

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871189

研究課題名(和文)細胞チップを用いた血中循環がん幹細胞の検出法の開発

研究課題名(英文)Detection of circulating tumor stem cells by use of a cell microarray chip

研究代表者

阿部 佳織 (ABE, Kaori)

徳島大学・大学病院・特任助教

研究者番号：60511326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：がんの再発・転移の原因としてがん幹細胞の存在が注目されている。近年、がん幹細胞は腫瘍組織中だけでなく、血中にも循環していることが報告されている。しかし、血中に存在する割合は非常に少ないため、高感度な検出が必要であり、これまでに簡易に正確に検出できるシステムは報告されていない。これまでに我々はスライドガラスサイズのプラスチック基板(チップ)に直径100 μm の穴を2万個配置し、1枚のチップ上で200万個の白血球を解析できる細胞チップを開発してきた。そこで本研究では、細胞チップを用いることにより、高感度に、簡易に、正確に血中を循環するがん幹細胞を検出できるシステムの開発を試みた。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells play an important role in cancer metastases. Recently, it has been reported that cancer stem cells exist not only in tumor tissue but also in peripheral blood. However, the conventional systems fail to detect circulating tumor stem cells (CTSC) because the rate of CTSC in peripheral blood is very low. In a previous study of ours, we developed a cell microarray chip with 20,944 microchambers (105 μm width and 50 μm depth). We could analyze 2,000,000 leukocytes on a cell microarray chip. In the present study, we developed a sensitive, simple, and accurate system to detect CTSC using a cell microarray chip.

研究分野：マイクロチップ基板でのバイオマーカー解析

キーワード：マイクロチップ がん幹細胞 単一細胞解析

1. 研究開始当初の背景

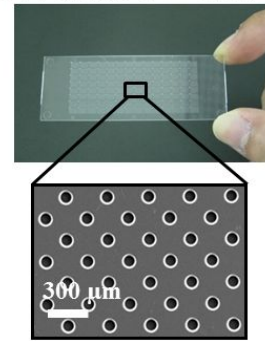
現在、がんは日本における死亡原因の第1位であり、早期発見の機会を逃して治療が困難になる症例が多い。がんの治療を困難にする要因として、がんの転移や再発が大きく関わっている。転移がんの治療には主に化学療法、放射線療法が用いられるが、完全にがん細胞を排除することはできないという問題がある。

近年、転移や再発の原因として、がん幹細胞 (Cancer Stem Cells: CSC) の存在が注目されている。CSC は、自己複製能と多分化能を同時に持ち合わせた細胞であり、少数存在するだけで元の腫瘍組織と同様の腫瘍形成能を持つことが示されている。さらに、CSC は抗がん剤や放射線への抵抗性を有しているため治療の際に残存しやすいことが知られている。したがって、CSC を標的とした治療法を確立することががんの根治に直結するものと期待されている。そのためには、CSC の性状を理解することが重要であるが、採取には腫瘍組織の生検が必要であり、その存在割合は低く、迅速に、簡易に、正確に検出することは非常に困難である。

一方、転移性がん患者の血中を循環するがん細胞は、血中循環がん細胞 (Circulating Tumor Cells: CTC) と呼ばれ、CTC 数の計測が転移がんの予後予測や治療効果判定の有効な検査として期待されている。最近、CTC の中にも CSC と同様に自己複製能や多分化能を獲得した血中循環がん幹細胞 (Circulating Tumor Stem Cells: CTSC) がわずかに存在することが報告されている (Cancer Letters, 2010, 288, 99-106)。

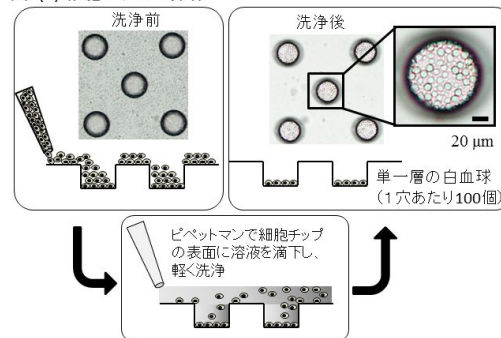
これまでに、申請者はスライドガラスサイズのプラスチック基板に直径 100 μm 程度の穴を 2 万個配置し (図 1A)、ピペットマンを用いるだけの簡単な操作で、その穴の中に赤血球や白血球などの細胞を 100 個ずつ一層に並べる (図 1B) ことにより、200 万個の細胞を一度に解析できるシステム (細胞チップ) を開発してきた。さらに、この細胞チップ上で、蛍光標識抗体を用いて細胞染色を行い、マイクロアレイスキャナにより蛍光検出することにより、白血球 200 万個中に 1 個存在する CTC を短時間で正確に検出することに成功している (PLoS One 2012)。そこで本研究では、CTC よりも高感度な検出が必要とされる血液中の CTSC を細胞チップを用いて、簡易に正確に検出するシステムを構築する。さらに、検出された CTSC を回収し、1 細胞レベルでの遺伝子発現解析を行うことにより、がんの個性診断や個別化医療を可能にするシステムを開発する。

