特集：1細胞質量分析法開発～現状と今後の展開

COMMENTARY

一細胞質量分析を用いた循環腫瘍細胞解析の試み

An Attempt to Analyze Circulating Tumor Cells
Using Single-Cell Mass Spectrometry檜山英三^{1,2,*}・原田隆範¹・児島正人²

Eiso HIYAMA, Takanori HARADA, and Masato KOJIMA

¹ 広島大学自然科学研究支援開発センター *Natural Science Center for Basis Research and Development, Hiroshima University*² 広島大学病院小児外科 *Pediatric Surgery, Hiroshima University Hospital*

Circulating tumor cell (CTC) has improved the study of cancer disease as it represents a noninvasive biopsy that can be used as prognostic and prediction biomarkers as well as for future molecular diagnosis as an accurate selection of molecular targets and effective drugs. As tumor heterogeneity exists in neuroblastoma (NBL), we aimed to evaluate lipid-metabolomic molecular profile as well as genetic profiles at the single cell level of CTC for better understanding the heterogeneity and malignant grade of NBL. For attempt of CTC analysis in NBL patients, we have isolated single-CTCs and then performed direct trapping of a single cell within a nanospray tip followed by super-sonication after the addition of ionization solvent for metabolomics analysis. And we also performed genomic aberrations and expressions using next-generation sequencing after whole genome/transcriptome amplifications (WGA/WTGA). In the NBL-CTCs, metabolomic analysis detected catechol amine metabolites, which are specific to NBL, and drugs included in the patient's course of therapy in addition to vital molecules such as amino acids. In genomic analysis, the average amount of amplified DNA was 19.0 µg, and the percentage of reads mapped to any targeted region relative to all reads mapped to the reference was 66.5–98.9%. The concordance rates of CTC and tumor mutations were 49–80%. The genomic expression analysis in CTC showed the activation of cancer metastatic, neurogenic, stem cell signaling pathway genes. This "direct single-cell analysis method" seems to be useful for direct and wide range genomic and molecular marker detection in NBL-CTC, for evaluating heterogeneity of NBL tumor at diagnosis as well as during treatments. This method will be applicable for selection of effective drugs and evaluation of treatment efficacy in future.

(Received February 4, 2020; Accepted February 10, 2020)

1. 序 論

細胞の働きに関係する分子を調べるときは、通常は組織や多くの細胞の集合体をすり潰し、これを分析して検討してきた。これらから得られる生体の応答は、1個の細胞の応答ではなく膨大な細胞の平均値となる。実際には、細胞個々は異なった反応を行い、隣の細胞との細胞間応答を行っていて、実際に1個の細胞を観察すると、同じ刺激に対しても個々の細胞の反応は多様である。また、組織が発生する段階や、細胞が変化する際は、経時的に変化し、また、周囲の細胞とのクロストークにより個々の細胞がそれぞれ変化するが、経時的、空間的に細胞間で差がみられる。これらの解析のためには、一つ一つの細胞を個別に解析することが必要となる。一般に、細胞集団や組織から細胞を分離採取すると、通常は分離する段階で細胞が死んで

しまうため、生きたままの状態での情報を得ることができない。実際には、生きた細胞の変化を見ながら、その細胞内の分子変化をリアルタイムで追跡することが必要であるが、これは至難の業で、かつては、細胞の体積は1ピコリットル（1兆分の1リットル）と超微量で、観察している細胞1個の中で起こっている分子変化は検出不可能と考えられていた。しかし、2008年に升島 努チームリーダー（当時、広島大学大学院医歯薬保健学研究院教授）らは、1個の生きた細胞の変化を見ながら、その細胞内の分子群をリアルタイムかつ網羅的に検出する「一細胞質量分析」を開発した。この手法を自然科学の分野に応用すると、希少な細胞でも、数個の細胞で簡単に分析できるうえ、解析の高速化と低コスト化や分子情報の高精度化をもたらす新技術となるものであった。筆者らの所属する広島大学自然科学研究支援開発センターでは、その後に本手法を用いた開発を継続して行っており、現在は、原子・分子の顕微イメージングプラットフォーム（共用プラット

* 連絡先：eiso@hiroshima-u.ac.jp

Fig. 1. Single CTC analysis platform.

Circulating tumor cell (CTC) is isolated using cell sorting by the cancer specific antibodies. And, picking of a single CTC is done by nanospray tip and a single cell mass spectrometry of isolated single CTC was performed. Principal component analysis was done using these single MS data.

