

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26461974

研究課題名（和文）定量位相顕微鏡を用いた新規CTC（血中循環腫瘍細胞）検出器の開発

研究課題名（英文）Label-free imaging identification of cells using quantitative phase microscopy for negative selection of Circulating Tumor Cells

研究代表者

川端 俊貴（Kawabata, Toshiki）

浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教

研究者番号：90402289

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）： 定量位相顕微鏡は細胞を染色することなく、数nmの高い分解能で観察することができる。健康人白血球、4種類の消化器癌細胞株を定量位相顕微鏡で観察し、得られた画像から特徴量を抽出して画像認識システムへ学習させ、白血球を識別するためのアルゴリズムを作成した。これを用いて白血球を癌細胞株から選別できるか検討しROC曲線を作成すると、AUC=0.99と高い精度で選別することができた。定量位相顕微鏡での撮影は当初は静止状態で行っていたが、現在は細胞を流しながら撮影することが可能となった。

研究成果の概要（英文）： We observed WBCs and five cell line cells flowing in the chamber by quantitative phase microscopy (QPM) that provides quantitative morphological information with high contrast without staining. Then, we extracted certain features from the obtained images as training data for pattern recognition, and created an algorithm to differentiate WBCs from cell lines. The obtained algorithm successfully differentiated WBCs from cell lines (AUC=0.99). Our label-free, non-cytotoxic cell recognition method based on the features of QPM images has the potential to serve as a novel method for cell recognition and negative selection of circulating tumor cells (CTCs).

研究分野：消化器外科

キーワード：血中循環腫瘍細胞

1. 研究開始当初の背景

CTC: Circulating Tumor Cells (血中循環腫瘍細胞)とは、原発腫瘍組織または転移腫瘍組織から遊離し血中へ浸潤した細胞と定義される。固形癌患者の末梢血中に微量存在して他部位への転移能を有している細胞を含んでいると考えられ、近年注目を浴びている。がんの死因の約90%は原発巣から他臓器への転移に起因しているが、腫瘍細胞塊から血管内へ浸潤する癌細胞の大半は自己免疫系により死滅するものの、その内ごく少数が免疫系の攻撃をすり抜けCTCとして血液内を循環し、転移巣を形成すると考えられている。

しかし血液中のCTCはその数が非常に少なく、抹消血の有核細胞 $10^6 \sim 10^8$ あたり1個の割合しか存在しないため、その検出は困難とされている。現在までに様々な検出方法が試され、大きさ・密度・電荷等の物理的特徴を利用したもの、細胞表面マーカー等の生物学的特徴を利用したもの等、2012年の時点で50種類以上のCTC同定方法が報告されている。(Clin. Chemistry 2013; 59(1):110-118)

これらの検出方法のうち、現時点で最も利用され米国FDAの認可も受けているものとしてVaridex社のCellSearchSystemTMがある。CellSearchSystemは細胞表面に発現している上皮系マーカーであるEpCAMに対する抗体を磁気で標識して選別し、得られた細胞のうちDAPIで染色され、CD45で染まらない細胞をCTCとしてカウントしている。このCellSearchSystemで得られたCTCの数が患者の予後と相関することが、乳癌(J Clin Oncol 2005; 23:1420-1430 図1)、結腸・直腸癌(J Clin Oncol 2008; 26:3213-3221 図2)、前立腺癌の患者において示されている。

図1

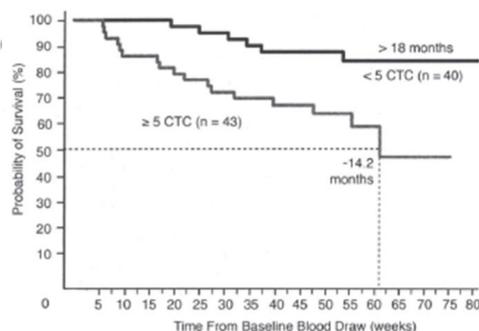
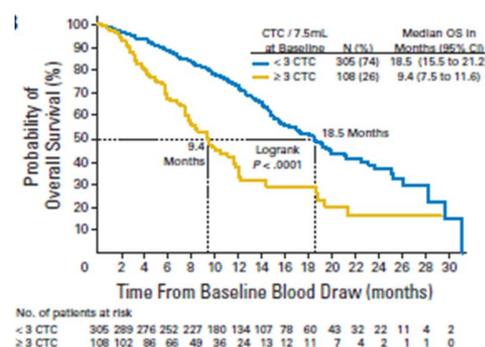


