

一話 題一

泌尿器癌における末梢血循環腫瘍細胞捕捉の試み

日本医科大学付属病院泌尿器科
大林康太郎, 近藤 幸尋

はじめに

各種固形癌における治療効果判定や生命予後予測などに、血中腫瘍マーカーが広く利用されてきています。しかし、腫瘍マーカーによってその感度、特異度は様々で、全身評価画像や治療経過との乖離を経験することがしばしばあります。また、転移性癌の確定診断の為に、原発巣腫瘍組織や転移巣腫瘍組織への針穿刺生検が行われる必要がありますが、患者の病状や部位によっては針穿刺生検の施行が困難であるケースを多く経験します。

癌の血行性転移には原発巣の腫瘍細胞がその上皮細胞表現型から細胞形態や細胞間接着因子などを変化させ、運動・浸潤性を獲得し血管内に流入することが必要である、とする上皮間葉転換 (EMT: Epithelial-Mesenchymal transition) 説が多く受け入れられています¹。この考えを基に、患者の微量血液から末梢血中を循環する癌細胞 (循環腫瘍細胞 CTC: Circulating tumor cells) を捕捉する研究や、血液中に漏れ出した癌由来の遺伝子情報 (cfDNA: cell free DNA, ctDNA: circulating tumor DNA) を解析するリキッドバイオプシー (Liquid biopsy) の研究、開発が世界中で進められています²。

CTCs は末梢血 1 mL 中に数個と非常に少数と言われていますが、より低侵襲な転移有無診断や、癌治療効果判定、生命予後予測、転移メカニズムの解明など、様々な分野で応用され、新たなバイオマーカーとしての意義が模索されています。

使用デバイスについて

CTCs の捕捉、同定方法は多岐にわたって開発されており、微小磁気ビーズ等を利用した磁性微粒子法、チップ等を利用したマイクロ流路法、アデノウイルスなどウイルスを利用した検出法、フィルター等を用いたサイズ分画法、液体力学を利用した方法、電気泳動誘電法などがあります。転移性大腸癌、転移性乳癌、転移性前立腺癌において、米国食品医薬品局 (FDA: Food and Drug Administration) の許可を唯一受け、広く実用化、普及されてきた CTCs 捕捉デバイスとしましては、磁性微粒子法に位置する CellSearch[®] (Veridex 社) があり、採取された CTCs の個数が多いと生命予後不良と関係するとの報告が散見されます³。しかし、CellSearch[®] は検査費用が

高額であることや、使用可能抗体が限定されている、感度が低い (約 60%)、といった様々な問題点があります。

今回われわれは、マイクロ流路法に位置する流体チップデバイス (Polymer CTC chip) を用いて、泌尿器癌、特に前立腺癌患者の末梢血から CTCs を捕捉する試みを行いました⁴。このデバイスの特長としましては、操作が簡便で安価である、製造の再現性が安定している、高い捕捉率、捕捉抗体を自由に組み合わせて多様な癌細胞を捕捉できる、などの点が挙げられます。

上記 CTC chip はレジンポリマー製で、7.5×2.5 cm のプレパラート上に高さ 100 μm、長径 100 μm 大のマイクロポストが約 30,000 個敷き詰められており、腫瘍細胞表面に発現している抗原に反応する捕捉抗体をマイクロポストの表面にコーティングすることが可能となっています。前立腺癌細胞株 (PC3) における抗原発現の確認と細胞捕捉実験の後、未治療転移性前立腺癌患者より末梢血 2 mL を採取し、輸液ポンプで陰圧をかけながら、捕捉抗体である EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) 抗体をコーティングした chip 内を通過させ、1 時間程で CTCs を捕捉します。捕捉された CTCs は PE-Anti EpCAM や DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), FITC-Anti CK (Cytokeratin) 8, CK9, CK18, APC-CD45 などの各種蛍光免疫染色を施した後、蛍光顕微鏡で観察、同定、計測を行いました。

結果

培養した前立腺癌細胞株 (PC3) の EpCAM や CK18 などの抗原発現を確認、血液の代用として PBS (リン酸緩衝生理食塩水: Phosphate Buffered Saline) 約 2 mL に培養した前立腺癌細胞を混濁させて捕捉を試み、約 9 割以上の高い捕捉率を確認しました。健常人から末梢血 2 mL を採取し、培養した前立腺癌細胞を混濁させて同様の方法で捕捉を試み、約 8 割以上の捕捉率を確認しました。前立腺癌細胞株での捕捉実績を確認した後、未治療転移性進行前立腺癌患者 15 名 (PSA 値 9.85~6,822.8 ng/mL) から末梢血を 2 mL 採取し、同様の方法で CTCs を捕捉、観察し、全例で CTCs を確認することができました。しかし、その捕捉数は 1~81 個/mL と偏りが大きく、コンタミネーションや、結果の再現性の問題点や、捕捉された CTCs クラスターの個数の扱いやその存在意義などの追究が課題となっています。

おわりに

今回使用したデバイスが未治療転移性前立腺癌患者の CTCs を捕捉可能であることを確認することができました。今後は、治療経過中での CTCs 数変化や各種腫瘍マーカーとの関係性、転移を有していない早期患者における

CTCsの捕捉可否, EpCAM以外の抗体による腫瘍細胞捕捉, 他の捕捉デバイスやcfDNA解析との比較など, さらなる追究をしていきたいと考えています。また, 前立腺癌以外の泌尿器癌(腎癌, 腎盂尿管癌, 膀胱癌, 精巣癌)におけるCTCs研究も進めていきたいと思ひます。

文 献

1. Greenburg G, Hay ED: Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 1982; 95: 333-339.
2. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K: Cell-free nucleic acid as biomarkers in cancer patients. *Nature Review Cancer* 2011; 11: 426-437.
3. Allard WJ, Matera J, Miller MC, et al: Tumor cells circulating in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant disease. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6897-6904.
4. Ohnaga T, Shimada Y, Moriyama M, et al: Polymeric microfluidic devices exhibiting sufficient capture of cancer cell line for isolation of circulating tumor cells. *Biomed Microdevices* 2013; 15: 611-616.

(受付: 2017年8月14日)

(受理: 2017年9月11日)
