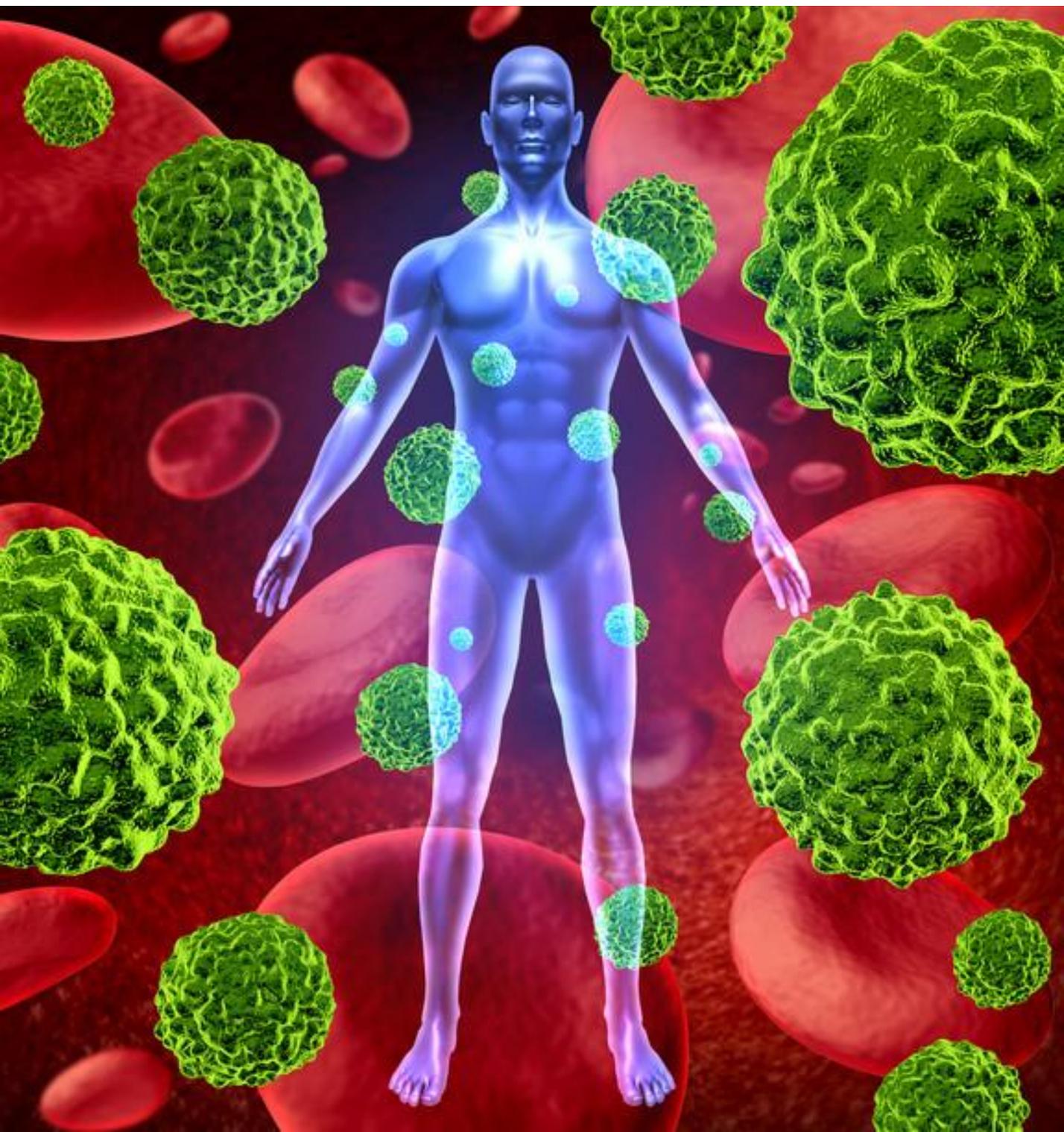


On-chip[®] SortによるCTC検出法の開発
—癌転移にともなうリキッドバイオプシー技術の発展—

株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ



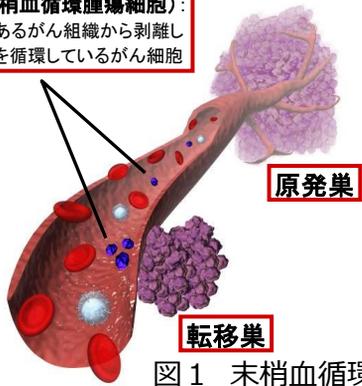
第1章

NEDOプロジェクト「がん超早期診断・治療機器の総合研究開発」における CTCs診断装置開発と基礎・臨床データ取得 ～ 1歩先進む国産CTCs回収診断装置をめざして～ (2010～2015年)

株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズは、2010年から新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の「がん超早期診断・治療機器の総合研究開発」に参画し、末梢血循環腫瘍細胞（Circulating tumor cells: CTCs）の細胞濃縮および解析をする装置の開発を開始した。

乳がん、前立腺がん、大腸がん等の治療効果の判定や予後予測の臨床検査システムとして、既にVeridex社が開発し米国FDAの承認を受けたセルサーチシステム（CellSearch® system）が利用されており、国内においてははその臨床有用性に勝る装置開発が求められた。

CTC(末梢血循環腫瘍細胞):
原発巣であるがん組織から剥離して血液中を循環しているがん細胞



原発巣

転移巣

図1 末梢血循環腫瘍細胞（Circulating tumor cells: CTCs）

CTCsは血液中を流れている“がん細胞”である。原発巣から剥離した一部がん細胞が血液中を循環し、別の組織へ転移する可能性がある細胞と定義されている。直接的なバイオプシーに比べ侵襲度が低い採血操作においてCTCsを採取できることから、がん診断において有効な診断法となることが期待される。しかし、CTCsは非常に数少ない細胞である。その理由として、原発巣において剥がれ出るくらいの腫瘍である必要があり、ステージⅢ以降にならないと検出できないケースが多い。また検出できたとしても10mL中に数個数十個であることが多くCTCsを純化する技術が必須である。

セルサーチシステムは、CTCsを純化するためにEpCAMという上皮系細胞の表面抗原を標的とした抗体磁気ビーズで濃縮純化し、同時に核、血液細胞、上皮性細胞を蛍光染色で染め分け最終的に細胞1個ずつを画像解析する。一方、On-chipシステムは磁気ビーズを利用して主な血液細胞を除去した後に、蛍光染色した細胞をフローサイトメーターで解析する。

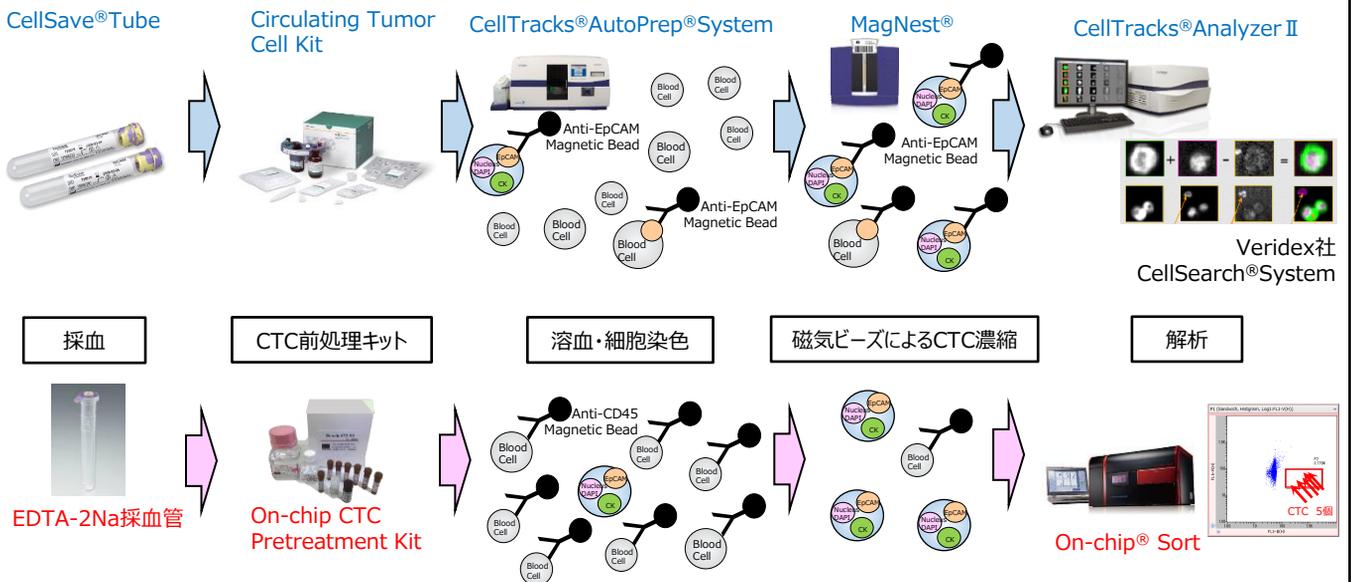
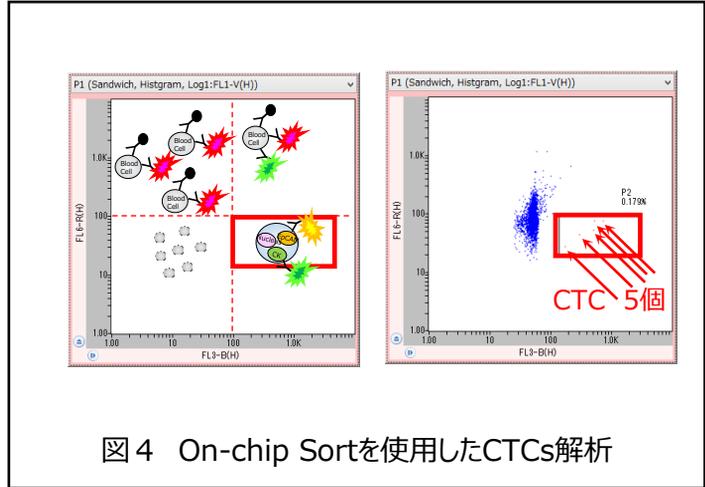
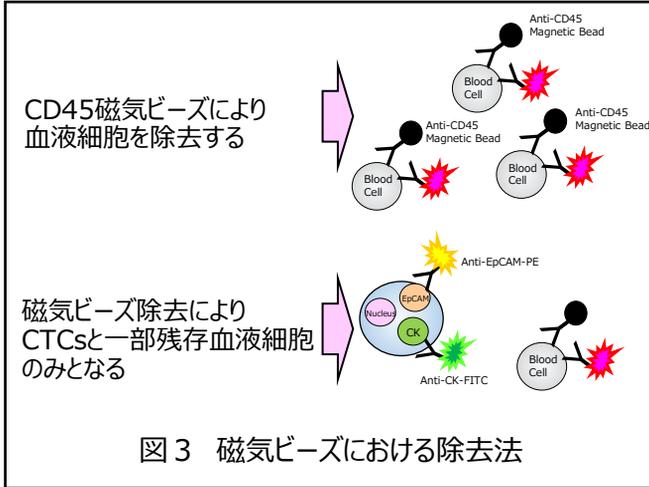


図2 セルサーチシステムとOn-chipシステムの違い

On-chipシステムにおけるCTCs解析とは

セルサーチシステムに勝るシステム作りを目標にOn-chipシステムは開発された。

On-chipシステムの特徴は、セルサーチシステムのようなEpCAMに依存した細胞の解析のみに限定するのではなく、CD45磁気ビーズを使用することにより解析に不要な血液細胞を除き、EpCAM発現のみに依存せずにサイトケラチン陽性細胞 (= CTCs) の解析を可能としている。また解析基盤をフローサイトメーターにすることで目視による画像解析を回避し、陽性率をプロットとして解析することが可能になり、人為的なミスを更に低減させることにある。

