

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H03836

研究課題名(和文) 一細胞微小液滴培養による血中循環がん細胞高感度検出法

研究課題名(英文) Development of sensitive detection method for circulating tumor cells by packaging single cell in microdroplet

研究代表者

寺園 英之(Terazono, Hideyuki)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・准教授

研究者番号：30398143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、血液中に存在する転移性を持つがん細胞を生きのまま補足することで、原発巣に存在するがん細胞の情報、さらには得られたがん細胞が実際どのような抗がん剤に感受性があるのかを採血により得ることで検査できるようにすることを最終目標としている。血液中に存在するがん細胞(CTC:血中循環がん細胞)は正常な赤血球・白血球細胞数に比べ圧倒的に数が少ない。本研究では高感度にCTCを捉える技術の開発を行った。正常細胞と混ざった状態で培養を行うとどの細胞ががん細胞由来なのか通常は判別できないが、微小なマイクロゲルの中に小分けして培養する事でどの細胞ががん細胞由来なのか判別できる基本技術の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん転移は多くの場合、治療困難場合に陥りやすい。転移を起こす経路としてはリンパあるいは血管が主である。これまで血管内を流れる転移性のがん細胞を捉える手段として、血中の癌由来DNAの補足、あるいは抗体などを用いた細胞の検出などの方法が存在している。本研究技術が確立できれば、生きのままの転生のがん細胞を捉えることが可能になり、原発巣に存在するがん細胞の情報を取り出すことができるだけでなく、がん細胞を人工的に体外で増殖させ、どのような抗がん剤に感受性を持つか検査できる可能性を持つ意味で学術的な意義が存在する。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a techniques to capture cancer cells in the blood(CTCs: circulating tumor cells). Capturing live CTCs allows us to get information that exist in the primary nest as well as be able to test the sensitivity of the anti-cancer drug. The number of CTC is predominantly lower than the normal number of red and white blood cells. In this research, we developed a technique to capture CTC with high sensitivity. It is usually impossible to determine which cells are derived from cancer cells when cultured in the state of being mixed with normal cells. We developed a basic technique to distinguish which cells are derived from cancer cells by subdividing and culturing in small microgels.

研究分野：薬物動態

キーワード：血中がん細胞 微細加工 細胞工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、様々な性質を持つ細胞集団の中から特定の細胞を選び分け人工的な組織を作製することで一細胞単位から機能解析する“オンチップ・セロミクス計測技術”の開発を行ってきた。開発を進める中で、半導体作製技術を応用して手のひらサイズのチップ上にマイクロメーターサイズの微小流路を作製し、その中で特定の細胞をハイスピードカメラによる画像処理による選別で選り分けるオンチップセルソーターの開発に成功した。さらに、選り分けた細胞を遺伝的に迅速に診断する事を目的として最短3分で遺伝子増幅・検出を行える超高速PCR装置の開発に成功した。このように、一細胞毎に細胞を診て・測る手法は、サンプル中の希少な細胞を解析する研究、特に血液中に微量に流れる転移性のがん(血中循環がん細胞: Circulating Tumor Cells: CTC)を検出する技術として非常に有用であると考えられる。

CTCはヒトのサンプルでいえば、一回の採血量約7.5mL程度の血液中に最低数個しか存在しないにも関わらず、検出されれば転移能力が高く、患者の予後が悪いことが示されている。現在、CTCを検出する方法としてアメリカ食品医局(FDA)からCellSearch®システムと呼ばれる装置が承認を受け、様々な機関でCTC検出のための装置として使用されている。この手法は血液の中に含まれる上皮系細胞を関連抗体で染色した後、細胞を一つ一つ画像解析することでその存在を検出するという原理であるが、臨床結果とマッチされていない例も多数認められる。マッチしない理由として、この装置のCTC検出原理が血液中に存在するはずのない上皮系細胞が存在したとき、その細胞をCTCとして定義していることが上げられる。定義を外れる転移性を持つ細胞が存在した場合は検出されない事になる。がん細胞の種類が多岐にわたる中、血液中に存在するCTCを正確に検出するためにはCTCを改めて再定義し、全てのCTCを検出できる技術を開発する必要がある。

2. 研究の目的

本申請課題により新たなCTCの再定義と高感度検出を目指した新たな検出技術を開発することを目指した。研究を進める上での概念として、がんであれば増殖能を持つという、がんの根本的な性質を利用し研究を進めた。方法概略として、一細胞毎を直径数十マイクロメートルの微小液滴の中に封入し、それぞれの細胞を孤立培養する事により微小液滴内での細胞増殖を確認する事CTCと定義可能か検討した。

手法としては、血液サンプル内の細胞を一細胞単位で微小液滴に内包させることによる新たな「一細胞微小液滴培養によるCTC高感度検出法」の確立を目指した。

これまでがん細胞の同定には、主に一種類の原因遺伝子を同定することで判断されている。本開発課題によりがん細胞だけを抽出することでがん細胞の遺伝情報をエンリッチする事ができれば原因遺伝子種類だけではなく、複数の原因遺伝子も同定が可能となり、同一細胞内に含まれるがん関連遺伝子の多重性について明らかにする事も可能である。

