

Development of an optimal protocol for molecular profiling of tumor cells in pleural effusions at single-cell level

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2020-03-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中村, 育子 メールアドレス: 所属:
URL	https://jair.repo.nii.ac.jp/records/2002443

授与機関名 順天堂大学

学位記番号 甲第 2197 号

Identification of an alectinib-resistant mutation in EML4-ALK by single-cell sequencing of floating tumor cells in malignant pleural effusion

悪性胸水中腫瘍細胞のシングルセル解析によるアレクチニブ耐性遺伝子の同定

中村 育子 (なかむら いくこ)

博士 (医学)

論文内容の要旨

がん患者のリキッドバイオプシーは、腫瘍の遺伝子変異及び薬剤耐性機序などを非侵襲的に探索可能な検査である。肺がん患者の胸水から肺がんの原因遺伝子変異を検出するには、細胞診やセルブロック検体が用いられてきたが、検体量が不十分な場合や、腫瘍含有率が低い検体では診断できない場合がある。今回我々は胸水より肺がん細胞を濃縮して、網羅的ゲノム解析を行う手法を構築した。まず肺がん患者の胸水を遠心して得られた細胞成分を、血球の細胞表面抗原に対する抗体結合磁気ビーズと反応させた。次に磁気を用いた自動細胞分離機である autoMACS を用いて血球成分を除去した。さらに検体を血球及び上皮系マーカーのそれぞれを用いて免疫蛍光染色を行い、DEPArray で解析を行った。DEPArray は細胞形態と蛍光標識をもとに細胞を選別し、誘電泳動を用いて、1 細胞またはプールとして回収が可能な機器である。DEPArray では血球マーカー陰性、上皮系マーカー陽性の細胞を腫瘍細胞として回収した。回収した細胞は全ゲノム増幅 (WGA) を行ったのち、サンガーシーケンス、全ゲノムシーケンスと、2 種類のパネルシーケンスを行った。サンガーシーケンスでは、回収した細胞の 60-80% から腫瘍特異的なドライバー変異が検出された。全ゲノムシーケンスから EML4-ALK 融合遺伝子の配列の一部が検出され、融合遺伝子特異的なプライマーによる PCR 増幅により、切断点が同定された。WGA は不均一なゲノム増幅と複製エラーが問題となるため、反応条件の最適化による不均一性の是正と、解析パイプラインによるエラー除去を行った。パネルシーケンスでは、ALK 阻害薬耐性変異である ALK G1202R が検出された。今回の解析では 10ml 程度の胸水を用い、autoMACS と DEPArray により腫瘍細胞を濃縮し、網羅的な遺伝子解析を行い、薬剤耐性遺伝子変異が同定された。シングルセル解析を行うことはがんの不均一性を評価するために重要である。本手法は、微量胸水や末梢血の循環腫瘍細胞 (CTC) において、シングルセルレベルでの網羅的なゲノムプロファイリングを行うことで、最適な個別化医療への応用が期待される。