

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510173

研究課題名(和文) 血中循環がん細胞の検出を目指した細胞チップデバイスの開発

研究課題名(英文) Development of cell chip devices for detection of circulating tumor cells

研究代表者

山村 昌平 (yamamura, shohei)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：50432141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、独自の集積型の細胞チップを作製し、血中循環がん細胞(CTC)の検出系の構築を目指した。微細加工技術を用いて、直径105マイクロメートルのマイクロチャンバーが約2万個集積した細胞マイクロアレイチップを作製した。デザインや表面処理等を検討し、1枚のチップで約180万個の白血球を単一層に配置することに成功した。本細胞チップを用いて、全血中に添加した0.0001%の標的がん細胞を検出することができた。検出後、独自のマイクロマニピュレーターを用いて、標的の単一がん細胞を回収し、一細胞PCRすることも可能であった。さらに、本細胞チップを用いて、肺がん患者試料中のCTC検出にも成功した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we developed a novel high-throughput screening and analysis system for circulating tumor cells (CTCs) using a cell microarray chip. The cell microarray chip with 20,944 microchambers (105 micrometer diameter) was made from polystyrene by using LIGA process. The chip surface was rendered to hydrophilic by means of reactive-ion etching, which led to the mono-layers formation of leukocytes. Leukocytes isolated from whole blood were dispersed on the chip surface, followed by 15 min standing. Approximately 89 leukocytes entered each microchamber when about 1,800,000 leukocytes in total were placed onto the cell microarray chip. In the experiments using spiked NCI-H1650 cells (0.01 to 0.0001%), accurate detection of carcinoma cells was achieved with monoclonal antibodies. Further, we could retrieve target carcinoma cells by micromanipulator for DNA analysis. Using the cell microarray chip system, we also succeed to detect CTCs in peripheral blood of lung cancer patients.

研究分野：バイオチップ

 キーワード：細胞チップ マイクロアレイ 循環がん細胞 転移性がん 単一細胞解析 バイオチップ ハイスルー
 ットスクリーニング

1. 研究開始当初の背景

近年、がん細胞は転移する際に腫瘍組織から血管中に入り、様々な箇所へ移動すると考えられており、血中循環がん細胞 (CTC) の解析は、新たながん検査として期待されている。しかし、CTC が存在する割合は、血液 10ml (白血球約数千万個) 中に数個から数百個といわれており、従来の PCR や FACS 等では感度や正確性などに問題があり、極めて検出が困難である。これらの問題を克服するためには、多数の血液細胞を細胞レベルで高感度、高精度に操作、検出する必要がある。そこで本研究では、既存法では検出困難であった CTC を高感度、高精度、簡易に検出するため、多数の白血球を均一に配置し、抗体多重染色による高精度検出で、一度に解析可能な集積型の細胞チップの開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、微細加工技術を用いて独自の集積型マイクロアレイチップを作製し、CTC 検出系の構築を目指し、多数の白血球細胞から極少数のがん細胞を、一枚のチップ上で高精度、高感度に行えるがん診断システムの開発を目標とする。

そのためには、まず多数の白血球をマイクロアレイ上に均一に単一層配置できる細胞チップを設計し、チップ上で 1000 万個の白血球を検出および解析できるシステムの開発を目指す。この細胞マイクロアレイチップを用いて、要求される CTC の検出感度である白血球数千万個あたり数個から数百個の極少数のがん細胞を高感度に検出する系を構築する。それと同時に、抗体多重染色による高精度な検出が簡易にできるシステムを開発する。それによって、本細胞チップシステムは、あらゆるがん細胞を見落とすことなく正確に検出することが可能である。さらに、検出後に PCR などを行い、単一がん細胞を機能解析できれば、がん細胞の種類等も評価できるため、新しいがん診断システムとして期待される。

3. 研究の方法

CTC 検出を目指した新しいがん診断システムとして、高精度、高感度な細胞マイクロアレイチップシステムを開発するにあたり、(1) まず、多数の白血球を均一に単一層配置するマイクロアレイチップを作製する。(2) 次に、作製した細胞マイクロアレイチップを用いて、がん細胞のみを高感度でかつ抗体多重染色による高精度な検出を行い、がん細胞を定量的に検出するための条件検討を行う。さらに、チップ上で PCR などを行うことによって単一がん細胞の詳細な解析を目指す。最終的には、患者試料において CTC 検出の実証実験を試みる。以下に詳細を述べる。

