

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830099

研究課題名(和文)超低侵襲性癌診断装置により採取した血液循環癌細胞の性状解析

研究課題名(英文) Analysis of circulating tumor cells using an ultra-low-invasive cell separation device

研究代表者

遊佐 亜希子 (Yusa, Akiko)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：00455536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、研究代表者の所属先で開発している超低侵襲性血液中循環癌細胞(CTC)分離回収装置を使って、安定的に遺伝子解析を行う方法の開発を目的として行った。リキッドバイオプシーとしてCTCを用いることで、リアルタイムで腫瘍の性状を把握し、分子生物学的な情報に基づいて、よりの確な治療を提供するためのクリニカルシーケンスの実用化を目指す。本機は非常に分離回収単離を高速に行うことができるため、簡便で再現性の高い遺伝子解析方法が整うことで、CTCの遺伝子解析の高速化が実現できる。

研究成果の概要(英文)：Characterization of Circulating Tumor Cells (CTCs), it is necessary to practical use in personalized medicine of cancer. In recent research, the technology of detection, isolation and separation of CTC from whole blood is progressed steadily. In order to optimize methods of genetic analysis that follows a step of CTC collection, we tested many kinds of method of nucleic acid amplification and genetic analysis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：個別化医療 血液循環癌細胞 癌の個性診断 一細胞解析

1. 研究開始当初の背景

(1) CELLSEARCH® assay の台頭とクリニカルシーケンスの重要性

CELLSEARCH® assay (旧 Veridex, 現 Janssen Diagnostics) が, 米国食品医薬品局 (FDA) で認可されて以来, CTC 検査は, 癌診断法の一つとして認知されている。CTC 数は, 乳癌や大腸癌においては, 予後予測因子であり, 採取した CTC の遺伝子情報を解析できれば, 患者の癌形質を直接反映する Liquid Biopsy として非常に有用なバイオマーカーとなり得ることが期待される。しかし, CTC の計数だけでなく, CTC のクリニカルシーケンシングを医用応用するには, 遺伝子の解析精度などの技術的課題や, 現時点では解析費が高額であること, 解析結果が高度に専門的であることなど, 広く普及・利用を妨げる要因は少なくない。

(2) 単一細胞分離回収装置の開発

我々の開発チームでは, 単一細胞分離回収装置「希少細胞ソーター」をはじめ, 様々な特徴を持つ単一細胞分離回収装置を開発している。細胞の単離および検出・分離技術は, 世界中で様々な手法が開発されている。しかし, 回収法や回収後の細胞の取り扱い方法には, 改良の余地が認められた。CTC のような希少な生体試料を扱うには, 採取時の損失や, 解析前処理の段階での損失を最小限に抑えたい。なぜなら, 希少細胞から抽出される生体分子は, 極めて希少で常に損失の危険性が伴うためである。

2. 研究の目的

(1) 再現性の良い単一細胞遺伝子解析法の開発 抽出条件の最適化 解析方法の最適化

(2) CTC のスクリーニングマーカーの探索

3. 研究の方法

(1) 人血液の採取方法

愛知県がんセンター倫理審査委員会の承認の元, 連携研究者より提供された。採血は, 患者または健康人ボランティアの肘静脈より EDTA-2Na 採血管(テルモ)に約 5mL 採取された。

(2) フローサイトメトリー

培養細胞 (胃癌細胞株 ; COLM-2, COLM-6, GLM-2, GLM-5, MKN-45, 乳癌細胞株 ; MCF-7, BT-474, 末梢血単核球 PBMC) の, 抗体 (抗糖タンパク質糖鎖抗体 : anti-CD15s, anti-CA19-9, anti-sialyl Le^x, anti-pan-MUC, ヘパラン硫酸糖鎖抗体 : 10E4, NAH46, JM403) に対する反応性を調べるため, FACS Calibur™ (BD biosciences) を用い

て, フローサイトメトリー解析を行った。二次抗体として, F(ab')₂-Goat anti-Mouse IgG/ IgM(H+L) Alexa Fluor® 488 標識抗体を用いた。

(3) 微量核酸の増幅および解析

各種培養細胞 (大腸癌細胞 ; CACO-2, 胃癌細胞株 ; COLM-6, 乳癌細胞株 ; MCF-7, MDA-MB-231) を, 常法に従い培養し, 増殖期に細胞を回収した。その後, RNeasy mini kit および DNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて抽出, 精製した。

微量ゲノム DNA の増幅試薬として, GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification Kit (Sigma-Aldrich), Ampli1™ WGA Kit (Silicon biosystems) を付属の方法に従って使用した。

