

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：33920

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21690

研究課題名（和文）マイクロ流体デバイスを用いた血中循環がん細胞クラスター抽出法の開発

研究課題名（英文）Development of a microfluidic device for the extraction of circulating tumor cell cluster

研究代表者

各務 秀明（Hideaki, Kagami）

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：80242866

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：血中循環腫瘍細胞（CTC）の解析は、遺伝子発現のみでは判断できない個別の腫瘍に対する治療薬の選定に有用である。しかしながら、その頻度は血液10ml中に数個程度とされ、簡便で効率的な抽出は困難であった。本研究では、「決定論的横置換法（DLD）」を応用したマイクロ流体デバイスを用いて、一定以上の大きさを持つCTC細胞塊の効率的な抽出法について検討した。次に、得られた細胞塊から自発的スフェロイドを形成し、遺伝子発現解析を行った。DLDによって細胞塊を含む分画を濃縮することは可能であり、得られた細胞から形成されたスフェロイドは、幹細胞マーカーと血管新生、移動に関わる遺伝子群の発現が上昇していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍細胞クラスターの分離についてはまだ研究が始められたばかりであり、リキッドバイオプシーによって得られるCTCはわずかであるため、これまでの方法では十分ではない。また、腫瘍から樹立された細胞株による検討では特定の腫瘍に対する薬剤感受性を判断することは難しく、患者本人の腫瘍を評価する重要性が指示されている。本研究ではマイクロデバイスと幹細胞研究で開発された自発的スフェロイド培養法を応用することで、効率的に腫瘍幹細胞を抽出することが可能であった。今回の研究は、個別腫瘍に対する薬剤の最適化や、転移能の高い腫瘍への効率的な治療法選択につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：Analysis of circulating tumor cells (CTCs) is useful for selecting therapeutic agents for individual tumors that cannot be determined based on gene expression alone. However, the frequency of CTCs is only a few per 10 ml of blood, and simple and efficient extraction has been difficult. In this study, we investigated an efficient extraction method for CTC cell aggregates with a certain size or larger using a microfluidic device applying the "deterministic lateral displacement method (DLD)". Next, spontaneous spheroids were formed from the obtained cell aggregates, and gene expression analysis was performed. Fractions containing cell masses could be enriched by DLD, and spheroids formed from the obtained cells showed elevated expression of stem cell markers and gene clusters involved in angiogenesis and cell migration.

研究分野：口腔外科学

キーワード：血中循環腫瘍細胞 決定論的横置換法 自発的スフェロイド 腫瘍幹細胞 リキッドバイオプシー テーラード医療

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

腫瘍の低侵襲な診断法として、採血によるリキッドバイオプシーが注目されている。解析対象には DNA、RNA、細胞外小胞などがあるが、中でも血中循環腫瘍細胞 (CTC) の解析は、遺伝子変異のみでは判断できない個別の腫瘍に対する治療薬の選定に有用である。ただし、その頻度が少ないことが問題であり、簡便で効率的な抽出法の開発が求められている。また、CTC には単一の細胞としてではなく、細胞塊 (クラスター) として存在するものがあり、その存在が転移など腫瘍の予後にも重要な役割を果たすことが報告されている。そこで、本研究では CTC の中で、一定以上の大きさを持った細胞クラスターをターゲットとして、DLL マイクロデバイスを用いることで、その効率的な抽出と増幅による新たな診断法の確立を目指した。

また、癌組織ではすべての細胞が増殖するわけではなく、癌幹細胞が増殖の主役である。癌幹細胞にはスフェロイド形成能があり、その幹細胞性が増殖能や転移能などの悪性度に影響する。癌幹細胞は通常環境下ではほとんど分裂をしないことから、放射線治療や化学療法に耐性が高く、再発の原因になる。従って癌幹細胞を診断に用いることができれば、悪性度や薬剤の選択に有用である。われわれは、特定の疎水性を示す培養ディッシュを用いることで、自発的にスフェロイド形成が起こる条件を見だし、報告してきた。5 継代を経ても自発的スフェロイド形成による幹細胞培養が可能であるため、効率的に幹細胞を回収することができる。そこで、DLL マイクロデバイスを用いて、適切なサイズの CTC クラスターを回収後、自発的スフェロイド培養法を用いることで、CTC クラスターから効率的に癌幹細胞を増幅するシステムの構築が可能と考えた。

2. 研究の目的

DLL マイクロデバイスを用いて、血液中から CTC の集合体であるクラスターを効率的に抽出する方法を確立する。さらに、抽出された数少ない腫瘍細胞から、スフェロイド培養技術の応用により、効率的に腫瘍幹細胞を増幅させる。この方法が確立されれば、腫瘍の転移機序解明など基礎研究のみならず、患者毎の薬剤感受性試験にも応用が期待できる。

