

特集(1)：がんはどこまでわかるようになったか

3. 血中循環腫瘍細胞(CTC)測定・cfDNA濃度測定

八重樫 徹*¹ 中 篤 浩 二*¹ 中川原 寛 一*²

[Key Words] 血中循環腫瘍細胞(CTC)、微小流路デバイス(Microfluidic Chip)、cell-free DNA(cfDNA)、circulating-tumor DNA(ctDNA)

はじめに

血中循環腫瘍細胞(circulating tumor cells ; CTC)は、Thomas Ashworth によって 1869 年に初めて報告された。その後がんの転移との重要な係わりが徐々に認められつつあったものの注目をとみに集めるようになったのは 100 年以上も経ってからであった。その理由の一つには血中に含まれる CTC の量が 1 mL 当たり数個から数十個とごく微量なために測定が難しく、近年飛躍的に進歩した高感度で精密な装置によって漸く真価が見え始めたことが挙げられる。一般的にがんは、組織の最表面に位置する上皮組織から発生し、上皮と結合組織を区切っている基底膜を分解しながら組織浸潤を起こす。そして血管やリンパ管に侵入し、周辺や遠方の臓器へ生着して転移が生じる。この転移の過程で血管内に侵入したがん細胞が CTC である¹⁾。こうした細胞を簡便な末梢血の採取で測定できれば、がんの診断や診療に大変有効と考えられる。

実際に末梢血を調べて見ると CTC は微量のみならず種類も多岐にわたることが明らかとなり、症状と関係することも分かってきた。例えば、浸潤能を獲得した悪性度の高いがん細胞においては、本来の発元である上皮細胞の特徴

を有する上皮系(epithelial)から、しばしば EMT (epithelial-mesenchymal transition)と呼ばれる上皮-間葉転換が生じ、上皮細胞の特徴が失われて間葉系(mesenchymal)の性質へと移り変わって行く。こうして CTC は体内環境に適合し、生き残るためにも性状や形状の異なる亜形(subtype)へと変化することになる。これらの変化を追うことにより、がんの転移や進行状況を的確に把握して高度な治療に役立てることが期待できる。

また末梢血中には細胞が幾つか CTC と一緒に集まった塊(CTC cluster, circulating tumor micro-emboli)や、自らの死滅(apoptosis, necrosis)による残骸、損傷または分解による破片(granular CTC, tumor cell fragment)、粒(tumor micro particle)も検出される。更に死滅によって放出される cell-free DNA(cfDNA)や circulating-tumor DNA(ctDNA)も大量に見つかっており、遺伝子解析も進められている²⁾。CTC と同様に、そのほとんどががん細胞から派生した物質であり、患者の生存率などと強い相関を示す測定結果が報告されている。

CTC を詳しく調べるためには種類に見合った濃縮と分離の技術が欠かせない。本稿では CTC などのがん細胞から派生する物質について様々な検出方法を概説し、intact な CTC を始め上皮系

* Toru YAEGASHI, Koji NAKASHIMA & Kan-ichi NAKAGAWARA

*¹ 株式会社日本遺伝子研究所 開発、*² 同 所長(〒983-0013 宮城県仙台市宮城野区中野 1-5-28)

から間葉系形質までを示すタイプについて、最近注目されている微小流路デバイス (Microfluidic Chip) により分離同定した測定結果を紹介する。また CTC と並んで重要と認められつつある cfDNA について、特に健常者も含めた数多くのサンプルから得られた興味深い濃度測定の結果も紹介する。

I. CTC の検出方法

CTC 測定は、直接的な腫瘍切除や吸引針などで組織を採取する侵襲的な測定と異なり、末梢血を採取する液体生検 (リキッドバイオプシー) の一つで、侵襲性が低く比較的簡便に測定を行えることが大きな利点である。

捕捉検出方法は多岐にわたり、生物学的手法と物理学的手法に大別することがよく行われ³⁾、またそれらを組み合わせたものもある。代表的な例を表に示した。

A. 生物学的手法

1. 表面バイオマーカーによる濃縮

この方法では細胞を捕捉するために細胞表面上に発現された特定のバイオマーカーを用いる。Positive Selection では EpCAM などの腫瘍関連細胞表面抗原をマーカーとして CTC を濃縮する。

市販装置としては抗原を付けた磁性ビーズで濃縮を施す CellSearch® (Janssen Diagnostics) や、AdnaTest (Adnagen AG) が挙げられる。Negative Selection では、CD45 など CTC では発現していない蛋白を抗原にして、目的外の細胞を除去する。装置には CD45 抗原を付けた磁性ビーズによって白血球などを除去する MACS (Miltenyi Biotec) がある。濃縮でも除去でもマーカーの適切な選択によって、目的とするタイプの細胞を逃さないことが要点である。

2. 腫瘍細胞機能の利用

この方法は腫瘍細胞に特有な機能を利用する。例としては、がん細胞で亢進しているとされているテロメラーゼ活性を利用したテロメスキャン®による測定 (オンコリスファーマ) が挙げられる。

B. 物理学的手法

物理学的手法では細胞のサイズ、重さ、電荷などの違いを利用して CTC を濃縮する。まず CTC の多くが血球細胞より大きいことを利用し、マイクロフィルターで濃縮する方法がある。多くの場合、8 μm 程度のマイクロポアを持つフィルターで濾過を施し CTC を回収・濃縮する。装置の例としては、ISET (Reacells)、ScreenCell

表 CTC 濃縮技術

生物学的手法				
細胞表面バイオマーカーによる濃縮				腫瘍細胞機能の利用
Positive Selection			Negative Selection	がん細胞のテロメラーゼ活性亢進を利用テロメロスキャン®
抗-上皮系抗体 例) EpCAM CellSearch® AdnaTest	抗-間葉系抗体 例) N-cadherin	抗-上皮系抗体+ 抗-間葉系抗体 例) plastrin 3	CD45 に対する 抗体 MACS	
物理学的手法				
サイズ	サイズと変形性	密度	電荷	サイズと慣性特性
膜およびろ過によるシステムで濃縮 ISET ScreenCell	マイクロチップ内の標柱を介して濃縮	Ficoll 密度勾配による遠心分離で濃縮 OncoQuick 膜ろ過を組合せ	高い特異性をもつ誘電泳動を介して濃縮 ApoStream	スパイラル構造チップと渦を介して濃縮 ClearCell®
生物学的手法と物理学的手法の組合せ				
サイズによる選択と抗体による濃縮 CTC-iChip				

が挙げられる。

重さの違いは遠心分離で、電荷の違いは電気泳動で選別する。後者の装置としては誘電泳動による ApoStream がある。

CTC は正常な細胞と比較してサイズ以外に形状、広がり、核のあり方が違い、変形しにくい性質もある。従ってこれらの違いを検知してタイプの異なる CTC を分離することも重要になる。このため、細胞程度の大きさの突起や標柱が設けられた幅 100 μm 程度のマイクロチャンネルのような流路に通して分離する方法が考案された⁵⁾。いびつに広がっていたり変形しにくい CTC はマイクロチャンネルを通過しにくくなるので、捕捉されやすくなる⁴⁾。

C. 微小流路

マイクロチャンネルの考え方を大きく発展させたのが Microfluidic Chip である⁵⁾。細胞などを微小空間に溶液として導入し、流路の幅と標柱などの置き方を工夫して対象とする種類の細胞を濃縮、分離、捕捉する。流路側面の面積に対する内部の体積比を大きく取れるので、対象物は狭い流路を側面に沿って制御された流れとなり、自動的で再現性のよいマーカーフリーの選別が可能である。更に導入の前後あるいは流路内においては必要に応じて様々な生物学的、物理学的処理を施すことも併用できる。側面を抗体などで修飾すれば狭小な空間で効率よく対象物と反応させることもできる。

流路の幅は細胞に比べて大きく取れるのでマイクロポアに比べて細胞に大きな力などが掛かりにくく、末梢血中における状態を可能な限り保持することができる。仕組みが単純で高感度の測定が迅速に行える。またナノ加工技術により小型でチャンネル数が非常に多く取れ、大量の試料が並列的に、少ない試薬や溶液を使って安価に処理できるのは測定手段として大きな利点である。

代表的な微小流路デバイスの一つに CTC-iChip がある。流路内に微小円柱アレイが標柱として置かれ、抗 EpCAM 抗体で修飾されて濃縮が施される。サイズに基づく細胞選択という

物理的手法と、造血細胞の枯渇および抗-上皮系抗体による濃縮という生物学的手法を組み合わせることで CTC を回収している。この円柱アレイの間隔を下流になるに従って狭めて、フィルターの役割も持たせた方式の装置が OncoQuick (Greiner Bio-one) である。CTC と血球細胞の分離は比重差を利用し、密度勾配遠心とフィルターによるろ過を組み合わせている。

また、湾曲した流路を持つマイクロチップ内で、遠心力により流路の内側と外側に生じる流速の差によって CTC を回収する ClearCell[®] FX (Clearbridge Biomedics) がある。

II. Microfluidic Chip による分析手順

当研究所では独自あるいは大学などとの共同研究により、Celsee 社の Microfluidic Chip[®] を用いた分析を実施している。この装置には 56,320 ヶ所の滑らかな曲線構造を持つ trapping chamber が Chip 内に設けられており、CTC などが回転しながら導かれる。この立体的構造のためにダメージを極力与えずに intact や viable な CTC が捕捉でき、小さなサイズの smallCTC などでも捕捉できる特長がある。

Microfluidic Chip 法による CTC 測定のフローチャートを図 1 に示した。

検出は Celsee 社に先駆けて様々な改良が加えられている。まず使用する血液量はこれまで 2 mL であったが、現在では 4 mL まで使用することが可能で、非常に高い検出感度が実現した。また抗 Vimentin 抗体での染色・検出が最近できるようにもなった。Vimentin は EMT の分子マーカーとして知られていて、EMT に伴って N-Cadherin などとともに発現が増加する。2016 年 6 月より、核 DNA 染色の DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)、上皮系細胞表面マーカーの Cytokeratin、非白血球識別の CD45 を併せた 3 種 3 色に、Vimentin を加えた計 4 種 4 色による免疫染色の自動化とその検出が確立されたことで、ルーティンベースでの再現性良い CTC 測定を実現している。現在では、更に抗 PD-L1 抗体も組み込んだ検出系が確立されつつある。

