

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
(先端計測分析技術・機器開発プログラム)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 腫瘍内不均一性を考慮した癌生細胞検査法の開発
(英語) Development of examination method of living cancer cells considering
intra-tumor heterogeneity

研究開発実施期間: 2016年8月30日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 杉浦 慎治
(英語) Shinji Sugiura

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・上級主任研究員
(英語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Biotechnology
Research Institute for Drug Discovery, Chief Senior Researcher,

II 研究開発の概要

和文

本研究では、不均一な細胞群を三次元培養下の形態と蛍光標識を指標として単離・培養できる『ハイコンテンツイメージングセルソーター』を開発した。これを用いて、マウス発癌モデルやヒト臨床検体由来の細胞からの細胞分離を実施し、多様な細胞によって構成される癌細胞群を分離した上で検査する手法の有用性を検証した。

『ハイコンテンツイメージングセルソーター』は、杉浦慎治（産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門）らが独自に開発した光分解性ゲル内に癌細胞群を抱埋して培養し、培養した細胞の明視野および蛍光画像を自動的に撮像し、加藤竜司（名古屋大学 大学院創薬科学研究科）らが独自に開発した画像解析アルゴリズムによって多様な癌細胞群を分類し、標的とされた癌細胞周辺に光を照射して光分解性ゲルを溶解し、ピペッティングにより回収する装置である。柳沢真澄（エンジニアリングシステム株式会社）が中心となり、撮像・解析・光照射・ピペット回収を自動的に行うことのできる装置を開発した（図1）。

装置の撮像は、明視野および二色の蛍光観察（FITC と RITC）に対応している。また、装置の形態判別アルゴリズムは最大 8 種類の形態タイプ分類に対応しており、蛍光画像に関しても、FITC および RITC の蛍光画像に対応した分類が可能となっている。総合的な装置のスペックとしては 8 種類の形態タイプと 2 色の蛍光指標の有無とのかけあわせで、32 のサブタイプに分画可能な構成となっている。これにより、不均一な癌細胞群を既知の表面抗原に基づいて分類しつつ、表面抗原に依存しない細胞形態に基づく分類ならびに単離を可能とする装置が完成した。また、癌細胞の撮像を自動的に行う際に、ピントあわせを効率的に行うために、光分解性ゲル内に抱埋培養された癌細胞の上下方向の座標を一定の範囲にとどめることのできる特殊な培養容器を開発した。この培養容器を用いて光分解性ゲル内に癌細胞を抱埋培養し、4 視野×32 ウェル（128 視野）内の癌細胞に対して、形態解析に基づいて特定の細胞を識別し、各ウェルから 1 コロニーずつ回収する実験を行ったところ、3 時間以内に撮像・解析・光照射・ピペット回収の自動処理を完了した。

培養基材の開発および培養条件の探索に関して、杉浦慎治（産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門）と武藤倫弘（国立がん研究センター 予防研究部）が検討を進め、癌細胞が三次元培養下でより迅速に形態変化を示す培養条件を検討した。具体的には、ゲルの硬さ、ゲルを構成する高分子の組成および培養液に添加する増殖因子について検討し、数種の細胞株を用いて細胞分離の際に使用するゲルの組成のレシピを決定した。また、武藤らがマウス adenoma 細胞を用いて培地組成や添加物について検討し、光分解性ゲル内で三次元培養可能な培養条件を見出した。

