

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：83205

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350582

研究課題名(和文) Study on microfluidic devices for isolation of circulating tumor cells expressing a variety of surface makers

研究課題名(英文) Study on microfluidic devices for isolation of circulating tumor cells expressing a variety of surface markers

研究代表者

大永 崇 (Ohnaga, Takashi)

富山県工業技術センター・その他部局等・研究員

研究者番号：10416133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌の治療・診断・研究において高い有用性が認められつつある血中循環腫瘍細胞(CTC)を効率よく捕捉する“ポリマーCTCチップ”を開発した。従来このようなデバイスでは癌細胞のEpCAMをターゲットとして捕捉するが、本研究ではEpCAM発現が低いCTCの捕捉を目指し、比較的多くの癌で高発現が見られるEGFRを中心とした他のターゲットによる捕捉を検討した。その結果、抗EGFR抗体としてCetuximabを選択することにより、これまでEpCAMでは捕捉困難だった癌細胞の捕捉を可能とした。

研究成果の概要(英文)：We have developed polymeric microfluidic devices for isolation of circulating tumor cells (CTCs). The device targeted EpCAM expressed on cancer cells and captured them with anti-EpCAM antibody immobilized on the device. However, this device has been known to be of no use for cancer cells expressing little EpCAM and therefore we took account of other targets of cell surface makers and incorporated antibodies against them into the device in this study. Since EGFR is known to be overexpressed in many kinds of cancer, we used anti-EGFR antibodies for the capture. As a result, the anti-EGFR antibody Cetuximab was shown to efficiently capture esophageal cancer cells of KYSE series (EGFR changes from 60,000 to 12,000,000 receptors/cell) despite of low-efficient capture by the other anti-EGFR antibodies used in this study. Cetuximab also captured well breast cancer cells of MDA-MB-231 that is known to hard to capture them with anti-EpCAM antibodies.

研究分野：マイクロ流体デバイス

キーワード：血中循環腫瘍細胞 癌 抗体 EGFR

1. 研究開始当初の背景

癌の組織から血中に侵入し体内を循環する血中循環腫瘍細胞 (CTC) は、癌の治療・診断・研究において高い有用性が認められつつある。CTCは極希薄に存在するため単離は困難だが、表面の上皮性マーカーをターゲットとしその抗体とマイクロ流体デバイスとを組み合わせた“CTCチップ”が、有望な単離デバイスとして提案されている。筆者らは、これまでに新規のポリマー製CTCチップを開発し、実用化を進めてきた (T.Ohnaga et al. Biomed Microdevices: 15,611(2013))。しかし近年のCTC単離研究においては、上皮性マーカーだけでは単離効率が極端に低下する場合は報告されており、その理由が上皮間葉転換 (EMT) から理解されている。

2. 研究の目的

本研究提案では、CTCに関する上記のような新たな知見を取り入れてポリマー製CTCチップを改良し、様々な癌のCTCを確実に単離できるようにすることを目的とする。

3. 研究の方法

CTCチップでは、図1の原理でCTCを捕捉する。すなわち、多数の微細なマイクロポスト (高さ、直径とも 100 $\mu$ m 程度のポストが数万個程度) の間にサンプル (全血など) を流し、マイクロポスト表面に固定した抗体が癌細胞の表面マーカー (=捕捉ターゲット) に結合することで、選択的に細胞を捕捉する。また筆者らのポリマーCTCチップでは、チップ表面の反応性が経時低下しないため、ユーザーが選んだ抗体をいつでも自由に固定することができる (従来のCTCチップでは、表面反応性が短時間で低下するため、抗体の固定はチップ製造時にしか出来ない)。

捕捉ターゲットについては、従来、上皮細胞接着分子 (EpCAM) を選定し、抗 EpCAM 抗体がチップに用いられてきた。しかし本検討では上皮性が低下または消滅したCTCを捕捉

することを目指すので、新たな捕捉ターゲットを検討した。ターゲットの選定基準としては、(1) EpCAM 発現の低下した癌細胞で高発現する、(2) EMTにより発現が低下することがない、(3) 比較的多くの癌で高発現する、とした。この基準のもと捕捉ターゲットを調査したところ、上皮成長因子受容体 (EGFR) を選定したので、本研究では EGFR を中心に検討した。EGFRは大腸癌、肺癌、食道癌、膵臓癌、頭頸部癌、腎癌などにおいて高発現することが知られており、その検討はCTCの臨床応用面からも有意義であると考えられる。

