

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「統合 1 細胞解析のための革新的
技術基盤」
研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 平成26年10月～平成30年3月

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)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本課題では、がん患者末梢血からの血中循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cell: CTC) の濃縮、検出、単一細胞レベルでの分離、DNA/RNA の増幅を一貫して行うシステム「CTC の核酸解析プラットフォーム」を開発し、これを用いて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、新薬開発コンセプトの傍証としての利用 (Proof of Concept; POC の確認) に焦点を絞り、その有用性を示すことを目的として研究を進めてきた。

CTC の核酸解析プラットフォームは「CTC 濃縮」、「CTC 検出」、「CTC の単一細胞分離」「単一細胞由来 DNA/RNA の増幅」の 4 要素からなる。「CTC 濃縮」工程は農工大グループと日立化成グループで開発を進めてきた金属フィルターである Microcavity array (MCA) 方式を採用した。日立化成グループは特に単一細胞解析に向け、細胞の取り出しに対応可能な MCA カートリッジを開発し、量産化に向けた製造法を確立した。

「CTC 検出」においては、農工大グループにて広視イメージングシステムを開発し、MCA 全面を約 10 秒にて撮像可能とした。また、日立化成グループでは画像解析ソフトウェアの開発を行い、取得した画像から高速で CTC 様の染色パターンを示す細胞を抽出することスキームを確立した。また、駒込病院グループでは開発した画像解析ソフトウェアを臨床サンプルからの CTC 検出に利用し、現場で発生する課題を日立化成グループにフィードバックした。

「CTC の単一細胞分離」においては、農工大グループで独自の技術である「Gel-based cell manipulation (GCM) 法」の開発を進めた。GCM 法は、MCA 上の単一細胞を光硬化性のハイドロゲルに包埋し、分離操作を行う手法である。単一細胞に肉眼で視認可能なサイズの目印をつけることができるため、ピンセットなどで簡便に分離することが可能である。高精度な単一細胞分離を可能とするハイドロゲルの組成を決定し、光照射パターンにてハイドロゲルの形状を制御する技術を確立した。また、広視イメージングシステムに Digital Micromirror Device (DMD) を統合し、CTC 検出と GCM 法による単一細胞の分離を可能とする自動化システムの開発を行い、CTC 濃縮から単一細胞分離を一貫して行うための技術基盤の確立を達成した。さらに、環境微生物や接着細胞などの他の細胞種においても GCM 法が利用可能であることを確認した。

「単一細胞由来 DNA/RNA の増幅」においては、GCM 法にて分離した単一細胞からの核酸増幅の検討と、増幅産物の解析方法の検討、臨床サンプルから分離した CTC の解析を並行して進めた。農工大グループでは、GCM 法で分離した単一細胞からの全ゲノム増幅 (Whole genome amplification: WGA) 法と全トランスクリプトーム増幅 (Whole transcriptome amplification: WTA) 法の検討を行った。WGA、WTA においては複数種類の手法を検討し、細胞とともに反応槽に持ち込まれるハイドロゲルが核酸増幅反応に顕著な影響を与えないことを確認した。駒込病院グループでは単一細胞由来 WGA 産物の解析について検討を行い、がんパネルを用いた解析においては偽陽性の変異は検出されないことを確認した。また、本プラットフォームにてがん患者血液より分離した CTC 候補単一細胞に対し WTA 及び RNA-seq 解析を行い、CTC の単一細胞遺伝子発現解析における有用性を示した。

また、CTC 解析の有用性を評価することを目的とし、上記プラットフォームの開発と並行して CTC による Drug-induced modification の評価系の開発と、CTC の培養試験を進めた。駒込病院グループでは分子標的薬による標的分子の修飾を抗体染色にて評価可能であることを示した。農工大グループでは、MCA 表面の化学修飾を検討し、CTC の濃縮及び培養シャーレへの回収を迅速に行う実験系を構築した。また、臨床サンプルを用いた CTC の培養試験を行い、本手法にて回収した CTC を短期間ではあるが培養可能であることを示した。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. Gel-based cell manipulation (GCM) 法の確立

概要：光硬化性ハイドロゲルを用いて細胞を可視化することで、簡易・迅速な単一細胞の分離を可能とする技術を開発し、単一細胞のゲノム・トランスクリプトーム解析に利用可能であることを示した。細胞をピンセットにてハンドリング可能とする技術は世界でも本成果のみであり、簡便に単一細胞の遺伝子解析が行える技術として、学術的にも応用的にも評価されている。

2. 異なる患者から採取された CTC に共通する遺伝子変異の発見

概要：CTC の単一細胞がんパネル解析により、異なるがん患者から採取した CTC に共通する遺伝子変異が存在することが示唆された。同変異は口腔がん、肺がんにおいて検出されており、CTC の血管内で生存、転移巣の形成に関連する変異であると考えられ、治療標的となる可能性がある。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 解体型 MCA カートリッジの開発

概要：PMMA 製流路をクリップにて固定することにより、血液をフィルトレーションした後に解体し、MCA を取り出すことが可能なカートリッジ型デバイスを作製した。通常のマイクロ流体デバイスはガラスと PDMS を接着し作製するため、捕捉した細胞の取り出しは困難であり、解析方法が限定されるが、本デバイスは簡便に解体することが可能であるため、単一細胞解析をはじめとする様々な解析法に利用可能であると考えられる。

2. 広視野イメージングシステムの構築

概要：通常顕微鏡の 80 倍の視野範囲を持つ蛍光イメージング装置を開発した。本装置は顕微鏡の 100 倍以上の速度で MCA 全面を撮像可能であり、抗体にて染色した細胞由来の蛍光を検出することができる。従来の CTC 検出プロセスの律速であった顕微鏡観察のハイスループット化を達成するだけでなく、簡易セルカウント装置など、様々な用途に利用可能であると考えられる。

3. GCM 法の自動化システムの構築

概要：単一細胞を包埋したハイドロゲルを核酸増幅の反応槽である PCR チューブに移す工程の自動化を達成し、CTC 核酸解析プラットフォームを確立した。本装置は直径数百 μm のハイドロゲルをロスなくハンドリングすることが可能であり、分離した単一細胞に対して核酸増幅を行うことができる。従来の単一細胞分離装置では細胞分離の成否を評価することはできなかったが、本装置ではハイドロゲルを観察することにより細胞が分離できたことを確認することができるため、CTC をはじめとする希少細胞の分離に特に適した装置であると考えられる。

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「東京農工大学」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
吉野 知子	東京農工大学大学院工学研究院	准教授	H26.10～
田中 剛	同上	教授	H26.10～
前田 義昌	同上	助教	H26.10～
松永 是	同上	特別招聘教授	H26.10～
根岸 諒	同上	産学官連携研究員	H26.10～
土橋 弘典	東京農工大学大学院工学府	M2	H26.10～H28.3
高井 香織	同上	M2	H26.10～H29.3
真下 遼介	同上	M2	H27.4～H29.3
太田 健人	同上	M2	H27.4～H29.3
岩田 怜士	同上	M2	H27.4～
高林 知弘	同上	M2	H27.4～
小木曾 淳	同上	M2	H28.4～
茅 逸皓	同上	M1	H29.4～
赤塚 万紀	東京農工大学工学部生命工学科	B4	H29.6～
山川 ひとみ	同上	B4	H29.6～
佐伯 達也	東京農工大学大学院生物システム応用科学府	D3	H26.10～H27.3
梁 越	東京農工大学グローバルイノベーション研究機構	特任助教	H26.10～H27.12

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
- ・他の希少細胞への応用展開
- ・ソーティングシステムの構築
- ・CTC の培養、株化

②「日立化成」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
樋口 雅之	日立化成株式会社・ライフサイエンス事業本部 メディカル事業ユニット	主任研究員	H27.4～
上原 寿茂	同上	技術担当部長	H26.10～H29.7
小田切 大平	同上	専任研究員	H27.10～
遠藤 勝也	同上	研究員	H26.10～H28.3
八木 理美	同上	研究員補	H26.10～H28.3

中村 清太	同上	研究員補	H26.10～
伊藤 明子	同上	研究員補	H27.10～
板谷 英貴	新事業本部新事業推進 センタ	開発担当部長	H26.10～H27.9

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検討
- ・CTC 計数用ソフトの開発

③「駒込病院」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
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	H26.10～
澤田武志	同上	非常勤医師	H26.10～H28.12
小泉史明	同上	臨床検査科医長	H26.10～
佐々木貴之	同上	研修員	H26.11～H27.3
鈴木智子	同上	非常勤職員	H27.4～H28.3
利根山香織	同上	非常勤職員	H26.11～H27.3
高津正子	同上	非常勤職員	H27.4～H28.3
佐々木友希	同上	非常勤職員	H26.11～
小山瑠美	同上	非常勤職員	H27.5～
秋元茉莉	同上	非常勤職員	H27.4～
北村悠香	同上	非常勤職員	H27.12～
斧美咲	同上	非常勤職員	H28.10～
横田祐子	同上	非常勤職員	H28.12～

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 (POC)の確認

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ・ 日立化成株式会社は CTC のがん遺伝子解析の臨床的有用性を評価するために、米国テキサス大 MD アンダーソンがんセンターとの共同研究を進めており、CTC 濃縮システムを利用した大規模臨床試験を実施している。
- ・ 東京農工大学は University of East Anglia の Thomas Mock 教授に MCA システムを提供している。Tomas Mock 教授は耐冷性珪藻の研究を進めており、細胞観察及び単一細胞分離方法として MCA の使用を検討している。

§ 3 研究実施内容及び成果

3. 1 CTC 核酸解析プラットフォームの構築

<概略>

CTC 核酸解析プラットフォームとは、血液中の CTC の「濃縮」及び「染色」、蛍光観察による「イメージング」、「単一細胞レベルでの分離」、「核酸増幅」の一連の操作を一貫して行うためのプロセスを指す (図 1)。本研究では、独自に開発してきたマイクロキャビティアレイ方式を採用した、CTC の単一細胞核酸解析を可能とすることを目的とし、プロセスごとの要素技術開発に取り組んだ。各要素技術を以下の研究項目に集約する。

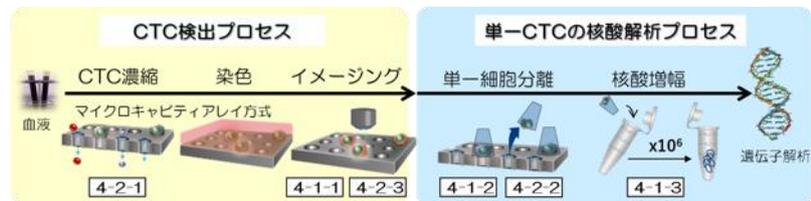


図 1. CTC 核酸解析プラットフォームの開発

3. 1. 1 CTC のイメージング技術の開発

研究課題：広視野イメージングシステムの構築及び性能評価

3. 1. 2 単一細胞分離法 (Gel-based cell manipulation (GCM) 法) の開発

研究課題：原理検証 / ハイドロゲル組成の検討 / ハイスループット化に向けた光照射システムの構築 / 自動マイクロピンセットによるハイドロゲル自動ソーティングシステムの構築 / 光照射による細胞内 DNA への影響評価

3. 1. 3 単一細胞の核酸増幅の検討

研究課題：ハイドロゲル包埋単一細胞からの全ゲノム増幅法及び全トランスクリプトーム増幅法の検討 / 単一細胞の DNA・RNA の分画及び増幅の検討

なお、研究項目「フィルターおよびカートリッジの試作」は 3. 2. 1、研究項目「簡易細胞分離システムの構築」は 3. 2. 2、研究項目「CTC 検出ソフトウェア開発」は 3. 2. 3 に記載した。また、GCM 法の CTC 以外の他の細胞への応用展開は 3. 4 に記載した。

3. 1. 1 CTC のイメージング技術の開発 (農工大グループ)

<実施内容>

マイクロキャビティアレイ (MCA) 上に回収した細胞をハイスループットに識別するための光学システム (広視野イメージングシステム) を構築した (図 2)。具体的には 6 mm x 6 mm 領域を一括で撮像可能な光学系を実現するためにレンズの選定及び鏡筒の設計・開発を行ない、CTC 検出性能を評価した。健常者血液にがん細胞を添加した模擬サンプルを MCA にてフィルトレーションし、広視野一括撮像システムにてイメージングを行った。がん細胞の検出効率を顕微鏡と比較・評価した。

<成果>

CellTracker Green にて染色した細胞株では、広視野イメージングシステムは顕微鏡と 100%一致する検出性能を示した (図 3)。さらに、3 色のマルチカラー撮像が可能であり、がん細胞と白血球を蛍光パターンにて識別可能であった (検出効率 98.6%)。また、顕微鏡と比較して 100 倍以上の速度 (3 色で約 10 秒) でマイクロキャビティアレイ全面を撮像可能で

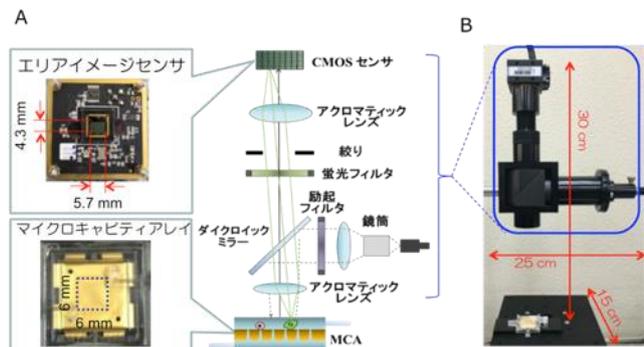


図 2. 広視野イメージングシステム概要

あった。

<成果の位置づけ>

従来の CTC 検出方法では、顕微鏡によるスキャンニングにより数百~数千枚の画像を取得することが必須であったため、CTC のイメージングステップが解析のスループットを下げる要因であった。広視野一括撮像による CTC 検出技術は、CTC 検出スループットの向上に寄与できると考えている。現時点では輝度の低い細胞の検出が困難な課題が残されているが、検出素子(CCD, CMOS)の高感度化などにより改善可能である。

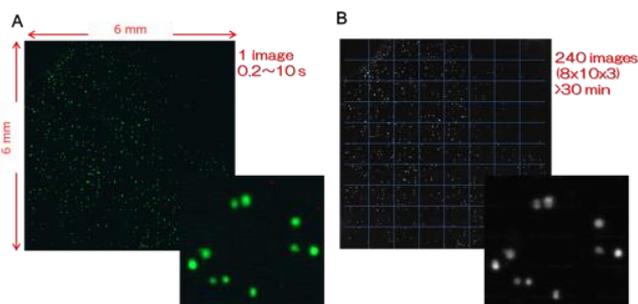


図3. 広視野イメージングシステム (A) 及び蛍光顕微鏡による細胞イメージング (B)

3. 1. 2 単一細胞分離法 (GCM 法) の開発(農工大グループ)

【GCM 法：原理検証】

<実施内容>

GCM 法とは光硬化性ハイドロゲルに単一細胞を包埋し、ハンドリングする技術と定義する。直径数十 μm の単一細胞に数百 μm のハイドロゲルを付与することにより、

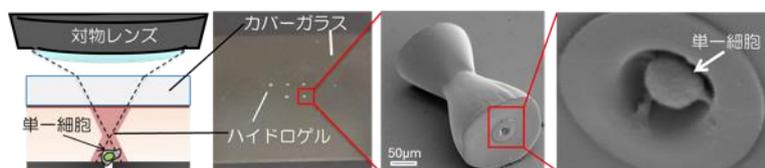


図4. ハイドロゲルで包埋された単一細胞

細胞を肉眼で視認可能とする (図 4)。これにより、簡易・迅速かつ高精度な単一細胞分離を実現でき、CTC のような希少細胞をロスなく分離する上で強力な手段となると期待した。そこで、本研究項目では、MCA 上に捕捉した CTC の単一細胞分離を高精度に行うための基礎検討を実施した。