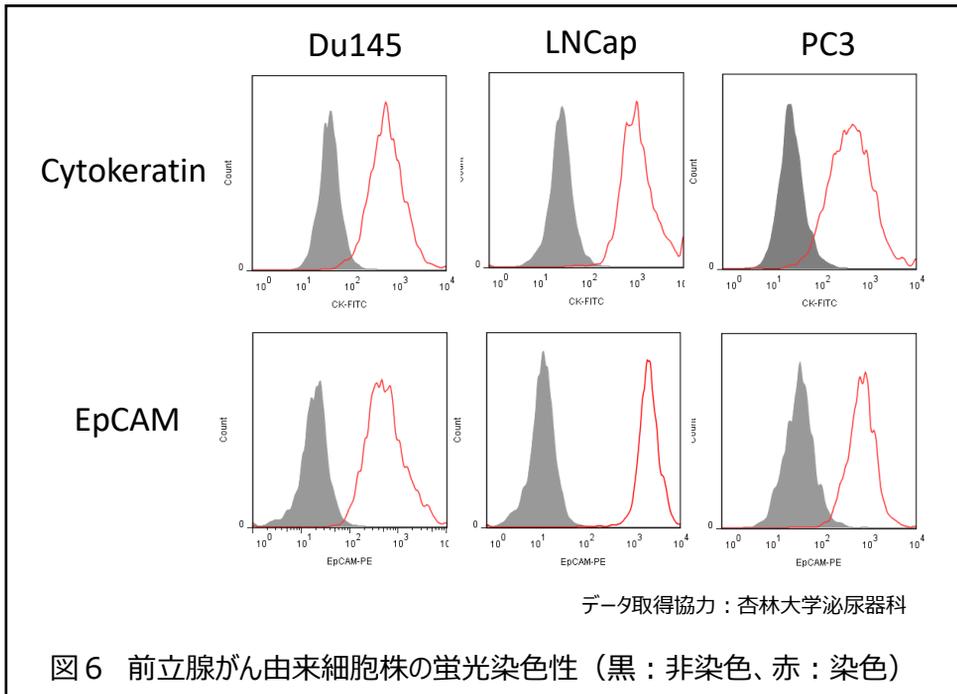


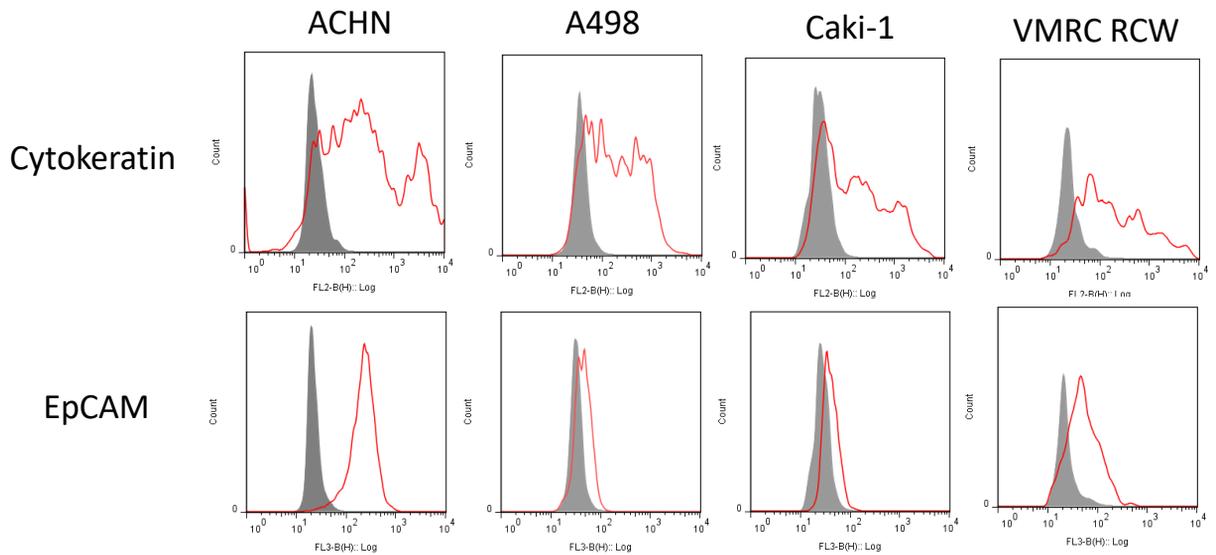
On-chip® Sortにおけるがん細胞株の検出

On-chip® Sortは蛍光強度の違いを1細胞1プロットとして表示することができる。On-chipシステムでは、サイトケラチンの非染色細胞集団と染色集団の分離が大きいほど確実にCTCsとして分離できることを意味している。特に腎がん細胞株においてEpCAMの分離とサイトケラチンの分離を比較してみると、サイトケラチンのほうが染色性が高いことがわかる。これはEpCAM発現に依存しない解析法のほうがバイアスが低いCTCs解析が可能になることを意味している。

| | Cell line | Staining intensity | |
|----------------|-----------|--------------------|-----|
| | | EpCAM | CK |
| Human Lung | A549 | + | +++ |
| Human Lung | H1975 | ++ | +++ |
| Human Lung | H441 | +++ | +++ |
| Human Lung | PC-9 | +++ | +++ |
| Human Lung | PC-14 | - | ++ |
| Human stomach | KATOIII | +++ | +++ |
| Human Prostate | DU-145 | ++ | ++ |
| Human Prostate | LNCaP | +++ | +++ |
| Human Prostate | PC-3 | ++ | ++ |
| Human Kidney | ACHN | ++ | + |
| Human Kidney | A498 | - | + |
| Human Kidney | Caki-1 | - | + |
| Human Kidney | VMRC RCW | - | + |
| Human Skin | A431 | ++ | +++ |
| Human Pancreas | AsPC-1 | +++ | +++ |
| Human Pancreas | SUIT-2 | +++ | +++ |
| Human Pancreas | BxPC-3 | + | +++ |

図5 癌細胞株におけるサイトケラチン(CK)とEpCAM発現





データ取得協力：杏林大学泌尿器科

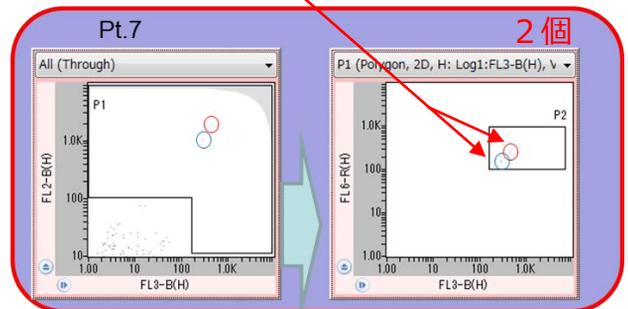
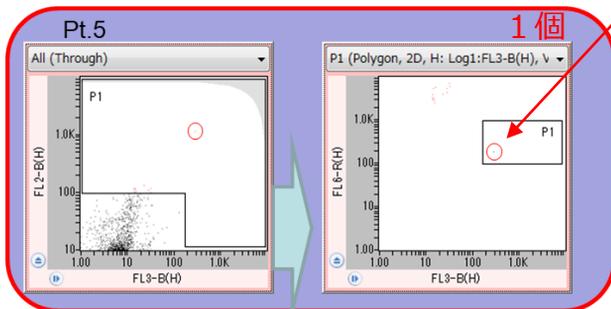
図7 腎がん由来細胞株の蛍光染色性（黒：非染色、赤：染色）

前立腺がん患者におけるCTCs解析（セルサーチシステムとの比較1）

去勢抵抗性前立腺がん（CRPC）患者9名のCTCs解析を杏林大学泌尿器科の協力のもと実施し、セルサーチシステムとの比較データを取得した。On-chipシステムではセルサーチシステムで検出することができなかった9例中6例でCTCsを検出することができた。また日内再現性についてもPt.1とPt.4で確認することができる。

| No. | Age | Disease | PSA | Gleason score | On-chip CTC | CellSerach |
|------|-----|---------|------|---------------|-------------|------------|
| Pt.1 | 71 | CRPC | 65.3 | 5+5 | 0 | 0 |
| Pt.1 | | | | | 0 | 0 |
| Pt.2 | 76 | CRPC | 26.6 | 4+4 | 0 | 0 |
| Pt.2 | | | | | 0 | 0 |
| Pt.3 | 80 | CRPC | 1.84 | 4+3 | 7 | 0 |
| Pt.4 | 85 | CRPC | 15.6 | 4+4 | 1 | 0 |
| Pt.4 | | | | | 1 | 0 |
| Pt.5 | 48 | CRPC | 55 | 4+4 | 1 | 0 |
| Pt.6 | 79 | CRPC | 25.8 | 4+4 | 5 | 0 |
| Pt.7 | 77 | CRPC | 16.9 | 4+5 | 2 | 0 |
| Pt.8 | 80 | CRPC | 23.4 | 5+3 | 0 | 0 |
| Pt.9 | 77 | CRPC | 60.3 | 4+5 | 0 | 0 |

同一検体の日内再現性あり

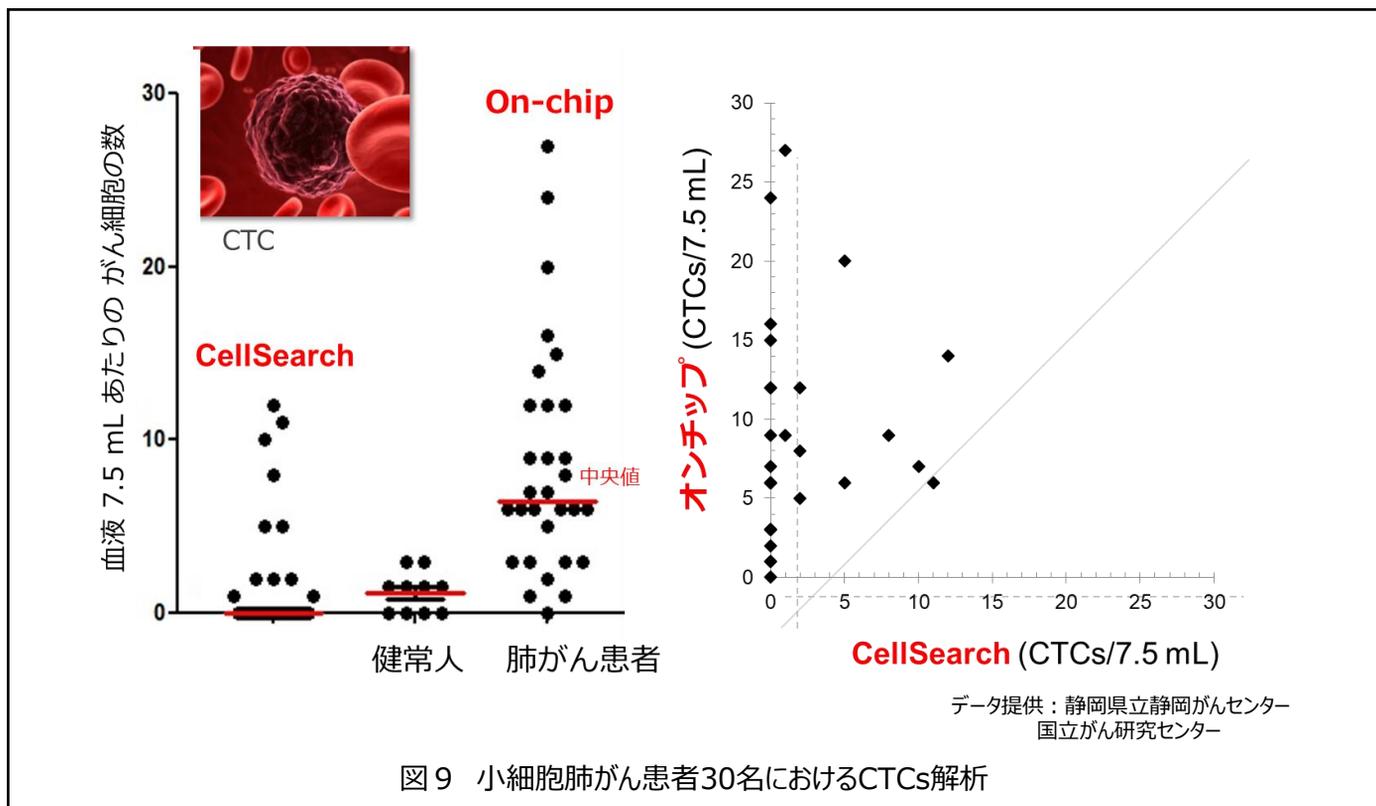


データ取得協力：杏林大学泌尿器科

図8 前立腺がん患者9名におけるCTCs解析

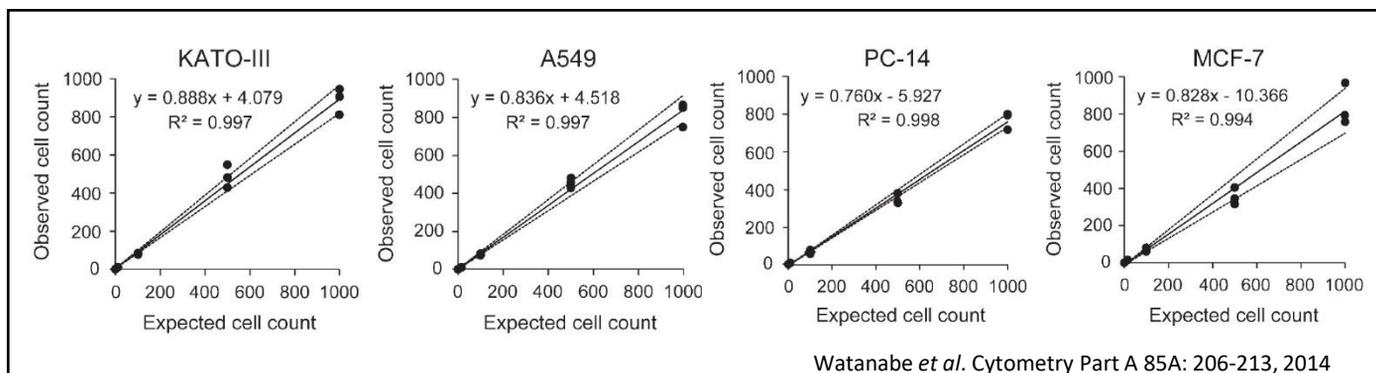
小細胞肺癌患者におけるCTCs解析（セルサーチシステムとの比較 2）

小細胞肺癌患者30名のCTCs解析をNEDOプロジェクトの元で実施し、On-chipシステムとセルサーチシステムとの比較データを取得した。On-chipシステムは末梢血4mLで解析するためセルサーチに合わせ7.5mL換算したが、セルサーチと比較して感度の高い検出を実現した。



