

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 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
(英語) Development of advanced measurement and analysis systems

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

研究開発担当者 (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 主任研究員 杉浦 慎治

所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
(AIST)
Biotechnology Research Institute for Drug Discovery
Senior Researcher, Shinji Sugiura (Ph. D.)

実施期間： 平成28年8月30日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) ハイコンテツイメーシングセルソーターの開発
開発課題名： (英語) Development of high contents imaging cell sorter

研究開発分担者 (日本語) エンジニアリングシステム株式会社 代表取締役 柳沢 真澄
所属 役職 氏名： (英語) Masumi Yanagisawa, President, Engineering System Co., Ltd.,

分担研究 (日本語) 癌細胞分離と薬剤感受性試験に関する動物実験と臨床研究
開発課題名： (英語) Animal testing and clinical study on cancer cell separation and drug sensitivity assay

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人筑波大学 医学医療系臨床医学域 講師 松井 裕史
所属 役職 氏名： (英語) Hirofumi Matsui, Assistant Professor Faculty of Medicine, University of Tsukuba

分担研究 (日本語) 癌細胞分類画像解析アルゴリズムの開発
開発課題名： (英語) Development of image analysis on cancer cell classification

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学 大学院創薬科学研究科 准教授 加藤 竜司
所属 役職 氏名: (英語) Ryuji Kato, Associate Professor, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University

分担研究 (日本語) 三次元培養条件の最適化とその条件による検証研究
開発課題名: (英語) Optimization of 3D culture condition and evaluation in the culture condition

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター
社会と健康研究センター 予防研究部 室長 武藤 倫弘
所属 役職 氏名: (英語) Michihiro Mutoh, Laboratory Head, Epidemiology and Prevention Division, Center for Public Health Sciences, National Cancer Center.

II. 成果の概要 (総括研究報告)

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』を開発する。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する。

本年度は、培養基材、画像解析、分離プロトコルといった細胞分離関連技術を確認し、細胞分離装置の各種設計を完了した。また、装置完成後の臨床研究に備え、臨床検体からの細胞分離に必要な手技やプロトコル、臨床検体受け入れ体制の整備を進めた。

培養基材の開発および培養条件の探索に関しては、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、杉浦らがゲルの硬さ、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する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。

画像解析に関しては、加藤竜司(名古屋大学 大学院創薬科学研究科)が検討し、株化マウス胃がん細胞モデルを用いて癌細胞塊の判別アルゴリズム開発を行った。癌細胞と正常細胞とを培養 4 日後に 82%~92%で判別できるアルゴリズムの開発に成功した。

細胞分離装置の開発に関しては、柳沢真澄(エンジニアリングシステム株式会社)が H26 年度までに開発した 3D イメージングセルソーターをベースとして、蛍光撮像・解析機能を搭載し、三次元培養下での形態や、二次元および三次元培養下で蛍光標識された癌細胞を自動的に単離する装置、ハイコンテンツイメージングセルソーターの設計を行った。ハードウェアおよびソフトウェアの設計を完了し、部材の調達を行った。

ハイコンテンツイメージングセルソーターによる検査法の有効性を動物実験によって検証するために、松井裕史(筑波大学 医学医療系)がマウス癌モデル由来細胞を樹立し、凍結ストックを作製した。また、松井らは、ヒト臨床検体を用いた細胞分離法の確立に向け、倫理委員会申請を行い、承認を得た。

英文

In this study, we are going to develop "high contents imaging cell sorter", which can isolate heterogeneous tumor cell population from three-dimensional culture in photodegradable hydrogels by morphology and fluorescent label as an indicator. We are going to use this system for separation of heterogeneous cell populations from mouse carcinogenesis model or human clinical specimens.

In this fiscal year, we have developed cell separation technologies such as culture substrate, image analysis, and separation protocol. We have also completed the design of hardware and software of cell separation equipment. In preparation for future clinical research after the completion of the cell separation equipment, we have also developed procedures and protocols for cell separation from clinical specimens.

Shinji Sugiura (Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)) and Michihiro Mutoh (Epidemiology and Prevention Division, National Cancer Center) have studied on culture substrate and culture conditions. Sugiura et al., examined the hardness of the gel, the composition of the macromolecules constituting the hydrogels, and the growth factors to be added to the culture solution. Sugiura et al., examined the culture condition using several kinds of cell lines and determined the composition recipe. Mutoh et al. examined the medium composition and additives using mouse adenoma cells. Mutoh et al. found culture conditions enabling three-dimensional culture of mouse adenoma cells in the photodegradable hydrogel.

Ryuji Kato (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University) have studied on image analysis. Kato et al. developed an image-based discrimination algorithm for cancer cell aggregates from normal cells using an established mouse gastric cancer cell model. We succeeded in developing an algorithm that can discriminate cancer cells and normal cells at 82% to 92% after 4 days of culture in the photodegradable hydrogels.

Masumi Yanagisawa (Engineering System Co., Ltd.) has worked on development of a cell separation system. Yanagisawa et al. designed the cell separation system based on the 3D imaging cell sorter that we have developed in 2014. In this study, we have adopted fluorescence imaging and analysis function and going to develop high contents imaging cell sorter, an apparatus for automatically isolating fluorescently labeled cancer cells under two and three dimensional culture. In this year, Yanagisawa et al., completed design of hardware and software and purchase of materials that are required to manufacture the high contents imaging cell sorter.

Hirofumi Matsui (Faculty of Medicine, University of Tsukuba) established cells derived from a mouse cancer model. Matsui et al. prepared frozen stocks in order to verify the effectiveness of cell separation method. In addition, Matsui et al. applied a clinical study for ethical committee in Tsukuba University to prove the effectiveness of cell separation method from human clinical specimen.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）
該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Shinji Sugiura: “Optical cell manipulation using biomaterial-based photodegradable hydrogels”, Fall Symposium 2016 of KICChE, Korea Univ., 2016.10.20、国外、(口頭)
2. Masato Tamura, Fumiki Yanagawa, Shinji Sugiura, Toshiyuki Takagi, Kimio Sumaru, Toshiyuki Kanamori, “Click-crosslinkable and photodegradable gelatin hydrogels for cell separation”, ICBS2016, 東京大学, 2016.11.28, 国内、(ポスター)
3. 杉浦 慎治: 光分解性ゲルを用いた細胞操作技術の開発, Bio Japan2016, パシフィコ横浜、2016.10.12、国内 (口頭)
4. Mayu Shibuta, Hiroto Sasaki, Masato Tamura, Kei Kanie, Hirofumi Matsui, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, Masumi Yanagisawa, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda, Ryuji Kato: "Development of Optical Cell Collection System Combining Photodegradable Hydrogel Cell Image Analysis", TERMIS-AP 2016, Fullon Hotel Tamsui Fishermen's Wharf, 2016.09.04, 国外 (ポスター)
5. 渋田真結、佐々木寛人、田村磨聖、蟹江慧、松井裕史、杉浦慎治、金森敏幸、柳沢真澄、加藤竜司: 3次元ゲル培養からの形態情報による細胞塊選抜システムの開発、第68回日本生物工学会大会、富山国際会議場、2016.09.29、国内 (ポスター)
6. 渋田真結、佐々木寛人、田村磨聖、蟹江慧、松井裕史、杉浦慎治、金森敏幸、柳沢真澄、佐藤琢、高木俊之、加藤竜司: 細胞画像情報解析を用いた三次元培養細胞選抜システムの開発、第16回日本再生医療学会総会、仙台国際センター、2017.03.07、国内 (ポスター)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし