

「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

H26 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(研究機関別)

- 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(研究機関別)

- 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(研究機関別)

- 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には、全血中からの CTC の直接回収・計数、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としての利用性を検討し、その有用性を示す。

平成 26 年度は、マイクロキャビティアレイ方式により回収した CTC を単一細胞レベルでソーティングする技術の開発に着手した。「農工大」グループにおいては、同時多並列に細胞ソーティングすることを最終目標とし、光硬化性のハイドロゲルを利用した細胞ソーティング方法を検討した (図 1)。本年度は、ハイドロゲルの種類、ゲル形状の制御方法、および光照射方法の検討を行った。具体的には、光照射面積と焦点位置をパラメータとした制御を試み、これらによりシングルセルを包埋するハイドロゲルの形状を制御可能であることを確認した。また、ハイドロゲルに包埋し、回収した CTC からの単一細胞レベルでの核酸解析に向け、ゲノム DNA、RNA の抽出から増幅までのプロセスの基礎検討を実施した。固定化・膜透過処理済みの細胞をハイドロゲルに包埋し、回収した後、反応槽へ導入し、全ゲノム増幅反応を行った結果、がん細胞特有の遺伝子変異を検出することが可能であった (図 1)。また、RNA に関しては増幅の可否を評価したところ、ハイドロゲルおよびソーティング時の細胞状態が増幅に影響を与え得ることが課題として顕在化した。次年度以降、これらの課題の解決と網羅的な解析にむけた検討に取り組む。「日立化成」グループではマイクロキャビティアレイ方式に連結可能な細胞ソーティング方法として、自動ピペッティングを採用し、各工程の課題抽出、及びプロトタイプ機の仕様の構想を作成することとした。市販の手動装置 2 種類を用いて、がん細胞の取り出し実験を行った結果、カートリッジ上のがん細胞の認識および採取はいずれの装置でも可能であった。課題として、カートリッジの分解時に、一部の細胞がフィルター上から失われること、乾燥を防止するための水分補給が必要であることなどが明らかになった。これらの予備検討結果を踏まえ、次年度には細胞の固定化プロセスを組み入れた方式を併せて検討することとした。フィルターおよびカートリッジの開発においては、二次解析を可能とする解体タイプのものを設計・試作し、細胞回収とソーティングとの連結を図った。「駒込病院」グループでは、がん細胞株、および既存技術によりがん患者血液より分離した CTC を用いて単一細胞からの全ゲノム増幅と増幅 DNA の品質検討を行った。特に、細胞株を用いた検討では、臨床上重要である分子標的治療薬の標的、または効果予測マーカーとなっている遺伝子について、変異検出が可能かどうかを試みた。マイクロキャビティアレイ方式による CTC 回収装置が設置され次第、臨床検体から単離した CTC の培養と遺伝子変異解析を実施する。

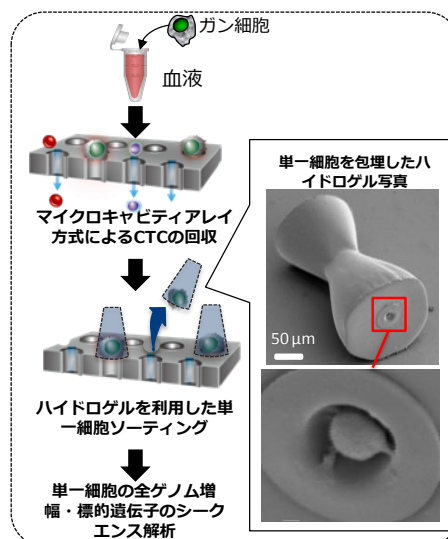


図 1 マイクロキャビティアレイ方式を用いた単一細胞解析技術