まず、高精度な単一細胞分離に向け、光硬化性ハイドロゲル PEGDA (poly(ethylene glycol) diacrylate) の組成の検討を行った。数平均分子量 250、575、700、750 の PEGDA にて GCM 法を実施した。また、PBS にて希釈し、100%、75%、50%、30% の濃度に調整した PEGDA (数平均分子量 700) を用いて単一細胞分離操作を行った。なお、数平均分子量の検討には共焦点レーザー顕微鏡を、PEGDA の濃度の検討においては蛍光顕微鏡を利用した。

<成果>

数平均分子量を検討した結果、700 以上でほぼ全ての単一細胞を分離することが可能であった。数平均分子量 575 以下においてはハイドロゲルの作製は確認されたが、細胞分離成功率は低下した。数平均分子量が低いプレポリマーほど硬化に要するエネルギー量が大きいことから、同条件においては十分に硬化しなかったことが考えられた。また、PEGDA (数平均分子量 700) の濃度を検討した結果、濃度 100% において 95% 以上の分離成功率を示した (図 5)。低濃度のゲルにおいてはピンセットによる把持の際に破損する現象が見られた。このことから、細胞分離には一定の機械的強度を持つハイドロゲルを用いる必要があることが示唆された。さらに、単一細胞の分離成功率をマイクロマニピュレーターを用いた手法と比較した結果、分離成功率、処理能力ともに向上することが示された (表 1)。

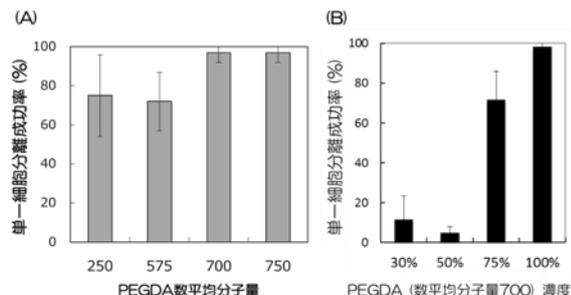


図5. PEGDA を用いた単一細胞分離条件の検討。(A) 数平均分子量の検討、(B) 濃度の検討

以上より、以降の検討においては数平均分子量 700 の PEGDA を濃度 100% で使用することとした。

<成果の位置づけ>

従来の単一細胞分離技術では直径数十 μm の細胞を直接取り扱うため、非常に高精度なシステムが必要であった。本研究では肉眼で観察可能なサイズのハイドロゲルに細胞を埋め込み、ハンドリングするという発想のもと検討を進めた結果、簡便な操作での高精度な単一細胞分離を実現することができた。本手法は特殊な装置を必要とせずに行えるため、CTC をはじめとする希少細胞の単一細胞を対象とした研究において、広く世界中で使われることを期待している。

表 1. 細胞分離の成功率の比較

	単一細胞分離の成功率	処理能力
マイクロピペット	22/29	6~12 cells/h
GCM法	55/55	60 cells/h以上

【GCM法：ハイスループット化】

<実施内容>

GCM法におけるハイドロゲル作製のハイスループット化を目的とし、Digital Micromirror Device (DMD)を用いた一括ゲル作製方式を構築した(図 6)。本システムは 4-1-1 にて構築した広視野イメージングシステムに、ゲル硬化用の励起光の光照射系を組み込んだものとした。ゲル硬化用の光照射系に DMD を組み込み、専用プログラムにて作製したパターンを読みこませることで、任意の形状の励起光を照射可能とした。光重合開始剤の検討を行い、ハイドロゲルの重合条件を決定した。また、MCA にて捕捉した単一細胞に対して同時に光を照射するための DMD 駆動パターンの作製に向け、画像解析ソフトウェアを新規に開発した。さらに、本システムを用いた単一細胞の分離効率の評価と細胞のバーコーディング化を目指して、ハイドロゲルの形状制御への応用展開を行った。

<成果>

光重合開始剤の検討を行った結果、PEGDA (Mn 700)に Benzophenone 及び 4,4'-Bis (dimethylamino) benzophenone をそれぞれ 0.1% の濃度で添加することで、光の照射パターン(200 μm の正方形を 800 μm 間隔)の形状を反映したハイドロゲルを作製可能であった(図 7)。実際に、MCA 上に捕捉した細胞を広視野イメージングシステムにて撮像し、画像を元に作製した照射パターンを用いて光照射したところ、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であった。さらにハイドロゲルで包埋した単一細胞は 96% の効率で MCA 上から分離することが可能であり、従来の顕微鏡を用いた光照射の 200 倍程度のスループット向上を達成した。さらに、EGFR 遺伝子の遺伝子型が異なる 2 種類の細胞 (A549 細胞、NCI-H1975 細胞)を異なる形状のハイドロゲルに包埋して分離し(図 8)、全ゲノム増幅・EGFR 遺伝子のシーケンス解析を行なった(全ゲノム増幅の詳細は 4-1-3 に記述)。その結果、ハイドロゲルの形状に対応する遺伝子型を同定することが可能であり、本手法が細胞バーコーディングに利用可能であることが示された。

<成果の位置づけ>

開発初期の GCM 法では、蛍光顕微鏡を用いて細胞一個一個に対して光照射を行っていたため、スループットに課題があった。DMD と広視野イメージングシステムを統合するこ

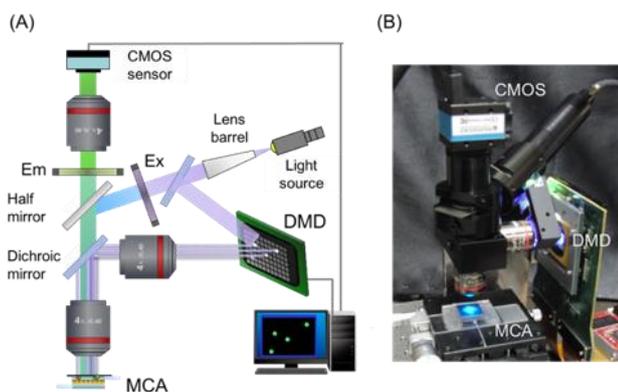


図 6. 広視野イメージング/ゲル作製システムの概要

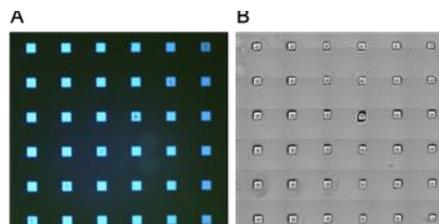


図 7. 光照射パターン (A) とハイドロゲルアレイ (B)

とにより、大幅なスループットの改善が可能であった。また、DMDを用いた光照射技術は米国を中心に研究が進められているが、観察した画像を元に光照射パターンを作成する一連のプロセスをソフトウェア上で完結できるフローを構築した例は存在せず、独自の技術を開発できたと考えている。さらに、光照射条件によってゲルの形状は可変であることより細胞バーコーディングへの応用が期待される。

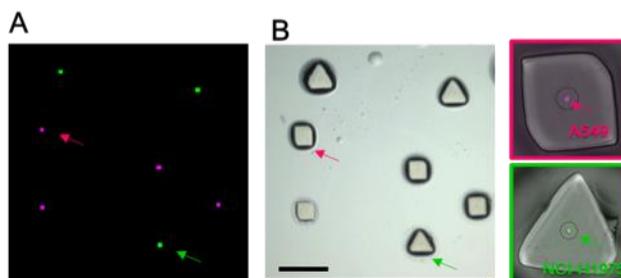


図8. ハイドロゲルの形状による単一細胞バーコーディング (A) 広視野一括撮像による細胞の二成分イメージング (B) 作製されたハイドロゲル。スケールバー: 100 μm

CTC 解析においては、ゲノム情報だけではなく、タンパク質の発現パターンなどのイメージング解析による情報を組み合わせることが望ましく、どの細胞をどの反応槽に入れたのか追跡する必要がある。従来法では顕微鏡で観察しながら一個一個取り出す必要があるが、本技術は顕微鏡観察を必要とせず、これらの情報を識別し、単一細胞を反応槽に導入できるため、分離・解析スループットの向上に有効な手法であると考えている。

【GCM 法: 高感度化/高精度化】

<実施内容>

上述において開発した広視野イメージング/ゲル作製システムは、複数の異なる形状のハイドロゲルを同時に作成可能であり、GCM 法のハイスループット化に有効であることが示された。一方で、本装置はMCA上の細胞の広視野一括撮像とGCMに特化した設計としたため、200 μm 以下の微細な構造のハイドロゲルを作成できないこと、光学系の設計上、イメージングの感度低下が発生することなどの課題が残されていた。そこで、イメージングの高感度化、ハイドロゲル造形の高精度化を目的として、一括ゲル作成装置の次世代機の開発を進めた。

<成果>

次世代機は、XYZ 電動ステージと、ゲルの自動注入機能をもつ構造とした (図9)。これにより、光照射パターンを変化させつつハイドロゲルを注入することで、ハイドロゲルの3Dプリンティングを行うことが可能な設計とした。イメージングの高感度化に向けて、複数の対物レンズを交換可能な光学系を設計した。また、イメージング用の光学系とハイドロゲル硬化用の光学系を統合することにより、細胞に照射される励起光及びカメラに向かう細胞由来の蛍光のロスを低減した設計とした。結果、初期型の広視野イメージング/ゲル作製システム(図6)では観察が難しかった細胞固定化後の細胞内抗原の検出が可能となった。ハイドロゲル造形の高精度化については、高倍率レンズを搭載することにより、100 μm 以下のサイズのハイドロゲルを作製することが可能となった(図10)。さらに、専用の制御ソフトを開発し、画面上で入力したポイントに対して任意の形状の光を照射することを可能とした。

<成果の位置付け>

【GCM 法: ハイスループット化】にて開発した広視野イメージング/ゲル作製システムはMCA上(6 mm x 6 mm 領域)の細胞を対象とした設計であったため、適応可能なサンプルがMCAに限定されていた。本システムは、より汎用的に使用可能な設計とし、光学系の再構築により、蛍光検出感度の向上、ハイドロゲル造形の高精度化を達成することができた。

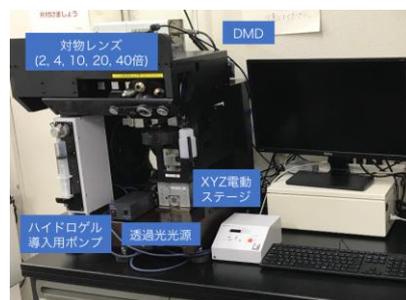


図9. 高精度広視野イメージング/ゲル作製システムの概要

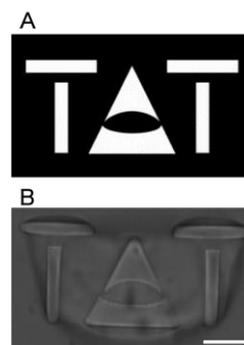


図10. 高精度広視野イメージング/ゲル作製システムを用いて作成したハイドロゲル (A) 照射パターン (B) ハイドロゲルの顕微鏡観察像。スケールバー: 100 μm

顕微鏡観察下で任意の部位に様々な形状の光を照射するシステムとしてはカナダ MIGHTEX 社の Polygon シリーズが 2015 年に市販化されているが、光照射のみを目的としたものであり、電動ステージの制御などのシステム全体の制御を行うことはできない。そのため、主にオプトジェネティクスにおける光刺激の制御に用いられている。一方で本システムは、GCM 法による細胞分離を行うことを想定したシステム設計となっており、ステージ制御、細胞撮像、ハイドロゲルの作製まで工程を一つのソフトウェア上で実施できる。これらの点で既存技術と差別化できると考えている。

【GCM 法：自動マイクロピンセット】

<実施内容>

ハイドロゲルで包埋した細胞のハンドリングプロセスの自動化を目的として、分離装置の設計・プロトタイプ開発を行った。本研究では、ハイドロゲルの分離及び運搬方法として、ピンセット方式とプローブ方式の 2 種を考案し、予備実験を実施した。最終的にピンセット方式を選択し、自動化装置のプロトタイプ機を開発した。装置の性能評価として単一細胞を包埋したハイドロゲルの分離効率と、所要時間を評価した。また、分離した単一細胞の全ゲノム増幅反応への適応性を評価した。

<成果>

ピンセットを装備した自動化装置（自動マイクロピンセット）を試作した(図 11)。本装置は自動で開閉、傾斜するピンセット、自動 XYZ ステージ、ハイドロゲルを観察するための顕微鏡、ハイドロゲルを作製したカバーガラスを設置するための台、細胞回収用の PCR チューブを設置するためのホルダーから構成される。ハイドロゲルの位置情報をマニュアルで読み込むことで、全自動運転にてハイドロゲルを PCR チューブに輸送することが可能である。ステージの運転速度を検討した結果、一個のハイドロゲルの輸送を約 45 秒で完了することが可能であった。精度評価として同一の基板上に固定した 20 個のハイドロゲルを分離したところ、全てのハイドロゲルをロスなく PCR チューブに輸送することが可能であった。このことから、本装置は高精度な単一細胞の分離が可能であることが示唆された。また、分離した単一細胞に対して全ゲノム増幅を行なった結果、手動で分離したものと同等量の全ゲノム増幅産物を得ることが可能であった（全ゲノム増幅に関しては 3-1-3 に記載）。

<成果の位置づけ>

これまで販売されている単一細胞分離装置は細胞を直接操作するため、数 μm オーダーでの制御が必須であり、非常に高精度な機械加工・組み立て技術を必要としていた。一方、GCM 法は単一細胞を数百 μm 程度のサイズのハイドロゲルに包埋してハンドリングするため、要求される機械精度を落とすことができる。このため、従来法と比較して装置のコスト面で有利である期待できる。また、全行程をモニタリングすることが可能であり、単一細胞を 100%ロスすることなく PCR チューブまで運搬することが可能であった。

【GCM 法：光照射の細胞への影響評価】

<実施内容>

本研究で考案した GCM 法は光照射により細胞をハイドロゲルで包埋するプロセスを含む。よって光照射時における細胞、及び DNA への影響の評価が必要である。そこでハイドロゲルの硬化に必要なエネルギー (380 mJ/cm^2)、および実際の照射強度の 20 倍強にあたる

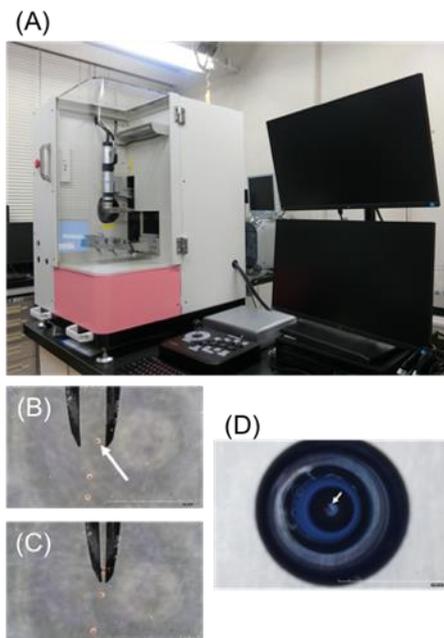


図 11. 自動マイクロピンセット
(A) 装置外観。(B) ハイドロゲル(白矢印)把持前の様子。(C) ハイドロゲルを把持した様子。(D) PCRチューブ内部に輸送したハイドロゲルの観察