実験的検討では、ポリマーCTCチップにターゲットマーカーに対する抗体を固定し、そこにターゲットマーカー発現が既知の癌細胞株を流し、細胞捕捉効率を測定した。またEGFRの検討では、異なる抗EGFR抗体、EGFR発現の異なる細胞株を使用し、それらの変化が捕捉に及ぼす影響についても検討した。また食道癌臨床検体からのCTC捕捉を、富山大学倫理委員会の承認を得て、富山大学第2外科において実施した。

4. 研究成果

(1) CTC捕捉システムの改良

本研究ではCTCの臨床応用推進のために、CTC捕捉システムの改良も行った。シンプルで低コストなシステムの提供を目指して次の2つのタイプを開発し、本研究でも使用した。



図2 標準捕捉システム

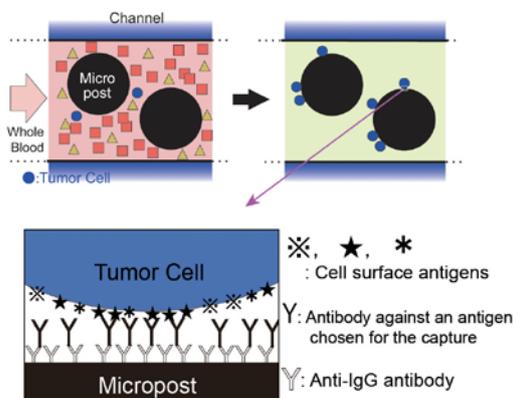


図1 ポリマーCTCチップの捕捉原理

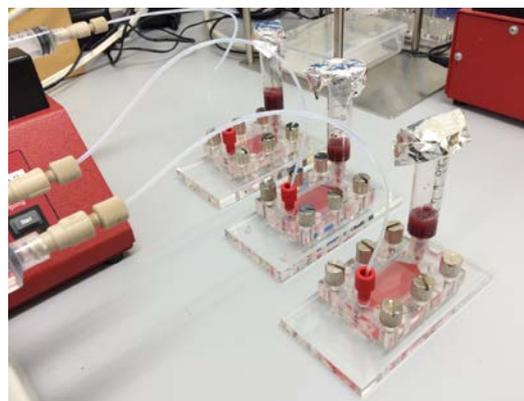


図3 簡易捕捉システム

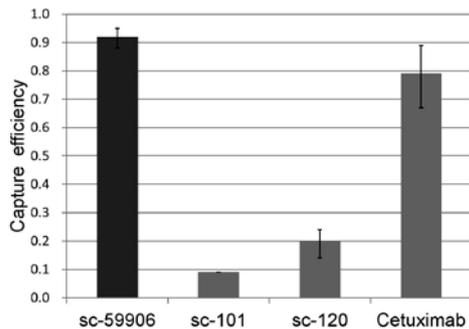


図4 KYSE220 の捕捉効率

a. 標準捕捉システム

細胞懸濁液、全血、血液分画を使用した試験を迅速かつ簡単にできるように、図2のシステムを開発した。シリンジポンプ、サンプル振とう機などからなり、チップへのサンプル送液、その後の洗浄・細胞染色などの一連の操作をバルブ切換えで出来るようにした。

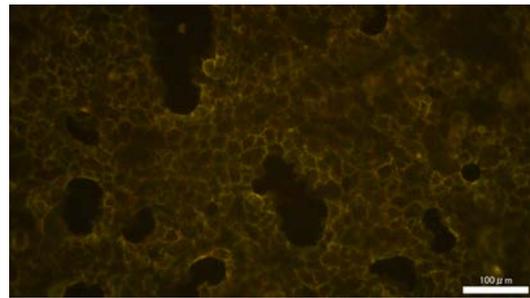
b. 簡易捕捉システム

臨床現場ではほとんどが全血を使用した試験となることが予想されるため、それに向けた捕捉システムを開発した。試験時間短縮、消耗品の削減、さらなる操作の簡略化、などが求められるため、それに合わせた改良を行った。その結果、サンプル供給部を備えたチップホルダーとシリンジポンプからなる極めてシンプルなシステムを開発した(図3参照)。操作が単純で複数サンプルの同時捕捉も可能である。

