

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861057

研究課題名(和文) 新しい血液中循環がん細胞分離デバイスを用いた乳がん患者からのCTC検出とその意義

研究課題名(英文) The circulation tumor cells detection from patients with breast cancer using new device

研究代表者

近藤 直人 (KONDO, NAOTO)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90529166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：選択性の3Dフィルター型CTC分デバイスをさらに改良して、マニピュレーターを用いて自動単離できるように装置の改良を試みたが、細胞の接着などのためキャピラリーによる迅速な吸引、吐出が困難なことが判明した。そこでマニピュレーターによるCTCの単一細胞採取は中止し、フィルターからスライドグラスにCTCを直接転写する方式に切り替えた。これにより単一細胞採取はできなくなったが迅速、簡便なCTC回収が可能となった。少数の白血球のコンタミは免疫染色や遺伝子解析にほとんど影響しなかった。この方法を用いて乳がん患者の末梢血から簡便、迅速にCTCを検出し、さらに免疫染色や遺伝子解析が可能なシステムを構築した。

研究成果の概要(英文)：We improved 3D filter type CTC isolation device of the rhinoceroses selectivity more and tried the improvement of the device to isolate it using a manipulator automatically, but it became clear for the adhesion of cells that quick aspiration, regurgitation by capillary were difficult. Therefore we canceled the single cells sampling of CTC with the manipulator and changed it to a method to copy CTC from a filter to object glass directly instead. The single cells sampling was not possible, but quickness, simple and easy CTC recovery were thereby enabled. Of few leukocytes contaminating it hardly influenced immunostaining and a genetic analysis.

研究分野：breast cancer

キーワード：breast cancer CTC filter

## 1. 研究開始当初の背景

CTCは2000年以前から上皮特異的なCEA、KeratinなどをマーカーとするRT-PCR法により定量的に検出できるようになったがRT-PCR法は間接的な手法であり、精度も十分ではなかった。2002年に上皮細胞接着分子(EpCAM)抗体磁気ビーズを用いてCTCを選択的に分離・計数できる装置CellSearchシステム(Veridex社)が発表された。これを用いて2004年にCristofanilliらがCTCの数と患者の予後不良との間に相関があることが報告して以来、世界各地でCTCに関する多くの臨床研究が実施されている。現在、CellSearchはアメリカのFood and Drug Administration(FDA)で承認されている唯一のCTC検査装置である。CellSearchは、世界に先駆けてCTC計数法を提供したが、時間がかかり、かつ高コストという短所以外にも、上皮間葉転換(EMT)によりEpCAMが陰性化したCTCを検出できないという大きな欠点が指摘されてきた。近年、これに代わるEpCAM抗体に依存しない分離法としてCTCが血液細胞よりもサイズが大きいことを利用して、フィルターをベースにしたサイズ選択性分離法が開発されてきた。この方法は白血球が $7\mu\text{m}$ 以下であるのに対し、大多数の上皮がん細胞株はサイズが $10\mu\text{m}$ より大きいという事実に基づいている。愛知県がんセンター研究所と名大工学部の医工連携で開発している3D metal filter型CTC分離デバイスはリソグラフィーと電鍍技術を組み合わせた超微細加工により $8\mu\text{m}$ のporeの上部に $30\mu\text{m}$ のCTCがすっぽり入るPocketを高密度( $100,000/\text{cm}^2$ )に設けた3次元メタルフィルターを組み込んだ小型のポンプレスデバイスである。本デバイスは簡便、低コストかつ高感度、しかもCTCを1個ずつ分離・回収できるデバイスであり、遺伝解析も可能である。培養がん細胞を健常人血液に添加するスパイク実験で本CTC

分離デバイスの回収率を検討すると、85%以上であり、しかも血液5mlの処理時間は20分と迅速性も兼ね備えている。

本CTC分離デバイスを用いて少数の転移性乳がん患者の血液と健常人血液を検討したところ、患者からEpCAM+/CD45-/DAPI+形質を示すCTCが検出されたのに対し健常人では明らかなEpCAM+/CD45-/DAPI+細胞は検出されなかった。このように本研究では既にCTC分離デバイスのプロトタイプが作成済みである。

## 2. 研究の目的

(1) これまでに開発してきている上記フィルター型デバイスをさらに改良して、乳がん患者の末梢血から簡便、迅速かつ高精度にCTCを検出し、さらに1細胞を単離できるシステムを構築する。

(2) 上記CTC分離デバイスを用いてFISH法や免疫蛍光染色法によりCTCのHER2やホルモン受容体(ER/PgR)などの発現(陽性、陰性の判定)を行える方法を確立する。

(3) 単離した1個のがん細胞から抽出したRNA、DNAを用いて、上皮マーカーだけでなく、HER2やホルモン受容体(ER/PgR)などの発現を定量RT-PCR法で、また1細胞の遺伝子変異をダイレクトシーケンスで測定できる手法を確立する。

