

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04929

研究課題名(和文) 血中循環腫瘍細胞の新規検出方法開発と臨床応用

研究課題名(英文) Development and clinical application of a novel method for the detection of circulating tumor cells

研究代表者

今野 弘之 (Konno, Hiroyuki)

浜松医科大学・医学部・学長

研究者番号：00138033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：がんの血行性転移の機序および診断技術の一つとして、血中循環腫瘍細胞(CTC)が注目されている。本研究では、定量位相顕微鏡(QPM)で細胞を染色せずに観察し、細胞形態を機械学習によって識別する技術を用いた、新規CTC検出法の開発を行った。健常人の白血球と消化器癌の細胞株を非染色でQPM観察し、画像解析にて高精度な識別が可能であった。シーフロー技術を用いて細胞を直線化して流すことにより、流路中における細胞のQPM観察に成功し、健常人の白血球と癌細胞株の識別が可能であった。さらに担癌マウスの血液や消化器癌患者さんの血液のQPM観察を行い、CTC候補の細胞集団を検出した。

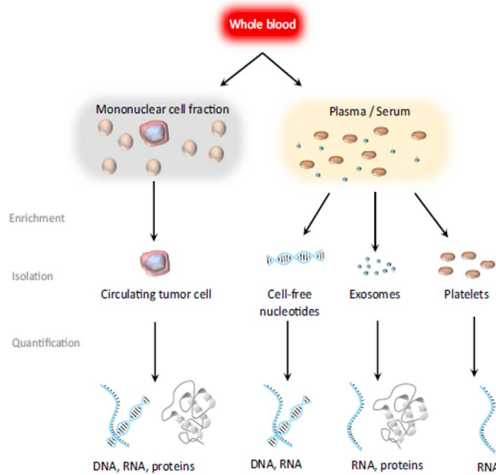
研究成果の概要(英文)：Circulating tumor cells (CTCs) are used as a liquid biopsy target in cancer patients. In this study, we sought to develop a novel CTC detection method using quantitative phase microscopy (QPM) and computer vision technologies for pattern recognition based on the morphological features of live cells. We observed white blood cells (WBCs) and cancer cell line cells by QPM without staining, and successfully differentiated WBCs from cell lines. We applied our image recognition methods to the cells flowing in the chamber, and properly differentiated WBCs from cell line cells flowing in the chamber. Finally, cell fractions suspicious of CTCs were detected in blood samples of tumor bearing mice and cancer patients.

研究分野：消化器外科学

キーワード：循環腫瘍細胞 非染色 蛍光位相顕微鏡 消化器癌

1. 研究開始当初の背景

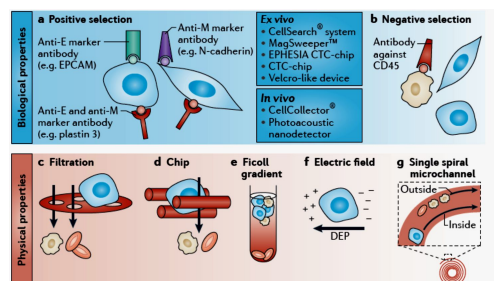
近年の集学的治療の進歩により消化器がんの治療成績は向上したが、さらなる治療成績向上のためには転移・再発の制御や早期診断技術の向上が必要である。がんの血行性転移の機序および診断技術の一つとして、原発または転移腫瘍組織から遊離し血中へ浸潤した血中循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell: CTC) が近年注目されている。



Cancer Cell 28, 2015

固形癌患者の CTC 数は末梢血の有核細胞 $10^6 \sim 10^8$ あたり 1 個程度と非常に少ないため検出が困難であり、現在まで種々の CTC 検出方法が開発されてきた。これまでに最も汎用されている Varidex 社の CellSearchSystem™ は、細胞表面の上皮系マーカー EpCAM に対する抗体で標識して選別し、得られた細胞のうち DAPI で核染色され白血球マーカー CD45 で染まらない細胞を CTC として回収している。その他の既存の CTC 検出方法のほとんどが CellSearchSystem™ と同様に、癌細胞特異的とされる種々の細胞表面マーカーを基に細胞を選別する、いわゆる positive selection による検出手法である。

一方、上皮間葉転換 (EMT) は浸潤能が強く悪性度の高い癌細胞の特徴とされ、近年 CTC にも EMT を起こした細胞が存在し血行性転移において重要な役割を担っていることが示された (Science 339: 580-4, 2013)。この EMT を起こしたがん転移に重要な CTC は EpCAM 等の上皮系マーカーが消失しているため、CellSearchSystem™ 等の細胞表面上皮系マーカーを用いた従来の方法 (positive selection) では検出困難であり、新たな CTC 検出方法の開発が必要とされている。

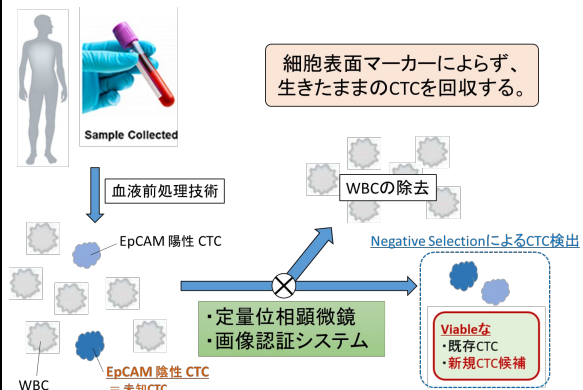


Nat Rev Cancer 14, 2014

従来の positive selection 法に代わる新たな CTC 検出技術として、末梢血中の有核細胞の殆どを占める白血球を除去することで全ての CTC を回収する複数の方法 (negative selection) が提唱されている。その代表が米国の Massachusetts General Hospital で開発された CTC-iChip であり (Sci Transl Med 5: 179ra47, 2013)、流体力学に基づいた赤血球除去と CD45 抗体磁気ビーズを用いた白血球の除去によって上皮マーカーを用いずに CTC 候補を選別する手法である。CTC-iChip は次世代 CTC 検出法として期待されるが、抗体標識された磁気ビーズによる前処理が必要であり、細胞ストレスによる CTC への影響が除外できない。このため、より細胞ストレスの少ない CTC 検出方法の開発が、欧米を中心として行われている。

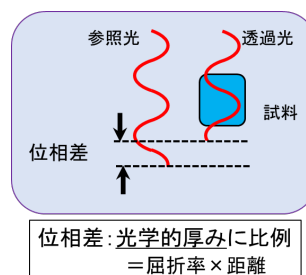
2. 研究の目的

細胞を染色せずに観察し、細胞形態に基づいた識別技術を用いることで、細胞表面マーカー非依存的な negative selection による、全く新しい CTC 検出方法の開発を目的とする。さらに従来法では検出できなかった CTC の生物学的解析の実現を目指す。



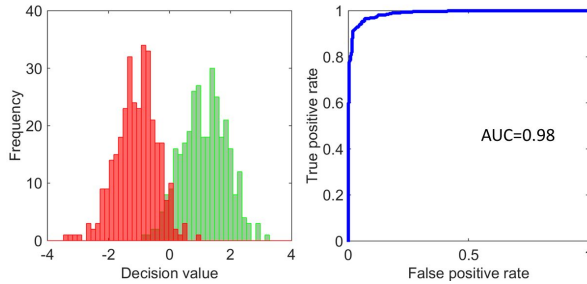
3. 研究の方法

浜松ホトニクス社の定量位相顕微鏡 (quantitative phase microscopy: QPM) を用いることにより、細胞を染色せずに詳細な観察を行った。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、QPM 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、顔認証システムを用いてその特徴量を抽出し、コンピューター解析によって細胞を選別する手法を確立する。



