

# 血中循環腫瘍細胞のシングルセル分離技術

吉野 知子・根岸 諒

## 1. はじめに

血中循環腫瘍細胞 (CTC: Circulating tumor cell) はがん組織から血管内に侵入し、血流に乗り全身を循環するようになった腫瘍細胞である (図1)。がんの血行性転移に関与することが知られており、採血のみで低侵襲的かつ定期的に採取できる腫瘍細胞であることから、液体生検 (リキッドバイオプシー) の主要なターゲットとして知られている。液体生検とは、血液や尿などの体液を利用してがんの性質を評価する技術で、CTCや血中循環腫瘍DNA (ctDNA: circulating tumor DNA), Exosomeなどが測定対象として挙げられている。特にCTCは、転移・再発症例で生検が不可能な場合の組織代替サンプルとしての利用や、定期的な採取・解析による治療効果のモニタリングへの利用が可能であると考えられており、個別化医療の発展への寄与が期待されている<sup>1,2)</sup>。さらにCTCは、近年の研究により原発巣 (最初に発生したがん) とも転移巣 (別の臓器に転移したがん) とも異なる性質を持つことがわかってきており、転移メカニズムの理解や、新たな治療標的の探索など、創薬分野での応用も検討されて

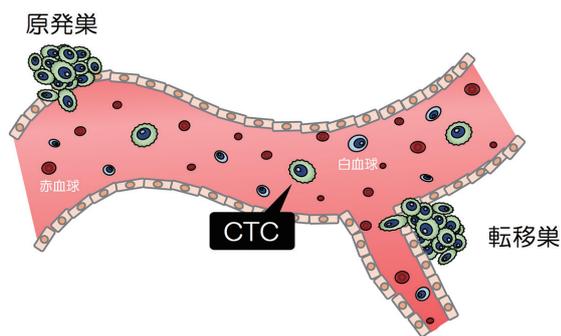


図1 血中循環腫瘍細胞 (CTC) の模式図

いる。一方で、CTCは血液1 mL中に含まれる約50億個の血球のうち、多くても100個程度しか存在しない非常に希少な細胞である。そのため、CTCの解析には高精度な細胞分離技術が必要であった。本稿ではCTC解析向けの技術開発の現状と、筆者らの研究グループで開発を進めているCTC分離技術であるMCA/GCM (Microcavity array/gel-based cell manipulation)法について紹介する。

## 2. CTC解析の流れ

### 2.1 CTC濃縮

上述の通り、CTCは非常に希少な細胞であることから、採取した血液をそのまま顕微鏡やFACS (Fluorescence activated cell sorting) 等で解析することは効率面において不適である。そのため、通常は血液の中から赤血球や白血球などの正常血球を除去し、CTCの存在比を上げる濃縮操作がおこなわれる。CTCの濃縮技術は主に、CTCの表面に発現しているタンパク質を標的として抗体を利用して分離回収する「抗原抗体反応方式」と、CTCと正常血球のサイズや変形能の差を利用して分離回収する「物理的分離方式」に分けられる (図2)。

抗原抗体反応方式では、主に上皮細胞表面に存在するEpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) と呼ばれるタンパク質を認識する抗体が利用されている。抗体の固定化担体は磁気微粒子やマイクロ流体デバイスなど様々であり、CellSearch System (Silicon Biosystems) やCTC-chipなどが代表的な技術として知られている<sup>3,4)</sup>。特に、CellSearch SystemによるCTC数の計測は、転移性の乳がん、前立腺がん、大腸がんにおける予後診断への利用が米国FDA (Food and drug administration) に認可されている。一方で、CTCは非常に不均一な細胞集団であり、EMT (Epithelial mesenchymal transition: 上皮間葉転換)により上皮性(上皮細胞に見られる特徴)を失い、EpCAMを発現しなくなったCTCが存在することが知られている<sup>5)</sup>。EMTはCTCの転移巣への生着に関連