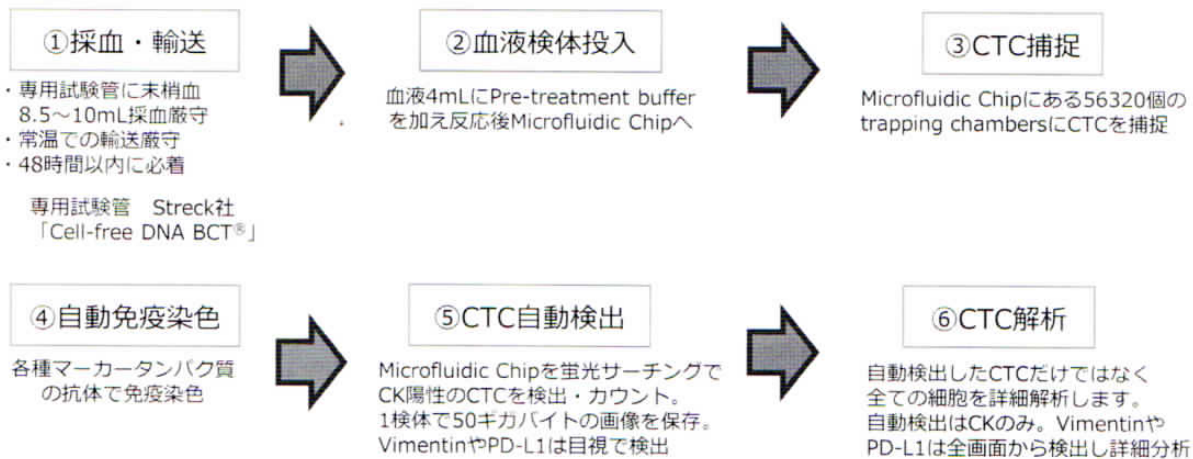


図1 微小流路デバイス法 (Microfluidic Chip) CTC 測定フローチャート

がん患者の多くの症例では深部静脈血栓などの血栓が見受けられるが⁷⁾、Microfluidic Chip にとっては流路の目詰まりにつながって大きな課題である。従来の一般的な CTC 検出法では溶血処理などで防いでいるが、溶血処理を施してしまうと EMT を起こしている細胞、特に mesenchymal 細胞が溶けてしまったりする現象が観察される。そのため、溶血処理を施す手法では転移マーカーを有する細胞を逃してしまう可能性があると考えられる。

これらの課題は、血液サンプルを Microfluidic Chip へセットする直前に Pre-treatment buffer で処理することで克服され、現在では溶血処理も遠心処理も施さず細胞へのダメージを完全にシャットアウトした状態で、血液サンプルを目詰まりなしで Microfluidic Chip へ導入することが可能となっている。

III. CTC の測定結果例

Microfluidic Chip により細胞を捕捉し、免疫染色を施した検出結果について幾つかの例を示した。いずれも DAPI、CD45、Pan-Cytokeratin Vimentin の 4 種 4 色の組み合わせで CTC を判定している。

図 2(a) は典型的な上皮系形質の CTC (上から clusterCTC、通常サイズの CTC、smallCTC) の検出例である。clusterCTC は単体に比べて転移性が高いと言われているタイプである²⁾。図 2(b) は上皮形質から EMT への模式図とその検

出例である。がん細胞は悪性度が高まるにつれて上皮様の状態から線維芽細胞様の間葉の状態へ変化する。従って EMT に伴って CTC 表面に発現する物質も変化し、上皮細胞で発現が認められる Cytokeratin などの細胞表面マーカーが徐々に失われ、上皮形質および間葉形質の両方を示すハイブリッド細胞 (準安定; metastable 細胞) の存在が報告されており⁸⁾、図 2(b) ではこのハイブリッド状態が捉えられている。図 2(c) は間葉系形質 CTC (上から clusterCTC、通常サイズの CTC) の検出例である。

IV. Cell-free DNA の濃度測定例

リキッドバイオプシーのなかで、CTC と並び血液中のバイオマーカーとして研究が進められているのが cfDNA である⁹⁾。CTC に似て発見は古く 70 年前の 1948 年に遡るが、がん遺伝子が検出されるまでには 40 年を要した。cfDNA とはヒト血液中に 166bp を中心に 332bp、498bp などのサイズで存在している細胞外遊離 DNA 断片のことを指す¹⁰⁾。この cfDNA は細胞がアポトーシスなどの細胞死を起こす際に、血中に放出されたものと考えられる。

健常者では主に血球系細胞の死滅に由来する DNA 断片が微量に存在する。一方がん患者においては、がんの発生により、がん細胞が免疫により破壊されたり、自ら細胞死(アポトーシス)を起こしたり、血中に漏れ出した CTC が何らかの影響によって血中で破壊されたりして、cfDNA の