図1(A)細胞チップの概略



- ・穴の数: 20944個/チップ
- ・穴の大きさ: 直径105 μm
深さ50 μm
- ・チップの素材: ポリスチレン
- ・表面処理: 酸素プラズマ処理

図1(B) 細胞チップの操作



2. 研究の目的

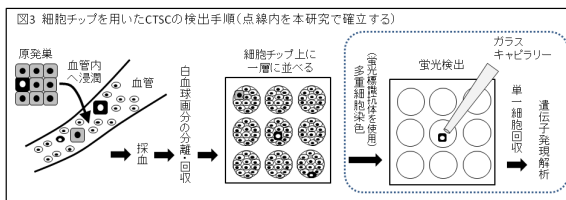
検出対象としては、これまでに CTC の検出系が確立できている肺癌を用い、CTSC の検出系を新たに確立する。CTSC は CTC 中の約 17~35%との報告がある。そこで本研究では、肺癌患者の全血 10 ml、つまり白血球約 5000 万個中に 1 個含まれる CTSC を検出できるシステムを開発する。CTSC の検出は、5 種類のマーカー (上皮細胞マーカーである Epthelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM), Cytokeratin (CK) と一般的な癌幹細胞マーカーである CD133、造血幹細胞マーカーである CD34、白血球マーカーである CD45) に対する蛍光標識抗体を用いて多重染色 (図 2) を行い、マイクロアレイスキャナを用いて蛍光検出を行う。また、検出できた CTSC を蛍光顕微鏡下でガラスキャピラリーを用いて回収し、1 細胞レベルでリアルタイム PCR を行い、mRNA 発現を定量解析する (図 3)。

- 以下の(1)~(4)の項目について検討を行い、最適な実験条件を決定する。
- (1) EpCAM, CK, CD133, CD34, CD45 の蛍光標識抗体を用いて多重染色の条件を検討
 - (2) 健康人の全血に既知の濃度でがん細胞を添加し、細胞チップで検出し、検出精度を確認
 - (3) 細胞チップからガラスキャピラリーを用いて 1 細胞を回収できる条件を検討
 - (4) 1 細胞からリアルタイム PCR を行うための条件を検討

(1)~(4)の条件を決定後、肺癌患者 50 症例を解析し、CTSC と臨床症状との相関を明らかにする。

図2 CTSCの検出マーカー

マーカー 細胞の種類	上皮		一般的な 癌幹細胞	造血 幹細胞	白血球
	EpCAM	CK	CD133	CD34	CD45
CTC	+	+	-	-	-
CTSC	+	+	+	-	-
	+	-			
	-	+			
	-	-			
造血幹細胞	-	-	+	+	-
白血球	-	-	-	-	+



3. 研究の方法

がん幹細胞と白血球細胞を用いたモデル系でCK, CD133, CD45の蛍光標識抗体を用いて多重染色の条件を検討する。さらに、健常人の全血にがん幹細胞を添加し、白血球画分を分離・回収後、細胞チップ上で多重染色を行い、染色条件を確認する。また、細胞チップの穴からガラスキャピラリーを用いて蛍光顕微鏡下で1細胞を回収できる条件および1細胞でのリアルタイムPCRの条件を検討する。最後に、肺癌患者の血液を用いて、細胞チップ上で多重染色を行い、CTCを検出し、ガラスキャピラリーを用いてCTCを回収し、リアルタイムPCRで遺伝子発現解析を行う。

4. 研究成果

(1) CD133 抗体の染色条件の検討：がん幹細胞のマーカーの1つであるCD133が高発現しているKATO-細胞（胃がん細胞）を用いて細胞染色の条件の検討を行った。市販のCD133抗体のクローンを3種類用いて比較検討を行った結果、特異性が高いクローンを見出すことができた。また、白血球細胞にKATO-を添加し、幹細胞マーカーであるCD133、血中循環がん細胞のマーカーであるサイトケラチン(CK)、白血球のマーカーであるCD45、核マーカーであるDAPIとの4重染色の条件を検討した結果、最適な界面活性剤の種類と濃度、および染色時間を確立することができた。さらに、健常人の全血にKATO-細胞を添加し、フィコールを用いた濃度勾配遠心分離法により、白血球画分を分離回収し、細胞チップ上に展開した後、前述の染色条件で4重染色が可能であることが確認できた。

