

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K04645

研究課題名(和文) 高集積型細胞チップを用いたオンチップがん診断デバイスの開発

研究課題名(英文) Development of on-chip cancer diagnostic devices using a high integrated cell chip

研究代表者

山村 昌平 (yamamura, shohei)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：50432141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：独自の細胞チップ技術を用いて、世界最大級の細胞数のマイクロアレイチップを作製し、循環がん細胞(CTC)の検出から解析までが可能なオンチップがん診断デバイスの構築を目指した。射出成型技術を用いて、直径100マイクロメートルのマイクロチャンバーが約8万個集積した高集積型細胞チップを作製した。細胞チップのデザインや表面処理を検討し、従来の細胞チップの3倍の約180万個の培養系白血球細胞の単一層配置に成功した。本細胞チップを用いて、白血球中に添加した0.0001%のがん細胞を検出した。さらに、光応答性ガス発生樹脂や細胞回収装置を用いて、単一がん細胞を回収し、一細胞PCRも可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this project, we have developed a novel high integrated cell microarray chip system for detection and analysis of circulating tumor cells (CTC). The high integrated cell microarray chip with 78,660 microchambers (100 micrometer diameter) was made from polystyrene by using UV-LIGA process. The chip surface was rendered to hydrophilic by means of reactive-ion etching, which led to the mono-layers formation of leukocytes. Leukocytes isolated from whole blood were dispersed on the chip surface, followed by 15 min standing. Approximately 24 leukocytes (CEM) entered each microchamber when about 1,800,000 leukocytes in total were placed onto the cell microarray chip. In the experiments using spiked breast cancer cell, MCF-7 cells (0.01 to 0.0001%), accurate detection of breast cancer cells was achieved with monoclonal antibodies. Furthermore, we could retrieve target breast cancer cells by light-reactive gas generation polymers or our original micromanipulator system for DNA analysis.

研究分野：バイオチップ

キーワード：細胞チップ マイクロアレイ 循環がん細胞 単一細胞解析 バイオチップ ハイスループットスクリーニング

1. 研究開始当初の背景

近年、がん細胞は転移する際に腫瘍組織から血管中に入り、様々な箇所へ移動すると考えられており、血液中の循環がん細胞 (CTC) の解析は、新たながん検査として期待されている。しかし、CTC が存在する割合は、血液 10ml (白血球約 5 千万個) 中に数個から数百個程度といわれており、従来の PCR や FACS 等では極めて検出が困難である。最近、FDA に認可された CellSearch System が CTC 検出方法として開発されているが、1 次スクリーニングで EpCAM に対する抗体でがん細胞を選別するため、EpCAM を発現していないがん細胞を取りこぼす問題がある。さらに、標的がん細胞を回収して機能解析することは難しい。これらの問題を克服し、早期治療に繋がるがん診断システムになるには、標的がん細胞を正確に検出し、さらに回収や機能解析まで行う必要がある。本研究では、細胞チップ技術を応用し、がん診断デバイスの構築を目指し、多数の白血球の中から、極少数のがん細胞をチップ上で高精度、高感度に検出、解析できるシステムの開発を目標とする。

2. 研究の目的

近年、転移がんの予後の診断の指標として、血液中の循環がん細胞 (CTC) の解析が新しい検査として期待されている。CTC が存在する割合は、血液 10ml (白血球: 約 5 千万個) 中に数個から数百個程度といわれており、既存のフローサイトメトリー法や PCR 法等では極めて検出は困難である。そこで我々は、独自に開発を進めている細胞チップ技術を用いて、1000 万個以上の細胞を一細胞レベルで一度に解析可能な世界最大級の高集積型の細胞チップの開発を実現化する。さらに、本細胞チップの高機能化として、標的がん細胞を回収し、遺伝子解析などの詳細な機能解析まで行えるオンチップがん診断デバイスを構築する。

