

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：83205
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：20K12706
研究課題名（和文）循環腫瘍細胞・セルクラスター・セルフリー核酸を調べつくすためのシンプルな分離法

研究課題名（英文）A simple separation method for investigation of circulating tumor cells, cell clusters, and cell-free nucleic acids

研究代表者
高田 耕兎（Takata, Koji）
富山県産業技術研究開発センター・その他部局等・主任研究員

研究者番号：40530621
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）：リキッドバイオプシーの検体から循環腫瘍細胞、セルクラスター、セルフリー核酸を分離することができれば、解析技術の進歩をそれぞれに適用できるようになる。そのために必要となるのがシンプルな分離法である。サイズ分離の閾値が2.3、2.6、10、20、30 μm のチップ、カートリッジ、シンプルなデバイスを開発した。これによりカートリッジ交換で様々な閾値を検討できるようになった。閾値が30 μm のチップで腎がん由来細胞の分離実験を行い、細胞とセルクラスターを分離することができた。閾値が2.3 μm のチップで赤血球と血漿の分離を検討し、赤血球はこのチップ内で2.3 μm より小さい粒子としてふるまうことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

例えばPCR検査のような解析技術は日進月歩で進化している。一方、調べようとする検体に含まれる様々な成分を分けずに解析するよりも、成分ごとに分けてから解析したほうが得られる情報が多い。本研究では、血液中の癌細胞、セルクラスター、核酸をサイズで分離するためのシンプルなデバイスを開発した。このデバイスは様々な解析の前処理として応用できる可能性があり、学術的にも社会的にも意義がある。

研究成果の概要（英文）：If circulating tumor cells, cell clusters, and cell-free nucleic acids can be isolated from liquid biopsy samples, the latest analysis techniques can be applied to each. We developed a simple separation method that is necessary for this purpose. We developed chips, cartridges with size separation thresholds of 2.3, 2.6, 10, 20, and 30 μm , and also developed simple devices. This makes it possible to adapt to various threshold values by replacing the cartridges. We performed a separation experiment on kidney cancer-derived cells using a chip with a threshold of 30 μm , and were able to separate cells and cell clusters. We investigated the separation of red blood cells and plasma using a chip with a threshold of 2.3 μm , and showed that red blood cells may behave as particles smaller than 2.3 μm within the chip.

研究分野：マイクロ流体デバイス

キーワード：循環腫瘍細胞 マイクロ流体デバイス セルクラスター

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リキッドバイオプシーは身体への負担が少ない液性検体(血液など)を診断等に利用する技術である。リキッドバイオプシーの検体から循環腫瘍細胞、セルクラー、セルフリー核酸を分離してそれぞれを調べることができれば、次世代シーケンスをはじめとした解析技術の進歩をそれぞれに適用できるようになり、癌の不均一性等をより深く理解することが可能になると考えられる。その実現のために必要となるのがシンプルな分離法である。

2. 研究の目的

血液などの液性検体から、循環腫瘍細胞だけでなく、セルクラー、セルフリー核酸を分離するためのシンプルなチップとシンプルなデバイスを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

<チップ作製>

マイクロ流路チップは、Deterministic Lateral Displacement(DLD)の原理(Huang et al., *Science*, 2004, **304**, 987-990)に基づいて設計した。Fig.1に示すように、流路には一定の規則に基づいて柱が並んでおり、ここに粒子を流すと、小さい粒子は流れの方向に沿って進み、大きい粒子は柱によって流れの方向に沿う進行を妨げられる結果として流れの方向に対し斜めに進む。サイズ分離の閾値である Critical diameter (D_c)は柱の間隔 g と \tan から求められる(Zeming et al., *Sci. Rep.* 2016, **6**, 22934)。設計したパターンをフォトマスクを作製し、そのフォトマスクを用いてシリコン基板に塗布したレジストを露光、現像し、そのシリコン基板をICPドライエッチング装置(住友精密工業 MUC-21 ASE-SRE)によりエッチングしてシリコン製鋳型を作製した。次にシリコン製鋳型を用いて微細パターンを有するチップを射出成形した。微細パターンを有するチップと別に成形したフタとを貼り合わせるによりマイクロ流路チップとした。

