

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：83205

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01432

研究課題名(和文) マイクロ流体デバイスによる循環がん細胞除去法の開発

研究課題名(英文) Development of Microfluidic Devices for Circulating Tumor Cell Separation

研究代表者

高田 耕児 (TAKATA, Koji)

富山県産業技術研究開発センター・その他部局等・主任研究員

研究者番号：40530621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：循環がん細胞(CTC)は、がん患者の血液中を流れるがん細胞であり、がんの転移の原因の一つと考えられている。そのため、血液からCTCを分離することができれば、血行性の転移を抑える革新的ながん治療等に繋がる可能性がある。これまでの研究で、Deterministic Lateral Displacement法を利用したマイクロ流路チップを開発し、血液から培養がん細胞を分離できることを示してきた。本研究では、このマイクロ流路チップを利用して、血液から連続的にCTCを分離することのできる簡便なマイクロ流路デバイスと大流量処理が可能なマイクロ流路デバイスの開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで開発してきたマイクロ流路チップをベースに、簡便に、かつ、大量の血液からCTCを分離する方法を開発する研究である。大量の血液からCTCが分離できるようになれば、転移を抑える革新的ながん治療等に繋がると考えられる。また、血液からCTCを分離・回収することもできるため、これまでCTCが希少なため困難であったCTCによる癌の状態のモニタリング、最適な治療法の選択等にも用いることができ、がん医療に多大な貢献ができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor cells (CTC) are tumor-derived cells circulating in bloodstream and could be the origin of lethal metastatic disease. Easy-to-use and high-throughput methods for CTC separation have potential to be used in innovative cancer therapy, next-generation diagnosis, personalized medicine, fundamental metastasis research, etc. In this study, we newly developed a microfluidic device which could easily separate CTCs, and devices which could be used for high-throughput cell separation. These devices were tested using blood sample spiked with cultured cancer cells, and we showed that the devices could successfully separate cultured cancer cells.

研究分野：マイクロ流路チップ

キーワード：循環がん細胞 がん マイクロ流路チップ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん患者の9割は転移がんで死亡すると言われ、多くのがんは転移させなければ予後が良い。そのため転移を抑える方法を開発できれば、化学療法(薬物療法)、放射線療法、免疫療法等とも組み合わせて革新的ながん治療に繋がる可能性がある。また、外科療法(手術)に起因するがん細胞播種ががんの転移を助長する可能性が考えられ、手術後の一定期間転移を抑える方法を実施できれば治療成績向上が期待できる。転移の原因の一つは血液中を循環する循環がん細胞(CTC)である。CTCはがんの原発巣(または転移巣)から遊離して血管に侵入したがん細胞で、その内一部の転移能を有するがん細胞が転移を引き起こす。そのため血液からCTCを除去することができれば、血行性の転移は抑えることができると考えられる。

血液から有害な成分や細胞を除去し再び体内に戻すことは、人工透析や血液浄化療法(アフェレシス)などで既に行われている。例えば潰瘍性大腸炎や慢性関節リウマチの治療では血液中の白血球をフィルターに吸着させて除去する白血球除去療法が用いられている。

しかしながら、がん細胞を血液から除去するという方法についての取組みはこれまでほとんど無い。これは、CTCが非常に希少(CTCは1mL当たり数個~数百個、これに対し赤血球は1mL当たり50億個程度、白血球は1mL当たり500万個程度)であり、CTCを選択的に、しかも大量の血液から除去することは、これまで現実的ではなかったためと考えられる。

2. 研究の目的

がん転移の原因の一つであるCTCを血液から分離して、血行性の転移を抑える革新的ながん治療に繋げるために、血液からCTCを連続的に分離することのできる簡便なマイクロ流路デバイスと大流量処理が可能なマイクロ流路デバイスを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)チップ作製