Development of Single-Cell Isolation System for Circulating Tumor Cells  
Tomoko YOSHINO  
2005年 東京農工大学大学院工学教育部生命工学専攻博士課程修了 博士(工学)  
現在 東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門 教授  
連絡先: 〒185-8588 東京都小金井市中町2-24-16  
E-mail y-tomoko@cc.tuat.ac.jp

Ryo NEGISHI  
2017年 東京農工大学大学院工学府生命工学専攻博士後期課程修了 博士(工学)  
現在 東京農工大学大学院工学府 特任助教  
連絡先: 〒185-8588 東京都小金井市中町2-24-16  
E-mail r-negishi@go.tuat.ac.jp

2020年11月5日受理

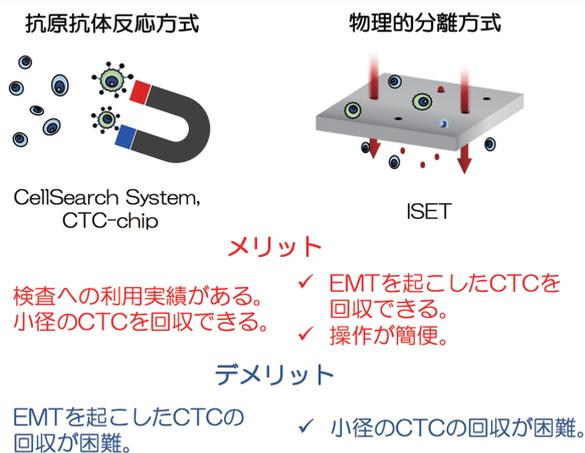


図2 CTCの濃縮方法の比較

していると考えられ、EMTを起こしたCTCの解析が求められているが、抗原抗体反応方式の手法ではこれらの検出が困難であることが課題となっている。近年では白血球の表面抗原であるCD45に対する抗体を用いて白血球を除去する手法が開発されているが、除去効率が低く、更なる精度向上が求められている。

物理的分離方式では、CTCが正常血球と比較してサイズが大きく、変形能が低い性質を持つことを利用してCTCを選択的に回収する。Isolation by size of epithelial tumor cell (ISET) と呼ばれ、主にはメンブレンフィルターなどを使用して、フィルター上にCTCを回収する。抗原抗体反応方式と比較して操作が簡便であり、タンパク質の発現に依存しないため、EMTを起こしたCTCを回収できることから、肺がんなどがん種によっては抗原抗体反応方式の手法よりも多くのCTCを回収できることが知られている<sup>9)</sup>。一方で、血液をフィルトレーションしてCTCを回収することから、フィルターの孔径と同等あるいはそれ以下のサイズのCTCが通り抜けてしまい回収できない点が課題として挙げられている。このように、現状のCTCの濃縮技術はそれぞれ一長一短があり、全てのCTCを余すことなく回収することはできず、目的によって使い分けていくことが必要となっている。

## 2.2 CTCのシングルセル分離

2004年にCellSearch Systemを用いたCTC計数による予後診断法が承認されて以降、様々ながん種でのCTC計数が試みられてきたが、現在においても診断利用が認められているのは先に挙げた3種のがん種のみであり、CTCの数を持つ臨床的な意味は限定されていることが周知の事実となっている。一方で、近年のシングルセル解析技術の発展は目覚ましく、ゲノムやトランスクリプトームといった膨大な情報を1細胞からでも取得することが可能となってきた。そのような背景から、近年ではCTCのシングルセル解析が注目されている。CTCのシングルセル解析をおこなうには、CTCを濃縮したサンプルからCTCのみをシングルセルレベルで分離することが必要となる。一般的なシ