3. 研究の方法

「(1)微小流路系を用いた微小液滴内一細胞封入技術の開発」

本研究の概念通りに血中のがん細胞を補足するため、まずは一細胞を微小液滴に内包させる技術の開発を目指した。

界面活性剤の選択

血中に存在する希少ながん細胞を補足するためには、採血から得られた血液中の細胞の

ほとんどを微小液滴中に補足する必要がある。そのために、油中水型における微小液滴作製法を選択した。また、微小液滴で血液内細胞を小分けした後は細胞を一定期間培養する必要がある。微小液滴を培養液中においてもその形状を保持する必要があることから、細胞懸濁液にゲル化剤を混ぜた。まずは、ゲル化した状態で培養液中に移行させるため、微小液滴作製に必要な界面活性剤の選択を行った。

ゲル化剤の選択

ゲル化剤としてカルシウム依存的に相転移を可逆的に起こすアルギン酸ナトリウムと低融点アガロースで検討を行った。

微細加工技術の開発

微小液滴のサイズは封入した細胞が増殖した際の判別の為にはある程度均一に揃っている必要がある。そこで、微小液滴を均一に作製する為の手段として手のひらに収まる程度のガラス基板にマイクロスケールの微小流路を構成したマイクロフルイデックスを作製する事でサイズが均一な微小液滴作製デバイスの作製を目指した。微小液滴を均一に作製する為のマイクロフルイデックスの形状の検討を進めた。

「(2) 微小液滴内細胞の長期培養法の技術開発」

細胞を微小液滴に封入する作業は界面活性剤や油、物理的な圧力を利用することから細胞に多少の侵襲性を与える可能性がある。また、細胞増殖は外的な圧力が増殖速度が遅くなることが知られている。

そこで、封入した細胞が実際に微小液滴内で増殖するかの検討を行った。また、研究期間中にアルギン酸ゲルを用いた新たな細胞選別法を創案し、検討を行った。

4. 研究成果

「(1) 微小流路系を用いた微小液滴内一細胞封入技術の開発」

界面活性剤の選択、ゲル化剤の選択

細胞を生きたまま油中水型の微小液滴を作製する為には細胞に対して非侵襲的な物質を利用する必要がある。また、油中で作製した微小液滴の球形を保持したまま、作製した微小液滴ゲルを培養液中に移行させる必要がある。これを決める要素として親水親油バランス (HLB: Hydrophilic-Lipophilic Balance) の値が重要となる。まず、細胞を含む微小液滴を油中で作製するためにまずは HLB が 3-6 程度の界面活性剤を選択した。候補として span-80、SY-グリスター(阪本薬品工業株式会社)数種類を選択した。また、低粘度ミネラルオイル、シリコンオイル、デカンを作製用の油として選択した。

次に、作製した微小液滴を培養液中に移行する手段として HLB10-13 の界面活性剤として tween-20, pluronic-F67 を選定した。

これらの組合せを検討した結果、油中並びに水中の界面活性剤の組合せは、微小液滴の形状に大きく影響した。特に HLB のバランスが影響を及ぼし、アルギン酸での微小液滴は涙型や非球形の微小液滴ゲルが作製された。また、組合せによっては一度作製した微小液滴がゲル化途中で再融合し、いわゆる雪だるま型の形状になることもあった。一般的にミネラル

オイル-Span80-tween20 がよく知られる組合せであるが、tween20 は濃度依存的に細胞障害性を有することが知られている。様々な検討の結果、複数の組合せで微小液滴ゲルの作製に成功した(Fig.1)。さらに油中で作製した微小液滴を水中に移行する界面活性剤は pluronicF67 が細胞への侵襲性に影響が無いことが分かった。微小液滴ゲルはアルギン酸ゲルのみならずアガロースにおいても作製に成功した。

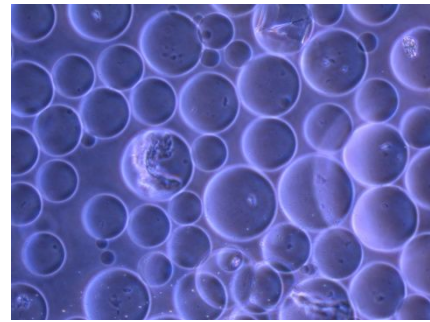


Fig.1 アルギン酸微小液滴ゲル

微細加工技術の開発

均一なサイズの微小液滴を作製する為の手段として手のひらに収まる程度のガラス基板にマイクロスケールの微小流路を構成したマイクロフルイデックスを作製する事でサイズが均一な微小液滴作製デバイスの作製を目指した。微小液滴を均一に作製する為のマイクロフルイデックスの形状の検討を進めた。微小液滴を作製するためのマイクロフルイデックスのデザインとしては、T字型あるいは十字型等が知られているが、サイズを詳細に決めることができる十字型を採用した。十字型マイクロフルイデックスを用いて粒径が揃った微小液滴ゲルの作製に成功した(Fig.2)。