4. 研究成果

健常人白血球 325 個、5 種類の消化器癌 cell line 325 個を QPM 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。得られたアルゴリズムを用いて、白血球と cell line の混合画像からの白血球の選別を試みた。ROC 曲線を作成すると、AUC=0.98 であり高い精度で選別可能であった。



血液前処理の効率化を目指し、既存の Ficoll を用いた遠心分離法と血液分離キットである HetaSep (STEMCELL Technologies) を用いた遠心分離法を用いて有核細胞を分離し、赤血球や血小板などのデブリの混入率を比較したところ、HetaSep 処理法において有意にデブリ混入率が低く、かつ単核球のみならず顆粒球も含む有核細胞層の抽出が可能であり、HetaSep 法の優位性が確認された。

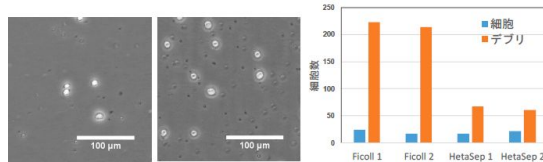


図 1K 血液前処理後のデブリ混入率

(左) Ficoll 処理法 (中) HetaSep 処理法 (右) 定量化

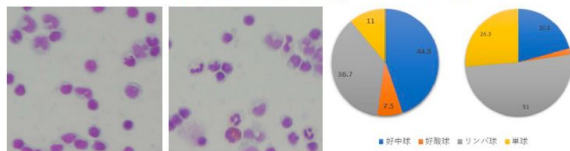
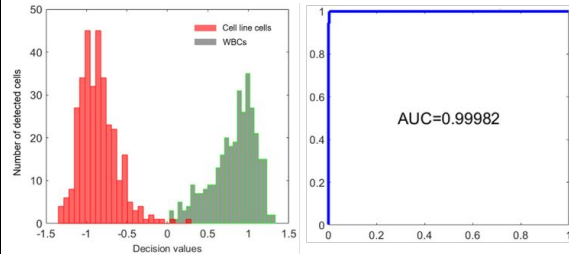
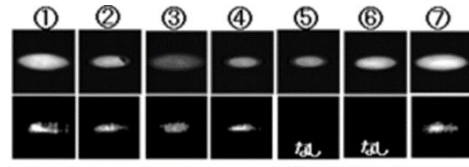


図 2K May-Grunwald-Giemsa 染色
(左) Ficoll 処理法 (右) HetaSep 処理法

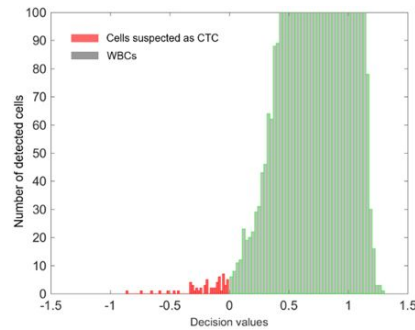
図 3K 白血球分画比率 (%)
(左) 全血 (右) HetaSep 処理法

これまででは静止した細胞の観察に留まっていたが、流路系における QPM 観察を可能とするために測定装置の開発を行い、細胞を装置内で一定の速度で流しながらリアルタイムで QPM 画像を得ることに成功した。さらに、シースフローを用いて細胞を直線化して流すことにより、流路中における細胞の重なりが減り、有核細胞の観察の効率が向上した。

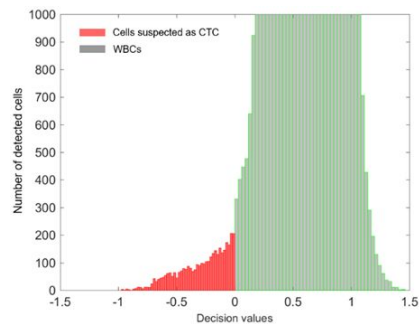
健常人白血球と、GFP を発現させた大腸癌細胞株 (HCT116) とを任意の割合で混合して疑似 CTC モデルを作製し、健常人白血球を positive image の訓練画像として機械学習させた識別器を作成した。この識別器を用いて、流路内を流れる HCT116 と白血球を高精度で識別可能であった (AUC=0.99982)。