約 8300 mJ/cm² の条件において、光照射による細胞への影響評価を実施した。各条件により光照射した後の細胞 (A549) に対し、コメットアッセイ(単一細胞ゲル電気泳動法) にて DNA の切断を評価した。さらに UV 照射した DNA に対し、DNA 損傷マーカーとして知られるシクロブタン型ピリミジンダイマー、6-4 光生産物、及び 8-oxo-dG の 3 種の化合物が発生するか、抗体染色により検証した。

<成果>

コメットアッセイの結果、いずれの条件においてもコメットテールの長さに顕著な違いは見られなかった(図 12)。このことから、ハイドロゲルの作製に用いるエネルギーの光照射では DNA の顕著な断片化は発生しないことが示唆された。また、3 種の DNA 損傷マーカーを抗体にて染色したところ、いずれも検出限界以下であった。これは、既往の知見とも矛盾しない結果であり、GCM 法で用いるエネルギーの光照射では DNA に顕著なダメージは発生しないことが示された。

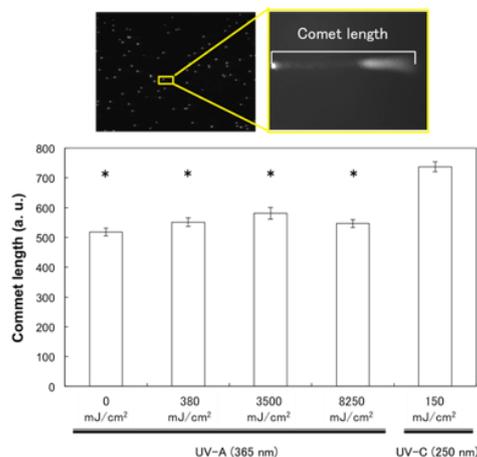


図 12. コメットアッセイによる DNA 切断の評価

<成果の位置づけ>

細胞への光照射の影響は、先行研究と矛盾しない結果であった。また、ハイドロゲルの硬化に必要な照射量の 20 倍のエネルギー量でも DNA への影響は見られないことから、GCM 法による DNA へのダメージは無視できるレベルであると考えられる。このことから、本手法が遺伝子解析に利用可能であることが示された。

3. 1. 3 単一細胞の核酸増幅の検討(農工大グループ)

【全ゲノム増幅】

<実施内容>

ヒト由来の単一細胞にはゲノム DNA が 6 pg 程度しか含まれていないため、単一細胞由来のゲノム解析を行うためにはゲノム DNA を網羅的に増幅可能な全ゲノム増幅 (Whole genome amplification: WGA) を行い、十分量の DNA を確保する必要がある。上述で示した GCM 法は、単一細胞を確実に次の反応に供することが可能であるため、ゲノム解析への利用が期待される。本項では、ハイドロゲルに包埋された単一細胞を WGA 法に利用することが可能であるか検証した。GCM 法にて分離した単一細胞に対して WGA を行い、①全ゲノム増幅産物の収量、②増幅領域へのバイアス、コピー数の評価を実施し、ハイドロゲルの WGA への影響を評価した。

WGA には Multiple displacement amplification (MDA)法に基づく Repli-g Single Cell kit (QIAGEN)、PCR 法に基づく Ampli1 WGA kit (Silicon Biosystems)、及び MDA と PCR 双方を組み合わせた PicoPLEX WGA kit (New England BioLabs)の 3 種類のキットを用いた。GCM 法にて分離した細胞に対して、全ゲノム増幅を行い、得られた増幅産物の収量を測定した。ハイドロゲルの全ゲノム増幅の増幅領域に与える影響を評価するために、得られた増幅産物をテンプレートとし、染色体上での位置の異なる 9 領域 (Jiang et al., *Nucleic Acid Research*, 2005) の PCR 増幅を実施した。さらに、全ゲノムを網羅的に増幅することが可能であるか、Array CGH 解析にて評価した。

<成果>

①3 種類の増幅方法において GCM 法で分離された単一細胞 (ハイドロゲルで包埋された単一細胞) から十分量の増幅産物を確認することができた(表 2)。マイクロマニピュレーションにて分離した細胞 (ゲル非存在下での WGA) から得られた増幅産物量を t 検定により検証したが、いずれの増幅方法において有意差は認められなかった。一方、GCM 法で分離した単一細胞のハイドロゲルから露出している部位をゲルで包埋することで、細胞全体をハ

イドロゲルで包埋した細胞に対して WGA (PicoPLEX WGA kit) を行った結果、増幅産物を得ることが出来なかった。この結果より、GCM 法により分離した単一細胞の WGA への利用においては、ハイドロゲルから一部露出していることが重要であることが示された。

②3 種類の全ゲノム増幅キットを用いて得られた全ゲノム増幅産物をテンプレートに遺伝子増幅の確認を行った (表 3)。3 種の全ゲノム増幅キットで増幅のされやすい領域に差異があることが確認されたが、ハイドロゲルに起因する影響は見られなかった。また、Array CGH 解析より、単一細胞のゲノムの概ね全領域を増幅できていることが確認できた。このことから、ハイドロゲル

は全ゲノム増幅における増幅領域へ顕著な影響を与えないことが示唆された。また、HER2 遺伝子などのがん関連遺伝子に対して、qPCR にて検出可能であることを確認している (遺伝子変異検出に関する検討の詳細は 3-3-1 に記載)。

表 2. 全ゲノム増幅法と単一細胞分離手法による増幅産物の収量の比較

方法	マイクロマニピュレーション (ゲル無し)	GCM法 (ゲルあり)	t検定	GCM法 (細胞全体をゲルで包埋)
MDA法 (QIAGEN: Repli-g)	28.8 ± 3.3 μg	26.3 ± 3.4 μg	n.s.	-
PCR法 (Silicon Biosystems: Ampli 1)	1.7 ± 0.5 μg	1.5 ± 0.3 μg	n.s.	-
MDA&PCR法 (NEB: PicoPlex)	3.1 ± 0.2 μg	3.2 ± 0.3 μg	n.s.	0.5 ± 0.0 μg*

n.s.: not significant * : significant difference from micromanipulation p < 0.01

表 3. 全ゲノム増幅のバイアス評価

Gene name (Chr.)	PIK3CA (3q)	MSH2 (2p)	CAT (11p)	P53 (17p)	ADCYAP1 (18p)	PMS2 (7p)	C6orf195 (6p)	PTEN (10q)	TOP1 (20q)	
Repli-g (MDA)	マイクロマニピュレーション法	7/10	3/10	7/10	10/10	4/10	9/10	6/10	10/10	9/10
	GCM法	4/10	5/10	9/10	10/10	5/10	9/10	8/10	8/10	8/10
Ampli 1 (PCR)	マイクロマニピュレーション法	9/10	0/10	1/10	9/10	10/10	2/10	7/10	4/10	9/10
	GCM法	5/10	3/10	1/10	8/10	8/10	4/10	6/10	1/10	9/10
PicoPLEX (MDA&PCR)	マイクロマニピュレーション法	3/5	1/5	1/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	GCM法	5/5	0/5	3/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	3/5

PCR増幅効率 0-39% 40-79% 80-100%

<成果の位置づけ>

GCM 法では単一細胞のハンドリング性を向上させる代わりに、細胞にハイドロゲルが付属する。そのため、ハイドロゲルが後段の解析に影響を与えることが懸念されたが、検証の結果、顕著な影響なく解析を行うことが可能であることが確認できた。また、ハイドロゲル内部に細胞を完全に包埋した場合に WGA 産物が全く得られなくなることから、WGA には細胞が一部ハイドロゲル外部に露出していることが重要であることが確認できた。本手法では MCA 上に細胞を捕捉した上でハイドロゲルに包埋するため、確実に細胞をハイドロゲル外部に露出させることができる。このため、本手法は分離した単一細胞を確実に WGA 反応に供することができると考えられ、簡易・迅速な単一細胞分離技術として広く利用されることを期待している。

【全トランスクリプトーム増幅】

<実施内容>

ヒト単一細胞には RNA が 10 pg 程度しか含まれないため、単一細胞のゲノム解析と同様に、遺伝子発現解析・トランスクリプトーム解析を行うには、全トランスクリプトーム増幅 (Whole transcriptome amplification: WTA) を行い、後段の解析に十分量の cDNA を取得する必要がある。このような背景のもと、GCM 法にて分離した単一細胞において WTA 法が適応可能か評価することとした。また、細胞内の RNA 安定化のタイミングについても検討し、RNA 分解への影響も評価した。

GCM 法で分離した単一細胞に対して WTA を実施し、増幅産物の収量及びクオリティをキャピラリー電気泳動により評価した。WTA には Poly-A tailing に基づく Quartz-seq 法 (Sasagawa et al., 2013) と Template switching に基づく SMART-seq 法 (Takara Bio) を使用した。また、RNA の安定化処理には CellCover (Anacyte) を使用した。

<成果>

あらかじめ RNA の安定化処理を実施することで、GCM 法で分離した単一細胞においても従来法 (マイクロマニピュレーション) で分離した単一細胞と同等の収量 (数十ナノグラム) ・平均鎖長 (1100 bp 超) を持つ WTA 産物を取得することが可能であった (図 13)。また、同様の条件にて SMART-seq 法での全トランスクリプトーム増幅も実施可能であることを確認した。また、単一細胞から得られる WTA 増幅産物量は、細胞毎に大きく異なることが示された (20 ~130 ng)。そこで SYTO RNA select による細胞内 RNA の染色を行ない、一細胞ごとの輝度を評価したところ、細胞によって輝度値が異なり、広範に分布することが確認できた (図 14)。このことから、WTA 産物の収量の違いは細胞内の RNA の量を反映していることが示唆された。

<成果の位置づけ>

単一 CTC の遺伝子発現解析においては単一細胞の分離工程における細胞へのストレスを考慮する例は殆どなく、これらを無視した解析が行われている現状にある。本検討においてはハイドロゲルへの包埋による単一細胞への物理的ストレスを考慮し、ハイドロゲル包埋前に RNA の安定化処理を行うことで、良好な WTA 産物の取得を行えた。本手法以外での単一細胞遺伝子発現解析においても有意義な知見となると考えている。

【同一の単一細胞からの全ゲノム及び全トランスクリプトーム増幅】

<実施内容>

従来の単一細胞遺伝子解析では、DNA または RNA の一方のみを対象とした解析が行われてきた。これらの解析が、これまで未知であった現象を説明する手がかりとなるデータを提供する一方で、ゲノム構造と遺伝子発現の単一細胞レベルでの相互関係は厳密には未知のままであった。このような背景のもと、本研究課題では単一 CTC の DNA 及び RNA を分画し、それぞれを増幅することで双方の解析を実現することを計画した。本研究では Macaulay らが開発した磁気ビーズによる mRNA のキャプチャーを利用した G&T-seq 法 (Macaulay et al., *Nature Method*, 2015) を利用し、GCM 法により分離した単一細胞から DNA/RNA の同時解析が可能であることを評価した。また、G&T-seq 法の実施に先駆けて、単一細胞の溶解条件を検討した。細胞の溶解には、RLT Buffer、NP-40 を使用し、細胞溶解後の核・細胞質・RNA の溶出を蛍光染色により確認した。mRNA の分画にはアダプター配列を付与した Oligo dT 修飾磁気ビーズ (Dynabeads) を使用した (図 15)。また、WTA には SMART-seq v4 Ultra Low input RNA kit (タカラバイオ)、WGA には PicoPLEX WGA kit (New England BioLabs) を

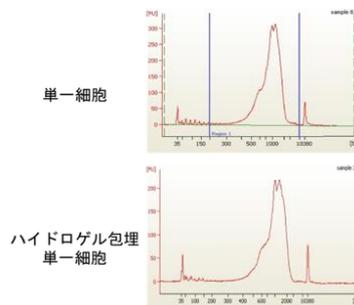


図 13. Quartz-seq による単一細胞由来増幅産物の電気泳動図

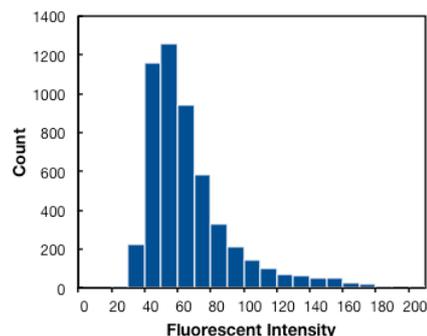


図 14. 単一細胞 RNA 由来の蛍光強度から作成したヒストグラム

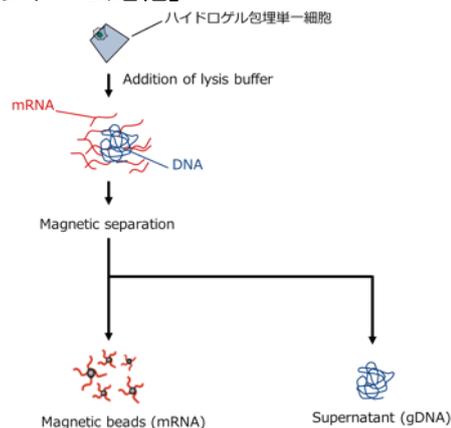


図 15. ハイドロゲル包埋単一細胞からの DNA/RNA の分画方法

使用し、既報のプロトコルを改良した。

<成果>

GCM 法にて分離したハイドロゲル包埋単一細胞に対して溶解バッファーを添加したところ、1x RLT Buffer 及び 0.5x RLT Buffer にて細胞質及び核の溶解が確認された。NP-40 は濃度を 2%とすることで細胞質の溶解及び RNA の分散が確認されたが、核の溶解には至らないことがわかった。これらの溶解

表 4. 溶解バッファーによる核酸増幅への影響評価

溶解バッファー	WGA産物	WTA産物
1 x RLT Buffer	2.55 ± 0.25 μg	検出限界以下
0.5 x RLT Buffer	2.22 ± 0.16 μg	7.25 ± 0.71 ng
2% NP-40	検出限界以下	7.82 ± 3.54 ng

バッファーによる細胞溶解サンプルを対象に DNA/RNA の分画、及び WGA、WTA を実施した結果、0.5x RLT Buffer を用いた場合においてのみ双方の増幅産物を得ることが可能であった (表 4)。さらに、WGA においては、分画操作を行わなかったサンプルよりも多くの増幅産物を得ることが可能であった。これは、分画工程において細胞内に存在する DNA 増幅阻害物質が除去されるためであると考えられる。

<成果の位置づけ>

単一細胞のマルチオミクス解析は G&T-seq の登場を皮切りに様々な手法の開発が報告されているが、CTC の研究に利用した例は存在しない。このような現状の中、GCM 法にて分離した同一の単一細胞から DNA・RNA 双方の増幅が可能となったことは、大きなアドバンテージとなると考えている。本手法にて、希少な CTC から多くの情報を取得することができれば、抗がん剤効果の判断に必要な情報提供が可能となり、個別化医療への貢献が期待できる。

3. 2 プロトタイプ開発

<概略>

臨床サンプルの処理に適したフィルターとして、金属フィルターの安定化処理、および CTC 濃縮後の遺伝子解析などの二次解析を可能とする解体型のカートリッジを設計した。また、末梢血からの自動 CTC 濃縮・染色装置を基盤とし、フィルターからの細胞分離として簡易的な細胞分離システムを新たに構築した。さらに、追加項目として蛍光染色されたがん細胞の自動判定ソフトウェアの開発を行った。

3. 2. 1 フィルターおよびカートリッジの試作開発 (日立化成グループ)