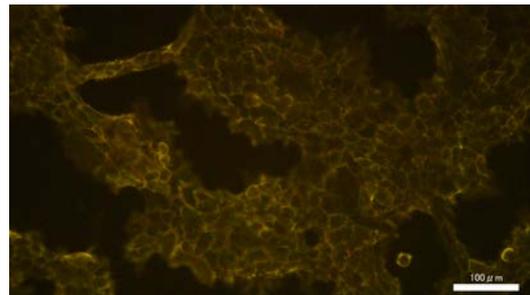
上記2つのシステムは既にキット化し商品化しており、チップと共に購入して広くユーザーテストが可能である。

(2) EGFR と EpCAM による癌細胞捕捉

EGFR 発現が既知の食道癌細胞株 KYSE220 (EGFR: 13 万/cell) を、3 種類の抗 EGFR 抗体 (sc-101 および sc-120 (Santa Cruz Biotechnology), Cetuximab (Bristol-Myers Squibb)、何れも細胞外ドメインのエピトープに対応) および抗 EpCAM 抗体 (sc-59906 (Santa Cruz Biotechnology)) で捕捉した時の捕捉効率 (Capture efficiency: チップに捕捉された細胞数/チップに流入した細胞数) を図4に示す。従来の EpCAM をターゲットとした捕捉では、抗体の種類によらず EpCAM 高発現の細胞はよく捕捉されることが知られているが、本検討においても KYSE220 は良く捕捉された (KYSE220 の EpCAM 発現は図5 (a) のとおり高い)。一方、EGFR による捕捉では、3 種類の抗体で捕捉効率が大きく異なり、Cetuximab で効率よく捕捉された。また KYSE220 を sc-59906 または sc-120 で免疫蛍光染色したところ (蛍光標識抗体は同じ Cy3 goat anti-mouse IgG を使用)、図5の写真を得た。これの結果は、蛍光標識では同等に結合する抗体であっても、本チップでの利



(a) sc-59906 による EpCAM 染色像



(b) sc-120 による EGFR 染色像

図5 KYSE220 の免疫蛍光染色像

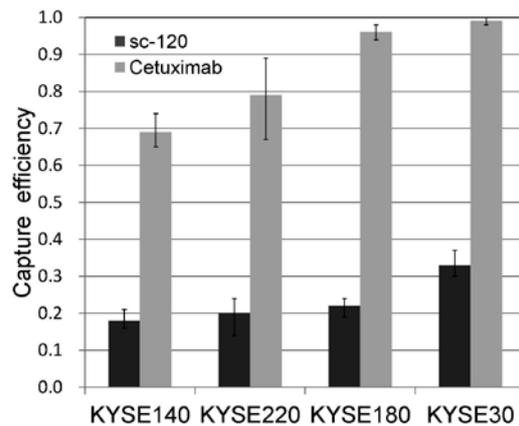


図6 EGFR 発現の異なる癌細胞の捕捉

用のようにそれらを固体表面に固定した時は、結合が変化する(→細胞捕捉率が変わる)ことを示唆すると考えられる。

(3) EGFR 発現が異なる癌細胞の捕捉

KYSE220 に3種類のEGFR発現が異なる食道癌細胞株 (KYSE140 (EGFR: 6 万/cell), KYSE180 (EGFR: 60 万/cell), KYSE30 (EGFR: 1200 万/cell)) を加え、sc-120 および Cetuximab で細胞捕捉率を測定した(図6)。EGFR 発現が200倍程度変化(6万→1200万)したのに対し、捕捉率はわずかに上昇する結果が得られた。このことは、チップ上の捕捉抗体分子数(密度)があまり多くなく、発現の低い細胞で既に抗原-抗体の結合が飽和してしまったことを示すと思われる。チップ性能改良の点からは興味深い知見である。ま