(1) 微細加工技術であるフォトリソグラフィ技術を用いて、マイクロアレイチップを作製する。マイクロアレイチップを用いて 1000 万個の白血球を検出することを目標に、より多くの白血球を均一かつ単一層に配置可能な細胞チップの設計作製を目指す。そのためには、各マイクロチャンバーに導入できる細胞数を一定にかつ単一層に固定化させる必要があり、チップのデザイン、表面処理、細胞濃度などを検討する。

(2) 作製した細胞チップ上で、白血球中に混在する極少数のがん細胞を対象に、複数の蛍光標識抗体等を用いて、がん細胞のみを検出できるように抗体や色素の種類や濃度の条件検討を行う。次に、がん細胞を 0.01% から 0.00001% に細胞濃度を変化させ、マイクロアレイスキャナーを用いてがん細胞濃度に依存して定量的に検出するための条件の洗い出しを行う。それと同時に、抗体多重染色をチップ上でを行い、正確にがん種の同定ができるシステムを構築する。さらに、がん細胞の詳細な機能解析として、検出された標的の単一がん細胞に対して、チップ上で PCR 等を試みることによって、単一がん細胞の遺伝子解析を行う。また、最終年度 (平成 26 年度) には、患者試料を用いた CTC 検出の実証実験も行う。

4. 研究成果

(1) 微細加工技術であるナノリソグラフィ技術 (LIGA プロセス) を用いて、直径 105 マイクロメートルのマイクロアレイチップを作製した。マイクロチャンバーの直径、深さなどのデザインや、チップの表面処理として酸素プラズマ処理条件を検討することによって、白血球を均一かつ単一層に配置することに成功した (図 1)。これらの条件をもとに、展開する細胞濃度を調整することによって、1つのマイクロチャンバーの穴底のみに約 90 個の白血球を配置することができ、1枚のチップで約 180 万個の白血球を単一層に配置することが可能となった。したがって、細胞チップを十枚程度使用すれば数千万個の細胞検出も可能であることが示された。

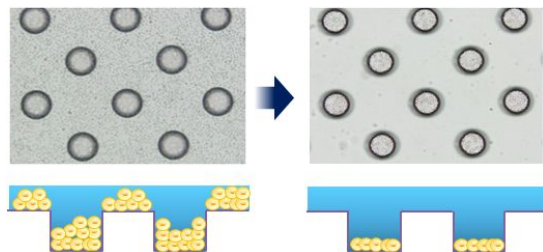


図 1. 細胞チップ上での白血球の単一層配置、洗淨前 (左) と洗淨後 (右) の細胞配置状態

(2) 作製した細胞チップを用いて、白血球中に添加した培養系肺がん細胞 (H1650 株) の定量検出を試みた。試料をチップ上に展開した後、複数の蛍光標識抗体等を用いて染色する

ことによって、1枚のチップで0.01%から0.0001%の標的がん細胞を定量的に検出し、180万個に1個(0.00006%)の標的がん細胞を検出することにも成功した(図2)。将来的には、細胞チップをさらに集積化し、複数枚のチップで1000万個に1個の単一がん細胞の検出も可能であると思われる。また、スパイク実験として全血中に混在する極少数のがん細胞を定量検出も可能であった。検出後、独自に開発したマイクロマニピュレーターを用いて、標的の単一がん細胞の回収にも成功した。さらに、回収した単一がん細胞におけるサイトケラチンのmRNA発現をリアルタイムPCRで確認することができた。また、本細胞チップシステムを用いて、患者試料を用いた臨床研究を行った結果、肺がん患者試料からCTCを検出することに成功した。今後、企業や大学病院などと共同研究を進めながら、新しいがん診断システムの開発に繋げていきたい。

