

Application News

血中循環腫瘍細胞分離濃縮装置とGC-MSの統合によるリキッドバイオプシー研究の促進

中川 裕貴¹、HaiChon Lee²
1 株式会社島津製作所、2 CytoGen, Inc.

ユーザーベネフィット

- ◆ GC-MSは微量の代謝物（糖、アミノ酸、脂肪酸、核酸、有機酸など）を高感度に検出できるため、生きた腫瘍細胞を培養し、その培地を測定することで腫瘍の代謝に関する研究を促進します。
- ◆ マルチオミクス解析パッケージを用いることで一次代謝物測定データだけでなく、細胞や培地に関するデータを読み込み、特徴量の多い測定項目（デジタルバイオマーカー）を検出できます。

■はじめに

近年、リキッドバイオプシーはがん研究において画期的な技術として注目を浴びています。尿や血液などの試料を用いてがんの早期検出や治療効果のモニタリングを行うリキッドバイオプシーは、従来の組織生検に比べて非侵襲的で再検査が簡便であるとされています。

リキッドバイオプシーを用いたがんの早期発見や治療法の開発では、通常はctDNAが主に注目されています。しかし、ctDNAでは、DNAのみを測定するため、RNAやタンパク質など、血中循環腫瘍細胞（CTCs：Circulating Tumor Cells）の解析も重要性を増しています（図1）。

特に、生きたままのCTCsを血液から独立させ、濃縮し、そのがん細胞を培養している培地に含まれる微量の代謝物の変化を把握することは、リキッドバイオプシー研究に大きな貢献をもたらす可能性があります。GC/MS（ガスクロマトグラフィー質量分析法）は、培地中の糖、アミノ酸、脂肪酸、核酸、有機酸などの一次代謝物を測定できます。

しかしながら、GC/MSを用いる際には、専門知識や代謝経路の作成において課題が存在しています。それらの課題を克服するため、本報では培地をガスクロマトグラフ質量分析計GCMS™-TQ8040 NX（図2 左）とSmart Metabolites Database™ Ver.2で測定しました。

データベースを用いることでメソッド開発に必要な専門的な知識や技術が不要となります。また500成分以上の一斉測定でありながら測定は23分で完了します。試料はH358肺がん細胞とH1975肺がん細胞の2種類のCTCをCytogen社製Smart Biopsy Cell Isolator（図2 右）で分離し、個別の培地で単種で細胞数0個、1個、10個、100個でそれぞれ培養したものを用いました。血中循環腫瘍細胞分離濃縮装置であるSmart Biopsy Cell IsolatorはHDMを用いた重力ベースのフィルタリングで、特殊コーティングにより回収率を最大化し、1検体25分のハイスループットでCTCを生きたまま分離する装置です。統計解析にはeMSTAT™ Solution Ver.2とマルチオミクス解析パッケージを用いて、ANOVAと代謝経路図を組み合わせた可視化法や、代謝経路図上でCTC数測定データと各代謝物の相関関係を可視化し解析しました。



図2 GCMS-TQ™8040 NX（左）とCytogen社製Smart Biopsy Cell Isolator（右）

今後期待される研究対象

miRNA（マイクロRNA）

循環先の細胞に影響を及ぼす機能を保有し、がん早期発見に適しています。DNAとRNAが分析できて、かつタンパク質もある程度分析可能とされます。しかし、高感度分析ツールに加え、miRNAの存在量の補正が必要で、がんに特異的な遺伝子情報解析はできないと考えられています。miRNAはエクソソームに含まれているか血中に遊離で存在しますが、エクソソーム内では安定しており、マーカーとして使用できる可能性があると考えられています。

目標の研究対象（特定箇所に注目）

CTC（血中循環腫瘍細胞）

腫瘍細胞=希少細胞（数億の細胞のうちの一つ）であり、「シングルセル分離技術」が必要で分離難易度が高いです。しかし、腫瘍組織そのものを取るのと同じくDNA、RNA、タンパク質、オルガネラ（3Dイメージング）、細胞の物性（硬さなど）などを評価できます。課題は「見つけられない」「血小板と結合している場合、分離技術がない」「スループットが低い」などですが、検出されるとctDNAなどの解析結果と一致率が高く、精度が高いと言われています。

