

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：83205

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07746

研究課題名（和文）血中循環腫瘍細胞を利用した癌の遺伝子解析技術に関する基礎検討

研究課題名（英文）Development of technologies using circulating tumor cells for genetic analysis of cancer

研究代表者

大永 崇（Ohnaga, Takashi）

富山県産業技術研究開発センター・その他部局等・副主幹研究員

研究者番号：10416133

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、癌ゲノム医療に不可欠な「患者さんの腫瘍の遺伝子を、低侵襲で必要時に繰り返し入手する方法」を確立するための基礎技術を検討した。遺伝子の入手には血中循環腫瘍細胞（CTC）を利用し、その捕捉には筆者らが既に開発したマイクロ流体デバイス“ポリマーCTCチップ”を使用した。捕捉した癌細胞をゲルに包埋された状態で取り扱えるようにし、全ての細胞を確実に、またシングルセルでも回収できる手法を考案した。遺伝子変異が既知の癌細胞株を用い捕捉、回収、遺伝子解析の一連のプロセスを検証し、本手法により問題なく変異検出できることを示して、CTC遺伝子解析の新たな技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CTCによる癌の遺伝子解析が可能となれば、低侵襲で継続的に繰り返し患者さんの遺伝子情報を得ることができるようになり、癌の診断、治療、モニタリングに革命的な変化をもたらす。さらに癌が転移能や薬剤耐性などを獲得するプロセスを詳細に解析できるようになり、それらのメカニズム解明、さらには創薬開発へと繋げることが期待できる。またCTCは癌の情報全体を与える成分を有しており、ctDNAなど他のLiquid Biopsyの対象物にはない特徴を有する。以上の点は国が推進する「がんゲノム医療」に大きく寄与するものであり、癌制圧に大きく寄与することが予想される。

研究成果の概要（英文）：We developed liquid biopsy technologies using circulating tumor cells (CTCs) for genetic analysis of cancer. Cancer cell capture was performed with a microfluidic device “polymer CTC-chip” that we have developed earlier and novel cell recovery methods were developed here. An aqueous monomer mixture was fed to the chip that captured lung cancer cells having known gene mutations, and polymerized to be a gel. A small piece of gel containing the cells could be picked up and the cells were isolated finally by resolving the gel in a PCR tube. The obtained cells were genetically analyzed and the mutation was successfully detected without problems caused by chemicals used for the gel.

研究分野：Liquid Biopsy

キーワード：血中循環腫瘍細胞 遺伝子解析 シングルセル ゲル

## 1. 研究開始当初の背景

癌は遺伝子に由来する病気であり、1つの腫瘍の中でも細胞レベルでは遺伝子が不均一であること、さらには個々の患者さん、病状の経過、治療経過などにより遺伝子が変化することへの理解が深まりつつある。このような認識と共に、次世代シーケンサーなどによる飛躍的な遺伝子解析技術の進歩が相まって、現在癌医療は、患者さんの腫瘍の遺伝子情報を網羅的に取得・把握して個別的・精密的に実施する方向に進みつつある。このような「がんゲノム医療」の実現は、現在、国主導のもと強力に推進されており、研究領域において解決すべき課題が明らかになっている。そのような課題の中で、“患者さんの腫瘍の遺伝子を、必要時に繰り返し入手する方法を確立する”ことは、がんゲノム医療を実現していく上で不可欠と位置付けられている。このような遺伝子の入手は、現状では生検や手術により行われているが、大きな身体的負担を伴い繰り返しの実施が極めて困難であることなどから不十分であり、さらなる進歩が求められている。

近年、血液などから遺伝子等を得る新たな手法として“Liquid biopsy”が提案され、広く世界で検討されている。Liquid biopsyは、患者さんへの負担を抑え必要時に繰り返し実施できることから様々な分野で期待されており、がんゲノム医療においても同様である。癌のLiquid biopsyが対象とする血中成分は、ctDNA(血中循環腫瘍DNA)、癌細胞由来エクソソーム、CTC(血中循環腫瘍細胞)が中心である。これらの成分は、癌医療を進める上で相補的に活用でき何れも重要だが、筆者らはこれまでにCTCに注目しその単離研究を進めてきた。CTCは癌組織から血管に侵入し体内を循環する腫瘍細胞であり、“細胞”として癌の情報を包括的に有する。しかしその血中濃度は極めて低く、血液からの単離は非常に困難であり、CTC単離装置・デバイスは未だ開発途上にある。さらにCTCから遺伝子を抽出して解析する手法も未だ確立されておらず、CTCを利用して患者さんの腫瘍の遺伝子を入手することは実用化されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、癌患者さんの腫瘍由来遺伝子を必要時に繰り返し入手できるようにするために、CTCを捕捉・回収して遺伝子を抽出・精製し、その解析を確実に実施できるようにするための基本技術を確立することを目指した。

