

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710135

研究課題名(和文) 生体に学び・生体を凌駕する超高性能細胞分離・非標識検出法の創成

研究課題名(英文) Development of high performance cell separation and label-free cell detection methods by biomimetic methods

研究代表者

岡本 行広 (Okamoto, Yukihiro)

大阪大学・基礎工学研究科・講師

研究者番号：50503918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：従来法では、非侵襲的な循環腫瘍細胞(circulating tumor cell: CTC)の分離・同定は不可能であった。しかし、今回の研究により非侵襲的かつ簡便なCTCの分離同定の可能性を見出すことに成功した。このことで分離・増殖させたCTCを利用した医学研究の推進が期待される。さらに、細胞分離手法を改良することで細胞分離および細胞内分子(DNA, RNA)の抽出を可能とする手法の開発に成功した。本手法では細胞の回収および細胞内分子の抽出が簡便でありサンプルロスの抑制も期待できる。このため本手法はCTCのような希少細胞の分離・細胞内分子の抽出に適した手法になりうると期待できる。

研究成果の概要(英文)：I successfully developed less-invasive and easy cell separation, and label-free cell detection methods for circulating tumor cells (CTCs). Because current methods have severe damage on cells and require troublesome procedures in cell separation and detection, present results would make it possible to accelerate medical research about CTCs by separation and culturing CTCs. Furthermore, for improving cell separation method and an extraction process for intracellular molecules such as DNA and RNA, a new combined method was developed for cell separation and extraction. This developed method makes it easy to collect cells and extract intracellular molecules such as DNA and RNA, and would decrease sample loss during extraction. Therefore, a developed method is expected to be applied for cell separation and characterization of rare cells such as CTC.

研究分野：分析化学

キーワード：循環腫瘍細胞 マイクロ流体デバイス 非侵襲分離 非標識検出 抽出

1. 研究開始当初の背景

日本人の大半は悪性新生物(がん)で死亡している。このためがんによる死亡者数低減には、がんの超早期発見およびがんの術後検査が重要であることは言うまでもない。がんの超早期診断および術後検査で期待されているのが血中循環腫瘍細胞(circulating tumor cells: CTC)の分離・計測である。がん患者の血中には CTC の存在が知られおり、CTC の数および遺伝子の解析により腫瘍の部位・大きさ、抗がん剤の適切な選択が可能になると期待されている(*Science* 2011, 331, 1559)。つまり、がんの超早期発見、がんの術後経過観察が採血という低侵襲的な操作で実施可能になる。しかし、CTC の分離・計測で問題となるのは、CTC の数の少なさである。CTC はがん患者の血液 10 mL あたり 10~100 個、言い換えると、血球細胞数 10^9 個あたり数個しか存在しない。このために CTC の分離・計測には高性能分離計測が必要である。現状の分離・計測法では、血中からの簡便な CTC の分離は不可能であり、非常に煩雑な操作および熟練した技師が必要である。また、現状の分離・計測法では CTC の取りこぼしによる擬陰性および血球細胞による擬陽性が問題となっている。今後、CTC の分離・計測ががん診断に応用されるためには、血液中わずか数個の CTC を短時間で簡便に分離・検出を可能とする技術の開発が必須である。これを達成するには従来技術の改良では不可能であり、新たな原理に基づく超高性能な細胞分離・検出技術が求められている。

また、細胞分離後の細胞内分子解析において、DNA や RNA といった細胞内分子の前処理操作の高性能化は細胞内分子解析の成功の鍵を握る。しかし、この前処理操作は煩雑な操作およびこれに伴うサンプルロスが問題となっている。特に CTC のような稀少な細胞ではサンプルロスは後続の解析において致命的である。そこで細胞内分子解析を簡便に実施可能であり、サンプルロスを軽減可能な前処理方法の創成が求められている。

2. 研究の目的

このようにがんの超早期発見およびがんの術後検査を低侵襲的に実施可能とするために CTC の高性能な分離分析手法の確立が重要である。しかし、既存の原理に基づく分離法の高性能化では、臨床で期待される性能に到達することは困難である。そこで、免疫に代表されるような生体の高度な認識システムの一部をマイクロ空間内あるいはマイクロ粒子上に構築し、これらを活用した新たな原理に基づく超高性能な細胞分離法・検出法を創成する。また、細胞内分子の抽出を簡便に実施可能な前処理法を創成する

3. 研究の方法

半導体微細加工技術により Poly(dimethyl siloxane) (PDMS) 製マイクロデバイスを構築する。続いて、血栓形成タンパク質の重合でその内部に対してコーティング処理を施し、血管模倣デバイスを作製する。循環腫瘍細胞は他の血球細胞と比較し、浸潤・転移するためにプロテアーゼを過剰に分泌しており、血栓形成タンパク質との相互作用も強いと期待される。これにより CTC モデル細胞を血球と分離する。さらに、CTC は過剰にプロテアーゼを分泌するため、これと反応し、蛍光を発する試薬をマイクロデバイス内面にコーティングしておくことで、捕捉された CTC の部位に蛍光を観測可能として、CTC の非標識検出を可能とする。

