

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04489

研究課題名（和文）がんの原発巣高速診断を実現するオンチップリキッドバイオブシーの構築

研究課題名（英文）Development of on-chip liquid biopsy for achieving express diagnosis of cancer primary tumor

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） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、リキッドバイオブシーによりがんの原発巣を診断することが可能な技術を開発することを目的とし、がんを見つけるセンサとして細胞を活用する技術を考案した。このデバイスは、センシング用細胞を培養するための流路とがんを検出するための検出部から構成される。サンプルとして、がん細胞の培養上清を細胞培養部に導入したところ、センシング用細胞ががんの種類に応じて異なる産生物を産生することを明らかにした。また、その産生物を検出部でリアルタイムに検出できることを実証した。がんを移植したマウスの血清を用いた実験でも検出に成功しており、構築した技術の更なる高度化によりがんの原発巣を特定できることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんを早期に発見する点において、リキッドバイオブシーは低侵襲かつ簡便、高速に検査できる点で有用であることが周知の事実であるが、既存の技術では、原発巣を特定できないことが大きな課題である。本研究の成果は、リキッドバイオブシーによってがんの原発巣を特定できる可能性を示唆した点で、がん医療における早期発見、早期治療の観点で非常に大きな社会的意義がある。また、本成果は、自身の細胞を用いた評価が可能なため、がんの診断のみならず、他の疾患への適用や、細胞応答を基にした治療薬のスクリーニングや治療方針決定に適用することができるなど、次世代医療への展開・貢献も期待でき、学術的・社会的意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：This research objective is to develop the technique for enables diagnosis the primary cancer sites by liquid biopsy. The cells are used to the sensor for detecting the cancer. The developed device consists of a microchannel for culturing the sensing-cell and a detection area for cancer detection. We clarify that the sensing-cell produced different substances depending on the cancer type when the culture supernatant of cancer cells was injected into the culture microchannel as sample. Also, we demonstrated that the cell produced substances were able to be detected in real time by the detection area. It was also successfully detected the sensing-cell produced substances in an experiment using serum from mice implanted with cancer. These results suggested that further advancement of the developed technique could detect the primary cancer sites.

研究分野：バイオマイクロデバイス

キーワード：リキッドバイオブシー BiMEMS がん検診

1. 研究開始当初の背景

がんは、1981年より常に日本人の死因第1位であり、国民の生命及び健康にとって重要な課題である。がんを早期に治療することにより、その完治率が大幅に上昇することが周知の事実であり、がんを早期に発見することが重要である。早期発見には、がん検診を受診する必要があるが、日本のがん検診の受診率は他国と比較して非常に低く、40～69歳の男女共に多くのがん種で50%に満たないのが現状である。がんによる死亡率を低下させるためには、がん検診受診率を向上させることが日本国としての大きな課題である。

現在のがん検診では、主にCTやMRI、PETを用いた画像診断が行われている。検診は肺や大腸、胃などの部位別に受診する必要があることや、X線照射や放射性薬剤の注入による医療被曝、長時間の検査、早期がんの検出が困難などの課題が存在する。また、高額な費用も必要であり、受診者には費用的、身体的、心的なコストがかかる。これらの課題を解決する、新たながん診断法として血液や尿などの生体液サンプルを用いる生体組織診断（リキッドバイオプシー）が期待されている。この技術は、採血や検尿などで採取したサンプルを使用するため低侵襲であり、受診者の負担を最小限に抑えることができる。この方法は、がん患者の血液中を流れる腫瘍細胞（Circulating Tumor Cell: CTC）やがん細胞が産生する細胞外小胞（エクソソーム）などをバイオマーカーとして診断するものであり、近年では、線虫を用いて一滴の尿からがんを検出する方法も開発されている。これらの技術では、比較的早期にがんの罹患を検査することができる点で非常に有用である。しかし、現状のリキッドバイオプシーの技術では、早期に発見できても、がんが存在する部位を特定することができないものが多く、治療することを考えると大きな課題である。このため、リキッドバイオプシーでがんの部位を特定できる新たな技術の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、がんの原発巣を特定できるリキッドバイオプシーを実現することを目指し、医療現場でのがん診断に貢献する。具体的には、細胞を「がんを見つけるセンサ」として活用するがん診断システムを構築する。このため、がんの環境下での細胞の応答動態評価とセンシング用デバイス構築の2つの基盤要素を推進し、最終的にはこれらを統合したシステムを構築する。具体的には、食道がんや胃がん、大腸がんなどの各種がん環境中での細胞の応答を評価することにより、がん種に依存して細胞から産生される産生物を明らかにする。また、センシング用細胞の培養デバイスの設計、製作、検証を行うと共に、細胞から産生される物質のリアルタイム検出評価が可能であることを実証する。これらの実施により、がんの原発巣を特定することが可能なデバイスの設計指針を得る。

