

報告番号	甲 第 12764 号
------	-------------

主論文の要旨

論文題目 **Plasma processes for circulating tumor cells isolation devices**
(血中循環がん細胞捕捉デバイスに向けたプラズマプロセス)

氏 名 木原 直人

論文内容の要旨

疾患に関連した遺伝子診断技術に基づき、高い治療効果が見込まれる患者を適切に層別化し、効果的な治療方法を選択できれば、治療薬の副作用の低減が見込まれ、医療費の削減も達成できるために、簡便な遺伝子診断技術の開発が求められている。従来は疾患組織から侵襲的に生体検査されてきたが、体液中、中でも血液、尿などからバイオマーカーを捕捉し解析する液体生検（リキットバイオプシー）が、患者への負担が小さく、既往歴によらず検査が繰り返し可能な方法として注目されている。血液中 10mL あたりわずか数個程度しか存在していない血中循環がん細胞（Circulating tumor cell, CTC）が有望なバイオマーカーに挙げられる。この量が少ない CTC を選択的に捕捉し遺伝子解析する方法の確立が望まれてきた。この実現に向け、本研究では、他の血中細胞に比べ CTC が僅かに大きい点に着目し、そのサイズ分離フィルターを構想し、実際作製したフィルターを用いて、肺がん患者検体から CTC を捕捉し CTC 遺伝子解析が可能であることを示した。

本研究では、フィルターをプラズマ微細加工技術により作製する際、プラズマ加工条件と貫通孔形状について深く考察を行った。また、血液中のモデルがん細胞の捕捉率が、孔径とピッチに対する関係も示した。

本論文は6章で構成されており、以下に各々の章の概要を示す。

第1章では、本研究の背景と目的を説明した。効果的な治療選択のために患者

負担の小さいリキットバイオプシーによる遺伝子診断技術の確立が求められている。CTCを含む血中バイオマーカーおよびCTC捕捉方法の現状と課題を示し、本研究の目的と意義を示した。現状のフィルターは用いる材料と加工方法の組み合わせが限定されているため、特性に制約が生じていることを示し、本研究では、幅広く入手可能で種々のフィルム特性を選択可能な工業用フィルムを基材とし、プラズマ加工技術を用いて貫通孔フィルターの作製およびCTC遺伝子解析を達成することを目標とした。

第2章では、本論文に関わるプラズマ加工技術としてスパッタリング法、ドライエッチング法および微細加工技術としてフォトリソグラフィ法の原理と適用方法を述べた。また、基材フィルムとして poly(ethylene terephthalate)(PET)と低自家蛍光であるフッ素樹脂 ethylene tetrafluoroethylene(ETFE)の特性を述べた。フィルタリング後の細胞観察評価に用いた蛍光顕微鏡の原理を説明するとともに、基材の自家蛍光評価の重要性を示した。

第3章では、樹脂フィルム基材に貫通孔を高密度に形成する独自の方法について述べた。光学的に透明なPETフィルムにフォトリソグラフィとプラズマエッチングによって高密度な貫通孔の形成を達成した。つまり、直径 $4\mu\text{m}$ から $12\mu\text{m}$ の貫通孔 38 万孔をガラス転移温度が 70°C 以下と低いPET基材に、 $0.85\mu\text{m/分}$ の高いエッチング速度で達成した。この実現には、 $12\mu\text{m}$ と極めて薄いフィルムをシリコンウエハに弱粘着性テープで貼り付けた上で、加工後に剥がしてハンドリングする方法を考案し、この手法がドライエッチング時の基板を十分冷却するために必要であることを学術的に説いた。

また、PETフィルムのドライエッチングは、酸素プラズマを用いてメタルマスクに行った。メタルマスクには、熱膨張係数の大きい樹脂フィルム上でクラックが発生しない金属材料が要求された。この条件には、小さなヤング率を有するTiをスパッタ法で形成することで、クラックなく、またフォトリソグラフィのプロセスにも適用可能であることを示した。高密度な貫通孔を形成するために、イオンの加速電圧と貫通孔形状の関係について検討を行い、高いイオン加速電圧条件でストレート貫通孔が得られる結果を得た。高密度な貫通孔を得ることが可能であるプラズマパラメータの制御手法を示した。新規開発された加工技術は、種々の樹脂材料のメンブレンフィルターの作製に適用できることを実証した。