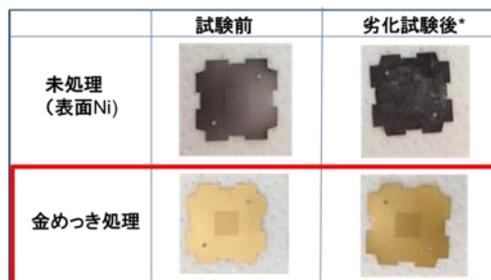
【MCA フィルター】

<実施内容>

東京農工大学及び日立化成グループでは本プロジェクト開始以前に、Ni 製の MCA の開発に取り組み、CTC 検出への利用性を示してきた。本プロジェクトにおいては、CTC 濃縮後の細胞の分離、核酸解析への応用や細胞培養への利用を目的として、新たに MCA 表面の改質として、表面状態を安定化させるための表面処理を検討した。具体的に Ni 製フィルターは耐食性が弱いため、金めっき処理の検討を行った。更に金属表面への生体親和性処理を施し、遺伝子解析でノイズ原因となる白血球・血小板の低減を検討した。

<成果>

フィルター本体の安定化検討の結果、金めっき処理により耐劣化性能を付与することに成功した (図 16)。更に、生体親和性処理により遺伝子解析時のノイズ成分 (白血球、血小板) の低減効果があることを確認した。



*劣化試験: EDTA含有リン酸緩衝生理食塩水中に24時間浸漬

図 16. 金めっきフィルターの安定性

【解体型カートリッジ】

<実施内容>

これまで開発してきたカートリッジは CTC 検出を目的とした仕様であったため、内部の MCA フィルターの取り外しができない溶着型カートリッジを使用していた。本プロジェクトでは、濃縮した CTC の取り出しを目的として、新たに解体型のカートリッジの試作に取り組んだ。具体的には、クリップ除去により容易に解体可能なカートリッジとして設計した。固定はクリップ止めとし、血液検体プロセス時に漏えいせず、顕微鏡観察領域の平面性を保つために、均一に圧がかかる最適化を行った。



図 17. 試作した解体型カートリッジ

<成果>

解体型カートリッジのクリップ位置により液漏れ現象が発生したため、圧力分布シミュレーションにより最適位置をシミュレーションした。サンプル液にて液気密性を検証し、4点固定（中央）による最適仕様を決定した（図 17）。解体型カートリッジの開発により、従来の細胞観察に加え、フィルター上の単一細胞に対する遺伝子解析への可能性が広がった。

<成果の位置付け>

初期の MCA システムは捕捉細胞の計数を目的に設計されたものであったが、遺伝子解析のニーズが高まり、新たに解体型カートリッジを設計した。数社がサイズ選択的な CTC 回収装置を開発中であるが、MCA システムは細胞捕捉染色の自動化、二次解析に有利な短時間での細胞捕捉を特長としており、駒込病院グループでの臨床研究ほか複数の共同研究において、本カートリッジを用いた血液検体の評価が進行中である。解体型カートリッジは捕捉した細胞へのアクセスが可能であることから、単一細胞遺伝子解析等の二次解析への利用が可能であると考えられ、現在の CTC 研究のニーズを満たすものと期待している。

3. 2. 2 簡易細胞分離システムの構築（日立化成グループ）

<実施内容>

農工大グループで進めているハイドロゲルを用いたハイスループットな単一細胞分離システム（GCM 法）の確立に先駆けて、MCA 方式に特化した簡易細胞分離システムの構築を検討した。

<成果の位置付け>

本プロセスにより、濃縮した細胞を高効率にカートリッジ外部に取り出すことができるため、市販の単一細胞分離システムを用いた単一細胞やクラスター細胞の分離が可能になると考えられる。また、金属製の MCA フィルター上では困難であった透過光観察が可能となるため、ギムザ染色など、従来の細胞診と同様のプロセスにて CTC を同定することができる。現状、CTC の同定は細胞骨格タンパク質の蛍光染色にて行われることが一般的だが、細胞診による検出のニーズも多い。本プロセスはそれらのニーズに応える上でも有効な手法であると考えている。

3. 2. 3 CTC 計数用ソフトの開発（日立化成グループ）

<実施内容>

6 mm x 6 mm の MCA フィルター上に回収された細胞集団から CTC を計測するためには、蛍光免疫染色した細胞を蛍光顕微鏡にて観察し、CTC を画像から同定している。これまでの臨床試験の結果より、CTC はがん細胞株と異なり染色性に劣る傾向がある。その結果、測定者間で捕捉した細胞が CTC であるかどうか判定にばらつきが出やすい。そこで、本項では統一された判断基準をベースに捕捉細胞を判断できるよう、新規に CTC 計数用ソフトの開発を行い、市販ソフトと比較した。

<成果の位置づけ>

撮像された画像から CTC を同定する場合、画像の撮像、画像解析、測定者による解析結

果確認、最終判断というステップが必要になり、通常は時間がかかり、測定者間の誤差も生まれやすい。東京農工大で開発を行っている広視野一括撮像システム(3-1-1 に記載) と、日立化成の CTC 計数用ソフトは、画像の撮像及び解析に必要な時間を大きく削減することが可能である。また、同一の解析アルゴリズムを使用することで、測定者間の誤差を抑制し、信頼性の高い結果を安定して得ることが出来るようになると期待している。

3. 3 CTC 核酸解析プラットフォームの有用性の評価

<概略>

近年、発生物学と再生医学の分野において単一細胞遺伝子解析の実施例は増加しているが、CTC を対象とした研究報告例は未だ少なく(現時点で 20 例以下)、技術的な課題が残されている。また、これまでに示された実施例においても、分離した単一 CTC 由来の核酸増幅産物が、必ずしも解析に耐えられるクオリティを示していないことが確認されており、その歩留まりは分離できた単一 CTC 全体の 30~60%程度といった現状にある。操作の煩雑さによる CTC のロスや、検体あたりの所要時間の長さ(4-5 時間)による CTC へのストレスが考えられ、これらが単一細胞遺伝子解析の歩留まり低下の一因となっていると考えられる。従って、CTC の単一細胞遺伝子解析を推進していくためには、迅速かつ確実に単一 CTC を分離する技術が必要であるが、実用レベルでこれを満たす技術は現時点で存在しない。

本プロジェクトでは、MCA 方式による CTC の核酸解析プロセスの要素技術開発を行ってきた(3-1, 2)。本項では、その有用性の評価とがん患者からの血液検体を用いた臨床試験への応用を試みた。また、がん診断、治療、創薬分野への CTC の利便性の追求を目的として、治療標的因子の探索や薬剤開発における POC 確認などへの応用の可能性について、検討した。本項での実施内容を以下の 4 つの研究項目に集約する。

3. 3. 1 要素技術の有用性確認

研究課題：GCM 法を用いた単一細胞ゲノム解析及び遺伝子発現解析の実証試験 / 臨床検体を用いた単一細胞遺伝子発現解析試験

3. 3. 2 新規治療標的因子の探索、同定

研究課題：単一細胞全ゲノム増幅産物のターゲットシーケンスによる遺伝子変異の同定 (モデル/臨床)

3. 3. 3 Proof of Concept(POC)の確認

研究課題：抗体染色による分子標的薬の標的分子修飾評価系の構築 / 遺伝子発現解析による分子標的薬暴露の影響評価

3. 3. 4 CTC の培養

研究課題：MCA 上からの細胞回収法の開発/臨床検体を用いた培養試験

3. 3. 1 要素技術の有用性確認(駒込病院グループ・農工大グループ)

CTC 研究は、その感度、特異度が極めて重要である。数千万個の白血球に対してわずか数個の CTC をとらえる技術の確立(感度)、および偽陽性 CTC を生じないシステムが望まれる(特異度)。仮に CTC であるとした細胞が CTC でなかつた場合、基礎検討、臨床研究において、誤った結果を得ることになり、研究、臨床応用は困難となる。これまでに MCA 方式を採用した CTC 濃縮装置の肺がん患者への有効性に関して、実証済みであるため、他のがん種への有用性評価と核酸解析への利用性を確認した。

2017 年度までに病期、がん種など多岐にわたるがん患者の血液検体を用いて、解析を行っている。これまでに、CTC 濃縮装置の性能評価、画像ソフト Columbus を使用した CTC 計測、及び GCM 法を用いた核酸解析を実施している。以下に、本プロジェクトで開発した GCM 法の有用性の確認をまとめた。

【GCM 法：ゲノム解析】

<実施内容>

CTC を用いたがんの遺伝子検査を目指し、GCM 法による単一細胞の分離と塩基変異多型解析、コピー数多型解析、及び全ゲノムシーケンス解析への利用性について検証した。

がん患者血液 (1 ml) またはがん細胞をスパイクした健常者血液(1 ml)を用いて、3-1 で示した MCA 方式によるがん細胞の濃縮、GCM 法による単一細胞を分離し、全ゲノム増幅を行った。増幅産物に対し、塩基配列解析にはサンガー法(ABI PRISM 3130)または ion PGM (Life technologies)によるターゲットシーケンス、次世代シーケンサー(HiSeq2500 (illumina))による全ゲノムシーケンスを実施した。また、Copy number variation の解析にはリアルタイム PCR による乳がん細胞の HER2 遺伝子のコピー数解析を行った。

<成果>

塩基変異多型解析として、EGFR のエクソン 19 の部位に 15 塩基欠損の遺伝子変異 (del E746-A750) を持つことが報告されている肺がん細胞株 HCC827 細胞をモデル CTC として用いた。がん細胞株をスパイクした健常者血液から MCA を用いてがん細胞の濃縮・染色後、GCM 法による単一細胞の分離を行った。分離した細胞に対して全ゲノム増幅を行い、増幅産物に対しシーケンス解析を行った。その結果、HCC827 細胞からのみ遺伝子変異を持つ配列が確認された (図 18A)。GCM 法により分離した全ての細胞において、細胞株に対応した遺伝子変異が確認され、EGFR 遺伝子変異の検出率は 100%となった。

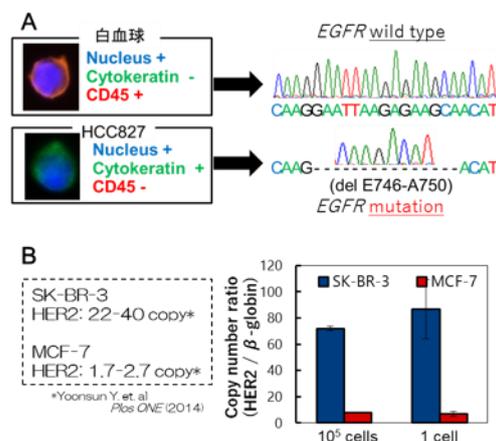


図 18. GCM 法に基づいた単一がん細胞の遺伝子変異解析 (A) 及び Copy number variation 解析 (B)

Copy number variation 解析の実証試験として、HER2 遺伝子のゲノム上でのコピー数が異なることが確認されている乳がん細胞 SK-BR-3、MCF-7 を使用した。これらの細胞を単一細胞レベルで分離し、全ゲノム増幅を行い、得られた増幅産物を対象に HER2 遺伝子とコピー数の変化がない β-globin のリアルタイム PCR を行なった。その結果、分離した全ての細胞 (各 10 細胞)において、既往の知見を反映したコピー数比を示した (図 18B)。

全ゲノム配列解析として、GCM 法により分離した単一細胞 (胃がん細胞) を Ampli1 WGA Kit (silicon biosystems)、および REPLI-g single cell kit (Qiagen)により増幅し、シーケンス解析を行った。また、コントロールとして、バルク細胞(10⁶cells)から抽出したゲノム DNA サンプルに対しても同様にシーケンス解析を実施した。その結果、REPLI-g 法で増幅したサンプルから取得した解読塩基数および Quality は、バルク細胞から取得した結果と同レベルであることが示された。以上の結果より、GCM 法で分離した単一細胞に対して、種々のゲノム解析への利用性が示された。

<成果の位置付け>

CTC の検出工程を経たサンプルから遺伝子変異を検出可能であることを確認できた。また、遺伝子解析の結果、白血球とがん細胞の取り違い、複数細胞の巻き込みなどなく単一細胞を分離できることが確認できた。また、全ゲノム解析においては、全ゲノム増幅方法により得られる解読塩基数に違いが見られている。解読配列の詳細解析に関しても今後実施し、その特性の評価を引き続き行っていく予定である。

【GCM 法：トランスクリプトーム解析】

<実施内容>

単一細胞レベルでの CTC のトランスクリプトーム解析の実施に向けて、転移性がん患者血液 (1 ml) からの CTC 候補の検出及び単一細胞分離試験を行い、3-1-3 にて決定した条件で単一 CTC 候補から WTA 産物を得ることが可能であるかを評価した。転移性がん患者血液 1 ml を対象に CTC の単一細胞分離を行い、WTA を行なった。得られた WTA 産物の収量及びクオリティをキャピラリー電気泳動及びハウスキーピング遺伝子 GAPDH の qPCR により評価した。また、膀胱がん患者より分離した CTC 候補細胞についてシーケンスライブ

ラリーを作成し、Illumina HiSeq 2500 にて RNA-seq を行った。さらに得られたシーケンスデータから、遺伝子発現解析を実施した。

<成果>

RNA を対象とした CTC の単一細胞解析は技術的なハードルが高く、世界的にもまだ報告例が少ない。そのため、本手法にて単一 CTC を検出・分離でき、安定的に WTA 産物を取得できることを確認できたことに大きな意味がある。従来法では数時間の操作の間、CTC 内の RNA は安定化されないのに対し、本手法は血液から CTC を濃縮した直後 (約 40 分以内) に細胞内 RNA を安定化できる。このことから、本手法では長時間の実験操作による影響を受けにくいロバストな遺伝子発現解析が可能であると考えられる (図 19)。また、RNA-seq 解析により、膵臓がん患者の CTC 候補の性質を評価した結果、膵臓がんモデルマウスと類似した性質を持つことが確認できた。このことから、本手法を用いた CTC の遺伝子発現解析により、がんの転移メカニズムや、抗がん剤耐性の獲得機構についての知見を得ることが可能になると考えられる。

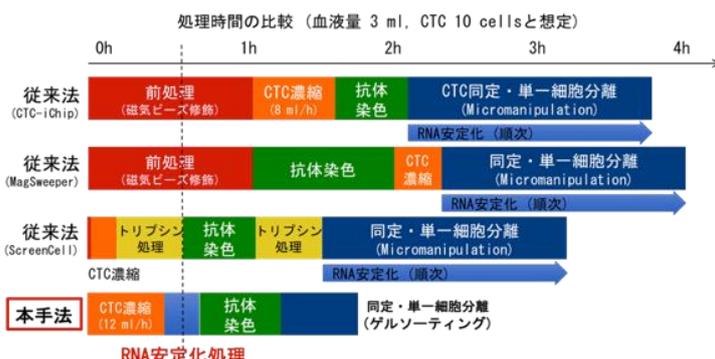


図 19. 各種 CTC 単離技術の RNA 解析における細胞処理工程の比較

3. 3. 2 新規治療標的因子の探索、同定 (駒込病院グループ)

<実施内容>

治療標的因子の探索として、CTC に特徴的な遺伝子変異を見出すために、単一細胞レベルでのがん関連遺伝子のターゲットシーケンス解析を実施した。臨床サンプルの実施に先駆けて、まず単一細胞での解析可能遺伝子変異の範囲を規定した。がん細胞株 5 種 (乳がん: BT20, SKBR3 肺がん: PC9 大腸がん: HCT116, WiDr) を用いて、単一細胞から増幅したゲノム DNA (Ampli1 で増幅) とバルク DNA との遺伝子変異の比較を実施した。遺伝子変異解析は、Ion PGM (LifeTechnologies) による Cancer Hotspot Panel (50 種類のがん関連遺伝子) での解析を実施した。1 細胞から増幅したゲノムと、バルク DNA の同パネルでの遺伝子変異解析の比較を行い、解析可能遺伝子変異の範囲について確認した。さらに、複数のがん患者の臨床検体から分取した単一 CTC の遺伝子変異解析を実施した。なお、CTC の分離には、MCA/GCM 法の確立以前において、従来法により実施した。本検討により、新規の標的が見出された際には、がん細胞での遺伝子変異の強制発現系、ノックダウン系を用いて機能解析を実施した。