肺がん細胞株スパイク血液を使用したOn-chipシステムにおける検出数（論文参照データ1）

CTCs解析精度を確認するため、肺がん細胞株を血液1mLにスパイクし、前処理をおこなった後Fishman-R（Fishman-RはOn-chip Sortのプロトタイプであり解析専用機）にて解析し回収率を求めた。添加回収試験の結果は、直線性が非常に高く前処理を挟んでも検出率の高いシステムであることがわかる。



スパイクした細胞株はKATO-III、A549、PC-14、MCF-7の4種類を使用した。それぞれの細胞株を健康人の血液1mLに0個、10個、500個、1000個スパイクし前処理をおこなった。1グラフあたりのデータポイントは15個である。

図10 肺がん細胞株スパイク血液を使用したOn-chipシステムにおける検出数

肺がん細胞株スパイク血液を使用したセルサーチシステムとの比較（論文参照データ2）

EpCAMの発現に依存しないCTCs解析が可能であることを確認するため、EpCAM発現の異なる肺がん細胞株3種類（KATO-III, A549, PC-14）を血液4.5mLにスパイクし、前処理をおこなった後Fishman-Rにて解析した結果とセルサーチシステムで解析した結果を比較した。その結果、セルサーチシステムにおいてはCTCs検出率はEpCAMの発現に依存しているのに対して、On-chipシステムではコンスタントに75%前後を維持することがわかった。

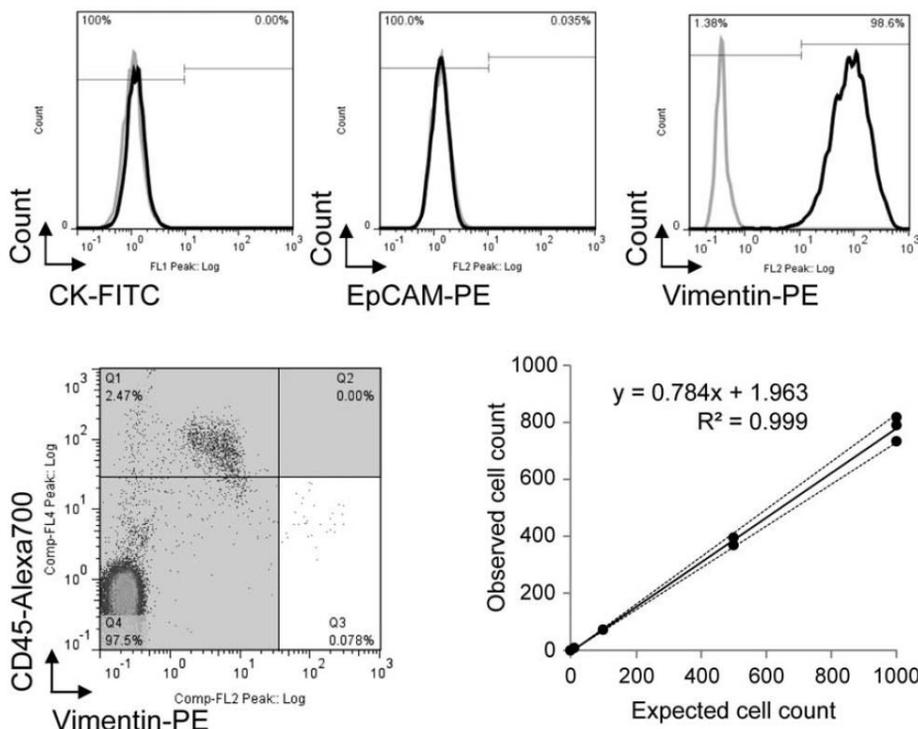
| CELL LINE | EPCAM EXPRESSION | FISHMAN-R | CELLSEARCH |
|-----------|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | | PERCENTAGE OF CELLS DETECTED (RANGE) | PERCENTAGE OF CELLS DETECTED (RANGE) |
| KATO-III | High | 77.5% ± 7.5% (70–85%) | 93.5% ± 4.5% (89–98%) |
| A549 | Low | 75.5% ± 2.5% (73–78%) | 43.5% ± 2.5% (41–46%) |
| PC-14 | Null | 78.5% ± 4.0% (75–82%) | 1% ± 0.0% (1–1%) |

Watanabe *et al.* Cytometry Part A 85A: 206-213, 2014

図11 肺がん細胞株スパイク血液を使用したセルサーチシステムとの比較

ビメンチンを使用したサイトケラチン・EpCAMに依存しない検出法（論文参照データ3）

サイトケラチンとEpCAMの発現に依存しないCTCs解析の可能性をビメンチンの発現によって追求した。Hs578T細胞はサイトケラチン陰性、EpCAM陰性かつビメンチン陽性を示す。ビメンチンは血液細胞の中にも陽性を示す集団が存在するがCD45染色することで排除することができる。その検出率が高いことも12サンプルにおける直線性から証明されている。

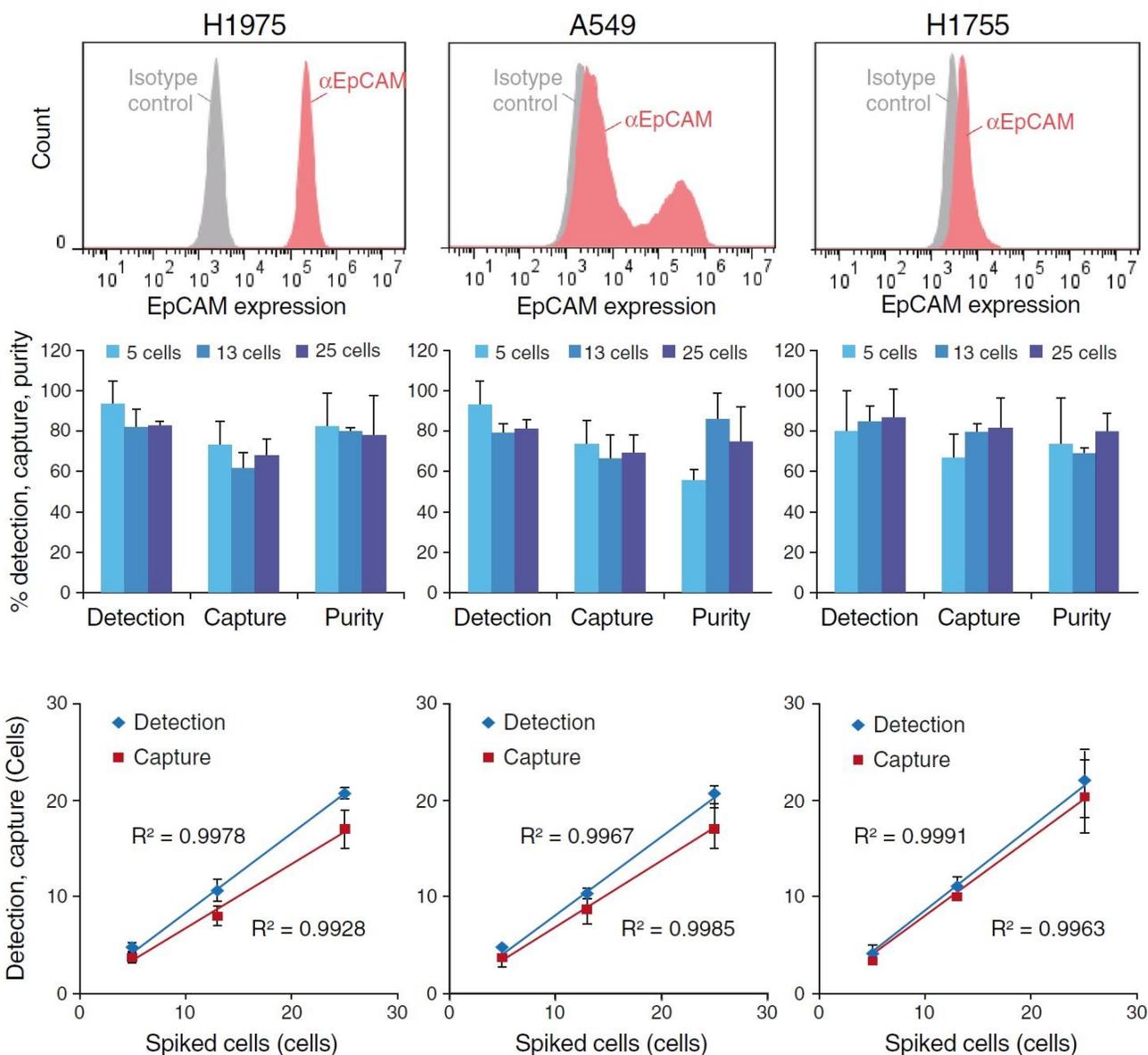


Watanabe *et al.* Cytometry Part A 85A: 206-213, 2014

図12 ビメンチンを使用したサイトケラチン・EpCAMに依存しない検出法

肺がん由来細胞株を使用してEpCAMに依存しないCTCs解析（論文参照データ4）

EpCAM発現に依存しないCTCs解析の可能性を追求するため、EpCAMの発現強度の異なる3種類の細胞株（H1975, A549, H1755）を使用して解析した。H1975細胞株のEpCAM発現は強発現、A549細胞株は強弱を含む発現、H1755はほとんど発現していない。これら細胞株を5個、13個、25個と血液4mLにスパイクし、スパイクした細胞数と前処理後解析した細胞数により算出された回収率はEpCAMの発現に依存せず平均8割を維持していた。その添加回収の直線性も非常に良好であった。



Watanabe *et al.* Journal of Translational Medicine 12: 143, 2014

図13 ビメンチンを使用したサイトケラチン・EpCAMに依存しない検出法

H1975細胞株における遺伝子変異解析（論文参照データ5）

EGFR mutation検出の可能性を確認するため、H1975細胞株を10個、1個と血液4mLにスパイクし前処理の後にOn-chip® SortでCTCsとして回収して、イルミナ社MiSeqを使用してNGS解析した。L858RおよびT790M EGFR mutationは、細胞数1個からでも検出可能であった。

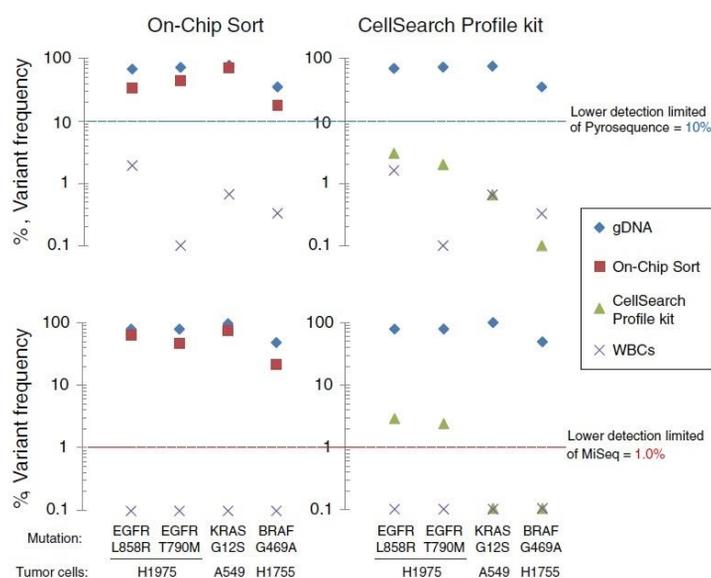
| Cells | Template | EGFR mutation | Var. Freq. by Pyro. | Var. Freq. by MiSeq | | Coverage min. = 10 × (212 amplicons) |
|------------------------|------------------|-----------------|---------------------|---------------------|------------|--------------------------------------|
| | | | | Var. Freq. | Total read | |
| H1975 | Unamplified gDNA | L858R (2573T>G) | 75% | 78.2% | 13,070 | 100.0% |
| | | T790M (2369C>T) | 74% | 79.5% | 11,044 | |
| H1975 | Amplified gDNA | L858R | 73% | 65.9% | 372 | 96.7% |
| | | T790M | 72% | 75.2% | 10,013 | |
| H1975 | 10 cells | L858R | 71% | 88.8% | 4,479 | 92.0% |
| | | T790M | 79% | 84.1% | 27,539 | |
| H1975 | 10 cells | L858R | 73% | 90.1% | 601 | 93.5% |
| | | T790M | 77% | 80.9% | 35,070 | |
| H1975 | 1 cell | L858R | 68% | 77.1% | 109 | 90.6% |
| | | T790M | 79% | 87.0% | 31,312 | |
| H1975 | 1 cell | L858R | 69% | 78.2% | 368 | 80.2% |
| | | T790M | 61% | 63.8% | 27,341 | |
| WBC from healthy donor | 10 cells | L858R | 2% | N/A | 3,596 | 81.4% |
| | | T790M | 0% | N/A | 18,497 | |
| WBC from healthy donor | 1 cell | L858R | 3% | N/A | 56 | 88.7% |
| | | T790M | 0% | N/A | 256 | |

Watanabe *et al.* Journal of Translational Medicine 12: 143, 2014

図14 H1975細胞株における遺伝子変異の確認

細胞株を使用したターゲットシーケンス解析の比較確認（論文参照データ6）

H1975, A549, H1755細胞株を血液1mLあたり10細胞になるようにスパイクし、On-chipシステムとCellSearch profile kitの比較をPyrosequenceとMiSeqでおこなった。CellSearch profile kitにおけるMiSeq解析はEpCAM発現依存が顕著であり、H1975細胞株では検出可能であったがEpCAM発現が低くなるA549とH1755細胞株では検出限界以下であり、Pyrosequenceにおいてはどの細胞株でも検出限界以下であった。On-chipシステムではどの細胞株、どちらのシーケンス解析においても検出が可能であり汎用性の高さが示された。