微量 RNA の増幅試薬として, Single cell-to-Ct™ kit (Ambion), Superscript III (invitrogen), WT-Ovation One-Direct RNA Amplification System (Nugen) を付属の方法に従って使用した。

微量 RNA の増幅および次世代シーケンサーのライブラリ作成のために, Quartz-Seq 法 (Sasagawa *et al.*, Genome Biology, 2013) を用いた。

解析は, qPCR 法では, ケミストリーは DNA プローブ法, 解析装置は Light Cycler® Nano (Roche) を用いた。ゲノム配列解析には, ABI Prism® 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems), 次世代 DNA シーケンシング解析は, NextSeq500 (Illumina) を使用した。

(4) In situ hybridization (ISH)

観察標本には, マウス (C57BL, 雌) の十二指腸, 空腸, 回腸, 8 週齢胎児全身および, 皮膚を用いた。皮膚は, 成獣の皮膚にバイオプシーパンチで創傷処理を施し, 治癒過程の組織を屠殺後に採取した。標本は全てホルマリン固定パラフィン包埋とした。ISH 検出プローブには, RNAscope® (MBL) を用いた。

4. 研究成果

(1) CTC の分子マーカーの探索

表面マーカーの検討

我々のグループでは, 様々な特徴を持つ単一細胞分離回収装置を開発しているが, 分離の主な原理は細胞のサイズを基準とした物理量を用いている。世界的に見れば, 比重等の物理量や細胞表面マーカーに対する抗体を選別方法, あるいは各種を組み合わせた複合的な方法等が提案されている。しかし, 圧倒的多数の血液細胞に対してわずか数個の CTC を高速かつ正確に分離するのは困難である。我々のグループの方式では, 圧倒的多数の血液細胞から CTC を分離することは可能であるが, その後正確に

分取するための、CTC 以外の細胞との差別化の過程が必要であった。そこで、種々の細胞株を用いて血液細胞を差別化する細胞表面マーカーの検討を行った。癌細胞に普遍的に発現している、血球にはほとんど反応しない細胞表面抗原が理想的である。今回検討した7種類の抗体のうち、anti-pan-MUC と JM403(ヘパラン硫酸鎖中の GlcA-GlcNH₃⁺糖鎖抗原を認識)はPBMCにはほとんど反応性を示さず、今回調べた範囲では、全ての細胞株で陽性であった。(Data not shown)

GlcA-GlcNH₃⁺糖鎖抗原合成遺伝子の検索

今回我々は、JM403 抗体の CTC 選別方法としての使用可能性を見いだした。しかし、蛍光検出するには蛍光強度が低いという問題点があった。そこで、これまでの研究で絞り込んだ数種の遺伝子の中から、JM403 糖鎖抗原の糖鎖合成に関与すると考えられる遺伝子の検索を行った。免疫組織科学的解析と ISH により、糖鎖の発現部位と遺伝子の発現部位との比較検討を試みたところ、予想以上に陽性率が低く、統計処理を行うことはできなかった(図1)。

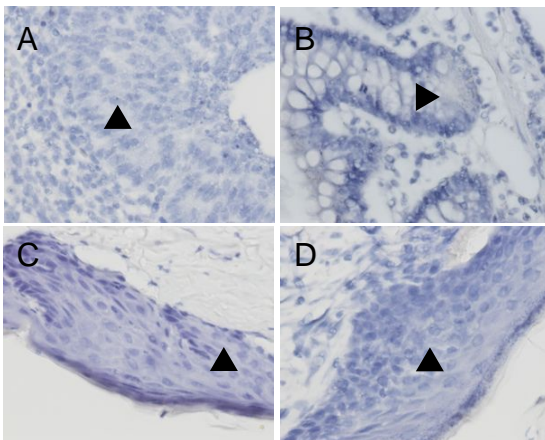


図1 ISH(A;胎児小腸, B;成獣空腸, C;成獣皮膚, D;成獣皮膚) 検出部

(2) 微量核酸の遺伝子解析

微量 DNA の遺伝子変異解析

微量 DNA の解析方法は、アーカイブサンプルのゲノム解析を目的とした試薬がいくつか市販提供されている。どの方法も、PCR の原理に基づく増幅過程を必要とするため、方法によっては、酵素反応に起因する増幅バイアスがかかってしまう場合がある。また、多種類のプライマーを用いるため、

