

マイクロチップ型セルソーターを用いた 血中循環腫瘍細胞の高感度検出・単離方法

渡辺 勝, 洪 泰浩, 山本 信之

1. はじめに

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。FDAの承認を受けた唯一の検出系であるCellSearchシステムで血液中のCTCs数を測定することで、大腸がん、乳がん、前立腺がんといった転移性がん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⁾。近年、このCTCsを回収して生化学・分子生物学的に解析して、がんの診断や治療に役立てようという研究が行われており、微量細胞（レアセル）の分離・分析技術の進歩に伴いCTCsを分子レベルで解析できるようになってきた。本稿では、その一例としてOn-chip Sortを用いたレアセルのソーティングと遺伝子変異解析方法について紹介する。

2. CTCs解析の意義と現状

近年、生命科学分野における研究の進展により、個別化医療が一部で実現している。特に、がん治療の分野で個人の腫瘍におけるゲノム情報に基づき、適切な薬剤を患者に投与する“precision medicine”が日常診療として行われている。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、侵襲性の高さからすべての患者で実施できるわけではない。現在、バイオプシー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、もし実用化されれば、これまでの腫瘍生検に代わり

末梢血から腫瘍のゲノム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²⁻⁶⁾。

CTCsは腫瘍組織から血中に遊離した生きたがん細胞であり、生化学的・分子生物学的に解析できればリアルタイムな腫瘍の情報を得るための格好の材料となる。しかし、従来のCTCs測定技術ではこのようなレアな細胞を回収してゲノム解析するのは困難であった。近年、CTCsのゲノム解析を目的とした技術が複数のグループで開発されている（表1）。それぞれの方法には一長一短があり、今のところゴールドスタンダードとなる方法はない。

3. マイクロチップ型セルソーターの特徴：レアセルソーティング装置として

セルソーターは目的の細胞を検出して回収する装置として広く利用されているが、CTCsのようなレアな存在比の細胞を検出・回収するためには複数の問題点が存在する。たとえば一般的なキャピラリー型セルソーターでは、サンプル全量を解析できないこと、流路にデッドボリュームが存在すること、同じ流路を使い回すためサンプル間のコンタミが懸念されること、分取の際に細胞にダメージがあること、無菌で分取できないこと、専任オペレーター操作とメンテナンスが必要であることなどが挙げられる。マイクロチップ型セルソーター On-chip Sortを用いたレアセルソーティング法は、これらの問題点をほぼクリアしている^{13, 14)}。すなわち長所として、(1)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ること、(2)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、(3)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、(4)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、(5)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、(6)マイクロ流路チップは交換型なの

和歌山県立医科大学呼吸器内科・腫瘍内科（〒641-8509 和歌山市紀三井寺811-1）

A novel flow cytometry-based cell capture platform for the detection, capture and molecular characterization of rare tumor cells in blood

Masaru Watanabe, Yasuhiro Koh and Nobuyuki Yamamoto (Third Department of Internal Medicine, Wakayama Medical University, 811-1 Kimiidera, Wakayama-shi, Wakayama 641-8509, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880265

