

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 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：2014～2016

課題番号：26350557

研究課題名(和文) 血中循環腫瘍細胞によるがん個別化治療のためのバイオマーカー解析に関する研究

研究課題名(英文) Personalized Biomarker Analysis Using Circulating Tumor Cells

研究代表者

高田 耕児 (TAKATA, Koji)

富山県工業技術センター・機械電子研究所・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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：循環腫瘍細胞(CTC)は血液中を流れる癌細胞であり、癌の転移の原因の一つとも考えられている。このCTCを簡便に分離・解析できれば、癌の検査・診断や患者一人ひとりに適した個別化治療等に応用できる。本研究では、細胞をサイズで分離するマイクロ流路チップを開発し、細胞分離実験によりその性能を確認するとともに、臨床サンプルからチップでCTCを分離し、RT-PCR法によりバイオマーカー解析を行うという簡便な分離・解析法の確立を試みた。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor cells (CTC) are tumor-derived cells circulating in bloodstream and could be seeds for metastases. Easy-to-use isolation and analysis methods of CTC could be applicable to cancer diagnosis and personalized medicine. In this study, we developed microfluidic chips which could be used for size-based cell separation. We showed that the chip could successfully separate cell line spiked to blood, and showed that CTC isolated from clinical sample by the chip could be used for RT-PCR-based biomarker analysis.

研究分野：マイクロ流路チップの医療応用

キーワード：循環腫瘍細胞 癌 マイクロ流路チップ

1. 研究開始当初の背景

癌の増殖・浸潤・転移などに関わる特定の分子に作用する分子標的薬の開発により癌治療の成績向上が期待されている。分子標的薬を効果的に使用するには、患者一人ひとりについて、治療の進行に合わせて癌細胞のバイオマーカーを把握しながら進める個別化治療が求められる。しかし、このような癌細胞のバイオマーカーの検査には生検や手術等により癌組織を採取する方法が用いられており、身体的負担が大きいため検査は容易でなく、経時的に繰り返しサンプルを採取し検査を行うことも困難である。

癌の原発巣から血管に侵入し体内を循環する循環腫瘍細胞 (CTC) は、採取における患者の負担は採血のみで、繰り返しの採取に適しており、上記のバイオマーカーの検査には理想的に使用できる可能性がある。しかし、癌の個別化治療を意識した CTC のバイオマーカーに関する臨床研究はほとんどない。これは、実用的な CTC 分離・解析技術の開発が進んでおらず、従来方法は手間やコスト面から臨床現場での実施には向かないためと考えられる。そのため、実用的な CTC 分離法の開発とそれを用いた簡便なバイオマーカー解析法について検討する必要がある。

2. 研究の目的

マイクロ流路チップを用いて CTC を分離し、分離した CTC について、RT-PCR、免疫蛍光法等によりバイオマーカー (N-Cadherin、Cadherin-11、EGFR 等癌の浸潤、転移と関係するもの) の解析を行い、CTC 解析の簡便な手法を確立することで、CTC を用いた個別化治療の推進に繋げることを目的とする。また、細胞の解析に適したものとなるようにチップを改良し、臨床サンプル等を用いた試験によりその有効性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) チップの試作

マイクロ流路チップの構造は文献¹⁾を参考にし、成型方法は文献²⁾と同様に行った。チップの流路には微細な柱が林立しており、その柱の間隔は 30 μm 、柱の直径は 70 μm 、ピッチは 100 μm 、柱の高さは 50 μm とした。

(2) 細胞分離実験

種々の培養細胞株を用いた分離実験を行った。細胞株として乳がん由来細胞株である MCF-7 (ATCC) 及び MDA-MB-231 (ATCC)、食道がん由来細胞株である KYSE-510 (共同研究者嶋田) を用いた。培養した細胞をトリプシン処理により回収した後、CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit (Thermo Fisher Scientific) により蛍光標識し、PBS で 2 倍希釈した血液に 1000 ~ 10000 cells/mL となるように加えたものを試料とした。一方の入口から試料を、もう一方の入口からバッファー (25wt% Glycerol, 0.5% BSA, 2mM EDTA, PBS) をそ

れぞれシリンジポンプにより流速 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ で送液した。

(3) 臨床サンプルを用いた実験

群馬大学医学部附属病院でニボルマブ治療を受けた肺癌患者 15 症例から治療前の全血を採取し、そのうち 1mL から試作したチップで CTC を含む分画を分離した。

