

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01778

研究課題名（和文）インテリジェント画像活性細胞選抜法によるCTC検査法の創出

研究課題名（英文）CTC detection based diagnosis using intelligent image-activated cell sorting

研究代表者

磯崎 瑛宏（Isozaki, Akihiro）

立命館大学・理工学部・准教授

研究者番号：10732555

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、血中循環腫瘍細胞（Circulating tumor cells; CTC）の高感度検出および解析技術を構築することを目的として研究を進めた。具体的には、検出感度を向上させるために新たなバイオマーカーであるPpIXを導入して、イメージングフローサイトメトリーで細胞の形態を観察することによって、検出感度の向上を目指した。このことにより、乳がん患者の血液サンプルから約20個のCTCとみられる細胞を検出することに成功した。さらに、これらの細胞を取り扱うことのできるマイクロ流路を開発し、その有用性を実験的に実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1 mLの血液中に数個しか存在しないCTCを、イメージングフローサイトメトリーにより検出できる可能性を示したことは、フローサイトメトリーの新たな可能性を示すという観点で学術的に意義深い。さらに、それらの細胞を高精度に操作するマイクロ流路を新たに提案したことも、マイクロ流路の高度な設計方法を提案するという意味で学術的意義がある。また、患者への身体的負担の少ない血液検査によるCTC検出を用いたがんモニタリング方法の構築へ向けた重要な基礎研究結果を示したという観点で、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop a highly sensitive detection and analysis technology for circulating tumor cells (CTCs) in blood. Specifically, we introduced a new biomarker, PpIX, to improve detection sensitivity and used imaging flow cytometry to observe cell morphology with the goal of enhancing sensitivity. As a result, we successfully detected approximately 20 cells believed to be CTCs in blood samples from breast cancer patients. Furthermore, we developed a microfluidic device capable of handling these cells and experimentally demonstrated its utility.

研究分野：ナノマイクロデバイス

キーワード：イメージングフローサイトメトリー がん細胞検出 細胞分取

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、がんは日本人の二人に一人がかかる病気であり、20%程度の人のがんで命を落とすと言われている。このような背景のもと、がんの早期発見手法やがんゲノム医療(個別化医療)など最先端の科学技術を組み合わせる新たな手法が日々研究されている。その中でも、患者に負担がかからずに定期的に診断が可能となる血液検査でがん検査が行える Liquid biopsy に関する研究は精力的に行われており、近年発展が目覚ましい。例えば血中には、血中遊離 DNA (cell-free DNA, cfDNA) や microRNA、血中循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cells; CTC) など、がんの診断に活用できる情報が存在しており、これら进行分析することで、新たな診断法が構築できると期待されている。特に CTC はがん細胞そのものであるため、多くの情報を含んでおり、有力な診断材料となると期待されている。

現在アメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) で認可されている CTC の検出方法はセルサーチシステムと呼ばれる手法であり、これを用いて CTC に関する多くの知見が集まってきている。しかしながらセルサーチシステムは CTC の検出を EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) という特定のたんぱく質の発現に頼っている。従って、EpCAM の発現量が少ない CTC や、そもそも EpCAM 陰性の CTC、または上皮間葉転換により EpCAM が消失した CTC は検出できない。この点において、セルサーチシステムの CTC 検出感度は十分ではない。この問題を解決するために、いくつかのマーカーに対する抗体カクテルを利用する改良法などが提案されているが、多様な CTC をもれなく捕捉するためには、抗体の組み合わせが莫大な数になってしまい、現実的ではない。「細胞の大きさ」や「伸縮性」を指標に CTC を濃縮する方法も提案されているが [Dhar et al., PNAS 115, 9986 (2018); Tse et al., Sci. Transl. Med. 5, 212ra163 (2013)]、汎用的な CTC 識別法としては限界がある。

以上のように、CTC の重要性は強く認識されているにもかかわらず、取りこぼしなく検出し、かつ分取する手法はこれまでになかった。従って、多様であると言われる CTC は、本当に多様であるのか、どのような CTC が存在するのか、といったことが真に解明されているとは言えない。本提案では、このような学問的問いに答える。また、これまで不可能であった高感度 CTC 検出が、高精度マイクロ流体制御技術と深層学習による画像解析技術を用いて解決できるのか、という工学的な問いにも答える。