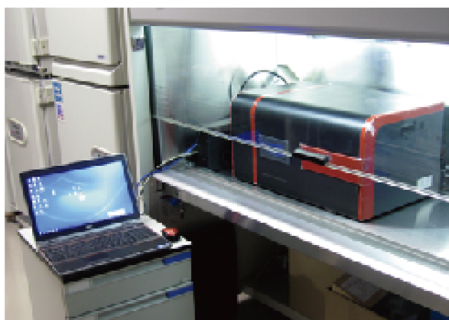
© 2016 公益社団法人日本生化学会

テクニカルノート

表1 CTCs解析技術

CTCs検出機器	CTCs回収機器	ゲノム解析	メリット	課題	文献
CellSearch	DEPArray	DNA MassARRAY, Real-time PCR	豊富な臨床データ, シングルセル回収	EpCAM依存性	7)
Nanovelcro	Laser capture microdissection	Whole genome Sequencing	温度依存的に回収・リリース, シングルセル回収	表面抗原依存性	8)
MagSweeper	Micromanipulation device	RNA Sequencing	生きたまま回収可能, シングルセル回収可能	EpCAM依存性	9)
CTC iChip	Micromanipulation device	Single cell RNA analysis	ポジティブ・ネガティブセクション両方, シングルセル回収	スループット	10)
ISSET	不要	FISH, Pyrosequencing	サイズセクション	CTCsサイズ, コスト	11, 12)
On-chip Sort	不要	Pyrosequencing Panel Sequencing, Copy number 解析	ネガティブセクション, 高感度	コスト	13, 14)

A



B

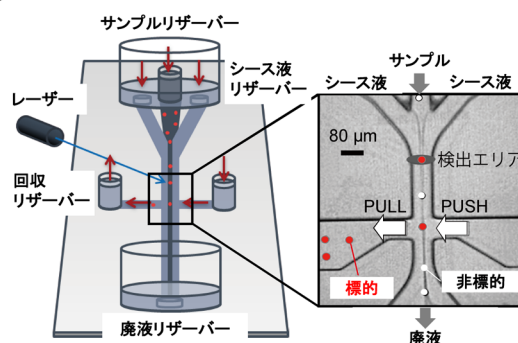


図1 マイクロチップ型セルソーター On-chip Sort

(A) On-chip Sortの外観と安全キャビネット内に設置された様子. (B) マイクロ流路チップの模式図. 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方式によって, 標的細胞のみが回収リザーバーに回収される.

で, 流路の洗浄を必要とせずメンテナンスが容易であることがあげられる (図1).

4. On-chip Sortを用いたCTCsの検出・単離方法

On-chip Sortを用いたCTCsの検出・単離・解析フローを図2に示す. CTCsのようなレアな存在比の細胞を検出・回収するためには, まずCTCsの濃縮処理が必要となる. 濃縮処理には二つの方法があり, 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を選び取るポジティブセクション法と, 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ネガティブセクション法があげられる. ポジティブセクション法は濃縮率が高く, 濃縮後に顕微鏡下での目視や自動検出でCTCsを検出できるという利点の反面, 表面マーカーに依存적であり, その表面マーカーを発現していないCTCsを回収することはできないという欠点がある. 一方, ネガティブセ

クション法は, 表面マーカーに非依存的なので, さまざまな性質を持ったヘテロなCTCsをロスする心配は少ないが, 濃縮率が低く残存正常血球数が多いため, その後の検出には高感度な方法もしくはさらなる濃縮が必要となる. セルソーターは高感度な標的細胞の検出とソーティングによる濃縮が可能であることから, 我々はCD45抗体を結合させた磁気ビーズでネガティブセクションを行っており, この処理によって白血球を数百分の一まで減らすことができる.

血中に存在する細胞のうち, 1. 核陽性, 2. サイトケラチン陽性, 3. CD45陰性の細胞がCTCsと定義されている. つまり, 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のことを指す. これらの生化学的な特徴を蛍光免疫染色によって判別することでCTCsを検出する. また, この定義に当てはまらないCTCsが報告されているため, 現在では上記に加えてビメンチン等の上皮間葉転換 (epithelial-

mesenchymal transition : EMT) マーカーを利用したCTCsの検出法も開発されている。On-chip Sortは上記すべてのマーカータンパク質の発現を指標としてCTCsを検出して回収することが可能である (図3)。