PyrosequenceおよびMiSeq解析は、H1975, A549, H1755細胞株を血液1mLに対して10個になるようにスパイクし、On-chipシステムとCellSearch profile kitにおいて比較した。確認したミューテーションは、H1975におけるEGFR L858RとT790M、およびA549におけるKRAS G12S、H1755におけるBRAF G469Aである。WBCの値からPyrosequenceの検出限界は10、MiSeqの検出限界は1に設定した。

Watanabe *et al.* Journal of Translational Medicine 12: 143, 2014

図15 細胞株を使用したシーケンス解析の比較確認

肺がん・乳がん等患者検体におけるセルサーチシステムとの比較（論文参照データ7）

がん患者検体46名と健常者5名の血液4mLから、前処理をおこないFishman-R（Fishman-RはOn-chip® Sortのプロトタイプであり解析専用機）でCTCs数を解析した。同サンプルにおいては同時にセルサーチシステムのデータを取得し比較した。

Table 1. Patient characteristics of, and number of circulating tumor cells detected in various cancer patients using FISHMAN-R and the CellSearch system

| Pt | Primary | Histology | Stage | Age/Sex | Metastatic site | FISHMAN-R/4 mL | CellSearch/4 mL | CellSearch/7.5 mL |
|----|---------------|---------------|-------|---------|--|----------------|-----------------|-------------------|
| 1 | Lung | SCLC | IIIB | 79/M | — | 7 | 159.5 | 299 |
| 2 | Lung | SCLC | IIIB | 59/F | — | 18 | 3.7 | 7 |
| 3 | Lung | SCLC | IV | 61/M | Liver, bone | 4 | 1.6 | 3 |
| 4 | Lung | SCLC | IV | 66/M | Liver | 7 | 5.3 | 10 |
| 5 | Lung | NSCLC (Sq) | IIIB | 66/M | — | 0 | 0 | 0 |
| 6 | Lung | NSCLC (Sq) | IV | 59/F | Retroperitoneum | 0 | 0.5 | 1 |
| 7 | Lung | NSCLC (Sq) | IV | 74/M | Liver, bone | 8 | 0 | 0 |
| 8 | Lung | NSCLC (Sq) | IV | 59/M | Lung, LN | 18 | 9.1 | 17 |
| 9 | Lung | NSCLC (Ad) | IIIA | 66/M | — | 1 | 0 | 0 |
| 10 | Lung | NSCLC (Ad) | IIIB | 63/F | — | 6 | 0 | 0 |
| 11 | Lung | NSCLC (Ad) | IV | 61/F | Lung | 3 | 0 | 0 |
| 12 | Lung | NSCLC (Ad) | IV | 54/M | Brain, Liver, kidney, bone, lung, pleura | 4 | 0 | 0 |
| 13 | Lung | NSCLC (Ad) | IV | 54/M | Brain, adrenal, LN (abdominal) | 4 | 0.5 | 1 |
| 14 | Lung | NSCLC (Ad) | IV | 61/F | Lung, liver | 4 | 0 | 0 |
| 15 | Lung | NSCLC (Ad) | IV | 68/F | Lung | 7 | 0.5 | 1 |
| 16 | Lung | NSCLC (Ad) | IV | 50/F | LN | 8 | 0 | 0 |
| 17 | Lung | NSCLC (Ad) | IV | 51/M | Pleura | 11 | 0 | 0 |
| 18 | Lung | NSCLC (Ad) | IV | 73/F | Bone | 14 | 43.2 | 81 |
| 19 | Lung | NSCLC (Ad) | IV | 61/F | Brain | 15 | 0 | 0 |
| 20 | Lung | NSCLC (Ad) | IV | 75/M | Lung | 16 | 0 | 0 |
| 21 | Lung | NSCLC (other) | IV | 63/M | — | 3 | 0 | 0 |
| 22 | Lung | NSCLC (LCNEC) | IV | 71/M | LN (neck) | 3 | 0 | 0 |
| 23 | Breast | IDC | IIIC | 72/F | — | 5 | 0 | 0 |
| 24 | Breast | ILC | IV | 53/F | LN, liver, bone, stomach | 0 | 0 | 0 |
| 25 | Breast | IDC | IV | 45/F | Lung, liver, bone | 1 | 0 | 0 |
| 26 | Breast | Ad | IV | 74/F | Bone | 2 | 0.5 | 1 |
| 27 | Breast | IDC | IV | 58/F | LN, lung, bone | 3 | 0.5 | 1 |
| 28 | Breast | IDC | IV | 58/F | LN, lung, liver, bone, skin | 4 | 0.5 | 1 |
| 29 | Breast | IDC | IV | 42/F | Lung, bone, pleura | 5 | 1.1 | 2 |
| 30 | Breast | IDC | IV | 71/F | Bone, pleura | 10 | 0 | 0 |
| 31 | Breast | IDC | IV | 56/F | Liver, bone, stomach | 20 | 6.9 | 13 |
| 32 | Breast | IDC | IV | 35/F | LN, lung, liver, bone | 23 | 23 | 23 |
| 33 | Breast | IDC | IV | 45/F | LN, bone | 255 | 193.6 | 363 |
| 34 | Breast | IDC | IV | 60/F | Lung, liver, bone, brain | 443 | 874.7 | 1640 |
| 35 | Breast | IDC | IV | 70/F | Bone, pleura | 829 | 402.7 | 755 |
| 36 | Cervix | Sq | IV | 54/F | Bone | 3 | 3 | 0 |
| 37 | Cervix | Sq | IV | 60/F | LN | 4 | 0 | 0 |
| 38 | Cervix | Sq | IV | 47/F | LN, lung | 6 | 0 | 0 |
| 39 | Peritoneum | Ad | IIIC | 72/F | Peritoneum | 3 | 0 | 0 |
| 40 | Endometrium | Ad | IV | 66/F | Peritoneum | 2 | 0 | 0 |
| 41 | CUP | Mesothelioma | IV | 61/F | Lung, peritoneum, pleura, subcutaneous | 0 | 0 | 0 |
| 42 | CUP | Ad | IV | 46/M | LN | 1 | 0 | 0 |
| 43 | CUP | Ad | IV | 43/M | LN, brain | 2 | 0 | 0 |
| 44 | CUP | Ad | IV | 68/M | LN, lung | 7 | 0 | 0 |
| 45 | CUP | Ad | IV | 66/M | LN, lung, brain, adrenal, thyroid | 9 | 0.5 | 1 |
| 46 | Head and Neck | SCC | IV | 61/M | LN, liver, bone, bone marrow | 24 | 71.5 | 134 |
| | Healthy donor | | | | | 1 | 0 | 0 |
| | Healthy donor | | | | | 1 | 0 | 0 |
| | Healthy donor | | | | | 0 | 0 | 0 |
| | Healthy donor | | | | | 3 | 0.5 | 1 |
| | Healthy donor | | | | 18 cells of PC-14 were spiked in blind | 10 | 0 | 0 |

Ad, adenocarcinoma; CUP, cancer of unknown primary; F, female; IDC, invasive ductal carcinoma; ILC, invasive lobular carcinoma; LCNEC, large cell neuroendocrine carcinoma; LN, lymph node; M, male; NSCLC, non-small cell lung cancer; Pt, patient number; SCLC, small cell lung cancer; Sq, squamous cell carcinoma; TKI, tyrosine kinase inhibitor; -, no metastases.

図16 肺がん・乳がん等患者検体におけるセルサーチシステムとの比較表

臨床検体30症例におけるNGS解析詳細

臨床検体（血液5mL）から前処理をおこない、On-chip® SortにおいてCTCs数を解析・分取した。分取したCTCsはNGS解析をおこなった。

| Sample ID# | CellSearch CTC (cells/7.5 mL) | On-chip Sort CTC (cells/7.5 mL) | On-chip Sort (cells/5 mL) | EGFR mutations in CTCs (allele frequency%) | EGFR mutations in primary tissue |
|------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------|--|----------------------------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | Wild-type | L858R |
| 2 | 1 | 9 | 6 | Ex19 del, p53 | Ex19 del |
| 3 | 5 | 20 | 13 | Ex19 del, SMAD4 | Ex19 del |
| 4 | 10 | 7 | 5 | Ex19 del, JAK3 | Ex19 del |
| 5 | 0 | 3 | 2 | Wild-type | Wild-type (EML4-ALK) |
| 6 | 0 | 3 | 2 | Wild-type | L858R |
| 7 | 0 | 3 | 2 | Wild-type, EGFR G719X | Ex18 G719X |
| 8 | 8 | 9 | 6 | Ex19 del, T790M (21%) | Ex19 del, T790M |
| 9 | 0 | 16 | 11 | Wild-type | L858R |
| 10 | 0 | 12 | 8 | Wild-type | Wild-type (KRAS Q61H) |
| 11 | 12 | 14 | 9 | Wild-type | Wild-type |
| 12 | 2 | 5 | 3 | Wild-type, CDH1 | Ex19 del |
| 13 | 0 | 6 | 4 | Wild-type | Ex19 del |
| 14 | 0 | 6 | 4 | Wild-type | L858R |
| 15 | 0 | 1 | 1 | Wild-type | Ex19 del |
| 16 | 2 | 12 | 8 | Wild-type | Wild-type |
| 17 | 0 | 6 | 4 | Wild-type | L858R |
| 18 | 0 | 9 | 6 | Ex19 del | Ex19 del |
| 19 | 11 | 6 | 4 | Wild-type | Wild-type (KRAS Q61H) |
| 20 | 0 | 6 | 4 | Wild-type | Ex18 G719X |
| 21 | 0 | 7 | 5 | Wild-type | Ex19 del |
| 22 | 0 | 2 | 1 | Ex19 del | Ex19 del |
| 23 | 5 | 6 | 4 | L858R (10%), T790M (17%) | L858R |
| 24 | 0 | 3 | 2 | Wild-type | Wild-type |
| 25 | 0 | 24 | 16 | Ex19 del | Wild-type |
| 26 | 2 | 8 | 5 | Wild-type, ERBB2 | Ex19 del |
| 27 | 0 | 12 | 8 | Wild-type, p53 | Ex18 G719X |
| 28 | 1 | 27 | 18 | Wild-type | Ex19 del |
| 29 | 0 | 15 | 10 | Wild-type | Ex19 del |
| 30 | 0 | 1 | 1 | Ex19 del, HIF1a | Ex19 del |

二次的変異も検出

10 個以下の CTC からでも遺伝子変異を検出

CellSearch では CTC を検出できなかった検体からでも CTC とその遺伝子変異を検出

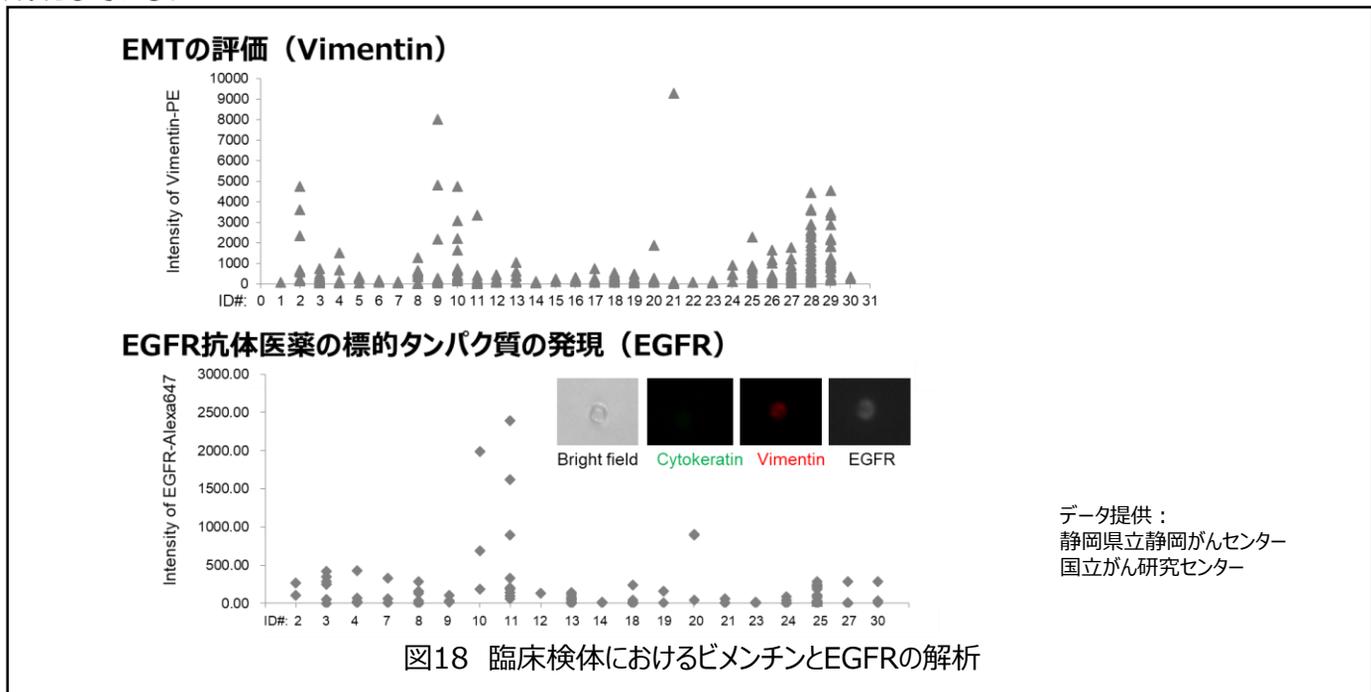
治療によって獲得した耐性変異も CTC から検出

データ提供：
静岡県立静岡がんセンター
国立がん研究センター

図17 臨床検体30症例におけるNGS解析

臨床検体におけるビメンチンとEGFRがん細胞表面マーカー解析

On-chipシステムは、CTCs数の測定・分取以外にCTCs表面マーカー頻度の解析も可能である。例えば EMTに大きく関与しているビメンチンの発現強度の解析や薬剤ターゲットとなるEGFRの発現強度をサンプルごとに解析することができる。臨床検体約30症例においてもビメンチンとEGFRの発現強度の強弱を捉えることに成功している。