第4章では、サイズ分離フィルターとして血中からモデルがん細胞を96%以上の高い精度で捕捉可能であることが示し、CTCなどの血中の希少細胞をサイズに基づき捕捉するためのフィルターを作製する方法が確立した。まず、第3章で作製したPETフィルターを用いて細胞捕捉評価を実施した結果、一方、がん細胞を多重蛍光染色によって同定する際に使用される細胞核染色試薬の紫外線

発光領域で自家蛍光が大きいだけでなく PET に含有されている添加剤のフィラーが発光し、細胞と区別出来ない問題を抱えていることが判明した。課題解決のため、低自家蛍光フルオロカーボンポリマーフィルム(ETFE)に適用した。ETFE フィルムの貫通孔形成では、酸素プラズマ加工に発生する ETFE のエッチング副生成物は、Ti マスク表面で反応し、Ti をエッチングしてしまい、作製上の課題となった。Ti マスクを削らずに ETFE の選択比を向上するためには、低圧力および大流量酸素条件などのチャンパー中のフッ素分圧を低減する加工条件により達成され、貫通孔加工条件を確立した。低圧力条件で生じる貫通孔の内壁面の表面粗さと裏面形状の荒れの発生メカニズムについても、元素分析を実施して解明した。作製した ETFE フィルターを用いても、血液中からモデルがん細胞を 96%以上の高い精度で捕捉できることを実証した。

第 5 章では、作製したフィルター(PET, ETFE)の患者検体を用いた臨床試験に向けたフィルター最適化、CTC 遺伝子解析手法について述べている。フィルター形状については、孔径とピッチをパラメータとして血液中からのモデルがん細胞の捕捉率と白血球の捕捉率を評価した。また、フィルター上下の差圧が捕捉率に影響を与え、フィルターに掛かる圧力として 0.06kPa が好ましいことも示した。孔径 7 μ m、ピッチ 20 μ m のフィルター形状にてモデルがん細胞捕捉率 96%以上で白血球の捕捉率 0.01%以下の高い選択比を達成した。

さらに、フィルターで捕捉したモデルがん細胞から遺伝子解析するためのプロトコルについて研究した結果を述べている。遺伝子解析を、モデルがん細胞 3cells から実証し、肺がん患者の血液検体からの CTC 捕捉試験を実施し、72cells の捕捉し、上皮成長因子のドライバー変異遺伝子解析を達成し、捕捉した CTC から肺がん治療選択する一連のプロトコルを示した。

本論文では、CTC 捕捉率および白血球との選択比の高い樹脂フィルターの作製技術の背景を深く考察し、さらに CTC 遺伝子解析可能なシステムおよびプロトコルを科学的なアプローチに基づいて実施した成果について述べられている。

種々の工業用フィルム材料への展開および CTC 以外の血中希少細胞の捕捉に展開できるものとする。現時点の技術では、CTC 遺伝子解析を実施する際には、市中病院から検査センターに検体を送付する必要がある。凍結すると CTC 細胞は壊れてしまうため、CTC を凍結保存可能な遺伝子の状態まで精製可能な装置が求められる。今後、装置の自動化を含めた CTC 遺伝子解析プロトコルの簡略化の実現が急務である。

また、遺伝子解析の際に、白血球がノイズとなる。白血球を除くために高価かつ煩雑なシングルセルを扱う装置が必要なことも課題である。さらに白血球を除去可能なサイズフィルターや簡易なプロトコルの追加の研究開発が必要である。また、捕捉した CTC はがん細胞そのものであるため、培養できれば抗ガン

剤の評価にも展開できる可能性が考えられる。

血液中に循環している希少細胞やマーカーは CTC だけではなく、今後、益々重要性は増していくリキットバイオプシーについて本研究で得た知見が産業の発展にも寄与出来ればこのうえなく幸いである。