その検体を用いて、N-Cadherin、Cadherin-11、CEA、hTERT、CK19、PD-L1 の発現を RT-PCR で解析し、その発現と治療効果の関係を調べた。RNA 抽出は NucleoSpin RNA XS kit (TAKARA BIO INC.)、逆転写は PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (TAKARA BIO INC.) を用いた。

プライマーは、N-Cadherin: ctccatgtgcc ggatagc、cgatttcaccagaagcctctac、Cadherin-11: ttggcagcaagatccaatg、ctggttgagctcat cagctc、CEA: accacagtcacgacgatcac、ggagtt gttgctggtgatg、hTERT: gccttcaagagccacgctc、ccacgaactgtcgcatgt、CK19: gccactactacacgacatcc、caaacttggttcggaagtcac、PD-L1: ctactggcatttgctgaacg、tgcagccaggctctaatgttt、18S ribosomal RNA: gatggtagtgcgccgtgcc、gc ctgctgccttccctgg とした。

PCR は LightCycler system (Roche) において、LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit (Roche) を用いて行った。18S ribosomal RNA の発現量を内在性コントロールとして、それぞれの遺伝子の相対的な発現量を計算した。

(4) 量産化チップの性能検討

射出成形によってマイクロ流路チップを作製し、その性能を評価した。サイズ分離部に林立した微細な柱の間隔、柱の直径を変えることによりサイズ分離のしきい値を変えた 3 種類 (No.1 ~ No.3) のチップを作製して実験に用いた。No.1 は柱の間隔 30 μm 、柱の直径 70 μm 、ピッチ 100 μm 、柱の高さ 50 μm のチップである。No.2 は柱の間隔 27 μm 、柱の直径 63 μm 、ピッチ 90 μm 、柱の高さ 50 μm のチップ、No.3 は柱の間隔 24 μm 、柱の直径 56 μm 、ピッチ 80 μm 、柱の高さ 50 μm のチップである。

細胞は肺がん由来細胞株 PC-9 (理研 BRC) を用いた。培養した細胞をトリプシン処理により回収した後、CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit (Thermo Fisher Scientific) により蛍光標識し 500 cells/mL となるようにバッファー (25wt% Glycerol, 0.5% BSA, 2mM EDTA, PBS) に加えたものを試料とした。一方の入口から試料を、もう一方の入口からバッファー (25wt% Glycerol, 0.5% BSA, 2mM EDTA, PBS) をそれぞれシリンジポンプにより流速 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ で送液した。

4. 研究成果

(1) チップの作製

RT-PCR 等によるバイオマーカー解析を簡便に行うためには、細胞を懸濁液の状態でも簡便に回収できることが極めて重要である。そのため Deterministic Lateral Displacement (DLD) 法(文献)を用いて細胞をサイズで分離し、懸濁液の状態でも回収するチップの検討を行った。図 1 は DLD 法の模式図である。流路には微細な柱が林立(柱の間隔 G) しており、その柱が一行ごとに d だけシフトしている。しきい値より小さい粒子は液体の流れの方向に進むのに対し、しきい値より大きい粒子は柱の影響で下方方向へシフトしていく。

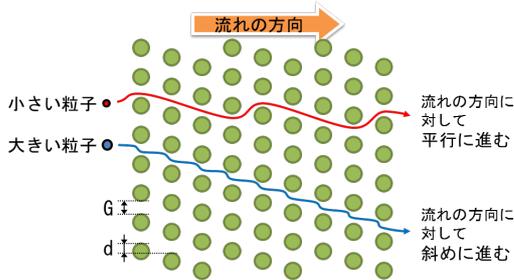


図 1 DLD 法の模式図

試作したチップの外観とサイズ分離部の拡大写真を図 2 に示す。直径 $70\mu\text{m}$ の微細な円柱が 5000 個以上も林立したチップを樹脂で成形することができた。柱の間隔 G は $30\mu\text{m}$ 、シフト量 d は $5\mu\text{m}$ である。