<成果>

ターゲットシーケンス解析により得られた遺伝子変異の結果を図 20 に示す。全ゲノム増幅の過程により、本来有していた可能性のある遺伝子変異を検出できなくなる可能性が分かった。しかし、全ゲノム増幅の過程による増幅ミスのために、本来は有していない遺伝子変異を誤って検出してしまう (偽陽性) 可能性は極めて低いことが示唆された。すなわち、CTC 1 細胞から全ゲノム増幅の過程を経てシーケンス解析により得られた遺伝子変異は、その CTC に存在している可能性が極めて高いと考えられた。

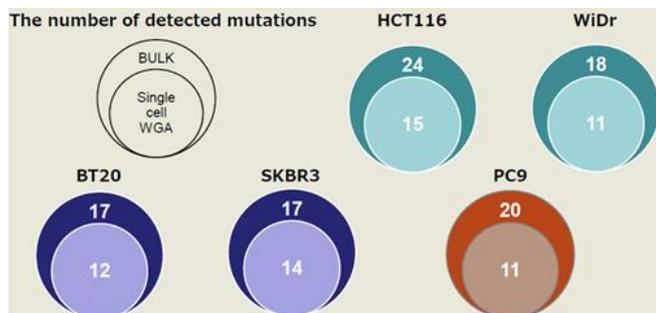


図 20. 5 細胞株の BULK DNA と 1 細胞からの増幅 DNA を用いた遺伝子変異検出の比較

以上の結果を踏まえ、臨床検体から分取された CTC を用いて解析を行った。

<成果の位置付け>

単一細胞で核酸解析が可能なプラットフォームの実現は、臨床においてがんの進展度診断、治療法の決定、再発、転移、予後予測など様々な応用が期待でき市場規模は大きい。本研究で進めている CTC に特異的な遺伝子変異の発見やその機能解析により、創薬研究にも新たな知見が得られると考えられる。

3. 3. 3 Proof of Concept(POC)の確認 (駒込病院グループ・農工大グループ)

創薬開発における POC の確認は、投薬前後での治療薬標的の評価を行うことであり、ほとんどの抗がん剤の治験において実施される。病変組織の生検による標的分子の評価を投薬前後において行う必要があるが、患者に身体的負担を与えるため、再生検を行うことは容易ではない。そこで、POC 確認の検査対象として CTC の利用による創薬開発の効率化が期待されている。さらに、CTC を利用することで、投薬効果や病状の進行状況をリアルタイムに評価し、患者個人に最適な治療法を選択する個別化医療に繋げることが期待できる。以下には、本プロジェクトにおいて、CTC を用いた POC 確認への利用を目指し、薬剤応答の単一細胞レベルでの評価系について検証した。

【薬剤投与による標的分子の修飾評価】

<実施内容>

臨床で用いられている抗体を含む分子標的薬を用いて、疑似的に薬剤による標的分子の修飾が観察できるかを試みた。がん細胞として、HER2 陽性乳がん細胞株である SKBR3 または EGFR 陽性大腸がん細胞株である WiDr を使用した。がん細胞 (1000 cells) をスパイクした健常人血液 (3 ml) に、薬剤 (トラスツズマブまたはパニツムマブをそれぞれ 10 µg/ml) を 4 時間暴露し、暴露前後における標的分子の修飾を観察した。

<成果>

薬剤投与無しにおいては、HER2 陽性細胞、及び EGFR 陽性細胞の標的分子の発現が確認された。一方、薬剤投与ありの細胞においては、がん細胞の確認はされたが、標的分子の発現が示されなかった。本結果、薬剤暴露により標的分子が修飾を受けていることが示唆された。以上の結果より、標的分子における薬剤暴露後の変化が、1 細胞レベルで確認可能であることが示された。

<成果の位置づけ>

分子標的薬剤の開発が主流となった今、開発過程における新規開発薬剤の drug-induced target modification (薬剤の標的分子の修飾) の早期臨床試験における確認は、創薬の効率化に貢献する可能性がある。上記では、抗体染色による評価を実施したが、検出可能なタンパク質には数的制約が残るため、以降で示す RNA 解析技術を用いて drug-induced target modification の評価が行えると考えており、臨床検体を用いた基礎検討を実施している。

【薬剤暴露による mRNA 発現応答の評価】

<実施内容>

薬剤投与後の体内における CTC での発現変動を評価することを最終目的として、薬剤暴露後の経時変化に応じた単一細胞レベルでの遺伝子発現変動を捉えられるかを検証した。培養ディッシュに播種した肺がん細胞株 PC9 を EGFR チロシンキナーゼ阻害剤である薬剤 (ゲフィチニブ) に暴露した。1、4、24、48 時間後に暴露を停止し、ディッシュから細胞を剥離したのち、3-1-3 で決定した条件にて、MCA 方式による細胞の回収、RNA の安定化、GCM 法による単一細胞の分離を行った。WTA を行い、得られた WTA 産物を対象に Digital PCR 法にて細胞周期関連遺伝子の発現量を測定した。

<成果>

細胞へのゲフィチニブ暴露停止から 10 分以内に RNA 安定化処理を完了することが可能であった。細胞周期制御遺伝子である *CDKN1A*、*CDKN1B* の発現量を Digital PCR にて評価したところ、ゲフィチニブを暴露した細胞の一部で共通する遺伝子発現パターンを持つ細

胞が存在することが確認された (図 21)。これは、ゲフィチニブ曝露による影響を捉えたものであると考えられた。遺伝子発現パターンが変化した細胞は様々な曝露時間において見られ、時間依存的な変動を検出するには至らなかった。ゲフィチニブは細胞周期を停止させアポトーシスを誘導する作用機序を持つが、本試験では実際の CTC を想定して細胞周期を揃えずに実験を行なっている。このため、細胞間の細胞周期のばらつきを反映したことが原因と考えられた。また、1 時間のみ曝露した場合においても発現変動が起きた細胞が存在することが確認された。

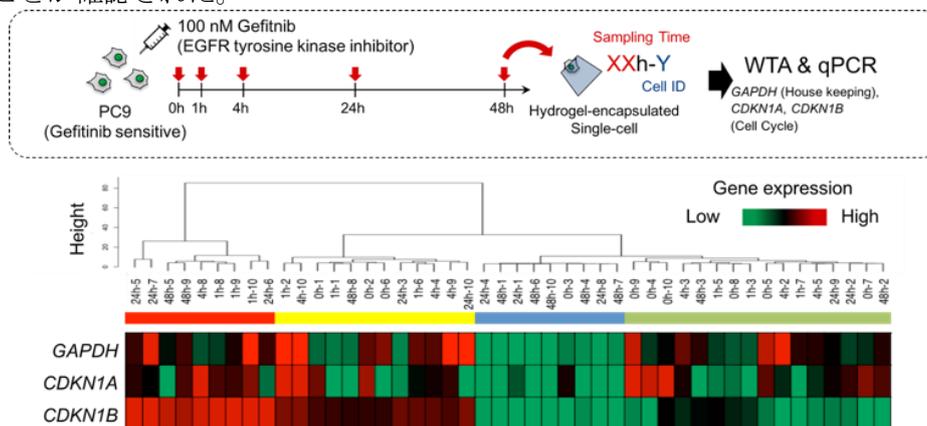


図 21. ゲフィチニブに曝露した肺がん細胞の遺伝子発現の評価
サンプル名は曝露時間と細胞の番号を示す。例: 24h-5 (24 時間曝露群の 5 番目の細胞)

<成果の位置づけ>

本研究では同一の細胞種において薬剤曝露による単一細胞への影響を RNA の発現量にて評価できることを示した。この結果から、同一の患者において薬剤投与による影響を CTC の遺伝子発現から評価できる可能性が示唆された。抗がん剤投与前後の CTC の網羅的な遺伝子情報を指標とすることで、CTC 計数では判断できない、精密な薬剤投与効果を検証する術を提示することができる。得られた薬剤効果予測に基づき、個々の症例により適した薬剤の選択が可能となり、採血のみで個別化医療に繋げることが可能である。

3. 3. 4 CTC の培養検討、株化(駒込病院グループ・農工大グループ)

CTC の培養は世界各国で試験が進められているが、培養株の樹立に至った報告例は極めて少ない。培養株の樹立には、CTC 数が大きく依存するが、現状のプロトコルにおいて採血から CTC の培養に供するまでの時間の長さも培養が困難である要因の 1 つと考えられる。そこで、本プロジェクトでは、CTC 回収の時間短縮を達成できる MCA 方式に基づいた CTC 培養への検討を行った。

【MCA 上からの細胞回収の検討】

<実施内容>

CTC の自動回収・培養技術の開発を目指し、逆流方式による MCA 上からの細胞の回収を検討した。このとき MCA の表面を修飾を行ったものを使用した。また、末梢血からのがん細胞の回収および培養に関しては、従来法である RosetteSep Human CD45 Depletion Cocktail 及び Ficoll-Paque PLUS を用いた密度勾配遠心分離によるがん細胞の回収法を行い、同様な方法で培養を行った。

<成果>

論文報告のある従来法と細胞回収率の比較を行った結果、がん細胞を添加した健常者血液から従来法では 20~30%であったのに対し、本手法では 80%以上の効率で細胞を回収できることが示された (表 5)。このとき、操作に要する時間は、従来法では 90 分程度であったが、本手法では約 20 分であった。さら

表 5 血液からの細胞回収効率の比較

Method	Spiked cells		
	10	100	1000
MCA	8 ± 1	95 ± 4	864 ± 13
密度勾配遠心	3 ± 2	27 ± 18	212 ± 24

に、血液中から回収した細胞の増殖能は、回収操作を行わずに直接ウェルプレートに播種した細胞と同等であった。このことから、本手法は従来法と比較して、細胞回収性能、スループット面で優れていることが示された。

<成果の位置づけ>

CTC の解析・培養に向けて、マイクロ流体デバイス内に濃縮した CTC を外部に取り出すための技術開発が世界的に進められている。これらの多くは CTC の捕捉に利用した抗体とデバイス内壁の結合を酵素消化などで切断することで取り出しを実現するため、CTC へのダメージが懸念されている。一方で、本手法ではこれらの酵素反応無しで細胞を回収できるため、ダメージの少ない細胞回収が可能であると考えられる。さらに、本手法は CTC の培養ディッシュへの回収までの操作を最短で 20 分で完了できる。これは上述の CTC の取り出し機構と比較しても非常に高速であり、細胞へのストレスを低減する上で有効な手法であると考えられる。

【CTC 培養の実施】

<実施内容>

転移性がん患者の末梢血を MCA を用いてフィルトレーションし、がん細胞を MCA 上に捕捉した。その後、MCA 上から細胞を 96 well プレートまたは 48 well プレートに回収した。このとき、一部のサンプルにおいては、蛍光染色により CTC の有無を確認した。取り出した細胞に対しては、検討した培地を用いて培養し、顕微鏡にて経時観察を行うことで細胞の分裂の有無及び生死判定を行った。

3. 4 他細胞種への応用展開(農工大グループ)

本プロジェクトで確立した核酸解析のプラットフォームは、末梢血からの CTC 回収に留まらず、様々な細胞懸濁液からの標的細胞の回収・解析に利用することが可能である。本項では、MCA 方式に基づいた細胞の回収、及び GCM 法による単一細胞の分離・核酸解析への活用として、環境微生物への利用性を検討した。さらに、GCM 法による単一細胞の分離技術をディッシュやスライドガラス上の細胞を標的として、単一細胞を分離できるかについても検証し、応用範囲の拡大を図った。

【環境微生物への応用】

<実施内容>

GCM 法を用いた微生物の単一細胞分離、ゲノム解析、及びハイドロゲル内での微生物培養への応用を試みた。具体的には、モデル微生物として緑藻 *Haematococcus lacustris*、珪藻 *Fistulifera solaris*、*Thalassiosira pseudonana*、*Phaeodactylum tricornutum* 及び出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を標的とし、ハイドロゲルを用いた分離、及び分離した単一細胞からの全ゲノム増幅について検討した。Ni 製の MCA に加え、透過光観察が可能な PET 製 (レーザー加工) の MCA を使用し、各種微生物を捕捉、GCM 法にて分離し、微生物の捕捉効率と単一細胞の分離成功率を評価した。また、分離した単一細胞に対して Repli-g single cell kit (QIAGEN) にて全ゲノム増幅、18SrRNA の配列解析を実施した。さらに、環境微生物の単一細胞分離のモデル実験として、大学構内の池水から採取した環境サンプルに対し、同様の手法にて微生物の単一細胞の SEM 観察を実施した。さらに、GCM 法により分離した単一細胞(出芽酵母)からの培養も試みた。

<成果>

H. lacustris、*F. solaris*、*T. pseudonana*、及び *P. tricornutum* の MCA 上への捕捉効率はそれぞれ 99±1%、92±5%、101±6%、22±4%であった。*P. tricornutum* は紡錘形の形態をとっており、横幅は MCA の孔サイズである 3 μm を下回る。そのため、MCA の孔を通り抜けたため捕捉効率が低下したと考えられた。一方で、GCM 法による分離成功率は、それぞれ 100%、93±3%、97±3%、80±6%であり、微生物種を問わずいづれも高効率な単一細胞分離が可能

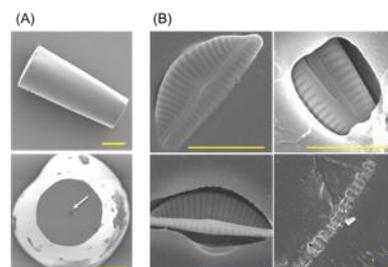


図 22. GCM 法にて分離した環境微生物の SEM 画像
(A) 単一微生物(白矢印)を包埋したハイドロゲル。Scale bar: 100 μm。
(B) 分離した単一微生物の拡大図。

であることが示唆された。また、分離した緑藻 *H. lacustris* 及び珪藻 *F. solaris* の単一細胞からの全ゲノム増幅を行った結果、どちらも次のゲノム解析に十分な収量 (数十 μg) の増幅産物が得られた。18S rDNA 解析の結果、増幅産物がそれぞれの微生物種由来であることを確認した。さらに、池水から採取した環境微生物を同様の手法にて分離できることを確認した (図 22)。また、GCM 法で用いるハイドロゲルの濃度検討により、分離した単一酵母細胞の培養が可能となり、98%の細胞において増殖が確認された。倍加時間は約 2-3 時間であり、通常の培養条件と同等であったことから、本手法が細胞の生育に顕著な影響を与えないことが示唆された。

<成果の位置付け>

近年、環境微生物や腸内細菌叢を対象とした単一細胞ゲノム解析技術の開発が精力的に進められている。それらの技術の多くは FACS を利用したものであり、細菌の遺伝子情報は効率的に得られるものの、細胞の形態に関する情報は得られないといった課題がある。本手法は、同一の細胞に対して形態観察とゲノム解析が可能となるユニークな手法である。今後、単一微生物のトランスクリプトーム解析が可能となることで形態情報と遺伝子機能の結びつけに関する研究に発展できる。

【接着細胞への応用】

<実施内容>

GCM 法の応用として、ディッシュ上に接着した単一細胞の分離を試みた。さらに分離した細胞の遺伝子解析を行い、接着細胞の単一細胞レベルでの遺伝子解析への利用性を評価した。サンプルとして、非小細胞肺癌由来 NCI-H1975、A549 細胞及び子宮頸がん由来 HeLa 細胞(GFP 安定発現株)を使用した。各細胞を細胞培養ディッシュに接着させ、24h 培養した後、PEGDA にて GCM 法を行った。分離した細胞の観察には蛍光顕微鏡を利用した。

