

原 著

血中循環腎癌細胞回収について

On-chip Sort[®]と ClearCell FX[®]システムとの比較検討

昭和大学医学部泌尿器科学講座

松井 祐輝 直江 道夫* 太田 実香
下山 英明 鷗 木 勉 中里 武彦
押野見和彦 森田 順 前田 佳子
富士 幸蔵 小川 良雄

抄録：現在，がんの治療は目覚ましい進展を遂げている。疾患経過の様々な時点で迅速かつ低侵襲的にバイオマーカーを同定することは，治療効果と予後を評価または予測する一助となる。近年は組織生検に代わる方法として「Liquid biopsy」に対する注目が大きく高まっている。この「Liquid biopsy」の一つに，血中循環腫瘍細胞（Circulating Tumor Cells：CTCs）がある。転移性癌患者の血液中にはCTCsと呼ばれるがん組織由来の細胞が微量に循環していることが知られている。血中に存在するCTCsの数を測定することは，転移性癌に対する治療効果の判定や病勢把握に有用である。CellSearch[®]システムは，米国FDA（Food and Drug Administration）の承認を受けた唯一のCTCs検出装置である。CTCs検査は，転移性大腸癌，乳癌，前立腺癌の治療効果の判定や予後予測因子としての有用性が認められている。しかし，CellSearch[®]システムはEpCAM（Epithelial cell adhesion molecule；上皮細胞接着分子）の抗体を用いた免疫磁気的手法に基づくため，EpCAM非発現細胞の捕捉が困難な点が近年指摘されている。今回，EpCAM非依存的にCTCsを同定する方法として，腎癌特異的なG250抗原をターゲットとしたOn-chip Sort[®]とClearCell FX[®]システムを用い，CTCsの捕捉回収率を比較検討した。On-chip Sort[®]による腎癌CTCsの回収率は75%程度であったのに対し，ClearCell FX[®]システムの場合は33%～69%であった。腎癌CTCsの同定において，G250抗原をターゲットとしたEpCAM抗原に非依存的なOn-chip Sort[®]システムが，ClearCell FX[®]システムに勝っていた。

キーワード：血中循環腫瘍細胞（CTCs），リキッドバイオプシー，ClearCell FX[®]，On-chip Sort[®]

緒 言

がん患者の血液中には，血中循環腫瘍細胞（Circulating Tumor Cells：CTCs）と呼ばれるがん組織由来の細胞が微量に循環していることが知られている。原発腫瘍組織または転移腫瘍組織から血中へ遊離した細胞がCTCsであり，1. 核染色陽性，2. サイトケラチン陽性，3. CD45陰性の細胞と定義されている。すなわち，有核で上皮系マーカーを発現し，白血球共通抗原（leucocyte common antigen：LCA）を発現していない細胞がCTCsと定義される。このCTCsは固形転移性癌患者の末梢血中に微量存在している事が知られており，血行性転移

に関与すると考えられている。

泌尿器科癌領域においては，腎癌や尿路上皮癌のような血清マーカーの無い癌の経過は，画像診断による腫瘍径の評価に依存している。しかし，画像診断では腫瘍径を測定することは可能だが，その腫瘍が活発に増殖しているのか，もしくは休眠状態にあるのかを知ることは不可能である。また，一般的には画像検査は数か月間隔で行うため，治療の有用性を即時に判断することは困難である。そこで，末梢血循環腫瘍細胞（CTCs）検査は，効率的な癌治療を行うために治療中にいつでも正確な病態を把握可能となる点で，今後重要な意義を持つと考えられる。CTCs検査は非侵襲的に癌の病態予測を行うことが出