3. 研究の方法

CTC の検出から解析までが可能な新しいがん診断デバイスとして、高精度、高感度、高機能な細胞チップシステムを開発する。(1) まず、多数の白血球細胞を単一層に配置する高集積型の細胞マイクロアレイチップを作製する。次に、作製した細胞チップを用いて、がん細胞のみを高感度でかつ抗体多重染色による高精度な検出を行い、がん細胞を定量的に検出するための条件検討を行う。(2) さらに、標的単一がん細胞を回収し、遺伝子解析を行うマイクロチップデバイスを構築する。そのために、チップ表面に光応答性ガス発生樹脂を被覆させ、光照射による発生ガスによって標的がん細胞を剥離させ、回収する。回収した単一がん細胞の PCR 等による遺伝子解析を行い、オンチップがん診断デバイスの開発を目指す。以下に詳細を述べる。

(1) 微細加工技術である金型からの射出成型技術 (UV-LIGA) を用いて、高集積型のマイクロアレイチップを作製する。マイクロアレイチップを用いて 1000 万個の白血球を検出することを目標に、多数の白血球を均一かつ単一層に配置可能な細胞チップの設計作製を目指す。そのためには、各マイクロチャンパーに導入できる細胞数を一定にかつ単一層に固定化させる必要があり、チップのデザイン、表面処理、細胞濃度などを検討する。作製した細胞チップ上で、白血球中に混在する極少数のがん細胞を対象に、複数の蛍光標識抗体等を用いて、がん細胞のみを検出できるように抗体や色素の種類や濃度の条件検討を行う。次に、がん細胞を 0.01% から 0.0001% に細胞濃度を変化させ、がん細胞濃度に依存して定量的に検出するための条件の洗い出しを行う。同時に、抗体多重染色をチップ上でを行い、正確にがん種の同定ができる系を構築する。

(2) 高集積型細胞チップ上で、白血球中に混在する極少数のがん細胞を検出した後、標的の単一がん細胞の回収および機能解析を試みる。標的がん細胞の詳細な機能解析として、細胞チップ基板上に光応答性ガス発生樹脂を被覆することを検討し、光照射によってチップ底面よりガスを発生させ、標的単一がん細胞の剥離、回収を行う。また、独自の細胞回収装置を用いて標的単一細胞の回収を試みる。回収した標的単一細胞を含む試料に対して、PCR 等を試みることによって、単一がん細胞の遺伝子解析を試みる。

4. 研究成果

(1) 微細加工技術である金型からの射出成型技術を用いて、直径 100 マイクロメートルのマイクロチャンパーが約 8 万個集積化した高集積型細胞チップを作製した。マイクロチャンパーの直径、深さなどのデザインや、チップの表面処理として酸素プラズマ処理条件を検討することによって、従来の細胞チップの 3 倍の約 180 万個の培養系白血球細胞を均一かつ単一層に配置することに成功した。全血中の白血球で換算すると、500 万個以上を単一層配置できることから、複数のチップを用いることで 1000 万個の細胞の配置も可能であることが示された。本細胞チップ上で、白血球中に添加した標的がん細胞 (MCF-7) を抗体多重染色で識別し (図 1)、細胞濃度に依存して定量的に検出することも確認できた。また、1 枚のチップ上で 0.0001% の標的がん細胞も検出可能であった。

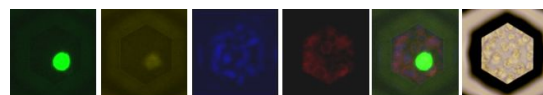


図 1. 高集積型細胞チップ上での標的がん細胞 (MCF-7) の抗体多重染色

(2) 細胞チップ基板上に光応答性ガス発生樹脂を被覆し、光照射によってチップ底面よりガスを発生させ、標的単一がん細胞の剥離、回収する実験を行った。まず、サイズの大きいマイクロチャンバアレイチップを作製し、光応答性ガス発生樹脂を被覆し、チャンバ内に吸着した培養系がん細胞において、LED光照射によるガス発生によって標的がん細胞も含めた細胞群を剥離、回収することができた。高集積型細胞チップ上での光応答性ガス発生樹脂の被覆はマイクロチャンバが小さいため作製できなかったが、今後チップの素材や作製方法などを検討することにより可能であると思われる。次に、チップ上で検出された標的単一がん細胞の遺伝子解析を試みた。チップ上でPCRは行うことはできなかったが、独自の細胞回収装置によって標的がん細胞を回収でき、RT-PCRをすることは可能であった。したがって、開発した高集積型細胞チップは、極少数のCTCなどの標的がん細胞の検出、回収、解析などが可能な新しい解析、診断ツールとして期待される。

