

日本医療研究開発機構
医療機器等における先進的研究開発・開発体制強靱化事業事業
「基盤技術開発プロジェクト」
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 全血対応が可能な細胞分取装置による癌モニタリング
(英語) Cancer monitoring by whole blood compatible cell isolation system

研究開発実施期間: 令和1年10月17日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 益田 泰輔
(英語) Taisuke Masuda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) メドレッジ株式会社・研究開発部・部長
(英語) Medridge Corporation, Research and Development Division, Director

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

体液中の遊離物質を用いた診断法は Liquid biopsy とよばれ、多様化する治療法の選択や早期疾患の発見に寄与することがわかってきた。Liquid biopsy のなかでも、細胞そのものである CTC (Circulating Tumor Cells) は多くのゲノムやプロテオーム情報を担持し、その臨床的応用への期待値は ctDNA, microRNA 同様に高い。しかし、CTC は、その希少さゆえ既存技術では効率よく分取できないこと、次世代シーケンサーに代表される微量分子の解析プラットフォームとの親和性が低いことから、臨床研究と関連付けは未だ達成できていない。本研究は、雑多な中から、稀少な細胞をシンプルかつ効率的に 1 細胞レベルで分取する細胞分取装置「レアセルソーター」の実用化を目指す。そのために、以下の 3 つの研究開発課題を抽出し、「①一気通貫の自動システムの構築」、「②単一細胞分取技術の向上」、「③中規模臨床試験による有効性評価」、遂行した。

「①一気通貫の自動システムの構築」では、既存のプロトタイプ機の煩雑な手動操作を排除し、サンプルセット、細胞分離、検出、分取までの一気通貫の自動システム (ソフトウェアを含む) の構築、およびオープン型マイクロ流体チップの安定的製造の確立を行った。具体的には、当該細胞分離技術に影響を与える、気液界面のメニスカス位置の安定性や細胞分離の安定性を図り、さらには細胞/RNA の品質維持を考慮した設計を取り入れた細胞分取装置 (第 4 次プロトタイプ機) を作製した。当該細胞分取装置を完成させ、各種キャリブレーション、細胞分離、抗体染色、細胞検出、細胞分取の一連の操作において自動化項目がワーク

することを確認した。また、オープン型マイクロ流体チップの量産化に取り組んだ。マイクロ流体チップの安定的供給体制を確立するために、現行シリコン製マイクロ流体チップから、プロピレン系樹脂とエラストマーの混合樹脂による硬質マイクロ流体チップに変更した。プロピレン系樹脂材料にすることによりマイクロ流体チップの量産製造が可能になり、消耗品チップの安定供給体制を構築することに成功した。

細胞母集団から単一細胞レベルで Intact/Fast を同時に満たす分取技術を確立するためには、煩雑な作業工程やシリンジポンプの過吸引による細胞のロスが課題となる。「②単一細胞分取精度の向上」では、目的細胞の分取効率や細胞純度を向上させるために、現行のステップモータ駆動方のマイクロピペットから圧電駆動に変更し、分解能の向上を図った。具体的には、新しく確立した圧電駆動マイクロポンプを用いて、細胞分取成功率、細胞純度（他の細胞の混入）等、各種細胞分取性能評価を行った。新たに構築したマイクロピペットシステムの吸引量を評価した結果、最小分解能が 21 nL（従来が 850 nL）と圧電による応答速度の向上とともに吸引分解能が大幅に向上した。また、細胞分取成功率および平均細胞純度は、それぞれ 98% (n=50) 90.0% (N=39) であった。このことから、開発した細胞分取装置は概ね単一 CTC で分注できることが明らかになった。また、患者血液から CTC をシングルセルで採取し、1 細胞 RNAseq を実施した。現時点では、がん特異的な遺伝子変異が明確には検出されなかったが、採取したシングルセルにおいて品質の良い RNA が維持されていることが明らかになった。

③中規模臨床試験による有効性評価では、プロトタイプ機を用いて臨床検体から CTC を分離し、回収した CTC に対して各種検討を行った。最終的には、膀胱がん 67 症例、乳がん 34 症例、肺がん 16 症例、合計 117 症例を実施した。CTC には、クラスター形成したものが血中に存在し、シングル CTC より予後に強く関与するとされている。このクラスターCTC は、既存のセルソーターやこれまでの CTC 診断装置では見落とされてきた。その理由として、クラスターCTC を前処理（溶血処理）で排除してきた疑いがある。我々の細胞分取装置は、前処理不要で全血に対応していることから、多くの症例においてクラスターCTC を検出できることが明らかになった。膀胱がん症例では、新規 CTC マーカーを活用した CTC 検出率と従来法（EpCAM による検出）との比較を行い、**CTC マーカーとしての可能性が示唆された**。乳がん症例では、ヒト検体から生きたまま CTC を分取し、スフェロイドの形態を呈する培養条件の至適化を進め CTC の不死化（株化）を試みた。肺がん症例に対して、同一患者による生検組織と CTC による EGFR 遺伝子変異解析の比較評価試験を行った。また、本研究で開発した細胞分取装置による CTC 検出法と従来法（MACS）との比較試験を行った。その結果、従来法と比べて、遜色のない CTC の検出感度があると判断できた。その上で CTC クラスターが判別できること 1 細胞採取が可能であることから、従来法と比べて社会実装に至る重要な優位性を示すことが検証された。

