

”ポリマーCTCチップ”

新たながん医療への応用

産業医科大学 第2外科学 非常勤講師

CTC 臨床応用研究会・Liquid Biopsy 研究会 世話人 大永 崇

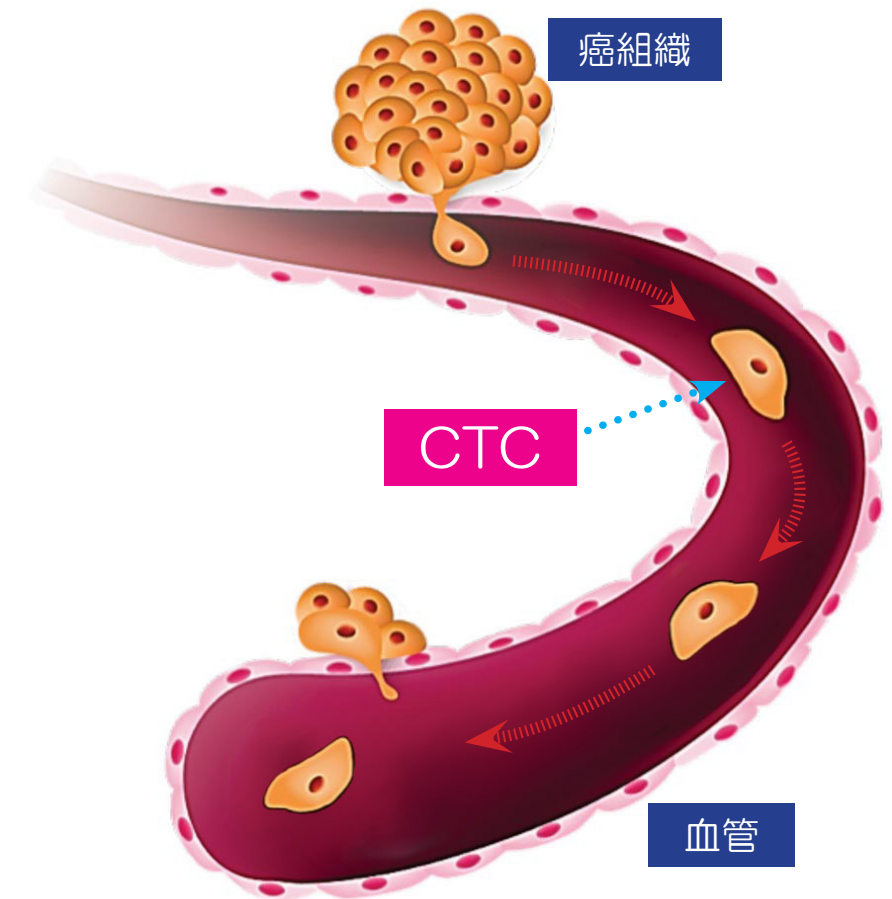
●はじめに

患者さんの癌細胞がいつでも安全に少ない負担で採取でき、がん医療において容易に利用できるようになれば、がんの治療、診断、創薬、研究などが飛躍的に発展することが期待されています。血中循環腫瘍細胞（Circulating Tumor Cell: CTC）は、このような癌細胞の利用を実現する可能性を秘めており、近年、精力的にその研究が進められています。

私たちは、自ら開発した” **ポリマーCTCチップ**” を利用した臨床研究を行い、CTC が拓く新たながん医療の可能性を明らかにしてきました。

以下では、私たちのこのような研究について概説します。

血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell: CTC)



●病期、予後への応用

CTC 血中濃度が病期と共に増加すること、さらに予後予測に適用できることは、既に多くの研究により示されています。ポリマー CTC チップの研究では、CTC 捕捉が難しくこれまでに研究例のない悪性胸膜中皮腫で、このような検討を行いました。