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 5件)

- 1) Izumi S., Yamamura S., Hayashi N., Toma M., Tawa K., Dual-color Fluorescence Imaging of EpCAM and EGFR in Breast Cancer Cells with a Bull's Eye-type Plasmonic Chip, *Sensors*, 17, 2017, 2942
- 2) Yamamura S., Yamada E., Kimura F., Miyajima K., Shigeto H., Separation and analysis of adherent and non-adherent cancer cells using a single-cell microarray chip, *Sensors*, 17, 2017, 2410
- 3) Tawa K., Yamamura S., Sasakawa C., Shibata I., Kataoka M., Sensitive Detection of Cell Surface Membrane Proteins in Living Breast Cancer Cells by Using Multicolor Fluorescence Microscopy with a Plasmonic Chip. *ACS Appl Mater Interfaces*. 8, 2016, 29893–29898
- 4) Sawada T, Araki J, Yamashita T, Masubuchi M, Chiyoda T, Yunokawa M, Hoshi K, Tao S, Yamamura S., Yatsushiro S, Abe K, Kataoka M, Shimoyama T, Maeda Y, Kuroi K, Tamura K, Sawazumi T, Minami H, Suda Y, Koizumi F., Prognostic Impact of Circulating Tumor Cell Detected Using a Novel Fluidic Cell Microarray Chip System in Patients with Breast Cancer. *EBioMedicine*. 11, 2016, 173-182
- 5) Biju V, Hamada M, Ono K, Sugino S, Ohnishi T, Shibu ES, Yamamura S., Sawada M, Nakanishi S, Shigeri Y, Wakida SI., Nanoparticles speckled by ready-to-conjugate lanthanide complexes

for multimodal imaging. *Nanoscale*. 5, 2015, 9511-9516

[学会発表](計 17件)

- 1) 山村昌平、細胞チップによる1細胞解析と診断応用、名古屋大学・ナノバイオ関連施設のラボツアー、平成30年第1回次世代バイオナノ研究会、2018/03/27、愛知県
- 2) 山村昌平、山田恵理子、木村落子、宮島久美子、重藤元、1細胞マイクロアレイチップによる各種がん細胞の分離、解析、回収技術、日本化学会第98春季年会、2018/03/22、千葉県
- 3) 山村昌平、山田恵理子、木村落子、宮島久美子、重藤元、各種がん細胞を分離、解析、回収可能な1細胞マイクロアレイチップ、第17回産総研・産技連LS-BT合同発表会、2018/02/06、茨城県
- 4) 山村昌平、細胞チップを用いた1細胞解析と診断応用、精密工学会中国四国支部(香川地区)講習会「先端医療・ヘルスケアに貢献する低侵襲デバイスからそのシステム開発に関する最新動向」、2017/12/07、香川県
- 5) 山村昌平、山田恵理子、木村落子、宮島久美子、重藤元、1細胞マイクロアレイチップを用いた各種細胞の分離、解析、回収、化学とマイクロ・ナノシステム学会第36回研究会(CHEMINAS36)、2017/10/04、群馬県
- 6) 山村昌平、山田恵理子、木村落子、宮島久美子、重藤元、1細胞マイクロアレイチップによる浮遊性および接着性細胞の分離、解析、回収技術、第11回バイオ関連化学シンポジウム、2017/09/07、東京都
- 7) 山村昌平、細胞チップを用いた1細胞解析と診断応用、第2回関西バイオ医療研究会、2017/03/13、大阪府
- 8) 山村昌平、林尚子、山田恵理子、橋本芳子、梶本和昭、片岡正俊、循環がん細胞検出を目指した細胞チップの開発、第16回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会、2017/01/31、茨城県
- 9) Shohei Yamamura, Yoshiko Hashimoto, Naoko Hayashi, Eriko Yamada, Shouki Yatsushiro, Yoshinobu Baba and Masatoshi Kataoka, Accurate detection of circulating tumor cells using cell microarray chip, International Conference on Single-Cell Research 2016 (Joint Conference of the 10th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis & IIRC Conference), 2016/11/17, Japan (Tokyo)
- 10) 山村昌平、細胞チップの開発とその診断応用、第2回四国オープンイノベーションワークショップ in 松山、2016/11/02、愛媛県
- 11) 山村昌平、橋本芳子、芝田いづみ、林尚