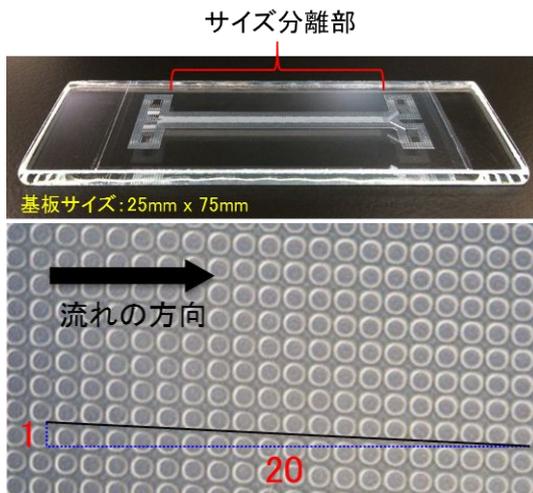


図 2 チップの外観(上)と拡大写真(下)

(2) 細胞分離実験

チップの構造を図 3 に示す。Inlet1 から血液に培養細胞を加えた試料を、Inlet2 からバッファを送液した。図 4 は送液中の流路の拡大写真である。血液が上側を、バッファが下側を、きれいに分かれて流れていることが分かる。試料中の血液はこのまま上側の流れ、Outlet1 から排出される(この液を「廃棄液」とする)。試料中の細胞はサイズ分離部で下方方向へシフトしてバッファ側へ移動し、Outlet2 からバッファとともに回収



図 3 チップの構造

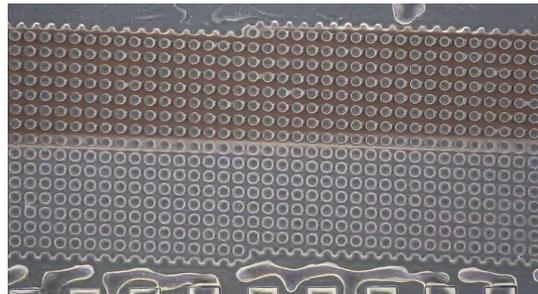


図 4 送液中の流路の拡大写真

される(この液を「回収液」とする)。

回収液中及び廃棄液中の癌細胞の個数を計測したものを表 1 に示す。3 種類の細胞株を用いた実験を行った結果、MCF-7 の回収率は 99.7%、MDA-MB-231 の回収率は 98.4%、KYSE-510 の回収率は 99.6%であり、このチップは高い細胞回収率を示すことが分かった。

表 1 回収液中および廃棄液中の細胞数

細胞株	回収液中の細胞数(割合)	廃棄液中の細胞数(割合)
MCF-7	12350個 (99.7%)	36個 (0.3%)
MDA-MB-231	1142個 (98.4%)	18個 (1.6%)
KYSE-510	1090個 (99.6%)	4個 (0.4%)

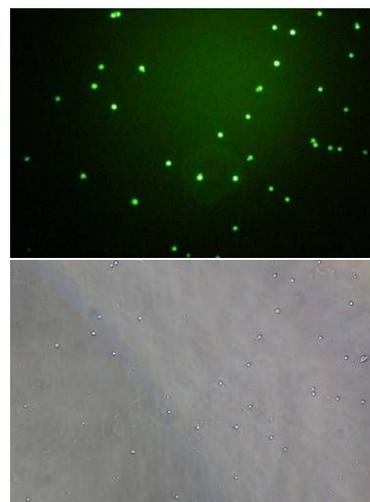


図 5 回収液の蛍光像(上)と位相差像(下)

図 5 に KYSE-510 を用いた実験での回収液の蛍光像と位相差像を示す。蛍光を発する癌細胞の数と蛍光を発しない細胞(主に白血球、白血球は赤血球よりもサイズが大きいので回収液に混入しやすい)の数を数えると、それぞれ 42 個、41 個であり、ここから白血球

の混入数を計算すると 1mL 当たり 1000 個程度となる。これは他の研究チームの結果(文献)と比べても一桁以上少なく、このチップは癌細胞株と白血球との分離性能が良いことが分かった。このように優れた性能を示す要因の一つは、バッファーにグリセリンを加え、試料とバッファーの粘度を調整したことであるが、この方法については特許出願を行った。

また、図 6 に示すように、チップで回収した細胞 (KYSE-510) は再び培養することができた。このことは、チップで回収した CTC についても培養して解析や研究等に用いることができる可能性を示すものである。

