

プログラム名：セレンディピティの計画的創出による新価値創造

PM名：合田 圭介

プロジェクト名：高精度血液検査技術開発の実証評価

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成29年度

研究開発課題名：

血中 CTC の取りこぼしを許さない高精度血液検査技術の開発

研究開発機関名：

公益財団法人 がん研究会

研究開発責任者

松阪 諭

# I 当該年度における計画と成果

## 1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

平成29年度では、健常人から取得した血液にがん細胞をスパイクした再構成系でセレンディピターの機能評価をおこない、十分な性能が得られていることが確認することで、患者検体を用いた、治験へとつながるデータを集積する。

具体的な開発計画は以下の通りである。

- (1) CTC 検体プローブの開発
- (2) STEAM 法を用いた CTC 自動計数ソフトウェアの開発
- (3) 必要な前処理法の検討
- (4) 非標識で CTC 検出技術の開発
- (5) 捕捉 CTC の一細胞解析

## 2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

### 2-1 進捗状況

#### (1) CTC 検体プローブの開発

超高速蛍光イメージング技術を用いて、ALA で代謝標識された CTC を確認できたことを受け、セレンディピターでの確認を計画している。

標識ラマンイメージングとして、グルコース代謝やアミノ酸代謝を利用した CTC の検出が認められた。現在は、脂肪酸プローブによる条件設定を検討している。

#### (2) STEAM 法を用いた Deep learning による CTC 自動計数ソフトウェアの開発

STEAM法にて「CTC」と「クラスターCTC」を区別可能であることを確認したことを受け、セレンディピターでの解析を開始した。

#### (3) 必要な前処理法の検討

X線リソグラフィ技術で作製された孔径の異なる「超精密濾過膜」を組み合わせることで、「CTC」と「クラスターCTC」を分離する条件を決定した。さらに CTC 濃縮方法を確立した。

#### (4) 非標識による CTC 同定技術の開発

誘導ラマン顕微鏡により、Lipid droplet のラマンシグナルによる CTC 同定法を確立した。現在は、ラマンイメージングによる解析のための高感度化の検討を行っている。

#### (5) 捕捉 CTC の一細胞遺伝子解析

EGFR 遺伝子に焦点をあて、Whole Genome AmplificationにてDNAを増幅したのち、qPCRで定量化を行っている。

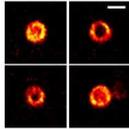
## 2-2 成果

### (1) CTC 検体プローブの開発

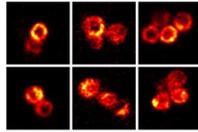
スパイク実験：HT29（大腸がん細胞）/健康者血液（PBMC+PMN）

アミノレブリン酸(ALA)染色

Single cells 15  $\mu$ m



Clusters



超高速蛍光イメージング技術を用いて、全血液の中から、ALA で代謝標識された CTC の蛍光画像の取得・解析法を確立した。

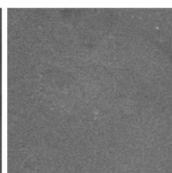
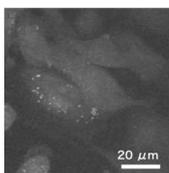
MDA-MB-231（乳がん細胞株）

重水素置換グルコース処理した細胞

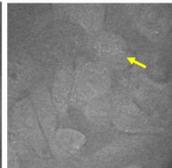
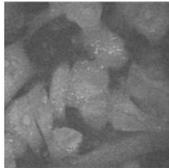
通常モード

重水素シグナル

通常のアミノ酸



重水素置換アミノ酸

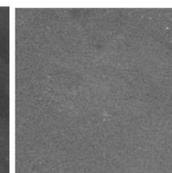
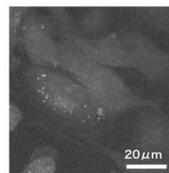


重水素置換アミノ酸処理した細胞

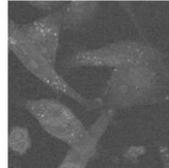
通常モード

重水素シグナル

通常のアミノ酸



重水素置換アミノ酸

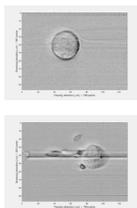


標識ラマンイメージングによる、グルコース代謝やアミノ酸代謝を利用した CTC の検出法を確立した。

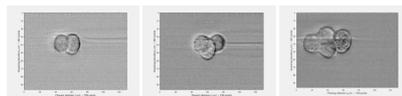
### (2) STEAM 法を用いた Deep learning による CTC 自動計数ソフトウェアの開発

スパイク実験：H1650（肺がん細胞）/健康者血液（PBMC）

Single cells

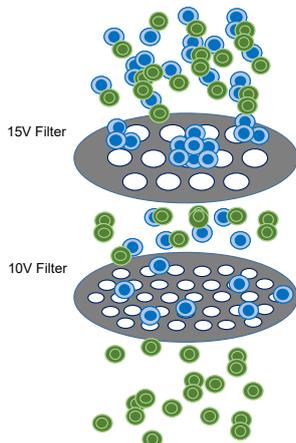


Clusters



サイズにより CTC、クラスターCTC が区別可能であることを明らかにした。

### (3) 必要な前処理法の検討

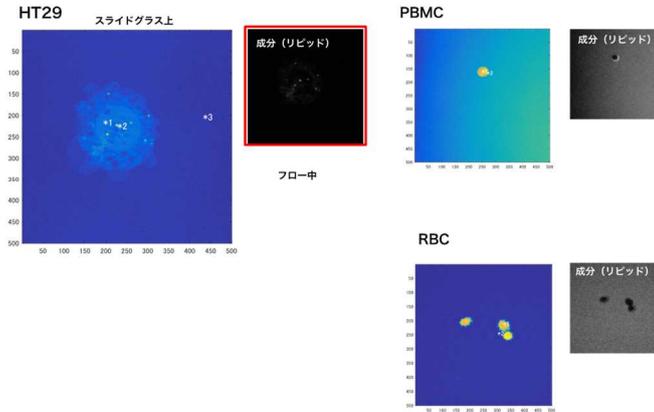


X線リソグラフィーで作製する孔径の異なる厳密精密濾過膜を組み合わせることで、患者血液を「CTC」「クラスターCTC」分画に分類することに成功した。

#### (4) 非標識による CTC 同定技術の開発

##### 非標識ラマンイメージング： Lipid dropletによるCTCの検出

ラマンイメージング像：スライドガラス上の細胞・フロー中の細胞



誘導ラマン顕微鏡を用いた、Lipid dropletのラマンシグナルを指標としたCTC同定法を確立した

#### 2-3 新たな課題など

ラマンフローサイトメーターでの CTC 検出のための高感度化。  
FISH 解析のための 3D 撮影法の検討。

#### 3. アウトリーチ活動報告

なし。