マイクロ流路チップは、DLDの原理(Huang et al. Science 304, pp987-990, 2004)に基づいて設計した。図1に示すように、流路には一定の規則に基づいて柱が並んでおり、ここに粒子を流すと、小さい粒子は流れの方向に沿って進み、大きい粒子は柱によって流れの方向に沿う進行を妨げられる結果として流れの方向に対し斜めに進む。設計したパターンをフォトマスクを作製し、そのフォトマスクを用いてシリコン基板に塗布したレジストを露光・現像し、そのシリコン基板をICPドライエッチング装置(住友精密工業 MUC-21 ASE-SRE)によりエッチングしてシリコン製鋳型を作製した。次にシリコン製鋳型を用いてチップを射出成形した。チップの流路には微細な柱が林立しており、その柱の間隔は30 μ m、柱の直径は70 μ m、ピッチは100 μ m、柱の高さは50 μ mとした。

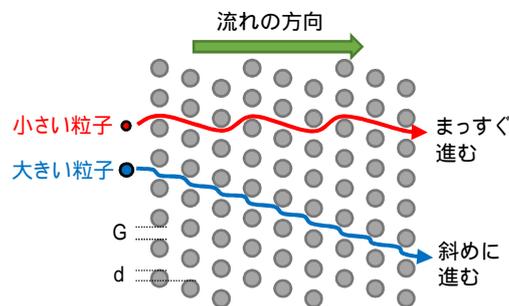


図1 DLDの原理

(2)分離実験

ビーズの分離実験では0.5%BSAを含むPBSに15 μ mのビーズを加えたものを用いた。ビーズはMegabead NIST Traceable Particle Size Standard, 15 μ m (Polysciences)を用いた。

細胞分離実験では、培養細胞として、乳がん由来細胞株であるMDA-MB-231(ATCC HTB-26)およびMCF-7(ECACC 86012803)を使用した。MDA-MB-231は、15%ウシ胎児血清(FBS)および1%ペニシリン/ストレプトマイシン含有L-15培地にて、CO₂非存在下、37 $^{\circ}$ Cで培養した。また、MCF-7は10%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシンおよび1%非必須アミノ酸含有EMEM培地にて、5%CO₂存在下、37 $^{\circ}$ Cで培養した。培養した細胞をトリプシン処理で回収し、CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて蛍光染色したものを実験に用いた。

血液はラットから次のように採取した。Wistar系雄ラット(6-10週齢)を7日間以上予備飼育(飼育条件は温度22-24 $^{\circ}$ C、湿度55-65%、照明サイクル12時間点灯-12時間消灯)し、イソフルラン麻酔下、23G針および2.5mLシリンジを使用して腹部大動脈より採血を行った。得た血液は、抗凝固剤であるEDTA二カリウム塩が添加された真空採血管(テルモ)に3mLずつ注入後、転倒混和したものを実験に用いた。

4. 研究成果

これまで開発してきたマイクロ流路チップとして分離チップと大流量チップがある(図2)。分離チップは、標的細胞(CTC)を含む血液とバッファ液とを一本の流路に流し、標的細胞をバッファ液内に取り出すチップであり、主にサイズ分離性能の評価に用いられる。大流量タイプは標的細胞を含む血液を10本の流路が並列化した流路に流し、標的細胞を除去した除去液と標的細胞が濃縮された濃縮液に分離するチップであり、主にハイスループット分離に用いられる。両方のタイプについてこれまでの課題を克服するための新たなデバイスの開発を行った。