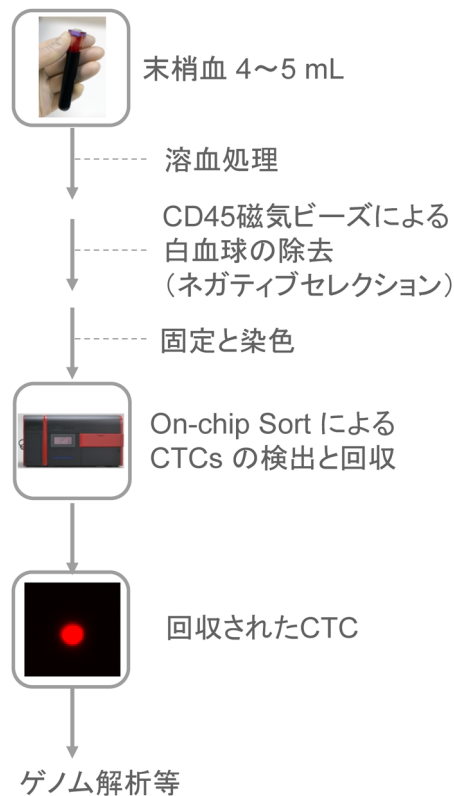


図2 On-chip Sortを用いたCTCsの検出・単離方法
末梢血の溶血処理後に、CD45抗体を結合させた磁気ビーズによって白血球が除去される (ネガティブセクション)。その後、固定とマーカータンパク質の蛍光抗体染色を行い、On-chip SortによってCTCsの検出と分取が行われる。分取されたCTCsはゲノム解析等に利用される。

5. On-chip Sortを用いたレアセルソーティングと遺伝子変異解析例

4 mLの健常者の血液にわずか5~25個の肺がん由来の培養がん細胞株 (H1975) を混入させた疑似がん患者検体を用いた検討では、前述の方法による培養がん細胞の検出率は $86.9\% \pm 8.6\%$ 、回収率は $68.5\% \pm 9.2\%$ であり、血中に含まれるごくわずかながん細胞でも9割近く検出でき、7割ほどは回収することが可能であった (表2)。このときの純度 (精製率) は $78.4\% \pm 13.9\%$ であり、その後のゲノム解析への影響を最小限にとどめている。さらに、CTCsの表面マーカーとして一般的に用いられるEpCAMの発現が低い細胞株 (A549) でも陰性の細胞株 (H1755) でも同様の性能を発揮していることから、EpCAM非依存的なソーティングが可能である (表2)。

On-chip Sortで回収したわずかな細胞から遺伝子変異解析等のゲノム解析が可能である。末梢血1 mLあたり10個の培養がん細胞を混入させた疑似検体から回収した細胞サンプルのゲノムDNAを、市販の全ゲノム増幅キット (例: Silicon Bio社の *Ampli1*) で増幅した。増幅したゲノムDNAを鋳型としてPyrosequencerおよび次世代シーケンサーにより混入させた培養がん細胞株に特異的な遺伝子変異を検出したところ、検出限界が1%の次世代シーケンサーだけでなく、検出限界が10%のPyrosequencerでも十分に遺伝子変異を検出することが可能であった (図4)。On-chip Sortを用いたセルソーティング法はレアな存在比の標的細胞を回収できるだけでなく、非標的細胞のコンタミを抑え、下流の解析への影響を最小限にできる。