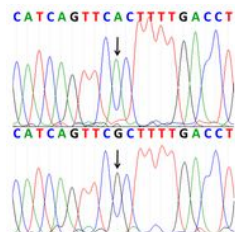


図2 KRAS の変異解析

増幅の過程でプライマーダイマーが多数形成され、解析時のノイズとなるケースも見られる。本研究では、方法に記載したいくつかの入手可能な市販試薬を用いて、我々の開発装置で採取した細胞の遺伝子解析が実施可能かどうかを検討した。KRAS の変異を検出することを基準とし、繰り返し安定してゲノム変異を検出できるかを検討した。DNA の場合、比較的検出は安定しており、どの試薬を用いても結果に差はなかった(図2)。

微量 RNA と 1 細胞からの cDNA 合成

微量 RNA のマイクロアレイ解析を行うため、いくつかの試薬が市販提供されている。RNA の場合も DNA 同様、PCR による前増幅を数回にわたって行うため、PCR に起因する増幅バイアスがかかる危険性がある。また、非常に不安定な分子であることは周知の事実であり、分解をいかに防ぐかが解析成功の鍵とも言える。一細胞からおよそ 10-50pg, 培養癌細胞でおよそ 30-40pg 程度の全 RNA が

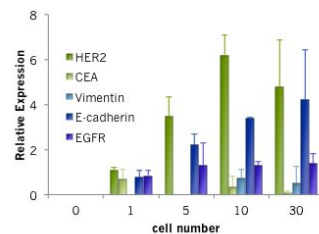


図3 Single cell-to Ct kit を用いた qPCR 解析

含まれている。市販薬を使用し cDNA を合成、その後特定の遺伝子に対して qPCR 解析を行った結果、再現性よく解析できた試薬は、限られていた。その中で、比較的成績の良かった試薬を用いて、細胞数をかえて、定量性を比較検討した(図3)。

微量のスタートマテリアルに対する酵素の性能が結果を左右していると考えられる。また、RNA 溶解液に, RNasin Plus(Promega)を添加することで、改善された。逆転写の段階で RNA の分解を防ぐことが安定した解析には必須であると考えられる。

Nextseq500 を用いた RNA 発現解析

本課題では、医用応用可能な方法の開発を目的としていたため、保険収載の対象となっている遺伝子診断法(PCR 法, DNA シーケンス法, FISH 法)を用いて解析する方法を検討していた。しかし前出までに行った試料調整法では、見かけ上 pg オーダーのスターティングマテリアルから μg オーダーの試料が増幅される。ただしこれには、プライマーダイマー等のバックグラウンドノイズも含まれ

るため、正確な cDNA の含有量は規定できない。また、CTC を医用応用する際には、明確に診断遺伝子が決定されていなければならないが、現状では CTC はむしろ研究対象であるため、幅広く遺伝子を解析できる方が有用性が高い。

2013 年に笹川らによって Quartz-Seq 法が報告された。この方法の優れている点は、増幅までの過程が非常に安定していること、非常にロバストな方法であるため、実験者の手技によるばらつきが少ないこと、プライマーによるバックグラウンドノイズが低レベルであることなどがあげられる。論文ではマニュアルピッキングとセルソーターによる細胞採取例等が報告されていたが、我々の開発装置で採取した細胞でも、安定的にライブラリを調整することが可能であった。(図 4,5)

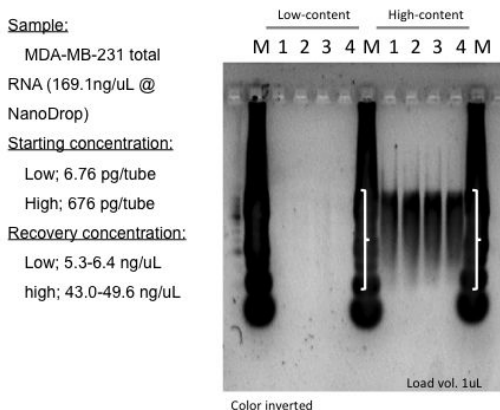


図 4 Quartz-Seq による微量 RNA の cDNA 合成

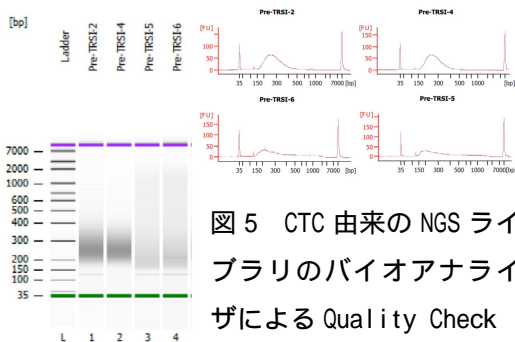


図 5 CTC 由来の NGS ライブラリのバイオアナライザによる Quality Check

引用文献

・ Sasagawa et al., Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. *Genome Biol.*, 2013 14:R31