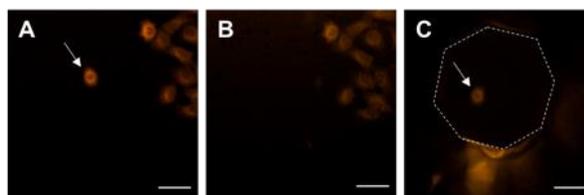


図 23. 接着細胞の分離の様子 (A) ディッシュ上の細胞の観察(白矢印: 標的細胞)、(B) GCM 法後のディッシュの観察、(C) ハイドロゲル上の細胞の観察(白矢印: 分離細胞、破線: ハイドロゲル) Scale bar: 100 μm

また、分離した単一接着細胞について、全ゲノム増幅への適応性を評価した。

<成果>

GCM 法にてディッシュ上に接着した単一細胞を分離することが可能であった (図 23)。また、サイズ分布の異なる NCI-H1975、A549、HeLa 細胞の分離を試みたところ、いずれの細胞もサイズに依存せず 90%程度の効率で単一細胞を分離できることが確認でき、本手法が接着細胞の単一細胞レベルでの分離に有効であることが示された。本手法による単一細胞分離の実証試験として、共培養した HeLa 細胞(GFP 安定発現株)と NCI-H1975 細胞を CellTracker Orange にて染色し、蛍光パターンにて両細胞を識別、GCM にて分離した。分離した単一細胞に対して、全ゲノム増幅及び EGFR Exon 8 領域の PCR を行い、シークエンス解析を実施した。結果、HeLa 細胞からは野生型の塩基配列が検出され、NCI-H1975 細胞からは T790M 変異を有する変異型の塩基配列が検出された (図 24)。以上の結果から、本手法が接着細胞の単一細胞分離及び全ゲノム増幅、シークエンス解析に有効であると判断した。

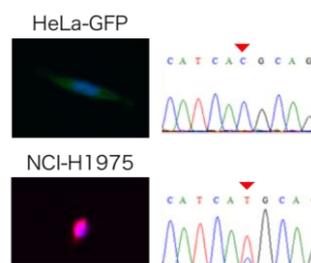


図 24 接着細胞の単一細胞遺伝子解析のモデル実験、分離した単一細胞と EGFR 遺伝子のシークエンス結果

<成果の位置付け>

接着細胞の分離にはレーザーマイクロダイセクションが主に使用されるが、大型の装置が必要であり、また、細胞を播種する基板の材料を限定するため、汎用性に課題があった。GCM 法は通常の培養ディッシュからでも細胞の分離が可能であることから、汎用的に用いることが可能な手法であると考えられる。一方で、現時点では顕微鏡による光照射を行な

っているため、単一細胞を分離するには、細胞の播種密度を下げる必要がある。現在、コンフルエント状態からの単一細胞分離に向けて、3-1-1 で開発した一括ゲル作製装置をより高精度化した光照射システムの開発を進めている。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 30件)

1. Yoshiaki Maeda, Takahiro Toyoda, Masayoshi Tanaka, Takeyuki Mogi, Tomoyuki Taguchi, Takeo Tanaami, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka “DNA Recovery from a Single Bacterial Cell Based on Electrostatic Interaction Using Amine Dendron-modified Magnetic Nanoparticles” *Electrochim. Acta*, 168, 308-312 (2015)
2. Toru Honda, Takayuki Yasuda, Tsuyoshi Tanaka, Koji Hagiwara, Tohru Arai, Tomoko Yoshino "Functional Expression of Full-Length TrkA in the Prokaryotic Host *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 by Using a Magnetosome Display System" *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, 1472-1476 (2015)
3. Toru Honda, Yoshiaki Maeda, Takayuki Yasuda, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino "Novel Designs of Single-chain MHC I/peptide Complex for the Magnetosome Display System" *Protein Eng. Des. Sel.*, 28, 53-58 (2015)
4. Tatsuya Saeki, Yuriko Sugamura, Masahito Hosokawa, Tomoko Yoshino, Tae-kyu Lim, Manabu Harada, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka “Simple and Rapid CD4 Testing Based on Large-field Imaging System Composed of Microcavity Array and Two-dimensional Photosensor” *Biosens. Bioelectron.*, 67, 350-355 (2015)
5. Ryo Negishi, Masahito Hosokawa, Seita Nakamura, Hisashige Kanbara, Masafumi Kanetomo, Yoshihito Kikuhara, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino "Development of the Automated Circulating Tumor Cell Recovery System with Microcavity Array" *Biosens. Bioelectron.*, 67, 438-442 (2015)
6. Shigehiro Yagishita, Yu Fujita, Satoru Kitazono, Ryo Ko, Yusuke Nakadate, Takeshi Sawada, Yuka Kitamura, Tatsu Shimoyama, Yoshiharu Maeda, Fumiya Takahashi, Kazuhisa Takahashi, Tomohide Tamura, Fumiaki Koizumi “Chemotherapy-Regulated microRNA-125–HER2 Pathway as a Novel Therapeutic Target for Trastuzumab-Mediated Cellular Cytotoxicity in Small Cell Lung Cancer” *Mol Cancer Ther.*, 14(6) (2015)
7. Atsushi Morimoto, Toshifumi Mogami, Masaru Watanabe, Kazuki Iijima, Yasuyuki Akiyama, Koji Katayama, Toru Futami, Nobuyuki Yamamoto, Takeshi Sawada, Fumiaki Koizumi, Yasuhiro Koh “High-Density Dielectrophoretic Microwell Array for Detection, Capture, and Single-Cell Analysis of Rare Tumor Cells in Peripheral Blood” *PLoS ONE*, 10(6), e0130418 (2015)
8. Yue Liang, Kyoko Osada, Yoshihiko Sunaga, Tomoko Yoshino, Chris Bowler, Tsuyoshi Tanaka “Dynamic Oil Body Generation in the Marine Oleaginous Diatom *Fistulifera solaris* in Response to Nutrient Limitation as Revealed by Morphological and Lipidomic Analysis” *Algal Res.*, 12, 359-367 (2015)
9. Toru Honda, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino “Stoichiometrically Controlled Immobilization of Multiple Enzymes on Magnetic Nanoparticles by the Magnetosome Display System for Efficient Cellulose Hydrolysis” *Biomacromolecules*, 16, 3863-3868 (2015)
10. Yoshiaki Maeda, Takahiro Toyoda, Takeyuki Mogi, Tomoyuki Taguchi, Takeo Tanaami, Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka “DNA recovery from a single bacterial cell using charge-reversible magnetic nanoparticles” *Colloids Surf. B: Biointerfaces.*, 139, 117-122 (2015)
11. Makoto Yamagishi, Harutaka Katano, Tsunekazu Hishima, Tatsu Shimoyama, Yasunori Ota, Kazumi Nakano, Takaomi Ishida, Seiji Okada, Toshiki Watanabe “Coordinated loss of microRNA group causes defenseless signaling in malignant lymphoma” *Scientific reports*, 5, 17868 (2015)
12. Yoshiaki Maeda, Takuma Tateishi, Yuta Niwa, Masaki Muto, Tomoko Yoshino, David Kisailus, Tsuyoshi Tanaka “Peptide-mediated Microalgae Harvesting Method for Efficient Biofuel Production” *Biotechnol. Biofuels*, 9 (2016)
13. Yusuke Kanemasa, Tatsu Shimoyama, Yuki Sasaki, Takeshi Sawada, Yasushi Omuro, Tsunekazu Hishima, Yoshiharu Maeda “A convenient prognostic score consisting of the Glasgow prognostic score and serum lactate dehydrogenase predicts clinical outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma” *Leukemia & lymphoma*, 57(10), 2460-2463 (2016)

14. Takeshi Sawada, Masaru Watanabe, Yuu Fujimura, Shigehiro Yagishita, Tatsu Shimoyama, Yoshiharu Maeda, Shintaro Kanda, Mayu Yunokawa, Kenji Tamura, Tomohide Tamura, Hironobu Minami, Yasuhiro Koh, Fumiaki Koizumi “Sensitive cytometry based system for enumeration, capture and analysis of gene mutations of circulating tumor cells” *Cancer Sci.* 107(3), 307-314 (2016)
15. Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka, Seita Nakamura, Ryo Negishi, Masahito Hosokawa, Tadashi Matsunaga “Manipulation of a Single Circulating Tumor Cell Using Visualization of Hydrogel Encapsulation toward Single-Cell Whole-Genome Amplification” *Anal. Chem.*, 88(14), 7230-7237 (2016)
16. Yusuke Kanemasa, Tatsu Shimoyama, Yuki Sasaki, Miho Tamura, Takeshi Sawada, Yasushi Omuro, Tsunekazu Hishima, Yoshiharu Maeda “Beta-2 microglobulin as a significant prognostic factor and a new risk model for patients with diffuse large B-cell lymphoma” *Hematological oncology*, doi: 10.1002/hon.2312 (2016)
17. Takeshi Sawada, Jungo Araki, Toshinari Yamashita, Manami Masubuchi, Tsuneko Chiyoda, Mayu Yunokawa, Kumiko Hoshi, Shoichi Tao, Shohei Yamamura, Shouki Yatsushiro, Kaori Abe, Masatoshi Kataoka, Tatsu Shimoyama, Yoshiharu Maeda, Katsumasa Kuroi, Kenji Tamura, Tsuneo Sawazumi, Hironobu Minami, Yoshihiko Suda, Fumiaki Koizumi “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)
18. Yusuke Kanemasa, Tatsu Shimoyama, Yuki Sasaki, Miho Tamura, Takeshi Sawada, Yasushi Omuro, Tsunekazu Hishima, Yoshiharu Maeda “Central nervous system relapse in patients with diffuse large B cell lymphoma: analysis of the risk factors and proposal of a new prognostic model” *Annals of Hematology*, 95(10), 1661-1669 (2016)
19. Yusuke Kanemasa, Tatsu Shimoyama, Yuki Sasaki, Miho Tamura, Takeshi Sawada, Yasushi Omuro, Tsunekazu Hishima, Yoshiharu Maeda “The impacts of initial and relative dose intensity of R-CHOP on outcomes of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma.” *Leukemia & lymphoma* 58(3), 736-739 (2016)
20. Yoshiro Nakahara, Yusuke Takagi, Yukio Hosomi, Akiko Kagei, Tomohiro Yamamoto, Takeshi Sawada, Makiko Yomota, Yusuke Okuma, Shinichiro Mikura, Tatsuru Okamura “Noninvasive monitoring of the genetic evolution of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer by analyzing circulating tumor DNA during combination chemotherapy with gefitinib and pemetrexed or S-1” *OncoTargets Ther.*, 9, 5287–5295 (2016)
21. Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka, Seita Nakamura, Ryo Negishi, Nozomi Shionoiri, Masahito Hosokawa, Tadashi Matsunaga “Evaluation of Cancer Cell Deformability by Microcavity Array” *Anal. Biochem.*, 520, 16–21 (2017)
22. Masaki Muto, Daisuke Nojima, Liang Yue, Hideyuki Kanehara, Hideaki Naruse, Asuka Ujiro, Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka “Potential of Water Surface-Floating Microalgae for Biodiesel Production: Floating-Biomass and Lipid Productivities” *J. Biosci. Bioeng.*, 123, 314-318 (2017)
23. Kyoko Osada, Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Daisuke Nojima, Chris Bowler, Tsuyoshi Tanaka “Enhanced NADPH Production in the Pentose Phosphate Pathway Accelerates Lipid Accumulation in the Oleaginous Diatom *Fistulifera solaris*” *Algal Res.*, 23, 126-134 (2017)
24. Yoshiaki Maeda, Hironori Dobashi, Yui Sugiyama, Tatsuya Saeki, Tae-kyu Lim, Manabu Harada, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka “Colony fingerprint for discrimination of microbial species based on lensless imaging of microcolonies” *PLoS ONE*, 12(4), e0174723 (2017)
25. Tomoko Yoshino, Kaori Takai, Ryo Negishi, Tatsuya Saeki, Hisashige Kanbara, Yoshihito Kikuhara, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka “Rapid imaging and detection of circulating tumor cells using a wide-field fluorescence imaging system” *Anal. Chim. Acta*, 969, 1-7 (2017)
26. Daisuke Nojima, Yuki Ishizuka, Masaki Muto, Asuka Ujiro, Fumito Kodama, Tomoko Yoshino, Yoshiaki Maeda, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka “Enhancement of Biomass and Lipid Productivities of Water Surface-Floating Microalgae by Chemical Mutagenesis” *Mar. Drugs*, 15, 151 (2017)
27. Atsushi Arakaki, Takuya Matsumoto, Takuma Tateishi, Mitsufumi Matsumoto, Daisuke

- Nojima, Yoshino Tomoko, Tsuyoshi Tanaka “UV-C Irradiation Accelerates Neutral Lipid Synthesis in the Marine Oleaginous Diatom *Fistulifera solaris*.” *Bioresour. Technol.* In press (2017)
28. Tomoko Yoshino, Natsumi Kakunaka, Yue Liang, Yasuhito Ito, Yoshiaki Maeda, Tatsuhiro Nomaguchi, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka “Production of ω3 Fatty Acids in Marine Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain NKBG 15041c via Genetic Engineering” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101, 6899–6905 (2017)
 29. Tsuyoshi Tanaka, Takashi Yabuuchi, Yoshiaki Maeda, Daisuke Nojima, Mitsufumi Matsumoto, Tomoko Yoshino “Production of Eicosapentaenoic Acid by High Cell Density Cultivation of the Marine Oleaginous Diatom *Fistulifera solaris*” *Bioresour. Technol.*, 245, 567-572 (2017)
 30. Satomi Yagi, Yasuhiro Koh, Hiroaki Akamatsu, Kuninobu Kanai, Atsushi Hayata, Nahomi Tokudome, Keiichiro Akamatsu, Katsuya Endo, Seita Nakamura, Masayuki Higuchi, Hisashige Kanbara, Masanori Nakanishi, Hiroki Ueda, Nobuyuki Yamamoto “Development of an automated size-based filtration system for isolation of circulating tumor cells in lung cancer patients” *PLoS ONE*, 12(6), e0179744 (2017)

(2)その他の著作物（総説、書籍など）

1. 澤田 武志, 小泉 史明 「Circulating tumor cells (CTC) —測定技術から分離解析技術への発展」 *がん分子標的治療*, 13(1), 85-91 (2015)
2. 小泉 史明, 澤田 武志 「血中がん細胞診断」 *細胞*, ニュー・サイエンス社, 7月号 (2016)
3. Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino, Yoshiaki Maeda, Tatsuya Saeki, Ryo Negishi, Reito Iwata, Atsushi Kogiso, Hironori Dobashi, Tadashi Matsunaga “High-Content Analysis of Single Cells Using a Wide-Field Imaging Sensor” *ECS Trans*, 75, 139-146 (2016)
4. 吉野知子, 根岸諒, 松永是 「マイクロキャピティアレイ方式に基づいた血中循環腫瘍細胞の解析技術」 *バイオサイエンスとインダストリー*, 74(2) (2016)
5. Yoshiaki Maeda, Daisuke Nojima, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka “Structure and Properties of Oil Bodies in Diatoms” *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 372(1728):20160408 (2017)
6. Daisuke Nojima, Tomomi Nonoyama, Tsuyoshi Tanaka “Lipid droplet-associated proteins in diverse microalgae revealed by proteomic analysis” *Perspectives in Phycology*, 4(1), 25-32 (2017)
7. 田中 剛, 小木曾 淳 「エリアイメージセンサの遺伝子・細胞診断への応用」 *化学工業*, 68(2), 23-28 (2017)
8. 根岸 諒, 吉野 知子 「単一細胞アレイ化技術を用いた血中循環腫瘍細胞検出法の開発」 *Chemical Sensors*, 33(1) (2017)
9. 根岸 諒, 吉野知子 「血中循環腫瘍細胞の回収技術と遺伝子解析への応用」 *PHARM STAGE*, 17(2), 29-36 (2017)
10. 根岸 諒, 吉野 知子 「マイクロキャピティ方式による CTC の回収と遺伝子解析への応用」 *リキッドバイオプシー—体液中腫瘍マーカーの検出・解析技術—*, シーエムシー出版刊, 71-80 (2017)
11. 根岸 諒, 吉野 知子 「シングルゲノム解析に向けた全ゲノム増幅法」 *実験医学別冊 最強のステップ UP シリーズシングルセル 解析プロトコール わかる！使える！ 1 細胞特有の実験のコツから最新の応用まで*, 羊土社, 108-122 (2017)

