

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09167

研究課題名（和文）定量位相顕微鏡技術を用いた新規循環腫瘍細胞検出技術の臨床応用

研究課題名（英文）Clinical application of a novel detection technology for circulating tumor cells using quantitative phase microscopy

研究代表者

菊池 寛利（Kikuchi, Hirotoshi）

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70397389

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：定量位相顕微鏡と人工知能(AI)を用いた画像診断による全く新しい血中循環腫瘍細胞検出技術として、2次元像位相イメージングフローサイトメーター(2D-IFCM)と3D-IFCMを組み合わせた、ハイブリッド型IFCMの開発を行った。健康人および進行癌患者さんの末梢血液から抽出した有核細胞をハイブリッド型IFCM試作機を用いて観察し、得られた3D画像のAI解析を行い、担癌患者と健康人との間で比率の異なる細胞分画が存在することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中循環腫瘍細胞（CTC）は、腫瘍から遊離し血中へ浸潤した癌細胞で転移に関わるとされるが、その検出は困難であり、既存の方法では検出できないICTC分画が存在することも明らかとなっている。本研究で開発したイメージングフローサイトメーターを用いて、末梢血中の臨床上重要なCTCを漏れなく同定できれば、新たな癌の診断法となり得る。低侵襲で繰り返し検査を行うことが可能であり、癌の早期発見や癌治療の個別化などの実現が期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed a hybrid imaging flow cytometer (IFCM) using a quantitative phase microscopy, which combined the 2-dimensional (2D) IFCM and the 3D IFCM, and evaluated its clinical utility as a novel imaging diagnostic tool for the detection of circulating tumor cells. Using our hybrid IFCM and artificial intelligence analyses, we identified typical cellular fractions within peripheral blood nucleated cells, the percentage of which differed between healthy volunteers' and advanced cancer patients' blood samples.

研究分野：消化器外科学

キーワード：循環腫瘍細胞 定量位相顕微鏡 negative selection 人工知能 画像認証 3次元 イメージングフローサイトメーター

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。

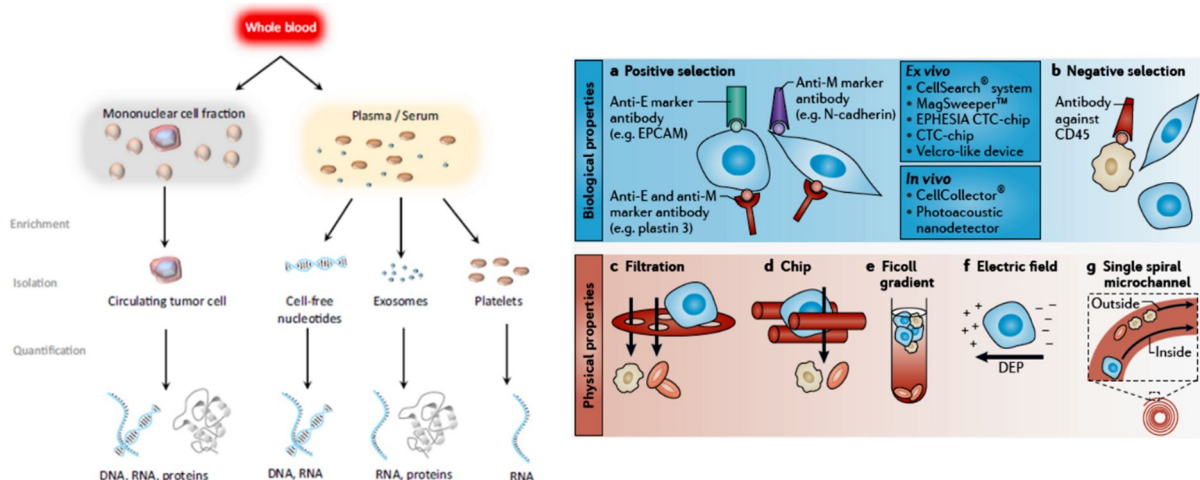
1. 研究開始当初の背景

近年の化学療法や分子標的療法などの発展により、癌治療における個別化の必要性が増しており、治療個別化の基となる biomarker の探索研究が精力的に行われている。例えば、化学療法開始前にその奏効度を知ることができれば、非奏効例に対する無効な治療による不要な毒性や時間の浪費を回避でき、より有効性の高い治療を選択することにより治療成績の向上のみならず医療費の削減も期待できる。