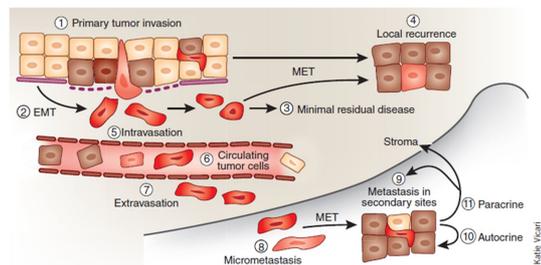
図2



一方で、CellSearchSystemで得られたCTCの中に、VimentinやN-cadherinといった間葉系マーカーも発現している細胞が含まれていることが報告され、一部のCTCでは上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transitions: EMT)を起こしていることが示唆された(Mol Cancer Res 2011; 9(8):997-1007)。EMTは、上皮細胞がその極性組織化や細胞間結合等の上皮特異性を失い、細胞骨格や細胞形の変化を受け、間葉系の特徴を獲得し、遊走性および浸潤性になる基本的な細胞プロセスのことである。癌細胞においてEMTを起こした細胞は上皮系マーカーの発現低下・間葉系マーカーの上昇を来し、低分化型の形態となり、浸潤性の強い悪性度の高い癌細胞の特徴をもつようになるとされる。実際、浸潤能が高い低分化型の癌細胞や、再発や転移した癌、あるいは抗癌剤に耐性の癌細胞ではEMTを誘導する転写因子の発現が高く、高分化の癌細胞ではこれらの転写因子の発現が低いことが報告されている(J. Clin. Invest 2009; 119:1420-1428)。

これらを踏まえると、全CTCのうち、EMTを起こした一部のCTCが転移の形成により強く関与していると考えられる(Nature Med 2011; 17(9) 図3)。

図3



一方で完全にEMTを起こしたCTCでは上皮系マーカーであるEpCAMの発現が低下しており、CellSearchSystemでは検出することができない。このように、CellSearchSystemを含め従来行われてきたCTCの検出方法の多くは上皮系マーカーによって選別しているため、CTCの中でも特に重要な細胞集団を検出できていない可能性が考えられる。そこで、EpCAM等の表面マーカーに依らない新たなCTCの検出方法が望まれる。

2. 研究の目的

従来の検出方法は、CTCで発現していると予想される表面マーカーを指標にpositive selectionによりCTCの候補を選別している。しかしCTCの特徴について全てが解明されていない現時点において、この方法ではCTCを漏れなく回収することは難しい。そこで我々は従来とは異なる手法を用いて細胞を評価し、negative selectionをかけてCTCの候補を選別する方法の開発を目指す。

浜松ホトニクスでは定量位相顕微鏡(Quantitative Phase Microscopy: QPM)とい

う装置を用いて、細胞を染色せずに詳細に観察することができる。物質には屈折率×距離で定義される光学的厚み(位相値)があり、定量位相顕微鏡では細胞のある断面における位相値の積分値が得られる。細胞におけるこの位相値の分布(QPM 画像)から、画像認証システムを用いてその特徴量を抽出し、それによって細胞を選別する手法の開発を進める。

3. 研究の方法

健常人白血球・各種癌細胞における QPM 画像の特徴を解析した。健常人の血液から Ficoll を用いて抽出した白血球、5 種類の消化器癌 cell line について、それぞれ定量位相顕微鏡にて観察を行った(白血球: 図 4、cell line: 図 5)。そこで得られた QPM 画像(白血球 881 個、cell line 51 個)から特徴量を抽出して両者を識別するアルゴリズムを作成した。

図 4

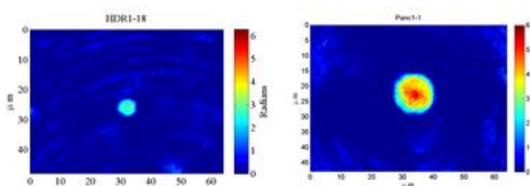
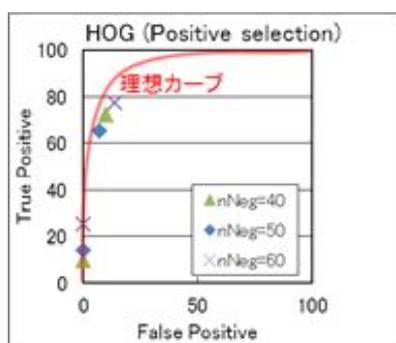


図 5

4. 研究成果

作成したアルゴリズムにより健常人白血球と消化器癌 cell line を選別することが可能であった(ROC 曲線 AUC=0.88 図 6)。この細胞識別装置および方法に関して、浜松トニクスと共同で特許を出願した。(2014.7.29 国内出願・特願 2014-153651、2015.7.23 PCT 出願・PCT/JP2015/071023)

