

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22080

研究課題名(和文)血小板が誘起する血中循環腫瘍細胞の転移性変化の計測技術の確立

研究課題名(英文) Development of monitoring system of platelet-induced metastatic property of circulating tumor cells

研究代表者

吉野 知子 (Yoshino, Tomoko)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30409750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：血小板とがん細胞の相互作用はがんの血行性転移において重要な役割を持つと考えられているが、転移の原因細胞である血中循環腫瘍細胞(Circulating Tumor Cell: CTC)と血小板との相互作用についてはほとんど明らかとなっていない。本研究ではがんの血行性転移に関連するCTCと血小板の相互作用解析に向けて、研究代表者がこれまでに確立してきたCTCの解析技術を基に、がん患者末梢血から血小板が付着したCTCの分離・同定方法を確立し、血小板結合の有無による細胞形状の変化を計測する技術を構築した。本技術により単一細胞レベルで血小板結合量と細胞変形能を同時に解析することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管内に進入したがん細胞は通常、ほぼ全ての細胞が死に至るが、わずかながん細胞が高転移性のがん細胞へと分化すると考えられており、この細胞分化に血小板が関与することが示唆されている。しかしながら、がん患者血中から血小板に結合したCTCを分離することは技術的に困難であり、その解析は殆ど行われていない。本研究により確立した計測技術は、CTCと血小板との結合やそれに伴うCTCの細胞形状変化を捕らえることができる画期的な方法であり、血小板がCTCの悪性化に関わる直接的な証拠を獲得できる可能性を秘めている。よって、本研究は血行性転移機構の解明に寄与することができる極めて重要な研究ツールを提供したと言える。

研究成果の概要(英文)：Interaction between platelets and cancer cells is thought to play an important role in the hematogenous metastasis of cancer. However, the interaction between platelets and circulating tumor cells (CTCs), the carriers of metastasis, is largely unknown. In this study, we established a method to isolate and identify platelet-associated CTCs from the peripheral blood of cancer patients, and developed a technique to measure changes in cell shape depending on whether platelets are bound or not, in order to analyze the interaction between CTCs and platelets related to hematogenous metastasis of cancer. It was found that this technology can simultaneously analyze the amount of platelet binding and cell deformability at the single cell level.

研究分野：生物工学

キーワード：血中循環腫瘍細胞 血小板 Microcavity array

1. 研究開始当初の背景

がんの血行性転移には血小板が促進的な役割を担っていることが明らかとなり、がん細胞と血小板との細胞間相互作用が重要な創薬標的となっている。さらに、近年、血液中に流れる血中循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cell: CTC) が血小板と結合することで、血流に基づくシェアストレスやナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) からの攻撃を免れ、血中でも生存できることが示唆されている (図1)。このことから、血小板と CTC との細胞間相互作用を理解することで、がんの血行性転移の解明につながることを期待される。しかしながら、CTC と血小板との細胞間相互作用に関する研究は、その解析手法が確立されていないため、ほとんど実施されていない。

CTC をがん患者血中から分離する技術はこれまでに数多く報告されており、ゲノムやトランスクリプトーム解析によりその特徴が少しずつ明らかになっている。一方で、これらの分離には CTC の細胞表面マーカーの1つである上皮細胞接着分子 (EpCAM) に対する抗体を用いた磁気分離による方法が主流であるため、血小板に覆われた CTC を分離することが困難である。また、血小板が付着した CTC は上皮間葉転換 (EMT: Epithelial Mesenchymal Transition) が引き起こされていることが考えられており、EMT 化により EpCAM の発現量が大幅に低下していることも分離効率の低下の要因と考えられる。血小板が付着した CTC を捉えた研究報告は極めて少なく、血小板と CTC との相互作用解析には、この様な細胞を効率的に分離できる技術の確立が急務である。