一方で、多数を占める血球細胞のみをあらかじめ分離除去する手法も CTC の分離において有用である。そこで、抗体を結合させた浮上可能なマイクロビーズを作製し、これとモデル細胞を混合し、血球分離除去法の確立を達成する。

また、回収した CTC モデル細胞に対して、細胞内の microRNA 抽出デバイス(図 1)の作製および評価を実施する。microRNA はカオトロピックイオン下でシリカ表面に結合する特徴を有している。そこで、シリカメンブレンを PDMS により挟み込んだデバイスを作製し、これに細胞溶解液、洗浄液、溶離液を送液することで細胞内の microRNA の抽出を可能とする。抽出性能評価は電気泳動および real time PCR により評価する。

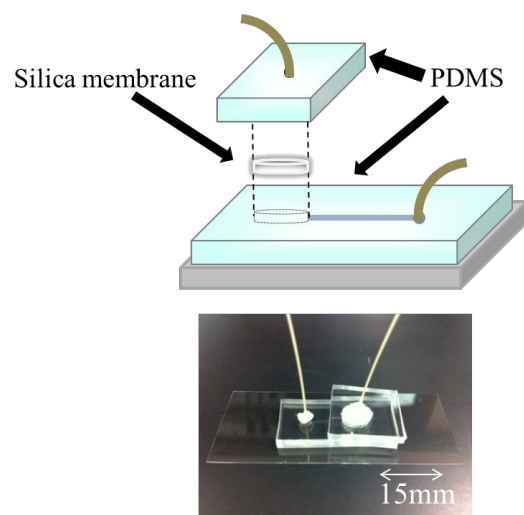


図 1. Micro RNA 抽出デバイス

4. 研究成果

作製した生体模倣マイクロデバイスを用いたところ CTC モデル細胞の捕捉に成功した(図 2)。この際、EpCAM を発現しない CTC モデル細胞も同様に捕捉されたので、従来の EpCAM 抗体を利用する磁気分離法より EpCAM 未発現細胞の分離も可能である点は優位であることを実証した。さらに、このプロテアーゼを過剰に分泌する特性を利用し、プロテアーゼにより開裂および発蛍光特性を有す

る試薬を練りこんでおいた場合には、この CTC モデル細胞 (EpCAM 発現および未発現) に対して、捕捉された位置に蛍光を観測することに成功した (図 2 (b))。一方で血球細胞では蛍光は観測されず、捕捉される数は圧倒的に少ない結果であった。以上より、CTC モデル細胞の濃縮および分離さらに、CTC モデル細胞の非標識検出を可能とする手法の確立に成功した。

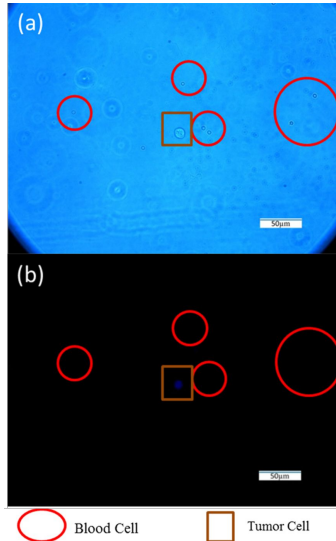


図 2. CTC モデル細胞および血球の蛍光画像。実験条件：マイクロデバイスに CTC モデル細胞および血球を静置後、蛍光観察 (a) 明視野画像、(b) 蛍光画像

一方で、血球の除去法に関しては、抗体を結合した浮遊ビーズの作製に成功した (図 3)。この利用により、モデル細胞では除去率 70-80% および純度 70% で簡便に実施可能であり、しかも血液中でもその性能の低下は観測されなかった。つまりこの結果より本手法は血液のような雑多で粘性の高い試料においても適用可能であると考えられる。

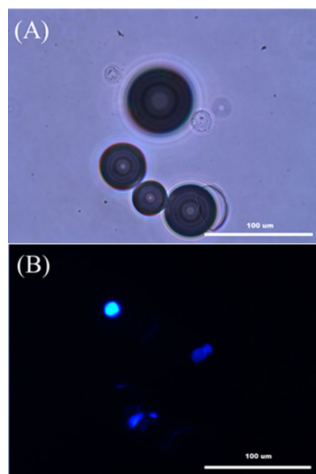


図 3. 抗体結合浮遊ビーズの評価細胞回収後の (A) 明視野画像、

(B) 蛍光画像
細胞：DAPI による核染色

表 1. 細胞分離性能

Sample	Only H1975	Mixture of H1975 and H1299	H1975 suspended in to blood
Collection rate (%)	84 (SD 6.2)	72 (SD 9.5)	62 (SD 5.4)

Sample	Mixture of H1975 and H1299	H1975 suspended in to blood
Purity (%)	78 (SD 4.1)	73 (SD 3.4)