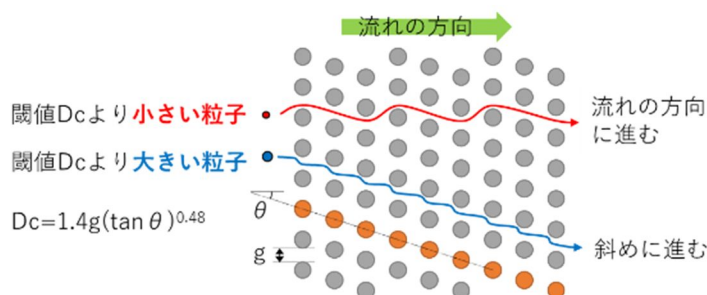


Fig. 1 Deterministic lateral displacement (DLD) principle.

<分離実験>

セルクラーの分離実験では、培養細胞として、腎がん由来細胞株である OS-RC-2(RCB0735)を使用した。10% ウシ胎児血清 (FBS) 含有 RPMI1640 培地にて、5%二酸化炭素存在下、37 で接着培養または浮遊培養した。培養した細胞をトリプシン処理で回収し、実験に用いた。血液は健康者から翼状針を用いて採血した。

血球の分離実験では、血液はラットから次のように採取した。Wistar 系 雄ラット(6-10 週齢)を7日間以上予備飼育し、イソフルラン麻酔下、23G 針および2.5 mL シリンジを使用して腹部大動脈より採血を行い、抗凝固剤である EDTA 二カリウム塩が添加された真空採血管(テルモ)に3 mL ずつ注入後、転倒混和したものを実験に用いた。

4. 研究成果

<チップの開発>

以前の研究(bao et al., *Oncol. Lett.*, 2018, 15 3061-3067)で、DLDの原理を利用したマイクロ流路チップを開発し、血液から培養がん細胞を分離できることを示した。このチップは D_c が $10\ \mu\text{m}$ (柱の直径が $70\ \mu\text{m}$ 、柱間のギャップが $30\ \mu\text{m}$ 、 \tan が 0.05) のチップである。また、同じ構造のチップを射出成形により作製した(Fig. 2a)。マイクロ流路チップの D_c を変えることにより、セルクラーを分離するためのチップ、血球と血漿を分離するためのチップを新たに

開発した。まず、セルクラスターを分離するために、 D_c が大きいチップを作製した。具体的には D_c が $20\ \mu\text{m}$ (柱の直径が $100\ \mu\text{m}$ 、柱間のギャップが $60\ \mu\text{m}$ 、 \tan が 0.05) のチップ、 D_c が $30\ \mu\text{m}$ (柱の直径が $100\ \mu\text{m}$ 、柱間のギャップが $90\ \mu\text{m}$ 、 \tan が 0.05) のチップについて射出成形により作製した。チップの外観写真、流路の顕微鏡写真を Fig.2b,c に示す。次に、血球と血漿を分離するために、 D_c が小さいチップを作製した。具体的には D_c が $2.3\ \mu\text{m}$ (柱の直径が $35\ \mu\text{m}$ 、柱の間隔が $15\ \mu\text{m}$ 、 \tan が 0.0125) のチップ、 D_c が $2.6\ \mu\text{m}$ (柱の直径が $35\ \mu\text{m}$ 、柱の間隔が $15\ \mu\text{m}$ 、 \tan が 0.0125) のチップについて射出成形により作製した。チップの外観写真、流路の顕微鏡写真を Fig.2d,e に示す。Fig.2 に示した各チップは柱の直径や間隔が大きく異なるが、いずれのチップも問題なく成形することができた。柱の直径や間隔が大きく異なる流路は、同様の圧力で送液した場合の流量が大きく異なる。本研究の開始時は、1つのチップで2つ以上の閾値の流路を持つチップの開発を視野に入れていたが、このように流量が大きく異なる流路を1つのチップに組み込むことは容易でなく、また、汎用性の低いシステムになると考えられる。そのため、チップごとに1つの閾値を割り当て、チップを簡単に交換できるようにして様々な閾値に対応するシステムを開発することにした。