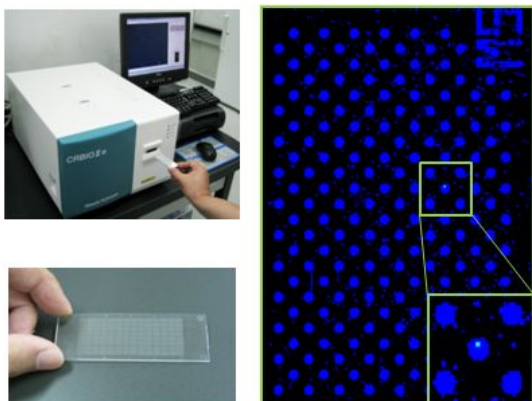


図 2. 細胞チップを用いた白血球中に混在する単一がん細胞の検出

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件) 全て査読有

- 1) Shibu E.S., Sugino S., Ono K., Saito H., Nishioka A., Yamamura S., Sawada M., Nosaka Y., Biju V., Singlet-oxygen-sensitizing near-infrared-fluorescent multimodal nanoparticles., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 52, 2013, 10559-10563
- 2) Jones P., Sugino S., Yamamura S., Lacy F., Biju V., Impairments of cells and genomic DNA by environmentally transformed engineered nanomaterials, *Nanoscale.*, 5, 2013, 9511-9516,
- 3) Abe K., Hashimoto Y., Yatsushiro S., Yamamura S., Bando M., Hiroshima Y., Jun-ichi Kido J., Tanaka M., Shinohara Y., Ooie T., Baba Y., Kataoka M., Simultaneous immunoassay analysis of plasma IL-6 and TNF- α on a microchip, *PLoS One*, 8, 2013, e53620

- 4) Yamamura S., Yatsushiro S., Yamaguchi Y., Abe K., Shinohara Y., Kataoka M., Detection of miRNA in cell cultures by using microchip electrophoresis with fluorescence-labeled riboprobe, *Sensors*, 12, 2012, 7576-7586
- 5) Yamamura S., Yatsushiro S., Yamaguchi Y., Abe K., Shinohara Y., Tamiya E., Baba Y., Kataoka M., Accurate detection of carcinoma cells by use of a cell microarray chip, *PLoS One*, 7, 2012, e32370
- 6) 片岡正俊、阿部佳織、橋本芳子、山村昌平、八代聖基、プラスチック製マイクロチップ基板を用いた血中バイオマーカー測定法の構築、日本臨床検査医学会、臨床病理、60、2012、1090-1100

〔学会発表〕(計 27 件)

- 1) 山村昌平、細胞チップを用いた各種疾患診断技術の開発、第 34 回 広大サステナブル科学セミナー(招待講演)、2015/02/23、広島県
- 2) Tawa K., Sasakawa C., Shibata I., Yamamura S., Kataoka M., Multicolor fluorescence microscopic imaging of tumor cells enhanced with the plasmonic chip, MNC2014, 2014/11/06, Japan (Fukuoka)
- 3) 山村昌平、細胞チップを用いた単一細胞機能解析および診断技術、BioJapan 2014 World Business Forum、2014/10/15、神奈川県
- 4) 山村昌平、細胞チップを用いた単一細胞機能解析および診断技術、機能性食品研究会 & ヘルスケア研究会 ショートプレゼンテーション in BioJapan2014、バイオインダストリー協会、神奈川、パシフィコ横浜、2014/10/17
- 5) 山村昌平、阿部佳織、芝田いずみ、八代聖基、馬場嘉信、片岡正俊、血中循環がん細胞検出のための細胞チップの開発、日本化学会生体機能関連化学部会バイオテクノロジー部会、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、2014/09/11、岡山県
- 6) 田和圭子、笹川知里、芝田いずみ、山村昌平、片岡正俊、プラズモニクチップを用いた細胞の高感度マルチカラー蛍光顕微鏡観察、高分子学会、高分子討論会、2014/09/24、長崎県
- 7) 田和圭子、笹川知里、山村昌平、片岡正俊、プラズモニクチップによる癌細胞のマルチカラー蛍光顕微鏡観察、応用物理学会秋季学術講演会、2014/09/18、北海道
- 8) 山村昌平、細胞チップを用いた単一細胞機能解析および診断技術、産総研 新技術説明会、2014/07/01、東京都
- 9) Yamamura S., Abe K., Yatsushiro S., Baba Y., Kataoka M., High-throughput screening and analysis for circulating tumor cells using a cell microarray chip, *Biosenso*

