

サイズ分画を利用したCTC cluster診断システムの開発

がん研有明病院 消化器センター

医長 松阪 諭

はじめに

がんの進行過程や抗がん剤（特に分子標的治療薬）による治療により、がん細胞は多様に変化することが知られており、リアルタイムにがん細胞の分子レベルの変化をモニタリングすることが必要である。手術や内視鏡検査によるがん細胞の採取は、患者にとって侵襲が高く頻回に行うことは難しい。そこで患者に低侵襲な手技で頻回に施行できる血液から生体内のがん細胞の情報を得ることにより、リアルタイムに適切な治療を選択できる診断システムの構築が切望され、血液中のがん由来成分をがん診断に利用する「がんの液性診断」の開発に注目が集まっている。

血液中に存在する循環がん細胞（CTC）の診断装置として、セルサーチ・システム（CellSearch™）が唯一FDA認可されている⁽¹⁻³⁾。筆者らは、セルサーチ・システムを用いて、CTC数が胃がん、大腸がんの予後診断および抗がん剤の治療効果予測診断に有用であることを報告してきた^(4, 5)。しかしセルサーチ・システムでは、進行がんであっても、検出率は30-40%と検出感度が低く、医療現場で実用化されていない。その理由として、セルサーチ・システムは、クラスターを形成したがん細胞集塊（クラスターCTC）を取りこぼしていることが考えられる。血液中で遊離・遊走しているがん細胞には、単細胞（CTC）と、クラスターCTCがあり、CTCよりもクラスターCTCの方が、転移・予後に関与している可能性が高いことが報告されている⁽⁶⁾。「CTC」「クラスターCTC」に分画し、それぞれから診断情報を取得するようなデバイスは、これまで開発されてこなかった。このような背景のもと、本申請研究では、血液から「CTC」「クラスターCTC」の2分画に分離し、診断情報を包括的に解析することで、がんに対する治療方針決定のための情報を最大限に引き出すことのできるシステムを開発した。

一般に広く使われているフィルターは不織布を用いているために、分布の広い孔径をもつ。しかしながら、X線リソグラフィーで作製する厳密精密濾過膜は、孔径の均一性が極めて高いのが特徴で、厳密なサイズ分画の材料として最適である。さらに、不織布ベースのフィルターに比べて、圧倒的な開口数を持ち、目詰まり問題の回避にも、厳密精密濾過膜に利がある。すでに筆者らは、厳密精密濾過膜を用いて、高感度なCTCの捕捉を報告している⁽⁷⁾。本研究では、孔径の異なるいくつかの厳密精密濾過膜を組み合わせることで、患者血液を「CTC」「クラスターCTC」の分画に分類し、診断情報を包括的に解析することに取り組んできました。

結 果

平成29年度公益財団法人大和証券ヘルス財団研究助成をいただき、シンクロトロン放射光を利用したX線リソグラフィー技術で作製された孔径の異なる「超精密濾過膜」を組み合わせることで、2分画を同時に分離する装置を開発した。

1. 模擬検体での解析

模擬検体を用いた最適な厳密精密濾過膜の探索

Calceinにて染色した培養細胞HT1080（シングル細胞及びクラスター）をそれぞれ100個培養液中にスパイクした擬似体液（CTC模擬検体及びクラスター CTC模擬検体）を調整し、厳密精密濾過膜の「孔径」をサイズ10、12、15、20 μm で濾過し、それぞれの培養細胞の回収率を測定した。