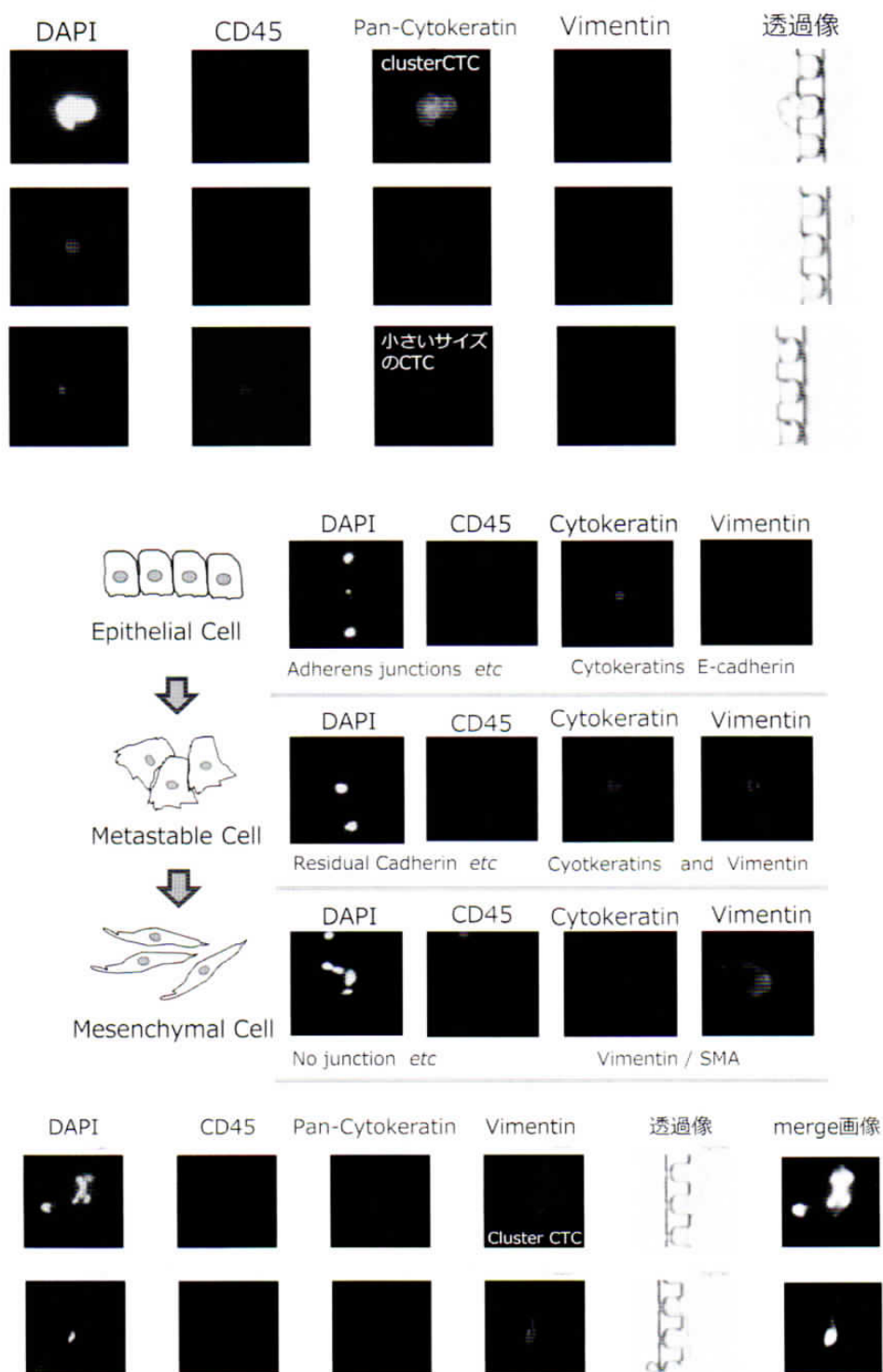


図2 CTCの測定結果例(株式会社日本遺伝子研究所)

- (a) 典型的な上皮系形質のCTC検出例。上から clusterCTC、通常サイズの CTC、smallCTC。
- (b) 上皮系形質から EMT への模式図とその検出例。(c) 間葉系形質 CTC の検出例。