データ提供：
静岡県立静岡がんセンター
国立がん研究センター

図18 臨床検体におけるビメンチンとEGFRの解析

第2章

CTCs回収診断装置の実用化に向けて ～新たなるステージNGS解析への道～ (2016～2017年)

CTCs解析は現在も癌の診断技術としての臨床的有用性は高いと考えられるが、EpCAMの発現に依存するだけのCTCs解析や、CTCs数のみで癌転移や予後の判断をすることの意義は薄れつつあり、CTCsを用いたがん診断・治療方針決定方法も大きく変わろうとしている。

近年では癌治療の最前線は、分子標的薬、免疫チェックポイント阻害剤などへ大きくシフトしつつあり、がん細胞が持つマスター遺伝子の変異や薬の標的分子の把握が治療方針決定に大きな情報となり得ると予測されている。

以下、CMC出版「リキッドバイオプシー -体液中腫瘍マーカーの検出・解析技術-」に掲載した内容を中心に紹介しながら、今後の我々の取り組みを紹介する。

1. はじめに

がん診断では原発巣から直接組織の一部を採取するバイオプシーが行われているが、患者本人の身体的な負担は少なくない。経過観察における治療方針の決定は短い間隔におけるモニタリングを考えると低侵襲な方法が求められており、近年ではリキッドバイオプシーという概念が注目を浴びている。その中でも我々が注目しているのは血液中を循環する癌細胞（circulating tumor cells : CTCs）である。CTCsは原発性腫瘍から血管に入り込み体内を循環してから転移を引き起こすと考えられている¹⁾。このがん細胞が血液中を循環しているタイミングで回収し「癌細胞の状態」を確認することが出来ればリアルタイムで治療方針を見直す機会が増えると考えられる。

しかしCTCsは末梢血10mL中に多くても数個～数十個しか存在しない。このような微少数の細胞を血液細胞の中から探し情報を得ることは非常に難しい技術である。これまでCTCs回収技術は抗体磁気ビーズによる細胞の磁気濃縮やサイズフィルターを用いた単離技術が開発されてきている。しかし、これらの濃縮技術は、特定の表面抗原やサイズなどに依存しているために偏った濃縮である。我々の濃縮技術は、以下に説明する様にこの偏りを改善した濃縮方法であり、シングルCTCにおける発現強度解析も可能としている。On-chip Sortはフローサイトメーターをベースとしマイクロ流路チップの技術を駆使した検体間クロスコンタミネーションフリーを実現したセルソーターで、これまで不可能であった繰り返しソーティングの技術を可能とし大多数の血液細胞の中から目的の細胞を取り出すことに成功した。また本来のフローサイトメーターの技術である発現強度解析も可能となるため、サンプルごとのCTCs中の目的タンパク質発現および頻度を知ることができる。

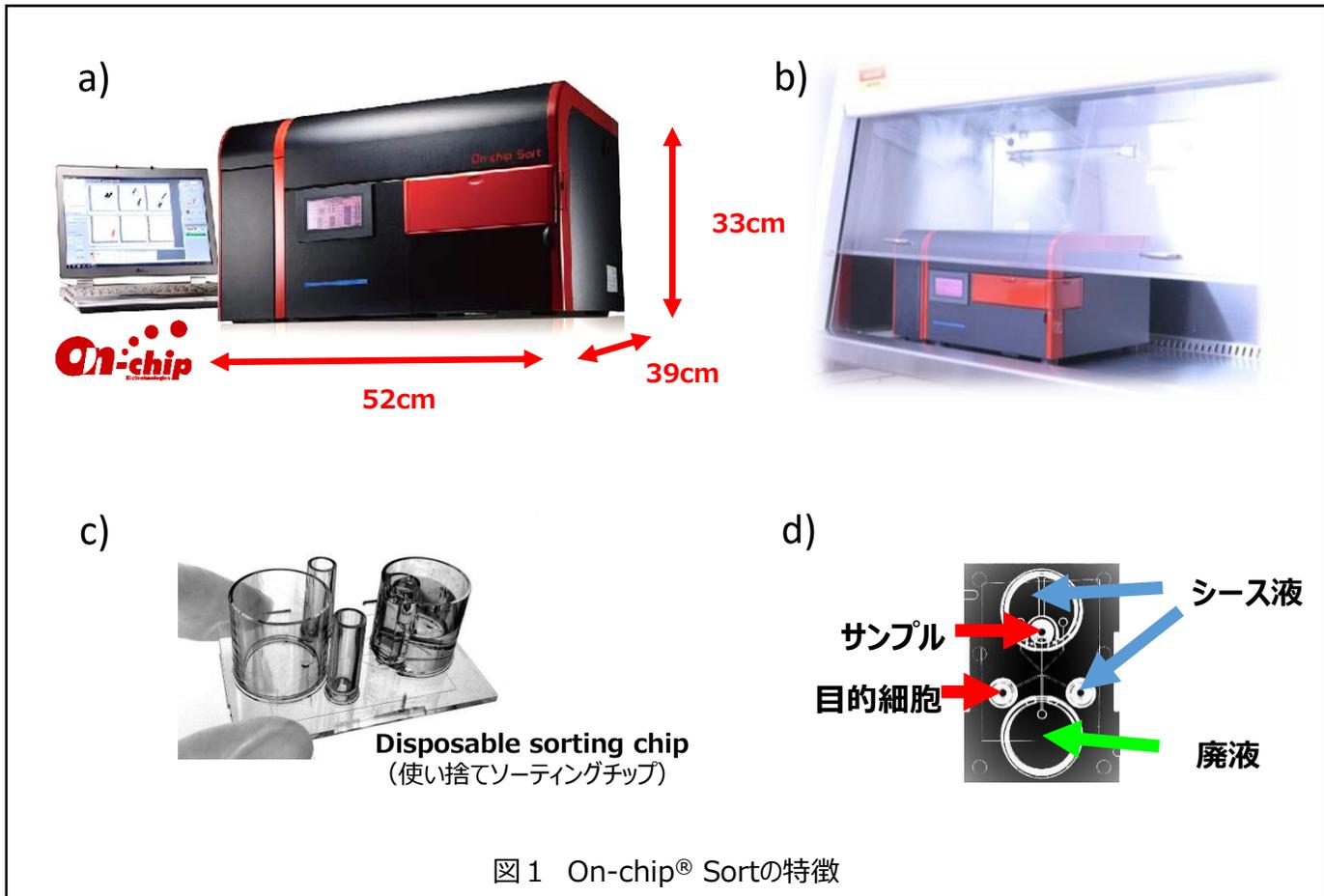
癌細胞の中には上皮間葉転換（Epithelial-to-mesenchymal transition : EMT）をおこす細胞がある。マウスレベルではEMTを起こしたがん細胞は化学療法に抵抗性があることも報告されている²⁾。この上皮系細胞と間葉系細胞を見分けるために使用される選択肢の一つがEpCAMとVimentinである³⁻⁶⁾。また、癌細胞の特徴として細胞増殖が速いことが上げられる。

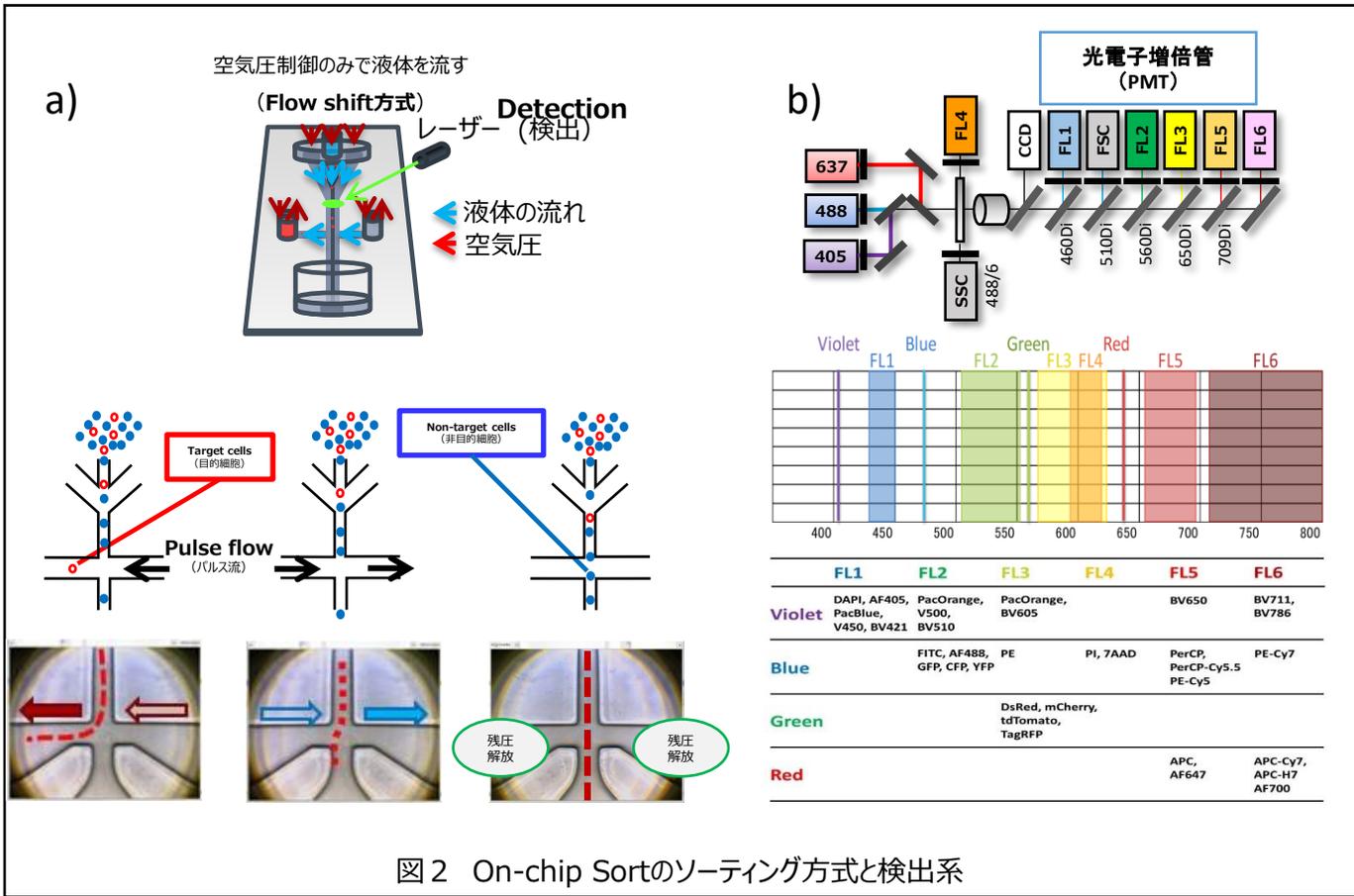
上皮成長因子受容体（EGFR）は細胞増殖に関わっていて、常に活性化されている状態にあると、無秩序な細胞増殖が起こる。実際に非小細胞肺癌や大腸がんを含む様々ながん細胞でEGFRが過剰発現している。さらに、EGFRが過剰発現している細胞はそうでない細胞と比べ、高い転移性を示すことが判っている。この過剰発現は、EGFRのみならずPD-L1などでも起きている報告もある⁷⁾。このような過剰発現やその頻度を癌細胞レベルで捉えることが出来れば転移の可能性を診断できるのではないかと考えている。

2. On-chip® Sortとは

On-chip® Sortはフローサイトメーターをベースとした細胞を分取する装置である。コンパクト設計になっており、縦39cm、横52cm、高さ33cmとなっている（図1 a）。このサイズはクリーンベンチや安全キャビネットに入るように考えられ設計されている（図1 b）。検出原理はフローサイトメーターにおける基本原理と同じく、細胞表面もしくは内部に発現している抗原タンパク質を特異的な蛍光標識抗体を使用して染色し、流路内に細胞を流しながら特定波長のレーザーを当て蛍光励起、その蛍光を検出器で検出し蛍光強度をプロット表示してデータ化している。

