

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02569

研究課題名(和文) マイクロ流体と集積回路技術によるリキッドバイオプラットフォーム開発

研究課題名(英文) Development of a novel liquid biopsy platform by combining microfluidics and integrated circuits

研究代表者

Kim Soohyeon (KIM, Soohyeon)

東京大学・生産技術研究所・講師

研究者番号：80709189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、一光子レベルで検出可能な半導体素子であるSingle Photon Avalanche Diode (SPAD)を内蔵したシリコン集積回路チップを、マイクロ流体デバイスと統合することで、ターゲット細胞を高精度・高速で検出可能な並列フローサイトメーターを開発した。SPADを用いて励起光と蛍光を時間ドメインで分離することで、がん細胞からの蛍光信号を、顕微鏡などの複雑な蛍光イメージングシステムを使わずに、複数地点で検出することに成功した。また、マイクロ流体技術とシリコン集積回路技術を融合することで、単一細胞を指定の場所に捕捉し、同時並列に解析可能なマイクロ流体デバイスも開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞を高効率で同定できるフローサイトメーター分野においては高速化に関する研究が行われているが、一本のキャピラリーを用いた既存の方法ではその物理的な限界があり、現状以上にスループットを向上するのは困難である。本研究は、発想を変えてフローサイトメーターを並列化することで、フローサイトメーターの機能・スループットの高度化を図るものであり、フローサイトメーターの新たな展開を拓くことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel concept of parallelized flow cytometer which consists of an array of Single Photon Avalanche Diode (SPAD) aligned with parallelized microfluidic channels. The fluorescence signal from individual cells flowing each microfluidic channel were simultaneously detected with the SPADs by separating emission from excitation in time domain without a complex microscopy system. Moreover, by integrating microfluidics and CMOS technologies, a novel microfluidic system has been developed for trapping single cells and/or microparticles into designated locations, followed by parallelized analysis of trapped single cells. By integrating these technologies, we expect to establish a novel liquid biopsy platform capable of highly efficient separation and analysis of cancer cells from body fluids.

研究分野：ナノマイクロバイオシステム

キーワード：フローサイトメーター シリコン集積回路チップ マイクロ流体デバイス リキッドバイオシー 1細胞解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

現在、一細胞解析は世界的に注目を集めており、これと次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析を組み合わせた基礎研究が活発に進められている。次のフェーズとしては、基礎研究で得られた解析結果に基づいて、一細胞解析を医療分野へ応用することになると我々は考えた。例えば、血中循環腫瘍細胞は一細胞レベルで形態や遺伝子発現が異なることが指摘されているため、ヘテロな特性を把握するためには一細胞レベルでの解析が必要である。しかし、臨床検体には血球細胞などの解析の対象では無い細胞が含まれているため、血球細胞を取り除く必要があり、そのスループットは非常に低い。がん細胞のヘテロな特性を把握した研究では、分離されたがん細胞を一つずつ回収して解析を行っており、がん細胞の特性を把握する基礎研究には問題ないが、実際の医療現場で使用するのは困難である。そこで、一細胞解析を医療分野へ応用するためには、分離された希ながん細胞を効率良く捕捉し、同時並列的な解析ができる簡便なシステムの開発が強く要求される。

原発腫瘍細胞塊から血管内へ浸潤するがん細胞である CTC は、血液を通じて体内を循環し転移巣を形成すると考えられている。このがん細胞の血中数をモニタリングすることによって、非侵襲的にがんの病態予測を行うことができると考えられている。また、CTC は体内のがん病巣の遺伝子情報をよく反映する。そのため、CTC の遺伝子解析を行うことで、がんを誘発することが既に知られている遺伝子変異の有無について調べ、遺伝子レベルの変異から効果的な分子標的薬の選択にあたっても有用な情報を得ることができる。現在は、手術等によりがん組織片を入手し、がんの状態をモニタリングしているが、採血からがん細胞そのものを解析できるようになれば、定期的な採血により、患者の負担がほとんどなく、がんシグネチャーの時系列変化を簡便に調べることが可能となる。さらに、CTC はがん関連死の最大要因である転移を引き起こす本体と考えられており、CTC の解析はがん転移メカニズムの理解などの基礎研究の対象でもある。