*責任著者

来る有効なツールとして、近年認識されつつある²⁻⁶⁾。

バイオマーカー検査のためには腫瘍生体検査（バイオプシー）を行う必要があるが、侵襲性の高さが問題である。現在、腫瘍生検と同等の検査を液性の生体試料（主に血液）を用いて行う液性生体検査（リキッドバイオプシー）研究が盛んに行われており、実用化されれば、これまでの腫瘍生検に代わり末梢血から腫瘍の情報を得ることができるため、組織の採取が困難な患者からでも繰り返し検査が可能になる。CTCsは転移性がん患者の血液10 mlに含まれる $10^8 \sim 10^9$ 個の血球成分のうち数個程度しか存在しない大変希少な細胞である。最近の微量細胞の分離・分析技術の進歩に伴い、CTCsを単離し、分子レベルで解析できるようになってきている。CTCsの同定原理は免疫学的方法、物理的方法の二つに大別される。今回われわれは、免疫学的方法のOn-chip Sort[®]システム（図1）と物理学的方法のClearCell FX[®]システム（図2）を比較検討した。

一つは免疫学的方法に基づいたCTCs同定法である。現在FDAの承認を受けた唯一のCTCs検出法

であるCellSearch[®]システムは、代表的な免疫学的方法による血液中のCTCs数を測定する方法であり、転移性大腸癌、乳癌、前立腺癌の治療効果の判定や予後予測因子としての有用性が認められている¹⁾。

CellSearch[®]システムはCTCsの細胞表面に存在する表面マーカーと磁気ビーズを用いてCTCsを選び取るPositive Selection法を用いている。CellSearch[®]システムはEpCAM（Epithelial cell adhesion molecule；上皮細胞接着分子）のモノクローナル抗体を用いた免疫磁気的手法（CellSearch[®]）を基礎とするシステムであり、EpCAMとサイトケラチンを発現している細胞を癌細胞として捉え、混在する白血球をCD45陽性細胞として除外する方法である⁷⁾。しかし近年、EMT（Epithelial Mesenchymal Transition；上皮間葉転換）現象を起こした細胞ではEpCAMの発現低下もしくは、消失により、抗EpCAM抗体では検出することが出来ないことが指摘されている¹¹⁾。つまりCellSearch[®]システムにおいては取り逃しているCTCsの存在が指摘されている。抗EpCAM抗原を用いたエンリッチ法

“On-chip Sort”

マイクロ流路チップ・セルソーター



細胞分離用 マイクロ流路チップ



- 細胞へのダメージ・フリー
- 無菌環境下での分収を実現
- 培養液中でも分収が可能
- 微量サンプルに対応
- クリーンベンチ内に設置可能

図1 CTC濃縮回収装置であるOn-chip Sort[®]システムであるマイクロ流路チップの採用している為、ダメージフリーで細胞分離が可能である。

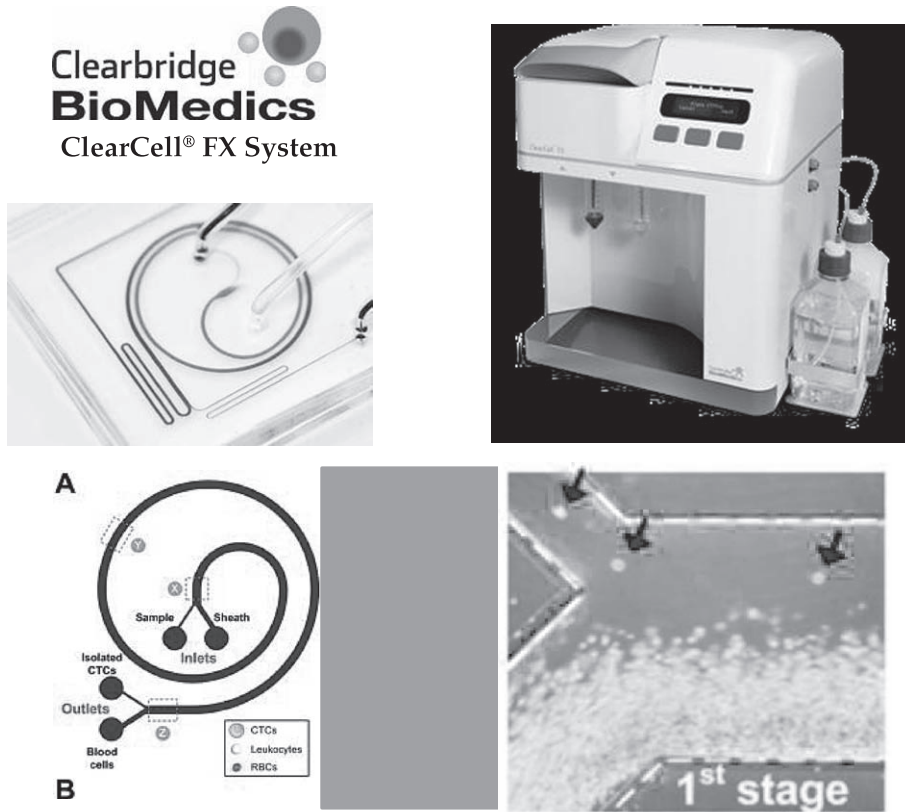


図 2 CTC 濃縮回収装置である CellSearch[®]システムである
物理学的に CTCs を回収するので、EpCAM 非依存的に CTCs 回収が可能である。

(EpCAM 抗体磁気ビーズによる CTCs のキャプチャー) には課題も多く、次々と EpCAM 抗原に依存しない新しい CTCs の検出法が開発されてきている。そこで EMT を起こした CTCs の取り逃がしを改善する目的で、On-chip Sort[®]システムと Dynabeads[®]CD45 を用いた CD45 depletion 法と腎癌特異的な抗 G250 抗体を組み合わせた腎癌 CTCs 同定方法を紹介する。この方法は正常な血球細胞を表面マーカーと磁気ビーズを用いて取り除く Negative Selection 法を用いている。Dynabeads[®]CD45 とは抗 CD45 抗体に磁性ビーズが共有結合しており、末梢血単核球に発現する CD45 抗原と結合する。末梢血単核球と Dynabeads[®]CD45 が結合したものを分離用磁石に通過させると、末梢血単核球のみが分離用磁石に捉えられ、抗 CD45 抗体陰性細胞が CTCs として回収される。この方法でおおかたの末梢血単核球は除外されるが、その除外は完全ではないので、次に腎癌 CTCs 特異的な抗 G250 抗体と抗 CD45 抗体による CTCs と残留末梢血単核球

の識別を On-chip Sort[®]システムで行っている。マイクロチップ型セルソーター On-chip Sort[®]は上部のサンプルおよびシース液リザーバーから下部の廃液リザーバーまでがマイクロ流路チップ上で完結している。標的細胞が検出されると、Push-and-Pull 方式により標的細胞のみが回収リザーバーに回収される仕組みとなっている。これは、アプライしたサンプルをエアで押し出す方式を採用しており、チャンバー内のサンプルを全量解析でき、また流路長がマイクロメートルレベルでデッドボリュームが 0.01 μ l 以下であること、流路系はすべて交換型のマイクロ流路チップ内にあり、サンプル間のコンタミがないことなどの長所を有する。さらにマイクロ流路チップ内の流れを制御する独自の細胞分離方法を採用し、細胞にダメージを与えずにソーティングが可能であること、装置が小型なため安全キャビネット内に設置でき、滅菌済みのチップを用いた無菌でのセルソーティングが可能であることといった利点も兼ね備えている。上述のように、Negative

Selection 法は CTCs の表面マーカーに非依存的なので CTCs をロスする可能性は少ない。しかし、CTCs の濃縮率が低く PBMC の残存が多いため、その後の CTCs の検出には高感度な方法が必要となる。

これらの免疫学的手法以外の CTCs 検出法としては、細胞の大きさで選択を行う物理的手法があり、その一つに ClearCell FX[®] システムがある。CTChip[®] FRI と呼ばれるディスプレイチップを用いて CTCs を濃縮回収するシステムである。サンプル懸濁液 (PBMCs + CTCs) が CTChip[®] FRI の渦巻き状のマイクロ流路を通過すると、流路内に生じる Dean Flow により、細胞のサイズの違いにより内寄りと外寄りに分配され、内寄りの画分が CTCs 濃縮画分として回収される仕組みである。