ハイコンテツイメージングセルソーターに実装した画像解析アルゴリズムの性能を検証するため、同一細胞株（4T1）から得られた 11 クローンを用いて分類判定精度の確認を行った。細胞塊の形態特徴量を数値化し、機械学習を用いたクローン判別モデルを構築したところ、各クローンを培養状態の癌細胞塊の画像形状パラメーターのみを用いて、判別精度 90%以上で薬剤耐性を発現する株を、そのレベル（Low, Medium, High）として判別予測できることがわかった。さらにその判別は培養初期などの早期にも高精度で可能なことがわかり、培養中の細胞塊の形状の経時的モニタリングが装置で可能になると、高度な悪性度診断が行えることを示した。さらに本研究では、単純な「薬剤耐性の変化」を予測するモデル以上の生物学的な体制獲得メカニズムの理解へと本解析アルゴリズムを対応させるため、上記各種クローンの薬剤応答パターンの変化と共に各種薬剤耐性に寄与するトランスポータの発現パターンを定量化し、これら発現パターンのタイプを細胞塊パラメーターのみから予測する判別モデルの構築を行った。結果この予測判定についても 99%以上の高精度予測を実現することができたため、耐性の程度他、その機序についても画像のみから診断できる可能性を示唆することができた。

また、蛍光標識を指標とした細胞分離を実施するために、CD44 陽性の PC-3 および陰性の DU145 細胞に対して、蛍光標識抗 CD44 抗体を用いて染色し、細胞包埋条件、染色条件、バックグラウンド吸着の洗浄条件について検討を行った。染色時間 1 時間のプロトコルで、細胞とバックグラウンドが識別確認可能な条件を見出した。

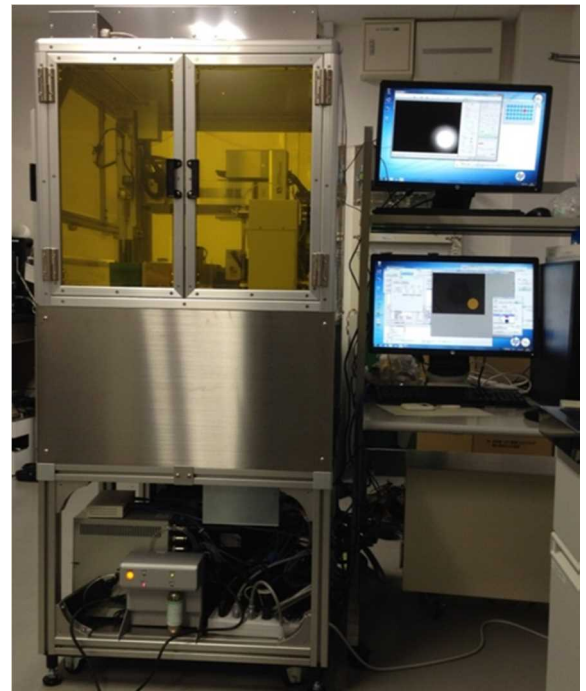


図 1. 作製したハイコンテツイメージングセルソーターの外観。

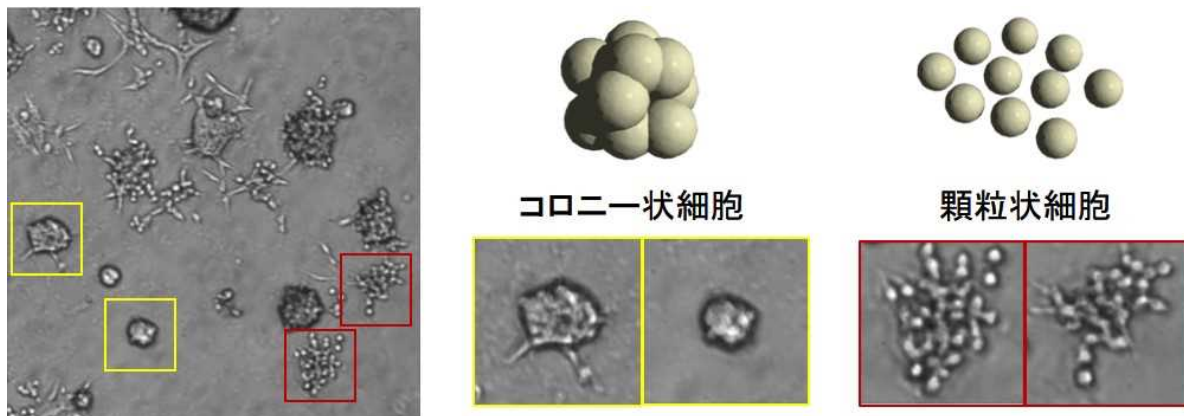


図 2. 形態別に分離された4T1E細胞.