On-chip® Sortの最も特徴的な内容は指でつまめるほどの大きさの使い捨て交換型マイクロ流路チップ（図1 c）を採用して、サンプル液が触れる範囲がこのチップ内に収まるというところにある（図1 d）。このため完全封鎖系であり、ユニークな分取方式を採用していることで少数細胞の解析・分取に適した装置となっている。分取方式は特徴的なFlow shift方式を採用しチップ内のみで細胞分取が可能となっている。Flow shift方式はサンプル液をシース液で挟み込んだ状態で流し、レーザー照射により目的の蛍光シグナルを検出したときのみ横方向から空気圧で液体を押し流し込むシステムとなっている（図2 a）。このシステムは細胞回収ロスを最小限に抑えることができるため、特に目的細胞が少数の場合に威力を発揮する。検出器は散乱光2種類（FSC、SSC）および蛍光最大6種類まで検出することが可能である（図2 b）。レーザーは最大3本まで同時搭載が可能であり様々な蛍光標識に対応している。





3. On-chip® Sort CTCプロトコル

On-chip® Sortを使用したCTC解析・回収プロトコルは、カラムや磁気ビーズを使用しない。当初の方法では磁気ビーズを使用してCD45陽性血液細胞除去を施し、On-chip® Sortで解析していた。臨床データも取得し有用性は確認済みである。しかし磁気ビーズは高価な商品であり且つ作業も非常に煩雑となる。我々は頻繁にモニタリングすることの意義を追及するため本方法における原価低減と手技の軽減に意識を置いている。その結果が、解析する装置でそのまま純化することであった。現在ではフローサイトメーターで 10^7 個～ 10^8 個の細胞をそのまま処理することは処理時間という観点で非現実的であるが、我々は繰り返しソーティングという方法を使用している。これは1回で高純度に回収するのではなく、2～3回繰り返すことにより徐々に回収純度を向上させていく方法である(図3)。1回目のソーティングは高細胞濃度で流しているため、目的細胞を回収するとき一部の血液細胞も引き込まれ回収する。この時点で純度は高くないが、繰り返しソーティングすることで血液細胞は除かれ細胞濃度は低くなるため、2～3回目後には目的細胞の純化が完了している仕組みである。

このようにOn-chip® Sortを使用して末梢血中からCTCを回収するプロトコルをOn-chip CTCプロトコルとして作成した。On-chip CTCは、サイトケラチンを主マーカーとして分取する。図3にあるように、血液細胞に極力発現していないタンパク質があれば、それを抗原として蛍光標識抗体で細胞を光らして検出し分取する。その一連のプロトコルを図4に記す。採血当日作業が可能な場合は、EDTA採血でも良い。我々は4日間保存可能なCell-Free DNA BCT 10mL(Streck, Inc)を使用し採血することが多い。溶血、細胞固定、細胞透過処理および蛍光標識抗体による細胞染色を施しサンプルとする。我々が現在用いている染色は、ソーティングターゲットとするサイトケラチンをはじめ、細胞核、EpCAMおよびVimentinとしている。細胞の核を染色することでノイズや微粒子や細胞片などと区別し、サイトケラチン陽性細胞を純化する。純化後の解析でサイトケラチン陽性細胞におけるEpCAMとVimentinの発現強度および頻度を確認する。

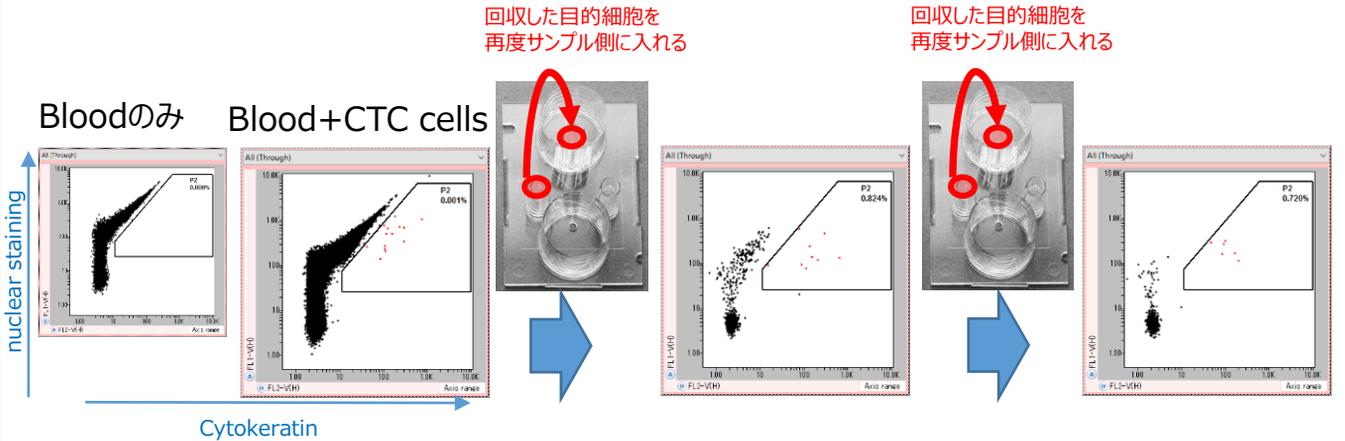
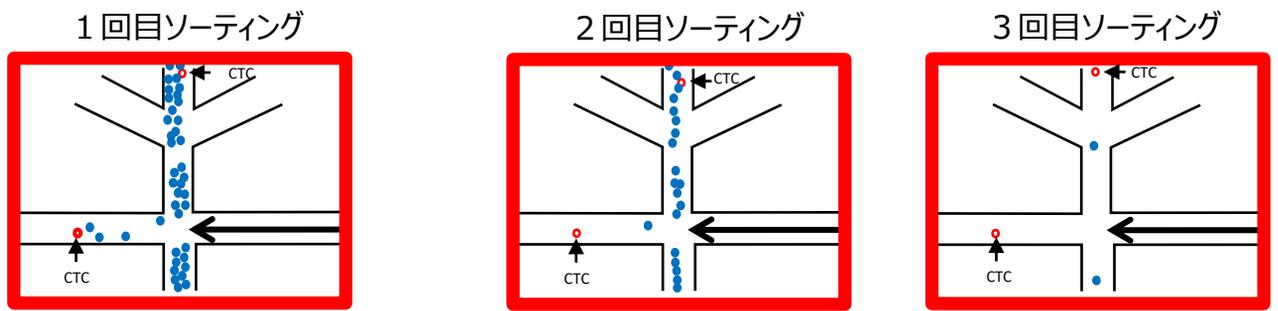
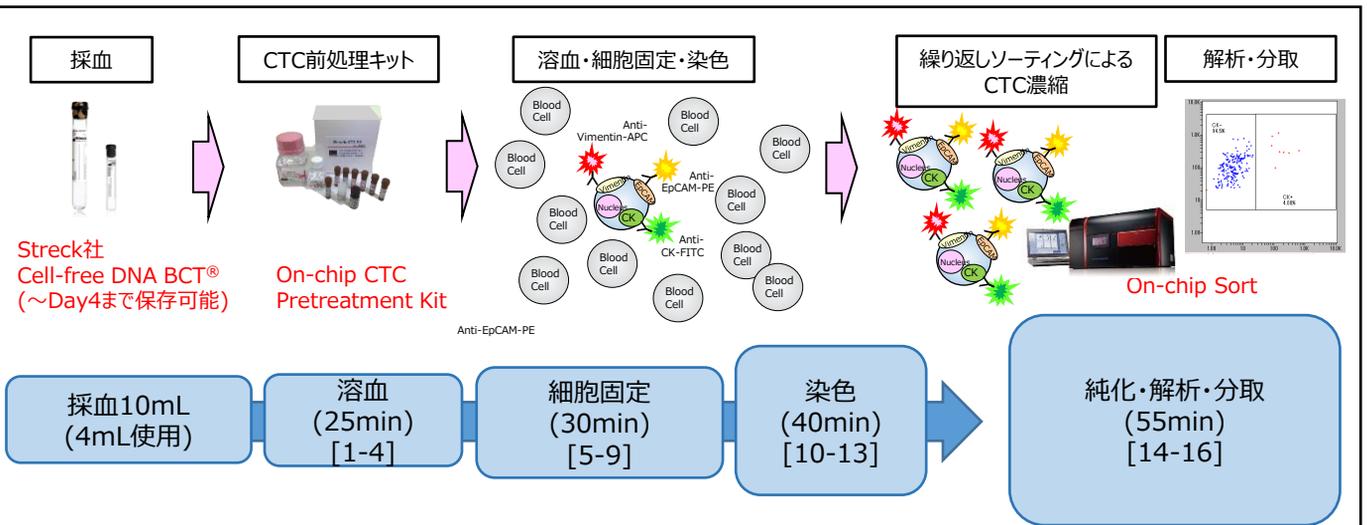


図3 繰り返しソーティングのイメージ



[操作手順]

0. 使用する器具・試薬を準備する。
1. よく混和した血液4mLを、On-chip T bufferでコーティングした50mL チューブへ移す。
2. 溶血液を40mL加え、混和せず室温で15分間静置する。
3. 300 × g で5分間 (室温) 遠心する。
4. 上清を除去する。
5. 固定液を500μL 加えてゆっくり20回懸濁し室温で5分間 静置する。
6. 透過処理液を500μL 加えてゆっくり20回懸濁し室温で 20分間 静置する。
7. On-chip T Buffer 5mL 加える。
8. 300 × g で5分間(室温) 遠心する。
9. 上清を除去する。
10. 混合蛍光標識抗体液を 100μL加え20回懸濁し室温で30分間静置する。
11. On-chip T Buffer 5mL 加える。
12. 300 × g で5分間(室温) 遠心する。
13. 上清を除去し、150μL程度にして懸濁する。
14. On-chip® sortで純化分取 (1回目) する。
15. On-chip® sortで純化分取 (2回目) する。
16. On-chip® sortで解析・分取 (3回目) する。

図4 On-chip CTCプロトコル

4. On-chip CTCの基礎データ

健康人末梢血4mL中に赤血球を除いた血液細胞は約 3×10^7 個存在する。On-chip® Sortは、溶血、細胞固定・透過処理、細胞染色後この細胞数を処理することとなる。まずは繰り返しソーティングによる血液細胞の残存数をカウントした（図 5 a）。 2×10^7 個を超える細胞数で始め、同じチップを使用してソーティングを3回繰り返し残存数十個程度の血液細胞の除去に成功した。YG蛍光ビーズを使用して目的物が繰り返しソーティングにより減少するのか検討した結果では（図 5 b）ビーズ数15~88個の条件で始め、3回の繰り返しソーティング後に残った割合は84~86%であった。図 5 cでは末梢血4mL中にPC-9細胞を50個スパイクしてOn-chip® Sortで純化した結果を示している。3回目の繰り返しソーティングにおいてマイクロ流路チップを新しいものに変えた結果と1チップを使い続けた場合のデータを取得した。この結果から新しいものに交換したチップを使用することで回収細胞の純度が画期的に向上することが示されており、2次解析に持って行くときに高純度を要求されるときは、チップ交換をすれば良いと考えられる。これら性能から、 10^7 個レベルの血液細胞から10個レベルの目的細胞を純化できる可能性がわかる。図 5 dは末梢血4mLに細胞株5個~50個をスパイクしOn-chip CTCプロトコルに準じて3回ソーティング処理した結果である。スパイクした5個~50個の細胞は6割~8割で回収出来ており、高い直線性も認められた。図 6は処理後に顕微鏡写真で確認した結果である。ソーティングを始める前のサンプルは数多くの血液細胞が含まれているが、3回ソーティング後には目的のサイトケラチン染色（緑）された細胞が高純度で回収されていた。これら結果は、On-chip® Sortで末梢血4mL中に数個存在する目的細胞を7割前後で回収することができることを意味している。極力細胞回収減少を抑えた方法であり、CTCをゲノム解析する場合には検出したCTC全体の70%程度を次世代シーケンサー解析用として分取できることを示している。