2. 研究の目的

本研究では、細胞の高精度操作を可能とするマイクロ流体技術と、高感度光検出・フロー制御の並列化を可能とするシリコン集積回路技術とを融合することで、体液中のがん細胞を検出・解析可能とするリキッドバイオプシープラットフォームの開発を目指す。具体的には、一光子レベルで検出可能な半導体素子である Single Photon Avalanche Diode (SPAD) を内蔵したシリコン集積回路チップを、マイクロ流体デバイスと統合することで、複数地点で同時並列にターゲット細胞を検出・分離することが可能な新概念の並列セルソーターを開発する。また、インデックス配列を持つ RNA 捕捉ビーズにより各細胞を標識し、トランスクリプトーム解析が可能な Addressable Electroactive Microwell Array (AEMA) を開発する。並列セルソーターと AEMA を単一デバイス上に統合し、リキッドバイオプシープラットフォームを実現することで、体液中のがん細胞の高効率分離と、分離されたがん細胞の網羅的な解析を連続して行うことが可能となる。

3. 研究の方法

本研究では、細胞分離から一細胞解析まで一連のプロセスが行えるリキッドバイオプシープラットフォームを確立する。このプラットフォームを確立するため検出機能の開発を行う。具体的には、時間分解光子測定技術を用いて励起光と蛍光を波長ドメインではなく時間ドメインで分離することで、光学的なフィルタリングに頼らず、任意の波長の蛍光を励起光と分離して検出することが可能になる。SPAD を用いることで、時間分解光子測定が可能となるため、検出感度の高い蛍光検出用 SPAD ピクセルを開発する。時間ドメイン分離方式において蛍光検出感度向上のためには、励起光により与えられたエネルギーが遅れて SPAD の avalanche を引き起こす裾引き現象の低減が必要である。デバイス構造および制御回路の最適化により、光子検出効率が高く (max 40%以上)、裾引きの減衰が早く (1ns で 10⁻⁴ 以下)、測定周期の短い (50MHz 以上) SPAD ピクセルを開発する。また、SPAD ピクセルを、マイクロ流路下に 100 μm ピッチ程度で配置できるように小型化することで、数 10 mm 角程度のシリコン集積回路上に、数万個以上の SPAD ピクセルを備えた、マイクロ流路を形成することを可能にする。

一方、ターゲット細胞を一細胞ごとに捕捉・解析が可能な AEMA を並列セルソーターの下流に統合し、デバイス上での一細胞解析を実現する。まず、マイクロウェルのサイズや実験条件を最適化することでトラップ効率を 90% まで向上させることを目指す。具体的には、誘電泳動によるトラッピングのための条件 (印加電圧、誘電泳動のためのバッファー、電極間距離など) を最適化するとともに、数値シミュレーションを用いてマイクロウェルのサイズによる誘電泳動力の違いを検討することによって、細胞トラップ効率を向上させる。このシステムの評価のため、PC3 細胞 (前立腺がん細胞株) を対象として解析をデバイス上で行う。

4. 研究成果

本研究では、細胞の高精度操作を可能とするマイクロ流体技術と、高感度光検出・フロー制御の並列化を可能とするシリコン集積回路技術とを融合することで、体液中のがん細胞を検出・解析可能とするリキッドバイオプシープラットフォームの開発を目指す。具体的には、一光子レベ

ルの検出が可能な半導体素子である SPAD を内蔵したシリコン集積回路チップを、マイクロ流体デバイスと統合することで、複数地点で同時並列にターゲット細胞を検出・分離することが可能な新概念の並列セルソーターを開発する。

フローサイトメーターに関しては、SPAD を内蔵したシリコン集積回路チップの設計・製作を行い、時間分解光子測定技術の基礎検討を行った。時間分解光子測定技術では、励起光と蛍光を波長ドメインではなく時間ドメインで分離することで、超短パルスレーザーを用いて励起を行った後に SPAD を活性化して蛍光を測定することが可能な技術である。この技術を利用して、光学フィルターを使わずにシリコン集積回路チップ上で蛍光色素からの蛍光を検出することに成功した。さらに、SPAD を内蔵したシリコン集積回路チップを用いて 10 ミクロンの蛍光ビーズからの蛍光信号も検出可能になった。次に、SPAD を内蔵したシリコン集積回路チップと PDMS マイクロ流路を結合して製作した並列フローサイトメーターを製作し、並列フローサイトメーターの実証実験を行った。具体的には、SPAD アレイに整列された 8 本のマイクロ流路を用いて並列化した 8 本のフローサイトメーターを製作し、マイクロ流路内で流れている細胞からの蛍光信号を SPAD で検出した。SPAD で検出された蛍光信号を、顕微鏡で撮影した細胞の動きと比較することで、SPAD による蛍光検出が可能であることを確認した(図 1)。最後に、SPAD を内蔵したシリコン集積回路チップを、マイクロ流体デバイスと統合することで、複数地点で同時並列に蛍光検出を行うことにより、「線」ではなく「面」でのフローサイトメーターが可能な新概念の 2D フローサイトメーターを開発した。開発した 2D フローサイトメーターを用いて検証実験を行った結果、CMOS 基板上を流れる癌細胞からの蛍光信号を複数地点で同時並列に検出可能であることを確認した。これにより、細胞からの蛍光信号を顕微鏡などの複雑な蛍光イメージングシステムを使わずに、複数地点で蛍光信号の検出が可能な並列フローサイトメーターの開発が可能であることを確認した。