6. おわりに

現在、世界中のグループがCTCsの検出・解析技術を開発しており、毎年新しい技術が報告されている¹⁵⁾。On-

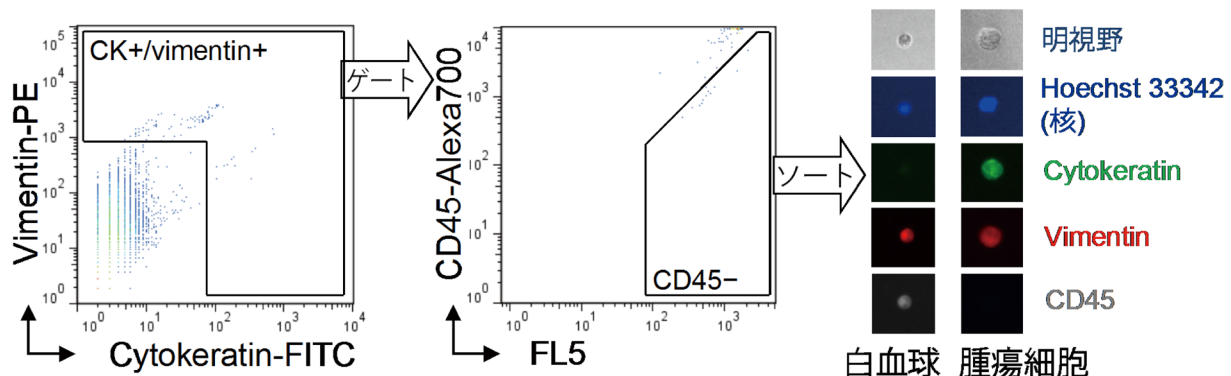


図3 On-chip Sortを用いたCTCsの同定
上皮系細胞マーカーであるサイトケラチン陽性もしくは間葉系細胞マーカーであるビメンチン陽性細胞の中から、CD45陰性の細胞を回収する。回収リザーバー内の細胞を蛍光顕微鏡下で観察して、腫瘍細胞を同定する。

テクニカルノート

表2 On-chip Sortを用いたレアセルソーティングの性能評価

N=9	H1975株 (EpCAM陽性)	A549株 (EpCAM低発現)	H1755株 (EpCAM陰性)
検出率	86.9%±8.6%	84.7%±9.3%	83.4%±12.4%
回収率	68.5%±9.2%	69.8%±9.9%	74.5%±12.7%
純度	78.4%±13.9%	69.8%±18.5%	70.4%±12.4%

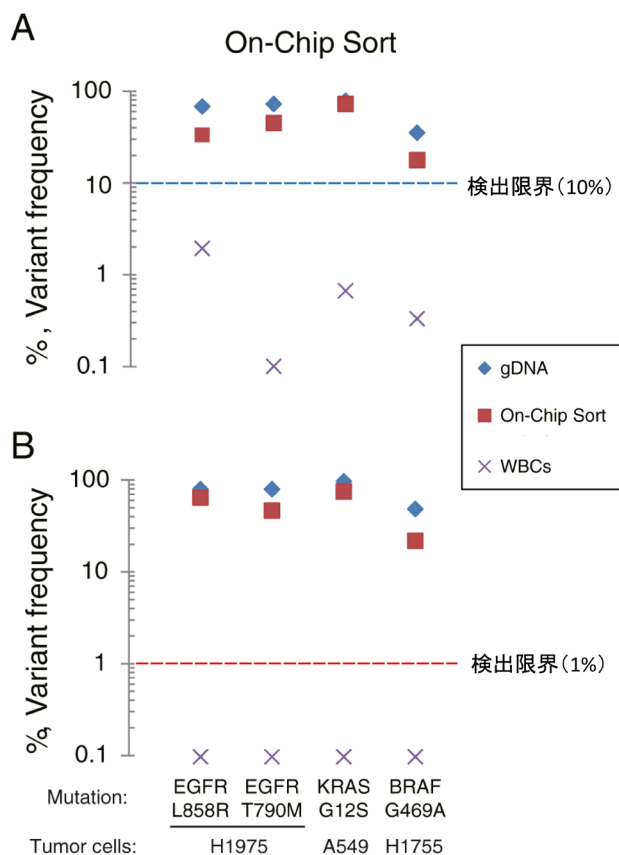


図4 On-chip Sortで血中より分取した培養がん細胞を用いた遺伝子変異検出

Pyrosequencer(A)および次世代シーケンサー(B)によって、それぞれの細胞株が有する特異的な遺伝子変異を検出した。

chip Sortは日本発のユニークなセルソーターであることから、我々が開発したOn-chip Sortを用いたレアセルソーティング方法は、わが国のバイオ技術の成果として意義があると考えられる。本稿では、主に前臨床モデルでの性能評価結果を紹介したが、実際の肺がん患者の末梢血からのCTCs検出だけでなく、回収したCTCsから腫瘍組織でみられた遺伝子変異の検出にも成功している¹⁶⁾。