ングルセル解析では、十分量の細胞集団から複数のシングルセルをランダムに分離、解析することで、母集団を構成する細胞種を同定する。そのため、高速でのランダムサンプリングが可能なFACSやドロップレットデバイスなどの技術が使用される。これらは、ハイスループットなシングルセル分離が可能であるが、同時に大量の細胞をロスするため、分離効率は低い。一方で、CTCの場合は解析対象が希少であるため、検出したCTCを余すことなく分離することが必要となる。そのため、現状では顕微鏡下でガラスキャピラリーを用いて細胞を吸引するマイクロマニピュレーション法が使用されることが多い<sup>7-9)</sup>。マイクロマニピュレーション法は観察した細胞を直接分離することができることから、CTCなどの希少細胞の分離に適しているが、労働集約的な操作が求められる。近年では顕微鏡システムと一体となった自動化装置や、誘電泳動に基づくシングルセル分離システムであるDEPArrayなどが販売されているが、いずれも数千万円程度の高額な装置であり、普及には至っていない<sup>10, 11)</sup>。そのため、簡易かつ迅速かつ、細胞のロスの危険性が少ない技術がCTC解析には求められる。

## 3. MCA/GCM法によるCTCのシングルセル分離

### 3.1 MCAによるCTCの濃縮技術

筆者らの研究室では、シングルセルのイメージング解析の支援ツールとして、Niなどの金属製基板に直径数 $\mu\text{m}$ の微細な貫通孔を配したフィルターであるMicrocavity array (MCA)を開発してきた(図3)。MCAを介して細胞懸濁液を吸引することで、シングルセルを孔の上に捕捉することが可能であり、数千から数万細胞程度の微量な細胞集団を90%以上の効率でアレイ化することができる。そこで、筆者らはMCAの微細孔のサイズを検討することで、血液からCTCを選択的に回収できると考えた。孔径と流速を検討した結果、直径8~9 $\mu\text{m}$ の円形の孔を10<sup>4</sup>個配置したMCAを用いた場合に血液中に添加した肺がん細胞の90%を回収できることがわかった<sup>12)</sup>。さらに、静岡がんセンターとの共同研究において、転移性非小細胞肺がん・小細胞肺がん症例を対象にCTC検出試験をおこなった結果、全42

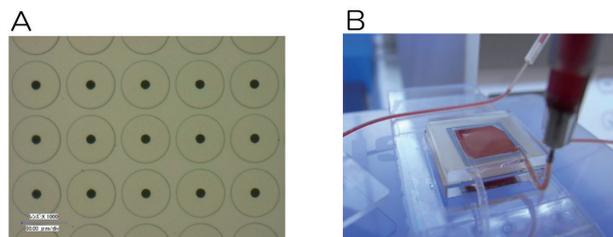


図3 MCAによるCTC濃縮システム  
A: MCA表面の顕微鏡画像, B: MCAを内蔵したデバイス

症例中37症例からCTCを検出し、CTCの検出率、平均検出数はCellSearch Systemと比較して高かった。このことから、MCAが肺がん症例におけるCTC回収及び検出において有用であることが明らかとなっている<sup>13)</sup>。

一方で、MCAはフィルトレーションを原理とすることから、孔径と同程度のサイズのCTCをロスする可能性があり、模擬サンプルでの試験においても平均サイズが小さいがん細胞(13 μm以下)の場合に細胞回収率が6割程度まで低下することが確認された。MCAは電鍍加工を用いて孔を形成しているため、孔径だけではなく形状を制御することが可能である。そこで、小径のCTCの回収に向けた取り組みとして、孔の形状の検討をおこなった。フィルトレーションの際にMCAに掛かる差圧が回収率の低下に繋がると考え、一つの細胞で孔が占有されない長方形の孔を持つMCAを開発した。実際に血液3 mLをフィルトレーションした際の差圧を評価した結果、円形孔のMCAでは差圧が最大で2.3 kPaまで上昇したのに対して、長方形孔では1.5 kPa以下となった。また、円形孔のMCAではフィルトレーション後に差圧が増大したままであるのに対し、長方形孔のMCAではフィルトレーション前の値まで低下した。このことから、孔を長方形型とすることで、円形孔と比較して低い差圧条件で血液のフィルトレーションが可能であることが示された。さらに、小径のがん細胞である小細胞肺がん細胞の回収率は80%以上となり、円形孔MCAと比較して回収率の向上を達成した<sup>14)</sup>。このように、筆者らは微細貫通孔の形状が細胞の回収効率に影響を与えることを見出し、様々な細胞の回収に向けたフィルター開発を進めている。また、化学メーカーとの共同研究にてMCA方式に基づくCTC自動濃縮装置を開発し、医療機関での性能評価試験を進めている<sup>15,16)</sup>。

