指す。

本技術を用いて、CTC 候補となる細胞の詳細な形態情報を得ることが可能となるが、識別された細胞が真の CTC であることの確認や証明に加え、上皮マーカーを用いた従来法でも識別可能な既存 CTC と、従来法では識別できなかった新規 CTC の鑑別を行う必要がある。これらを実現するためには、CTC 候補として認識された細胞を流路系から分取し、分子生物学的解析を行い各細胞の特性を同定する必要がある。本研究は「自動細胞認識」「分取」技術の開発や、臨床応用に向けた診断機器開発を目指す。



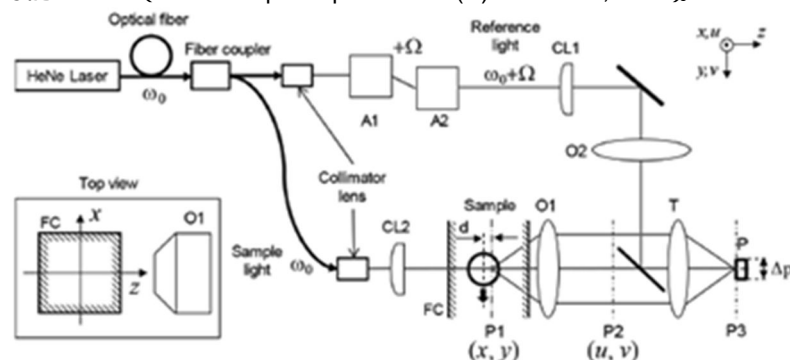
4. 研究成果

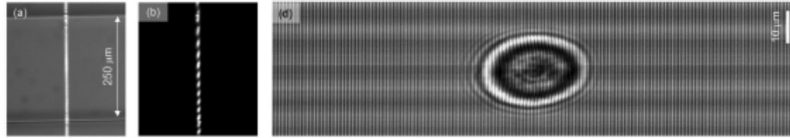
末梢血の前処理技術の比較検討: Ficoll、HetaSep、塩化アンモニウム (NH_4Cl) 処理法を比較検討し、デブリの混入が最小で核細胞の回収率が高い NH_4Cl 法を選別した。



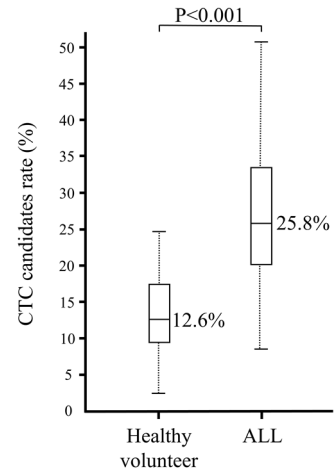
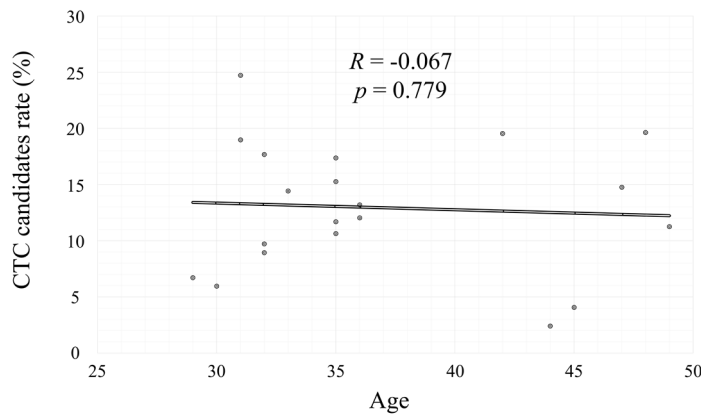
	HetaSep処理法	NH_4Cl 処理法
デブリ混入率	△	○
有核細胞の回収率	30-50%	30-60%
白血球分画の比率	○	○
処理後のCell Viability	○	△
処理所要時間	60分	40分
コスト	△	○
試薬保存期間	○	○
マウス血液への適応	×	○

2 次元像位相イメージングフローサイトメーターの開発: 臨床検体の測定に必要となる多量の細胞の撮影を可能とするために、QPM 観察による細胞識別装置に流路系を導入し、さらにシースフロー技術で細胞を一系列にすることで、効率よく細胞を流しながら 2 次元 QPM 画像を撮影することを可能とした (Biomed Opt Express. 11(4):2213-23,2020)。

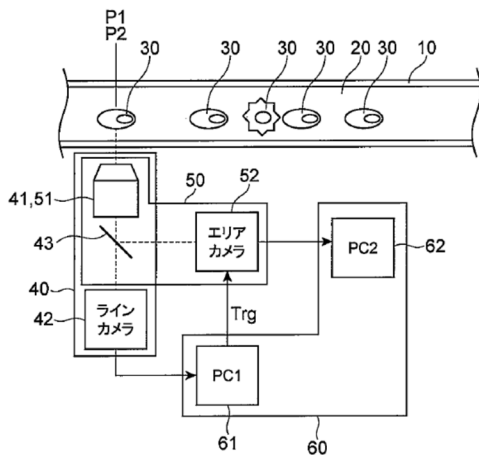




2次元像位相イメージングフローサイトメーターの臨床評価：健常人 20名の末梢血をNH₄Cl法で前処理し、得られた有核細胞を2次元像位相イメージングフローサイトメーターで撮影し、開発した細胞識別機を用いてCTC候補率を計測したところ、年齢によるCTC候補率の偏りを認めなかった。さらに、消化器癌患者の末梢血を前処理した試料を2次元像位相イメージングフローサイトメーターで撮影し、細胞識別機を用いてCTC候補率を計測したところ、CTC候補の細胞集団が健常人に比べ癌患者で多く観察された。