今後のCTCsを用いたリ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対して利用が期待される。また、成功率はまだ低いCTCsの培養に成功した例が報告されており^{17, 18)}、ダメージレスでセルソーティング可能な

On-chip Sortを用いることで培養の成功率を高められるのではないかと考えている。CTCsの安定した培養が成功すればex vivoでの薬剤効果判定に用いることができるだけでなく、CTCsのバイオリジー解明への貢献も期待される。さらに、On-chip Sortを用いたレアセルソーティング法は、CTCs研究に限らず幹細胞研究や環境中に含まれるレアな細菌の検出等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。

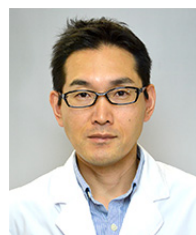
文 献

- 1) Cristofanilli, M., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M.C., Reuben, J.M., Doyle, G.V., Allard, W.J., Terstappen, L.W., & Hayes, D.F. (2004) *N. Engl. J. Med.*, **351**, 781–791.
- 2) Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F., & Bardelli, A. (2013) *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **10**, 472–484.
- 3) Alix-Panabières, C. & Pantel, K. (2013) *Clin. Chem.*, **59**, 110–118.
- 4) Bidard, F.C., Weigelt, B., & Reis-Filho, J.S. (2013) *Sci. Transl. Med.*, **5**, 207ps14.
- 5) Pantel, K. & Alix-Panabières, C. (2013) *Cancer Res.*, **73**, 6384–6388.
- 6) Gorges, T.M. & Pantel, K. (2013) *Cancer Immunol. Immunother.*, **62**, 931–939.
- 7) Peeters, D.J., De Laere, B., Van den Eynden, G.G., Van Laere, S.J., Rothé, F., Ignatiadis, M., Sieuwerts, A.M., Lambrechts, D., Rutten, A., van Dam, P.A., Pauwels, P., Peeters, M., Vermeulen, P.B., & Dirix, L.Y. (2013) *Br. J. Cancer*, **108**, 1358–1367.
- 8) Jiang, R., Lu, Y.T., Ho, H., Li, B., Chen, J.F., Lin, M., Li, F., Wu, K., Wu, H., Lichterman, J., Wan, H., Lu, C.L., OuYang, W., Ni, M., Wang, L., Li, G., Lee, T., Zhang, X., Yang, J., Rettig, M., Chung, L.W., Yang, H., Li, K.C., Hou, Y., Tseng, H.R., Hou, S., Xu, X., Wang, J., & Posadas, E.M. (2015) *Oncotarget*, **6**, 44781–44793.
- 9) Cann, G.M., Gulzar, Z.G., Cooper, S., Li, R., Luo, S., Tat, M., Stuart, S., Schroth, G., Srinivas, S., Ronaghi, M., Brooks, J.D., & Talasz, A.H. (2012) *PLoS ONE*, **7**, e49144.
- 10) Ozkumur, E., Shah, A.M., Ciciliano, J.C., Emmink, B.L., Miyamoto, D.T., Brachtel, E., Yu, M., Chen, P.I., Morgan, B., Trautwein, J., Kimura, A., Sengupta, S., Stott, S.L., Karabacak, N.M., Barber, T.A., Walsh, J.R., Smith, K., Spuhler, P.S., Sullivan, J.P., Lee, R.J., Ting, D.T., Luo, X., Shaw, A.T., Bardia, A., Sequist, L.V., Louis, D.N., Maheswaran, S., Kapur, R., Haber, D.A., & Toner, M. (2013) *Sci. Transl. Med.*, **5**, 179ra47.
- 11) Buim, M.E., Fanelli, M.F., Souza, V.S., Romero, J., Abdallah, E.A., Mello, C.A., Alves, V., Ocea, L.M., Mingues, N.B., Barbosa, P.N., Tyng, C.J., Chojniak, R., & Chinen, L.T. (2015) *Cancer Biol. Ther.*, **16**, 1289–1295.
- 12) Pailler, E., Auger, N., Lindsay, C.R., Vielh, P., Islas-Morris-Hernandez, A., Borget, I., Ngo-Camus, M., Planchard, D., Soria, J.C., Besse, B., & Farace, F. (2015) *Ann. Oncol.*, **26**, 1408–1415.
- 13) Watanabe, M., Uehara, Y., Yamashita, N., Fujimura, Y., Nishio, K., Sawada, T., Takeda, K., Koizumi, F., & Koh, Y. (2014) *Cytometry A*, **85**, 206–213.
- 14) Watanabe, M., Serizawa, M., Sawada, T., Takeda, K., Takahashi, T., Yamamoto, N., Koizumi, F., & Koh, Y. (2014) *J. Transl.*

