

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04495

研究課題名(和文) 血中循環がん細胞の検出・解析用デバイス開発

研究課題名(英文) Development of diagnosis system for circulating tumor cells

研究代表者

片岡 正俊 (Kataoka, Masatoshi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：20224438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん転移巣形成に働き、予後や治療効果の判定に利用できる血中循環がん細胞(Circulating tumor cell, CTC)を対象に、上皮細胞マーカーEpCAM発現に依存しない多重免疫染色が可能な平板全面細胞単層配列法、さらに標的一細胞を回収できる細胞ピンセットの開発を行った。平板なスライドガラス/ポリメチルメタクリレート基板上で基板全面に約1,000万個単位の白血球を単層配列後、上皮マーカーを含む免疫多重染色を行うことでがん細胞の多様性に対応できるCTCの定量検計系を構築した。さらに標的細胞回収可能な細胞ピンセット開発を行い、標的がん細胞の回収と一細胞PCRによる遺伝子解析にも成功している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唯一FDAで認可されているCTC検出デバイスであるセルサーチシステムでは、上皮細胞マーカーEpCAMによる細胞濃縮過程が必要で、がん細胞の多様性によるEpCAM低発現のCTCを見逃すことが知られている。本課題で開発した平板全面細胞単層配列法では多重免疫染色による標的細胞の検出・位置特定化が可能で、EpCAMに依存しないがん細胞検出により正確なCTCの定量検出と細胞ピンセットによる一細胞回収技術を利用したがん細胞の遺伝子発現解析により、薬剤耐性や分化度の判定などより詳細ながん診断応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor cells (CTC) that are released from the primary cancer and circulate in the blood to work on the formation of metastatic lesions in distant organs and can be used to determine the prognosis and therapeutic effect. We have developed a plate-wide cell monolayer arrangement method capable of multiple immunostaining independent of the expression of EpCAM that can apply CTC to accurate quantitative detection, and a cell tweezers that can recover a target cell. CTC that can respond to the diversity of cancer cells by arranging about 10 million leukocytes on the entire surface of flat acrylic plate in a single layer and then performing immune multiple staining including epithelial markers. We created a substrate that can be quantitatively detected and the position can be specified at the single cell level. In addition, we have developed tweezers for cells that can recover one cell, and have succeeded in analyzing genes by single-cell PCR.

研究分野：医工連携

キーワード：細胞単層配列 免疫多重染色 循環がん細胞 一細胞PCR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血液中に存在するがん細胞 CTC を定量検出することは、がん転移の予測・治療方針決定の強力な指標として注目されている。FDA は CTC 定量検出可能な診断法として、前立腺がん、乳がん、大腸がんに対してセルサーチシステムを認可している。本システムでは全血中から EpCAM 陽性細胞の濃縮過程を必要としており、EpCAM 発現陰性のがん細胞を見逃すことが問題となる。そのため EpCAM 発現に依存せず、全血 7.5 ml 中の CTC を定量検出可能な診断デバイスの開発が必要になる。さらに CTC 一個レベルからの遺伝子解析を通じて薬剤耐性や悪性度判定による個々の患者に適した新たながん診断法の開発が待たれる。

2. 研究の目的

診断基準である全血 7.5 ml 中の CTC を定量検出するために、EpCAM 発現に依存しないがん細胞の定量検出系構築を目的とする。全血 7.5 ml 中の白血球数千万個単位中に存在する CTC を、免疫多重染色を用いた一細胞レベルでの検出による定量を可能とし、さらに標の一細胞を回収・遺伝子解析を可能とする細胞ピンセットを開発する。

3. 研究の方法

(1) 全面細胞単層配列と免疫多重染色可能な平板アクリル板の作製

スライドガラス大のアクリル平板 (26 mm幅、76 mm長さ、2 mm厚) 表面を酸素プラズマ処理により親水化させ、基板表面への細胞接着を可能にした。親水化アクリル板に細胞展開しアクリル板の洗浄・乾燥を行い基板表面での細胞単層配列と多重免疫染色を行った。