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

遊佐亜希子, Liquid Biopsy の基礎的概念と臨床への展開, 月刊「細胞」, 48(5)229-232, 2016 年 5 月, 査読無

Shuhei Yamamoto, Jiahui Fei, Mina Okochi, Kazunori Shimizu, Akiko Yusa, Naoto Kondo, Hiroji Iwata, Hayao Nakanishi, Hiroyuki Honda: Efficient capturing of circulating tumor cells using a magnetic capture column and a size-selective filter. *Bioprocess biosyst. eng.* 38(9) 1693-1704 2015 年 9 月, 査読有, doi: 10.1007/s00449-015-1412-9

Taisuke Masuda, Sun Yilling, Song Won Eui, Miyako Niimi, Akiko Yusa, Hayao Nakanishi, Fumihito Arai: Cell Isolation System for Rare Circulating Tumor Cell. *Proceedings of the 2014 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems* 4698-4703 2014 年 9 月, 査読有, doi:10.1109/IRoS.2014.6943230

Akiko Yusa, Makoto Toneri, Taisuke Masuda, Seiji Ito, Shuhei Yamamoto, Mina Okochi, Naoto Kondo, Hiroji Iwata, Yasushi Yatabe, Yoshiyuki Ichinosawa, Seichin Kinuta, Eisaku Kondo, Hiroyuki Honda, Fumihito Arai, Hayao Nakanishi: Development of a New Rapid Isolation Device for Circulating Tumor Cells (CTCs) Using 3D Palladium Filter and Its Application for Genetic Analysis. *PLoS ONE* 9(2) e88821 2014 年 2 月, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0088821

[学会発表](計 6 件)

山本修平, 清水一憲, 遊佐亜希子, 近藤直人, 岩田広治, 中西速夫, 本多裕之, 「磁気捕捉カラムとサイズ選択性フィルターを用いた血中循環癌細胞の捕捉法の開発」, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

遊佐亜希子, 岩田広治, 吉田達哉, 谷田部恭, 本多裕之, 新井史人, 中西速夫, 「新規ディスク型 CTC 分離デバイスを用いた肺がん, 乳がん等の Liquid biopsy に関する 前臨床的および臨床的検討」, 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

中西速夫, 寺澤佳世子, 益田泰輔, 山本修平, 岩田広治, 近藤直人, 伊藤誠二, 新井史人, 本多裕之, 遊佐亜希子, 「新規 CTC 分離デバイスを用いた担がんマウスモデルにおける CTC の動態解析」, 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Akiko Yusa, Yumi Matsumoto, Kayoko Terazawa, Taisuke Masuda, Fumihito Arai and Hayao Nakanishi, 「Isolation of

Living Circulating Tumor Cells (CTCs) from Peripheral Blood Using Size-Based Device and Its Application to CTC Biology in Mice」, 24th 2013 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science 2013年11月10日, 名古屋大学(愛知県・名古屋市)

遊佐亜希子, 舎人誠, 益田泰輔, 山本修平, 大河内美奈, 伊藤誠二, 近藤英作, 馬場嘉信, 本多裕之, 新井史人, 中西速夫, 「新規血中循環がん細胞(CTC)迅速単離装置の開発と1細胞遺伝子解析」, 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

遊佐亜希子, 藤井正宏, 小田高司, 伊東良子, 伊東丈夫, 高橋響, 京ヶ島守, 「ヘパラン硫酸 JM403 抗原の細胞質内顆粒状発現は, 上皮細胞の増殖・分化に關与する」, 第32回日本糖質学会年会 2013年8月5日, 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)

京ヶ島 守 (KYOGASHIMA, Mamoru)
日本薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 50225091

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 末梢血循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス

発明者: 遊佐亜希子, 中西速夫, 他5名

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: 特願 2013-153717

出願年月日: 2013年7月24日

国内外の別: 国内

名称: 末梢血循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス

発明者: 遊佐亜希子, 中西速夫, 他6名

権利者: 同上

種類: 特許権

番号: PCT/JP2014/069469

出願年月日: 2014年7月23日

国内外の別: 外国

6. 研究組織

(1)研究代表者

遊佐 亜希子 (YUSA, Akiko)

名古屋大学・大学院工学研究科・招へい教員

研究者番号: 00455536

(2)連携研究者

中西 速夫 (NAKANISHI, Hayao)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍病理学部・研究員

研究者番号: 20207830