一部にがん細胞由来の DNA 断片である ctDNA が混在していることが知られている。

血液中の cfDNA 濃度は、がん患者では健康者よりも高いという報告があるが¹¹⁾、まだ健康

者の測定例が少なく、抽出方法、測定方法もそれぞれの報告で異なっていて健康者における通常濃度の範囲は明確ではないと思われる。

図3に cfDNA 濃度測定の手順を示した。採血



図3 cfDNAの濃度測定手順

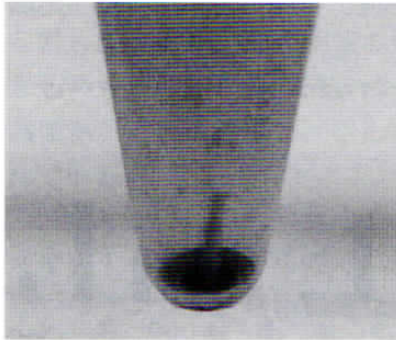


図4 血漿 16,000g 遠心分離後のチューブ写真

管として血中有核細胞からの DNA 放出を抑えるという原理に基づいた Cell-Free DNA BCT® (Streck 社)を用い、回収した血漿は抽出直前に 16,000g で 10 分間遠心分離した上清を用いた。その際、回収時に見られる沈殿物(図4)に対して十分上層部の上清のみを採取した。この手順は高分子量の DNA 断片が混入する影響を抑えるために残存細胞由来のバックグラウンドを極力排除して正確に cfDNA 濃度を測定するためのものである。

血漿からの cfDNA 抽出にはスピニングカラムを利用するタイプもあるが、操作時間再現性の面で優れた磁気ビーズ吸着法を用いた。また、cfDNA 濃度決定には高感度な Agilent 2200 TapeStation System などのフラグメントサイズを確認できる手法を採用し、当研究所では採血管、cfDNA 抽出方法、cfDNA 解析方法を統一して数多くの健常者も含めた cfDNA 濃度測定を実施している。図5に健常者とがん患者の cfDNA 濃度測定結果を示した。両者で濃度がオーバーラップしている領域が中間にあり、興味深いデータが得られている。

cfDNA の定量に用いられる方法には蛍光色素法、分光光度法、定量 PCR(qPCR)法もある¹²⁾。

また、最近では cfDNA 濃度を便宜的に評価できるリアルタイム PCR 製品が市販されている。これはノンコーディング DNA の部類に属する LINE-1 (long interspersed nuclear element-1) 配列を利用するもので、LINE-1 はヒトゲノムの 17%を構成し、ゲノムあたり約 520,000 コピーを有する。この LINE-1 を定量リアルタイム PCR のターゲットとして、血漿・血清中の低濃度の cfDNA 濃度を評価している報告がある¹³⁾。cfDNA のフラグメントサイズ分布を知ることはできないが、同一条件で抽出された cfDNA 濃度の相対比較は求められる。

V. Circulating-tumor DNA

cfDNA に対してもう一方の ctDNA は、がんの種類ごとに特異的な体細胞変異を確認することが期待できるため、近年注目されている¹⁴⁾。先にも述べたように、通常の cfDNA の大半は正常細胞由来であり、進行がん患者であっても、ほとんどの場合、がん由来の ctDNA 分画は 1%未滿とごく微量である。ctDNA を検出するためには、サンプル中からわずかな変異を検出する方法が必要となる。

安定した ctDNA の検出は Sanger 法や定量 PCR などの従来の変異解析法では困難であったが、次世代シーケンサー(NGS)、digital PCR などの技術進歩により現実的なものとなった。NGS を用いた変異解析の長所は網羅的に関連遺伝子変異をスクリーニングできることにある。更に、現在開発されているすべての腫瘍に対する網羅的なあるいは特定のがん種に特異的なホットスポットパネルを利用することにより、半網羅的なターゲットシーケンスが可能となっている。