現状の主流（全体像を見る）

ctDNA（血中循環腫瘍DNA）

現在のリキッドバイオプシー研究の主流はctDNAです。豊富に存在する単核球で、末梢血から分離が容易です。DNAのみを解析し、RNA、タンパク質、オルガネラ、細胞物性は観察できないのが欠点です。課題は正常細胞由来DNAなど外部DNAの混入、治療による腫瘍破壊でもDNA総量が増える点、評価方法が確立されていないなどであるとされています。

EV（細胞外小胞）

細胞から放出され、核を持たず複製できない小胞です。脂質二重膜で囲まれた粒子で、凍結融解などで破壊されることから丁寧な取扱いが求められます。DNA、RNA、タンパク質を一度に解析できますが、現状、研究事例はctDNAと比較して少ないです。

cfDNA（血中循環遊離DNA）

cfDNAは由来が分かり難いため、全身の死細胞数（進行がん→死細胞数の増加→cfDNA総量増加（正常細胞+がん細胞+炎症細胞））を観察していると考えられます。死細胞数は、手術の侵襲度合いと相関がある可能性があり、手術のダメージマーカーとしても期待されています。

cfRNA（血中循環遊離RNA）

分析技術が難しいことで知られています。しかしcfDNAと比べて、融合遺伝子（がん発生に関わる遺伝子）の同定に適している（腫瘍組織そのまま分析と一致）とされています。

図1 リキッドバイオプシー研究対象の概要

■ 実験

被験者の血液サンプルを酸性クエン酸ブドウ糖液Aチューブ (BD; フランクリンレイクス、ニュージャージー州、アメリカ合衆国) で採取しました。CTC単離キット (製品番号CIKW10; Cytogen Inc.) およびSMART BIOPSY Cell Isolator (製品番号CIS030; Cytogen Inc.) を用いて血液試料を処理してCTCを濃縮しました。希釈した細胞懸濁液を高密度微孔性 (HDM) チップを通して濾過しました。HDMチップ上の細胞を回収し、マイクロチューブに移しました。

ヒト肺がん細胞株H358 (野生型EGFR) およびH1975 (L858RとT790M) を、10%の熱不活化ウシ胎児血清および5mlの抗生物質-抗真菌薬 (製品番号15240062; Gibco) を補充したL-グルタミン (300 mg/L) (製品番号11875093; Gibco) を含むRPMI 1640培地中に単離しました。これらを加湿5% CO2雰囲気中で37℃で培養しました。

分離し培養されたCTCsの代謝物プロファイルへの影響を確認するため、11の培地試料 (未使用培地、各肺がんについて1細胞を含む培地 (n=2)、10細胞を含む培地、50細胞を含む培地、100細胞を含む培地) をGCMS-TQ8040 NXで測定しました。

前処理は「[メタボロミクス前処理ハンドブック](#)」に沿って行われ、GC-MSの分析条件はSmart Metabolites Database Ver. 2を用いました。データ採取モードとしてMultiple Reaction Monitoring (MRM) を用いることで、23分の分析時間で500成分以上の化合物を高感度に測定することができました。

■ ANOVAを用いた代謝経路解析

ANOVA (分散分析) はグループ間のデータ差異を検出し、その差異が偶然ではないかを判断するために使用されます。ANOVAの結果は通常p値のみですが、その結果を代謝経路に投影することで、生物学的な知見を深めるだけでなく、新たな研究の方向性を見出すこともできます。

図3では未使用培地 (青色)、肺がん細胞H358を50個あるいは100個培養した培地 (赤色)、肺がん細胞H1975を50個あるいは100個培養した培地 (黄色) のp値をANOVAで算出しました。その結果のなかでp値が5%以下の代謝物を、マルチオミクス解析パッケージの代謝経路図に投影しました。

