がん個別化医療向けの交換型マイクロ流路チップ型細胞ソーティング技術

(株)オンチップ・バイオテクノロジーズ
取締役　開発部長
武田一男

1. 背景と目的

がんの個別化医療では、患者から摘出したがん組織の表面抗原発現解析と次世代シーケンサー(NGS)によるゲノム解析によって最適な治療薬の選択が行われる。しかし、がん組織の摘出は、患者に対する侵襲性が高いため頻繁に行う事は不可能である。この為、治療経過でのがん細胞の治療薬に対する抵抗性獲得の変化に対応する治療が遅れる問題がある。この解決策として、侵襲性が低い採血により、血中循環腫瘍細胞;CTC)を高頻度に分取し、そのゲノム解析と発現解析解析によって最適な治療を選択することが考えられる。CTC解析はリアルタイム個別化医療を実現すると期待される。本講演では、CTCの発現解析とNGSによるゲノム解析を両立するCTC濃縮のための使い捨て交換型マイクロ流路チップ型セルセルソーティング技術を紹介する。

2. 血中循環腫瘍細胞(**CTC**)による個別医療に必要な細胞分取技術について

血液4mL中のCTC解析する為に、10^8個程度の膨大な白血球中に5個程度混在するCTCを濃縮し、NGSによるゲノム解析に必要な純度(>10%)に高める必要がある。血球細胞からCTCを分離する方法として、①サイズが大きい細胞、②誘電率が高い細胞、③上皮性表面マーカーを有する細胞、④サイトケラチン(上皮性細胞骨格)を有する細胞、以上の4種類の指標がある。NGSによるゲノム解析に必要な純度が得られる方法は③と④の方法である。③の方法は、上皮性細胞すべてに共通する表面マーカーがなく不完全である。磁気濃縮は上皮性表面抗原に対する抗体磁気ラベルを行うので同じ問題がある。故に、④の方法が最適である。以下、サイトケラチンを有する細胞分取により、発現解析とNGS解析を両立するCTC濃縮技術を次に説明する。

3. 交換型マイクロ流路チップ内の繰り返しソーティング法による**CTC**濃縮技術

装置:　異なる患者の検体間クロスコンタミネーションフリーを実現する為に、検体毎に交換可能な流路チップ内での細胞分取が可能な蛍光検出型セルソーター(On-chip Sort)を利用する。

前処理:　溶血および固定後にサイトケラチン染色と、CTC表面抗原の発現解析の為に複数の抗体蛍光ラベルを行う。解析対象となる表面抗原としては、EGFRやPD-L1、上皮間葉転換解析用のVimentin等が考えられる。

濃縮プロセス:　サイトケラチン蛍光を有する細胞を白血球から分取する。ソーティング処理1回目後は白血球数が1/1000程度に減少し、2回目後はさらに1/100程度になる。3日目後は白血球数が10個まで減少する。CTC純度は約40%であり、NGSによるゲノム解析が可能な純度に達する。繰り返しソーティングでは、同一流路チップを用いる事ができる。回収効率は75%である。

単一**CTC**の表面抗原のマルチカラー解析:　各CTCの表面抗原発現解析は、セルソーターのマルチカラー解析により濃縮と同時に自動的に完了する。蛍光顕微鏡観察は不要である。

遺伝子解析:　各患者について1個のCTC濃縮サンプルのNGS解析を行う。患者が有するがん遺伝子変異の網羅的な検出を行う。基礎研究用としては、特定の表面抗原を異常発現したCTCを1パルスソーティングにより分取し、単一CTCのNGS解析を行うことが可能である。

4. 結言

交換型マイクロ流路チップを用いるセルソーティング技術をがん医療に役立てることで、社会貢献を果たしたいと考えている。