3. 研究の方法

1) 流体制御技術を用いた CTC クラスターの選別・抽出技術の開発

CTC は一つの細胞として血中に存在することもあれば、細胞塊であるクラスターとして存在することもある。細胞塊である CTC クラスターは、高い転移能と薬剤耐性を有するため、腫瘍転移に主要な役割を果たすと考えられている。本研究では DLL によるマイクロデバイスを用いて、粒子の大きさによって、フローのみで特定のクラスターの分離を試みる。

2) 自発的スフェロイド形成技術による CTC クラスターからの効率的な幹細胞増幅と解析

わずかな CTC クラスターは、はじめ平面培養によって十分に増幅させる。得られた細胞を、特殊な低接着性プレートに播種することで、効率的に癌幹細胞からなる自発的スフェロイドが効率的に形成される。十分な細胞数が確保された後、CTC 由来癌幹細胞の遺伝子解析をおこなう。

4. 研究成果

1) 流体制御技術を用いた CTC クラスターの選別・抽出技術の開発

①細胞調製

DLL マイクロデバイスによる細胞クラスター分離技術の確立のため、NIH-3T3、臍帯由来 MSC、口腔癌由来 Cell line である HSC-2 細胞を用いた。平面培養後に細胞をトリプシン-EDTA によって剥離・分離し、チューブ内で浮遊させることで、細胞クラスターを作製した。次に単離細胞と細胞クラスターを混合して、分離用細胞懸濁液とした。

②DLL マイクロデバイスによる細胞クラスター分離

単離細胞と細胞クラスターが混在する懸濁液を、50ml シリンジへ充填し、シリンジポンプへ装着した。設計された流速で、目的とする細胞クラスター分画 (50-150 μm) とそれ以下の細胞との分離を行った (図 1)。小顆粒の分画では、主に単離細胞と破壊された細胞の一部が見られた (図 1 a, b)。一方目的とする細胞クラスター分画では、細胞の凝集体であるクラスターが回収されていた (図 1 c, d)。

それぞれの分画で得られた細胞画像を ImageJ に取り込み、画像と 8-bit に変換後、threshold

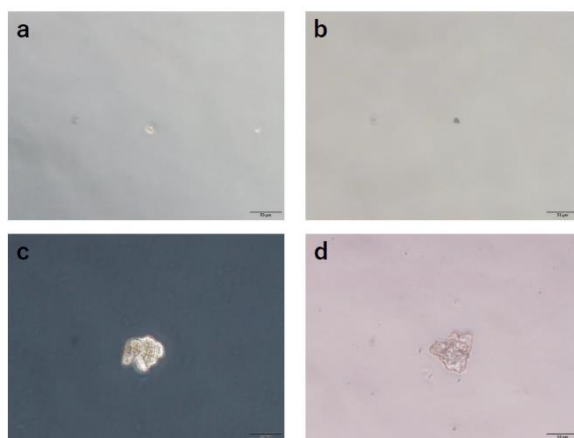


図 1 DLLによる細胞クラスターの分離
a, b 単一細胞の分離、c, d 細胞クラスターの分離

値を設定して細胞を抽出した。Particle 解析にて細胞および細胞塊の大きさを集計した (図 2)。細胞クラスター分画では、小粒子分画より大きな細胞塊を分離することが可能であり、目的とするサイズの細胞クラスターの分離は可能であった。

2) 自発的スフェロイド形成技術による CTC クラスターからの効率的増幅と解析

①細胞クラスターからの細胞増幅と幹細胞スフェロイド形成

細胞クラスターを平面培養系に移すことにより、細胞を増殖させた (図 3 a)。次に、得られた細胞を回収し、スフェロイド形成用ディッシュにて 24 時間培養することで、自発的スフェロイドを形成させた (図 3 b)。さらに得られたスフェロイドを用いて、幹細胞性や腫瘍特性の検討を行った。

②スフェロイドの幹細胞マーカ発現

CTC クラスターからの自発的スフェロイド形成の目的の一つは、癌幹細胞の確保である。したがって、本研究で得られた自発的スフェロイドの幹細胞性を調べるため、幹細胞マーカによる免疫染色を行った (図 4)。得られた自発的スフェロイドは、Sox2, Nanog, Oct4 陽性であり、ES 細胞類似の幹細胞マーカの発現が見られた。

③腫瘍特性の in vitro における検討

自発的スフェロイド形成細胞の特性を解析するため、平面培養細胞との遺伝子発現を RNA sequence にて網羅的に比較した (図 5)。その中で、自発的スフェロイドで高値を示す遺伝子群についての GO term 解析を行った。フィッシャーの正確確率検定法にて $p < 0.05$ を示した GO term の中で、癌幹細胞に関連するものは以下の 4 つであった。