研究代表者は CTC の簡易、迅速な回収を目的とした単一細胞捕捉デバイスである Microcavity array (MCA) の開発を行ってきた (Hosokawa et al., *Anal. Chem.*, 2013)。MCA とは、Ni 製基盤に微細貫通孔を多数有するデバイスであり、細胞をサイズ及び変形能依存的に濃縮し、95%以上の回収率で細胞を MCA 上に捕捉することが可能である (Negishi et al. *Biosens. Bioelectron.*, 2015)。本手法は、抗体非依存的に末梢血から CTC を回収することができるため、血小板が付着した CTC の回収も可能であると想定された (図2)。

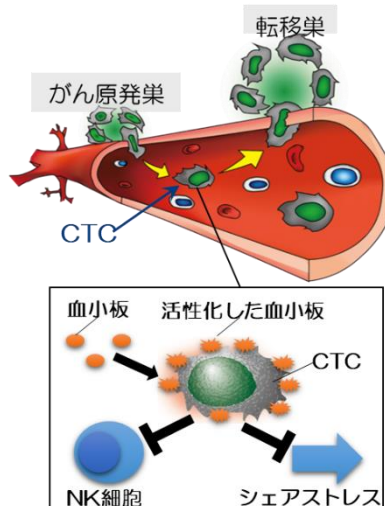


図1 CTCと血小板の結合

2. 研究の目的

そこで本研究では、がん患者末梢血から血小板が付着した CTC の分離・同定方法を確立し、血小板結合の有無による細胞形状の変化を計測する技術を構築した。具体的には、(1) MCA を用いて細胞懸濁液からのがん細胞の濃縮と1細胞当たりの血小板結合量の定量方法を確立し、(2) 単一がん細胞上の血小板結合量と悪性度との関連を考察した。また、(3) 同一がん細胞の細胞形状変化を計測するために、MCA を用いて微細貫通孔内の伸長距離計

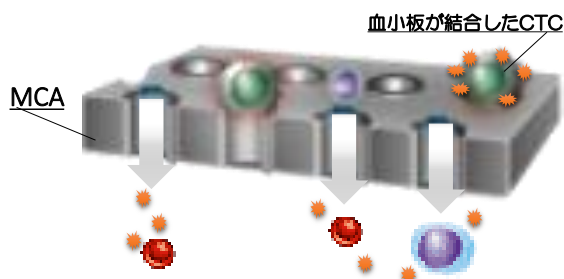


図2 Microcavity array (MCA) を用いた血小板が付着したCTCの回収

測による形状変化を評価した。さらに(4) がん患者由来の CTC の血小板結合の有無を血小板関連遺伝子の発現確認により考察した。本技術により、血小板と CTC の相互作用による細胞形状変化や細胞内発現変化を単一細胞レベルで計測可能な技術を提供でき、血小板結合と CTC の転移性との関連性に関する新たな知見が得られることが期待される。

3. 研究の方法

がん細胞の捕捉には微細貫通孔の孔径 3, 8 μm 、孔間距離 25, 60, 125 μm の Ni 製または PET 製 MCA を用いた。MCA 下部には、poly(methyl methacrylate) (PMMA) 素材の型枠と、シリコンチューブと polydimethylsiloxane (PDMS) からなる、溶液を吸引するラインを配した下部流路を作製し、細胞捕捉デバイスを作製した。細胞捕捉デバイスはペリスタリックポンプと接続して使用した。使用したがん細胞株として、乳がん細胞株 MDA-MB-231、胃がん細胞株 NCI-N87、SNU-1、肺がん細胞株 NCI-H1975 を用いた。血小板が結合したがん細胞は、ADP により活性化した血小板を各種がん細胞と混合して調整した。細胞懸濁液からの MCA 上でのがん細胞の濃縮条件の検討、MCA 上に捕捉されたがん細胞表面に結合した血小板量の計測条件の検討、及び MCA 上の貫通孔に挿入された細胞の変形能計測条件を決定した。MCA 上に捕捉された細胞の観察には、蛍光顕微鏡に加え共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて 3D 解析も実施した。さらに、がん患者由来の CTC への血小板への結合についても解析を行い、総合考察を行った。

