

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 1 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560190

研究課題名(和文)安全な自家造血幹細胞移植に向けたハイスルー・ブット残存腫瘍細胞除去法の開発

研究課題名(英文)High-throughput decontamination technology for autologous hematopoietic stem-cell transplantation

研究代表者

合田 圭介(Goda, Keisuke)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70518696

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):白血病などの血液のガンにおける再発を伴わない自家造血幹細胞移植の実現に向けた、高精度で混入腫瘍細胞の除去を行うチップスケールのハイスルーブット混入細胞除去システムの基盤となる光学・マイクロ流体融合技術を開発した。具体的には、マイクロ流体チップ上に高速で流れる細胞を高速光学イメージング及び蛍光測定することにより、リアルタイムかつ高精度に膨大な数の細胞の分類を行う。この技術の開発は、研究代表者が推進中の内閣府革新的研究開発推進プログラム(ImPACT)の「セレンディピティの計画的創出による新価値創造」プロジェクトに吸収され、本研究で予定していたスペックを凌駕する技術を現在開発中である。

研究成果の概要(英文): We developed an optofluidic system for high-throughput screening of a large heterogeneous population of cells based on their morphological and biochemical features. This system is based on an integration of an ultrafast optical imager with a multi-color fluorescence analyzer for simultaneous image- and fluorescence-based evaluation of every single cell in a large population with a high throughput of 10,000 cells/s. This system is expected to be useful for high-throughput identification and removal of cancer cells that contaminate grafts in autologous hematopoietic stem-cell transplantation. This work has been absorbed into the ImPACT program in which a far more advanced system is currently under development.

研究分野：光科学

キーワード：フローサイトメトリー マイクロ流体工学 レーザー 白血病 自家造血幹細胞移植

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植(HSCT)は、造血幹細胞(HSC)を移植することで、ガンや血液の病気の治療に効果的な医療手段のひとつである。特に血液・骨髄のガンと呼ばれる白血病や多発性骨髄腫には有効な治療法である。この場合、まず大量の抗ガン剤投与と大線量の放射線照射により患者のガン細胞を死滅させ、そこに正常なHSCを移植して造血機能を回復させる。このHSCTには多くの合併症が知られており、なかでもドナー(骨髄提供者)と移植対象患者との血液型の不適合による拒絶反応(GVHD)は致命的となるため、非血縁者間のHSCTは非常に難しい。

自家造血幹細胞移植(Autologous HSCT; A-HSCT)は、GVHDを回避して患者の合併症リスクを低減できる有望な技術である。A-HSCTはまず、患者からHSCを摂取後に冷凍保存し、次に化学療法(放射線療法の併用もあり得る)で患者の悪性細胞群を根絶する。このとき破壊された患者の骨髄は造血機能を失う。その後、事前に採取された患者自身の造血幹細胞が患者の骨髄内へ戻され、失われた造血機能が再生する。このように患者自身がHSCドナーとなるA-HSCTでは、免疫機能の回復が早いこと免疫低下による感染症リスクを軽減できるとともに、GVHDもほとんどない。

しかしながら、A-HSCT後のガン再発の症例が多く報告されている。A-HSCTで僅かな混入腫瘍細胞がHSCと共に培養され、HSCグラフト注入後に患者の体内でガンを再発することもあるが、その詳細な過程は不明である。このようにA-HSCTの信頼性・利便性向上には依然大きな課題が残されており、HSCグラフト内の混入腫瘍細胞の定量評価や発ガン性の立証は特に困難を極めている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、チップスケールのハイスループット細胞選別技術(high-throughput screening; HTS)を開発して高精度で混入腫瘍細胞の除去を実現し、ガン再発を伴わないA-HSCTを可能にすることである。具体的には患者より摂取したHSCはマイクロ流体チップへ搬送され、そこでレーザーによる混入腫瘍細胞の識別、破壊、およびふるい分けを陽性選択と陰性選択の二段階に分けて行う。破壊された腫瘍細胞の残骸はマイクロ流路内のマイクロポストアレイによってフィルタリング除去され、HSCグラフトは患者体内へ戻る前に十分に除染される。本研究期間内では提案するHTSの原理検証システムを構築し、本研究完了後に始動する動物実験および臨床試験へ向けた評価を行う

3. 研究の方法

ガン再発を伴わないA-HSCTを可能とする混入腫瘍細胞除去に必要な精度、コスト、スループット、および再現性を実現するためには、本提案技術の主要部分である(1)光学実験系、(2)マイクロ流体チップ、(3)測定機器、(4)電子回路の開発と評価を段階的に行う。具体的には、100,000 cells/sのスループット、1/1,000,000(二段階の合計)の腫瘍細胞検出・破壊精度、および99%以上のHSC収率を目指す。平成25年度では、光学実験系とマイクロ流体チップの設計、作製、および評価を行う。平成26年度の前半では測定機器と電子回路の設計、作製、および評価を行い、後半ではシステム全体の評価を行う。本研究期間内では提案するHTS技術の原理検証システムを構築し、本研究完了後に始動する動物実験および臨床試験へ向けた評価を行う。

4. 研究成果

製作した光学系を図1に示す。Identification Laserによるレーザー光でマイクロ流体中の

細胞に照射し、PMT による蛍光検出により細胞の種類を識別する。PMT からのシグナルを Analyzer で分析し、Ablation Laser の Shutter の開閉を行う。Laser Pointer と Phantom Camera の光学系によりマイクロ流体チップ上の細胞の流れのモニタリングを行う。目的の細胞が検出した際に、Shutter が開き、Ablation Laser がその細胞を破壊のために照射する。破壊された細胞はマイクロポストアレイに向かう。