既存の CTC 検査において、血液中の CTC 数と予後が相関するがん種が限定されていること、CTC 数の計測だけでは治療方針を決定するのに足る情報が得られないことが明らかになっている。その理由の 1 つが世界標準となっている EpCAM 抗体による CTC の判定にある。癌の進行に伴う上皮間葉転換（EMT）の際に EpCAM の発現が低下することは既に知られている。そのため、新たな CTC 捕捉技術や検出方法が切望されている。我々は、雑多な細胞群から特定の細胞を分離する独自の細胞捕捉技術を基盤に、高精度な 1 細胞分取技術を新たに確立した。本研究では、それらを搭載した細胞分取装置「レアセルソーター」のプロトタイプ機を完成させ、膀胱がん、乳がん、肺がん症例において各種有効性評価を行った。特に従来方法との比較試験から、従来法と比べて同等レベルの検出感度があると判断でき、プロトタイプ機の基本的性能を実証することができた。このことは、我々が目指す、CTC を“生きたまま”、“確実に”、“逃さず”、“1 細胞”で採取する装置の実用化に向けて大きな前進であり、停滞していた CTC 研究の加速化がグローバルに展開でき、リキッド・バイオプシーにおける CTC の臨床利用の活性化が十分期待できるものと考えられる。

Abstract

Liquid biopsy is a diagnostic method using free substances in body fluids. It has been found that liquid biopsy contributes to the selection of diversifying treatment methods and diagnosis of early-stage diseases. CTC, which is among the liquid biopsy, carries a lot of genomic and proteome information. Its expected value for clinical application is as high as ctDNA and microRNA. However, due to its rarity, CTC cannot be efficiently sorted by existing technologies. Also, its affinity with trace molecule analysis platforms is low. Hence its association to clinical research have yet to be achieved.

In this study we aim to put into practical use a single cell sorting device “Rare Cell Sorter”, that simply and effectively isolates rare cells from among miscellaneous cells at the single cell level. This research extracted three tasks: (1) development of an automated system for separating CTC from whole blood, (2) improvement of single cell separation technology, and (3) evaluation of efficacy by medium-sized clinical trials.

Dr. Masuda of Medridge Co. was in charge of the development of the automation system to isolate CTC. The Rare Cell Sorter, flows whole blood (cell suspension) onto a microfluidic chip with micropillars with a diameter of 18 μm to sort cells, detects specific cells trapped in between the pillars (7 μm), and separates the detected cells into PCR tubes individually using a micropipette. Here, complicated manual operations of existing prototype machines were eliminated and an autonomous system was constructed from calibrating the surface of microfluidic chips to cell isolation and cell picking. He also established a mass production system by changing the material of open-microfluidic chip from silicone to propylene resin.

Prof. Arai of university of Tokyo was responsible for improving single cell isolation technology. Mainly examined and improved the micro pipette system and the optimum conditions of the surrounding environment, and thus improved single cell isolation ability. Specifically, he established a high-precision micropipette system by combining a piezoelectric-driven micropump and a syringe pump. As a result, the success rate of cell sorting and the average cell purity improved to 98% ($n = 50$) and 90.0% ($N = 39$), respectively. In addition, the collected cells had RNA integrity that enabled single-cell RNA sequencing.

Finally, Prof. Matsusaka of Tsukuba university was responsible for evaluating the efficacy of mid-scale clinical tests. He evaluated the clinical efficacy of CTC in 67 cases of pancreatic cancer, 34 cases of breast cancer, and 16 cases of lung cancer, for a total of 117 cases. Within the circulation system, CTCs take on diverse forms (including singlets and cell clusters), and recent reports indicate that cluster-type CTCs are more likely than single CTCs to survive, proliferate, and act as a generative source of metastatic diseases. Since Rare Cell Sorter is compatible with whole blood without pretreatment, it was clarified that clustered CTC can be detected in many cases. He also conducted the comparative test between the CTC detection method using our Rare Cell Sorter and the conventional method using a magnetic cell sorting; MACS. As a result, it was judged that the CTC detection sensitivity was comparable to that of the conventional method. In addition, our method was verified to show superiority for clinical implementation because it can detect CTC clusters and isolate single cells.

We were developing an autonomous CTC sorting device that collects living CTC at the single cell level using an original cell sorting technology that efficiently isolates CTC based on size and mechanical deformation. While such CTC discrimination relies on the labeling of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), issues persist. Specifically, highly malignant CTC causative for cancer metastasis undergo

epithelial mesenchymal transition (EMT) that makes identification difficult. By improving the isolation and the detection accuracy of CTC from whole blood, we will be able to immediately release Rare Cell Sorter to the market and realize accurate diagnosis of malignant tumors.