4. 研究成果

(1) 単一細胞レベルでの血小板結合量の計測方法の確立

CTC 表面に付着した血小板数の計測に先駆けて、モデル CTC として乳がん細胞株 MDA-MB-231 への血小板の結合条件を検討した。その結果、アデノシン 5'-リン酸 (ADP) 添加により、血小板結合量が増加することが確認された。そこで、蛍光染色した MDA-MB-231 を血小板と 1:200 の割合で混合し、細胞懸濁液を MCA 上に導入して捕捉した。さらに抗 CD61 (血小板マーカー) 抗体にて血小板を染色し、MCA 上を蛍光イメージングした結果を図 3 に示す。MCA 上に単一がん細胞が捕捉され、一部の細胞において、血小板の結合が確認された。また、がん細胞に接着していない遊離血小板が MCA のフィルター機能によって取り除かれていることが確認された。この結果より、血小板が接着した単一がん細胞を MCA で検出可能であることが示された。

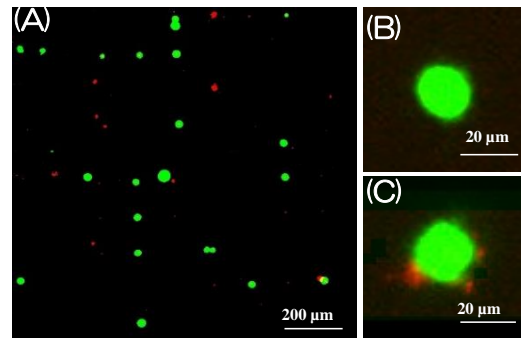


図3 血小板が付着したがん細胞の観察。
(A)MCA上の細胞アレイ写真、(B)血小板が付着していないがん細胞、(C)血小板が付着したがん細胞
緑：がん細胞、赤：血小板

(2) 単一がん細胞上の血小板結合量と悪性度との関連性評価

上記と同様のプロトコルにより悪性度の異なるヒト胃がん細胞株 (SNU-1、NCI-N87 悪性度: SNU1>NCI-N87) を血小板とインキュベートし、MCA で捕捉及び染色を行った。蛍光顕微鏡によりがん細胞を観察し、血小板が接着したがん細胞数及び細胞当たりの血小板の接着面積を計測した。MCA 上に捕捉されたすべてのがん細胞のうち、血小板が接着したがん細胞の割合を算出することで、2 種の胃がん細胞に対する血小板の接着性を評価した。その結果、NCI-N87 では $1.1 \pm 0.1\%$ 、SNU-1 では $3.9 \pm 0.7\%$ の血小板の接着が確認され、胃がん細胞に対する血小板の接着性は細胞種によって異なることが示された。さらに、1 細胞ごとの血小板の接着性を評価するために、各細胞に接着した血小板の面積を算出した。その結果、NCI-N87 と比較して、SNU-1 において 1 細胞当たりの血小板の接着面積が大きい細胞がより多く存在することが確認された。SNU-1 は NCI-N87 と比べて上皮性遺伝子の発現が低く、悪性度が高いことが知られている。以上より、胃がん細胞において悪性度が高いほど、血小板の接着性が高くなることが示唆された。

(3) MCA 上での血小板結合と細胞形状変化との同時計測方法の検討

これまでに MCA 上に細胞を集積化した後、イメージング解析に基づいて細胞変形能を計測し、正常細胞とがん細胞の判別が可能であることを示している (Yoshino et al. *Anal. Biochem.*, 2017)。本システムは、MCA 上の細胞の断面図から微細貫通孔内に陥入した部位を検出し、その距離を伸長距離として計測することで細胞形状変化を計測することが可能である。本研究では、MCA を用いて血小板の結合量に依存した CTC の形状変化を計測することを目指し、本研究期間内では、がん細胞内での微細な変化を本システムで計測出来るかの実証を行った。具体的には上皮性がん細胞 (NCI-H1975) に対し、アクチン脱重合処理を行い、処理前後での細胞形状変化を微細貫通孔内の陥入部位の計測により評価出来るかを検討した。その結果、処理後の平均細胞伸長距離は、 $6.0 \pm 1.9 \mu\text{m}$ であるのに対して、未処理のコントロールにおける細胞伸長距離は $4.9 \pm 1.5 \mu\text{m}$ であった。アクチンの脱重合により細胞変形能が高まり、有意に細胞伸長距離が増加することが確認された。このことから、細胞の僅かな形状変化を伸長距離として計測することが可能であり、また上述の通り MCA 上で血小板計測も同時に可能であることから、血小板の結合量に応じた細胞形状変化を観察できると考えられた。以上の様にフィルター型デバイスである MCA を用いることで血小板を結合した CTC の回収、CTC 上の血小板結合量、及び細胞形状変化を計測可能な技術が確立できた。