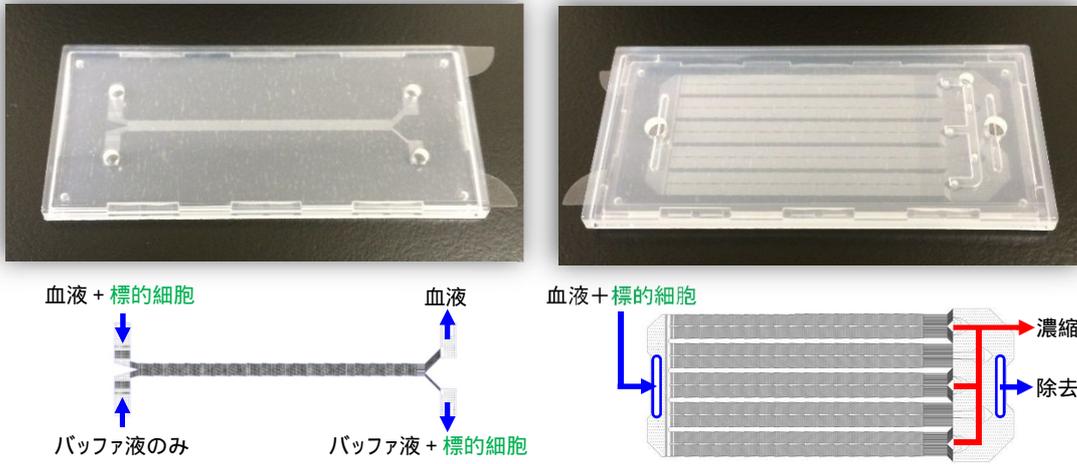


図2 分離チップ(左)と大流量チップ(右)の写真および構造

<分離デバイス開発>

分離チップはこれまでシリンジポンプ等を利用した複雑なシステムで送液しており、サイズ分離性能の評価を効率的に行うために、簡便なデバイスの開発が必要であった。新たに開発した簡便なデバイスを図3に示す。シリンジを手動で操作することで発生した圧力を分岐管でサンプル側の液だめとバッファ側の液だめの両方に分配し、同じ圧でサンプル液(血液+標的細胞)とバッファ液をチップに流す構造となっている。これにより簡便でありながら適切にサイズ分離ができるようになった。表1に、血液を4mM EDTAを含むPBSで2倍希釈したもの、またはバッファ液に、約1000cells/mLとなるように培養細胞を加えたものを試料として分離実験を行った結果を示す。MCF-7については、血液中からの回収率は98.0%、バッファ液中からの回収率は99.2%、血液中から回収した場合の白血球除去率は99.9%以上であり、MDA-MB-231については、血液中からの回収率は94.8%、バッファ液中からの回収率は96.7%、血液中から回収した場合の白血球除去率は99.9%以上と優れた回収率と白血球除去率を示した。

優れた回収率と白血球除去率を示す分離デバイスを開発したことにより、今後サイズ分離性能の評価を効率的に行うことができるようになった。また、このデバイスは後述するように大流量デバイスにおいても応用可能である。