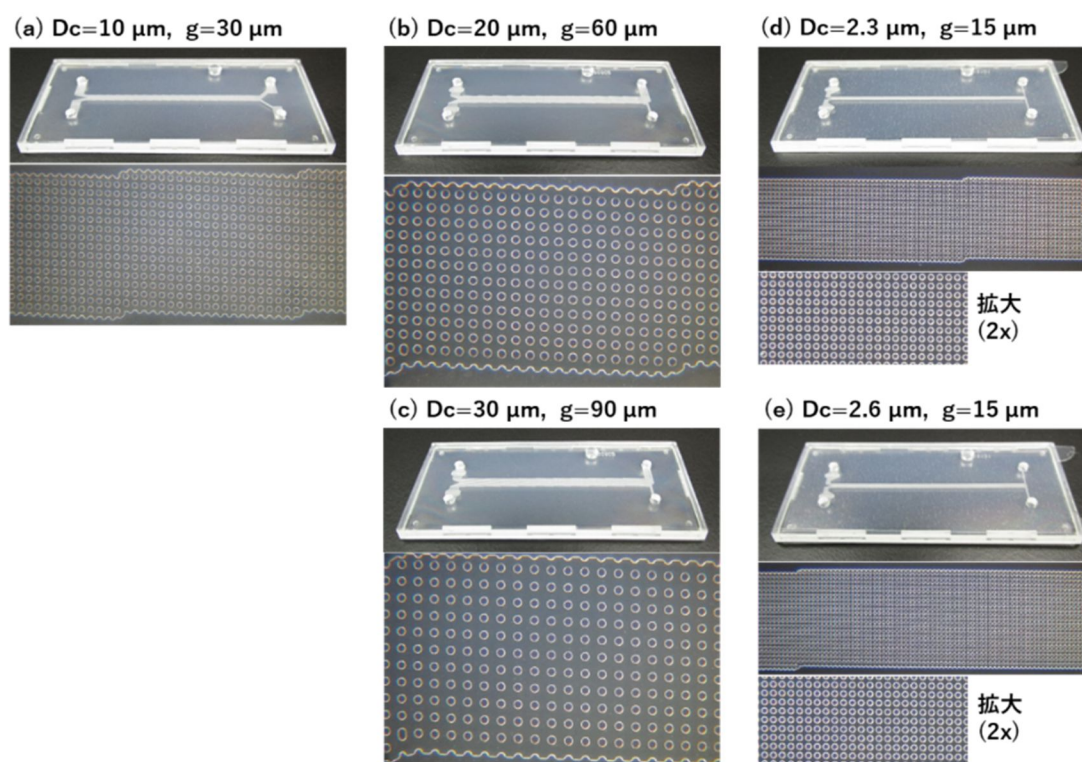


Fig. 2 Pictures of microfluidic chips and microscopic images of the channels with different D_c . (a) $D_c = 10\ \mu\text{m}$, (b) $D_c = 20\ \mu\text{m}$, (c) $D_c = 30\ \mu\text{m}$, (d) $D_c = 2.3\ \mu\text{m}$ and (e) $D_c = 2.6\ \mu\text{m}$.

<カートリッジの開発と手押しデバイスの開発>

チップを簡単に交換できるようにするため、チップと液だめを一体化したカートリッジを開発した。Fig.3 に示すように、液だめとチップを一体化する部品に 5 種の閾値のチップをそれぞれ入れて封止成形することにより、5 種の閾値を持つカートリッジを作製した。これにより、カートリッジ交換するだけで、セルクラスター、細胞、セルフリー核酸 (を含む血漿) の分離実験に対応することができるようになった。