### 3.2 GCM法によるCTCのシングルセル分離

マイクロマニピュレーションによるシングルセルの分離が困難を極める要因としては、細胞が非常に小さいため顕微鏡観察下での操作が必須であることが第一に挙げられる。そのため、実施者には肉体的にも精神的にも大きな負担が掛かり、大量の検体を処理する上で適さない。そこで筆者らは細胞を目に見える大きさのハイドロゲルに包埋することで、ピンセットなどを用いて細胞を容易に分離することが可能になると考えた。筆者らは本手法をGel-based cell manipulation (GCM)法と定義し、シングルセル遺伝子解析への応用が可能か評価を進めた<sup>17)</sup>。細胞の包埋においては局所的に光照射をおこなうことで任意の形状に硬化可能な光硬化性ハイドロゲル Poly (ethylene glycol) diacrylate (PEGDA)を選択した。具体的な手順は以下の通りである(図4)。(1) MCA上にがん細胞を回収したのち、上部から光重合開始剤を添加したPEGDAを積層し、カバーガラスを用いて封入する。(2) その後、蛍光顕微鏡を用いてがん細胞の周囲のみ波長365 nmの光照射をおこなうことで、シ

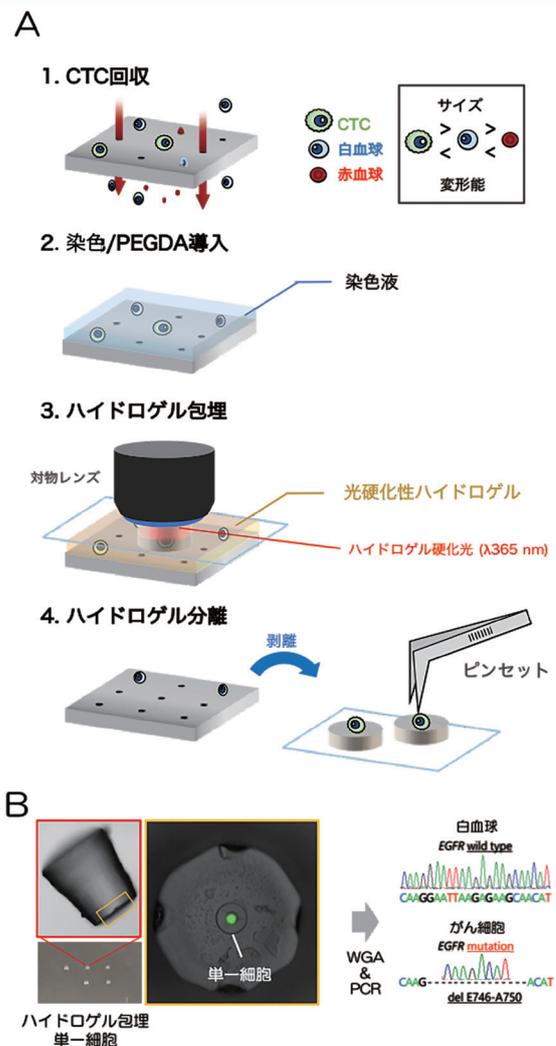


図4 GCM法によるMCA上からのシングルセル分離  
A: MCA/GCM法のプロトコル, B: ハイドロゲル包埋単一細胞と遺伝子変異解析結果

ングルセルを包埋したハイドロゲルを作製する。(3)最後に、カバーガラスを除去する。この時、ハイドロゲルがカバーガラスとともにMCA上から脱離するため、ピンセットを用いてPCRチューブなどの反応層に分離することが可能である。サイズの異なる複数のがん細胞を対象としてシングルセル分離効率を評価した結果、いずれも95%以上の効率での細胞分離が可能であり、本手法が高精度なシングルセル分離に利用可能であることが明らかとなった。また、細胞の分離に要する時間は長くても30秒程度であり、一細胞当たり数分から十分程度を要するマイクロマニピュレーションと比較して迅速な分離が可能であった。さらに、細胞はMCAの孔に捕捉されているため、ハイドロゲルから一部露出した状態で包埋される。これにより、シングルセルに対して細胞溶解液やDNA合成酵素などがアクセスでき、全ゲノム増幅(Whole genome amplification: WGA)や全トランスクリプトーム増幅などの後段の核酸増幅反応に供することができる。次に、本手法によるCTCのシングルセル遺伝子変異解析の実証試験として、健常者血液に