フォーム形成支援事業)にて、本手法を公開、共用している。

さらに、本プラットフォームと広島大学病院小児外科で戦略的に構築している1細胞解析基盤は、1細胞レベルのゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム等の同時大量取得・解析技術およびそれを支える周辺技術の整備をめざしている。対象は広く細胞の多様性や細胞状態の遷移が関与する多種多様な領域に適用可能である。本篇では、近年注目されている循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell, CTC) についての筆者らの解析を例にとりて記述する。担癌患者にとって、腫瘍の診断やその特性解析を行うために従来は手術などの侵襲のある方法でがんを採取して検査してきたが、これに取って代わって血液中に循環している腫瘍細胞を捕捉して、一細胞から検討できれば、手術などを受ける必要なく、血液検体から診断可能となるいわゆるリキッドバイオプシーが可能となり、患者にとって受ける恩恵は大きい。さらに、治療中や再発時にも容易に検査できることから、治療効果、あるいは腫瘍細胞の変化、耐性獲得などの検討にも応用可能となり、その有用性は計り知れない。

以下、現時点で行っている方法を紹介する。

2. 実験方法

2.1 腫瘍循環細胞 (CTC) などの細胞分離・回収

がん患者の組織検体については、腫瘍採取後、腫瘍を細胞培養液またはPBSに入れ、可及的速やかに眼科用せん刀にて裁断後、フィルターにて残存した組織片や線維成分を除去して、遊離した細胞を採取して、がん表面マーカーの抗体染色を行った。血液検体からは、ファイコールの濃度勾配による遠心分離を行い、単核球成分を採取し、同様にがん特異的表面マーカーの抗体染色を行った。陽性細胞の回収にはセルソーターFACS Aria II SORP (BD) を使い、血液検体からはがんマーカーのポジティブ分画のCTCを、組織検体からは同様にがんマーカーのポジティブ分画細胞である腫瘍細胞 (TC) をそれぞれ回収している¹⁾(Fig. 1)。

2.2 1細胞採取：ピックアップ

回収したそれぞれの細胞をガラスボトムディッシュに移し、顕微鏡下で標的細胞を観察し、直視下にマニピュレータにより細胞ピックアップを実施している。顕微鏡のカメラはDS-Qi2 (ニコン[®]) を使い、いずれの細胞ピックアップにも先端径約5 μm のCellomics Tip CT-5 μm (HUMANIX[®]) を使用した。ピックアップの様子をFig. 2に示しており、細胞がCellomics Tip内に入っていることがわかる。細胞1個をピックアップ後のCellomics Tipは-80°Cで保管した。

Fig. 2. Photograph of single cell picking.
Left: A single cell and the front edge of cellomics tip.
Right: The tip after a single cell picking.

Fig. 3. Isolated CTC cells (neuroblastoma).
Upper: Merging of the bright field and the fluorescence field for Hoechst[®] 33342 imaging ($\times 20$ -fold) GD2⁺CD90⁺.
Lower: Hoechst[®] 33342 imaging.

2.3 一細胞質量分析

細胞を含む Cellomics Tip に数 μL の溶媒を加えた後、同じ溶媒が入った別の容器に Cellomics Tip の先端を浸け、ソニケーションを超音波ホモジナイザー UR-20P (トミー精工[®]) を用いて行った。なお、ソニケーションは、代謝化合物や脂質の抽出効率を高めるための操作である^{1), 2)}。溶媒は 80% メタノール + 10% DMSO + 10% 水 + 0.1% ギ酸

を使用した。質量分析装置は Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) を使い、nanoESI イオン源に Cellomics Tip をセットし、スプレー電圧 1 kV, ポジティブイオンモードで測定した。解析には MarkerView (AB SCIEX) を使い、主成分分析と t -検定を行った。また、Human Metabolome Database (HMDB) を参照して候補化合物の絞り込みを行った。

2.4 一細胞遺伝子発現解析

細胞を採取した Cellomics Tip, もしくは 2.1 で回収した細胞を複数用いて, DNA, RNA を DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany), miRNeasy Mini Kit (Qiagen) にて抽出した. 全ゲノム解析のためにゲノム増幅は REPLI-g Advanced DNA Single cell kit (Qiagen) を用いて 1 細胞, 10 細胞を用いて行い, 増幅したゲノムはエタノール沈殿で回収した. 全ゲノム遺伝子発現解析は, SMART-Seq HT キット (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて 1 細胞, 5 細胞から増幅し, Agencourt Ampur XP (Beckman, Coulter, Brea, CA, U.S.A.) にて精製した. DNA 解析は, 50 遺伝子の 207 増幅領域の 2800 遺伝子変異を検出する Ion Ampli Seq™ Cancer Hotspot Panel v2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.) を用いた次世代シーケンス解析を行い, RNA 解析は, Truseq stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, U.S.A.) または, Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) にてライブラリーを作成して次世代シーケンス解析を行った.

