

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02997

研究課題名（和文）サイズ分画化された血液で最大化するがん診断情報

研究課題名（英文）Genetic analysis of circulating tumor cells using a microfilter device

研究代表者

松阪 諭（Matsusaka, Satoshi）

筑波大学・医学医療系・客員研究員

研究者番号：00372665

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）：癌の早期診断や再発のバイオマーカーである血中循環型がん細胞（Circulating Tumor cells：CTC）の遺伝子解析は抗がん剤の効果判定や薬剤選定にも有用であるが、血中での数が非常に少ないことから補足、解析が難しい。Ni/Pd合金精密濾過膜のサイズセレクションによってCTCを分離する本技術では、前処理無しで全血から直接CTCを分離・回収でき、遺伝子変異解析も可能であった。また、ラベリングが不要なことから使用抗体による選択が避けられる上、採血後迅速にダメージの少ないCTCを分離可能で、膜上でそのまま長期培養・増殖することもできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のCTC分離法は大型の装置や高価なフィルターを必要とするものが多いが、本法では13mmの合金フィルターとそのハウジング、小型ポンプを主としてクリーンベンチ内で短時間に分離可能である。また血液の前処理が不要なことから、もともと少ないCTCのロスも軽減できる。繰り返し行える採血で速やかに、また簡便にCTCを分離することで経過毎に遺伝子の情報を把握できるため、薬剤の効果・選択に有用と思われる。以上のように本法は特殊な技術・装置を必要とせず、安価で迅速にCTCを分離できる方法である。

研究成果の概要（英文）：Genetic analysis of circulating tumor cells are associated with cancer metastasis and prognosis but their scarcity in whole blood prevents their use as a diagnostic tool. The purpose of the present study was to establish a novel approach to capture and cultivate CTCs using a microfilter device. A non-invasive, size-based filtering modality was developed in the present study, which is able to effectively isolate and culture CTCs and CTC clusters from clinical patients with cancer to characterize these peripheral cells for therapy response predictions. Cultured CTCs may be used for patient-specific drug susceptibility testing and genomic profiling of cancer.

研究分野：腫瘍学

キーワード：血中循環がん細胞

1. 研究開始当初の背景

がんの進行過程や抗がん剤（特に分子標的治療薬）による治療により、がん細胞は多様に変化することが知られており、リアルタイムにがん細胞の分子レベルの変化をモニタリングすることが必要となってきた。手術や内視鏡検査によるがん細胞の採取は、患者にとって侵襲が高く頻回に行うことは難しい。そこで患者に低侵襲な手技で頻回に施行できる血液から生体内のがん細胞の情報を得ることにより、リアルタイムに適切な治療を選択できる診断システムの構築が切望されている。

2. 研究の目的

血中循環型がん細胞（Circulating Tumor cells：CTC）の測定は悪性腫瘍の予後予測、抗がん剤の効果判定や薬剤選定にも有用である。しかし薬剤選定のための感受性試験にはある程度の細胞数が必要となるため、CTCを培養する技術開発が必須となるが、現時点ではダメージを抑えて分離し、培養する技術について確立した方法がない。本研究ではNi/Pd合金でできた精密ろ過膜（Ni/Pd Filter）によるCTC分離・培養法の確立をめざす。この方法はCTCが血球細胞より大きいことを利用した分離法であり、抗体によるセレクションが不要なため細胞へのダメージが少なく、分取後の培養に非常に有利である。

3. 研究の方法

濾過膜：今回使用したろ過膜はNi/Pd合金製の精密濾過膜で、直径 $8\mu\text{m}$ および $15\mu\text{m}$ の孔を持つ金属フィルターである。このフィルターは平面のシートに精密直径を持つ孔が実際に並んでおり、孔サイズと直径が規則的で開孔率20%前後と、既存の不織布や中空糸製の約4倍以上である。

CTC補足方法：膀胱がん及び肺がん患者の術前血液5mLをPBS-EDTAで2倍希釈し、タンデムに繋いだ $15\mu\text{m}$ - $8\mu\text{m}$ Ni/Pd filterに通した。流速はシリンジポンプを用いて50mL/hに固定した。同じ流速でPBS-EDTA 20mLでwashし、filterを取り出す。補足した細胞はfilterごと長期培養、もしくは補足直後に細胞の回収を行なった。

また、フィルターを通過した血液はセパラピッドチューブ（徳山積水化学（株））を受けて遠心、上清（血清）5mLを分取して、ここからcell free DNAを抽出した。

培養：取り出したfilterを培地（IMDM-B27-EGF-FGF-2%Matrigel）3mL / 35mm Dishで長期培養（3～10週間）した。

回収：filterを取り出す前にHoechst/CD45-FITC/EpCAM-PE染色した。抗体溶液中で30分放置後PBS-EDTA washし、filterを取り出す。細胞補足面を培地でピペッティングし、回収した細胞懸濁液を遠心して濃縮、「1 Cell Dish（iBiochips, #H2-SCD-5PK）」に捲いて観察し、Hoechst(+)/EpCAM(+)/CD45(-)細胞の分取を試みた。

培養中の観察：CD45-FITC/EpCAM-PE染色し、観察した。観察後培養継続した。

培養終了時の観察：Hoechst/CD45-FITC/EpCAM-PE染色・観察した

培養の評価：培養途中または終了時に染色・観察し、Hoechst(+)/CD45-FITC(-)/EpCAM-PE(+)を以下のように分類して計数した。

single cell	細胞数1	$20\mu\text{m}$ 未満
cluster	細胞数2～数個	$50\mu\text{m}$ 未満
colony	細胞数複数	$50\mu\text{m}$ 以上