さらに、CTC モデル細胞からの microRNA 抽出の評価を実施した。作製した抽出デバイスは液漏れを生じず、細胞溶解液・洗浄液・溶離液の送液が可能であった。また、細胞溶解液中の microRNA を吸着・洗浄・溶離・回収したサンプルに対して、電気泳動による評価を実施した。その結果、microRNA の存在を確認することに成功した (図 4)。また、real time PCR の結果より、CTC モデル細胞内に存在する microRNA のうち、数種の microRNA の増幅が確認された。以上の結果より、本 microRNA 抽出デバイスにより CTC モデル細胞から microRNA の抽出が可能であると実証した。一方で、本手法では、チューブ接続部、シリンジ接続部などにおいてデッドボリュームが発生し、サンプルロスが問題となることが判明した。また、抽出性能に及ぼす因子としてシリカメンブレンへの送液速度および PDMS 表面への非特異的吸着の抑制ならびにシリカの吸着面積が挙げられることを明らかにした。

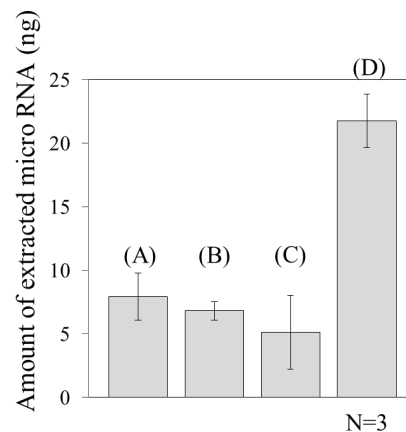


図 4. 抽出 microRNA の定量結果 (A)-(C) 作製した抽出デバイスによる抽出量。送液量：(A) 45 μ l /min, (B) 60 μ l/min, (C) 75 μ l/min ; (D) 市販キット

このような改善点は必要であるが、本手法は簡便に microRNA 抽出デバイスを作製であり、

細胞分離・同定プロセスとの統合が期待できる手法である。

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2件)

Yukihiro Okamoto, Ayato Hibito, Noritada Kaji, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba. Development of a microRNA extraction chip from human tumor cells. *Bunseki Kagaku*, 査読有、64, 2015, 9-13

Kouhei Ootsuka, Yukihiro Okamoto, Tetsunari Hase, Manabu Tokeshi, Noritada Kaji, Yoshinori Hasegawa, Yoshinobu Baba. Development of novel circulating tumor cells separation and non-labeling detection by circulating tumor cells' specific properties. *Micrototal analysis system* 2012. 査読有、1, 2012, 1123-1125

[学会発表](計5件)

岡本 行広、大川 智生、小野島 大介、湯川 博、渡慶次 学、馬場 嘉信、細胞表層改質による単一細胞抽出法の創成、日本分析化学会第63年会、2014年09月17日～2014年09月19日、広島大学東広島キャンパス、(広島県、東広島市)

Yukihiro Okamoto, Tomoki Okawa, Daisuke Onoshima, Hiroshi Yukawa, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba. Single Cell RNA Extraction by Bioinspired Silicification, RSC Tokyo International Conference 2014, 2014年09月04日～2014年09月05日、幕張メッセ(千葉県、千葉市)

岡本 行広、湯川 博、渡慶次 学、馬場 嘉信、簡便な稀少細胞同定・回収方法の創成、日本化学会第94春季年会

2014年03月27日～2014年03月30日、名古屋大学 東山キャンパス(愛知県 名古屋市)

岡本 行広、渡慶次 学、馬場 嘉信、単一細胞解析のためのバイオミメティック細胞表層改質法の創成、第73回分析化学討論会、2013年05月18日～2013年05月19日、北海道大学函館キャンパス(函館市 北海道)

岡本 行広、長谷 哲成、渡慶次 学、長谷川 好規、馬場 嘉信、血中稀少循環腫瘍細胞の簡便・安価な非標識検出法および回収法の創成、日本化学会第93春季年会、2013年03月22日～2013年03月25日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、(草津市、滋賀県)

[図書](計2件)

岡本 行広、加地 範匡、渡慶次 学、馬場 嘉信、PCR内蔵型DNAチップ、「試料分析講座」(丸善)、2015、*in press*

岡本 行広、馬場 嘉信、血中循環がん細胞(CTC)検出によるがん診断、現代化学、2013, 3, 32-36.

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称：細胞分離法
発明者：岡本 行広、大林 桃子、山本 美華、馬場 嘉信
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特願 2013-102557
出願年月日：2013年5月14日
国内外の別：国内

名称：循環腫瘍細胞の検出方法
発明者：岡本 行広、大塚 康平、長谷 哲成、渡慶次 学、長谷川 好規、馬場 嘉信
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特願 2012-181987
出願年月日：2012年8月21日
国内外の別：国内
取得状況(計0件)

[その他]

アウトリーチ活動：

大阪大学基礎工学研究科公開講座、2014
年7月31日
名大サイエンスカフェ、2013年9月27
日

ホームページ等：なし

6．研究組織

(1)研究代表者

岡本 行広 (OKAMOTO Yukihiro)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・講師
研究者番号：50503918

(2)研究分担者

該当者なし ()

(3)連携研究者

該当者なし ()