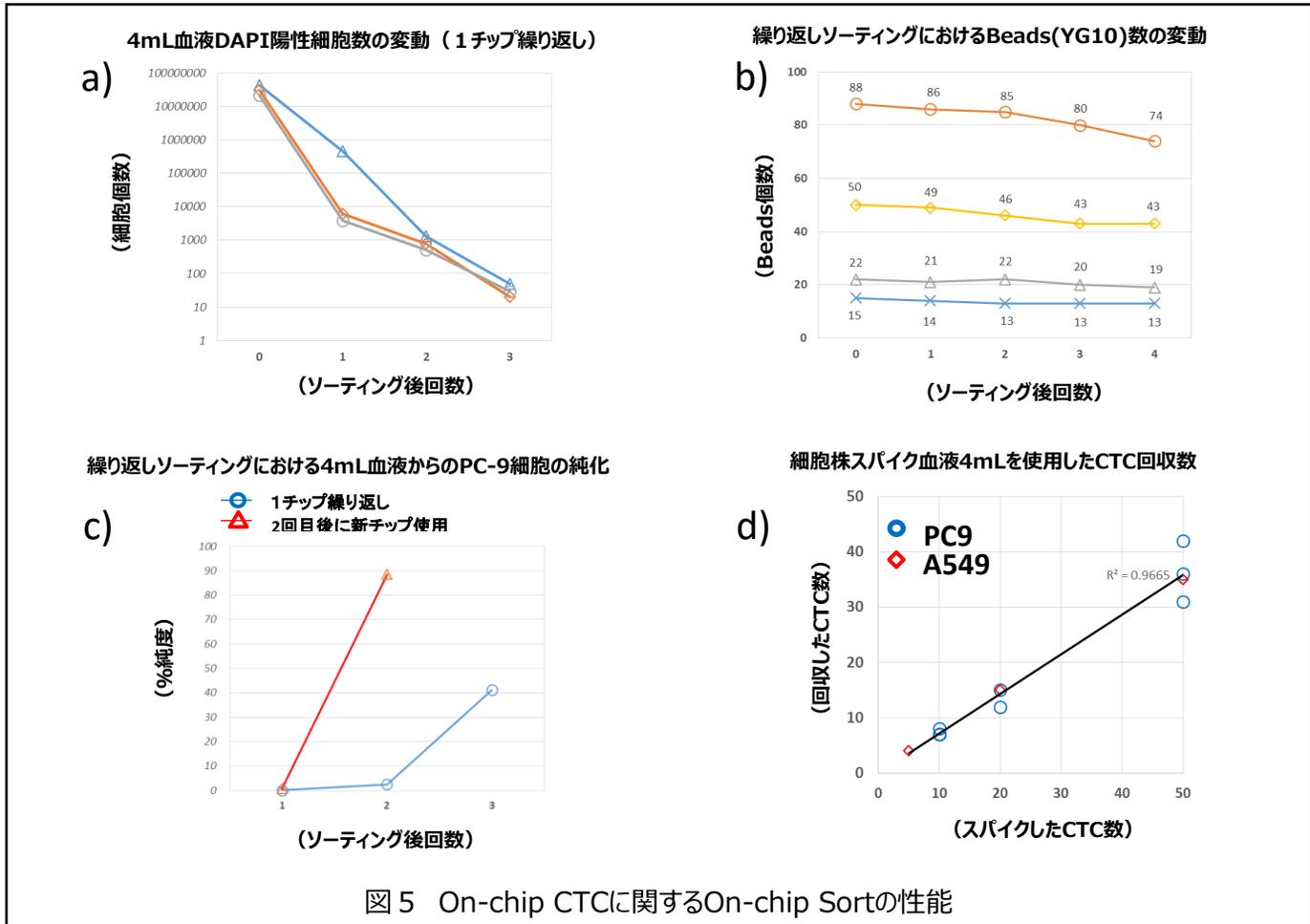
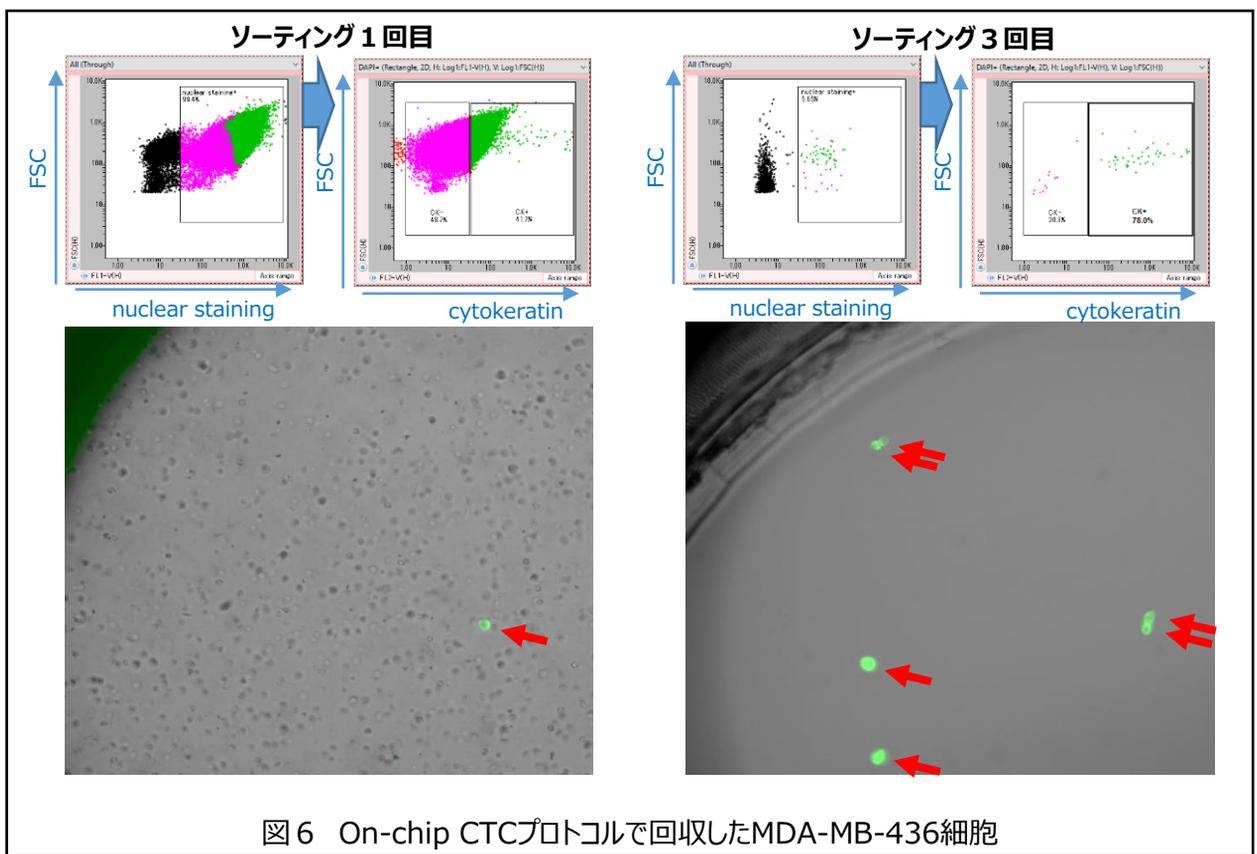


図 5 On-chip CTCに関するOn-chip Sortの性能



5. On-chip CTCの応用

フローサイトメーターは、細胞のタンパク質発現を解析したり、その発現を利用して分取したりすることができる装置である。On-chip[®] Sortも同様の機能を有しており、これまで述べて来たサイトケラチン陽性CTCsを純化分取するだけでなくタンパク質発現の解析も可能となっている。例えば癌細胞のEMTを起こしたときのマーカーとなるEpCAMとVimentinの発現強度や頻度を解析したり、薬剤ターゲットとなるEGFRやPD-L1などの過剰発現を捉えたりすることも可能と考える。まず細胞株を使用してVimentin、EpCAM、EGFR、PD-L1の発現を解析した（図7）。MDA-MB-436細胞株は一部集団でVimentin発現を示しEpCAM発現は全体的に低い。MCF-7細胞株ではVimentin発現は低いEpCAM発現は高い。A549、PC-9、NCI-H1975細胞株におけるPD-L1とEGFR発現は、多少の強弱があるものの各細胞株で発現が確認された。図8では、末梢血4mLにMDA-MB-436とMCF-7をそれぞれスパイクして発現強度解析をおこなった。末梢血中からOn-chip CTCプロトコルに従って数十個の細胞株を回収してきてそれぞれの細胞株特有の発現パターンを示していた。一方、このEpCAMとVimentinの組み合わせの代わりに、EGFRとPD-L1の発現強度解析をすることも可能である。図9では、NCI-H1975細胞株を末梢血4mLに10個スパイクし、On-chip CTCプロトコルに従って処理した。サイトケラチン陽性細胞は8個回収された。その8個のサイトケラチン陽性細胞は、EGFRおよびPD-L1を強く発現する傾向が確認された。これら結果は、図7に示す結果と同等の発現を示し、末梢血中からCTCsを回収しても、それら細胞の発現強度解析が可能であると考えられる。このような発現強度や頻度解析の組み合わせは無尽大である。例えば、PD-1/PD-L1をターゲットとしている免疫チェックポイント阻害剤などの使用時には、がん細胞上のPD-L1の発現が気になるかと思われる。図9cにあるようにサイトケラチン陽性CTCsを回収すると同時にPD-L1とEGFRの発現を見ておけば、EGFRの過剰発現とPD-L1の発現を押さえることができ、投薬を選択させる重要な情報になり得る可能性がある。