(2) 細胞培養と基板表面での全面細胞単層配列および免疫多重染色によるがん細胞検出

培養白血球としてヒトTリンパ球CCRF-CEM、培養がん細胞としてヒト肺がん細胞NCI-H1650をそれぞれ10%牛血清を含むRPM 1640培地で通法にて培養し、トリプシン処理を行いそれぞれ細胞を回収した。白血球 1.8×10^7 個/3 mlあるいは同白血球懸濁液にがん細胞 1.8×10^6 個を加え全量をアクリル基板の上に展開し60分間静置後、2.5%サポインを含むPBSで洗浄後、抗体溶液を基板表面全体に添加し遮光下で室温60分静置した。抗体溶液として、終濃度0.1 $\mu\text{g/ml}$ PE標識抗サイトケラチン抗体、1.8 $\mu\text{g/ml}$ Alexa 488 標識抗EpCAM抗体、0.9 $\mu\text{g/ml}$ Alexa 647標識抗CD45抗体を含む溶液1.5 mlを用いた。アクリル基板をPBSにて洗浄後、DAPIを含む封入剤を用いてカバーガラスを載せ蛍光顕微鏡にて細胞観察を行った。

(3) ヒト全血への培養がん細胞の添加およびアクリル基板でのがん細胞検出

ヒト全血に培養がん細胞NCI-H1650を白血球に対して1/100の濃度で加え、遠心分離で白血球画分を回収後、1.5 ml PBSに懸濁してアクリル基板表面に展開し、免疫染色に供した。

(4) ヒト脾臓がん患者血中がん細胞検出

脾臓がん患者全血から白血球画分を回収後、免疫多重染色を行い白血球中に含まれるがん細胞検出を行った。

(5) 細胞ピンセットによる白血球中がん細胞の一細胞回収と遺伝子解析

培養白血球に培養がん細胞を加え、免疫多重染色後がん細胞の位置特定を行い細胞ピンセットを用いてがん細胞回収と一細胞PCRによる遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) アクリル基板表面での細胞単層配列と免疫多重染色によるがん細胞検出

親水処理済みアクリル基板の上に細胞展開・洗浄することで、基板表面全体に密に1000万個単位で細胞の単層配列が可能になる(図1)。白血球CCRF-CEMにがん細胞NCI-H1650を添加した細胞懸濁液を用いた免疫多重染色では、CD45陽性白血球とEpCAMおよびサイトケラチン陽性がん細胞を一細胞レベルで識別と定量検出、さらにアクリル基板表面上での位置特定が可能になる(図2)。

