

リキッドバイオプシーによる 病態解明から創薬開発支援まで

1 がんリキッドバイオプシー

高齢化が進む多くの先進国において、長年、がんは死因の一位を占めており、がんの病因や転移を引き起こすメカニズムの解明および治療薬の開発が切望されています。がん創薬や治療法の開発、実用化には、がんの特徴を知ることが重要です。ところが、がんは多様性に富んでおり、その性質も時間経過に伴い変化します。そのため、適切ながん医療には、患者さんのがんの状態を経時的にモニタリングし、薬剤選択や治療効果を検証していく必要があります。しかし、腫瘍部位からがん組織を直接サンプリングする従来の組織生検では、患者さんの負担が大きく、継続的なモニタリングが難しいという課題がありました。また、腫瘍部位により不均一性を有する場合、サンプリングが局所的である組織生検では、一部の情報しか得られないという問題もありました。

そこで近年では、体液のサンプリングのみで検査できるリキッドバイオプシーの実用化が進められています。リキッドバイオプシーは、患者さんへの負担が少なく、繰り返し検査によるがんのモニタリングが可能です。さらに、体全体のがんの特性を反映した情報を取得し、がんの全体像を把握できる可能性も示唆されています。

がんリキッドバイオプシーの一つとして、血液中のがん細胞を回収する方法があります。がん患者さんの血液中には、血液循環腫瘍細胞（CTC：Circulating tumor cell）といわれる、がん組織から遊離し血液中を循環しているがん細胞が存在します。このCTCを回収し、解析できれば、がんの情報を得ることができます。しかし、CTCは非常に希少な細胞であるうえに、血中には多量の血液細胞が存在していることから、CTCを分離するのは困難でした。そこで、当社では新たに使い捨てマイクロ流路チップを用いる細胞選別装置を利用したCTC分離技術を開発し、CTCの回収ロスおよび血液細胞の混入を

最小限に抑えながら、血中のCTCを分取する技術確立しました。この技術で回収したCTCは純度が高く、CTCの個数計測に加え、PD-L1やHER2など、抗がん剤の標的となるタンパク質の発現量をCTC上で評価することも可能です。

また、回収したCTCを用いて、腫瘍と関連する遺伝子変異を調べることもできます。がん細胞は、転移巣への移行過程において、遺伝的な変化を伴うため、CTCがもつ遺伝子変異を検出することは、有効な医薬品の選定、治療効果の確認に加え、投与した新薬候補物質の効果や病態のモニタリングに有用です。一方で、CTCのDNAは非常に微量であるため、DNA量を増やす目的で全ゲノム増幅（WGA：Whole Genome Amplification）を行うことが一般的ですが、WGAによる不均一なDNA増幅やアーティファクトな変異の増加などの問題が報告されており、CTCの遺伝子解析を困難にしています。当社では、WGAを回避して、CTC 1個から次世代シーケンサーにより、がん関連の50遺伝子、2,709カ所以上のホットスポット変異を同時検出する分析サービスを提供しております。

CTC以外にもがん診断に有用な細胞外小胞（エクソソームなど）の分離・解析サービスを提供しており、合わせてセルフリーDNA（cfDNA）の分析評価サービスも提供できるよう体制の整備を進めております。これらのサービスが、がん創薬や治療法開発の課題解決に向けた有用なツールになると期待しております。

2 神経変性疾患

認知症やパーキンソン病に代表される神経変性疾患は、脳や脊髄の神経細胞群（ニューロンやアストログリア、オリゴデンドログリア等）が障害を受け、これらが脱落することで生じる病気です。脱落する細胞によって発症する病気は異なりますが、いずれも認知や運動機能の低下といった類似の症状を呈することから、患者さんの層別化は困難です。このため、神経変性

疾患の早期診断や治療に利用可能な客観的なバイオマーカーの開発が求められています。こうした背景を受け、液性バイオマーカーの有力な候補として近年注目されているのがエクソソームです。エクソソームは、私たちの体を構成している様々な細胞から分泌される細胞外小胞の一種で、細胞間情報伝達の担い手であることが明らかにされています。一方で、脳や脊髄の神経細胞群から放出されたエクソソームにはアミロイドβやリン酸化タウ、α-シヌクレイン等の病原タンパク質が積載されて

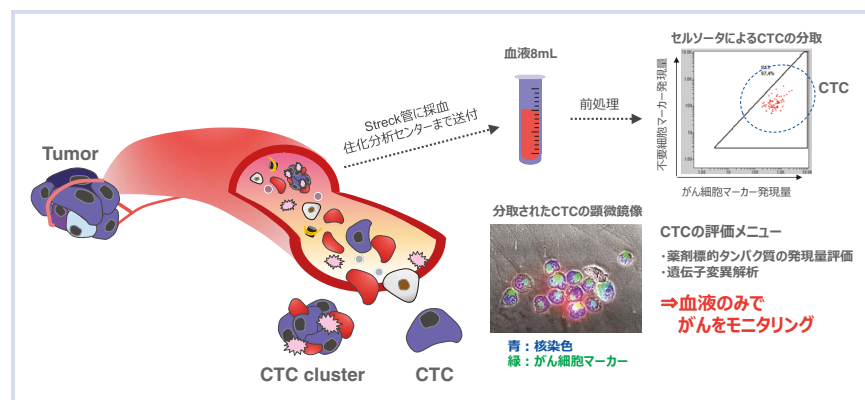


図1 がんリキッドバイオプシーにおけるCTCの概要と利用例

おり、伝播先の細胞で凝集形成を促進している可能性が報告されています。こうした研究成果を基に、神経細胞群由来エクソソームに着目した分子病態機構の解明や、診断・治療における患者さんの層別化、さらには薬剤の治療効果を反映する液性マーカーとしての応用が進められています（図2）。

