

血中循環腫瘍細胞を利用した癌の遺伝子解析技術に関する基礎検討

機能素材加工課 大永 崇*1 富山大学 藤井 努 東京大学 大塚基之

1. はじめに

癌が様々な遺伝子異常の蓄積に由来しそれが複雑に変化することが、極めて手強い疾病である起源となっている。そこで現在、国レベルではこのような癌の遺伝子異常を把握したうえで治療する“がんゲノム医療”を強力に推進している。理想的ながんゲノム医療を達成するには未だ多くの課題があるが、その1つに「患者さんの癌の遺伝子を如何に入手するか」がある。現状では生検、手術により得た組織を用いるが、身体的負担が大きく、必要時に繰り返すことは困難なため、新たな手法が求められている。

近年、このような課題において“Liquid Biopsy” (LB) が期待されている。LB は体内情報を血液などの体液から得ようとするものであり、癌では血液中の腫瘍由来の癌細胞(CTC)、DNA(ctDNA)、エクソソーム等の解析技術が世界中で開発されている。検討対象は、現在技術的なアプローチのし易さから ctDNA が先行しているが、得られる情報量の面では、癌そのものである CTC がベストである(Nature Reviews Genetics 20, 71-88 (2019))。

筆者らは 10 年以上前から CTC の癌医療での重要性を認識し、既にその単離技術を確認した。本研究ではこの単離技術を利用し、得られた癌細胞の遺伝子解析を行うための技術確立を検討している。

2. ポリマーCTC チップによる癌細胞捕捉・回収

既に開発した血中の微量な癌細胞を捕捉可能な“ポリマーCTC チップ”(Ohnaga, T. et al. *Sci Rep.* 8, 12005 (2018))を用い、チップからの細胞回収を検討した。回収にはハイドロゲル材料を利用し、それに捕捉細胞を包埋して、微量かつ微小な癌細胞を紛失することなく全数回収するアイデアをベースに検討している。

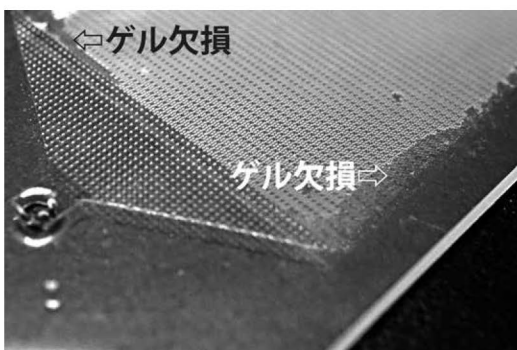


Fig. 1 チップ上のゲル欠損

これまでの検討から既にこのようなゲルによる細胞回収を実現しているが、再現性を確認したところ、回収過程でゲルの一部が破断し欠損する可能性があることが分かった(図1参照)。ゲルの欠損により細胞の紛失が懸念されるため、ここではゲル強度の向上による破断防止を検討した。溶解ポリマー濃度やゲル化温度条件等の最適化を検討したが、未だ常にゲルの欠損を防止するまでには至っておらず検討を継続している。

細胞回収については、下記で示した一般的な細胞回収方法が知られている。これらの方法は、上記のゲル法よりも確実性に劣るが、次のとおり検討対象とした。

●細胞剥離による回収

チップに流す PBS の流速を高め、それによりチップに捕捉した細胞を剥離する試験を行った。細胞捕捉時の流量(1mL/h)の 5 倍、10 倍、20 倍、40 倍と変化させてチップに付着した細胞の変化を観察したところ、40 倍の場合でも細胞の剥離は全く発生しなかった。これ以上の流量ではチップ内圧の変化が大きく送液ラインでの漏れが懸念されるため、試験を一旦中止した。今後、液中に剥離を助長する成分(トリプシンなど)を混合して再度試験する。

●細胞溶解による回収

チップに細胞を溶解する液を充填し、溶解物として細胞回収する試験を行った。市販の細胞溶解液、RIPA バッファー、DNA-RNA 保存液を用意して、各々を細胞が捕捉されたチップに流したときの状態を観察した。その結果、各溶液により細胞の溶解状況が異なり、均一に溶解する場合(DNA-RNA 保存液)、核以外が溶解する場合(RIPA バッファー)、細胞が形状を保って剥離する場合(細胞溶解液、ただし長時間では核を残して溶解)が認められた。溶液を選択することで、異なる状態で細胞回収できることが分かった。

3. 回収細胞の遺伝子解析

以上の回収方法で得られた細胞やその溶解物を用いて、現在、遺伝子解析の検討を行っている。ddPCR を用いて KRAS 遺伝子などの変異解析を進めている。

謝辞：本研究は科研費(基盤研究(C)：19K07746)の助成を受けたものである。

*1 産業医科大学医学部第2外科学