ハイコンテツイメーシングセルソーターの開発機を用いてマウス乳癌由来細胞 4T1E をモデルとして用いて、実際に細胞分離を行った上でインビトロ薬剤感受性試験を実施した (図 2)。分離した細胞を用いてタモキシフェンの感受性試験を行った結果、多様な癌細胞群を形態を指標として層別化することで、母集団とは異なる薬剤感受性を示す群が得られることが確認された。さらに、研究開発の後半では、松井裕史 (筑波大学 医学医療系) らが、マウス乳がん由来細胞株である 4T1 をシングルセルソーティングして樹立したサブクローン 6 株を樹立し、加藤らとともにゲル内でのスフェロイド形態と薬剤感受性の相関を MTT assay で検討した。その結果、親株と比してシクロホスファミドおよびタモキシフェンに対する薬剤感受性が高い形態グループがそれぞれ認められ、ゲル内での 3 次元形態に基づく細胞分離の有用性が示された。また、腫瘍組織から癌細胞を回収する際にサブクローンの存在が保たれているか検証するため、ヒト乳癌細胞株 MCF-7 と MDA-MB-231 を異なる比率で混合してマウスに移植してゼノグラフトモデルにて検証した。ゼノグラフトから腫瘍組織を回収し、回収された細胞を用いて FACS 解析を行ったその結果、1:10 の比率で混合した場合でも、回収後に 2 種類のサブクローンが検出されることを確認した。

ハイコンテツイメーシングセルソーターを用いた検査法の有効性を臨床検体によって検証するために、松井らは、「三次元細胞分離法を用いた新たな腫瘍の診断、癌予後予測の開発と個別化医療への応用」に関する臨床研究を筑波大学附属病院の臨床研究倫理委員会に申請した。分担開発者の松井の所属する消化器内科の他、乳腺外科坂東ら、消化器外科大河内らと協力して臨床検体を採取できる体制を構築し、2017 年 2 月に筑波大学倫理委員会に申請し同年 3 月に承認を得た。

製作したハイコンテツイメーシングセルソーターの基礎研究機を用いて臨床検体由来細胞の分離を試みた。マウスの腫瘍組織から癌細胞を回収するプロトコルをベースに、乳癌の手術検体から癌細胞を回収するプロトコルを作成した。この際に、血球細胞除去および回収細胞数の最大化を指標として、プロトコルを作成した。乳癌手術検体 3 検体を用いて細胞分離試験に向けたゲル包埋培養試験を行った。この際に、細胞を抱埋する光分解性ゲルを構成する高分子の濃度、培地添加物の組成、培養期間の条件を様々に変更しながら、ゲル内で画像解析が可能な細胞増殖を得られる条件を探索した。今回検討した検体に関しては、画像解析が可能となるまで癌細胞が増殖する条件を見いだすことはできなかつたため、臨床検査に応用するためには培養条件の更なる検討や適用癌種腫の再検討が必要であると考えられた。

本研究にて開発されたハイコンテツイメーシングセルソーターを用いた細胞分離において、蛍光に基づく分類では表面抗原ラベルの識別が可能であり、形態に基づく分類は他の技術では分けられない細胞の分画が可能であるため、腫瘍内不均一性に係る研究に対する新たなアプローチとして期待される。研究期間内に株化細胞や動物実験によって確認された成果は、「癌の腫瘍内不均一性の重要性」を示す結果であると考えており、今後は、この腫瘍内不均一性の重要性を臨床研究にて確認しつつ、腫瘍内不均一性