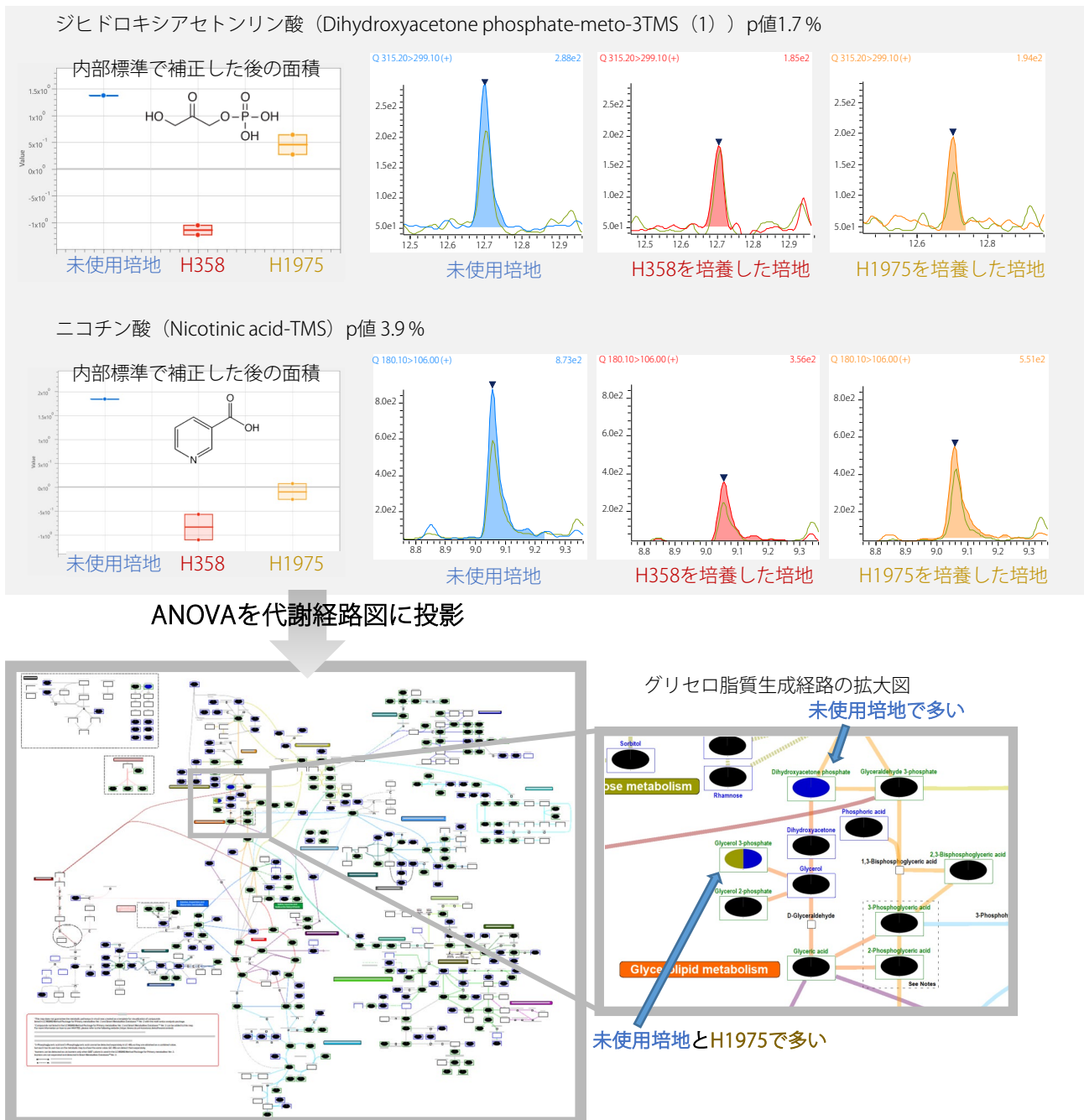


図3 eMSTATでANOVA解析を実施し、結果をマルチオミクス解析パッケージの代謝経路図に投影

その結果、H358を培養した培地はグリセロ脂質代謝経路の上流域に存在する基質（ジヒドロキシアセトンリン酸とグリセロール3-リン酸）が特異的に低いことがわかりました。ジヒドロキシアセトンリン酸から副産物としてメチルグリオキサール（methyl glyoxal; MG）が産生されますが、がん細胞では解糖系の亢進により副産物のMGが産生されやすいことが知られています¹⁾。

■代謝経路図上でCTC数と代謝物の相関解析

マルチオミクス解析パッケージの代謝経路解析機能を用いて、CTC数（0、1、10、50、100）と代謝物の相関解析を実施しました（図4）。

その結果、トリプトファン経路の中間代謝物であるドーパミンがH358と正の相関を持つことがわかりました。肺がん患者の血漿中ドーパミンは健康者より有意に上昇しているという研究結果が過去に報告されており、今後、因果関係の解明が期待されています²⁾。

グリセロ脂質生成経路ではグリセロール3-リン酸がH358細胞数と負の相関を持つことがわかりました。肺がん細胞ではグリセロール3-リン酸を1,3-ビスホスホグリセリン酸に変換するグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（NADP+）が多く発現されることが知られています³⁾。そのため今回の実験でグリセロール3-リン酸が減少した理由としても、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（NADP+）の増加が考えられます。