これまでに生検や切除検体の分子生物学的解析に基づいた biomarker に関する多くの報告があるが、治療の個別化に直結するものは僅かしかないのが現状である。その理由の一つとして癌の不均一性がある。例えば癌組織の一部の遺伝子発現変化を解析しても、癌の転移や治療抵抗性に関与する細胞集団が少なければその存在を必ずしも同定できない。特に生検による組織診断では、不均一な癌組織の全体像を捉えることが容易ではない。また、原発巣の切除検体を用いて転移巣に対する治療効果予測を行う場合、原発巣と転移巣の生物学的性質が必ずしも同一ではない点が問題となる。多発転移例では転移巣間での不均一性もあり、仮に一部の転移巣の詳細な解析を行ったとしても病変全体の治療効果を十分に予測し得ない。また、転移巣の組織採取は必ずしも容易ではない。

そこで近年、新たな癌診断法として、生検や手術で得られる組織ではなく血液検体を用いた液体生検 (liquid biopsy) の開発が急速に行われている。その有用性は低侵襲な方法で迅速かつ簡便に行えることに加え、原発巣や再発巣の組織採取が簡単に行えない場合や、多発転移など病変が複数存在する場合の全体像の把握にも利用できる点がある。また、繰り返し測定することにより、癌の存在診断や癌の形質変化の観察を経時的に行うことも可能であり、癌治療のモニタリングへの応用が期待される。Liquid biopsy は、末梢血中の有核細胞を用いる方法と血清や血漿中の成分を用いる方法に大別され、前者は循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell: CTC)、後者は循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA: ctDNA) やエクソソームなどがその代表である。

Liquid biopsy のうち CTC を用いる方法は癌細胞そのものの解析であり、癌の確定診断を行いやすいことに加え癌細胞 1 つ 1 つの質的診断が可能となるため、最も有用な手法として期待される。しかし、CTC は末梢血液中の有核細胞 $10^6 \sim 10^8$ 当たり 1 個の割合しか存在せず、その検出は困難であり現在までに様々な手法が開発されてきた。これまで最も汎用されてきた Cell Search®をはじめとする多くの手法は、EpCAM などの上皮細胞の表面マーカーを用いて CTC を同定している (positive selection)。一方、癌の転移における重要な細胞の形質変化である上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) によって生じたと考えられる間葉系細胞が CTC として存在することが示され、上皮細胞の表面マーカー依存性の従来の検出法では臨床重要な CTC の取りこぼしがあることが懸念されるようになった。そこで EMT を起こした細胞も含め CTC を漏れなく検出する方法として、血液中の有核細胞から白血球のみを除去する手法 (negative selection) を採用し、未知の CTC の取りこぼしを減らす試みが行われている。しかし negative selection 法の多くは CD45 等の細胞表面マーカーに依存しているため、抗体処理等によって CTC を含めた細胞に形態や機能の変化が生じる可能性があり、分子生物学的解析等による CTC の質的診断を行う際に問題となる。このため、細胞表面マーカー非依存性の CTC の negative selection 法が開発されているが、これまで広く臨床応用に至った方法はない。