子、山田恵理子、八代聖基、馬場嘉信、片岡正俊、循環がん細胞検出を目指した細胞チップの構築、日本化学会生体機能関連化学部会バイオテクノロジー部会、第10回バイオ関連化学シンポジウム、2016/09/07、石川県

- 12) Shohei Yamamura, Yoshiko Hashimoto, Shouki Yatsushiro, Yoshinobu Baba and Masatoshi Kataoka, High-throughput screening and analysis for circulating tumor cells using a cell microarray chip, Biosensors 2016, 2016/05/28, Sweden (Gothenburg)
- 13) 山村昌平、橋本芳子、八代聖基、馬場嘉信、片岡正俊、細胞チップを用いた循環がん細胞検出系の構築、日本化学会第96春季年会、2016/03/25、京都府
- 14) 山村昌平、橋本芳子、八代聖基、片岡正俊、細胞チップを用いた循環がん細胞検出系の開発、LS-BT 合同研究発表会、2016/02/02、茨城県
- 15) 山村昌平、各種疾患診断を目指した細胞チップ技術、第11回工学部先端工学研究発表会、2016/02/01、香川県
- 16) 山村昌平、各種疾患診断を目指した細胞チップ技術、四国オープンイノベーションワークショップ、2015/11/10、香川県
- 17) 山村昌平、細胞チップを用いた各種疾患診断技術、平成27年度実践セミナー、Bio&計測実践セミナー、2015/09/18、茨城県

〔図書〕(計 1件)

- 1) 山村昌平、日本分析化学会、病原体・変異細胞検出技術の最新動向：細胞チップによる検出と診断、日本分析化学会機関誌「ぶんせき」、9、2017、397-402

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：マイクロチャンバーアレイプレート、及び当該プレートを用いた細胞同定方法
発明者：山村昌平、八代聖基、片岡正俊
権利者：産業技術総合研究所
種類：特許
番号：PCT/JP2016/056664
出願年月日：2016年3月3日
国内外の別：外国

取得状況(計 3件)

名称：細胞展開用マイクロチャンバーチップ
発明者：星久美子、荒木淳吾、山村昌平、八代聖基、片岡正俊
権利者：コニカミノルタ、産業技術総合研究所
種類：特許
番号：6238208号

取得年月日：2017年11月10日

国内外の別：国内

名称：細胞展開用デバイスおよび希少細胞の検出方法

発明者：荒木淳吾、星久美子、山村昌平、八代聖基、片岡正俊

権利者：コニカミノルタ、産業技術総合研究所

種類：特許

番号：6218185号

取得年月日：2017年10月6日

国内外の別：国内

名称：細胞展開用マイクロチャンバーチップの製造方法

発明者：星久美子、荒木淳吾、山村昌平、八代聖基、片岡正俊

権利者：コニカミノルタ、産業技術総合研究所

種類：特許

番号：6198070号

取得年月日：2017年9月1日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 昌平 (YAMAMURA Shohei)

産業技術総合研究所・健康工学研究門・研究グループ長

研究者番号：50432141

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()