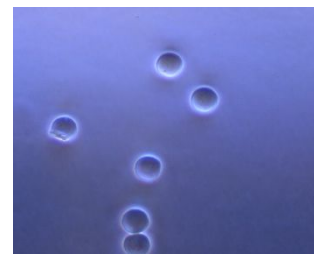


Fig.2 マイクロフルイデックスを用いた微小液滴ゲルの作製

「(2) 微小液滴内細胞の長期培養法の技術開発」

採血したサンプルに CTC が存在していた場合を想定して、細胞株をモデル細胞として微小液滴ゲル内に封入し細胞がゲル内で長期培養・細胞増殖するかを検討した。細胞封入はアルギン酸並びにアガロースゲルで検討した。モデル細胞として、転移性が高い脳腫瘍由来の U251 細胞と子宮頸癌由来である HeLa 細胞で検討した。細胞増殖速度はゲルの堅さに依存することが想定されたが1%アガロースゲルにおいてU251細胞の増殖を確認する事ができた(Fig.3_A)。また、アルギン酸ゲルにおいても HeLa 細胞においてゲル内での増殖を確認する事ができた(Fig.3_B)。さらに、アルギン酸ゲルにおいてキレート剤の EDTA により封入し増殖した細胞を取り出すことにも成功した(Fig.4)。

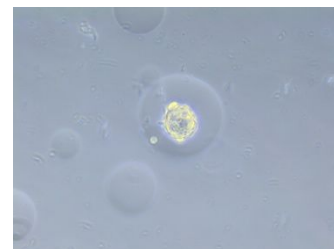


Fig.3_A 1%アガロースゲル内での脳腫瘍細胞増殖

本研究を通じて、がん細胞の基本原則である細胞増殖というパラメータを指標にした CTC 高感度検出技術の基本原則を確立することに成功した。

また、本研究を進めるにあたり、細胞をドロップレット内に封入するのではなく、ゲルをシート状に展開し、シート内部に細胞を固定・増殖させ、増殖性の細胞を検出する技術も構築した。

近年、患者から得られたがん細胞からの遺伝子を抽出し原因遺伝子を特定し、奏功する抗がん剤を特定する研究が発展している。それ以外に癌患者から得られた細胞を免疫不全マ

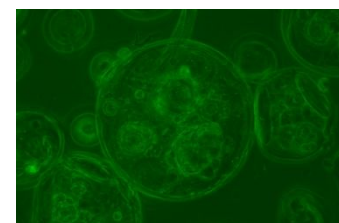


Fig.3_B 1.5%アルギン酸ゲル内での細胞増殖

ウスに移植しマウス内で増殖させた後、抗がん剤の影響を検討する患者腫瘍組織移植モデル（PDX: Patient-derived xenografts）モデルや in vitro で摘出したがん細胞を増殖させるがんオルガノイド作製技術が

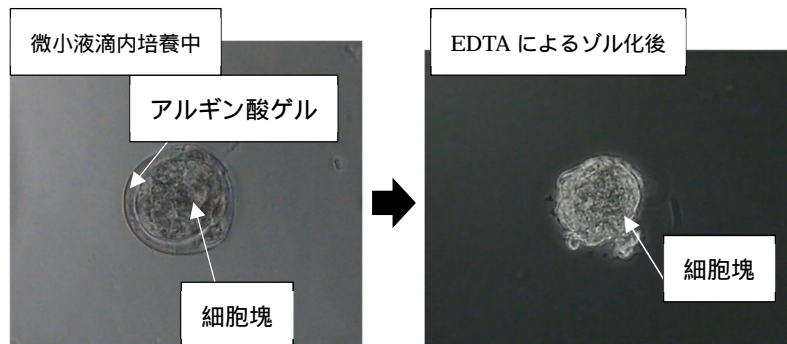


Fig.4 CTC モデル細胞の増殖後の回収

発展してきている。今後の課題としては、これらの技術を利用して実際の臨床サンプルを用いての検証を進めることを予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寺園 英之, 小八重 薫子, 高橋 毅行, 武田 泰生
2. 発表標題 異なる物性応答高分子を利用した稀少細胞同定法の開発
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2018/第26回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺園 英之, 小八重 薫子, 高橋 毅行, 武田 泰生
2. 発表標題 A novel method to identify proliferative cells in heterogenetic cell population
3. 学会等名 第28回 日本医療薬学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideyuki Terazono, Masao Odaka, Akihiro Hattori, Kenji Matsuura and Kenji Yasuda
2. 発表標題 Development of a single cell cultivating method using a microdroplets forming technique for sorting specific cells
3. 学会等名 第54回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2016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
---------------------------	-----------------------	----