

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

電子技術課 高田耕児 中央研究所 大永崇 小幡勤

富山大学大学院医学薬学研究部 長田拓哉 塚田一博 京都大学大学院薬学研究科 嶋田裕

1. 緒言

循環腫瘍細胞 (CTC) は血液中を流れる癌細胞であり、癌の転移の原因とも考えられている。この CTC を回収・解析することができれば、癌の検査・診断や患者一人ひとりに適した個別化治療などに応用することができる。しかし CTC は数が極めて少ないため (血液 1mL 中に数個~数十個)、これを回収することは困難であった。これまで、当センターでは、抗体を固定化したマイクロチップにより、癌細胞を捕捉 (固定化) する検討を行っており、一定の成果が得られている。しかしながら、癌細胞をチップに捕捉した場合、細胞を回収することが困難となり、癌細胞の解析 (免疫細胞化学、RT-PCR 等を用いたバイオマーカー等の解析) や培養をする際に制限や問題が生じる。そのため、癌細胞を捕捉するのではなく、解析しやすいように細胞懸濁液の形で回収する技術がより重要となる。

本研究では、血液中の赤血球等と癌細胞をサイズで分離し、癌細胞のみを細胞懸濁液の形で回収するための樹脂製マイクロチップを開発した。

2. 実験

チップの作製は、文献¹⁾の構造を参考にして、既報²⁾と同様に行った。また、マイクロチップにフタをして送液チューブ等を接続するためのチップホルダを作製した。

癌細胞は食道がん由来細胞株である KYSE510 を用いた。培養した癌細胞をトリプシン処理により回収した後、フルオレセインにより蛍光標識し、1000cells/mL となるように血液に懸濁した。試料はシリンジポンプを用いて流速 100 μ L/min で送液した。

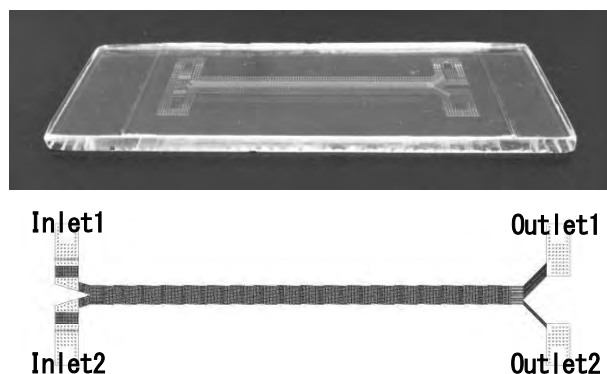


図1 チップの外観および構造

表1 回収液と排出液の細胞数

	排出液	回収液
細胞数(cells)	4	1090
細胞数割合(%)	0.4	99.6

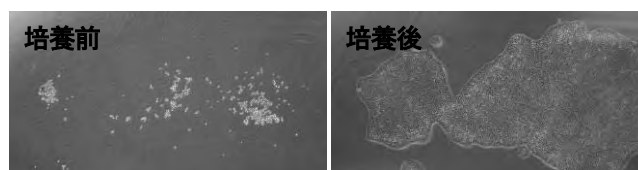


図2 回収した細胞の培養

作製したチップの外観と構造を図1に示す。Inlet1 から癌細胞を混入させた血液を、Inlet2 からはバッファーのみを導入する。血液中の赤血球等は層流になってチップの上側を流れ Outlet1 から排出される。それに対して癌細胞はチップの下側にシフトしていき、Outlet2 から回収される。排出液と回収液中の癌細胞の個数を計測したものを表1に示す。排出液中の細胞数は4個であるのに対し、回収液中の細胞数は1090個であり、99.6%の細胞を血液から分離して回収することができた。また、図2に示すように、回収した細胞は再び培養することができた。今回、1000cells/mL という比較的少ない細胞数での実験で十分な性能を示すことができ、今後、臨床サンプルからの CTC の回収実験でも良い結果が期待される。

3. 結言

血液中の赤血球等と癌細胞とを分離し、癌細胞を回収するマイクロチップを開発し、癌細胞と赤血球等を分離できること、癌細胞を細胞懸濁液の形で回収できることを確認した。これにより、今後回収した細胞の解析、臨床サンプルを用いた実験を進めることが可能となった。

参考文献

- 1) A. Davis J. A. *et al.* PNAS **103**, 14779-14784 (2006)
- 2) 富山県工業技術センター研究報告 **27**, 92-93 (2013)

謝辞

本研究は科研費 (基盤研究 (C) 課題番号: 26350557) の助成を受けたものであり、ここに謝意を表する。