## 3. 研究の方法

CTC捕捉では、これまでに筆者らが開発した“ポリマーCTCチップ”をベースとした技術を用いた。ポリマーCTCチップでは、特殊樹脂(筆者らが開発、特許取得)からなる流路およびその中に配置したマイクロポスト(高さ、直径とも100μm程度)の表面に特定の抗体(CTC表面に特異的に発現する抗原に対する抗体)が固定でき、そこに血液などのサンプルを流して選択的にCTCを捕捉する。

一般にもこのような抗体とマイクロ流体デバイスとの組合せからなるCTC単離デバイスは多数開発されているが、それらに対し筆者らのチップは次の特長を有する。(1)透明かつ丈夫であり、臨床現場での使用が容易、(2)抗体の固定が容易で、ユーザー自身が選択した抗体を何時でも自由に固定可能、(3)低コストでの提供が可能で、既にメーカーから研究用に提供開始。特に(2)については、従来のデバイスでは製造時に抗体固定する必要があるため、抗体は実質的にEpCAM(上皮細胞接着分子;癌細胞が広く発現し血中にはない表面抗原として選択)に対する抗体のみに限定された。一方、本チップ表面では樹脂技術によりタンパク質への反応性が保持され、ユーザーはEpCAMの他にも種々の表面抗原に対する抗体を自由に導入でき、より広く癌細胞が捕捉できる。さらに筆者らは、このチップを使用して全血サンプルからのCTC捕捉を可能にする簡易システムを開発し、これまでに全国の大学病院と共同して肺癌、悪性胸膜中皮腫、乳癌、大腸癌、前立腺癌、小児癌などにおけるCTC捕捉を確認した。

このように筆者らは既に信頼性の高いCTC捕捉技術を構築しており、本研究ではこの技術をベースにCTC回収・遺伝子解析の技術確立を検討した。具体的な細胞回収方法は、従来にはないゲルを用いた確実に捕捉細胞を取り扱える次の方法を検討した。

1)細胞捕捉後のチップに、ゲルを形成するための溶液(モノマー溶液や高分子溶液)をチップに流し込む

2)溶液を刺激(重合開始あるいは温度変化など)によりゲル化させて、すべての捕捉細胞をゲル中に包埋する

3)目的細胞を含むゲル領域を切り出してチューブに回収し、その中でゲルを溶解して細胞を回収する

本回収方法実現のための主な課題は適切なゲルの開発であり、天然高分子、合成高分子を広く探索した。さらに回収が以降の遺伝子解析に影響を与えないこともポイントであり、そのための確認も行った。

## 4. 研究成果

ゲルの探索

本研究目的に最適なゲルを見出すため、まずは天然高分子からなるゲルを用いて検討した。アガロース、ゼラチン、アルギン酸などの水溶液を用意して、それらをポリマーCTCチップに流し込んだのちにゲル化させる（温度変化または予め混合した多価イオンによる）ことを試みたところ、チップ中でのゲル形成はでき

たものの適切なゲルは得られなかった。100  $\mu\text{m}$  程度の微細なチップ流路に水溶液を流し込むためには、ポリマーの分子量や濃度を下げる必要があり、その結果、生成するゲルの強度が極めて低く形態保持も不十分となったため、細胞を包埋して取り扱う媒体としては適さなかった。

次に合成高分子のハイドロゲルについて検討した。水溶性のアクリレートまたはアクリルアミドのモノマーを溶解した水溶液をポリマーCTCチップに流し込み、チップ中で重合させてゲルを形成する方法を試みた。重合を紫外線照射で行うために光重合開始を、また化学架橋でゲル化させるために多官能性モノマーをそれぞれ水溶液に混合した。可能性がありそうな数種類のモノマーについて検討したところ、アクリルアミドを用いることによりチップ中で細胞包埋に適当なゲルが得られることが分かったので、以下のとおり細胞回収に関する検討を行った。

アクリルアミドゲルを用いた細胞回収、遺伝子解析

アクリルアミドゲルにより細胞を包埋する検討を行ったところ、架橋剤として通常使用するビスアクリルアミドを用いると、細胞単離時にゲル中から直接細胞を取り出したりゲルを除去したりすることが困難となることが分かった。そこで得られたゲルを再度流動化できるよう、分解可能な架橋剤を調査したところ、ジスルフィド結合を有しチオール類で分解可能な化合物を見出したので、次のとおり細胞を用いてポリマーCTCチップからの回収以降について検討した。

