

血中循環がん細胞の検出用細胞チップの開発における本格研究 がんの早期診断法を開発

血中循環がん細胞（CTC）の検査

現在、がんを早期に診断し、外科手術を行うことでがん患者の生存率が向上しています。しかし、がんは診断された時点で既にほかの場所に転移していることが多いため、転移・再発ががん死の大きな要因となっています。近年、がん細胞は腫瘍組織から離れて血管中に入り転移することも考えられており、血液中循環がん細胞（Circulating Tumor Cell：以下CTC）の解析は、転移がんの予後予測、治療効果判定などに有効な検査として期待されています。

しかし、CTCが存在する割合は、血液10 ml（白血球約5千万個）中に数個といわれており、これまでの細胞解析手法であるフローサイトメトリ法やPCR法などでは検出が極めて困難です。最近、アメリカ食品医薬品局に認可されたCell Search System（Veridex社）が、血液7.5 ml中から数個のがん細胞の検出に成功しています。しかし、CTC検出の第一段階で、上皮細胞に特異的に発現しているEpCAMに対する抗体を用いて細胞を選別回収した後に、がん細胞を検出する方法のため、EpCAMの発現量が少ないがん細胞を検出できない問題があります。したがって、これらの問題を克服するには、多数の血液細胞を細胞

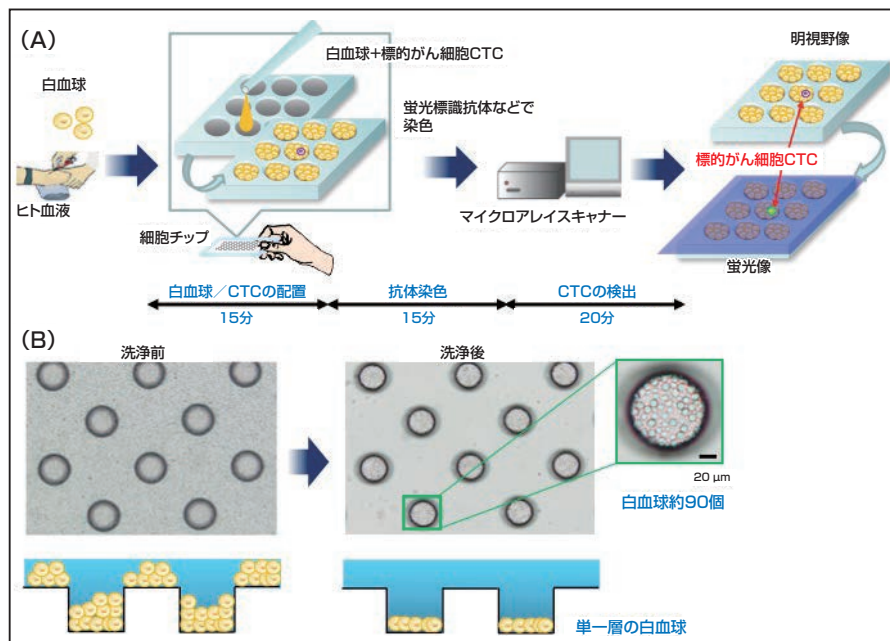


図1 細胞チップを用いたCTC検出システム (A) および細胞チップ上での白血球の配列 (B)

レベルで高精度に操作、検出する必要があります。

CTC検出用細胞チップ

私たちは、これまでの細胞解析手法に代わる新しい原理に基づき、独自に開発した細胞チップ技術を用いて、正確にCTCを検出できる技術を確認しようと考えました。

開発には各種疾患の発症前あるいは転移前の早期診断を行うため、病因となる希少な細胞を多量の細胞の中か

ら発見する技術が必要です。CTCの検出では、前述したようにヒト全血10 mlから赤血球を除いたとしても白血球約5千万個に数個のCTCを見つけなければなりません。それには、数千万個の細胞中から1個のがん細胞を発見する技術が求められます。これまでの細胞解析技術は、主な原理として細胞を細い流路に流しながら検出する手法や抗体を用いてカラムやフィルターなどで捕捉する手法などが挙げられます。しかし、これらの手法では正確に1個の細胞だけを発見することは極めて困難です。

そこで、私たちは、多数の細胞を均一かつ単一の層に配列できれば、その中に混在している標的のがん細胞も見落とすことなく正確に検出できると考えました。例えるなら、「木を見て森を見ず」では正確な検出はできないので、木を見てなおかつ森も見するような新たな検出手法を目指しました。マイクロチップ技術を用いて、マイクロチャンバーと呼ばれる微小穴を1万個



2008年現研究グループに着任。各種疾患の診断などを目指したバイオチップの研究開発に従事。特に単一細胞レベルで解析できる細胞チップの開発を進めています。臨床経験のあるグループ長やマラリアを専門とする研究者との異分野連携によって、マラリアやがん細胞を標的とした早期診断システムの開発に至っており、将来新しい診断技術を世の中に提供したいと考えています。

山村 昌平 (やまむら しょうへい)
yamamura-s@aist.go.jp
健康工学研究部門
バイオマーカー解析研究グループ 研究員 (四国センター)