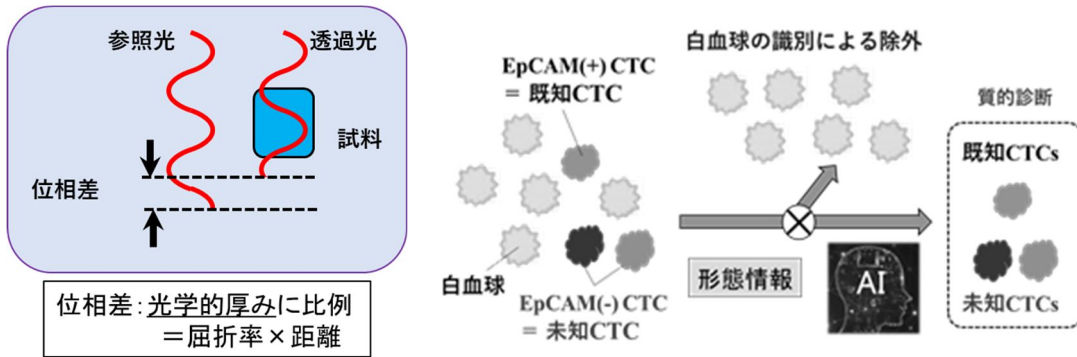
2. 研究の目的

本研究は、細胞の形態情報に基づいた、細胞表面マーカー非依存的な negative selection による、全く新しい CTC 検出方法の臨床応用を行うことを目的とする。形態学的な情報が既知である血球を定量位相顕微鏡 (quantitative phase microscopy: QPM) で観察し、その形態情報に基づいて識別し排除することによる (negative selection) 全く新しいコンセプトに基づく CTC 診断方法を確立する。

3. 研究の方法

これまで、QPM を用いた 2 次元位相イメージングフローサイトメーターによる「細胞を流す」「細胞を撮影」を実現し、さらに高分解能解析を可能とする 3 次元位相イメージングフローサイトメーターの研究開発を平行して行ってきた。これまでに開発した技術を用いて、前処理した血液サンプルを流路に流し、2 次元位相イメージングフローサイトメーターによって、白血球と非白血球を識別する。さらに非白血球と識別された細胞 (CTC 候補) を 3 次元位相イメージングフローサイトメーターで二次解析することにより、従来の上皮マーカーを用いた手法でも同定できる既存 CTC に加え、従来法では同定できなかった新規 CTC の形態情報に基づく識別の実現を目指す。

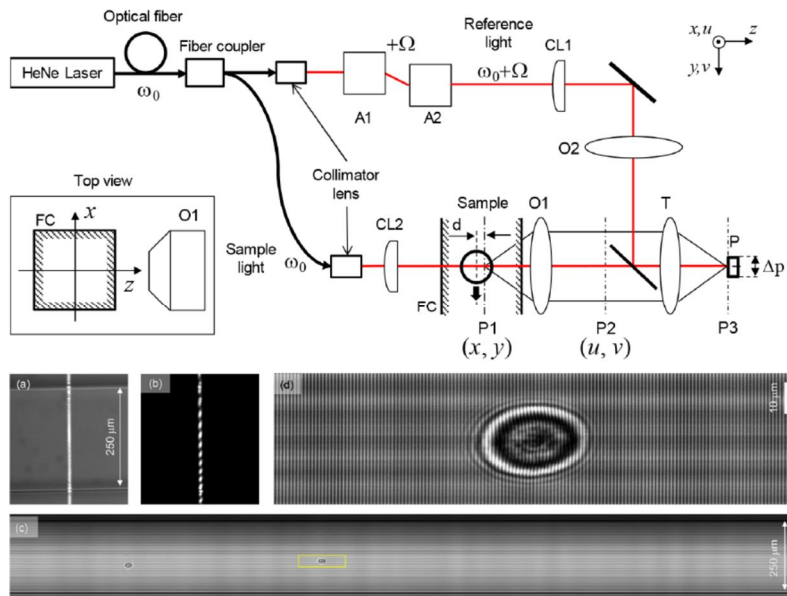
健常人および消化器癌患者の末梢血液中から有核細胞を抽出した後、2 次元位相イメージングフローサイトメーターによって流路内で細胞を観察し、得られた QPM 画像を人工知能 (AI) による画像認証システムで解析し、白血球と非白血球を識別する。非白血球と識別された有核細胞は CTC 候補として記録する。この CTC 候補には、上皮細胞の表面マーカー依存的な従来法でも検出可能な既存 CTC と、従来法では検出不能な上皮マーカー陰性の新規 CTC が混在していると考えられる。そこで、CTC 候補を 3 次元位相イメージングフローサイトメーターでより詳細に観察することにより、高詳細な微細構造の情報に基づいた CTC 候補の細分類化を試みる。