## 2. 研究の目的

本研究では、CTC の高感度検出技術を構築することを目的とする。これにより、患者への身体的負担の少ない血液検査による CTC 検出を用いたがんモニタリング方法の構築を目指す。このために、高速イメージングフローサイトメトリーを用いる。この技術は、独自に開発した高速顕微鏡で細胞の形態情報を数千細胞/秒の速度で読み取ることができる技術であり、市販されているイメージングフローサイトメトリーよりも 10 倍程度高速で動作させることができる。また、研究分担者が開発した 5-aminolevulinic acid (5-ALA, 5-アミノレブリン酸) を用いた CTC 検出手法 [Matsusaka et al., Cancer Lett. 355, 113 (2014)] を組み合わせる。この手法は、5-ALA 分子が細胞内に取り入れられて合成される代謝産物 protoporphyrin IX (PpIX) が蛍光を発することと、がん細胞においては、PpIX からヘムへの合成が進まず、がん細胞内に PpIX が蓄積されることを利用した CTC 検出方法である。これらを用いて CTC を画像により検出する。また、挑戦的な課題として、検出した CTC の分取を可能とするデバイスの開発を行う。本研究においては、細胞の画像を基にして分取を行う必要があるため、研究代表者らが開発したインテリジェント画像活性細胞選抜法 [Isozaki et al., Lab Chip 20, 2263 (2020)] を用いることを想定してデバイス開発を行う。

## 3. 研究の方法

イメージングフローサイトメトリーによる CTC の検出には、マイクロ流体技術による検出スループットの向上と得られた画像の解析が必要になる。具体的には、マイクロ流路に粘性流体を用いることにより、シース液無しで細胞を整列させる技術を導入する。このことで、検出スループットの向上が可能となる。画像解析に関しては、細胞から発せられる蛍光の強度だけでなく、形態にも注目することで、検出精度を上げる。さらに、細胞は単独して存在しているだけでなく、クラスターとして存在していることもあり、それらを判別できるアルゴリズムを開発する。また、粘性流体を用いた細胞整列技術と組み合わせ可能な細胞分取デバイスの開発も行う。

## 4. 研究成果

まず、イメージングフローサイトメトリーによる CTC 検出へ向けた実験プロトコルの確立と実験セットアップの構築を行った。実験プロトコルの概要を図 1a に示す。まず、Step (i) として被験者から血液を採取し、白血球と CTC を含む末梢血単核細胞分画を密度勾配遠心法で調製する。細胞を 5-ALA で処理し、抗体-蛍光色素複合体で染色する。次に Step (ii) として画像取得を行う。具体的には、調製した細胞懸濁液を粘性流体と混合し、マイクロ流路に導入して高速イメージングを行う。最後に Step (iii) として、取得した画像中の細胞の蛍光強度および形態的特徴