次に、ヒト腫瘍マウス移植モデルの実験として、ヌードマウスの白血球を positive image、HCT116 を negative image の訓練画像として機械学習させた識別器を作成し、ヒト大腸癌由来固形腫瘍の担癌マウスの血液より試料を作製し識別させた。その結果、白血球疑が 357,525 個および CTC 候補の細胞が 60 個検出された。



さらに担癌患者での実験として、肺および肝に多発転移のある胃癌患者の血液より試料を作製し、同様に識別器を用いて識別させたところ、白血球が 613,490 個および CTC 候補の細胞が 3,538 個検出された。



これまでの研究により、QPM を用いて細胞を非染で詳細に観察することによって、血液中の白血球とその他の有核細胞 (CTC 候補) を識別可能であることが示された。一方で本技術を臨床応用するためには、より多くの臨床検体の観察のみならず、血液前処理法や流路系、QPM 技術などの改良が必要であり、現在も研究開発を継続中である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 11 件)

発表年月：2015 年 7 月
発表者：尾崎裕介、今野弘之、他
発表演題：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の試み
学会等名：第 70 回日本消化器外科学会総会

発表年月：2015 年 10 月
発表者：尾崎裕介、今野弘之、他
発表演題：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の試み
学会等名：第 74 回日本癌学会学術総会

発表年月：2016 年 4 月
発表者：尾崎裕介、今野弘之、他
発表演題：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(CTC)検出手法の試み
学会等名：第 116 回日本外科学会定期学術集会

発表年月：2016 年 4 月
発表者：Ozaki Y, Konno H, et al.
発表演題：Label-free imaging identification of WBCs based on the features of Quantitative Phase Microscope Images for negative selection of CTCs
学会等名：American Association for Cancer Research Annual Meeting 2016

発表年月：2016 年 7 月
発表者：尾崎裕介、今野弘之、他
発表演題：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の試み
学会等名：第 71 回日本消化器外科学会総会

発表年月：2016 年 10 月
発表者：尾崎裕介、今野弘之、他
発表演題：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
学会等名：第 75 回日本癌学会学術総会

発表年月：2016 年 10 月
発表者：Ozaki Y, Konno H, et al.
発表演題：Label-free imaging identification of cells using quantitative phase microscopy

for negative selection of circulating tumor cells
学会等名：40th World Congress of the International College of Surgeons

発表年月：2017 年 10 月
発表者：Ozaki Y, Konno H, et al.
発表演題：Label free imaging identification of white blood cells using quantitative phase microscope for negative selection of circulating tumor cells
学会等名：3rd Advances in Circulating Tumour Cells

発表年月：2018 年 4 月
発表者：廣津周、菊池寛利、他
発表演題：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の検出法
学会等名：第 118 回日本外科学会定期学術集会

発表年月：2018 年 4 月
発表者：Kikuchi H, Ozaki Y, et al.
発表演題：Label-free classification of live cells using quantitative phase microscopy images for negative selection of circulating tumor cells
学会等名：American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018

発表年月：2018 年 7 月
発表者：廣津周、菊池寛利、他
発表演題：定量位相顕微鏡を用いた新たな血中循環腫瘍細胞の検出法
学会等名：第 73 回日本消化器外科学会総会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

平松 良浩 (Hiramatsu, Yoshihiro)
浜松医科大学・医学部・特任准教授
研究者番号：00397390

神谷 欣志 (Kamiya, Kinji)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20324361

菊池 寛利 (Kikuchi, Hirotoshi)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70397389

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

尾崎 裕介 (Ozaki, Yusuke)
浜松医科大学・医学部附属病院・診療助教

廣津 周 (Hirotzu, Amane)
浜松医科大学・大学院生