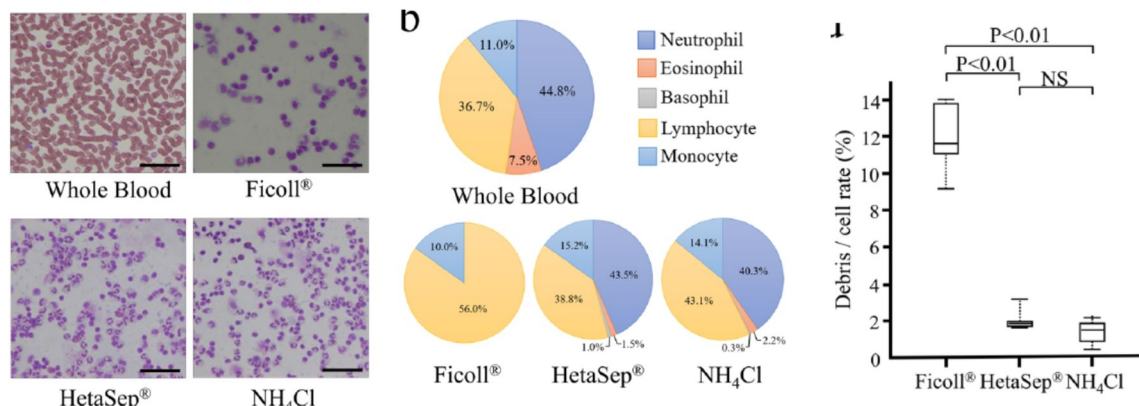
4. 研究成果

2 次元位相イメージングフローサイトメーターの開発:

臨床検体の測定に必要な大量の細胞の撮影を可能とするために、シーフロー技術による流路系と画像修正技術 (digital refocusing: DR) を開発し、細胞を流しながらの 2D QPM 画像撮影を可能とした (Yamada H, Kikuchi H, et al., Biomed Opt Express. 11:2213-23, 2020).

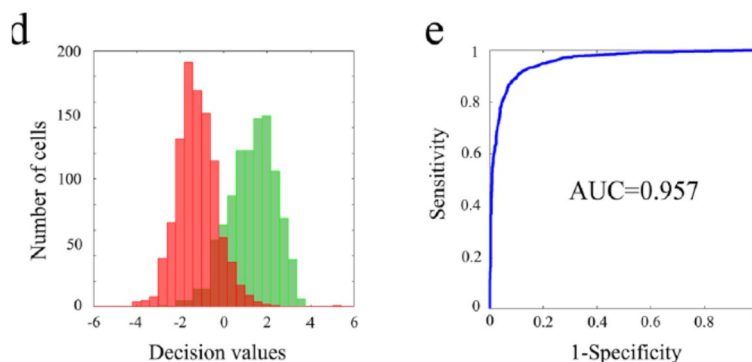


また、健常人から採取した全血を 3 つの試薬 (Ficoll®、HetaSep®、塩化アンモニウム (NH₄Cl)) で処理し、白血球の分画比率とデブリ混入量を比較したところ、白血球の分画比率とデブリ混入量の面で HetaSep®および塩化アンモニウムが従来の Ficoll®よりも優れており、処理時間や費用、マウスの血液への適用性などから塩化アンモニウムを最適な試薬として選定した。処理後の試料の細胞形態は採血後約 24 時間維持されていた。