図1は、CTC模擬検体を濾過した場合の培養細胞の回収率を示す。

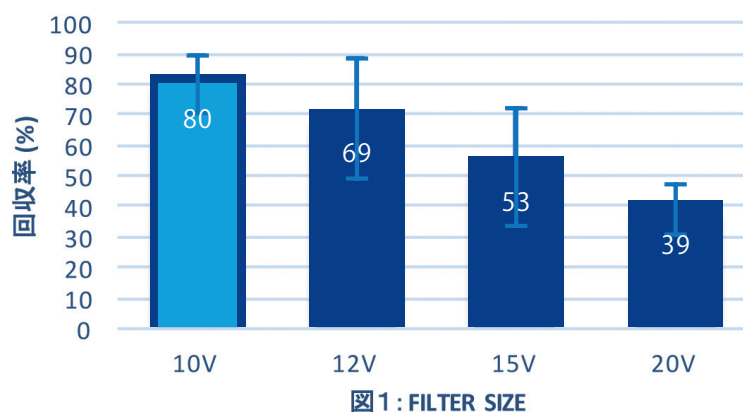
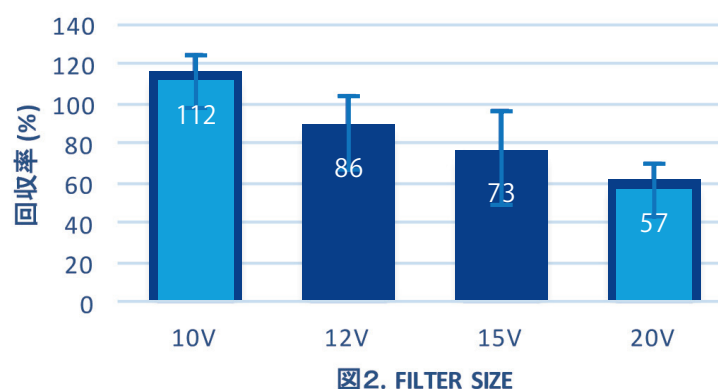


図2は、クラスター CTC模擬検体を濾過した場合の培養細胞の回収率を示す。



2. 患者検体を用いた最適な厳密精密濾過膜の探索

CTC（クラスター CTC）の定量評価

肺がん患者における全血5mlを、15V、10Vフィルターにて濾過し、CTC及びクラスター

CTCを検出した。回収した細胞を、抗EpCAM抗体、Hoechest（核染色）を用いて、蛍光顕微鏡観察を行ない、EpCAM陽性・核染色陽性の細胞をCTCと判定した。

表1. 肺がん患者における CTC 及び Cluster CTC 数

Patients	15µm Filter		10µm Filter	
	No of single cells	No of clusters	No of single cells	No of clusters
1	21	4	7	2
2	5	0	1	0
3	6	2	5	0
4	0	0	10	0
5	0	0	6	0
6	0	3	20	0
7	5	8	8	0
8	2	2	152	3
9	0	0	59	0
10	4	0	39	8

考 察

がん細胞株を用いた模擬検体で、厳密精密濾過膜の最適な組み合わせで、Single cellと Cluster cellsを分別して回収する系を確立した。肺がん患者の血液から15V、10Vフィルターの組み合わせでCTC/クラスターCTCの検出が可能であった。今後他の癌腫での解析を行なう予定である。

要 約

X線リソグラフィーで作製する厳密精密濾過膜は、孔径の均一性が極めて高いのが特徴で、厳密なサイズ分画の材料として最適である。本研究は、孔径の異なる厳密精密濾過膜を組み合わせることで、患者血液を「CTC」「クラスターCTC」の2分画に分類し、診断情報を包括的に解析することを可能とする装置を開発した。

文 献

1. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. N Engl J Med. 351: 781-91 (2004) .
2. de Bono JS, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. Clin Cancer Res. 14:6302-9 (2008) .

3. Cohen SJ, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 26:3213-21 (2008) .
4. Matsusaka S, et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Cancer Sci.* 101 (4) :1067-71 (2010) .
5. Matsusaka S, et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Sci.* 102(6):1188-92 (2011) .
6. Aceto N, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell.* 158 (5) :1110-22 (2014) .
7. Matsusaka S, et al. A novel detection strategy for living circulating tumor cells using 5-aminolevulinic acid. *Cancer Lett.* 355: 113-120 (2014) .