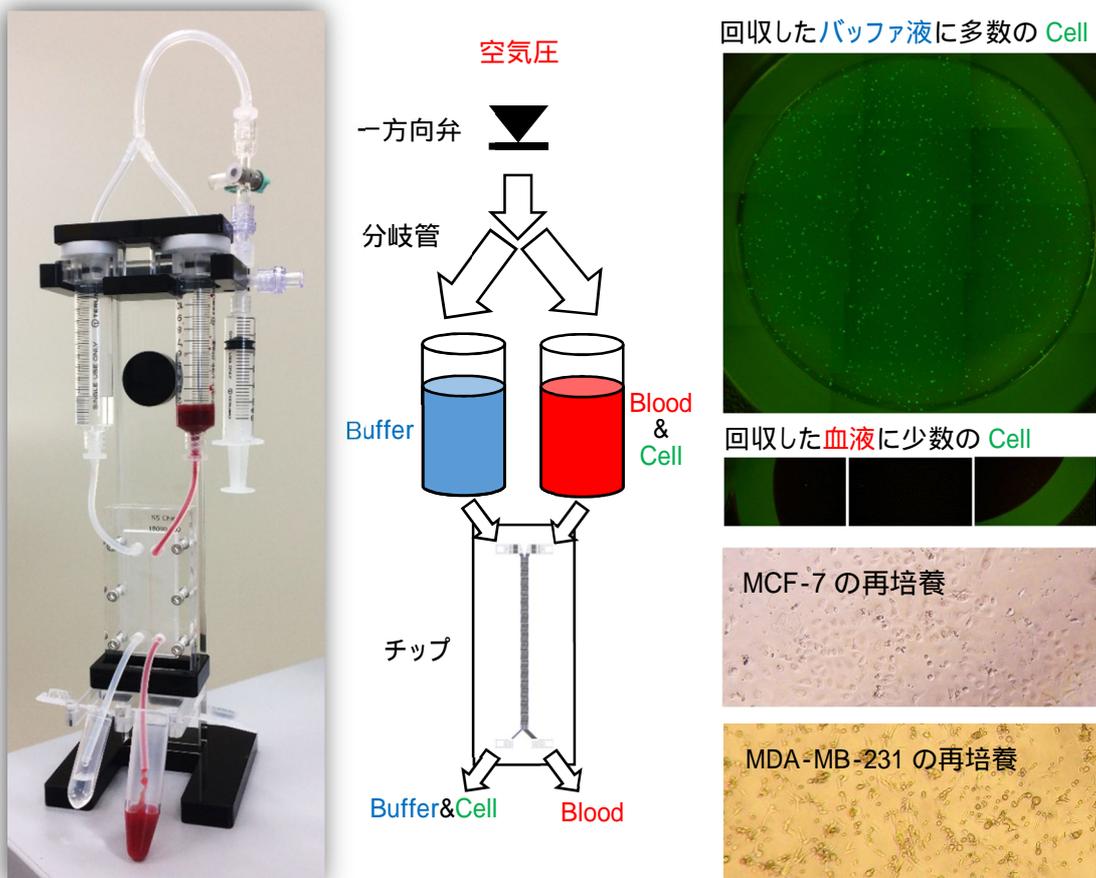


図3 分離デバイスの写真(左)、模式図(中央)、回収した細胞および再培養した細胞の写真(右)

表1 分離デバイスの細胞分離実験結果

Sample		標的細胞(蛍光あり)			白血球(蛍光なし)		
		Large cell fraction (cells) X	Small cell fraction (cells) Y	回収率 (%) $X/(X+Y) \times 100$	Large cell Fraction (cells) Z	白血球除去率 (%) $(1-Z/(5 \times 10^6)) \times 100$	
MCF-7	Blood (rat)	1281	9	99.3	98.0	1035	99.979
		1239	18	98.6		467	99.991
		1029	41	96.2		240	99.995
	Buffer	688	8	98.9	99.2	-	-
		903	5	99.4		-	-
MDA-MB-231	Blood (rat)	909	77	92.2	94.8	1075	99.979
		1002	36	96.5		1169	99.977
		711	32	95.8		859	99.983
	Buffer	528	10	98.1	96.7	-	-
		552	27	95.3		-	-

<大流量チップの性能評価>

まず大流量チップ単体による分離性能を評価した。血液に培養細胞 MDA-MB-231、MCF-7 を混ぜた試料を大流量チップで分離し、濃縮液と除去液に含まれる培養細胞をカウントしたところ、MDA-MB-231 については、濃縮液側は 299 個、除去液側は 2 個であり、99%以上の培養細胞が濃縮液側から回収されること、MCF-7 については、濃縮液側は 93 個、除去液側は 3 個であり、96%以上の培養細胞が濃縮液側から回収されることを確認した。これらのことから、大流量チップは高い回収率で血液から細胞を回収できることがわかった。また、送液時の流速は、2mL/min であり、分離チップの 20 倍程度の速度で血液を処理することが可能であることがわかった。

大流量チップはサンプル液のみが導入される構成であるため、サンプル液とバッファ液の流量調節が必要ないため、流路の並列化が容易であり、さらにチップ自体の並列化が容易であるという大量の血液から CTC を分離するのに適した特徴を持つ。しかし、排出された除去液にはサンプル液(血液)も含まれているため、標的細胞(CTC)の解析が困難であり、また、一定量の血液が除去液として損なわれる(体内に戻すことができない)という問題があり、これらの問題を解決する必要がある。

<大流量デバイスの開発 (ループデバイス)>

大流量チップを利用したデバイスとして、まず、大流量チップから排出される濃縮液を再びインプットに戻して、標的細胞が何度もチップを通るようにループさせて、標的細胞を除いた除去液を排出する構造のデバイスについて検討した(図4)。サンプル液を流した後にバッファ液を流し、その後ループ内の液体を回収することで、標的細胞の回収も可能となる。

チップに気体・気泡が残存した状態では粒子分離性能が損なわれるため、初めにチップに液を満たすプライミングを行う。ループさせずに(回収する場合の経路で)十分に送液した後、ループさせて送液することによりチップ内の気泡を完全に除去することができた。