3. 研究の方法

本研究では、ヒトへの適応を見据え、センシング用細胞として健常者の末梢血から単離したヒト末梢血由来初代免疫細胞を用いた。がん細胞としてヒト食道癌由来細胞（TE-1）、ヒト胃癌由来細胞（MKN45）、ヒト大腸癌由来細胞（COLO205）、ヒト乳癌由来細胞（MCF7）、ヒト卵巣癌由来細胞（RMG-1）を用いた。各種のがん環境にさらされた細胞が産生するサイトカインや発現するたんぱく質、細胞形態を明らかにするために、上記のがん細胞を培養ディッシュ上に播種し、サブコンフルエントになるまで培養した。この培養上清を24時間後に各種癌細胞の培養上清をそれぞれ回収し、センシング用細胞の培養液に添加することによって、細胞を疑似的ながん環境中で培養した。この際、細胞が産生する産生物をELISA（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay）で評価した。

次に、上記の実験結果を基にして検出用デバイスを構築した。デバイスはフォトリソグラフィをベースとした半導体加工技術を用いて製作した。デバイスの構成材料は、顕微鏡での観察を考慮し、透明のPDMS構造体とガラス基板から成るデバイスとした。本デバイスの中でセンシング用の細胞を培養できる構造にし、デバイス内で安定してセンシング用細胞が培養可能であることを実証した。構築したデバイス内にセンシング用細胞を培養し、そのデバイスにがん細胞の培養上清を導入することによって、センシング用細胞が応答し、疑似的ながん環境中で培養した細胞の応答と同等の結果が得られることをELISAにより検証した。また、QCM（Quartz crystal microbalance）を用いることにより、細胞の産生物質をリアルタイムで検出・評価するための検証実験を行った。具体的にはQCMの電極上に抗体を修飾し、そこにリコンビナントの抗原を送液することによってリアルタイム検出が可能であることを評価した。この際、濃度条件を複数設

定することにより検出範囲の検証を行った。

4. 研究成果

疑似的ながん環境中で細胞を培養した結果、各種がん細胞の環境中で培養されたセンシング用細胞から産生される炎症性サイトカインや抗炎症性サイトカインは、がんの種類に応じて産生の有無や産生量に違いが出ることを明らかにした（表 1）。また、細胞内に発現するたんぱく質についても、がん種に応じて発現の有無が生じることを明らかにした。

一方、細胞からの産生物を検出する検出用デバイスの全体設計を行い、製作プロセスについて検討した。本デバイスは、フォトリソグラフィを主とするマイクロマニシング技術を駆使して微小構造体を持つモールドを製作し、そのモールドにシリコーン樹脂（PDMS）を流し込んでキャストすることにより製作した。デバイス内での細胞の接着性を向上させるため、フィブロネクチンをコーティングした。デバイス内にセンシング用の細胞を播種し 1 日間静置培養を行ったところ、デバイス内に強固に接着し培養できることを確認した（図 1）。次に、QCM を用いることにより、細胞の産生物質をリアルタイムで検出・評価するための基礎実験を行った。具体的には QCM の電極上に抗体を修飾し、そこにリコンビナントの抗原を送液することによってリアルタイム検出が可能であることを実証した。リコンビナントの抗原として TNF- α を使用した。この際、検出対象のターゲット物質を検出するためのシグナルが小さく、感度を向上する必要があることがわかった。このため、ELISA で用いる検出用 HRP を用いてシグナルの増幅を試みた。その結果、10 ng/mL の濃度のターゲット抗体をリアルタイムで検出することに成功した（図 2）。