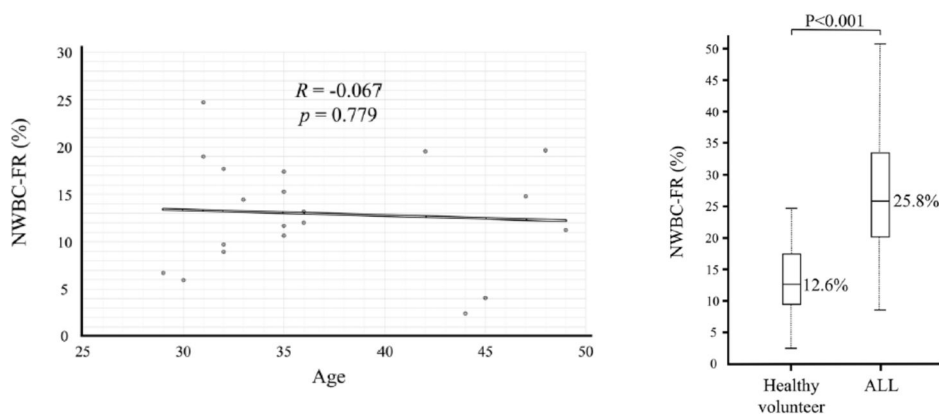


2次元像位相イメージングフローサイトメーターの臨床評価：

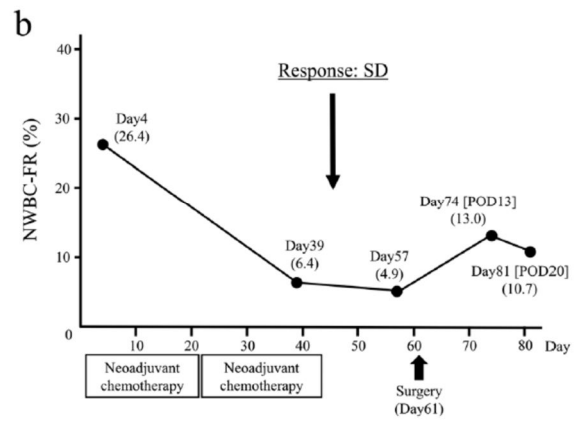
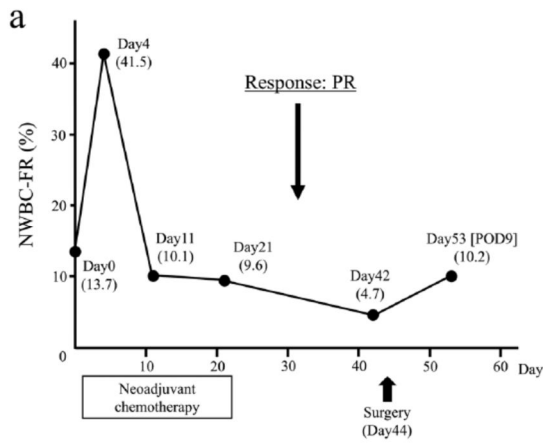
AI による細胞識別を可能にするため、機械学習用のトレーニングデータとして正常白血球 1,000 個をポジティブイメージ、がん細胞株 1,000 個をネガティブイメージとしたアルゴリズムを作成した。それぞれの形態学的特徴を視覚化し、静止系と同様に流路系でも正常白血球とがん細胞株を高い精度で識別できることを確認した。



