

吉野 知子

東京農工大学・大学院工学研究院
准教授

抗がん剤開発に資する単一 CTC の核酸解析プラットフォーム構築

§ 1. 研究実施体制

(1)「農工大」グループ

- ① 研究代表者: 吉野 知子 (東京農工大学大学院工学研究院、准教授)
- ② 研究項目
 - ・CTC のナンバリング技術の開発
 - ・ゲルソーティング技術の開発
 - ・単一細胞の核酸分画・増幅検討
 - ・CTC の培養、株化

(2)「日立化成」グループ

- ① 主たる共同研究者: 上原 寿茂 (日立化成株式会社・新事業本部 新事業推進センター・開発担当部長)
- ② 研究項目
 - ・フィルターおよびカートリッジの開発と試作
 - ・ソーティングシステムの構築

(3)「駒込病院」グループ

- ① 主たる共同研究者: 下山 達 (がん・感染症センター都立駒込病院・駒込データセンター・化学療法科医長)
- ② 研究項目
 - ・新規治療標的因子の探索、同定
 - ・CTC の培養、株化
 - ・Proof of Concept の確認

§ 2. 研究実施の概要

本研究は、抗がん剤開発プロセスのスループット向上を目指し、その基盤技術となる血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell : CTC) の単一細胞レベルでの同時多並列解析を実現するプラットフォーム開発を目標とする。本プラットフォームは、全血中からの CTC の直接回収・検出、個々の CTC のゲノム DNA 及び RNA 情報 (核酸情報) の獲得までの全プロセスを含む。また、抗がん剤開発プロセスの基礎研究にあたる新規治療標的因子の探索における本プラットフォームの有用性を検討し、その有用性を示すことを目的とする。

「農工大」グループでは、マイクロキャビティアレイシステムにより回収した CTC の迅速な検出・単離に向け、CTC ナンバリング技術およびゲルソーティング技術の開発を進めた。CTC ナンバリング技術は、マイクロキャビティアレイ上に回収した CTC をハイスループットに検出し、バーコーディングする技術である。その基盤となるマイクロキャビティアレイ全面 (6 mm×6 mm)の一括撮像が可能な広視野一括撮像システムを試作した。試作した広視野一括撮像システムは細胞の形状を反映した画像を顕微鏡の約 100 倍の速度で取得可能であり、ハイスループットな CTC 計数に利用可能であることが示唆された。今後、さらなる高感度化に向け、光学系の高精度化、画像取得センサの高感度化を図る予定である。個々の細胞を微小なゲルに包埋し、ソーティングする“ゲルソーティング技術”開発では、光照射条件、ハイドロゲル組成の検討により、DNA 損傷なく、高精度に細胞の単離を行うプロセスを構築した。ゲルソーティング技術により単離した細胞を用いて複数種類の全ゲノム増幅法への適応性を検討した結果、いずれの増幅法においても十分量の全ゲノム増幅産物を取得できること、ゲルソーティング法に起因する増幅バイアスがないことが明らかとなった。さらに、ハイドロゲル作製のハイスループット化に向け、広視野一括撮像システムに Digital Micromirror Device を統合した一括ゲル作製システムを設計した。現在までに、その試作機の作製を完了しており、原理検証と課題抽出に取り組んでいる。

「日立化成」グループでは、各がん種に対応したマイクロキャビティアレイ構造の検討、及びマイクロキャビティアレイを内蔵したカートリッジの開発に取り組んだ。特に、CTC の遺伝子解析に向けて、血液処理後に解体可能なカートリッジを開発し、従来のカートリッジと同等の性能を持つことを確認した。また、カートリッジから CTC を単離する際の技術的課題を抽出し、細胞単離装置の開発に着手しており、平成 28 年度には臨床サンプルへ適応する予定である。

「駒込病院」グループでは、がん患者検体を対象とし、マイクロキャビティアレイシステムの CTC 検出における有効性の評価を行った。その結果、乳がん、肺がん患者症例より CTC を検出可能であることが確認できた。一方、画像解析における CTC 判定基準の標準化が必要であることが課題抽出され、画像解析ソフトウェアの導入、及び画像データの蓄積を開始した。また、CTC、及び株化細胞の単一細胞の全ゲノムシーケンスにより単一細胞解析データを蓄積している。さらに、抗がん剤の Proof of concept の確認に向け、CTC における Drug induced modification の検出可能性を評価した。その結果、既存の抗体医薬により標的分子が変化した様子を単細胞レベルで評価することが可能であった。

【主要論文】

Maeda, Y., Toyoda, T., Mogi, T., Taguchi, T., Tanaami, T., Yoshino, T., Matsunaga, T., Tanaka, T.
"DNA recovery from a single bacterial cell using charge-reversible magnetic nanoparticles" *Colloids
Surf. B: Biointerfaces*, 139, 117-122 (2016)

Sawada, T., Watanabe, M., Fujimura, Y., Yagishita, S., Shimoyama, T., Maeda, Y., Kanda, S.,
Yunokawa, M., Tamura, K., Tamura, T., Minami, H., Koh, Y., Koizumi, F. "A sensitive cytometry
based system for enumeration, capture and analysis of gene mutations of circulating tumor cells"
Cancer Sci., 107, 307-314 (2016)

Yoshino, T., Tanaka, T., Nakamura, S., Negishi, R., Hosokawa, M., Matsunaga, T. "Simple and rapid
manipulation of a single circulating tumor cell using visualization of hydrogel encapsulation towards
single-cell whole-genome amplification" *Anal. Chem.* (in press)