- ・細胞増殖に関する GO term
- ・増殖因子に関する GO term
- ・細胞遊走能に関する GO term
- ・血管新生に関する GO term

次に、自発的スフェロイドにおいて活性化されているシグナルを明らかにするため、KEGG pathway 解析を行った。その中で、腫瘍幹細胞と関連するシグナル経路として、Ras signaling pathway, Wnt signaling pathway が抽出された。

3) 結果のまとめ

DLL マイクロデバイスにより、一定以上の大きさを持つ細胞クラスターの抽出が可能であった。得られた細胞を増幅し、自発的スフェロイドを形成することで、幹細胞の効率的な抽出が可能であった。自発的スフェロイド形成細胞は、細胞増殖、細胞遊走能、血管新生能が高く、腫瘍幹細胞の特徴を備えていた。現在得られた幹細胞を用いた薬剤感受性の検討を行っており、本研究によって得られた結果が、今後口腔癌に対するテーラーメイド化学療法の確立に寄与することが期待される。

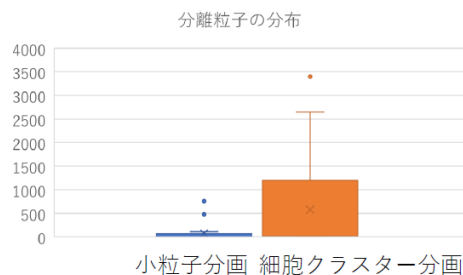


図 2 DLLによる細胞クラスターの分離

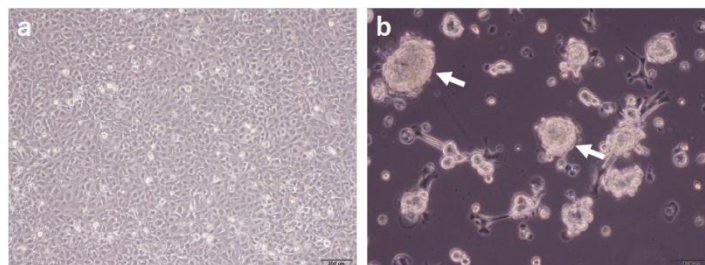


図 3 細胞クラスターからの増殖とスフェロイド形成。

a 増幅された細胞 b スフェロイド形成用ディッシュでの 24 時間後
白矢印：スフェロイド

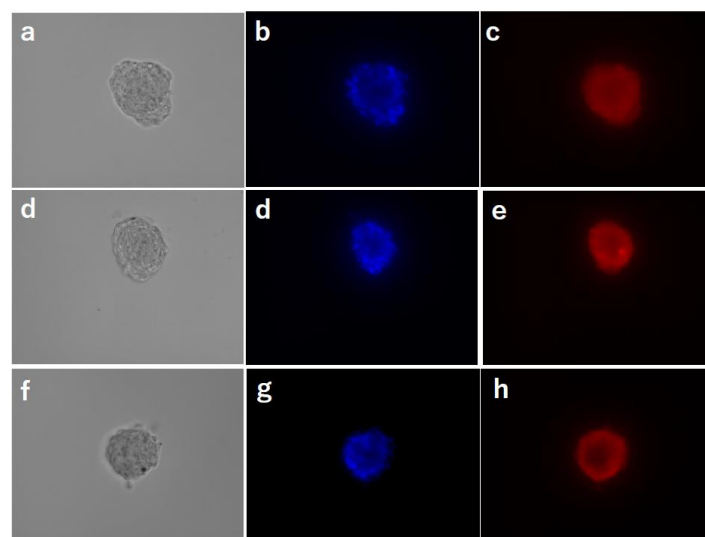


図 4 スフェロイド幹細胞マーカの発現

a, d, f: 位相差顕微鏡像、b, d, g: DAPI、c: Sox2, e: Nanog, h: Oct4

自発的スフェロイドと平面培養との比較

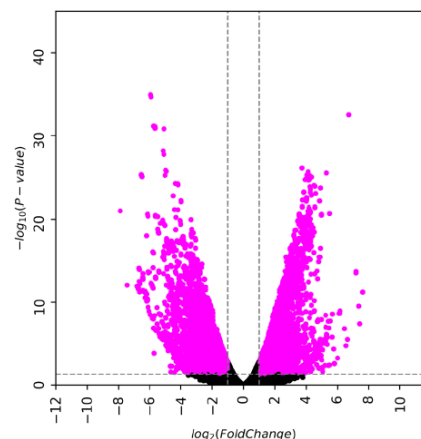


図 5. RNAシーケンスによる遺伝子発現解析
右は自発的スフェロイドで高値を表す遺伝子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Dong H, Li X, Chen K, Li N, Kagami H	4. 巻 27
2. 論文標題 Cryopreserved spontaneous spheroids from compact bone-derived MSCs for bone tissue engineering.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Eng Part C	6. 最初と最後の頁 253-263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEC.2021.0001	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 Zhang Y, Li X, Chihara T, Dong H, Kagami H	4. 巻 18
2. 論文標題 Effect of TNF-alfa and IL-6 on compact bone-derived cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Eng Reg Med	6. 最初と最後の頁 441-451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13770-021-00336-1.	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 該当する
1. 著者名 Nahomi Matsumura, Xianqi Li, Eri Uchikawa-Kitaya, Ni Li, Hongwei Dong, Kai Chen, Michiko Yoshizawa, Hideaki Kagami	4. 巻 in press
2. 論文標題 Tissue Engineering with Compact Bone-derived Cell-spheroids Enables Bone Formation around Transplanted Tooth.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tissue Eng Reg Med	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する
1. 著者名 Asahina I, Kagami H, Agata H, Honda MJ, Sumita Y, Inoue M, Nagamura-Inoue T, Tojo A	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical Outcome and 8-Year Follow-Up of Alveolar Bone Tissue Engineering for Severely Atrophic Alveolar Bone Using Autologous Bone Marrow Stromal Cells with Platelet-Rich Plasma and Tricalcium Phosphate Granules.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 5231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm10225231	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 Hongwei Dong, Xianqi Li, Kai Chen, Ni Li, Hideaki Kagami	4. 巻 in press