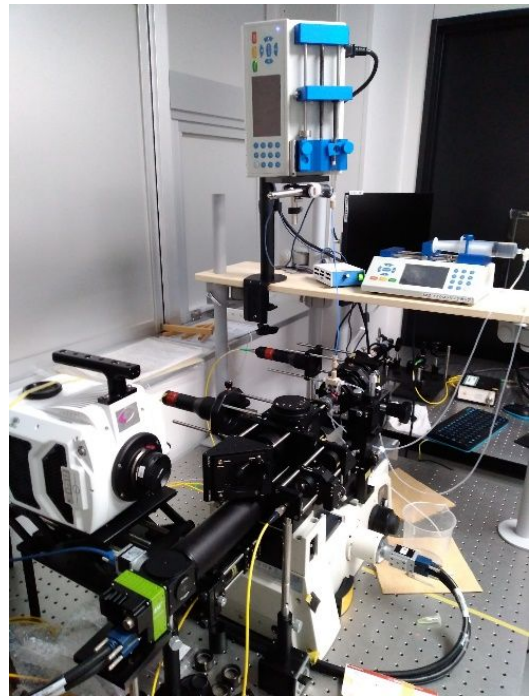
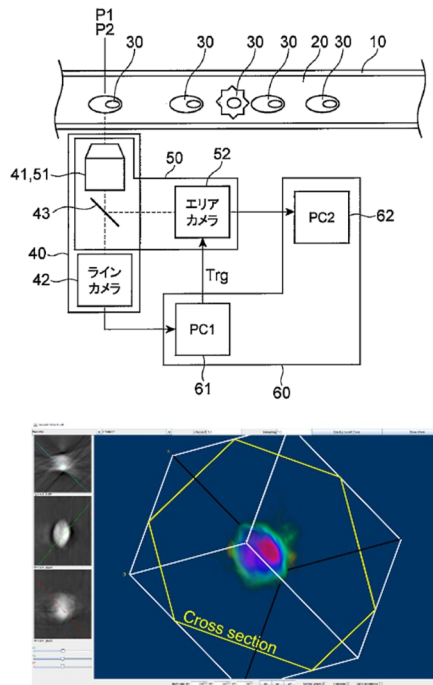
この技術を健常人 20 名と担癌患者 16 名から得られた試料に適用した。健常人 20 検体の末梢血有核細胞中の CTC 候補に相当する非白血球率 (NWBC-FR) を計測したところ、中央値 12.6% であり、年齢との間に有意な相関は認めなかった ($R=-0.067$, $p=0.779$)。一方で、担癌患者 17 検体の NWBC-FR は中央値 25.8% であり、健常人よりも有意に高かった ($p<0.001$)



さらに、術前化学療法 (NAC) 後に根治手術を施行した cStageIII 食道癌の患者 2 名について、臨床経過の中で複数の検体を採取して NWBC-FR を測定し、経時的変化を評価した。症例 1 では、NAC 開始後早期に NWBC-FR が 13.7% から 41.5% と大幅に増加し、手術の 2 日前には 4.7% に減少した。NAC の臨床的效果判定は、部分奏効 (PR) であった。一方で症例 2 では、NAC 開始後早期に 26.4% であり手術前に 4.9% に減少した。NAC の臨床的效果判定は不変 (SD) であった。両症例において、手術後早期に NWBC-FR の増加を認めた。



2次元/3次元ハイブリッド型イメージングフローサイトメーターの開発：2次元 QPM 観察で一次スクリーニングを行い、CTC の可能性が高いと判定された細胞のみを3次元 QPM 観察で二次判定するハイブリッド型定量位相フローサイトメーターの開発を行い、試作機を完成させた。また、ハイブリッド試作機で末梢血有核細胞を観察し、radiomics にて健常人と消化器癌患者の末梢血検体の QPM 画像を解析し、健常人に比べ癌患者で多い特徴量の類似した分画を同定した。