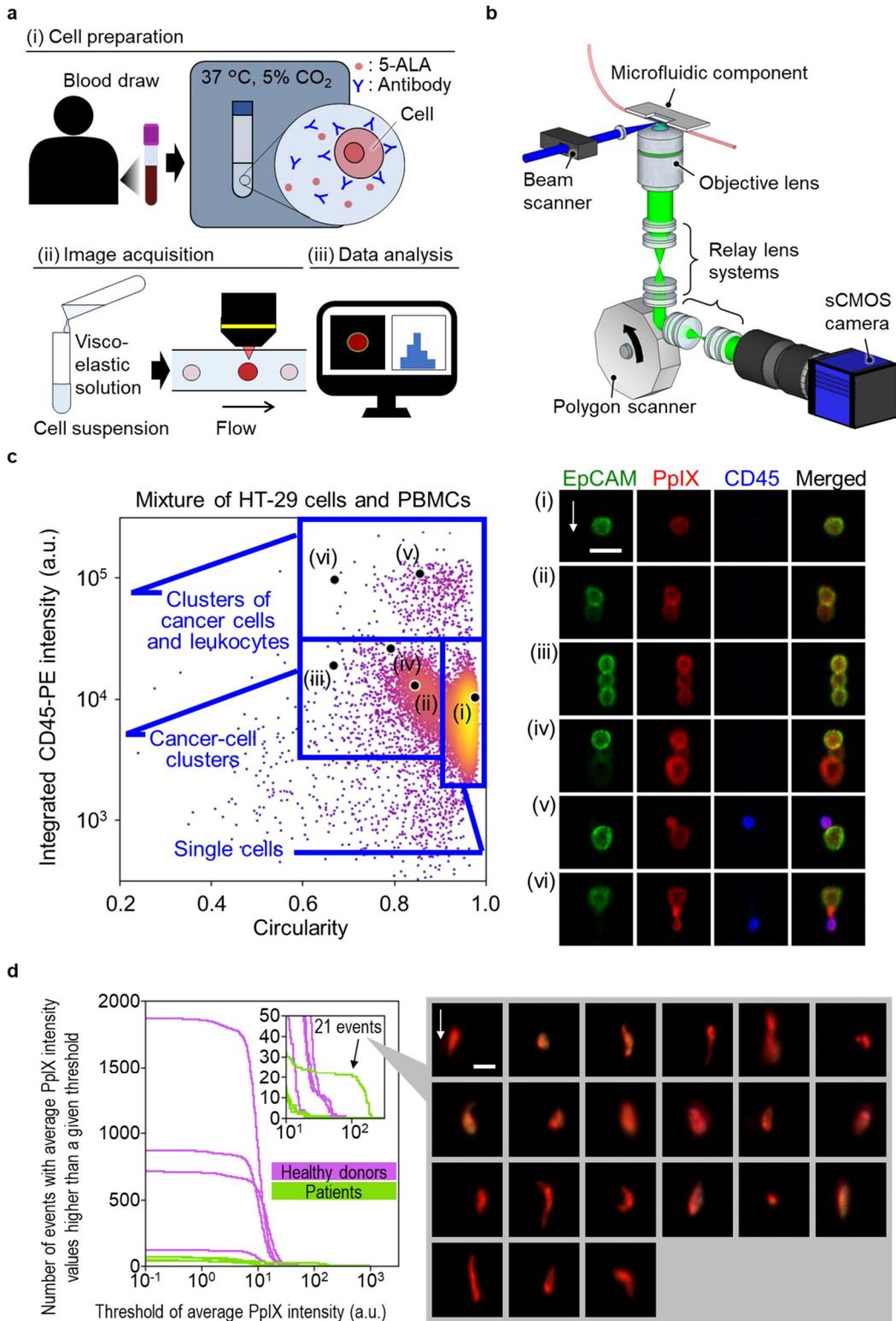


図1 イメージングフローサイトメトリーによる CTC 検出実験結果 (a) イメージングフローサイトメトリーの実験手順 (b) イメージングフローサイトメーターの概念図 (c) HT-29 細胞と血液細胞 PBMC の混合サンプルの計測結果 (スケールバー、20  $\mu\text{m}$ ; 矢印、流れの方向 (1 m/秒)) (d) 健常者の血液サンプルと乳がん患者の血液サンプルを用いた細胞検出実験結果 (赤、PpIX; 緑、EpCAM-FITC; 青、CD45-PE; スケールバー、20  $\mu\text{m}$ ; 矢印、流れの方向 (1 m/秒))

に基づいて分析する。この時、Step (ii)で示したように、粘弾性流体を導入したことは、本研究期間に行ったことであり、粘弾性流体導入前に比べると、細胞検出スループットは約 20 倍に増加した。これは、シーズ流が必要なくなり、サンプル流量が増加したことによる効果である。図 1b に構築したイメージングフローサイトメーターの概念図を示す。ビームスキャナにより、観察視野全体に励起レーザーをスキャンして流路内を流れる細胞にある物質を励起する。細胞からの