2. 論文標題 Cryopreserved spontaneous spheroids from compact bone-derived mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part C	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Uchikawa E, Yoshizawa M, Li X, Matsumura N, Li N, Chen K, Kagami H.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Tooth transplantation with a β -tricalcium phosphate scaffold accelerates bone formation and periodontal tissue regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.13634.	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 Chihara T, Zhang Y, Li X, Shinohara A, Kagami H.	4. 巻 35
2. 論文標題 Effect of short-term betamethasone administration on the regeneration process of tissue-engineered bone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Histol Histopathol .	6. 最初と最後の頁 709-717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14670/HH-18-193.	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 該当する

1. 著者名 Kagami, H.; Inoue, M.; Agata, H.; Asahina, I.; Nagamura-Inoue, T.; Taguri, M.; Tojo, A	4. 巻 11
2. 論文標題 A clinical study of alveolar bone tissue engineering using autologous bone marrow stromal cells: effect of optimized cell-processing protocol on efficacy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Clin. Med.	6. 最初と最後の頁 7328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11247328	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 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 各務秀明, 李憲起, 李に, 浅井太郎, 馬場航希、高橋洸洋、荻原 直人
2. 発表標題 新規細胞接着制御樹脂コートディッシュを用いて作製された自発的幹細胞スフェロイドの特性
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅井太郎, 馬場航希, 高橋洸洋, 荻原直人、李憲起, 各務秀明
2. 発表標題 新規細胞接着制御樹脂コートディッシュを用いた自発的幹細胞スフェロイドの形成法
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅井太郎, 馬場航希, 高橋洸洋, 荻原直人、李憲起, 各務秀明
2. 発表標題 新規細胞接着制御樹脂を用いた自発的幹細胞スフェロイドの形成法
3. 学会等名 第34回日本動物実験代償法学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 各務秀明
2. 発表標題 閉鎖型自動培養装置を用いた歯槽骨再生の臨床研究
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 各務秀明
2. 発表標題 インプラントにおける再生医療
3. 学会等名 NPO法人歯科放射線学会第1回秋季学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 各務秀明, 植田章夫, 下地茂弘, 高田匡基, 井上実, 李憲起, 田口明
2. 発表標題 CT画像と画像解析ソフトウェアを用いた再生骨の評価
3. 学会等名 第50回口腔インプラント学会記念学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 各務秀明, 植田章夫, 李憲起, 篠原淳
2. 発表標題 コーンビームCTを用いた再生骨評価法の検討
3. 学会等名 第24回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李 憲起, 栗原 祐史, 芳澤 享子, 各務 秀明
2. 発表標題 臍帯由来細胞により形成された自発的スフェロイドにおける炎症性サイトカインの発現抑制
3. 学会等名 第76回NPO法人日本口腔科学会学術集会
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	住田 吉慶 (Sumita Yoshinori) (50456654)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授 (17301)	
研究 分担者	李 憲起 (Li Xianqi) (60350831)	松本歯科大学・歯学部・准教授 (33602)	

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