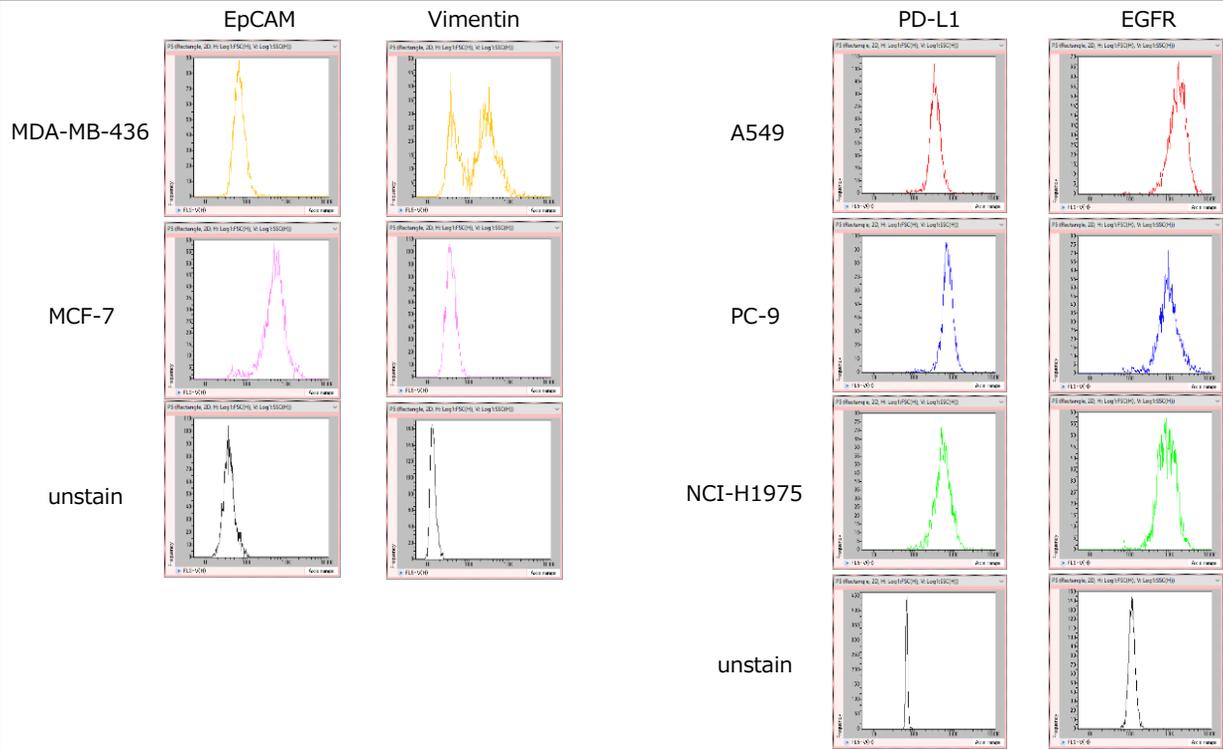


図7 各細胞株におけるEpCAM、Vimentin、PD-L1、EGFRの発現

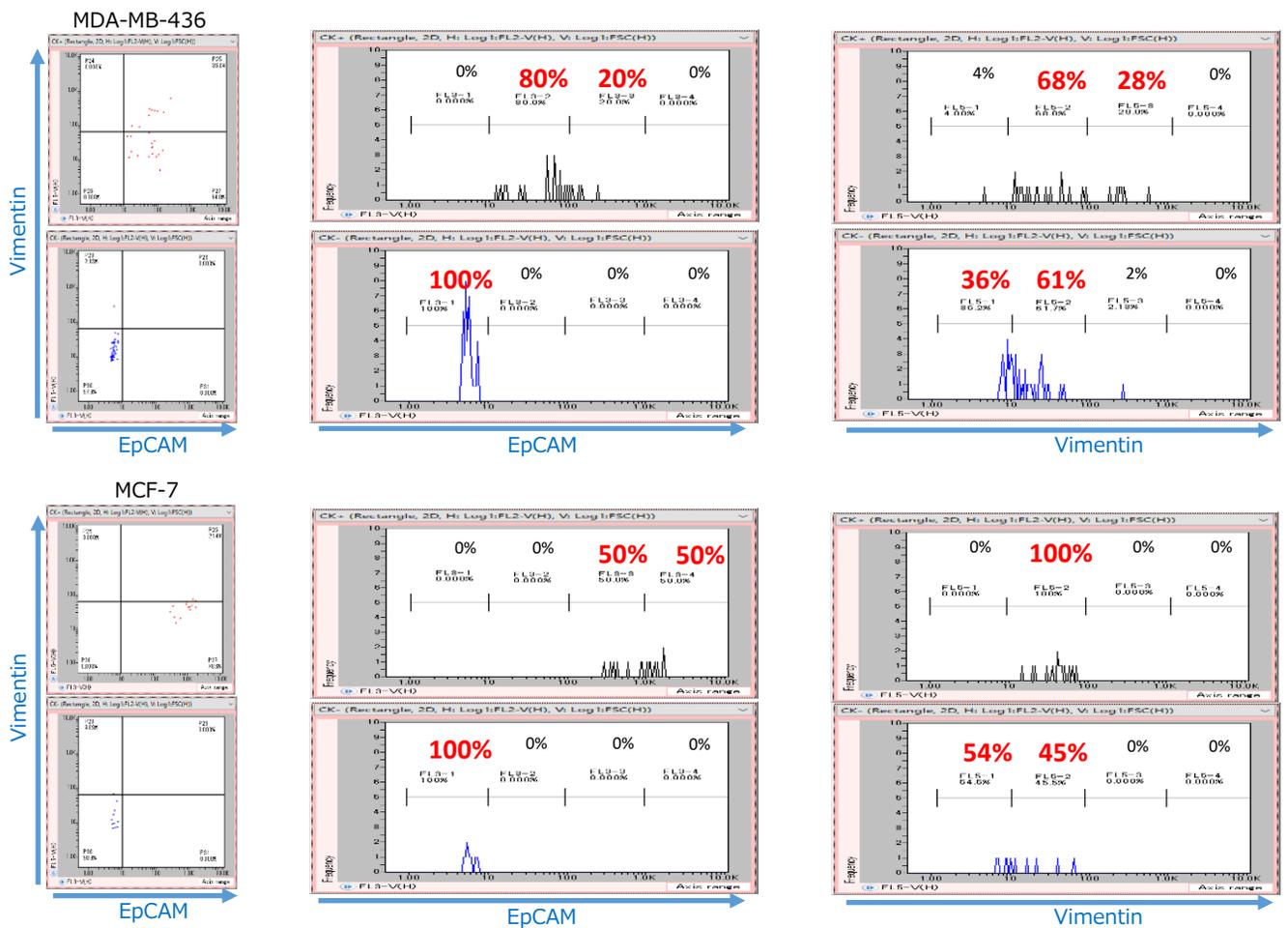


図8 スパイク末梢血を使用してOn-chip CTCで処理した発現強度解析

NCI-H1975

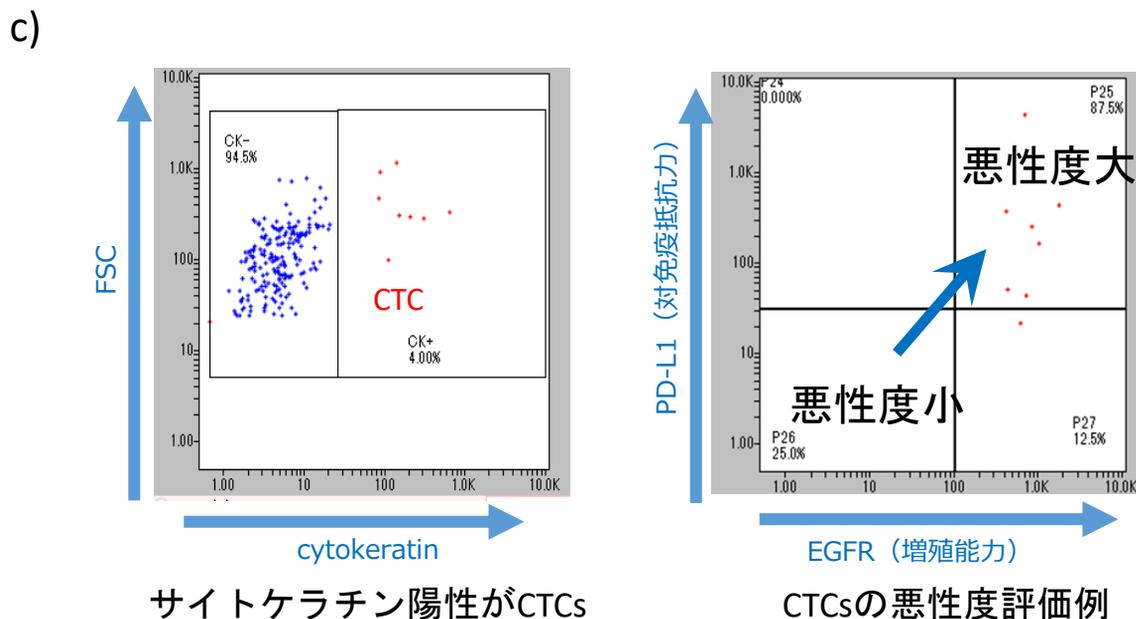
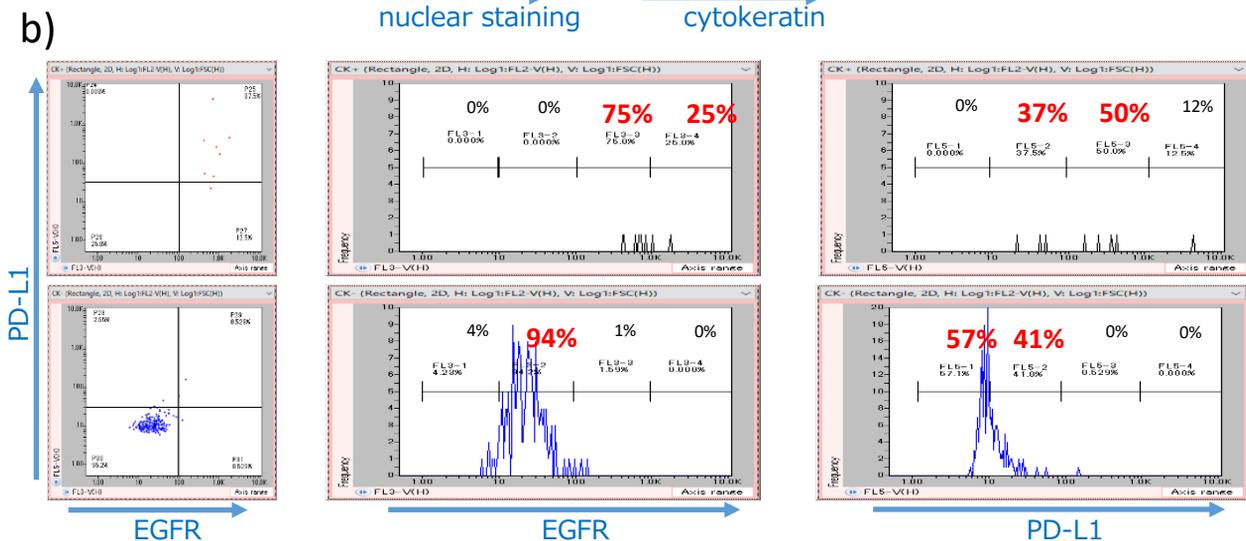
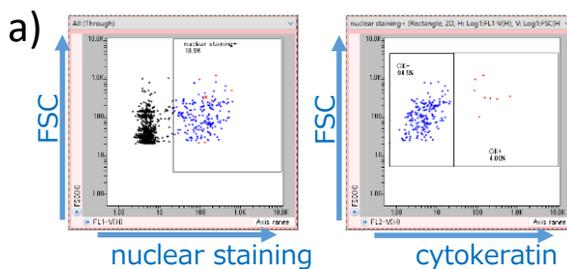


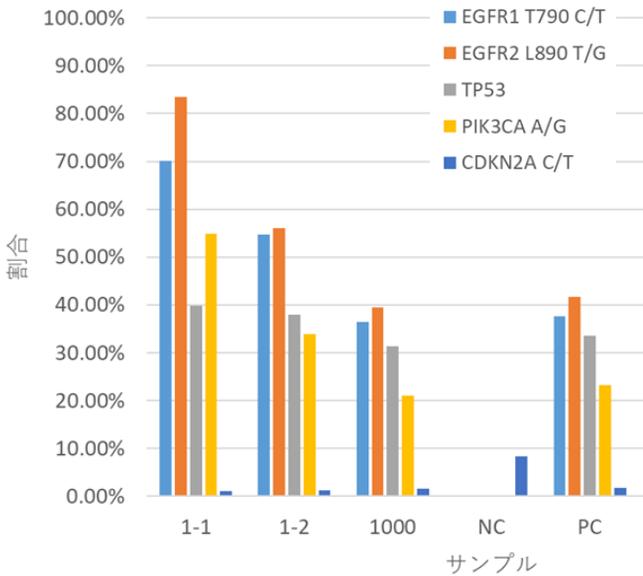
図9 NCI-H1975細胞株におけるEGFRおよびPD-L1発現強度の解析

2次解析としてNGS解析（ターゲットシーケンス）が可能かどうか確認するためH1975細胞株1個、1000個を血液4mLにスパイクし、EGFR陽性細胞を細胞固定せずに回収する On-chip CTCプロトコルにおいてH1975を回収後、NGS解析（MiSeqによるターゲットシーケンス）をおこなった（図10a）。その結果、H1975細胞株1個回収でも100個、1000個と同等な検出を示した。この結果は、図10bにあるように他社製品におけるNGS解析の精度より大きく有意な結果となっている。

サンプル5種類

- 1-1 : 末梢血 4 mLにH1975を10個スパイクし、
On-chip Sortで1パルスソーティングにより1個回収したサンプル (#1)
- 1-2 : 末梢血 4 mLにH1975を10個スパイクし、
On-chip Sortで1パルスソーティングにより1個回収したサンプル (#2)
- 1000 : 末梢血 4 mLにH1975を1000個以上スパイクし、
On-chip Sortで1000パルスソーティングにより1000個回収したサンプル
- NC : ネガティブコントロール（溶血済み血液細胞100個）
- PC : ポジティブコントロール（H1975細胞100個）

a) 5種類のがん遺伝子変異の検出



AACR2015 High Purity Isolation of Circulating Tumor Cells For Next Generation Sequencingより

b) 他社CTCs回収装置NGS検出における精度

| Sample Id | Sequencing Metrics | | NCI-H1975 Variants | | | | | HCT-116 Variants | | |
|---------------|--------------------|----------|--------------------|------------|------------|--------------|-------------|------------------|-----------|---------------|
| | Depth | Coverage | EGFR T790M | EGFR L858R | TP53 R273H | PIK3CA I391M | CDKN2A E69* | SMO V404M | KRAS G13D | PIK3CA H1047R |
| 250 cells (1) | 7659 | 97% | 23% | 42% | 54% | 17% | 22% | 18% | 8% | 11% |
| 250 cells (2) | 7521 | 97% | 35% | 29% | 35% | 4% | 21% | 6% | 8% | 8% |
| 50 cells (1) | 11157 | 97% | 22% | 9% | 11% | 7% | - | 4% | - | - |
| 50 cells (2) | 6863 | 97% | 16% | 12% | 13% | 4% | - | - | - | - |
| 10 cells (1) | 2741 | 96% | 11% | - | 4% | - | - | - | 4% | - |
| 10 cells (2) | 5959 | 96% | 9% | 7% | 4% | - | - | 5% | - | - |
| 0 cell | 6380 | 98% | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Whole blood | 6670 | 99% | - | - | - | - | - | - | - | - |

(AACR2015 ClearBridye BioMedics社ポスターから参考)

図10 NCI-H1975細胞株におけるNGS解析

6. おわりに

がん治療の主な治療方法は大きく分けて手術治療、化学治療、放射線治療の3種類に分類されている。しかし近年、新薬の登場により新しい“免疫療法”が注目を浴びている。この背景には免疫システムの研究が進み、この切り口から新しいタイプの治療法が次々と登場していることが上げられる。アメリカの科学誌「サイエンス」は、Cancer Immunotherapyについて免疫システムを使用した非常に魅力的な治療法であると2013年科学のブレークスルーに選んでいるほどである⁸⁾。ここで話題に上げられているのがCTLA-4とPD-1 pathwayである。これら免疫システムの抑制をブロックするために、抗CTLA-4抗体や抗PD-1抗体もしくは抗PD-L1抗体の作製・臨床試験が進められ免疫チェックポイント阻害剤として知られている。2017年5月現在日本国内で承認されている免疫チェックポイント阻害剤はイピリムマブ（ヤーボイ）、ニボルマブ（オプジーボ）、ペムブロリズマブ（キイトルーダ）などが上げられ、悪性黒色腫を中心に適応幅が徐々に増えつつある。一方、EGFRは過剰発現による異常増殖を抑えるためにEGFRチロシンキナーゼ阻害剤として知られているゲフィチニブ（イレッサ）などが存在する。これら療法は、ターゲットが決まっているため癌細胞の状態が変化すると薬が効かなくなる可能性が高い。

その変化をCTCsとして回収し、細胞表面における過剰発現解析のモニタリングまたはNGSなどの二次解析をすることが可能になれば癌細胞の状態の把握およびコントロールも容易になるかもしれない。On-chip Sortを使用したOn-chip CTCプロトコルは、これら解決の役に立つことを目指している。

参考文献

- 1) Leung CT, et al. Tumor self-seeding: Bidirectional flow of tumor cells. Cell. 2009 Dec 24;139(7):1226-1228.
- 2) Kari R. Fischer, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. Nature 527, 472-476.
- 3) Kalluri R, et al. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest. 2009 Jun;119(6):1420-1428.
- 4) Mego M, et al. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications. Nat Rev Clin Oncol. 2010 Dec;7(12):693-701.
- 5) Pecot CV, et al. Novel platform for detection of CK+ and CK- CTCs. Cancer Discov 2011 Dec;1(7):580-586.
- 6) Barriere G, et al. Epithelial mesenchymal transition: A new insight into the detection of circulating tumor cells. ISRN Oncol 2012;2012:382010.
- 7) K. Azuma, et al. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. Ann Oncol. 2014 Oct;25(10):1935-1940.
- 8) Jennifer Couzin-Frankel. Cancer Immunotherapy. Science 342 (6165), 1432-1433.