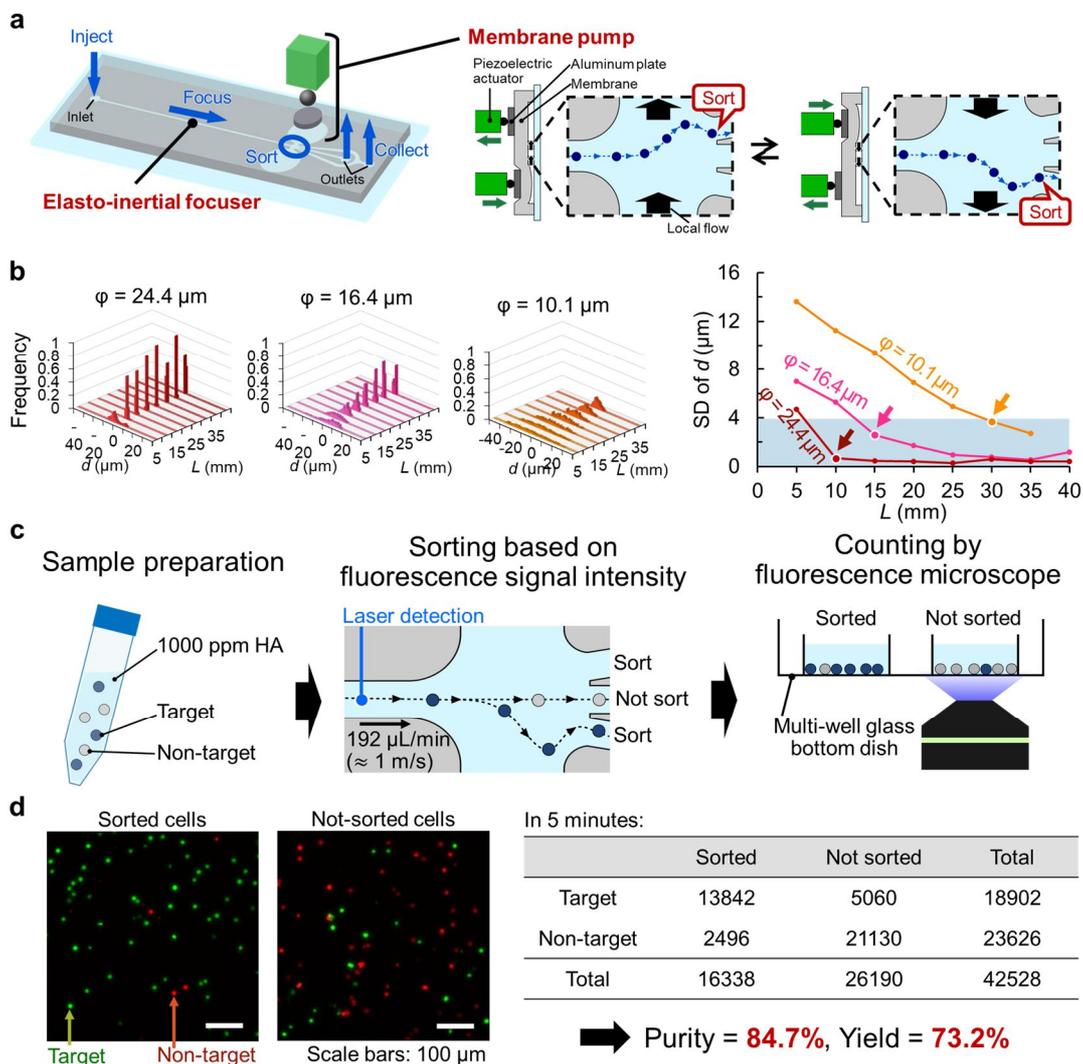


図 2 大きな細胞のための細胞分取デバイスの評価実験 (a) 作製したデバイスの概念図 (b) 粘弾性流体による細胞整列性能評価実験の結果 (c) 分取性能評価実験の手順 (d) 分取性能評価実験の結果