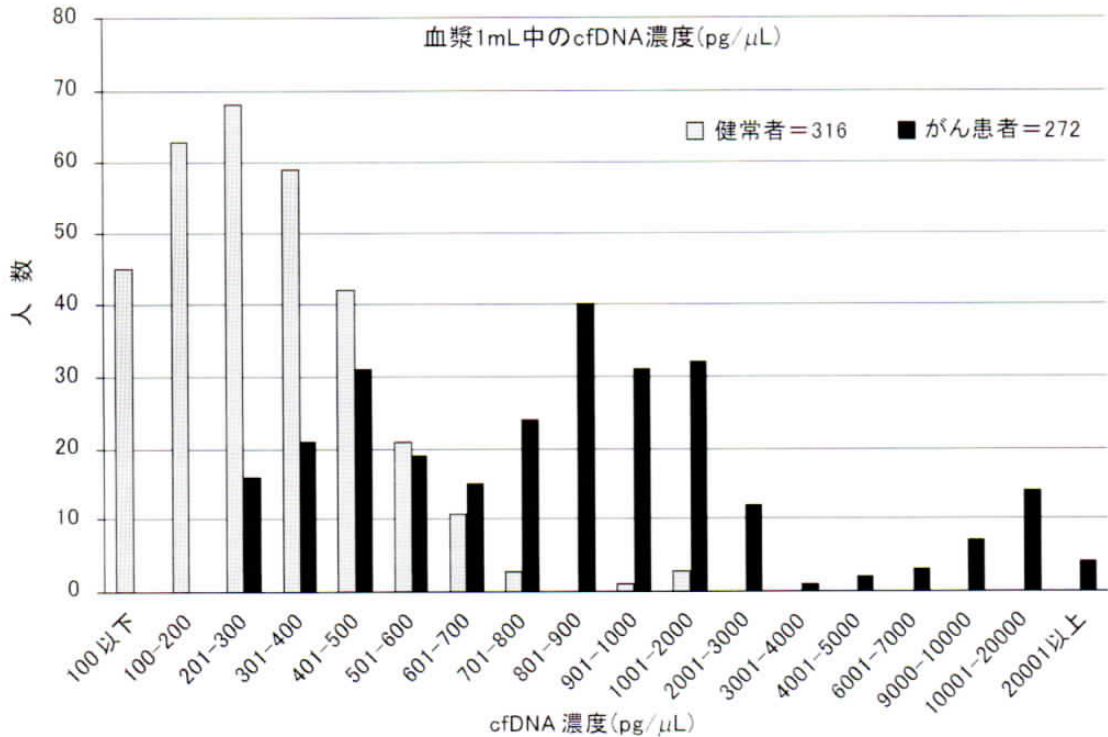


図5 健常者・がん患者における cfDNA 濃度測定結果 (株式会社日本遺伝子研究所) (転載禁止)
 採血管: Cell-Free DNA BCT® (Streck)
 抽出キット: MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit (ThermoFisher)
 濃度測定: Agilent 2200 TapeStation System (Agilent)
 諸大学・諸施設との共同研究によって得られた年齢・性別・病状経過など除外した
 「がん患者」と「健常者」の cfDNA 濃度データ (166 bp, 332 bp, 498 bp, ...合計)

一方の digital PCR は、従来の qPCR より高感度な定量が可能と言われており、網羅的な変異検出には不向きな面もあるが、低頻度の ctDNA 配列を感度よく検出できる手法である。Hypercool テクノロジー™ によるプライマー・プローブを digital PCR に用いて更に感度を高めて、ctDNA における症例特異的レア変異を比較的廉価で効率的にモニタリングする実施例もある。また、digital PCR の技術コンセプトを持つものとして BEAMing (beads, emulsion, amplification, magnetics) 法が開発されている¹⁵⁾。更に、現在では検出感度の面と網羅的検出という点を併せ持つ分子バーコード法を用いた ctDNA 解析法が登場している¹⁶⁾。