- Med.*, **12**, 143.
- 15) Alix-Panabières, C. & Pantel, K. (2014) *Lab Chip*, **14**, 57–62.
 - 16) Watanabe, M., Kenmotsu, H., Serizawa, M., Abe, M., Ko, R., Imai, H., Taira, T., Naito, T., Murakami, H., Endo, M., Nakajima, T., Takahashi, T., & Koh, Y. (2014) 日本癌学会学術集会, P-2377.
 - 17) Hodgkinson, C.L., Morrow, C.J., Li, Y., Metcalf, R.L., Rothwell, D.G., Trapani, F., Polanski, R., Burt, D.J., Simpson, K.L., Morris, K., Pepper, S.D., Nonaka, D., Greystoke, A., Kelly, P., Bola, B., Krebs, M.G., Antonello, J., Ayub, M., Faulkner, S., Priest, L., Carter, L., Tate, C., Miller, C.J., Blackhall, F., Brady, G., & Dive, C. (2014) *Nat. Med.*, **20**, 897–903.
 - 18) Maheswaran, S. & Haber, D.A. (2015) *Cancer Res.*, **75**, 2411–2415.

著者寸描

●渡辺 勝 (わたなべ まさる)



MSD株式会社, ジャパンオンコロジーサイエンスユニットオンコロジーサイエンスティフィックアフェアーズアソシエイトサイエンスティフィックディレクター, 博士(理学)。

■略歴 1975年東京都生まれ。2004年名古屋大学大学院理学研究科生命科学専攻修了。同年よりカリフォルニア大学ロサンゼルス校博士研究員, 08年より岩手医

科大学薬学部助教, 11年より静岡県立静岡がんセンター研究所プロジェクト研究員, 14年より和歌山県立医科大学医学部内科学第三講座特別研究員を経て15年より現職。

■研究テーマと抱負 肺がんのバイオマーカー研究, 免疫チェックポイント阻害剤の臨床研究, 抗がん剤の適切な患者選択を可能にするより良いバイオマーカーの開発を目指して研究しています。

●洪 泰浩 (こう やすひろ)

和歌山県立医科大学医学部内科学第三講座講師, 医師, 博士(医学)。

■略歴 1996年和歌山県立医科大学卒業。りんくう総合医療センター泉佐野市立病院, 国立がんセンター研究所薬効試験部, 米国Vanderbilt University Medical Centerポスドク, 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター, 静岡がんセンター研究所を経て2014年より現職。

■研究テーマと抱負 非侵襲的がん診断法の開発とがんにおけるシグナル伝達系を標的とした治療開発。

●山本 信之 (やまもと のぶゆき)

和歌山県立医科大学医学部内科学第三講座教授, 医師, 博士(医学)。

■略歴 1989年和歌山県立医科大学卒業。那智勝浦町立温泉病院, 国立がんセンター中央病院, 近畿大学医学部第四内科, 静岡がんセンター呼吸器内科部長, 副院長を経て2013年より現職。

■研究テーマと抱負 新規抗腫瘍薬剤の臨床開発と抗悪性腫瘍薬の薬物動態学。

■ウェブサイト <http://www.http://wakayama-med-3nai.com/>