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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirotzu Amane, Kikuchi Hirotoshi, Yamada Hidenao, Ozaki Yusuke, Haneda Ryoma, Kawata Sanshiro, Murakami Tomohiro, Matsumoto Tomohiro, Hiramatsu Yoshihiro, Kamiya Kinji, Yamashita Daisuke, Fujimori Yuki, Ueda Yukio, Okazaki Shigetoshi, Kitagawa Masatoshi, Konno Hiroyuki, Takeuchi Hiroya	4. 巻 22
2. 論文標題 Artificial intelligence-based classification of peripheral blood nucleated cells using label-free imaging flow cytometry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 3464 ~ 3474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2lc00166g	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 Kikuchi H, Takeuchi H	4. 巻 28
2. 論文標題 Can Liquid Biopsy be Used to Explore Future Precision Medicine for Solid Tumors?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 8022-8024
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-021-10873-7	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 Yamada Hidenao, Hirotzu Amane, Yamashita Daisuke, Yasuhiko Osamu, Yamauchi Toyohiko, Kayou Tsukasa, Suzuki Hiroaki, Okazaki Shigetoshi, Kikuchi Hirotoshi, Takeuchi Hiroya, Ueda Yukio	4. 巻 11
2. 論文標題 Label-free imaging flow cytometer for analyzing large cell populations by line-field quantitative phase microscopy with digital refocusing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 2213 ~ 2213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/BOE.389435	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12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 菊池寛利、廣津周、羽田綾馬、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、曾根田亘、川田三四郎、村上智洋、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、森田剛文、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 産学連携による新規循環腫瘍細胞検出機器の研究開発
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣津周、菊池寛利、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、羽田綾馬、曾根田亘、川田三四郎、村上智洋、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、森田剛文、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 位相イメージングフローサイトメーターを用いたCTCの非標識下AI検出技術
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池寛利、廣津周、羽田綾馬、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、曾根田亘、川田三四郎、村上智洋、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、森田剛文、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 定量位相顕微鏡技術を用いた新規循環腫瘍細胞検出技術
3. 学会等名 第29回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大手希望、橋本二三生、山田秀直、山内豊彦、羽田綾馬、廣津周、菊池寛利、岡崎茂俊、竹内裕也、上田之雄
2. 発表標題 細胞内構造の深層学習とレディオミクスに基づく癌細胞のラベルフリー分類
3. 学会等名 日本医用画像工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣津周、菊池寛利、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、関本晃、曾根田亘、川田三四郎、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、森田剛文、坂口孝宣、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 三次元像フローサイトメトリーを用いた非標識下CTC 検出法
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣津周、菊池寛利、羽田綾馬、曾根田亘、川田三四郎、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、森田剛文、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 定量位相顕微鏡を用いた血中循環腫瘍細胞のAI検出技術
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣津周、菊池寛利、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、平松良浩、神谷欣志、坂口孝宣、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 定量位相顕微鏡を用いた非標識下CTC検出技術の臨床応用
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣津周、菊池寛利、尾崎裕介、川田三四郎、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、坂口孝宣、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 定量位相顕微鏡と画像認証システムを用いた非標識下CTC 検出法
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎裕介、菊池寛利、廣津周、山田秀直、川田三四郎、羽田綾馬、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、岡崎茂俊、森田剛文、坂口孝宣、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 細胞内構造の機械学習に基づいた非標識による血中循環腫瘍細胞検手法
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣津周、菊池寛利、曾根田亘、川田三四郎、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、森田剛文、坂口孝宣、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣津周、菊池寛利、尾崎裕介、山田秀直、山下大輔、岡崎茂俊、川田三四郎、松本知拓、平松良浩、神谷欣志、森田剛文、坂口孝宣、今野弘之、竹内裕也
2. 発表標題 定量位相顕微鏡を用いた新たな非標識下CTC検出法
3. 学会等名 JDDW 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirotoshi Kikuchi, Amane Hirotsu, Hidenao Yamada, Daisuke Yamashita, Shigetoshi Okazaki, Yukio Ueda, Ryoma Haneda, Yoshihiro Hiramatsu, Kinji Kamiya, Hiroyuki Konno, Hiroya Takauchi
2. 発表標題 Label-free classification of live cells using quantitative phase microscopy images for negative selection of circulating tumor cells
3. 学会等名 The 8th International Congress on Cancer Metastasis (国際学会)
4. 発表年 2019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	竹内 裕也 (Takeuchi Hiroya) (20265838)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	廣津 周 (Hirotzu Amane)		
研究協力者	羽田 綾馬 (Haneda Ryoma)		
研究協力者	小嶋 忠浩 (Kojima Tadahiro)		

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