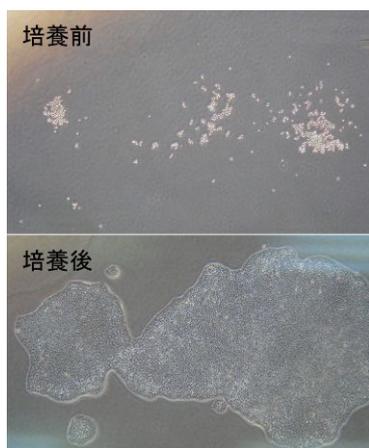


図 6 回収した細胞の培養

(3) 臨床サンプルを用いた実験

臨床サンプルを用いて簡便なバイオマーカー解析法の検討を行った。

サンプルはニボルマブ治療を受けた肺癌患者の治療前の全血である。現状、ニボルマブによる治療前に、ニボルマブによる治療効果を予測する血液マーカーが切望されているが、ニボルマブの治療効果予測マーカーとして報告されているのは、腫瘍組織の PD-L1 発現や遺伝子変異数などであり、その解析には侵襲的に腫瘍を採取する必要がある。

そのためチップで分離した CTC のマーカー発現を評価することが、ニボルマブの治療効果を予測する簡便な診断技術となりうるかを検討した。

表 2 及び表 3 に患者背景と RT-PCR での標的遺伝子発現を調べた結果を示す。ニボルマブの治療効果については PR 4 症例、SD 7 症例、PD 4 症例であった。当初癌の浸潤、転移と関係するバイオマーカーとして選択した N-Cadherin (NCAD) と Cadherin-11 (CDH11) については今回発現を確認することができなかった。しかし、CEA と hTERT について興味深い結果が得られた。PR の症例は CEA、hTERT 低発現症例が多く、PD 症例はそれらが高発現の症例が多いという結果であり、CEA、hTERT の発現とニボルマブの治療効果との間に関係性が見いだされた。

また、免疫蛍光法により、チップで回収し

表 2 患者背景と CTC マーカー発現 1 (N-Cadherin、Cadherin-11、CK19)

Age	Gender	Histology	CEA in serum	Response	NCAD	CDH11	CK19
74	Female	SqCC	7.9	PR	Negative	Negative	Negative
48	Male	AdenoCa	1.2	PR	Negative	Negative	Negative
64	Male	AdenoCa	4.3	PR	Negative	Negative	Negative
66	Male	AdenoCa	8.8	PR	Negative	Negative	Negative
82	Male	AdenoCa	9.3	SD	Negative	Negative	Negative
73	Male	SqCC	Unkown	SD	Negative	Negative	Negative
73	Male	SqCC	Unkown	SD	Negative	Negative	Negative
47	Male	AdenoCa	11342	SD	Negative	Negative	Negative
57	Male	AdenoCa	70.6	SD	Negative	Negative	Negative
52	Male	AdenoCa	99.7	SD	Negative	Negative	Negative
62	Male	AdenoCa	3.7	SD	Negative	Negative	Positive
78	Male	AdenoCa	1.8	PD	Negative	Negative	Negative
63	Male	AdenoCa	41.6	PD	Negative	Negative	Negative
70	Male	AdenoCa	4.4	PD	Negative	Negative	Negative
72	Female	AdenoCa	5.5	PD	Negative	Negative	Negative

表 3 患者背景と CTC マーカー発現 2 (CEA、hTERT、PDL1)

Age	Gender	Histology	CEA in serum	Response	CEA	hTERT	PDL1
74	Female	SqCC	7.9	PR	Low	Low	Negative
48	Male	AdenoCa	1.2	PR	Low	Low	Negative
64	Male	AdenoCa	4.3	PR	Low	Low	Negative
66	Male	AdenoCa	8.8	PR	Low	Low	Negative
82	Male	AdenoCa	9.3	SD	High	High	Negative
73	Male	SqCC	Unkown	SD	High	High	Negative
73	Male	SqCC	Unkown	SD	Low	High	Negative
47	Male	AdenoCa	11342	SD	Low	High	Positive
57	Male	AdenoCa	70.6	SD	Low	High	Positive
52	Male	AdenoCa	99.7	SD	High	Low	Negative
62	Male	AdenoCa	3.7	SD	Low	Low	Negative
78	Male	AdenoCa	1.8	PD	High	High	Negative
63	Male	AdenoCa	41.6	PD	High	High	Negative
70	Male	AdenoCa	4.4	PD	High	Low	Negative
72	Female	AdenoCa	5.5	PD	High	Low	Negative