上記の結果を基に実現したデバイスを用いて評価実験を行った。デバイス上に培養したセンシング用細胞に対して、がん細胞の培養上清を導入し、センシング用細胞から産生されるサイトカインを QCM によってリアルタイムで評価した（図 3）。比較実験として、通常の培地を導入したネガティブコントロール（NC）を評価した。その結果、NC では、周波数がほとんど変動せず、0 Hz の値を取ったのに対して、培養上清を導入した際は -20 Hz を示し、センシング細胞が産生した TNF- α を検出できることを実証した。同様の実験系を用いてセンシング細胞が産生した産生物を ELISA によって評価したところ、相関する結果が得られ、構築したデバイスががんを検出可能であることを実証した。また、測定時間は、ELISA を用いる場合は 24 時間以上かかるのに対し、構築したデバイスを用いた場合は約 14% の 200 分で測定が完了するため有用であることがわかった。さらに、がんを移植したマウスの血清を用いて検出評価を行った結果、がんを移植していないマウスの血清を用いた検出結果に比べて、有意に産生される物質を検出することに成功した。今後、更なる検証を重ねて、リキッドバイオプシーでがんの部位を特定できる技術を実現する。

表 1 疑似がん環境で培養されたセンシング用細胞からの産生物

	食道がん	大腸がん	胃がん	卵巣がん	乳がん
	TE-1	COLO205	MKN45	RMG-1	MCF7
TNF- α	×	○	×	○	×
IL-6	×	○	×	○	×
CCL2	○	○	×	○	×
VEGF	×	×	○	×	×
P-STAT3	○	×	×	○	×

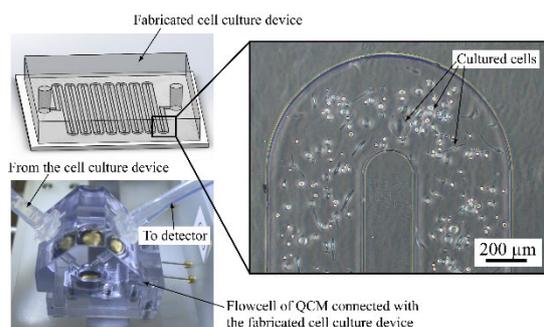


図 1 構築した検出デバイス

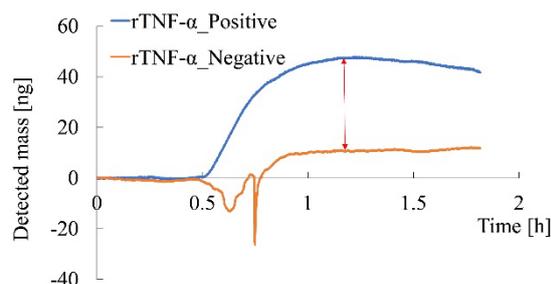


図 2 検出デバイスを用いた TNF- α の検出

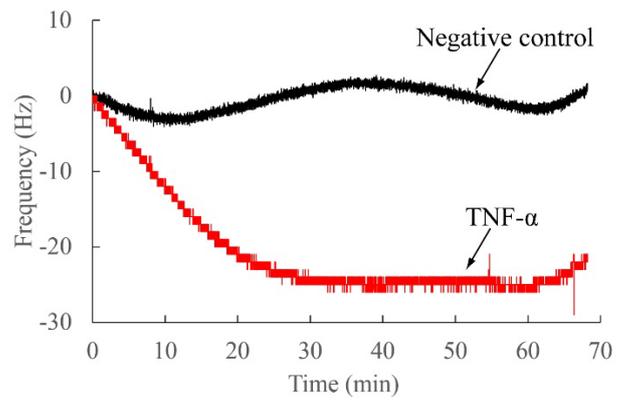


図3 構築したデバイスシステムを用いて検出した細胞の産生物 (TNF- α)

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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福山創一朗, 藤原章雄, 菰原義弘, 中西義孝, 中島雄太
2. 発表標題 液体検査での癌の検出・判別を目指したバイオセンシングデバイスに関する基礎的検証
3. 学会等名 日本生体医工学会九州支部講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福山創一朗, 藤原章雄, 菰原義弘, 中西義孝, 中島雄太
2. 発表標題 がんを判別するための免疫応答を基にしたマイクロバイオセンシングデバイスの構築
3. 学会等名 日本機械学会九州支部第74期総会・講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久本貴哉, 藤原章雄, 菰原義弘, 中西義孝, 中島雄太
2. 発表標題 免疫応答を利用した癌検出デバイスの構築
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 2020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	藤原 章雄 (Fujiwara Yukio) (70452886)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師 (17401)	

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