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 15 件、国際会議 7 件)

1. Tomoko Yoshino (国立大学法人 東京農工大学), Kinetic analysis of intracellular molecules in microalgae by in vivo cell imaging, Institute for Protein Research (IPR) International Seminar, Osaka University, 2014/10/24
2. Tsuyoshi Tanaka (国立大学法人 東京農工大学), Electrochemical inactivation of bacteria and viruses and the elucidation of action mechanisms, 10th International Symposium on Electrochemical Micro & Nanosystem Technologies, Okinawa, 2014/11/8

3. Tomoko Yoshino (国立大学法人 東京農工大学), Single cell biosensing technology for circulating tumor cell analysis, UK-Japan Workshop on BioSensing Technologies for the Innovative Healthcare, Tokyo University of Agricultural and Technology, 2014/12/2
4. 吉野 知子 (国立大学法人 東京農工大学)、細胞マイクロアレイを利用した血中循環腫瘍細胞の解析技術の開発、化学工学会 第 80 年会、芝浦工業大学、2015/3/20
5. 上原 寿茂 (日立化成株式会社)、血中循環腫瘍細胞の濃縮装置の開発、日本化学会 第 95 春季年会、日本大学、理工学部船橋キャンパス 薬学部、2015/3/29
6. 吉野 知子 (国立大学法人 東京農工大学)、Microcavity array 技術に基づく単一細胞解析と医療分野への展開、日立化成株式会社 講演会、2015/5/12
7. 田中 剛 (国立大学法人 東京農工大学)、2次元フォトセンサを利用した新たなバイオ分析手法の確立、“未来へのバイオ技術”勉強会「マイクロエンジニアリング」、東京、2015/5/11
8. 田中 剛 (国立大学法人 東京農工大学)、2次元フォトセンサを用いた遺伝子診断・細胞診断用バイオセンシングシステムの開発、2015年電気化学秋季大会・第59回化学センサ研究発表会、埼玉工業大学、2015/9/11
9. Tsuyoshi Tanaka (国立大学法人 東京農工大学), High throughput single-cells analysis based on lens-less imaging., ACCS 2015 : The 11th Asian Conference on Chemical Sensors, Penang, Malaysia, 2015/11/15
10. Tomoko Yoshino (国立大学法人 東京農工大学), Development of techniques for single circulating tumor cell analysis based on microcavity array, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Hawaii Convention Center, USA, 2015/12/18
11. 松永 是 (国立大学法人 東京農工大学)、細胞の電気化学、電気化学会第 83 回大会、大阪大学、2016/3/29
12. 澤田 武志(がん・感染症センター都立駒込病院)、CTC 研究開発状況、CTC 研究フォーラム、ベルサール東京日本橋、2016/5/20
13. *Tomoko Yoshino (国立大学法人 東京農工大学), Towards single-cell genome analysis of circulating tumor cells based on microcavity array, World Automation Congress 2016 Japan Satellite Session, Himeji JIBASAN Building, 4F, Rm#401, Himeji, Hyogo, Japan, 2016/8/6
14. *Tsuyoshi Tanaka (国立大学法人 東京農工大学), High-Content Analysis of Single Cells Using a Wide-Field Imaging Sensor, 7th PRiME 2016, HAWAII CONVENTION CENTER, 2016/10/5
15. 吉野知子 (国立大学法人 東京農工大学)、細胞マイクロアレイ技術を活用した血中循環腫瘍細胞の単一細胞解析、先端医工学研究センター2016年第3回学術交流会、姫路、2016/10/14
16. 吉野知子 (国立大学法人 東京農工大学)、血中循環腫瘍細胞の回収技術と遺伝子解析への応用、技術情報協会セミナー：がんの早期診断を可能にする最新のリキッドバイオプシー技術、東京、2016/11/11
17. 吉野知子 (国立大学法人 東京農工大学)、血中循環腫瘍細胞の遺伝子解析技術の開発、JMAC 第 94 回ワーキンググループ会議、東京、2016/12/21
18. 吉野知子(国立大学法人 東京農工大学)、血中循環腫瘍細胞の核酸解析プラットフォームの構築、早稲田大学特別ゼミナール、台場フロンティアビル 2F 会議室、東京、2017/6/11
19. *Tomoko Yoshino (国立大学法人 東京農工大学), Single cell analysis of diatoms based on microcavity array system, The 4th International Conference “Molecular Life of Diatoms”, Ikuta Shrine Hall, 2017/7/12
20. 田中剛(国立大学法人 東京農工大学)、病原性微生物の新規バイオイメージ診断法の開発、第 53 回学際領域セミナー 医工連携:隠れたニーズとシーズを探る、明電舎大崎会館、東京、2017/11/2
21. 松永是、シングルセル解析の最近の話題-血液中のがん細胞の検出への応用、第 83 回薬市フォーラム霜月講演会、電気化学会会議室、東京、2017/11/17
22. 吉野知子(国立大学法人 東京農工大学)、単一 CTC の遺伝子発現解析を目指したプラ

ットフォーム構築、第2回 Liquid Biopsy 研究会、京王プラザホテル、2018/1/20

② 口頭発表 (国内会議 16 件、国際会議 6 件)

1. 前田 義昌 (国立大学法人 東京農工大学)、太田 健人、豊田 貴博、茂木 豪介、田口 朋之、田名網 健雄、羽田 聖治、松永 是、田中 剛、単一細胞高集積化デバイスを用いた細胞外分泌性分子検出技術の開発、電気化学会第 82 回大会、横浜国立大学、神奈川県、2015/3/17
2. LIANG Yue (国立大学法人 東京農工大学), MUKAI Shoichiro, ANDO Masahiro, YOSHINO Tomoko, HAMAGUCHI Hiro-o, TANAKA Tsuyoshi, “Imaging analysis of biomolecules in a living microalga cell using confocal Raman microspectroscopy” 日本化学会 第 95 春季年会, 日本大学, 千葉県, 2015/3/28
3. Yue Liang (国立大学法人 東京農工大学), Kyoko Osada, Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Chris Bowler, Tsuyoshi Tanaka “Dynamic oil body generation in the marine oleaginous diatom *Fisturlifera solaris* following nutrient-limitation revealed by morphological and lipidomic analysis”, *Molecular Life of Diatoms 2015*, Seattle, USA, 2015/7/7
4. 高井 香織 (国立大学法人 東京農工大学)、吉野 知子、根岸 諒、佐伯 達也、前田 義昌、松永 是、田中 剛、血中循環腫瘍細胞の迅速かつ高精度検出に向けた広視野一括撮像システムの構築、2015 年電気化学秋季大会・第 59 回化学センサ研究発表会、埼玉工業大学、2015/9/11
5. Yoshiaki Maeda (国立大学法人 東京農工大学), Takahiro Toyoda, Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka, Single Bacterial Cell Detection based on the Efficient DNA Recovery Technique with Charge-reversible Magnetic Nanoparticles, 日本化学会 第 96 春季年会 (2016), 同志社大学 京田辺キャンパス, 2016/3/24
6. 根岸 諒 (国立大学法人 東京農工大学)、中村 清太、松永 是、田中 剛、吉野 知子、単一細胞解析に向けた光硬化性ハイドロゲルを利用した細胞単離方法の開発、日本化学会 第 96 春季年会、同志社大学 京田辺キャンパス、2016/3/27
7. 前田 義昌 (国立大学法人 東京農工大学)、土橋 弘典、佐伯 達也、林 泰圭、原田 学、松永 是、吉野 知子、田中 剛、マイクロコロニーのレンズレスイメージングに基づく簡易・迅速な菌種判別法の開発、電気化学会第 83 回大会、大阪大学、2016/3/29
8. Takeshi Sawada (がん・感染症センター都立駒込病院), Atsushi Morimoto, Tatsu Shimoyama, Toshinari Yamashita, Toshifumi Mogami, Kazuki Iijima, Mayu Yunokawa, Shintaro Kanda, Yasuyuki Akiyama, Koji Katayama, Masaru Watanabe, Yasuhiro Koh, Kenji Tamura, Tomohide Tamura, Toru Futami and Fumiaki Koizumi, Dielectrophoretic microwell array system for detection circulating tumor cells in patients with solid tumors and single cell analysis of detected circulating tumor cells, AACR 2015, Philadelphia, 2015/4/20
9. 前田 義昌 (国立大学法人 東京農工大学)、土橋 弘典、杉山 由依、佐伯 達也、林 泰圭、原田 学、松永 是、吉野 知子、田中 剛、レンズレスイメージングにより取得したコロニーフィンガープリントに基づく *Staphyrococcus* 属の菌種判別、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、石川県立音楽堂、2016/9/8
10. Takeshi Sawada (がん・感染症センター都立駒込病院), Masako Takatsu, Tomoko Suzuki, Mari Akimoto, Atsushi Morimoto, Yusuke Kanemasa, Tatsu Shimoyama, Yasushi Omuro, Toshinari Yamashita, Yoshiharu Maeda, Toru Futami, Fumiaki Koizumi, Circulating tumor cells as a potential sample for proof of concept studies in drug development, 日本癌学会 2015、名古屋, 2015/10/9
11. Tomoko Yoshino (国立大学法人 東京農工大学) “Production of functional biomaterials using genetically engineered microbes”, Malaysia-Japan Joint international conference, Kuala Lumpur, Malaysia, 2016/9/4
12. Tomoko Yoshino (国立大学法人 東京農工大学), HIGH-THROUGHPUT SINGLE-CELL MANIPULATION TOWARDS CIRCULATING TUMOR CELL SEQUENCING, International Conference on Single Cell Research 2016, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, 2016/11/17
13. 根岸 諒 (国立大学法人 東京農工大学)、岩田 怜士、松永 是、田中 剛、吉野 知子、

- Development of single-cell genetic analysis system for circulating tumor cells based on microcavity array、日本化学会第 97 春季年会、慶應義塾大学、日吉キャンパス、2017/3/18
14. 石川 万智 (国立大学法人 東京農工大学)、田口 朋之、蓼沼 崇、吉野 知子、前田 義昌、松永 是、田中 剛、シグナリングアレイプローブを用いた病原性微生物の簡易遺伝子検出法の開発、電気化学会第 84 回大会、首都大学東京 南大沢キャンパス、2017/3/27
 15. 杉山 由依 (国立大学法人 東京農工大学)、土橋 弘典、吉野 知子、前田 義昌、林 泰圭、原田 学、松永 是、田中 剛、コロニーフィンガープリントに基づく簡易・迅速な黄色ブドウ球菌の判別、電気化学会第 84 回大会、首都大学東京 南大沢キャンパス、2017/3/27
 16. Yoshiaki Maeda (国立大学法人 東京農工大学), Tatsuhiro Nomaguchi, Tomoko Yoshino, Toru Asahi, Tsuyoshi Tanaka “Biased contribution of the homoeologous subgenomes to lipid metabolisms in the marine alloidiploid diatom *Fistulifera solaris*”, The 11th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, University of Hawaii at Manoa, Hawaii, USA, 2017/5/21
 17. Tatsuhiro Nomaguchi ((国立大学法人 東京農工大学)), Yoshiaki Maeda, Tomoko Yoshino, Toru Asahi, Chris Bowler, Tsuyoshi Tanaka “Homoeolog expression bias in allopolyploid oleaginous marine diatom *Fistulifera solaris*”, The 73rd Fujihara Seminar International Conference “Molecular Life of Diatoms”, Ikuta Shrine Hall, Kobe, Japan, 2017/7/9
 18. 前田 義昌 (国立大学法人 東京農工大学)、太田 健人、畠山 慶一、吉野 知子、田中 剛、細胞高集積化デバイスを用いたがん細胞分泌タンパク質のシングルセル解析、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、東京大学、弥生キャンパス、2017/9/7
 19. 小木曾 淳 (国立大学法人 東京農工大学)、高林 知弘、吉野 知子、前田 義昌、林 泰圭、原田 学、松永 是、田中 剛、レンズレスイメージングに基づく血中循環腫瘍細胞の培養モニタリングシステムの開発、第 62 回化学センサ研究発表会、長崎大学、2017/9/11
 20. 根岸 諒 (国立大学法人 東京農工大学)、高井 香織、松永 是、田中 剛、吉野 知子、血中循環腫瘍細胞の遺伝子変異検出に向けたハイスループット単一細胞単離システムの構築、第 62 回化学センサ研究発表会、長崎大学、2017/9/11
 21. 小木曾 淳 (国立大学法人 東京農工大学)、コロニーフィンガープリントの機械学習に基づく真正細菌の高精度判別、電気化学会第 85 回大会、東京理科大学、2018/3/9
 22. 石川 万智 (国立大学法人 東京農工大学)、微生物ゲノム DNA の検出に向けたシグナリングアレイの開発、電気化学会第 85 回大会、東京理科大学、2018/3/9

③ ポスター発表 (国内会議 12 件、国際会議 15 件)

1. Kaori Takai, Ryo Negishi, Tatsuya Saeki, Hisashige Kanbara, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino, Investigation of the wide-field fluorescent imaging system using a 2D photosensor toward rapid detection of circulating tumor cells, 10th International Symposium on Electrochemical Micro & Nanosystem Technologies, Okinawa, 2014/11/6
2. Ryo Negishi, Seita Nakamura, Tatsuya Saeki, Masahito Hosokawa, Hisashige Kanbara, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino, A simple method for single cell manipulation using photopolymerizable hydrogel and microcavity array, 10th International Symposium on Electrochemical Micro & Nanosystem Technologies, Okinawa, 2014/11/6
3. 根岸 諒 (国立大学法人 東京農工大学)、中村 清太、松永 是、田中 剛、吉野 知子、光硬化性ハイドロゲルを利用した単一細胞ソーティング技術の開発、第 9 回バイオ関連化学シンポジウム、熊本大学、黒髪南地区キャンパス、2015/9/11
4. 鈴木 智子 (がん・感染症センター都立駒込病院)、澤田 武志、森本 篤史、下山 達、洪 泰浩、田村 研治、田村 友秀、二見 達、岡野 栄之、小泉 史明、次世代シーケンサーによる血中循環腫瘍細胞(CTC)の一細胞変異解析、日本人類遺伝学会第 60 回大会、京王プラザホテル(新宿)、2015/10/16
5. 太田 健人 (国立大学法人 東京農工大学)、前田 義昌、豊田 貴博、松永 是、田中 剛、単一細胞高集積化デバイスを用いた細胞外分泌性サイトカインの免疫測定技術の開発、第 67 回日本生物工学会、鹿児島、2015/10/26