蛍光は対物レンズとリレーレンズとポリゴンスキャニングミラーを経て sCMOS カメラに届く。ここで、ポリゴンスキャニングミラーは、カメラの観察視野を細胞の流れに従って動かす効果があり、高速に流れる細胞をまるで止まっているかのように撮像することができる。このような実験プロトコルおよびセットアップを用いてイメージングフローサイトメトリーの実験を行った。血液サンプルから濃縮した PBMC と培養がん細胞 (HT-29 細胞) と混合した細胞懸濁液を準備してイメージングフローサイトメトリーの実験を行った結果を図 1c に示す。左パネルは、検出されたイベントのうち、白血球のみが写っているイベントを取り除くゲーティングを行って、残ったイベントに対して Circularity と CD45-PE 強度を調べた散布図である。図中に示したように、この散布図から、がん細胞と白血球細胞のクラスターが形成されているイベントと、がん細胞のクラスターが形成されているイベントと、単一細胞が写っているイベントを見分けることができる。右パネルには、散布図で (i) から (vi) とラベル付けされたイベントの代表的な画像を示す。様々な形態を持つイベントが抽出されていることが分かる。以上より、本システムが CTC の検出に有用である可能性が示唆された。

このシステムを用いて、4 人の乳がん患者と 4 人の健常者の血液サンプルの CTC 検出の実験を行った。ここに示された結果は、EpCAM 陽性かつ PpIX 陽性の細胞を見つけ出すことを目的とした解析結果であり、EpCAM と PpIX の両方でゲーティングした時に何個の細胞が検出されるかを示した。EpCAM ゲーティングの閾値は固定とし、PpIX ゲーティングの閾値をパラメータとした。この時、PpIX ゲーティングの閾値を高くしていくと、1 人の乳がん患者サンプルから 21 個のイベントが検出されることが分かった。

以上より、高速イメージングフローサイトメトリーと PpIX 染色による CTC 検出の有用性を示唆する結果が得られた。本研究をさらに進めるために、高速イメージングフローサイトメトリー

ーにより得られた細胞を分取することを考え、その基礎的研究も行った。それらの結果を図 2 に示す。

図 2a に作製したデバイスの概念図を示す。このデバイスでは、イメージングフローサイトメトリーによる実験の時に用いた粘弾性流体を細胞整列技術に用いている。細胞を整列させたのちに、細胞分取機構へと流れ込むように設計されており、適切なタイミングで細胞を分取する。細胞分取機構のメカニズムは、研究代表者らが開発したインテリジェント画像活性細胞選抜装置[Isozaki et al., Lab Chip 20, 2263 (2020)]で用いられたメカニズムを踏襲している。

まず、分取性能を評価する前に、細胞整列性能の評価を行った。具体的には、デバイスに複数種類の大きさの粒子を流し、マイクロ流路上流からの距離によって粒子が流れる位置を評価した。結果を図 2b に示す。左のパネルにはそれぞれの粒子がどのような位置に流れているかを 3 次元的なヒストグラムとして示している。また、右のパネルではヒストグラムで得られた標準偏差値をまとめてグラフとして示した。大きな粒子ほど上流側で流路中央に流れ始めていることが分かる。さらに、それらの粒子は下流においても流路中央の位置をキープしたまま流れていることが分かる。従来のインテリジェント画像活性細胞選抜装置に搭載されていた細胞整列技術では、大きな粒子は一度流路中央を流れるように集めても、その後下流で流路中央から外れてきてしまう傾向があったので、今回の結果は CTC や CTC クラスターなどの大きな細胞を分取するデバイスとして優れた性能を示したと言える。

次に、デバイスの分取性能評価実験を行った。実験手順を図 2c に示す。まず、粘弾性流体中に標的となる粒子と、非標的となる粒子を混ぜて懸濁し、その懸濁液をデバイスに導入した。その後、分取されたサンプルを集めて顕微鏡で観察することで評価した。図 2d に評価実験の結果を示す。今回は緑色の蛍光を示す粒子を標的粒子として分取実験を行っており、図 2d の左パネルに示すように、Collection チャンネル ( 図中では Sorted cells と表記 ) の方に多くの緑色の粒子が集まっていることが分かる。定量的に評価すると、84.7% という高い Purity で分取できていたことが分かった。