食道癌細胞株である KYSE220 を蛍光標識したのちにポリマーCTCチップに捕捉し、アクリルアミド/光開始剤/分解性架橋剤/PBS からなる水溶液をチップに充填し、紫外線照射した。その後ホルダー類を外してチップのみの状態としたところ、チップ流路中にゲルが充填されその内部に KYSE220 が包埋されている様子が観察された（図1参照）。

次にチップ上でゲルに包埋された目的細胞を図2のように、ピンセットを用いてその周辺のゲルと共にチップからピックアップしてチューブ中に収納した。さらにチューブ中でゲル溶解液によりゲルを溶解して、目的細胞だけを単離できた。また別の細胞回収方法として、マイクロピペットを用いた方法を試みた。図3に示すように、目的細胞の周辺にゲル溶解液を滴下し流動化させたのちに、マイクロピペットでシングルセルとして回収したところ、問題なく細胞をチューブに収納することができた。

以上のようにして、ゲルによりポリマーCTCチップ上の細胞をシングルセルで回収する技術を確立できたが、ゲル化・溶解においては幾つかの化学物質を使用するため、それらが以降の遺伝子解析において影響がないかを評価した。評価は肺癌細胞株の PC9 を用い、このような細胞捕捉・回収ののちに既知の遺伝子変異（遺伝子欠失）が検出できるかをテストした（図4参照）。

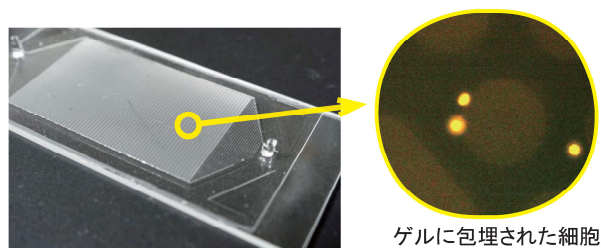


図1 チップに充填されたゲルとそこに包埋された癌細胞



図2 ピンセットを用いたゲル片ピックアップによる細胞回収

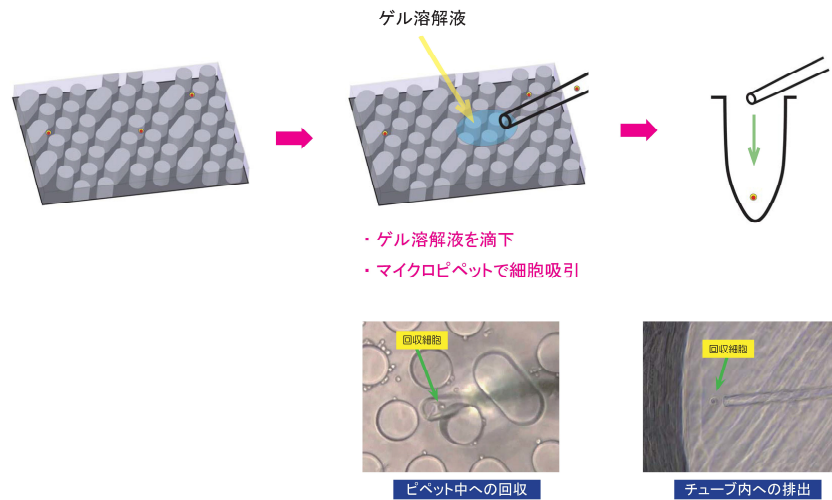


図3 マイクロピペットを用いた細胞回収

捕捉検体：PC9（ヒト肺癌細胞株、EGFR 遺伝子の exon 19 欠失変異あり）をスパイクした健康者血液  
チップ捕捉・染色：EpCAM をターゲットとしてチップで捕捉後、核、サイトケラチンを蛍光染色

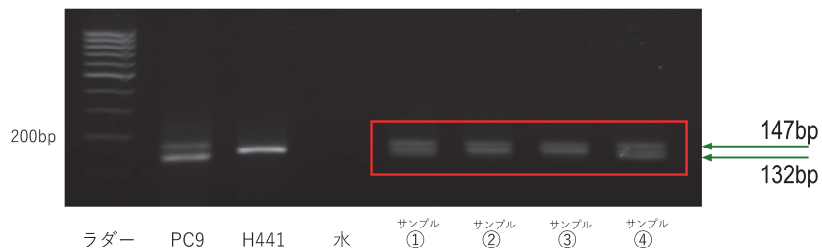


図4 回収細胞の遺伝子解析例

その結果、複数回のテストで再現性良く変異が検出できたので、ゲルに使用している化学物質は遺伝子解析に影響がないことが確認でき、ここで確立した技術の有用性が確認された。