VI. まとめと課題

進行がんや転移がんの患者において、転移の過程で血管内に侵入し体内を循環しているがん

細胞である CTC の存在が知られるようになり、末梢血から CT 画像では見えない「微細がん」の検出も可能なことから、CTC 測定は比較的 low cost の分子病理測定 (リキッドバイオプシー) の一つとなっている。CTC 登場時には脚光を浴び称賛された一方、当初の方法ではがん細胞の種類によっては検出できないものもあったが、現在では Vimentin 抗体により CTC の「subtype」である間葉系細胞の検出が可能となり、EMT の過程である上皮系様と間葉系様を併せ持つ準安定状態 (metastable) の細胞や、肉腫の間葉系細胞の検出も可能となった。また、典型的な CTC の指標「CD45 陰性/Cytokeratin 陽性」とは異なる「CD45 陽性/Cytokeratin 陽性」を示す細胞の報告¹⁷⁾と同様の染色状態を示す細胞の検出を経験している。新たに最近話題となっている免疫チェックポイントの検出での PD-L1 抗体を用いた検出では、Cytokeratin 陽性細胞や MDSC

に PD-L1 陽性が見られるなど、様々なパターンがあることが分かってきた。しかしながら、免疫染色を伴う手法においては、染色の操作や作業によって影響を受けて偽陽性などを生じることがあり、この点においては装置の自動化による高い再現性が重要となる。また、抗体試薬のロット間差、抗体試薬メーカーの組み合わせなどによる難しさもあり、CTC 測定 of 技術進歩には目覚ましいものがあるが、CTC はまだまだ奥深い領域であることも事実で、さらなる研究が求められている。

cfDNA, ctDNA についても同様のことが言え、腫瘍の構成要素としての関心は高く、測定のための高度なシーケンシング技術の更なる開発が必要である。

文 献

- 1) Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Molecular Medicine* 2015; 7(1): 1-11.
- 2) Hong B, Zu Y. Detecting circulating tumor cells: Current challenges and new trends. *Theranostics* 2013; 3(6): 377-94.
- 3) Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nature Reviews Cancer* 2014; 14: 623-31.
- 4) Bagnall JS, Byun S, Begum S, et al. Deformability of tumor cells versus blood cells. *Scientific Reports* 2015; 5(18542): 1-11.
- 5) Nilsson J, Evander M, Hammarstrom B, et al. Review of cell and particle trapping in microfluidic system. *Analytica Chimica Acta* 2009; 649(2): 141-57.
- 6) Riahi R, Gogoi P, Sepehri S, et al. A novel micro-channel-based device to capture and analyze circulating tumor cells (CTCs) of breast cancer. *Int J Oncol* 2014; 44: 1870-8.
- 7) 江本 精. 癌と血液凝固. *日産婦誌* 2000; 52(7): 138-41.
- 8) Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, et al. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006; 172: 972-81.
- 9) Volik S, Alcaide M, Morin RD, et al. Cell-free DNA(cfDNA): Clinical significance and utility in cancer shaped by emerging technologies. *Mol Cancer Res* 2016; 14(10): 898-908.
- 10) Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM, et al. Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. *Int J Cancer* 2013; 133: 346-56.
- 11) Spindler KL, Appelt AL, Pallisgaard N, et al. Cell-free DNA in healthy individuals, noncancerous disease and strong prognostic value in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2014; 135(12): 2984-91.
- 12) Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer: a survey. *Bba-Rev. Cancer* 2007; 1775: 181-232.
- 13) Rago C, Huso DL, Diehl F, et al. Serial assessment of human tumor burdens in mice by the analysis of circulating DNA. *Cancer Res* 2007; 67(19): 9364-70.
- 14) Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discovery* 2016; 6: 479-91.
- 15) Dressman D, Yan H, Traverso G, et al. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(15): 8817-22.
- 16) Kukita Y, Matoba R, Uchida J, et al. High-fidelity target sequencing of individual molecules identified using barcode sequences: de novo detection and absolute quantitation of mutations in plasma cell-free DNA from cancer patients. *DNA Res* 2015; 22: 269-77.
- 17) Pan D, Das A, Liu D, et al. Isolation and characterization of intestinal epithelial cells from normal and SIV-infected rhesus macaques. *PLoS One* 2012; 7(1).