カートリッジに送液するための手押しデバイスを開発した。手押しデバイスは電力が使えない環境でも使用可能であり、安価であるという利点がある。Fig.4 に示すように、カートリッジの液だめ (X と Y) に対して、シリンジ Z を手押しして圧力を供給する。具体的には、Z を押しと X と Y に空気が供給される。次に、Z を引くと、逆止弁により、X と Y の空気を保ったまま、Z に大気から空気が取り込まれる。そして、Z の押し引きを繰り返すことで、X と Y の圧力が逐次的に高まる。手押しが困難になるまで押し引きすると、X と Y の圧力は $0.26\ \text{MPa}$ であった。そして液を 5 分間流した後の X と Y の圧力は $0.23\ \text{MPa}$ であり、圧力の低下は限定的であった。また、 D_c は g と \tan で決まるので流速の影響は小さい。そのため、手押しでも十分な性能を確保できると考えられる。開発した手押しデバイスは構造がシンプルで安価である。デバイスを複数用いて、セルクラスター、細胞、セルフリー核酸 (を含む血漿) を連続的に分離するといったことも可能になると考えられる。

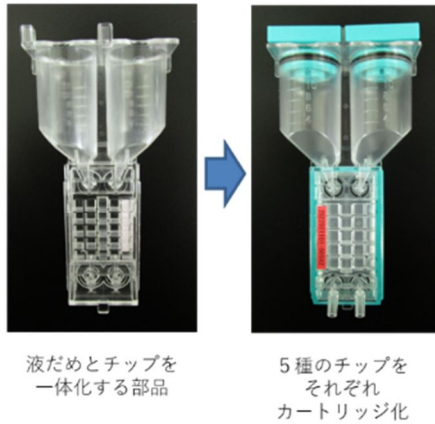


Fig. 3 Pictures of the reservoir part and the cartridge.

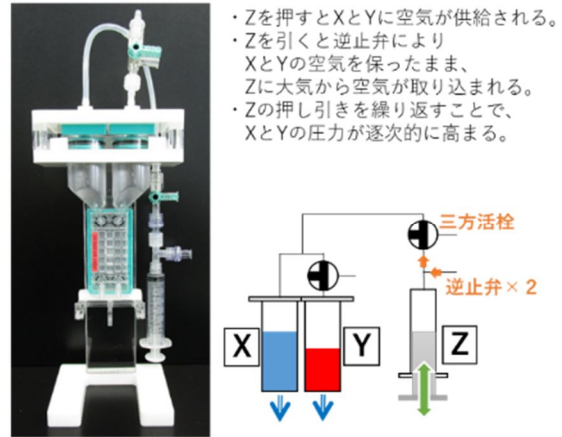


Fig. 4 Picture and illustration of the manual size-sorting device.

< 電動デバイスの開発 >

電力が使える環境（研究室等）でカートリッジに送液するための電動デバイスを開発した（Fig.5）。高さ192、奥行120、幅95ミリのコンパクトなデバイスである。中には、小型の電動ポンプ、圧力スイッチ、電磁弁、電気回路などがあり、上面には「プライミング」ボタンと「ソーティング」ボタンがある。カートリッジの左側の液だめXにバッファーを入れて「プライミング」ボタンを押すと、チップ内をバッファーで満たすプライミングが自動で行われる。具体的には、左側の液だめに圧をかけ、右側の液だめへバッファーを一定時間送った後、両方の液だめに圧をかけることでチップ内の空気を追い出す。その後右側の液だめYに試料をいれ「ソーティング」ボタンを押すと、一定時間サイズ分離が実行され、左側の出口からサイズの大きな粒子が、右側の出口からサイズの小さな粒子が回収される。開発した電動デバイスはシンプルかつコンパクトである。デバイスを複数用いて、セルクラスター、細胞、セルフリー核酸（を含む血漿）を連続的に分離するといったことも可能になると考えられる。