を考慮した検査法の確立に向けた研究の継続が期待される。一方、本研究の細胞分離装置の用途は癌細胞の分離に限定されるものではなく、微生物までも含めた様々な細胞の分離への適用も期待される。

英文

In this study, we have developed a novel cell separation apparatus, “High Contents Imaging Cell Sorter” that can separate and culture heterogeneous cell populations based on morphology and fluorescence labeling in three-dimensional culture. Using this apparatus, we separated target cells from the heterogeneous population in cancer cell lines, mouse carcinogenesis models, and human clinical specimens. We also tried to verify the usefulness of the examination method after separating specific cancer cell groups from heterogeneous cell populations.

The “High Contents Imaging Cell Sorter” works as follows: (i) culture of cancer cells embedded in a photodegradable hydrogel, (ii) automatic image acquisition in bright field and fluorescence field, (iii) classification of cancer cell groups by image analysis, (iv) light irradiation around the targeted cancer cells, and (v) collection by pipetting. We have developed an apparatus that can automatically perform image acquisition, analysis, light irradiation, and pipette collection. The optical system in the apparatus supports observation and image acquisition in bright field and two-color fluorescence corresponding to FITC and RITC. The image analysis algorithm in the apparatus supports morphology-based classification up to 8 types of morphology, and fluorescence -based classification corresponding to FITC and RITC fluorescence images.

In order to evaluate cell separation efficiency, cancer cells are embedded in the photodegradable hydrogel in the specially developed culture vessel with 32 wells. Target cells are identified based on image analysis of images in 4 fields \times 32 wells (128 fields). We collected one cell aggregate from each well by automatic processing of imaging, analysis, light irradiation, and pipette collection. The whole process has been completed within 3 hours

We also investigated about cell culture condition, in which cancer cells exhibited specific morphology, by changing hydrogel and medium composition. We also investigated cell embedding conditions, staining conditions, the washing conditions for demonstrating cell separation using a fluorescent label as an index. CD44-positive PC-3 and negative DU145 cells were embedded in the photodegradable hydrogel and stained with a fluorescent-labeled anti-CD44 antibody. We found the conditions under which the target cells could be identified.

In order to verify the performance of the image analysis algorithm implemented in the “High Contents Imaging Cell Sorter”, the classification accuracy was confirmed using 11 clones obtained from the murine breast cancer cell line 4T1E. The morphological features of the cell aggregate were quantified using a classification model developed using machine learning. As a result, each clone was distinguished with a classification accuracy higher than 90%. 4T1E cells were separated based on their morphology using the “High Contents Imaging Cell Sorter”, and in vitro drug sensitivity testing was carried out. As a result of tamoxifen susceptibility testing, it was confirmed that specific cancer cell groups separated from the heterogeneous population exhibited different drug sensitivity compared to the original heterogeneous population.

In order to verify the effectiveness of examination methods using “High Contents Imaging Cell Sorter” for clinical specimens, we tried to separate cells derived from clinical specimens. A protocol for recovering cancer cells from surgical specimens of breast cancer was determined based on a protocol for recovering cancer cells from mouse tumor tissue. The recovered cancer cells from for 3 breast cancer surgical samples were embedded in the photodegradable hydrogel and cultured for cell separation. At this time, we investigated the composition of the photodegradable hydrogel and medium additives, and appropriate culture period to obtain culture condition suitable for cell growth and image analysis. It was not possible to find the conditions for cancer cell growth suitable for the

specimens examined in this study, so further examination on the culture conditions and applicable cancer type were necessary for application to clinical examinations.

The “High Contents Imaging Cell Sorter” is capable of cell separation based on fluorescence and morphology, which cannot be applicable in other separation techniques, and therefore, can provide a new approach to research on intra-tumor heterogeneity. We believe that the results confirmed by cell lines study and animal experiments in this study are indicating the "importance of intra-tumor heterogeneity". Continuous research will contribute to the process to establishing examination method that takes into account intra-tumor heterogeneity.