0.75 個/mL の濃度でビーズを含む液 30mL をループさせて送液した後、ループ内の液を回収してビーズ数をカウントしたところ 24 個であり、ビーズをほぼ完全に回収できること、ビーズを濃縮できることを示した。次に、1.5 個/mL でビーズを含む液 500mL をループさせて送液した。この時、除去液からはビーズがまったく検出されず、ビーズを除去するという用途には十分利用可能であることがわかった。ループ内の液を回収し、回収液内のビーズ数をカウントしたところ 15 個であった。ビーズの濃度を 2 倍、送液量を 25 倍にしたため、50 倍のビーズ、すなわち、1200 個のビーズが回収されるはずが 15 個しか回収できなかった。チップを観察すると、チップのインプット部に多くのビーズが滞留していることがわかった。長い時間ループさせると滞留しやすい場所(流速が遅くなる場所等)に徐々に滞留していくものと考えられる。

同様にラットの血液を送液する実験を行った。ループさせて血液を一定時間流した後、バッファ液を流したところ、血液の一部がループした管路の途中(流速が遅くなる場所等)に滞留して長い時間バッファ液を流しても取り除けないことがわかった(図5)。このことは、例えば CTC が管路に滞留して回収できなくなる可能性を示している。

これらのことから、このデバイスはサンプル中の CTC を除去して、CTC 除去液を得る場合に

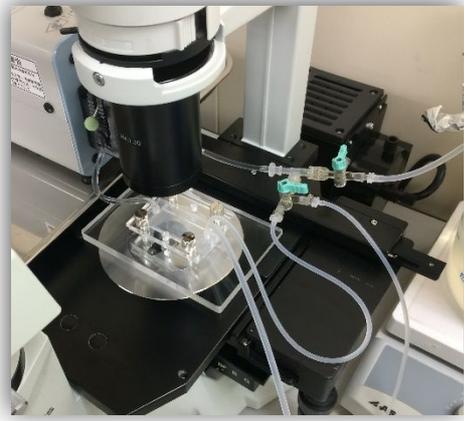
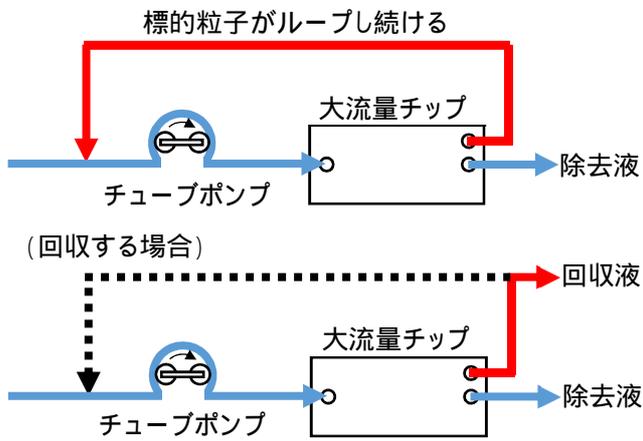


図4 ループデバイスの模式図(左)、写真(右)