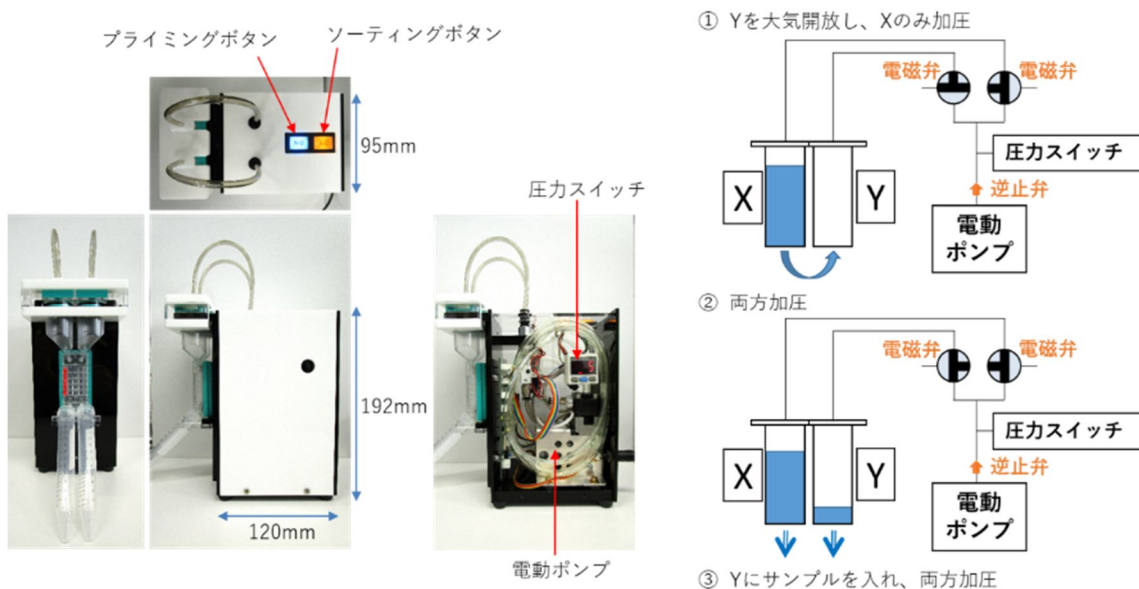


Fig. 5 Pictures and illustrations of the automated size-sorting device.

< 分離実験 >

サイズ分離の閾値が $30\mu\text{m}$ と $2.3\mu\text{m}$ のチップを用いて分離実験を行った。まず、閾値が $30\mu\text{m}$ のチップを用いてセルクラスターと単一細胞との分離を検討した。腎がん由来の培養細胞の培養液をサンプルとして分離実験を行ったところ、右側の Output（閾値より小さい粒子が回収される）では単一の細胞が見られる（Fig.6a）のに対し、左側の Output（閾値より大きい粒子が回収される）ではセルクラスターが見られた（Fig.6b）。また、腎がん由来の培養細胞の培養液を

血液に混ぜたサンプルで分離実験を行ったところ、左側の Output (閾値より大きい粒子が回収される) ではセルクラスターが見られた (Fig. 6c)。これらのことから、サイズ分離の閾値が 30 μm のチップで単一の細胞とセルクラスターとを分離できる可能性が示された。一方、2 日間浮遊培養することにより作成した 100 μm 以上のサイズのセルクラスターを含む培養液を血液に混ぜて分離すると、セルクラスターの分離は可能であるが回収率が低かった。閾値 30 μm のチップは柱間隔が 90 μm であるため、100 μm 以上のセルクラスターがチップに捕捉されたものと考えられる。これらのことから開発したチップでは柱間隔 90 μm より小さいサイズのセルクラスターを分離できる可能性が示された。

次に、閾値が 2.3 μm のチップで赤血球と血漿の分離を検討した。ラットから採取した血液を 2 倍希釈したサンプルを分離したところ、左側の Output (閾値より大きい粒子が回収される) にも赤血球が見られるが、右側の Output (閾値より小さい粒子が回収される) のほうがより高濃度の赤血球が見られた (Fig. 7a)。また、ラットから採取した血液を 10 倍希釈したサンプルを分離したところ、左側の Output にはほぼ赤血球は見られなかった (Fig. 7b)。これらのことから赤血球 (直径約 8 μm 、厚み約 2 μm) は開発したチップの中では 2.3 μm より小さい粒子 (厚み程度の大きさの粒子) としてふるまう可能性を示している。今後、赤血球のこの性質を利用した分離方法の検討が可能になると考えられる。