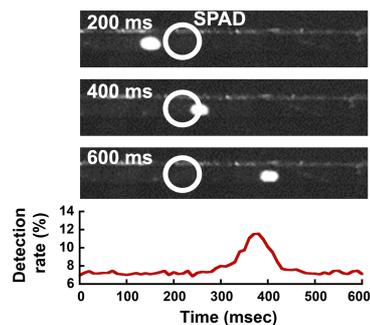


図 1 SPAD を用いた細胞検出

高スループット 1 細胞解析を実現するために、マイクロ流体技術とシリコン集積回路技術の融合により Electroactive doubleWell Array (EdWA) を高度化することで、決定論的単一細胞組み合わせを可能にした。EdWA は、マイクロウェルの底面部分に電極を配置することによって、解析対象物である一細胞や粒子を誘電泳動によって効率よくウェル内にトラップすることを可能とする技術である。また、マイクロウェルをその機能の違いによって捕捉用ウェルと反作用ウェルに分離することで、それぞれのウェルの寸法を最適化することが可能であり、95%の高効率細胞捕捉率の達成と、個々の細胞を区画化することが可能である。EdWA の反作用のマイクロリアクターの底面に、複数の単一細胞捕捉マイクロウェルを配置し、細胞やマイクロビーズを指定の場所に選択的に捕捉することを可能とする Addressable Electroactive Microwell Array (AEMA) を開発した。捕捉マイクロウェルの基盤をシリコン集積回路製作に利用されている back-end-of-line (BEOL) プロセスで製作することで、各電極の個別制御を可能にした。AEMA の電極を個別に制御し、異なる種類の細胞を指定のマイクロウェルに順番に捕捉することで、決定論的単一細胞の組み合わせを実現した。試作した AEMA を用いた検証実験として、青、緑、赤色の蛍光色素で染色した PC 3 (前立腺癌腫瘍細胞株) 細胞群を用意し、90%の効率で 3 つの単一細胞を区画化することに成功した (図 2)。AEMA を活かしてインデックス配列を持つバーコードビーズと細胞を一つのマイクロウェルに確実にトラップすることで、各細胞を効率良く標識することが可能になる。

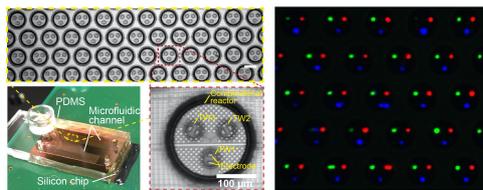


図 2 AEMA で実現した一細胞の組み合わせ

また、捕捉した細胞を解析するため、安定的に細胞を保持できる EMAB (EMA with barrier) を開発し、液状化細胞診法の検討を行った。既存の EdWA では、誘電泳動を切ると捕捉された細胞が流れ出してしまう問題があったため、導電率が高い細胞解析用試薬をデバイス内に導入することが困難であった。この課題に対して、各マイクロウェルの後ろに微小壁を形成することで捕捉した細胞を安定的に保持できる EMAB を開発した。EMAB では、誘電泳動を切ったときに、捕捉された細胞が微小壁に引っかかることで、細胞を安定的に保持することが可能である。EMAB を用いた実証実験として、子宮頸癌細胞株である HeLa 細胞を用いた免疫染色を行った。具体的には、臨床応用を視野に HPV 感染マーカーとして子宮頸部前癌病変の検出で利用されている p16 と、増殖マーカーである Ki67 の 2 重染色を、EMAB を用いて行った。p16/Ki67 マーカーは子宮頸部病変診断において臨床応用されており、細胞診の補助診断として用いられている。HeLa 細胞を EMAB に捕捉した後、免疫染色用の様々な試薬をデバイスへ順番に導入することで、1 細胞捕捉・細胞固定・透過処理・染色の一連のプロセスをデバイス上で行うことが可能になり、1 細胞免疫染色を高精度で実現することに成功した(図 3)。



図 3 EMAB を用いた一細胞解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 S. Okumura, N. Benediktus, N. Lobato-Dauzier, Y. Ohno, S. Benner, Y. Torii, Y. Tanabe, K. Takada, A. Baccouche, M. Shinohara, S. H. Kim, T. Fujii, A. Genot	4. 巻 11
2. 論文標題 Morphological manipulation of DNA gel microbeads with biomolecular stimuli	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nano11020293	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 該当する