それぞれの方法には長所短所があり、今のところゴールデンスタンダードとなる方法はない。本研究では、腎癌 CTCs 特異的抗体として抗 G250 抗体を使用し G250 抗原をターゲットとした EpCAM 非依存的な方法である On-chip Sort[®] システムと、細胞径の違いにより CTCs を分離回収する ClearCell FX[®] システムの比較検討を行った。

研究方法

今回、われわれは腎癌細胞樹立株を用い、抗 G250 抗体を用いた On-chip Sort[®] と ClearCell FX[®] システムによる CTCs の回収率について比較検討を行った。

1. On-chip Sort[®] 使用による CTCs 回収方法

今回、われわれはマイクロチップ型セルソーター On-chip Sort[®] と Dynabeads[®] を組み合わせた CTCs の回収法を用いた。腎癌細胞樹立株である VMRC-RCW を 50 個または 100 個をそれぞれ 10 ml の全血に混和し、溶血後、抗 CD45 抗体でコーティングした磁性ビーズ (Dynabeads[®]) を用いて白血球を除去し腎癌 CTCs の濃縮した後、On-chip Sort[®] システムによって腎癌 CTCs と PBMCs の識別を行った。抗 G250 抗体の特異性との比較の為に同時に抗 EpCAM 抗体による染色も行っている。

2. ClearCell FX[®] システムを用いた CTCs 回収法

健常者の血液 10 ml に約 100 個の腎癌細胞樹立株 (① OS-RC-2, 108 個 ② 786-O, 98 個 ③ VMRC-RCW, 97 個) を混和し、ClearCell FX[®] で処理した。処理後の検体を抗 CD45 抗体、抗 G250 抗体を用いた FCM

で解析した。そして抗 CD45 抗体陰性 / 抗 G250 抗体陽性細胞を CTCs としてカウントした。

結果

On-chip Sort[®] を用いた回収率の結果を示す (図 3)。EpCAM 陽性、CD45 陰性細胞を CTCs としてカウントした場合、50 個のスパイク中 6 個 (12%)、100 個のスパイク中 40 個 (40%) が CTCs としてカウントされる。しかし EpCAM ベースで見ると 50 個中 32 個、100 個中 35 個の腎癌 CTCs が見逃されている。一方、G-250 ベースで見ると 50 個のスパイク中 38 個 (76%) 100 個のスパイク中 75 個 (75%) が CTCs としてカウントされた。

次に ClearCell FX[®] を用いた CTC 同定率の結果を示す (図 4)。混和した 3 種の腎癌細胞樹立株は① OS-RC-2 > ② 786-O > ③ VMRC-RCW の順に大きさが異なる。ClearCell FX[®] では物理学的に CTCs を回収するので EpCAM 非依存的に回収することが可能である。腎癌細胞樹立株の中でも細胞径が大きい① OS-RC-2 の細胞株は CTCs と PBMCs との細胞径の差が大きく回収率が 69.4% と高い回収率を示す一方で、細胞径の小さい③ VMRC-RCW の細胞株は CTCs と PBMCs との細胞径の差が小さく回収率は 33% に留まった。

考察

現在、全世界的に CTCs の検出・解析技術が開発されており、新しい技術が次々と報告されている^{8,9)}。今後、CTCs を用いたりキッドバイオプシーは、薬剤バイオマーカー検査、治療効果のモニタリング、薬剤耐性の早期発見等の幅広い用途に利用が期待される。一方で CTCs の検出方法は多く存在するが、現状どの手法であっても全ての CTCs を回収する事は困難である。今回われわれは回収率の検討において On-chip Sort[®] による回収方法と ClearCell FX[®] システムによる回収方法を検討した。ClearCell FX[®] システムに関しては、腎癌細胞樹立株の中でも細胞径の大きさが大きい OS-RC-2 の細胞株は CTCs と PBMCs との細胞径の差が大きく回収率が 69.4% と高い回収率を示す一方で、細胞径の小さい VMRC-RCW の細胞株は CTCs と PBMCs との細胞径の差が小さく回収率は 33% に留まった。しかし同じ VMRC-RCW の細胞株を用いて On-chip