(2)細胞回収システムの構築：従来のマイク

ロマニピレータを用いた方法では細胞チップの穴に対して斜めからアプローチするため、回収するのが困難であった。そのため、細胞チップの穴の真上からアプローチできる装置として倒立顕微鏡にアルテア技研社のピコピペットを組み合わせることで、細胞チップの穴から細胞を容易に回収できるシステムの開発を行った(図4)。培養白血球細胞に培養がん細胞をスパイクし、細胞チップ上に展開し、細胞チップの穴に単層に白血球細胞を並べた後、CK, EpCAM, CD45, DAPIで四重染色を行い、がん細胞(CK陽性、EpCAM陽性、CD45陰性、DAPI陽性)を回収することが可能となった(図5)。また、細胞チップの穴から1細胞を回収するために最適なガラスキャピラリーの形状、直径、表面処理剤を見出した。

図4. 新規細胞回収装置による細胞回収方法

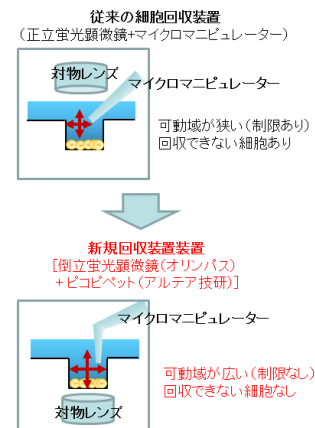
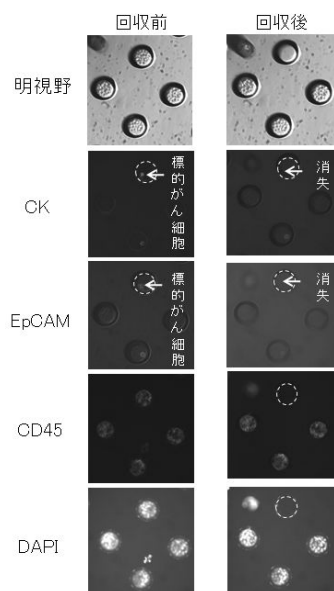


図5. 標的がん細胞の細胞チップから回収前後の写真



(3) 1細胞からの遺伝子発現解析の条件検討：1細胞での遺伝子発現解析には非常に高感度な検出系が求められる。そこで、mRNAの抽出を行わず、直接、細胞溶解バッファを

加え、cDNA 合成を行った後、cDNA 増幅反応を行うことで、1 細胞レベルでの遺伝子発現解析が可能になった (図 6)。

図6 (A) 肺がん患者で検出されたCTC

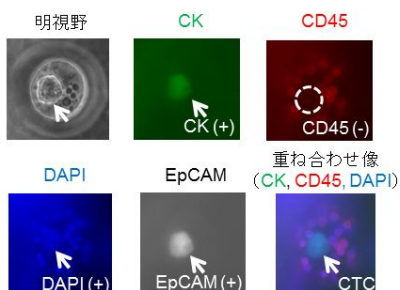
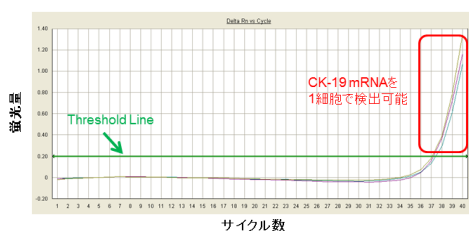


図6 (B) 回収した肺がん患者由来CTC 1細胞からCK-19 mRNAを検出



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

尾華絵里子、八代聖基、山村昌平、阿部佳織、篠原康雄、片岡正俊
 マイクロチップ電気泳動によるマラリア原虫種の新規同定法の構築
 第 53 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
 2014 年 11 月 8 日
 広島国際会議場 (広島県、広島市)

片岡正俊、山村昌平、阿部佳織、尾華絵里子、八代聖基、美田敏宏、櫻井美樹、堀井俊宏
 Development of cell microarray chip for rapid and high sensitive malaria diagnosis
 -Experimental study of cell microarray chip diagnosis system in Uganda-
 2014 SASA ANNUAL CONFERENCE
 2014 年 5 月 7 日
 カンパラ (ウガンダ)

尾華絵里子、阿部佳織、八代聖基、山村昌平、片岡正俊
 Application of microchip electrophoresis for the rapid and accurate identification of Plasmodium falciparum substitute for second PCR in nested PCR
 Advances in Biodetection & Biosensors

2014 年 3 月 10 日
 ベルリン (ドイツ)

橋本芳子、阿部佳織、橋本芳子、八代聖基、山村昌平、片岡正俊
 Quantitative, rapid, and high sensitive analysis of adipokine in blood by immunoassay on microchip
 Advances in Biodetection & Biosensors
 2014 年 3 月 10 日
 ベルリン (ドイツ)

阿部佳織、尾華絵里子、橋本芳子、八代聖基、山村昌平、篠原康雄、馬場嘉信、片岡正俊
 Recovery of malaria-infected erythrocyte from a cell microarray chip with a micromanipulator and PCR analysis for species identification of malaria
 Advances in Biodetection & Biosensors
 2014 年 3 月 10 日
 ベルリン (ドイツ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
 出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
阿部 佳織 (ABE, Kaori)
 徳島大学・病院・特任助教
 研究者番号：60511326

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：