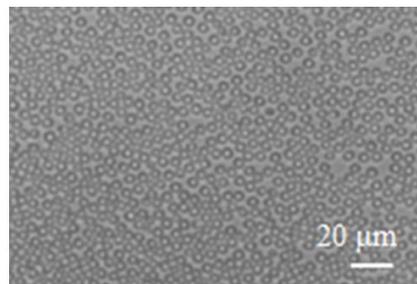


図1. 親水化アクリル基板での細胞単層配列
基板表面全体に、細胞種を問わず1000万個単位の細胞の高密度単層配列が可能になる。

(2) ヒト全血中での培養がん細胞検出

培養がん細胞 NCI-H1650 を加えた健常者全血を濃度密度勾配遠心分離により白血球画分を分離して、アクリル基板上で免疫多重染色を行った。スパイク

されたがん細胞は、核染色 DAPI と上皮マーカーである EpCAM およびサイトケラチン陽性細胞として、白血球と鑑別可能になった。

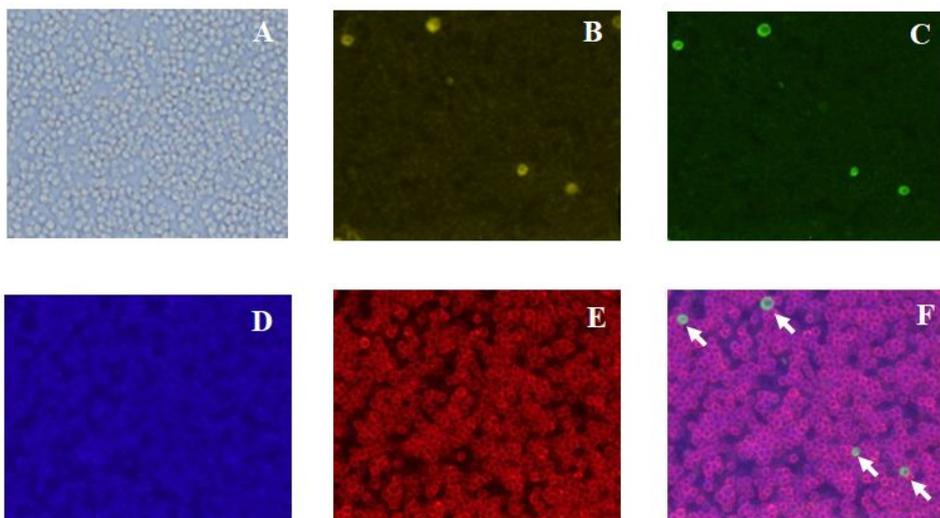


図2. 免疫多重染色像
明視野像(A)、Alexa488標識抗EpCAM抗体染色像(B)、PE標識抗サイトケラチン抗体染色像(C)、DAPI染色像(D)、Alexa647標識抗CD45抗体染色像(E)、重ね合わせ像(F)。

(3) がん患者由来 CTC 検出

膵臓がん患者由来全血から、白血球画分を分離後アクリル基板上での免疫多重染色により DAPI 陽性、サイトケラチン陽性かつ EpCAM 陰性、CD45 陰性細胞を検出した。CTC 検出デバイスとして FDA が唯一認可しているセルサーチシステムでは、膵臓がんは診断対象外となっている。膵臓がんは転移する確率が高いことが知られているが、セルサーチシステムでの CTC 検出は極めて低い。これはがん多様性により膵臓がん由来 CTC の細胞膜上では EpCAM 発現が低いため、セルサーチシステムでは見逃されているためと考えられる。本研究課題で開発したアクリル基板での免疫多重染色では、サイトケラチン発現に着目したがん細胞検出が可能となり、膵臓がん由来 CTC 検出のように EpCAM 発現に依存しない CTC 検出へ応用可能と考えられる。

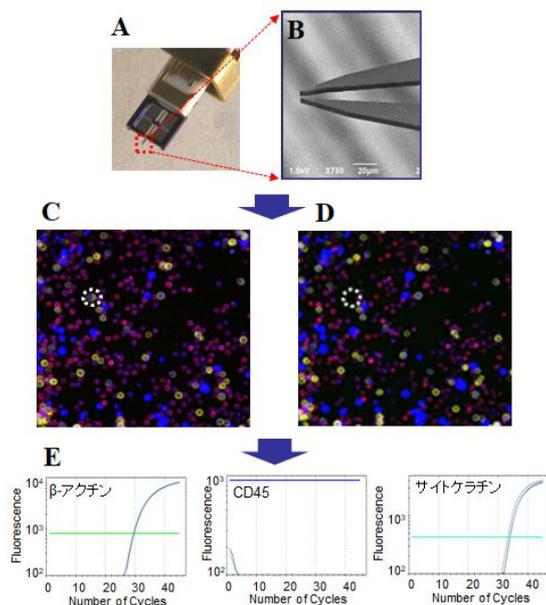


図3. 標的がん細胞の回収と一細胞PCRによる遺伝子発現解析
ナノピンセット(A)、細胞把持用先端部分(B)、免疫多重染色によるがん細胞(C、丸印)、細胞ピンセットによる一細胞回収(D、丸印)、一細胞RT-PCRによる遺伝子解析によりβ-アクチン陽性・CD45陰性・サイトケラチン陽性を確認(E)。

(4) がん細胞回収と遺伝子解析

微細加工領域で利用され微細粒子の把持・移動が可能なナノピンセットを基板技術として、把持部分の構造改良と表面処理を行うことで、アクリル基板表面で免疫染色されたがん細胞を基板表面から回収し一細胞遺伝子解析することに成功した(図3)。