6. Hironori Dobashi (国立大学法人 東京農工大学), Tatsuya Saeki, Yoshiaki Maeda, Tae-kyu Lim, Manabu Harada, Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka, Rapid identification of bacterial microcolonies based on lens-less imaging, ACCS 2015 : The 11th Asian Conference on Chemical Sensors, Penang, Malaysia, 2015/11/15
7. 吉野 知子 (国立大学法人 東京農工大学)、根岸 諒、田中 剛、Microcavity array 技術に基づく血中循環腫瘍細胞の分離及び核酸解析への応用、化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 32 回研究会 (32nd CHEMINAS)、北九州国際会議場、2015/11/27
8. Ryo Negishi (国立大学法人 東京農工大学), Seita Nakamura, Tatsuya Saeki, Masahito Hosokawa, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino, Single cancer cell isolation on the microcavity array platform using photopolymerizable hydrogel, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Hawaii Convention Center, USA, 2015/12/18
9. Kaori Takai (国立大学法人 東京農工大学), Ryo Negishi, Tatsuya Saeki, Yoshiaki Maeda, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino, Rapid circulating tumor cell detection based on wide-field fluorescent imaging system using 2D photosensor, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, Hawaii, Convention Center, USA, 2015/12/18
10. Takeshi Sawada (がん・感染症センター都立駒込病院), Jungo Araki, Toshinari Yamashita, Manami Masubuchi, Tsuneko Chiyoda, Mayu Yunokawa, Kumiko Hoshi, Shoichi Tao, Shohei Yamamura, Shouki Yatsushiro, Kaori Abe, Masatoshi Kataoka, Tatsu Shimoyama, Yoshiharu Maeda, Katsumasa Kuroi, Kenji Tamura, Tsuneo Sawazumi, Hironobu Minami, Yoshihiko Suda, Fumiaki Koizumi, Prognostic impact of CTC detected using a novel fluidic cell microarray chip CTC detection system in patients with breast cancer, AACR 107th Annual Meeting 2016, USA, 2016/4/17
11. Satomi Yagi(日立化成株式会社), Yasuhiro Koh, Hiroaki Akamatsu, Woong Kim, Ayaka Tanaka, Kuninobu Kanai, Atsushi Hayata, Ryota Shibaki, Masayuki Higuchi, Hisashige Kanbara, Takashi Kikuchi, Keiichiro Akamatsu, Masanori Nakanishi, Hiroki Ueda, Nobuyuki Yamamoto, Development of an automated device for size-based enrichment and isolation of circulating tumor cells in lung cancer patients, AACR 107th Annual Meeting 2016, USA, 2016/4/18
12. Tatsu Shimoyama (がん・感染症センター都立駒込病院), Takeshi Sawada, Mari Akimoto, Yuka Sasaki, Hiroaki Fujimori, Yoshinobu Ishikawa, Tadashi Okawara, Tetsumi Irie, Takeji Takamura, Kenji Matsuno, Kengo Inoue, Mitsuko Masutani, Fumiaki Koizumi, Identification of a novel compound, MO2455, that induces poly(ADP-ribose) (PAR) accumulation and inhibits the growth of cancer cells in vitro and in vivo, AACR 107th Annual Meeting 2016, USA, 2016/4/20
13. Yoshiaki Maeda (国立大学法人 東京農工大学), Hironori Dobashi, Tatsuya Saeki, Tae-kyu Lim, Manabu Harada, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino, Tsuyoshi Tanaka, Colony fingerprinting toward rapid detection and classification of microbial species, Biosensors 2016, Gotenburg, Sweden, 2016/5/25
14. 太田 健人 (国立大学法人 東京農工大学)、前田 義昌、畠山 慶一、吉野 知子、田中 剛、単一細胞高集積化デバイス上におけるがん細胞分泌タンパク質の免疫測定法の開発、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、石川県立音楽堂、2016/9/7
15. 高井 香織 (国立大学法人 東京農工大学)、根岸 諒、田中 剛、松永 是、吉野 知子、マルチ光照射システムを用いた単一細胞のゲルマニピュレーション技術の開発、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、石川県立音楽堂、2016/9/8
16. Reito Iwata (国立大学法人 東京農工大学), Ryo Negishi, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino, Copy Number Variation Analysis of Circulating Tumor Cells at a Single Cell Level Based on Hydrogel Encapsulation, 7th PRiME 2016, HAWAII, CONVENTION CENTER, USA, 2016/10/4
17. Atsushi Kogiso (国立大学法人 東京農工大学), Yoshiaki Maeda, Hironori Dobashi, Tomoko Yoshino, Tadashi Matsunaga, Tsuyoshi Tanaka, Development of a Novel Cell Monitoring

- System Based on Lens-Less Imaging Toward Cultivation of Circulating Tumor Cells, 7th PRiME 2016, HAWAII CONVENTION CENTER, USA, 2016/10/4
18. Ryo Negishi (国立大学法人 東京農工大学), Reito Iwata, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino, Hydrogel-based single-cell manipulation towards genetic analysis of single circulating tumor cell, International Conference on Single Cell Research 2016, Ito International Research Center, Japan, 2016/11/16
 19. Kaori Takai (国立大学法人 東京農工大学), Ryo Negishi, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino, Simultaneous photopolymerization of circulating tumor cells based on multiple light projection, International Conference on Single Cell Research 2016, Ito International Research Center, JAPAN, 2016/11/16
 20. Takeshi Sawada (がん・感染症センター都立駒込病院), Atsushi Morimoto, Yasuyuki Akiyama, Tomoko Suzuki, Yukiko. Hosomi, Yusuke Okuma, Hirotochi Horio, Manabu Harada, Sadao Oyama, Chiharu Ogawa, Toshinari Yamashita, Yoshiharu Maeda, Tatsu Shimoyama, Tsunekazu Hishima, Fumiaki Koizumi, Mutational analysis of primary tumors and single circulating tumor cells captured by a novel dielectrophoretic microwell array system in metastatic lung cancer, oral cancer and breast cancer patients, 28th EORTC-NCI-AACR symposium, Germany, 2016/11/29
 21. 高林 知弘 (国立大学法人 東京農工大学)、根岸 諒、上原 寿茂、菊原 得仁、小田切 大平、遠藤 勝也、小泉 史明、下山 達、澤田 武志、田中 剛、松永 是、吉野 知子、マイクロキャビティアレイ方式に基づく血中循環腫瘍細胞の自動回収・培養技術の開発、化学とマイクロ・ナノシステム学会第 35 回研究会、東京工業大学、大岡山キャンパス、2017/5/22
 22. 根岸 諒 (国立大学法人 東京農工大学)、高井 香織、田中 剛、松永 是、吉野 知子、単一細胞の高効率分離を目指したマルチ光照射システムの構築、化学とマイクロ・ナノシステム学会第 35 回研究会、東京工業大学、大岡山キャンパス、2017/5/23
 23. 茅 逸皓 (国立大学法人 東京農工大学)、根岸 諒、田中 剛、吉野 知子、光硬化性ハイドロゲルを利用した単一微生物の単離・培養法の開発、東京工業大学、化学とマイクロ・ナノシステム学会第 35 回研究会、東京工業大学、大岡山キャンパス、2017/5/23
 24. 茅 逸皓 (国立大学法人 東京農工大学)、根岸 諒、田中 剛、吉野 知子、Hydrogel-based cell manipulation 法に基づく環境微生物のシングルセルゲノム解析技術の開発、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、東京大学 弥生キャンパス、2017/9/8
 25. 根岸 諒 (国立大学法人 東京農工大学)、小泉 史明、澤田 武志、下山 達、松永 是、田中 剛、吉野 知子、Microcavity array 方式に基づく血中循環腫瘍細胞の迅速な遺伝子発現解析、第 69 回生物工学会大会、早稲田大学、2017/9/13
 26. 前田 義昌、太田 健人、畠山 慶一、吉野 知子、田中 剛、細胞高集積化デバイスを用いた単一がん細胞からの分泌タンパク質の免疫測定、第 69 回日本生物工学会、早稲田大学、東京、2017/9/13
 27. Yihao Mao, Ryo Negishi, Tsuyoshi Tanaka, Tomoko Yoshino, Techniques for Genomic and Morphological Characterization of Environmental Microbes at Single-Cell Level via Gel-based Cell Manipulation, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions 2017, Nagoya University, Nagoya, Japan, 2017/11/30

(4) 知財出願

① 国内出願 (8 件)

1. 《血中希少細胞含有液の製造方法、松永達也、遠藤勝也、日立化成株式会社、2014 年 11 月 5 日、特願 2014-225043》
2. 《生物物質捕獲システム、高井健次、ツァイ アンソニー エイチ、八木理美、松永達也、日立化成株式会社、2015 年 8 月 21 日、特願 2015-164060》
3. 《抗癌剤の評価方法、森本篤史、小泉史明、澤田武志、東ソー株式会社、東京都、2016 年 1 月 19 日、特願 2016-8264》

4. 《希少細胞の単離方法及び遺伝子解析方法、伊藤明子、上原寿茂、小田切大平、中村清太、日立化成株式会社、2016年3月16日、特願2016-52441》
5. 《金属フィルター、血液中の癌細胞を濃縮する方法、鈴木崇裕、上原寿茂、菊原得仁、鈴木恭介、日立化成株式会社、2016年10月27日、特願2016-210888》

②海外出願 (7件)

1. 《細胞単離方法及び細胞捕捉フィルタ、吉野知子、田中剛、松永是、根岸諒、上原寿茂、中村清太、国立大学法人東京農工大学、日立化成株式会社 2015年10月29日、PCT/JP2015/080588》
2. 《細胞捕捉デバイス、細胞捕捉フィルタ、細胞捕捉装置、及び細胞捕捉デバイスの製造方法、菊原得仁、小田切大平、古田土明夫、金友正文、日立化成株式会社、2015年3月25日、PCT/JP2015/059208》
3. 《血中循環癌細胞捕獲方法、高井健次、ツァイ アンソニー エイチ、八木理美、松永達也、日立化成株式会社、2015年7月30日、PCT/JP2015/071636》
4. 《血中希少細胞捕獲方法、高井健次、ツァイ アンソニー エイチ、八木理美、松永達也、日立化成株式会社、2015年7月30日、PCT/JP2015/071637》
5. 《細胞捕捉デバイス、古田土明夫、菊原得仁、小田切大平、金友正文、日立化成株式会社、2015年10月5日、PCT/JP2015/078211》
6. 《細胞捕捉方法、特定細胞捕捉済デバイスの製造方法、及び特定細胞含有溶液の製造方法、八木理美、高井健次、菊原得仁、ツァイ アンソニー エイチ、日立化成株式会社、2015年8月28日、PCT/JP2015/074457》
7. 《生体物質捕獲用フィルター及び生体物質捕獲システム、高井健次、八木理美、松永達也、鈴木崇裕、ツァイ アンソニー エイチ、日立化成株式会社、2015年8月31日、PCT/JP2015/074768》

(5)受賞・報道等

①受賞

1. Kaori Takai (国立大学法人 東京農工大学), Distinguished Poster Award 10th International Symposium on Electrochemical Micro & Nanosystem Technologies, Okinawa, 2014/11/5-11/8
2. 根岸 諒 (国立大学法人 東京農工大学)、第9回バイオ関連化学シンポジウム、熊本大学工学部 黒髪南地区キャンパス、熊本、2015/9/10-9/12
3. 根岸諒 (国立大学法人 東京農工大学)、第9回バイオ関連化学シンポジウム・ポスター賞、日本化学会—生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、熊本、2015/9/1
4. 高井香織 (国立大学法人 東京農工大学)、優秀ポスター賞、生体機能関連化学部会、バイオテクノロジー部会、石川県立音楽堂、2016/9/7-9/9
5. Kaori Takai (国立大学法人 東京農工大学), Poster Award、International Conference on Single Cell Research、Ito International Research Center, 16 - 17th of November, 2016
6. 澤田武志 (がん・感染症センター都立駒込病院), Travel Grant, 28th EORTC-NCI-AACR symposium, ドイツ, 2016/11/2
7. *根岸諒 (国立大学法人 東京農工大学)、優秀研究賞、化学とマイクロ・ナノシステム学会第35回研究会、東京工業大学、大岡山キャンパス、2017/5/22-5/23
8. 茅 逸皓 (国立大学法人 東京農工大学)、Poster Award、IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions 2017、Nagoya University、2017/11/30

②マスコミ (新聞・TV等) 報道

1. 日経産業新聞、血液中のがん細胞検出 東京農工大、早期発見導く、2016/12/22

2. 日経産業新聞、分泌物、細胞ごとに解析 東京農工大 がん早期発見めざす、2017/1/19

③その他

1. マイクロフィルター方式による血中循環がん細胞（CTC）の捕捉・濃縮技術の開発、国内、JSTアウトリーチ発表会（彩の国ビジネスアリーナ 2016）、2016/1/27-1/28

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

- ・ 日立化成は米国テキサス大 MD アンダーソンがんセンターで日立化成システムを使用した肺癌および乳癌患者の CTC のがん遺伝子解析の臨床的有効性に関する大規模臨床試験を実施中。

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2015/3/29	医工連携を目指した細胞解析技術—日本化学会特別講演	日本大学理工学部船橋キャンパス	100人	血中循環腫瘍細胞の濃縮装置の開発
2015/9/18	国立精神・神経医療研究センター—東京農工大シンポジウム	東京農工大学	50人	細胞マイクロアレイ技術を利用した単一細胞解析と医療分野への展開
2016/11/4	「東京農工大学 共同研究シーズ説明会 2016」～獣医系・生命工学系～	東京農工大学	100人	Microcavityarray 技術に基づく単一細胞の核酸解析技術の開発
2016/12/2~4	日米先端科学(JFoS)シンポジウム	Arnold and Mabel Beckman Center	70人	Technology for single cell genetic analysis of circulating tumor cells
2017/6/11	朝日研究室、特別ゼミナール	早稲田大学	20人	学術交流
2018/3/9	電気化学会第 85 回大会シンポジウム 特別企画 「細胞解析技術のニューフロンティア」	東京理科大学葛飾キャンパス、東京	100人	研究代表者が企画責任者の一人として実施し、細胞解析技術に関するシンポジウムを開催。

§ 6 最後に

本プロジェクトは、研究領域の戦略目標「生体制御の機能解明に資する統合 1 細胞解析基盤技術の創出」に向けて、がんの血行性転移に直接関与する血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell: CTC) に特化した単一細胞核酸解析技術を創出し、抗がん剤開発への応用性を探る研究として参画させていただいた。CTC の単一細胞解析に関する研究は、研究開始当初から世界各国で進められていたが、血液中の存在比が 0.00000001%以下である CTC を効率よく単一細胞レベルで分離する技術の開発がボトルネックであり、CTC の遺伝子

解析から得られる情報の具体的な利用方法を提示する段階には至っていなかった。そのような情勢の中で、本プロジェクトでは、簡便かつ高精度な単一 CTC の分離を実現するための基盤技術の確立、基盤技術の製品化検討、臨床現場での有用性の評価を医工が一体となり実施してきた。その過程において、単一細胞をハイドロゲルに包埋し可視化することで容易にハンドリング可能とする GCM 法と、それを利用した単一細胞遺伝子解析技術の確立に成功し、その成果により多くの招待講演の機会や、国内外の学術分野における技術供与や共同研究に発展した。本プロジェクトにおいて、この様な研究体制を構築し、次につながる成果として展開できたことは、チーム型研究推進事業である CREST 研究が無ければ成し得なかったとあらためて実感している。最後に、本プロジェクト採択直後から今日に至るまで、計り知れない温かいご指導とご厚情を頂きました菅野 純夫総括には、心から感謝の意を表したい。また、本領域のアドバイザーの皆様、CREST 研究プロジェクトを支える JST の方々にもあわせて感謝したい。