回収細胞及びcell free DNAの変異解析：遺伝子を増幅し（PicoPLEX Single Cell WGA Kit, TAKARA #R300722）、digital droplet PCR（ddPCR）にて遺伝子の変異有無を確認した。

4. 研究の成果

1) 膵がん患者背景

今回培養解析した膵がん 15 症例の背景について表 1 に示した。

表 1

15 症例		
年齢	中央値	74
	最少年齢	44
	最大年齢	87
性別	男性	6
	女性	9
TMN分類	Stage 0 (術前診断 cStage IIA)	1
	Stage I	6
	Stage II	8
組織型	浸潤性膵管癌	10
	膵管内乳頭粘液性腺癌(IPMC)	2
	膵管腺癌 {PDAC (mod-por)}	2
	unknown	1
化学療法歴	有	4
	無	11
放射線療法歴	有	2
	無	13

2) 膵がん 15 症例 CTC の培養

培養中・終了後の染色観察結果 [EpCAM(+)/CD45(-)細胞数] を表 2、3、4 にまとめた。いずれも長期培養により EpCAM(+)細胞が確認できた。

Day0 で single cell もしくは 2 細胞ほどの cluster が認められるケースも長期培養により増殖し、50 μ m 以上の colony 様の細胞も確認できた。また Day0 で EpCAM(+)細胞が確認できない例でも培養によって cluster/colony 状に増殖する例もあった。これは捕捉時 EpCAM(-)であった細胞が培養中に上皮型となり EpCAM を発現、増殖したものと考えられる。現在広く用いられる EpCAM 抗体によるセレクションではこのような細胞は分取できないため、Filter によるサイズセレクションはこの点においても有益な方法と考えられる。長期培養後の細胞の生存をカルセイン MA 染色で確認した(表 4)。

表 2 培養途中で染色観察した症例の結果

Case	First observation				Second observation				Third observation			
	Day	Cell	Cluster	Colony	Day	Cell	Cluster	Colony	Day	Cell	Cluster	Colony
1	0	0	0	0	21	5	0	0	50	0	1	0
2	0	0	0	0	23	3	1	0	44	0	1	0
3	0	0	0	0	27	2	0	3	42	0	0	2
4	0	18	2	0	43	3	1	1	103	8	0	2
5	0	0	1	0	42	1	1	0	102	1	2	2
6	0	0	0	0	38	0	1	2	98	0	1	0

表 3 培養終了時に染色観察した症例の結果

Case	Filter	Observation			
		Day	Cell	Cluster	Colony
7	R8	23	7	5	0
8	R8	23	7	0	0
9	R8	40	0	0	0
	R15	40	0	5	3
10	R8	41	0	0	0
	R15	41	0	2	1
11	R8	54	0	0	0
	R15	54	0	2	0
12	R8	54	0	4	44
	R15	54	0	0	0
13	R8	47	0	0	3
	R15	47	0	1	1

表 4 培養終了時に染色観察・生存確認した症例の結果

Case	Filter	Observation			
		Days	Cell	Cluster	Colony
14	R8	49	0	1	1
	R15	71	2	0	5
15	R8	61	0	1	2
	R15	62	0	0	0

3) 膵がん及び肺がん症例の回収細胞と cell free DNA の変異解析

「1Cell Dish (iBiochips, #H2-SCD-5PK)」で回収した細胞および filter を通過した血液から抽出した cell free DNA は PicoPLEX Single Cell WGA Kit を用いて Whole genome amplification を行った。この DNA を template にして ddPCR を行い、遺伝子の変異有無を調べた。回収細胞では膵がん症例 2 例 (P74, P93) で KRAS 遺伝子、肺がん症例 3 例 (L19, 23, 24) で EGFR 遺伝子に変異を確認した (L23 症例)。

cell free DNA の変異解析では膵がん症例 1 例 (P86) で KRAS 遺伝子に、肺がん症例 5 例 (L15, 18, 19, 21, 22, 23) で EGFR 遺伝子に変異 (T790M) を確認した。

膵がん 15 例のうち回収細胞で KRAS 変異を検出したのは 2 例、cfDNA も 2 例検出したが、この 2 例は同じ症例ではなかった。肺がんは 6 例で細胞回収し、うち 3 例で EGFR/T790M 変異を検出した。cfDNA は 10 例解析し、6 例で変異検出した。このうち 2 例で回収細胞と cfDNA の両方で変異を検出した。

今回使用した Ni/Pd 精密濾過膜によるサイズセレクション法で CTC を分取できた。多くの CTC 分取法の場合抗体標識を必要とするが、本法は標識不要で細胞へのダメージが小さく培養に耐える生細胞で、かつ標識法では取りこぼす EpCAM(-)細胞も分取可能な方法であることが証明された。加えて捕捉後回収した細胞の遺伝子変異解析も可能であった。

Filter 通過後の血中 cell free DNA の変異解析も可能であり、回収細胞と併せて目的遺伝子の変異情報も入手できる。手法自体も大型の装置等が不要であり、クリーンベンチ内で簡便に実施でき、比較的短時間での分取が可能なことから、非常に有益な方法であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古川安津子、森倫子、下村治、荒木一寿、小田竜也、松阪諭
2. 発表標題 Ni/Pd Filterによる膵がん患者CTCの分離及び長期培養
3. 学会等名 第7回リキッドバイオプシー研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Atsuko Furukawa, Tomoko Mori, Osamu Shimomura, Kazuhisa Araki, Tatsuya Oda, Satoshi Matsusaka	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Oncology Reports	5. 総ページ数 6
3. 書名 Culture of circulating tumor cells using a microfilter device	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞培養容器	発明者 松阪諭	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-017529	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------