神経変性疾患におけるエクソソームの臨床応用を目指す上で、神経細胞群由来エクソソームの“選択的回収”は欠かすことのできない技術の一つです。神経細胞群から放出されたエクソソームは血液脳関門を通過し、血液によって循環しています。一方で、血液中には血球細胞や上皮細胞等から放出されたエクソソームも数多く存在しており、従来のエクソソーム解析技術では、神経細胞群由来エクソソームに含まれる特徴的な疾患情報を抽出することは困難でした。こうした技術的課題に対して、当社では、各種神経細胞群に特徴的な表面抗原を指標に、これら小集団エクソソームを血液試料から選択的に回収可能な免疫学的精製技術を開発しました。図3にはその一例として、神経細胞膜糖タンパク質として知られるGPM6aを指標に、ヒト脳脊髄液および血漿試料より回収した神経細胞由来エクソソームのタンパク質解析結果と、それに至るまでの回収プロトコルを示します。回収された神経細胞由来エクソソームには、上に記した病原タンパク質に加え、“生きた脳”の状態、例えばアルツハイマー病患者における脳のインスリン抵抗性などが分子情報として反映されており、新たな創薬ターゲットとしても注目されています。

私たちは現在、血液試料から回収された神経細胞群由来

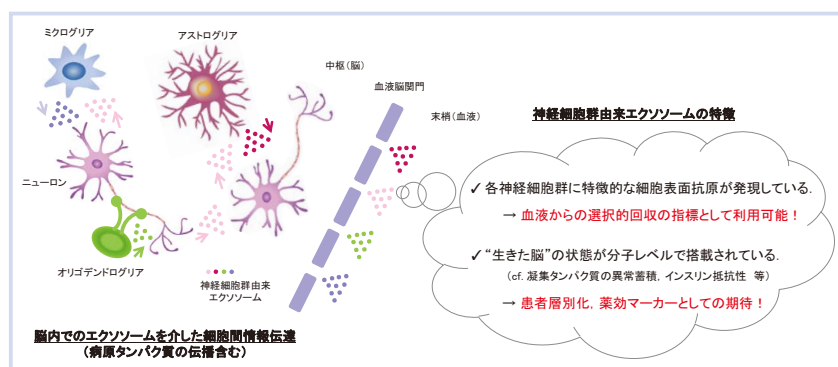


図2 ニューロンやグリア細胞群から放出されるエクソソームとその特徴

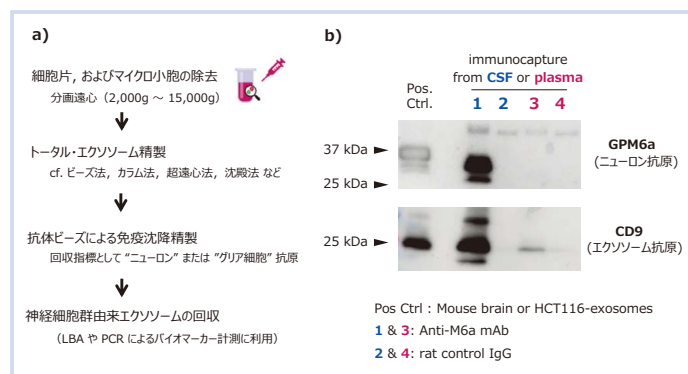


図3 生体試料からの神経細胞群由来エクソソームのa) 回収プロトコル、およびb) ウェスタンブロットによるタンパク質解析結果（1, 2：ヒト脳脊髄液、3, 4：ヒト血漿）

エクソソームを利用して、非臨床から臨床ステージのバイオマーカーとして皆様方に利用していただける高次の解析・計測技術の開発に取り組んでいます。本項で紹介した神経変性疾患に限らず、エクソソームの臨床応用にご興味をお持ちでしたら、お気軽に当社までお問い合わせください。



丸谷 曜子
(まるたに ようこ)
大阪ラボラトリー

〈主な投稿・学会発表〉
1) 丸谷曜子、高橋昭博、岩田美紀、岡嶋孝太郎、十亀祥久：第6回日本細胞外小胞学会学術集要旨集、p.44 (2019)。



村田 崇人
(むらた あかと)
大阪ラボラトリー



高橋 昭博
(たかはし あきひろ)
大阪ラボラトリー

〈主な投稿・学会発表〉
1) 高橋昭博：「先端の分析法」第2版、p.544, (2022)。(株式会社エヌ・ティー・エス)。

対象試料	化学品・化成品 金属 セラミックス ガラス プラスチック・樹脂 ゴム 炭素材料 複合材料 フィルム・膜 添加剤 触媒 接着剤・接合剤 燃料 オイル・潤滑油 バイオマス <u>医薬品</u> 医療機器・医用器械 再生医療等製品 <u>細胞</u> <u>バイオマーカー</u> 化粧品 食品 食品容器・包装材 自動車 電子機器 電池・キャパシタ 電子部品 ウェーハ 半導体 センサー クリーンルーム 製造環境 作業環境 ガス 薬液 水（超純水、純水、飲料水、排水）
シーン	研究開発 設計 製造 品質管理（劣化、異物） 製造管理（異物、汚染） 廃棄物（排ガス） 環境影響（水、河川水、海水、排水、土壌、大気） 安全性 登録 教育
技術・ノウハウ	元素分析・無機分析 クロマトグラフ 表面・形態観察 分光分析 物性評価 化学構造解析 危険性評価 <u>細胞評価</u> 遺伝子解析 オミクス解析 安全性評価 登録申請