た液に CEA 陽性、hTERT 陽性の有核細胞が存在することが確認できた。

これらのことから、マイクロ流路チップによる分離と RT-PCR による解析を組み合わせた手法により、ニボルマブ治療効果と有意に関連するマーカーを明らかにすることができた。今後は、より多数の検体を用いて、今回のマーカーの検証を行うとともに、他の分子標的薬や他のバイオマーカーについても検討する予定である。

今回 1mL の全血からの解析であり CTC 数が少ないため、N-Cadherin や Cadherin-11 等は検出できなかった可能性がある。このチップの処理速度(2倍希釈した全血を約 0.2mL/min で送液)であれば、より多い血液の処理も十分対応できる。今後処理する血液量を増やすことも検討する。

(4) 量産化チップの性能検討

ここまでの結果から、マイクロ流路チップにより CTC を細胞懸濁液の形で回収し、その回収液から RT-PCR によりバイオマーカー発現を解析するという、一連の簡便な解析法を実証することができた。今後は多数検体からの解析を行っていく必要があり、チップも量産化する必要がある。

ここまでの試作チップはチップの成形に 16 分かかり、量産化には適していなかった。そのため射出成形(わずか 38 秒で成形可能であった)で作製したチップについてその性能を確認した。

射出成形により作製したチップの写真及

び流路の走査型電子顕微鏡 (SEM) 像を図 7 に示す。射出成形によって直径 $56\ \mu\text{m}$ (No.3) ~ $70\ \mu\text{m}$ (No.1) の微細な円柱が 5000 個以上も林立したチップを作製することができた。

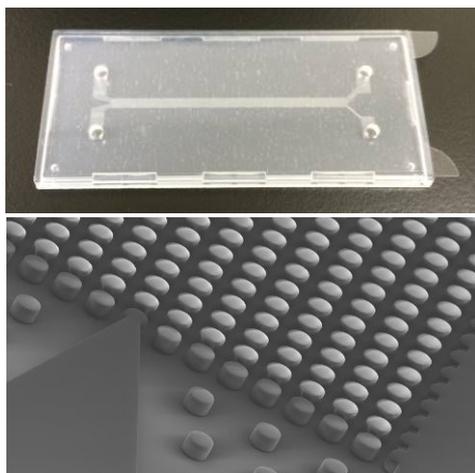


図 7 射出成形チップの写真と流路の SEM 像

チップ 3 種類 (No.1 ~ No.3) について細胞 (PC-9) を送液し、回収液中及び廃棄液中の細胞の個数を計測したものを表 4 に示す。チップ No.1 (柱の間隔 $30\ \mu\text{m}$) の回収率は 94.5%、No.2 (柱の間隔 $27\ \mu\text{m}$) の回収率は 99.8%、No.3 (柱の間隔 $24\ \mu\text{m}$) の回収率は 99.8%以上であった。

表 4 射出成形チップの回収率

Chip No. (柱の間隔)	回収液中の 細胞数(割合)	廃棄液中の 細胞数(割合)
No. 1 ($30\ \mu\text{m}$)	413個 (94.5%)	24個 (5.5%)
No. 2 ($27\ \mu\text{m}$)	428個 (99.8%)	1個 (0.2%)
No. 3 ($24\ \mu\text{m}$)	408個 (99.8%以上)	0個 (0.2%未満)

これらのことから、射出成形チップはこれまでと同様の高い分離性能をもつことを示した。また、柱の間隔が小さいチップはサイズ分離のしきい値が小さいためより高い割合で細胞を回収できることを示した。

CTC は細胞株とくらべて大きさが小さい可能性があり、このようなサイズの小さい CTC に対応するため、今後しきい値の小さいチップで CTC を回収することについても検討する。また、しきい値を小さくすると白血球等の標的外の細胞がより多く混入するようになる。RT-PCR ベースの解析ではあまり悪影響はないと考えられるが、他の解析法も含めて今後その影響を検証していく。

< 引用文献 >

Huang LR, Cox EC, Austin RH, Sturm JC. Continuous particle separation through deterministic lateral displacement. Science 2004;304(5673):987-90.

