

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
[1 年追加支援期間分]

研究期間 2018年 4月～2019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
生命機能科学部門、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

過去3年半の成果:

H26年からH29年において、(1)血中循環腫瘍細胞(Circulating tumor cell: CTC)の単一細胞分離に向けた Microcavity array (MCA) 内蔵カートリッジの開発・量産体制の確立、(2)CTC の高速検出に向けた広視野イメージングシステム及び画像解析ソフトの開発、(3)Gel-based cell manipulation (GCM) 法による高精度な CTC の単一細胞分離技術の開発、及びそのハイスループット化のためのマルチ光照射システム・自動マイクロピンセットの開発、(4)GCM 法にて分離したハイドロゲル包埋単一細胞の遺伝子解析に向けた全ゲノム増幅法 (Whole genome amplification)、全トランスクリプトーム増幅法 (Whole transcriptome amplification)の検討、など CTC の単一細胞遺伝子解析に向けた要素技術群(CTC 核酸解析プラットフォーム)の開発を進めてきた。さらに、開発した要素技術と既存の技術を用いてがん患者血液サンプルからの CTC の単一細胞分離及び遺伝子解析を実施し、特に遺伝子発現解析における開発技術の有用性を確認し、短期間ではあるが CTC の培養にも利用可能であることを確認した。また、GCM 法による単一細胞分離及び遺伝子解析が CTC だけではなく、環境微生物やシャーレ上で培養した接着細胞にも有効であることを確認した。

追加1年支援期間の達成目標:

1) CTC 核酸解析プラットフォームの有用性評価を目的とし、既存技術との比較、及び同一がん種を対象とした CTC の単一細胞遺伝子解析を実施する。また、CTC の単一細胞遺伝子解析においては得られるデータの特徴から、CTC の遺伝子解析の臨床における有用性についての考察を行う。2) GCM法のハイスループット化に向けて前年度より開発を進めているマルチ光照射システムの次世代機「高精度イメージング/ゲル作製システム」の性能評価を進める。3) MCA 上に捕捉された CTC の高精度検出に向け開発を進めているイメージング解析ソフトの性能評価を進める。

得られた成果の概要:

1) CTC 核酸解析プラットフォームの有用性評価

肺がん細胞単一細胞を対象とした遺伝子発現解析により、MCA/GCM 法の操作工程による細胞の遺伝子発現パターンへの影響は軽微であることを確認した。また、胃がん、すい臓がん患者 20 症例を対象とした CTC 検出、単一細胞分離試験を行い、合計 81 個の CTC 候補、58 個の白血球サンプルを獲得した。現在、RNA-seq、Target-seq、Whole genome seq による遺伝子解析を行なっている。本研究では世界的にも報告例が少ない胃がん、すい臓がんの CTC 解析に注力しており、得られるデータからこれらのがんの転移に関連する遺伝子情報を抽出できる可能性がある。

2) GCM 法のハイスループット化

抗体染色を行なったがん細胞の観察、及びハイドロゲルの作製条件の検討を実施し、高精度イメージング/ゲル作製システムが従来のマルチ光照射システムよりも高感度な細胞検出が可能であること、従来と同等の精度で単一細胞を分離可能であることを確認した。さらに、高倍率の対物レンズを使用した光照射を可能としたことで、従来のマルチ光照射システムよりも小型のハイドロゲルを作製可能であることを確認した。本システムは MCA/GCM 法による臨床サンプルからの CTC の単一細胞分離のスループットの向上に寄与する可能性がある。

3) イメージング解析ソフトによる CTC の高精度検出

がん細胞を添加した血液をモデルに、MCA にて濃縮、染色したがん細胞の判定性能の評価を実施した。結果として、開発したイメージング解析ソフトは、オペレーターの目視観察と同等の判定精度でがん細胞を識別可能であることが示され、オペレーター間での測定誤差や測定スループットの大幅な改善が可能であることが期待された。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. CTC の単一細胞 RNA-seq 解析

胃がん、すい臓がん CTC の単一細胞レベルでの遺伝子発現データを取得した。いずれの CTC においても血小板様の遺伝子発現パターンを示すことが確認され、EMT が進行していることが予想された。CTC の単一細胞遺伝子発現解析は世界的にもほとんど進められておらず、特に胃がんにおいては本研究が世界初の報告となる。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. マルチ光照射システムの開発

概要: 広視野イメージングシステムと Digital Micromirror Device (DMD) を統合することにより、MCA 全面の一括撮像及び複数の細胞への同時光照射を可能とした。本システムにより、MCA/GCM 法における CTC 検出及び単一 CTC のハイドロゲルへの包埋工程のスループットを飛躍的に向上させることが可能となり、CTC の単一細胞遺伝子解析のハイスループット化に寄与する成果である。(Analytical Chemistry, 90 (16), pp 9734–9741)

<代表的な論文>

Ryo Negishi, Kaori Takai, Tsuyoshi Tanaka, Tadashi Matsunaga, Tomoko Yoshino
"High-Throughput Manipulation of Circulating Tumor Cells Using a Multiple Single-Cell Encapsulation System with a Digital Micromirror Device" Anal. Chem., 90, 16 (2018)

Ryo Negishi, Reito Iwata, Tsuyoshi Tanaka, David Kisailus, Yoshiaki Maeda, Tadashi Matsunaga and Tomoko Yoshino "Gel-based cell manipulation method for isolation and genotyping of single-adherent cells", Analyst, Accepted (DOI: 10.1039/c8an01456f)

§ 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・日立化成」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	教授	H30.4～
田中 剛	同上	教授	H30.4～
前田 義昌	同上	助教	H30.4～
松永 是	同上	特別招聘教授	H30.4～
根岸 諒	同上	特任助教	H30.4～
茅 逸皓	同上	M2	H30.4～
赤塚 万紀	同上	M1	H30.4～
山川 ひとみ	同上	M1	H30.4～
斎藤 日向	東京農工大学工学部生命工学科	B4	H30.4～
堀川 万優子	同上	B4	H30.4～
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	H30.4～
遠藤 勝也	同上	研究員	H30.4～
伊藤 明子	同上	研究員補	H30.4～

研究項目

- ・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 計数用ソフトの開発

②「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	H30.4～
小泉 史明	同上	非常勤職員	H30.4～
小暮 寛子	同上	非常勤職員	H30.4～
佐々木 友希	同上	非常勤職員	H30.4～
小山 瑠美	同上	非常勤職員	H30.4～
林 美由紀	同上	研修員	H30.4～
北村 悠香	同上	研修員	H30.4～
小川 美奈	同上	研修員	H30.4～

研究項目

- 新規治療標的因子の探索、同定
- 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。