(4) 上記、改良型デバイスを用いて乳がん患者検体50-100例を測定し、CTC数とステージや転移との関連など各種臨床病理パラメーターとの相関性を検討する。またCTCにおけるHER2やホルモン受容体(ER/PgR)などの遺伝子発現や遺伝子変異を調べ、そのデータと原発巣のデータを比較し、CTCが“Liquid biopsy(液体細胞診)”として使えるか否かを検証する。

## 3. 研究の方法

近年、これに代わるEpCAM抗体に依存しない分離法としてCTCが血液細胞よりもサイズが大きいことを利用して、フィルターをベースにしたサイズ選択性分離法が開発されてきた。

この方法は白血球が7  $\mu\text{m}$ 以下であるのに対し、大多数の上皮性がん細胞株はサイズが10  $\mu\text{m}$ より大きいという事実に基づいている。愛知県がんセンター研究所と名大工学部の医工連携で開発している3D metal filter型CTC分離デバイスはリソグラフィと電鍍技術を組み合わせた超微細加工により8  $\mu\text{m}$ のporeの上部に30  $\mu\text{m}$ のCTCがすっぽり入るPocketを高密度(100,000/cm<sup>2</sup>)に設けた3次元メタルフィルターを組み込んだ小型のポンプレスデバイスである。本デバイスは簡便、低コストかつ高感度、しかもCTCを1個ずつ分離・回収できるデバイスであり、遺伝子解析も可能である。培養がん細胞を健常人血液に添加するスパイク実験で本CTC分離デバイスの回収率を検討すると、85%以上であり、しかも血液5 mlの処理時間は20分と迅速性も兼ね備えている。

本CTC分離デバイスを用いて少数の転移性乳がん患者の血液と健常人血液を検討したところ、患者からEpCAM+/CD45-/DAPI+形質を示すCTCが検出されたのに対し健常人では明らかなEpCAM+/CD45-/DAPI+細胞は検出されなかった。このように本研究ではまず、CTC分離デバイスの作成をおこなった。

#### 4. 研究成果

EpCAMなどのキャプチャー抗体を用いたCTCの分離、検出デバイスを用いた臨床研究により乳がん患者においてCTCの数が予後予測因子や化学療法の効果予測因子になることが報告されている。しかし、従来の上皮細胞マーカーを用いた分離システムではCTCを見逃しやすく、また高コストであり、いまだ一般臨床に普及するには至っていない。本研究ではCTCを細胞のサイズ

差によって分離するFilter型CTC分離デバイス(プロトタイプ)にさらに改良を加え、CTCを簡便に回収できるデバイスを作成した。このデバイスを用いて乳がんCTCマウスモデル及び臨床検体を用いて、CTCの診断的意義やLiquid biopsyとしての応用可能性について検討した。本研究でははじめに、乳がん細胞株MDA-MB231-GFP(TN)およびBT474(HER2+)を皮下接種して作成したマウスCTCモデルを用いて、肺転移のない早期群マウスと移植2カ月以上たち肺転移を有する後期群マウスの末梢血CTCの測定を行い、CTC数を比較検討した。その結果、CTC数は肺転移の出現と強い相関性を示すことが判明し、低侵襲にCTCをモニタリングすることにより転移を早期に発見できる可能性が示唆された。また本法を用いた免疫染色によりHER2+担がんマウス血液からHER2+CTCの検出が可能であった。次に非転移および転移性乳がん患者20名のCTCについて検討した。

Keratin+/EpCAM+/CD45-/Hoechst+による暗視野での蛍光検出単独に比べて、スライドグラス上に転写したCTCの細胞診を併用した本法によりCTC検出率の有意な増加が認められた。また継時的に採取できた1名の化学療法非感受性患者(PD)では、CTCは治療後も減少せず、逆に増加傾向を示した。

以上のことから、本CTC検出デバイスとマウスCTCモデルを用いて、繰り返しのCTC検出が転移の早期診断になりうる可能性があること、また従来法に比べて臨床検体におけるCTC検出率が高いことから、CTCによるHER2/ER/PRなどのサブタイプ解析が可能であり、遺伝子診断法などのさらなる改良によりLiquid biopsyとしての応用可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

中西速夫、寺澤佳世子、益田泰輔、山本修平、岩田広治、近藤直人、伊藤誠二、新井史人、本多裕之、遊佐亜希子「新規 CTC 分離デバイスを用いた担がんマウスモデルにおける CTC の動態解析」 第 73 回日本癌学会学術総会 2014/9/26 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 直人 (KONDO NAOTO)  
名古屋市立大学・医学研究科・助教  
研究者番号：90529166

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

中西 速夫 (NAKANISHI HAYAO)  
愛知県がんセンター研究所・腫瘍病理学  
部・研究員  
研究者番号：20207830