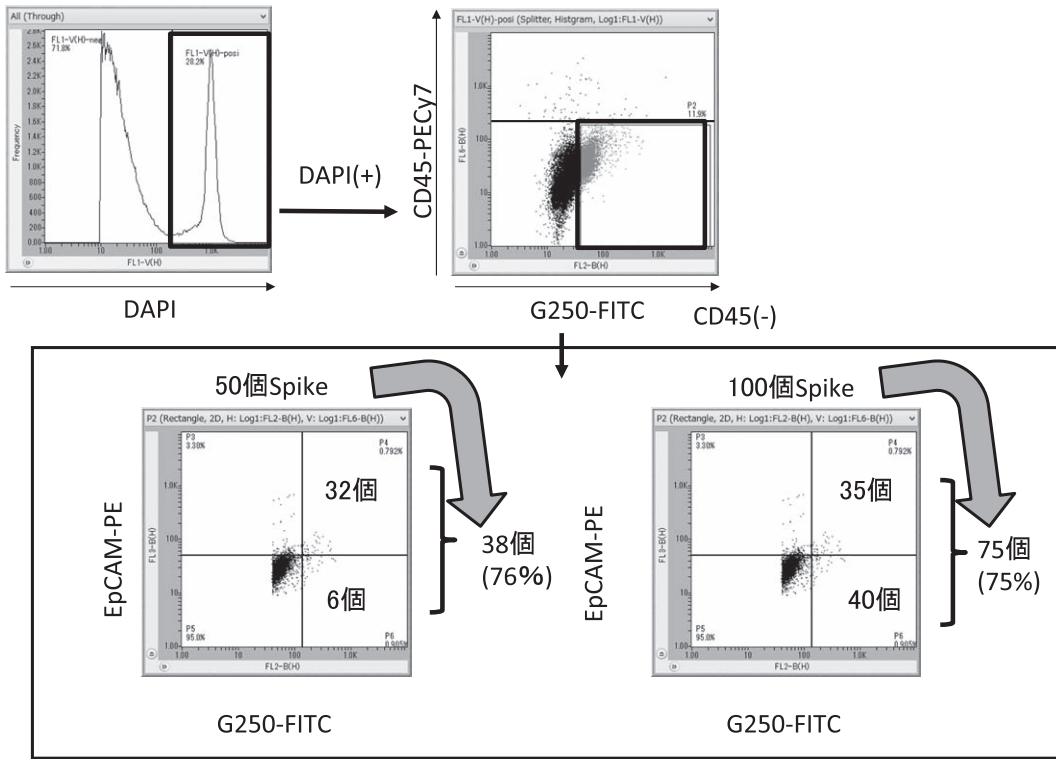


図 3 Onchip による腎癌細胞の同定

抗 G250 抗体を組み合わせた On-chip Sort[®]システムによる腎癌 CTCs の同定：上段より G250 抗原をターゲットとした腎癌特異的 CTCs の同定は高感度に可能であることが示されている。下段では CD45 (-) /EpCAM (+) 細胞を腎癌 CTCs としてカウントすると、50 個中 32 個、100 個中 35 個の腎癌細胞株が除外されてしまうが、CD45 (-) /G250 (+) 細胞を腎癌 CTCs としてカウントすると、50 個中 38 個 (76%) 100 個中 75 個 (75%) の腎癌 CTCs を同定可能である。

細胞大きさ (目視)	細胞株	Spike 細胞数	Output 細胞数	回収率 (%)
●	OS-RC-2	108	75	69.4%
○	786-0	98	46	46.9%
○	VMRC-RCW	97	32	33.0%

図 4 ClearCell FX での CTC 回収率に関する検討

ClearCell FX[®]システムによる腎癌 CTCs の同定。細胞の size が大きい腎癌細胞樹立株である OS-RC-2 の回収率は 69.4% と比較的高いが、細胞の size の小さな腎癌細胞樹立株である VMRC-RCW の回収率は 33% と低かった。(On-chip Sort[®]システムでは同じ腎癌細胞樹立株での回収率は 75 ~ 76%)