1. 著者名 Park Jongho, Komori Takayuki, Uda Toru, Miyajima Keiichi, Fujii Teruo, Kim Soo Hyeon	4. 巻 11
2. 論文標題 Sequential Cell-Processing System by Integrating Hydrodynamic Purification and Dielectrophoretic Trapping for Analyses of Suspended Cancer Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 47 ~ 47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi11010047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Makoto, Nagasaka Kazunori, Yoshida Mina, Kawata Yoshiko, Miyagawa Yuko, Tago Saori, Hiraike Haruko, Wada-Hiraike Osamu, Oda Katsutoshi, Osuga Yutaka, Fujii Tomoyuki, Ayabe Takuya, Kim Soo Hyeon, Fujii Teruo	4. 巻 13
2. 論文標題 On-chip immunofluorescence analysis of single cervical cells using an electroactive microwell array with barrier for cervical screening	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomicrofluidics	6. 最初と最後の頁 044107 ~ 044107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.5089796	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 5件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 金秀炫
2. 発表標題 Microfluidics-on-CMOSシステムによる高精度1細胞解析
3. 学会等名 SCE2021 第41回キャピラリー電気泳動シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 Soo Hyeon Kim
2 . 発表標題 Precise analysis of single molecules and cells using microsystems
3 . 学会等名 International Symposium on Upcoming Prominent Engineering solutions (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Soo Hyeon Kim
2 . 発表標題 Advanced biomedical microsystems for single-cell analysis
3 . 学会等名 IEEE-NEMS 2021 (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 S. Tago, K. Iizuka, T. Mitsunaka, D. Sato, T. Shindo, T. Fujii and S. H. Kim
2 . 発表標題 Two-dimensional flow cytometry realized by using an array of time-gated single photon avalanche diodes
3 . 学会等名 MicroTAS2021 (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 B. N. Hapsianto, N. Kojima, N. Lobato-Dauzier, R. Kurita, A. Genot, Y. Matsunaga, T. Fujii, and S. H. Kim
2 . 発表標題 A novel microbead-based digital PCR to improve detection sensitivity
3 . 学会等名 A novel microbead-based digital PCR to improve detection sensitivity (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1. 発表者名 S. Okumura, B. N. Hapsianto, N. Lobato-Dauzier, S. H. Kim, A. Genot and T. Fujii
2. 発表標題 A microfluidic generator of random distributions of DNA
3. 学会等名 MicroTAS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 C. Trzeciakowski, D. Sato, T. Shindo, T. Mitsunaka, Y. Fujimoto, K. Iizuka, S. Tago, T. Fujii and S. H. Kim
2. 発表標題 Parallelized flow cytometry realized by array of time-gated single photon avalanche diodes
3. 学会等名 MicroTAS2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Soo Hyeon Kim
2. 発表標題 Overcome the limits of cell analysis using advanced microfluidics-on-CMOS device
3. 学会等名 Pittcon 2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田子沙織、藤井輝夫、金秀炫
2. 発表標題 SPADアレイを用いた並列フローサイトメトリー
3. 学会等名 第47回可視化情報シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤大哲、金秀炫、土屋一成、関真秀、永澤慧、駒崎友亮、鳥居徹、鈴木穰、藤井輝夫
2. 発表標題 がん細胞塊トランスクリプトーム解析を目的とした細胞塊選別と液滴生成機能一体システムの開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金秀炫、藤井輝夫
2. 発表標題 マイクロ流体アプローチによる高感度Liquid Biopsy技術の進展
3. 学会等名 第4回 Liquid Biopsy 研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 D. Sato, T. Shindo, T. Mitsunaka, Y. Fujimoto, K. Iizuka, S. Tago, Y. Takayama, T. Fujii and S. H. Kim
2. 発表標題 Integrated parallel flow cytometry device with time gated spads
3. 学会等名 Transducers 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Saito, S. H. Kim, I. Tsuchiya, S. Nagasawa, M. Seki, Y. Komazaki, T. Torii, Y. Suzuki and T. Fujii
2. 発表標題 Integration of on-chip cluster purification and compartmentalization for rna-seq analysis of clusters
3. 学会等名 International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 流路デバイス、流体中粒子解析システムおよび流体中粒子分別システム	発明者 佐藤大紀、金秀炫	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-158646	出願年 2020年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 生体粒子捕集装置	発明者 満仲健、飯塚邦彦、 幡井徹也、藤井輝 夫、金秀炫	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-192797	出願年 2019年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 流路デバイスおよび流体中粒子解析システム	発明者 飯塚邦彦、藤井輝 夫、金秀炫	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-180308	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	長阪 一憲 (NAGASAKA Kazunori) (30624233)	帝京大学・医学部・教授 (32643)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------