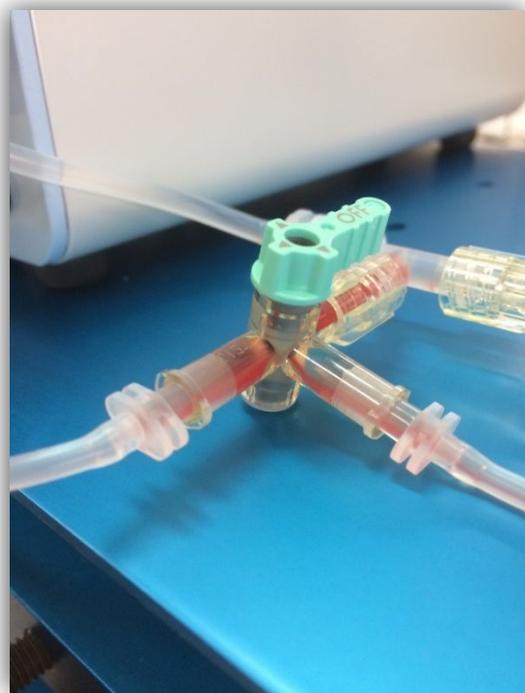
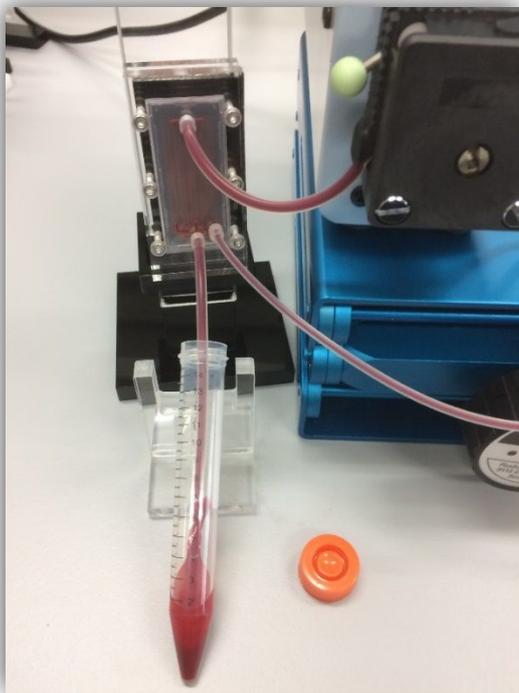


図5 ループデバイスに血液を流した実験の写真(左)、滞留した血液の写真(右)

は十分利用可能であると考えられるが、CTCの回収を考えた場合はロスが大きく、CTCを検査に用いるような用途には適さないと考えられる。

< 大流量デバイスの開発 >

別の方法として、上述した分離デバイス(大流量でないデバイス)を利用する方法がある。大流量チップで血液を濃縮液と除去液とに分離して、それぞれを回収し、その後、回収した濃縮液をサンプル液として分離デバイスに導入し、バッファ液と一緒に流すことで、バッファ液にCTCを取り出す方法である。CTCをバッファ液に取り出すことができるので、その後CTCの解析も行うことができる。また、分離チップから排出される血液はCTCが除去されているので、大流量チップの除去液と一緒に必要であれば体内に戻すこともできる。

大流量チップは流路の並列化およびチップの並列化により大量の血液を処理することができる。大流量チップ内でループする方法と、分離デバイスを併用する方法とを開発したことで、今後大量サンプルを用いた実験ができるようになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bao H, Bai T, Takata K, Yokobori T, Ohnaga T, Hisada T, Maeno T, Bao P, Yoshida T, Kumakura Y, Honjo H, Sakai M, Sohda M, Fukuchi M, Altan B, Handa T, Ide M, Miyazaki T, Ogata K, Oyama T, Shimizu K, Mogi A, Asao T, Shirabe K, Kuwano H, Kaira K	4. 巻 15
2. 論文標題 High expression of carcinoembryonic antigen and telomerase reverse transcriptase in circulating tumor cells is associated with poor clinical response to the immune checkpoint inhibitor nivolumab	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 3061-3067
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2017.7671	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高田耕児
2. 発表標題 低コストCTC分離装置
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松村吉晃、高田耕児、久米健一、別府真広、山下麻由美、杉浦剛
2. 発表標題 SS-Chipを用いたCTCの検出
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横堀武彦、高田耕児、浅尾高行、清水公裕、茂木晃、解良恭一、調憲、桑野博行
2. 発表標題 CTCを利用したニボルマブ感受性マーカーの探索研究
3. 学会等名 癌免疫外科研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松村吉晃、高田耕児、久米健一、別府真広、山下麻由美、東友太郎、杉浦剛
2. 発表標題 マイクロ流体チップによるCTC(circulating tumor cell)の検出
3. 学会等名 第4回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森將鷹、金山雅俊、柴田泰治、米田和恵、高田耕児、田中文啓
2. 発表標題 循環腫瘍細胞分離におけるDeterministic Lateral Displacement(DLD)法を用いたサイズ分離チップの基礎検討
3. 学会等名 第4回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	横堀 武彦 (YOKOBORI Takehiko) (60420098)	群馬大学・未来先端研究機構・准教授 (12301)	
研究分担者	安田 佳織 (YASUDA Kaori) (70707231)	富山県立大学・工学部・講師 (23201)	