本研究では様々な閾値を持つチップを開発してカートリッジ化し、カートリッジ交換によって様々な閾値でのサイズ分離ができるデバイスを開発した。これによりセルクラスター、細胞を連続的に分離することが可能になったと考えられる。また、この分離法は他にも応用の可能性がある。例えば本研究で開発した閾値 20 μm のカートリッジを用いて、分化誘導前の細胞と分化誘導後の細胞を分離する検討を行った。このように本研究で開発したシンプルなデバイスを利用して、今後様々なサイズ分離の応用ができるようになった。

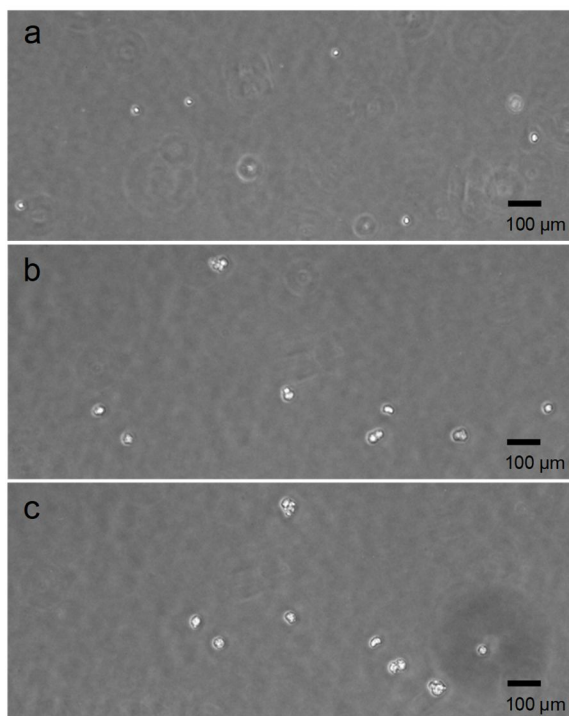


Fig. 6 Microscopic images of (a) single cells and (b) cell clusters separated from the culture medium, and (c) cell clusters separated from the blood sample using the microfluidic chips with separation threshold of 30 μm .

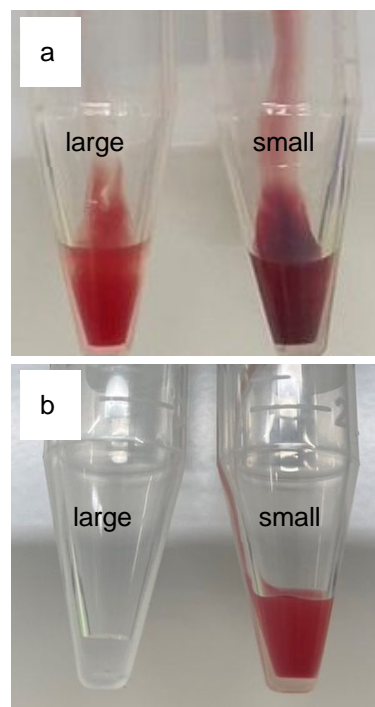


Fig. 7 Pictures of output solutions from the microfluidic chips with separation threshold of 2.3 μm . (a) 2x diluted blood or (b) 10x diluted blood was used.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Matsuura Koji, Takata Koji	4. 巻 14
2. 論文標題 Blood Cell Separation Using Polypropylene-Based Microfluidic Devices Based on Deterministic Lateral Displacement	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 238 ~ 238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi14020238	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金山雅俊、小山倫太郎、森將鷹、平良彰浩、黒田耕志、高田耕児、田中文啓
2. 発表標題 サイズ分離デバイスとセルソーターを用いた循環腫瘍細胞のシングルセル解析法の確立
3. 学会等名 第5回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 分化細胞の製造方法	発明者 松浦宏治、橋岡真義、高田耕児	権利者 学校法人加計学園、日本ゼオン株式会社、富山
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-001342	出願年 2024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	安田 佳織 (Yasuda Kaori) (70707231)	富山県立大学・工学部・准教授 (23201)	
研究分担者	菊地 央 (Kikuchi Hiroshi) (20828305)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	

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