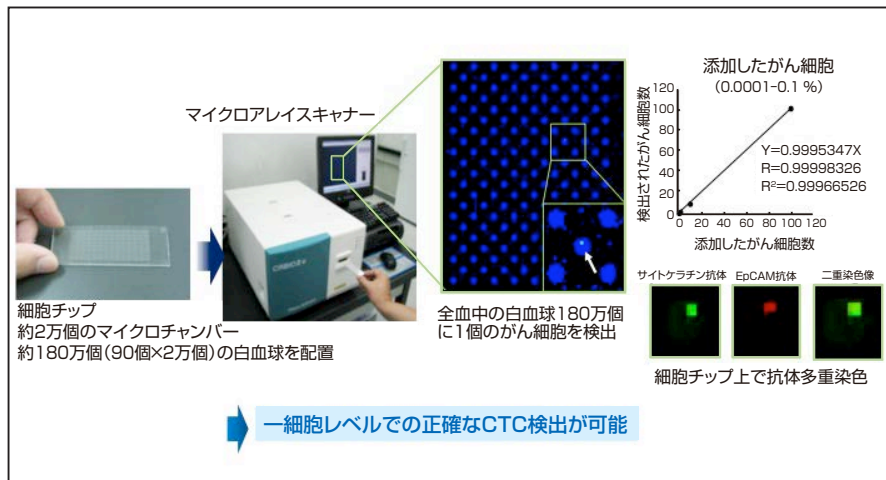


図2 細胞チップを用いた全血中のがん細胞検出

作り、そこに細胞を正確に100個ずつ格納すると、1枚のチップに100万個の細胞を配置できます。たとえばその中に1個の標的細胞が存在する場合は、一見、100万個に1個の細胞ですが、一つのマイクロチャンバーに着目すれば、100個に1個の標的細胞となっており、簡単に見つけることができます。この手法では細胞の分離と濃縮が一度にできるので、標的細胞の検出の高感度、高精度化が期待されます。このように細胞を規則正しく配置させ検出、解析できる手のひらサイズのマイクロチップ基板を細胞チップと呼んでいます。

この細胞チップを用いて、すでにマラリアの迅速診断法として、数百万個の赤血球から1個のマラリア感染赤血球の検出に成功しており、マラリア感染初期段階（自覚症状の前）での迅速診断法を確立しています（特願2010-527805、13/060531（米国）、09811528.0（EPC）、*PloS One*, 5, e13179, 2010）。

さらに、この細胞チップ技術を応用して、CTC検出システムの構築を目指し、全血中の白血球の中から、極少数のがん細胞をチップ上で正確に検出

できるシステムの開発を目標としました。実際には、スライドガラス程度の大きさのプラスチック基板に、白血球を約90個単位で格納できるマイクロチャンバーを2万穴作成しました。がん細胞を添加した全血試料から分離回収した白血球の懸濁液をこの細胞チップ上に展開し、15分間静置後、余剰の細胞を洗浄して細胞を均一かつ単一層に配置します。さらに、細胞チップ上で蛍光標識抗体などによる細胞の染色を15分間行い、専用の蛍光スキャナーを用いてスキャン（20分間）します（図1）。細胞チップへの展開・染色・検出という簡単な操作だけで、全てのマイクロチャンバー内を観察して、1時間以内に180万個の白血球の中から1個のがん細胞を検出できるCTC検出法を確立しました（図2、*PLoS One*, 2012 (in press)）。この技術の優れた点としては、マイクロチャンバーの形状や表面処理を最適化することによって、通常のピペットを用いた簡易な操作でマイクロチャンバー内に細胞が重なることなく単一層に格納でき（図1B）、数百万個の白血球の中からたった1個のがん細胞を正確に見つけ出せることです（図2）。これによ

り、1枚の細胞チップで世界トップレベルの細胞数の解析が可能になり、それに加えて、チップ上でさまざまな抗体による高精度ながん細胞の選別ができるため（図2）、細胞レベルで正確なCTC検出ができ、新しい診断法になると思われます。

社会的波及効果と今後の展開

この細胞チップは、これまでの問題点である正確性などを克服するだけでなく、今後の展開として、検出された標的がん細胞を回収し、さらに詳細な遺伝子解析なども可能なため応用も期待されます。この新しいCTC検出法によって、転移がんの再発・転移を早期に発見でき、術後の治療効果の経過観察や再発防止の治療手段が考慮できるようになり、肉体的にもコスト的にも負担の少ない治療につながります。また、この細胞チップの簡便で迅速な操作性により、特別な技術者は不要なので、コスト削減にもなり、定期的なモニタリングにも適しています。したがって、この細胞チップシステムは、転移がんの早期発見、早期診断の新しい手法として期待されると思われます。

今後は、この細胞チップの集積化も含めたデザインの改良や検出装置の開発を共同研究先の企業と進め、同時に医療機関との共同研究も進めることによって、新しい診断システムとして製品化につなげていきたいと考えています。