Ohnaga T, Shimada Y, Moriyama M, Kishi H, Obata T, Takata K, et al. Polymeric microfluidic devices exhibiting sufficient capture of cancer cell line for isolation of circulating tumor cells. Biomedicalmicrodevices 2013;15(4):611-6.

Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, et al. Inertial Focusing for Tumor Antigen-Dependent and Independent Sorting of Rare Circulating Tumor Cells Sci Transl Med. 2013;5(179):179ra47

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 3 件)

高田耕児、小幡勤、横堀武彦、長田拓哉、嶋田裕、血中循環腫瘍細胞によるがん個別化治療のためのバイオマーカー解析に関する研究、富山県工業技術センター研究報告、査読無、31 巻、2017、ページ未定

高田耕児、大永崇、小幡勤、長田拓哉、塚田一博、嶋田裕、血中循環腫瘍細胞によるがん個別化治療のためのバイオマーカー解析に関する研究、富山県工業技術センター研究報告、査読無、30 巻、2016、89

高田耕児、大永崇、小幡勤、長田拓哉、塚田一博、嶋田裕、血中循環腫瘍細胞によるがん個別化治療のためのバイオマーカー解析に関する研究、富山県工業技術センター研究報告、査読無、29 巻、2015、92

[学会発表](計 4 件)

横堀武彦(代表)、大竹紗弥香、解良恭一、大永崇、高田耕児、鈴木信、浅尾高行、桑野博行、新型 CTC チップの臨床応用を目指して、第 117 回日本外科学会定期学術集会、平成 29 年 4 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

横堀武彦(代表)、大竹紗弥香、大永崇、高田耕児、鈴木信、白岡雅、浅尾高行、桑野博行、西山正彦、CTCchip を利用した神経芽腫患者の低侵襲 MYCN 評価法の確立、第 1 回 CTC 臨床応用研究会、平成 28 年 7 月 17 日、東大寺総合文化センター(奈良県・奈良市)

横堀武彦(代表)、大竹紗弥香、白岡雅、高田耕児、大永崇、鈴木信、浅尾高行、桑野博行、西山正彦、循環癌細胞分離チップを用

いた循環神経芽腫細胞の捕捉と MYCN 評価の意義、第 25 回日本癌病態治療研究会、平成 28 年 6 月 8 日、三井ガーデンホテル千葉(千葉県・千葉市)

高田耕児(代表)、大永崇、長田拓哉、嶋田裕、塚田一博、CTC sorting chips: polymer microfluidic chips for marker-dependent and -independent isolation of circulating tumor cells、第 74 回日本癌学会学術総会、平成 27 年 10 月 8 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称:細胞を分離する方法及び装置
発明者:高田耕児、大永崇、小幡勤
権利者:富山県
種類:特許
番号:特願 2016-077717
出願年月日:平成 28 年 4 月 8 日
国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

高田 耕児 (TAKATA, Koji)
富山県工業技術センター・機械電子研究所・主任研究員
研究者番号: 4 0 5 3 0 6 2 1

(2)研究分担者

塚田 一博 (TSUKADA, Kazuhiro)
富山大学・医学薬学研究部・教授
研究者番号: 9 0 1 7 1 9 6 7

(3)研究分担者

嶋田 裕 (SHIMADA, Yutaka)
京都大学・薬学研究科・客員教授
研究者番号: 3 0 2 1 6 0 7 2

(4)研究分担者

長田 拓哉 (NAGATA, Takuya)
富山大学・付属病院・講師
研究者番号: 4 0 3 0 3 2 4 2
(平成 28 年度より研究分担者)

(5)研究分担者

横堀 武彦 (YOKOBORI, Takehiko)
群馬大学・未来先端研究機構・講師
研究者番号: 6 0 4 2 0 0 9 8
(平成 28 年度より研究分担者)

(6)連携研究者

大永 崇 (OHNAGA, Takashi)
富山県工業技術センター・中央研究所・副主幹研究員
研究者番号: 1 0 4 1 6 1 3 3

(7)連携研究者

小幡 勤 (OBATA, Tsutomu)
富山県工業技術センター・中央研究所・副主幹研究員
研究者番号: 3 0 4 1 6 1 4 3