- rs 2014, 2014/05/28, Australia (Melbourne)
- 10) Kataoka M., Yamamura S., Abe K., Obana E., Yatsushiro S., Mita T., Sakurai M., Horii T., Development of cell microarray chip for rapid and high sensitive malaria diagnosis -Experimental study of cell microarray chip diagnosis system in Uganda-, Society for the advancement of science in Africa, 2014 SASA ANNUAL CONFERENCE, 2014/05/07, Uganda (Kampala)
 - 11) 山村昌平、阿部佳織、八代聖基、馬場嘉信、片岡正俊、血中循環がん細胞検出を目指した細胞チップの開発、日本化学会第94春季年会、2014/03/27、愛知県
 - 12) Abe K., Obana E., Hashimoto Y., Yatsushiro S., Yamamura S., Shinohara Y., Baba Y., Kataoka M., Recovery of malaria-infected erythrocyte from a cell microarray chip with a micromanipulator and PCR analysis for species identification of malaria, Advances in Biodetection & Biosensors, 2014/03/10, Germany (Berlin)
 - 13) Hashimoto Y., Abe K., Yatsushiro S., Yamamura S., Kataoka M., Quantitative, rapid, and high sensitive analysis of adipokine in blood by immunoassay on microchip, Advances in Biodetection & Biosensors, Berlin, Germany, 10th Mar., 2014/03/10, Germany (Berlin)
 - 14) Obana E., Abe K., Yatsushiro S., Yamamura S., Kataoka M., Application of microchip electrophoresis for the rapid and accurate identification of Plasmodium falciparum substitute for second PCR in nested PCR, Advances in Biodetection & Biosensors, 2014/03/10, Germany (Berlin)
 - 15) 片岡正俊、阿部佳織、八代聖基、山村昌平、循環がん細胞検出用細胞チップの開発、LS-BT 合同研究発表会、2014/02/18、茨城県
 - 16) 山村昌平、八代聖基、片岡正俊、血中循環がん細胞の検出を目指した細胞チップの開発、産総研本格研究ワークショップ(四国)、2013/11/12、愛媛県
 - 17) 山村昌平、阿部佳織、八代聖基、馬場嘉信、片岡正俊、細胞チップを用いた血中循環がん細胞の検出系の構築、日本化学会生体機能関連化学部会バイオテクノロジー部会、第7回バイオ関連化学シンポジウム、2013/09/28、愛知県
 - 18) Biju Vasudevan Pillai, Edakkattuparambil Sidharthan Shibu, 杉野 紗貴子、kenji Ono、Hironobu Saito、山村 昌平、脇田 慎一、Yoshio Nosaka、Makato Sawada、Photouncaging nanoparticles for bioimaging、2013 光化学討論会、2013/09/13、愛媛県
 - 19) 片岡正俊、山村昌平、プラスチック製マイクロチップ基板を用いた血中バイオマーカー測定法の構築、第62回日本医学検査学会(招待講演)、2013/05/19、香川県
 - 20) 山村昌平、八代聖基、阿部佳織、MawThet、馬場嘉信、片岡正俊、細胞チップを用いた血中循環がん細胞の検出技術の開発、日本化学会第93春季年会、2013/03/22、滋賀県
 - 21) Yatsushiro S., Yamamura S. Kataoka M., Rapid and high sensitive detection system for malaria parasite using a cell microarray chip, PITTCON2013, 2013/03/17, USA (Philadelphia(PA))
 - 22) 山村昌平、八代聖基、片岡正俊、血中循環がん細胞の検出を目指した細胞チップの開発、産総研本格研究ワークショップ(四国)、2013/01/29、香川県
 - 23) 八代聖基、山村昌平、片岡正俊、200万分の1の感染を見出しマラリアに立ち向かう、産総研本格研究ワークショップ(四国)、2013/01/29、香川県
 - 24) 片岡正俊、阿部佳織、山村昌平、八代聖基、プラスチック製マイクロチップ基板での血中アディポカイン測定と糖尿病診断への応用、第25回バイオエンジニアリング講演会、日本機械学会、2013/01/10、茨城県
 - 25) Yamamura S., Yatsushiro S., Abe K., MawThet M., Baba Y., Kataoka M., Cell microarray chip for accurate detection of circulating tumor cells, International Joint Symposium on Single-Cell Analysis (The 6th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis & The 8th International Forum on Post-Genome Technologies) (SCS 2012), 2012/11/27, Japan (Kyoto)
 - 26) 山村昌平、八代聖基、片岡正俊、血中循環がん細胞の検出を目指した細胞チップの開発、産総研オープンラボ 2012、2012/10/25、茨城県
 - 27) 山村昌平、八代聖基、片岡正俊、血中循環がん細胞の検出を目指した細胞チップの開発、徳島ビジネスチャレンジメッセ 2012、2012/10/11、徳島県
- 〔図書〕(計 4件)
- 1) 山村昌平、日本生物工学会、細胞チップによる単一細胞解析と診断技術、生物工学会誌「バイオメディア」、91、2013、583
 - 2) 山村昌平、八代聖基、片岡正俊、電気化学会・化学センサ研究会、細胞チップを用いた新規診断技術の開発、「Chemical Sensors」化学センサ、28、2012、161-166
 - 3) 片岡正俊、八代聖基、山村昌平、丸善出版、マイクロチップを用いたバイオマーカー解析、タンパク質分析、2012、258-270
 - 4) 山村昌平、産総研、がんの早期診断法を開発、産総研 TODAY、12、2012、10 11