Sort[®]システムによる回収率を検討した所、75～76%の高い回収率を得る結果であり、On-chip Sort[®]システムがClearCell FX[®]システムに対しCTCs同定法は勝っていると考えられる。細胞径により回収率が異なるClearCell FX[®]システムでは、同一の患者における治療効果判定なので経時的観察には有効と考えられるが、異なる患者間でのCTCs数の比較検討には不向きであると考えられる結果であった。CTCsの回収においてダメージレスでセルソーティング可能なOn-chip Sort[®]を用いることは、CTCs研究に限らず幹細胞研究にも応用可能であり、さまざまな用途で幅広く応用される可能性を秘めていると考えられる。

結 語

高感度なCTCsの捕捉回収は、治療の効果判定や病勢評価目的のリキッドバイオプシーのみならず、さまざまな用途で幅広く応用される可能性がある。本研究において、抗G250抗体を用いたOn-chip Sort[®]システムは、高感度に腎癌のCTCsを捕捉する事が可能であり、ClearCell FX[®]システムに勝っていた。

微量なCTCsをより高感度に捕捉回収することが可能となれば、治療効果判定や病勢の評価が可能となる。本研究において、On-chip Sort[®]システムは、より高感度に腎癌CTCsを捕捉回収する上で、従来のさまざまなシステムと比較し、有用なシステムの一つとなる可能性が示唆された。

利益相反

本研究に関し開示すべき利益相反はない。

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.* 2004;351:781-791.
- 2) Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, *et al.* Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10:472-484.
- 3) Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem.* 2013; 59:110-118.
- 4) Bidard FC, Weigelt B, Reis-Filho JS. Going with the flow: from circulating tumor cells to DNA. *Sci Transl Med.* 2013;5:207ps14.
- 5) Pantel K, Alix-Panabieres C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res.* 2013;73:6384-6388.
- 6) Gorges TM, Pantel K. Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2013; 62:931-939.
- 7) Alix-Panabieres C, Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip.* 2014;14:57-62.
- 8) Peeters DJ, De Laere B, Van den Eynden GG, *et al.* Semiautomated isolation and molecular characterisation of single or highly purified tumour cells from CellSearch enriched blood samples using dielectrophoretic cell sorting. *Br J Cancer.* 2013;108:1358-1367.
- 9) Jiang R, Lu YT, Ho H, *et al.* A comparison of isolated circulating tumor cells and tissue biopsies using whole-genome sequencing in prostate cancer. *Oncotarget.* 2015;6:44781-44793.
- 10) Oosterwijk E, Ruiter DJ, Wakka JC, *et al.* Immunohistochemical analysis of monoclonal antibodies to renal antigens. Application in the diagnosis of renal cell carcinoma. *Am J Pathol.* 1986;123:301-309.
- 11) Hyun KA, Koo GB, Han H, *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer. *Oncotarget.* 2016;7:24677-24687. (accessed 2016 Mar 22) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5029733/pdf/oncotarget-07-24677.pdf>

IMPROVEMENT IN THE RECOVERY EFFICIENCY OF
CIRCULATING TUMOR CELLS IN THE BLOOD

Yuki MATSUI, Michio NAOE, Mika OHTA,
Hideaki SHIMOYAMA, Tsutomu UNOKI, Takehiko NAKASATO,
Kazuhiko OSHINOMI, Jun MORITA, Yoshiko MAEDA,
Kohzo FUJI and Yoshio OGAWA

Department of Urology, Showa University School of Medicine

Abstract — During solid tumor development, tumor cells, known as circulating tumor cells (CTCs), invade the peripheral blood. Although the mechanisms of invasive and metastatic behaviors of CTCs are not fully understood, CTCs are an important prognostic marker for cancer patients, providing information for the therapy and follow-up. We have challenged CTC analysis by flow cytometry. In this article, we focus on our recent development on the enumeration of intact CTCs.

Key words: circulating tumor cells (CTCs), Liquid biopsy, ClearCell FX[®], On-chip Sort[®]

[受付：12月4日，2017，受理：1月18日，2018]