図 6



ま

た、細胞を流路の中を流しながら定量位相顕微鏡で観察するための撮影システムを構築した。現時点では、シーフロー技術を利用して細胞を 1 列に整列させ効率よく撮影することで、約 30 個/秒の細胞を撮影することが可能となった(白血球: 図 7、cell line: 図 8)。また、これらの QPM 画像(白血球 350 個、cell line 350 個)を基に両者を識別するアルゴリズムを作成すると、更に高い精度で選別することが可能であった(ROC 曲線

AUC=0.99 図 9)。

図 7

図 8

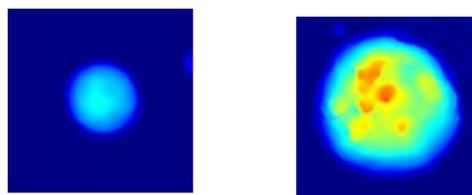
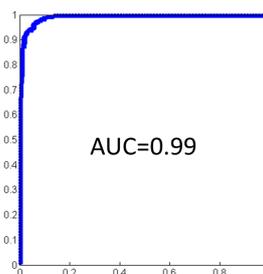


図 9



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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

定量位相顕微鏡と画像認証システムを用いた新たな CTC 検出手法の試み

尾崎裕介、山田秀直、菊池寛利、村上智洋、松本知拓、高橋善明、川端俊貴、平松良浩、太田学、神谷欣志、坂口孝宣、海野直樹、岡崎茂俊、今野弘之

第 116 回 日本外科学会定期学術集会

2016.4.16 大阪国際会議場

Label-free imaging identification of WBCs based on the features of Quantitative Phase Microscope Images for negative selection of CTCs

Yusuke Ozaki, Hidenao Yamada, Hirotohi Kikuchi, Tomohiro Murakami, Tomohiro Matsumoto, Toshiki Kawabata, Yoshihiro Hiramatsu, Manabu Ohta, Kinji Kamiya, Megumi Baba, Toyohiko Yamauchi, Kentaro Goto, Yukio Ueda, Shigetoshi Okazaki, Hiroyuki Konno

American Association for Cancer Research
Annual Meeting 2016
20.16.4.49 New Orleans, USA

定量位相顕微鏡と画像認証システムを用いた新たな血中循環腫瘍細胞検出手法の試み
尾崎裕介、山田秀直、菊池寛利、村上智洋、
松本知拓、川端俊貴、平松良浩、太田学、神谷欣志、岡崎茂俊、今野弘之

第 20 回 日本がん分子標的治療学会学術集会

2016.5.31 別府国際コンベンションセンター

定量位相顕微鏡と画像認証システムを利用した新たな血中循環腫瘍細胞検出手法の試み
尾崎裕介、山田秀直、菊池寛利、川端俊貴、平松良浩、太田学、神谷欣志、坂口孝宣、岡崎茂俊、今野弘之

第 71 回 日本消化器外科学会総会

2016.7.15 徳島、あわぎんホール

Label-free imaging identification of cells using quantitative phase microscopy for negative selection of CTCs

Yusuke Ozaki, Hidenao Yamada, Hirotohi Kikuchi, Tomohiro Murakami, Tomohiro Matsumoto, Toshiki Kawabata, Yoshihiro Hiramatsu, Manabu Ohta, Kinji Kamiya, Takanori Sakaguchi, Hiroyuki Konno.

第 75 回 日本癌学会学術総会

2016.10.7 パシフィコ横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：識別装置および識別方法
発明者：尾崎裕介、岩井秀直、今野弘之、菊池寛利、山内豊彦
権利者：浜松医科大学、浜松ホトニクス

種類：特許
番号：特願 2014-153651
出願年月日：平成 26 年 7 月 29 日
国内外の別：国内

名称：識別装置および識別方法
発明者：尾崎裕介、岩井秀直、今野弘之、菊池寛利、山内豊彦
権利者：浜松医科大学、浜松ホトニクス
種類：特願
番号：PCT/JP2015/071023
出願年月日：平成 27 年 6 月 23 日
国内外の別：国外

取得状況(計 0 件)

〔その他〕(特になし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川端 俊貴 (KAWABATA, Toshiki)
浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教
研究者番号：90402289

(2) 研究分担者

今野 弘之 (KONNO, Hiroyuki)
浜松医科大学・学長
研究者番号：00138033

平松 良浩 (HIRAMATSU, Yoshihiro)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：00397390

菊池 寛利 (KIKUCHI, Hirotohi)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：70397389

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()