〔産業財産権〕

出願状況(計 9件)

名称：マイクロチャンバーアレイプレート、及び当該プレートを用いた細胞同定方法
発明者：山村昌平、八代聖基、片岡正俊
権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2014-191129

出願年月日：2015年3月4日

国内外の別：国内

名称：細胞内の核酸の解析方法ならびにそのためのシステムおよびキット

発明者：荒木淳吾、増淵茉奈美、山村昌平、八代聖基、片岡正俊

権利者：コニカミノルタ、産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2014-191129

出願年月日：2014年7月3日

国内外の別：国内

名称：懸濁液の移送方法

発明者：松本修一郎、赤木良教、野村茂、山村昌平、片岡正俊

権利者：積水化学工業、産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2014-115079

出願年月日：2014年6月3日

国内外の別：国内

名称：粘着剤組成物、細胞支持用基材、細胞培養用基材、並びに、細胞の培養方法

発明者：赤木良教、松本修一郎、野村茂、鹿毛崇至、河野隆昌、片岡正俊、山村昌平

権利者：積水化学工業、産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2014-106249

出願年月日：2014年5月22日

国内外の別：国内

名称：細胞の剥離方法、細胞支持用基材、細胞培養用基材、並びに、細胞の培養方法

発明者：赤木良教、松本修一郎、野村茂、伊豆本義隆、山村昌平、片岡正俊

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2013-273283

出願年月日：2013年12月27日

国内外の別：国外

名称：マイクロアレイチップ及び該チップを用いた細胞解析方法

発明者：山村昌平、八代聖基、片岡正俊

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2013-182984

出願年月日：2013年9月4日

国内外の別：国内

名称：細胞展開用マイクロチャンバーチップの製造方法

発明者：星久美子、荒木淳吾、山村昌平、八代聖基、片岡正俊

権利者：コニカミノルタ、産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2012-149406

出願年月日：2012年7月3日

国内外の別：国内

名称：細胞展開用マイクロチャンバーチップ

発明者：星久美子、荒木淳吾、山村昌平、八代聖基、片岡正俊

権利者：コニカミノルタ、産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2012-149407

出願年月日：2012年7月3日

国内外の別：国内

名称：細胞展開用デバイスおよび希少細胞の検出方法

発明者：荒木淳吾、星久美子、山村昌平、八代聖基、片岡正俊

権利者：コニカミノルタ、産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2012-149405

出願年月日：2012年7月3日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 昌平 (YAMAMURA Shohei)

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究員

研究者番号：50432141

(2) 研究分担者

なし

()

(3) 連携研究者

なし

()