3. 結果と考察

3.1 CTC の採取

血液検体 5 mL 程度から, Ficoll-Paque 濃度勾配法にて単核球分画を採取し, CD45⁻で造血器細胞を除去し, GD2⁺, CD90⁺の細胞をソートにて採取した. 採取細胞数は, 500~700 個程度であった. 採取した細胞は, GD2 陽性, CD90 陽性で, ヘキストの核染色も陽性であった (Fig. 3). 小児であり, 進行例であることも関連しているが, 担がん患者にて CTC は十分採取可能な症例があることが確認された. 胃がん, 大腸がん, 膵がん患者においても, サイトケラチン抗体で CTC を捕捉することに成功しており²⁾, 今後, 癌腫や年齢, さらに進行度, 治療時期の相違から

CTC の採取のタイミングや効率を検討していく予定である.

3.2 一細胞質量分析

3.1 で採取した細胞をピックアップで採取し, 1 細胞解析を行った. 同時に, 腫瘍組織からの遊離細胞もピックアップにて採取して同様に 1 細胞解析を行った. 神経芽腫の患者の CTC と組織がん細胞, ブランクとして溶媒の 3 種を比較した主成分分析の結果を Fig. 4 に示す. CTC と組織がん細胞のそれぞれのグループに分かれており, この傾向は他の患者の神経芽腫検体でも見られた. *t*-検定により CTC と組織がん細胞の両方で検出された共通の化合物を検討したところ, アミノ酸代謝物や脂質類が候補化合物として推定された. また, 予後不良とされる病期 (INSS) 4 期の患者の CTC からは, 神経芽腫の腫瘍マーカーとされるカテコラミン代謝産物が確認され, 同時に嫌氣的解糖系産物が検出された (Fig. 5). これらの結果から, 神経芽腫患者の

Fig. 4. Principal component analysis.

●: CTC, ●: Tissue cancer cells, ●: Blank (solvent only).

Fig. 5. Single-cell cellomics analysis of CTC derived from poorly prognosis INSS4 neuroblastoma patient. Catecholamine metabolites were detected and anaerobic glycolysis products activated by cancer stem cells were detected at the same time.

CTC（循環腫瘍細胞）であることが確認されたとともに、CTCにおいて嫌氣的解糖系の亢進が生じていることが示唆された。

3.3 遺伝子変異解析

神経芽腫の症例での結果では、神経芽腫でしばしば増幅する *MYCN* 遺伝子増幅が CTC 細胞の解析からも容易に検出できた。また、*KIT* 遺伝子変異、*APC* 遺伝子変異が見いだされた CTC が存在し、腫瘍そのものからの DNA では検出できない変異であったことから、CTC 特異的に見いだされる変異もしくは、組織内にあるが極めて少数の細胞でしか起きていない変異であると考えられた。

3.4 遺伝子発現解析

遺伝子発現をみる Transcriptome では、1 細胞由来のリード数は組織そのものに比べ 20～40% にとどまったがアライメント率は 80% 以上と良好であった。これらから、

CTC に特異的に発現している遺伝子を抽出することが可能となった。実際の神経芽腫症例では *XPR1*, *P14*, *LOC*R などの遺伝子発現の上昇が観察され、これらは神経芽腫のシグナル伝達や *MYCN* を介する発現上昇と関連していた。このデータから、CTC は質量分析からの解析結果と同様に、組織を構成する腫瘍細胞とは異なったプロファイルのものであることが示された。

文 献

- 1) E. Hiyama, A. Ali, S. Amer, T. Harada, K. Shimamoto, R. Furushima, Y. Abouleila, S. Emara, and T. Masujima, *Anal. Sci.*, **31**, 1215 (2015).
- 2) Y. Abouleila, K. Onidani, A. Ali, H. Shoji, T. Kawai, C.T. Lim, V. Kumar, S. Okaya, K. Kato, E. Hiyama, T. Yanagida, T. Masujima, Y. Shimizu, and K. Honda, *Cancer Sci.*, **110**, 697 (2019).