H358は細胞数が増えるにつれて、グリセロール3-リン酸の蓄積量が減少しました。

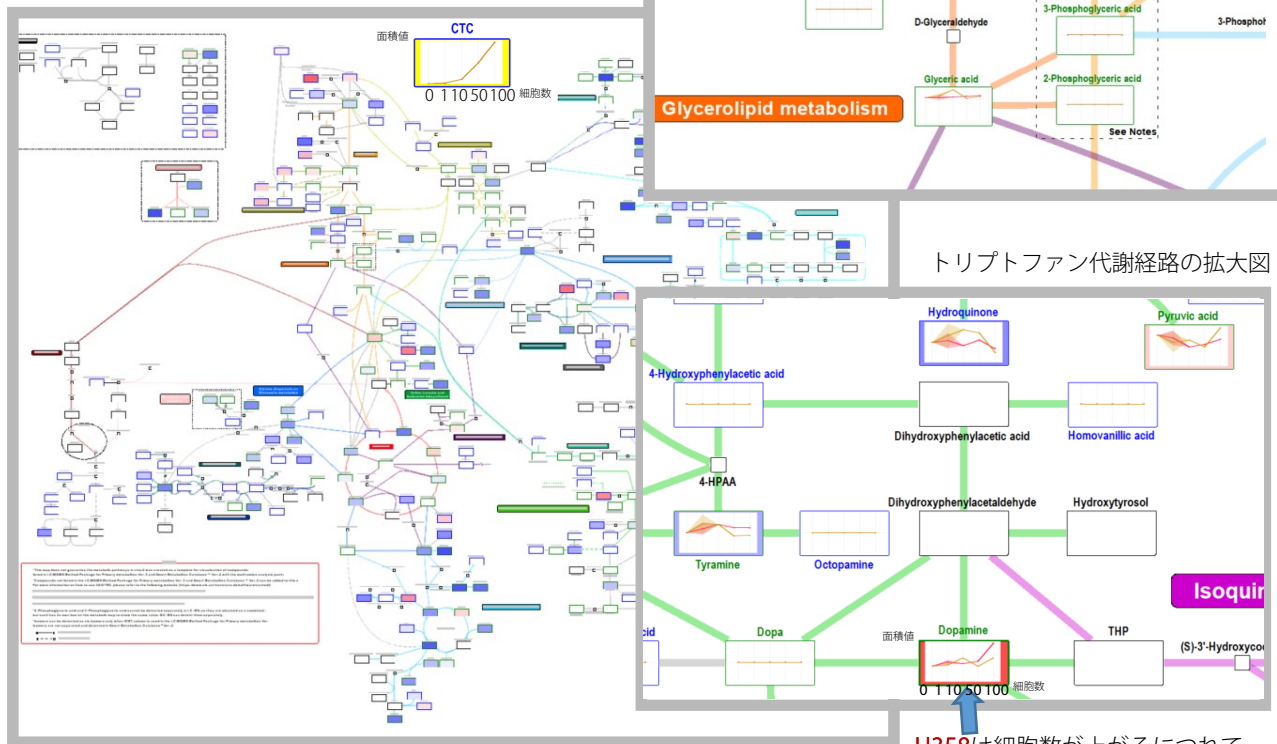


図4 CTC数と相関のある代謝物の探索

GCMS-TQ、eMSTAT、Smart Metabolites Databaseは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

■まとめ

本報ではH358肺がん細胞とH1975肺がん細胞をCytogen社Smart Biopsy Cell Isolatorで分離し、培養しました。GCMS-TQ8040 NXとSmart Metabolites Database Ver. 2で培地を分析し、マルチオミクス解析パッケージによりCTC数と相関のある代謝物を検出しました。細胞サイズによる濾過法と負の選択によりCTCを生きたまま単離・培養し、その培地をGC-MSで測定することで腫瘍に関する研究を促進する可能性があることがわかりました。

<参考文献>

- 1) [植物由来生体活性物質の探索と作用機構の解析](#)、金田典雄、2024年5月24日参照
- 2) [Circulating dopamine level, in lung carcinoma patients, inhibits proliferation and cytotoxicity of CD4+ and CD8+ T cells by D1 dopamine receptors: an in vitro analysis](#)、Baisakhi Saha et al.、2024年5月24日参照
- 3) [Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers](#)、Tokunaga et al.、2024年5月24日参照