開発したアクリル製平板基板では1000万個単位の白血球展開が可能で、CTC診断に必要な7.5ml全血解析に必要な数千万個単位の白血球解析に数枚程度の基板を使用することで対応可能になる。また免疫多重染色が容易なことから、EpCAM発現に依存せずがん細胞の多様性にも対応が可能な定量的CTC検出系が構築された。さらに細胞ピンセットを用いることで、基板上的がん細胞回収・一細胞遺伝子解析を行うことで、一細胞レベルでの薬剤耐性や悪性度の判定など、より有効性の高いがん診断法構築が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yokota Kazumichi, Hashimoto Muneaki, Kajimoto Kazuaki, Tanaka Masato, Murayama Sanae, Tsutsui Makusu, Nakajima Yoshihiro, Taniguchi Masateru, Kataoka Masatoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of Electrolyte Concentration on Cell Sensing by Measuring Ionic Current Waveform through Micropores	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosensors	6. 最初と最後の頁 78 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bios11030078	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 -
1. 著者名 Hashimoto Muneaki, Yokota Kazumichi, Kajimoto Kazuaki, Matsumoto Musashi, Tatsumi Atsuro, Nakajima Yoshihiro, Mita Toshihiro, Minakawa Noboru, Oka Hiroaki, Kataoka Masatoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Highly Sensitive and Rapid Quantitative Detection of Plasmodium falciparum Using an Image Cytometer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1769 ~ 1769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8111769	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 -
1. 著者名 Hashimoto Muneaki, Yokota Kazumichi, Kajimoto Kazuaki, Matsumoto Musashi, Tatsumi Atsuro, Yamamoto Kenichi, Hyodo Tomonori, Matsushita Kiichiro, Minakawa Noboru, Mita Toshihiro, Oka Hiroaki, Kataoka Masatoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Quantitative Detection of Plasmodium falciparum Using, LUNA-FL, A Fluorescent Cell Counter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1356 ~ 1356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8091356	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 -
1. 著者名 Yokota Kazumichi, Hashimoto Muneaki, Kajimoto Kazuaki, Tanaka Masato, Murayama Sanae, Tsutsui Makusu, Nakajima Yoshihiro, Taniguchi Masateru, Kataoka Masatoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of Electrolyte Concentration on Cell Sensing by Measuring Ionic Current Waveform through Micropores	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosensors	6. 最初と最後の頁 78 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bios11030078	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 -

1. 著者名 Hashimoto Muneaki, Yokota Kazumichi, Kajimoto Kazuaki, Matsumoto Musashi, Tatsumi Atsuro, Nakajima Yoshihiro, Mita Toshihiro, Minakawa Noboru, Oka Hiroaki, Kataoka Masatoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Highly Sensitive and Rapid Quantitative Detection of Plasmodium falciparum Using an Image Cytometer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1769 ~ 1769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8111769	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 -

1. 著者名 Hashimoto Muneaki, Yokota Kazumichi, Kajimoto Kazuaki, Matsumoto Musashi, Tatsumi Atsuro, Yamamoto Kenichi, Hyodo Tomonori, Matsushita Kiichiro, Minakawa Noboru, Mita Toshihiro, Oka Hiroaki, Kataoka Masatoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Quantitative Detection of Plasmodium falciparum Using, LUNA-FL, A Fluorescent Cell Counter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1356 ~ 1356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8091356	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 -

1. 著者名 Yamamoto Takeki, Hashimoto Muneaki, Nagatomi Kenji, Nogami Takahiro, Sofue Yasuyuki, Hayashi Takuya, Ido Yusuke, Yatsushiro Shouki, Abe Kaori, Kajimoto Kazuaki, Tamari Noriko, Awuor Beatrice, Sonye George, Kongere James, Munga Stephen, Ohashi Jun, Oka Hiroaki, Minakawa Noboru, Kataoka Masatoshi, Mita Toshihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of a quantitative, portable, and automated fluorescent blue-ray device-based malaria diagnostic equipment with an on-disc SiO2 nanofiber filter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6585-6596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63615-2	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 -

1. 著者名 Yamamoto Takeki, Yatsushiro Shouki, Hashimoto Muneaki, Kajimoto Kazuaki, Ido Yusuke, Abe Kaori, Sofue Yasuyuki, Nogami Takahiro, Hayashi Takuya, Nagatomi Kenji, Minakawa Noboru, Oka Hiroaki, Mita Toshihiro, Kataoka Masatoshi	4. 巻 132
2. 論文標題 Development of a highly sensitive, quantitative, and rapid detection system for Plasmodium falciparum-infected red blood cells using a fluorescent blue-ray optical system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 375 ~ 381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2019.02.064	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0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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