がん細胞を添加した試料を対象としてMCA/GCM法によるシングルセル分離とWGA, サンガーシーケンスによる遺伝子変異検出を試みた。がん細胞と白血球をそれぞれシングルセル分離し、一部のがんにおいて変異が認められる上皮成長因子受容体(EGFR: epidermal growth factor receptor) 遺伝子の遺伝子配列を解析した結果、がん細胞のみからがん細胞特有の遺伝子変異が検出された。これらの結果から、MCA/GCM法は周囲の細胞を巻き込むことなく高精度なシングルセル分離をおこなうことが可能であることが示された。

筆者らはGCM法の更なるスループット向上に向けて、プロジェクターなどに使用される光学素子であるDigital micromirror device (DMD) と、独自に開発を進めていた広視野蛍光イメージングシステムを統合した新たな光照射システムの開発を開始した<sup>18)</sup>。広視野蛍光イメージングシステムはCMOSセンサーにMCA全体の像を投影することで、一度に全面を撮像することができる。DMDは数マイクロメートル角の微小な鏡が高密度にアレイ化したものであり、任意の形状の光を反射することができる。これらを統合することにより、検出した複数のCTCに同時に光を照射し、ハイドロゲルに包埋することが可能になる(図5)。実際に、MCA上の任意の位置にアレイ化されたがん細胞に対して光照射をおこなった結果、 $10^2$ のがん細胞に対し一度に光照射、ハイドロゲル包埋が可能であり、90%以上の効率で分離することが可能であった。このことからDMDを利用することでMCA/GCM法によるシングルセル分離プロセスのハイスループット化が達成された。さらに現在は、高倍率観察にも対応した新型機も開発しており<sup>19)</sup>、CTCだけでなく接着細胞やオルガノイド、環境微生物の分離に向けた技術開発を進めている。

上記のように筆者らはCTC解析に向けた技術開発を進めているが、医療機関との共同研究においてがん患者のCTCのシングルセルオミクス解析も並行して進めている。都立駒込病院との共同研究において、胃がん、すい臓がん患者からのCTC分離及びトランスクリプトーム解析を進め、遺伝子発現パターンからCTCの多くがEMTを起こし、上皮性を失った細胞であることを明らかにしている。さらに、EMTの誘導因子として血小板によるシグナル伝達などの複数の経路が関与していることを確認しており、薬剤耐性獲得の機序の理解に向けた情報が蓄積されつつある。

#### 4. おわりに

本稿ではCTCのシングルセル分離技術の開発状況と筆者らが独自に開発を進めているMCA/GCM法について概説した。CTCの研究は2000年代の初頭から徐々に取り組まれていたが、技術的な難しさから同様の液体生検のターゲットである血中腫瘍DNA(Circulating tumor DNA: ctDNA)などと比較して解析が遅れている状況にある。近年のシグ