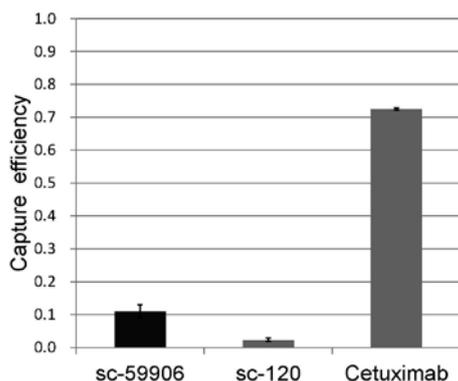


図7 MDA-MB-231 の捕捉効率

た、本チップの捕捉性能の限界を考えたとき、抗体を選択すれば数万/cell 程度の発現があれば細胞を捕捉できることを示唆する結果であると思われる。

#### (4) EpCAM 発現が極めて低下した癌細胞の捕捉

以上の結果をもとに、EpCAM 発現が極めて低いことが知られている乳癌細胞株 MDA-MB-231 (1,700/cell の報告がある) の捕捉を試みた。各抗体を用い測定した捕捉率を図7に示す。従来の結果と同様に抗 EpCAM 抗体 (sc-59906) ではほとんど捕捉できないが、抗 EGFR 抗体では Cetuximab により効率よく捕捉できることが分かった。MDA-MB-231 の EGFR 発現については既に幾つかの報告があり、10万/cell 以上の発現はあるようなので、上記 KYSE220 の結果から考えると妥当な捕捉結果であると言える。

#### (5) EGFR による食道癌の CTC 捕捉

以上の細胞株の検討結果をもとに、Cetuximab による食道癌臨床検体の CTC 捕捉を試みた。現在も捕捉検討を継続しており、既に CTC と考えられる細胞を全血から捕捉している (図8参照)。

#### (6) 他のターゲットマーカーによる癌細胞の捕捉

これまでに MDA-MB-231 の抗 CD318 抗体による捕捉、神経芽腫細胞 (NB16、NB69) の抗 CD47 抗体による捕捉、などについて検討しているが、効率よく捕捉できる抗体を見い出すには至っていない。

### 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)

①長田拓哉、大永崇、呂曉龍、渡辺徹、平野勝久、奥村知之、塚田一博、新規血中浮遊癌細胞 (CTC) 捕捉システムによる乳癌患者末梢血液中の CTC 同定と抗癌剤感受性予測、

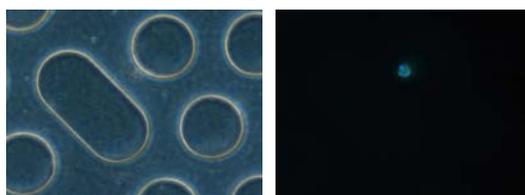


図8 食道癌臨床検体から捕捉した CTC

癌と化学療法、査読有、42: 1240-1242, 2015、URL:<http://ccpgan.com/article/20151015-80>

②Ohnaga T, Shimada Y, Takata K, Obata T, Okumura T, Nagata T, Kishi H, Muraguchi A, Tsukada K, Capture of esophageal and breast cancer cells with polymeric microfluidic devices for CTC isolation, Molecular and Clinical Oncology, 査読有、4: 599-602, 2016、DOI: 10.3892/mco.2016.734

[学会発表] (計 3件)

①大永崇、嶋田裕ほか Effect of cell surface marker on capture efficiency of polymeric microfluidic devices for CTC isolation、第 72 回日本癌学会学術総会 2013. 10. 3、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

②大永崇、嶋田裕ほか Capture of cancer cells expressing EGFR with polymeric microfluidic devices for CTC isolation、第 73 回日本癌学会学術総会 2014. 9. 26、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

③横堀武彦、大永崇ほか Circulating tumor cytology by new CTC chip might be a diagnostic powerful tool in neuroblastoma、第 74 回日本癌学会学術総会 2015. 10. 9、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2件)

名称: 微小体の封入、回収方法及びそれに用いられる封入液体

発明者: 大永崇

権利者: 富山県

種類: 特許

番号: 特願 2014-31578

出願年月日: 2014年2月21日

国内外の別: 国内

名称: 細胞を分離する方法及び装置

発明者: 高田耕児、大永崇、小幡勤

権利者: 富山県

種類: 特許

番号: 特願 2016-077717

出願年月日: 2016年4月8日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ

[https://www.researchgate.net/profile/Takashi\\_Ohnaga](https://www.researchgate.net/profile/Takashi_Ohnaga)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大永 崇 (OHNAGA TAKASHI)

富山県工業技術センター・中央研究所・研究員

研究者番号：10416133

### (2) 研究分担者

塚田 一博 (TSUKADA KAZUHIRO)

富山大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号：90171967

嶋田 裕 (SHIMADA YUTAKA)

京都大学・薬学研究科・客員教授

研究者番号：30216072

### (3) 連携研究者

岸 裕幸 (KISHI HIROYUKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号：60186210

小幡 勤 (OBATA TSUTOMU)

富山県工業技術センター・中央研究所・研究員

研究者番号：30416143

高田 耕児 (TAKATA KOUJI)

富山県工業技術センター・機械電子研究所・研究員

研究者番号：40530621