まず、流路に入れる前にレーザーで細胞を破壊できることを検証した。図2でそれを示す。レーザー光を細胞に照射した際に、熱破壊の効果を向上させるために、細胞の表面に金のナノ粒子をコーティングさせた。その結果、細胞のレーザー破壊に成功した。

図3で Analyzer の電気回路図を示す。PMT から得た信号をリアルタイムで分析し、信号の強度により目的細胞であるかどうかを判別する。

図4でマイクロポストアレイを含んだマイクロ流体チップを示す。図5が示すように、整列化された細胞がマイクロポストアレイに入った際に、図6が示すようにアレイフィルターにより大きな細胞と小さな細胞が分類される。

これらのすべての要素技術を構築し、図1の光学系に組み込むことで、マイクロ流体チップ内で高速に流れる細胞の破壊と分類を試みた。結果として、Ablation Laser の光強度の限界により、目的細胞の破壊の精度が10%以下に留まった。この知見を用いて、今後はレーザー強度の向上およびより効率的に細胞を破壊するシステムの構築を目指したい。

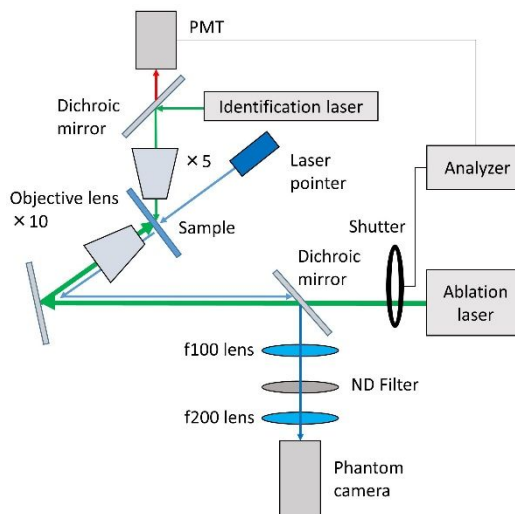


図1：光学系

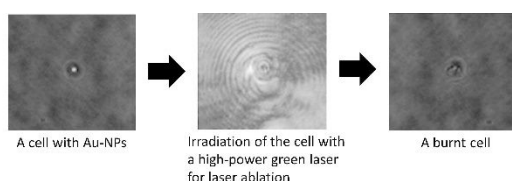


図2：細胞のレーザー破壊

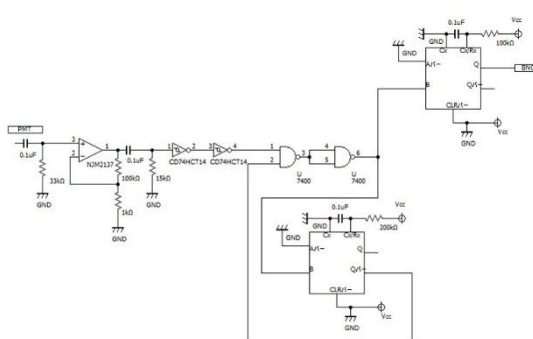


図3：Analyzer の電気回路図

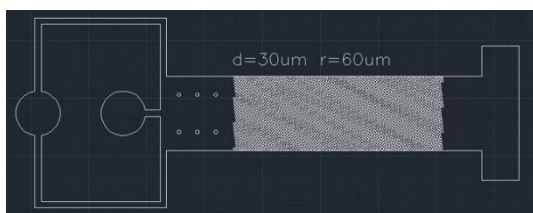


図4：マイクロポストアレイを含んだマイクロ流体チップ

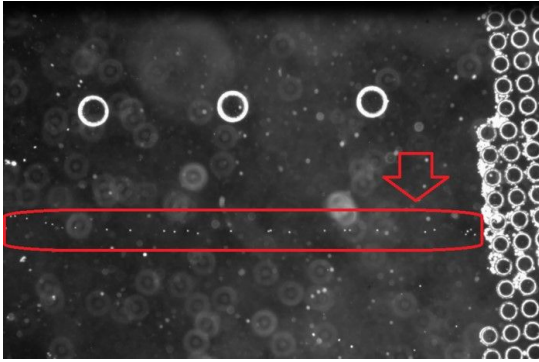


図5：マイクロポストアレイに入射する整列された細胞

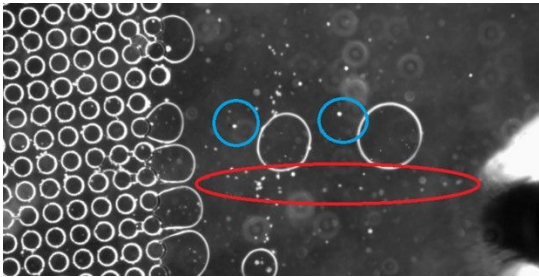


図6：細胞の大きさによる細胞の分類

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：Apparatus and Method for
Image-Activated Cell Sorting

発明者：合田圭介

権利者：合田圭介

種類：特許

番号：PCT/JP2014/80473

出願年月日：2014年11月18日

国内外の別：国内

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

テレビ出演①

NHK「サイエンスZERO」

2015年7月12日

テレビ出演②

BSフジ「革新のイズム」

2015年12月25日

6. 研究組織

(1)研究代表者

合田 圭介 (Goda Keisuke)

東京大学大学院理学系研究科・教授

研究者番号：70518696

(2)研究分担者

山根 大輔 (Yamane Daisuke)

東京工業大学精密工学研究所・助教

研究者番号：70634096

(3)連携研究者()

なし

研究者番号：