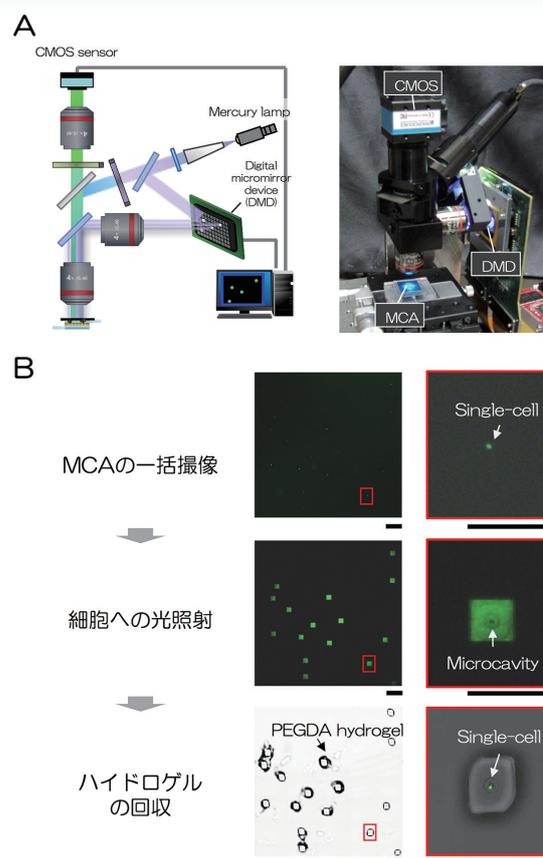


図5 DMDを用いたマルチ光照射システム  
A: 装置概要, B: MCAの全面撮像及び細胞への同時光照射によるハイドロゲルの作製。スケールバー: 500 μm (左列), 250 μm (右列)

ルセル遺伝子解析技術の発展により、CTC研究にも進展の兆しが見えてきており、ctDNA解析だけでは得られない情報を取得できることが明らかとなっている。一方で、シングルセル分離プロセスはまだ改善の余地が残されており、爆発的な普及には程遠い。クライオ電子顕微鏡の登場が生体分子の立体構造解析におけるパラダイムシフトを起こしたように、研究領域全体を一步先に推し進めるためには技術革新が不可欠である。我々はCTC解析による医療品質、がん患者のQOL向上の実現に向けて、今後も工学の立場から研究開発を進めていきたいと考えている。

#### 参考文献

- 1) Miyamoto et al. : *Science*, **349** (6254), 1351-1356 (2015)
- 2) Yu et al. : *Science*, **339** (6119), 580-584 (2013)
- 3) Cristofanilli et al. : *N. Engl. J. Med.*, **351** (8), 781-791 (2004)
- 4) Nagrath et al. : *Nature*, **450** (7173), 1235-1239 (2007)
- 5) Lampignano et al. : *Int. J. Mol. Sci.*, **18** (9), 1885-1901 (2017)
- 6) Hofman et al. : *Int. J. Cancer*, **129** (7), 1651-1660 (2011)
- 7) Gorges et al. : *Clin. Chem.*, **62** (11), 1504-1515 (2016)
- 8) D'Avola et al. : *Sci. Rep.*, **8** (1), 11570 (2018)
- 9) Sun et al. : *Clin. Cancer Res.*, **24** (3), 547-559 (2018)
- 10) Szczerba et al. : *Nature*, **566** (7745), 553-557 (2019)
- 11) Peeters et al. : *Br. J. Cancer*, **108** (6), 1358-1367 (2013)
- 12) Hosokawa et al. : *Anal. Chem.*, **82** (15), 6629-6635 (2010)
- 13) Hosokawa et al. : *PLoS One*, **8** (6), e67466 (2013)
- 14) Hosokawa et al. : *Anal. Chem.*, **85** (12), 5692-5698 (2013)
- 15) Negishi et al. : *Biosens. Bioelectron.*, **67** 438-442 (2015)
- 16) Yagi et al. : *PLoS One*, **12** (6), e0179744 (2017)
- 17) Yoshino et al. : *Anal. Chem.*, **88** (14), 7230-7237 (2016)
- 18) Negishi et al. : *Anal. Chem.*, **90** (16), 9734-9741 (2018)
- 19) Negishi et al. : *Eng. Life Sci.*, Early view (2020)