

「統合1 細胞解析のための革新的技術基盤」
平成26年度採択研究代表者

| |
|----------------|
| H28年度 実績報告書 |
|----------------|

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
 - ・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)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

§ 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利用性を検討し、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、ゲルソーティング技術の開発を進めた。ゲルソーティングとは、個々の細胞を微小なハイドロゲルに包埋し、単離する技術である。本年度は、ゲルソーティングにより得られた単一細胞の RNA 解析への応用を試みた。細胞内 RNA の安定化処理条件の検討を行なうことで、ハイドロゲル包埋単一細胞からの安定的な RNA の増幅が可能となった。本技術を用いることで、末梢血中の CTC 回収から RNA の安定化までに要する時間は約 40 分であり、CTC を対象とした単一細胞解析技術の中では現時点で世界最速となる。現在、臨床サンプルでの単一 CTC を対象とした遺伝子解析を開始している。また、昨年度より開発を進めてきたハイドロゲル一括作製装置の運用プロセスを確立し、複数の単一細胞を同時にハイドロゲルに包埋することが可能となった。これにより、従来の顕微鏡を用いたハイドロゲル作製プロセスの 200 倍以上のスループット向上が達成できた。さらに、細胞を包埋したハイドロゲルの自動単離装置の開発を進め、プロトタイプの実験を開始した。また、CTC 以外の細胞への応用範囲拡大を目指し、単一微生物の単離に利用可能であることを確認した。平成 29 年度には環境サンプル由来の単一微生物のゲノム解析に展開する予定である。

「日立化成」グループでは、マイクロキャビティアレイの品質向上に向けた表面処理の検討、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性能評価を行った。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の設計を完了し、大量生産の目処を立てた。また、マイクロマニピュレーターを用いた CTC 単離に向けた支援ツールのプロトタイプを完成させ、CTC 単離の原理検証を完了している。

「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。蓄積した CTC 画像データを用いて、画像解析ソフトウェアによる半自動 CTC 検出プロセスを構築し、CTC 計数のスループット・再現性の向上を達成した。また、口腔がん、肺がん症例を対象に単一 CTC のターゲットシーケンス解析を実施し、CTC のみに見られる変異の一部ががん種

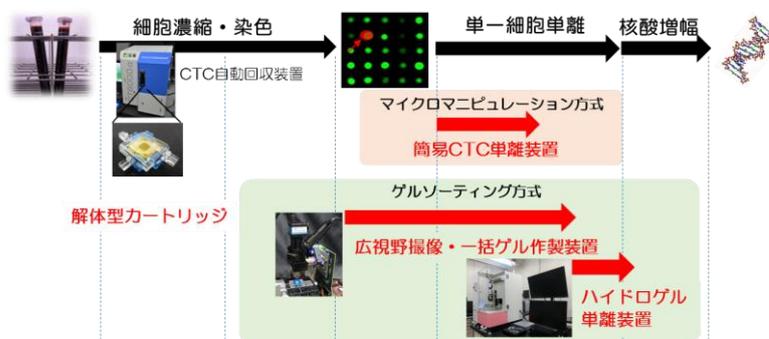


図: CTC 解析プロセスと本研究の開発項目
(赤字は本年度開発した要素技術および装置)

間で共通していることを確認した。

代表的な原著論文

1. Yoshino, T., Takai, K., Negishi, R., Saeki, T., Kanbara, H., Kikuhara, Y., Matsunaga, T., Tanaka, T., “Rapid Imaging and Detection of Circulating Tumor Cells Using a Wide-Field Fluorescence Imaging System” *Anal. Chim. Acta*, 969, 1-7 (2017)
2. Yoshino, T., Tanaka, T., Nakamura, S., Negishi, R., Shionoiri, N., Hosokawa, M., Matsunaga, T., “Evaluation of Cancer Cell Deformability by Microcavity Array” *Anal. Biochem.*, 520, 16–21 (2017)
3. Sawada, T. Araki, J., Yamashita, T., Masubuchi, M., Chiyoda, T., Yunokawa, M., Hoshi, K., Tao, S., Yamamura, S., Yatsushiro, S., Abe, K., Kataoka, M., Shimoyama, T., Maeda, Y., Kuroi, K., Tamura, K., Sawazumi, T., Minami, H., Suda, Y., Koizumi, F., "Prognostic Impact of Circulating Tumor Cell Detected Using a Novel Fluidic Cell Microarray Chip System in Patients with Breast Cancer" *EBioMedicine.*, 11, 173–182 (2016)