以上より、本研究を通じて、高感度 CTC 検出へ向けた可能性を大きく広げる研究成果を得ることができた。

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 0件）

1. 著者名 Matsumura Hiroki, Shen Larina Tzu-Wei, Isozaki Akihiro, Mikami Hideharu, Yuan Dan, Miura Taichi, Kondo Yuto, Mori Tomoko, Kusumoto Yoshika, Nishikawa Masako, Yasumoto Atsushi, Ueda Aya, Bando Hiroko, Hara Hisato, Liu Yuhong, Deng Yunjie, Sonoshita Masahiro, Yatomi Yutaka, Goda Keisuke, Matsusaka Satoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Virtual-freezing fluorescence imaging flow cytometry with 5-aminolevulinic acid stimulation and antibody labeling for detecting all forms of circulating tumor cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 1561 ~ 1575
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2LC00856D	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hiroki Matsumura, Larina Shen, Akihiro Isozaki, Hideharu Mikami, Dan Yuan, Maik Herbig, Yuto Kondo, Tomoko Mori, Yoshika Kusumoto, Masako Nishikawa, Yutaka Yatomi, Satoshi Matsusaka, Keisuke Goda
2. 発表標題 Detection and characterization of circulating tumor cell clusters by high-throughput optomechanical imaging flow cytometry
3. 学会等名 CYTO 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroki Matsumura, Larina Tzu-Wei Shen, Hideharu Mikami, Akihiro Isozaki, Dan Yuan, Taichi Miura, Yoshika Kusumoto, Masako Nishikawa, Atsushi Yasumoto, Takeshi Yamada, Aya Ueda, Hiroko Bando, Hisato Hara, Yutaka Yatomi, Satoshi Matsusaka, and Keisuke Goda
2. 発表標題 High-throughput on-chip imaging of diverse cancer cells in blood
3. 学会等名 The international Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (Pacifichem 2021)（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松村 洋貴, 沈 之為, 三上 秀治, 磯崎 瑛宏, 袁 丹, 楠本 佳香, 西川 真子, 山田 武史, 上田 文, 坂東 裕子, 原 尚人, 矢富 裕, 松阪 諭, 合田 圭介
2. 発表標題 蛍光イメージングフローサイトメトリーによる血中循環腫瘍細胞の検出
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第44回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松村 洋貴, 沈 之為, 三上 秀治, 磯崎 瑛宏, 袁 丹, 三浦 太一, 楠本 佳香, 西川 真子, 安本 篤史, 山田 武史, 上田 文, 坂東 裕子, 原 尚人, 矢富 裕, 松阪 諭, 合田 圭介
2. 発表標題 高速蛍光イメージングフローサイトメトリーによるがん細胞の検出
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第43回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 磯崎 瑛宏, 合田 圭介
2. 発表標題 画像と深層学習で広がるフローサイトメトリーの応用
3. 学会等名 第32回日本サイトメトリー学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihiro Isozaki
2. 発表標題 Intelligent image-activated cell sorting: principles and application to hematology
3. 学会等名 2021 Korean Society of Hematology (KSH) International Conference & 62nd Annual Meeting (ICKSH 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中澤 優真, 磯崎 瑛宏
2. 発表標題 オンチップ細胞分取デバイスの高速化へ向けた流路構造の検討
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第48回研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長坂 柚葵, 中川 悠太, 丁天本, 磯崎 瑛宏, 合田 圭介
2. 発表標題 画像に基づく大きな細胞の分取に向けた粘弾性流体制御によるオンチップセルソーターの評価
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第47回研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長坂 柚葵, 松村 洋貴, 中川 悠太, 磯崎 瑛宏, 合田 圭介,
2. 発表標題 血中循環腫瘍細胞の分取に向けた粘弾性流体制御によるオンチップセルソーター
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第46回研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

磯崎研究室 <a href="https://sites.google.com/view/isozakilab/">https://sites.google.com/view/isozakilab/</a>
--

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	松坂 諭  (Matsusaka Satoshi)  (00372665)	筑波大学・医学医療系・教授    (12102)	

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