(4) 血小板関連遺伝子の発現確認による CTC への血小板結合の評価

研究代表者はこれまでに末梢血から高効率な CTC 回収技術、単一細胞レベルでの遺伝子解析技術を確認し、がん患者血液を用いた臨床試験を実施してきた。胃がん患者の末梢血から分離した CTC の単一細胞トランスクリプトーム解析の結果から、血小板由来の遺伝子発現が確認された。しかしながら、この血小板由来の遺伝子発現が CTC に結合した血小板であるか、または単一 CTC を分離する際に血小板が混入してきたのかは明らかになっていなかった。そこで本研究では、臨床試験で実施した CTC 分離プロトコルの精度確認を行った。蛍光染色した胃がん細胞株を健常者末梢血にスパイクし、MCA を用いて表面抗原に依存しないがん細胞の回収を行った。さらに、単一細胞を簡便に分離する Gel-based cell manipulation (GCM) 法による単一 CTC の分離と全トランスクリプトーム増幅を行った。この増幅産物を用いて RNA-seq

解析により、分離した単一胃癌細胞由来の発現マーカーを確認した。その結果、擬似的に末梢血にスパイクした胃癌細胞からは、血小板に由来するマーカー遺伝子の発現は見られなかった。この結果より、本プロトコルにおいて血小板の非特異的な吸着は見られないことが確認された。胃癌患者末梢血から分離された CTC においては、血小板マーカー遺伝子の発現が確認されていることより、血小板が付着した CTC を MCA で回収出来ていることを強く支持する結果と言える。上記で確立したプロトコルにより、血小板が結合した CTC の単一細胞分離が可能であり、CTC への血小板の結合、細胞形状変化に加え、細胞内の生化学情報も取得することが出来る技術の確立が行えた。以上より、本研究を進めていくことにより、血小板と CTC の相互作用の解析が進むことが期待され、学術的、社会的に意義がある研究であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryo Negishi, Hyuga Saito, Reito Iwata, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino	4. 巻 20
2. 論文標題 Performance evaluation of a high-throughput separation system for circulating tumor cells based on microcavity array	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eng. Life Sci.	6. 最初と最後の頁 485-493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/elsc.202000024	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 吉野 知子、根岸 諒	4. 巻 38
2. 論文標題 CTC回収技術の開発とシングルセル核酸解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharma Medica	6. 最初と最後の頁 13-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34449/J0001.38.07_0013-0017	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉野知子
2. 発表標題 腫瘍内不均一性の解析に向けたCTC のシングルセル核酸解析技術
3. 学会等名 第4回Liquid Biopsy研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoko Yoshino
2. 発表標題 Characterization of circulating tumor cells in gastric cancer patients based on single-cell transcriptome analysis
3. 学会等名 The 29th Hot Spring Harbor International Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永田 涼子,根岸 諒,田中 剛,吉野 知子
2. 発表標題 Microcavity Arrayを用いた単一細胞変形能計測の基づくがん細胞のプロファイリング法の確立
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉野 知子
2. 発表標題 希少細胞のシングルセル遺伝子解析技術の開発と応用展開 ~ 血中循環腫瘍細胞から環境微生物の解析まで ~
3. 学会等名 2020年度第4回ExCELLSセミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryo Negishi, Hyuga Saito, Tsuyoshi Tanaka, Yoshino Tomoko
2. 発表標題 Development of High Throughput Single-cell Isolation System for Circulating Tumor Cells Based on Digital Micromirror Devices
3. 学会等名 PRiME2020
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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