2次/3次元ハイブリッド型イメージングフローサイトメーターの開発：2次元QPM観察で一次スクリーニングを行い、CTCの可能性が高いと判定された細胞のみを3次元QPM観察で二次判定する、ハイブリッド型定量位相フローサイトメーターの開発を行い、試作機を完成させた。また、ハイブリッド試作機で末梢血有核細胞を観察し、CTC候補細胞を同定した。



CTC候補細胞の分取装置の開発：ハイブリッド型定量位相フローサイトメーター試作機の完成に伴い、計測された細胞の分取装置の開発を計画したが、研究期間内には十分な成果が得られておらず、現在も研究開発を継続中である。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamada Hidenao, Hirotsu Amane, Yamashita Daisuke, Yasuhiko Osamu, Yamauchi Toyohiko, Kayou Tsukasa, Suzuki Hiroaki, Okazaki Shigetoshi, Kikuchi Hirotooshi, Takeuchi Hiroya, Ueda Yukio	4. 巻 11
2. 論文標題 Label-free imaging flow cytometer for analyzing large cell populations by line-field quantitative phase microscopy with digital refocusing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 2213-2223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1364/BOE.389435	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 菊池寛利、廣津周、羽田綾馬、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、曾根田亘、川田三四郎、村上智洋、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、森田剛文、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 産学連携による新規循環腫瘍細胞検出機器の研究開発
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣津周、菊池寛利、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、羽田綾馬、曾根田亘、川田三四郎、村上智洋、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、森田剛文、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 位相イメージングフローサイトメーターを用いたCTCの非標識下AI検出技術
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池寛利、廣津周、羽田綾馬、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、曾根田亘、川田三四郎、村上智洋、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、森田剛文、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 定量位相顕微鏡技術を用いた新規循環腫瘍細胞検出技術
3. 学会等名 第29回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大手希望、橋本二三生、山田秀直、山内豊彦、羽田綾馬、廣津周、菊池寛利、岡崎茂俊、竹内裕也、上田之雄
2. 発表標題 細胞内構造の深層学習とレディオミクスに基づく癌細胞のラベルフリー分類
3. 学会等名 日本医用画像工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣津周、菊池寛利、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、関本晃、曾根田亘、川田三四郎、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、森田剛文、坂口孝宣、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 三次元像フローサイトメトリーを用いた非標識下CTC 検出法
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣津周、菊池寛利、羽田綾馬、曾根田亘、川田三四郎、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、森田剛文、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 定量位相顕微鏡を用いた血中循環腫瘍細胞のAI検出技術
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣津周、菊池寛利、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、平松良浩、神谷欣志、坂口孝宣、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 定量位相顕微鏡を用いた非標識下CTC検出技術の臨床応用
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣津周、菊池寛利、尾崎裕介、川田三四郎、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、坂口孝宣、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 定量位相顕微鏡と画像認証システムを用いた非標識下CTC 検出法
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎裕介、菊池寛利、廣津周、山田秀直、川田三四郎、羽田稜馬、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、岡崎茂俊、森田剛文、坂口孝宣、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 細胞内構造の機械学習に基づいた非標識による血中循環腫瘍細胞検手法
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣津周、菊池寛利、曾根田亘、川田三四郎、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、森田剛文、坂口孝宣、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 定量位相顕微鏡を用いた新たな血中循環腫瘍細胞の検出法
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 廣津周、菊池寛利、尾崎裕介、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、川田三四郎、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、森田剛文、坂口孝宣、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 定量位相顕微鏡を用いた新たな非標識下CTC検出法
3. 学会等名 JDDW 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirotooshi Kikuchi, Amane Hirotsu, Hidenao Yamada, Daisuke Yamashita, Shigetoshi Okazaki, Yukio Ueda, Ryoma Haneda, Yoshihiro Hiramatsu, Kinji Kamiya, Hiroyuki Konno, Hiroya Takauchi
2. 発表標題 Label-free classification of live cells using quantitative phase microscopy images for negative selection of circulating tumor cells
3. 学会等名 The 8th International Congress on Cancer Metastasis (国際学会)
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
研究分担者	平松 良浩 (Hiramatsu Yoshihiro) (00397390)	浜松医科大学・医学部・特任准教授 (13802)	
研究分担者	菊池 寛利 (Kikuchi Hirotooshi) (70397389)	浜松医科大学・医学部・准教授 (13802)	
研究分担者	松本 知拓 (Matsumoto Tomohiro) (10867229)	浜松医科大学・医学部・助教 (13802)	
研究分担者	村上 智洋 (Murakami Tomohiro) (60897510)	浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教 (13802)	
研究分担者	神谷 欣志 (Kamiya Kinji) (20324361)	浜松医科大学・医学部附属病院・講師 (13802)	

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