【謝辞】

回収細胞の遺伝子解析を実施して下さった産業医科大学第2外科学 田中文啓先生、松宮弘喜先生、小山倫太郎先生に深く感謝いたします。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kanayama Masatoshi, Kuwata Taiji, Mori Masataka, Nemoto Yukiko, Nishizawa Natsumasa, Oyama Rintaro, Matsumiya Hiroki, Taira Akihiro, Shinohara Shinji, Takenaka Masaru, Yoneda Kazue, Kuroda Koji, Ohnaga Takashi, Tanaka Fumihiro	4. 巻 113
2. 論文標題 Prognostic impact of circulating tumor cells detected with the microfluidic “universal CTC chip” for primary lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1028～1037
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15255	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 -

1. 著者名 KAZUMASA KURE, MASAKI HOSOYA, TAKAE UYAMA, MIDORI FUKAYA, KIICHI SUGIMOTO, YUICHI TOMIKI, TAKASHI OHNAGA, KAZUHIRO SAKAMOTO and HIROMITSU KOMIYAMA	4. 巻 19
2. 論文標題 Using the polymeric circulating tumor cell chip to capture circulating tumor cells in blood samples of patients with colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ONCOLOGY LETTERS	6. 最初と最後の頁 2286-2294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.11335	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 -

1. 著者名 REI ISHIBASHI, SHUNTARO YOSHIDA, NARIAKI ODWARA, TAKAHIRO KISHIKAWA, RYO KONDO, AYAKO NAKADA, RYUNOSUKE HAKUTA, NAMINATSU TAKAHARA, ERI TANAKA, KAZUMA SEKIBA, TAKAHIRO SEIMIYA, TAKASHI OHNAGA, MOTOYUKI OTSUKA and KAZUHIKO KOIKE	4. 巻 18
2. 論文標題 Detection of circulating colorectal cancer cells by a custom microfluid system before and after endoscopic metallic stent placement	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ONCOLOGY LETTERS	6. 最初と最後の頁 6397-6404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2019.11047	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 -

1. 著者名 MASATOSHI KANAYAMA, RINTARO OYAMA, MASATAKA MORI, AKIHIRO TAIRA, SHINJI SHINOHARA, TAIJI KUWATA, MASARU TAKENAKA, KAZUE YONEDA, KOJI KURODA, TAKASHI OHNAGA, YUKINARI KATO, FUMIHIRO TANAKA	4. 巻 22
2. 論文標題 Novel circulating tumor cell-detection chip combining conventional podoplanin and EGFR antibodies for all histological malignant pleural mesothelioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ONCOLOGY LETTERS	6. 最初と最後の頁 1792-1074
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.12783	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深谷緑
2. 発表標題 大腸癌患者血液検体からの流体 CTC チップを用いた循環腫瘍細胞 検出
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森將鷹
2. 発表標題 凍結PBMCを用いたCTC-chipでの循環腫瘍細胞捕捉系の確立
3. 学会等名 第5回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻野紘大
2. 発表標題 CTC(血中循環腫瘍細胞)捕捉用流路内における挙動の解析
3. 学会等名 日本機械学会 北信越支部
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金山雅俊、森 將鷹、桑田泰治、米田和恵、大永 崇、田中文啓
2. 発表標題 "Universal CTC-chip"によるEMT を起こした循環腫瘍細胞の捕捉システム確立に向けた検討
3. 学会等名 第4回Liquid Biopsy 研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米田和恵、大永 崇、田中文啓
2. 発表標題 Detection of circulating tumor cells (CTCs) with polymeric CTC-chip or LiquidBiopsy™ system in primary lung cancer
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松宮弘喜
2. 発表標題 CTC遺伝解析システム構築の基礎検討～光硬化ゲルによるChip上の細胞保持～
3. 学会等名 第7回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大永崇
2. 発表標題 抗原抗体反応を利用したマイクロ流体デバイスによる 多様な癌細胞の単離・回収とゲノム解析
3. 学会等名 第40回日本ヒト細胞学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小山 倫太郎
2. 発表標題 高分子マイクロ流体デバイス CTC-chip を利用した single cell の ターゲットシーケンス
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022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
研究 分担者	藤井 努  (Fujii Tsutomu)  (60566967)	富山大学・学術研究部医学系・教授   (13201)	
研究 分担者	大塚 基之  (Otsuka Motoyuki)  (90518945)	東京大学・医学部附属病院・届出研究員   (12601)	

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
---------	---------