病期については従来同様、病期が上がるにつれ CTC 血中濃度が増大することが示されました。

また予後については、患者さんの CTC 血中濃度と閾値（1mL あたり 0 または 1）との大小関係により、生存率変化が明確に異なることが確認されました。

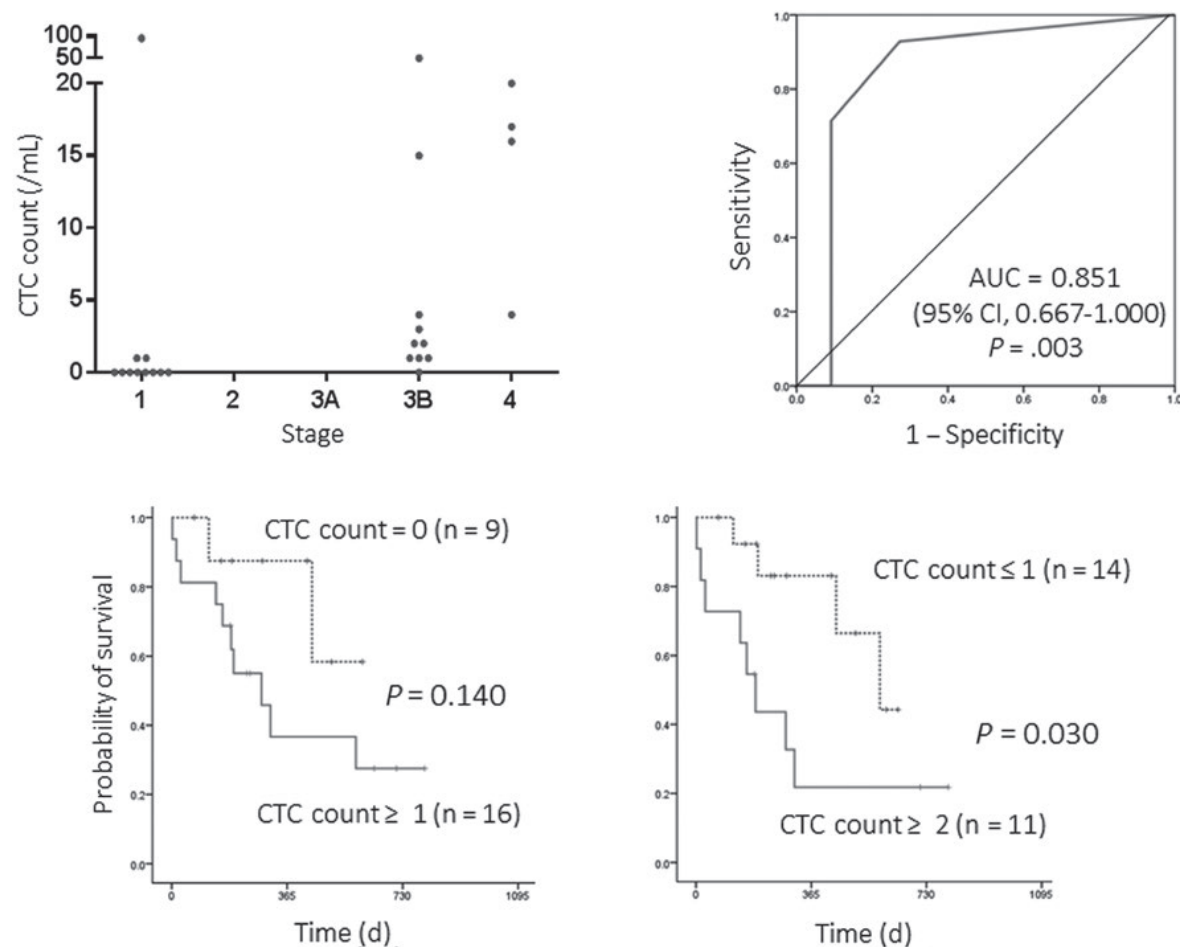


FIGURE 5 Clinical implications of circulating tumor cells (CTCs) detected with the CTC-chip in malignant pleural mesothelioma (MPM). Top left panel, distribution of CTC count according to disease stage. CTCs were detected in peripheral blood sampled from 25 patients with MPM with the podoplanin-chip. The number of CTCs (CTC count) was significantly higher in advanced stages of disease (stage IIIB and IV). Top right panel, receiver operating curve to predict "unresectable" disease (stage IIIB or IV). CTC count provided a significant diagnostic performance in discrimination of "unresectable" (stage IIIB or IV) disease from potentially "resectable" disease. Bottom panels, overall survival curves according to CTC count. Patients with high-CTC tumor (CTC count ≥ 2) showed a significantly poorer prognosis than those with low-CTC tumor (CTC count, 0 or 1)

* Yoneda, K. et al. Cancer Sci. 110, 726-733 (2019)

●癌治療モニタリングへの応用

手術や化学療法による癌治療において、CTC 血中濃度の低下は治療がよく効いていることを示す多くの研究結果が報告されています。ポリマー CTC チップを用いた悪性胸膜中皮腫の検討では、手術と化学療法で治療中の患者さん、化学療法で治療中の患者さんの2例について、CTC 血中濃度を約2年間継続して測定しました。両方のケースで治療開始から CTC 血中濃度が低下したまま維持され、この期間に癌の再発や進行は認められませんでした。

Figure S3A: Longitudinal monitoring of CTCs

Case 1 (64 years, Male) Epithelioid MPM (stage IB/T3N0M0)

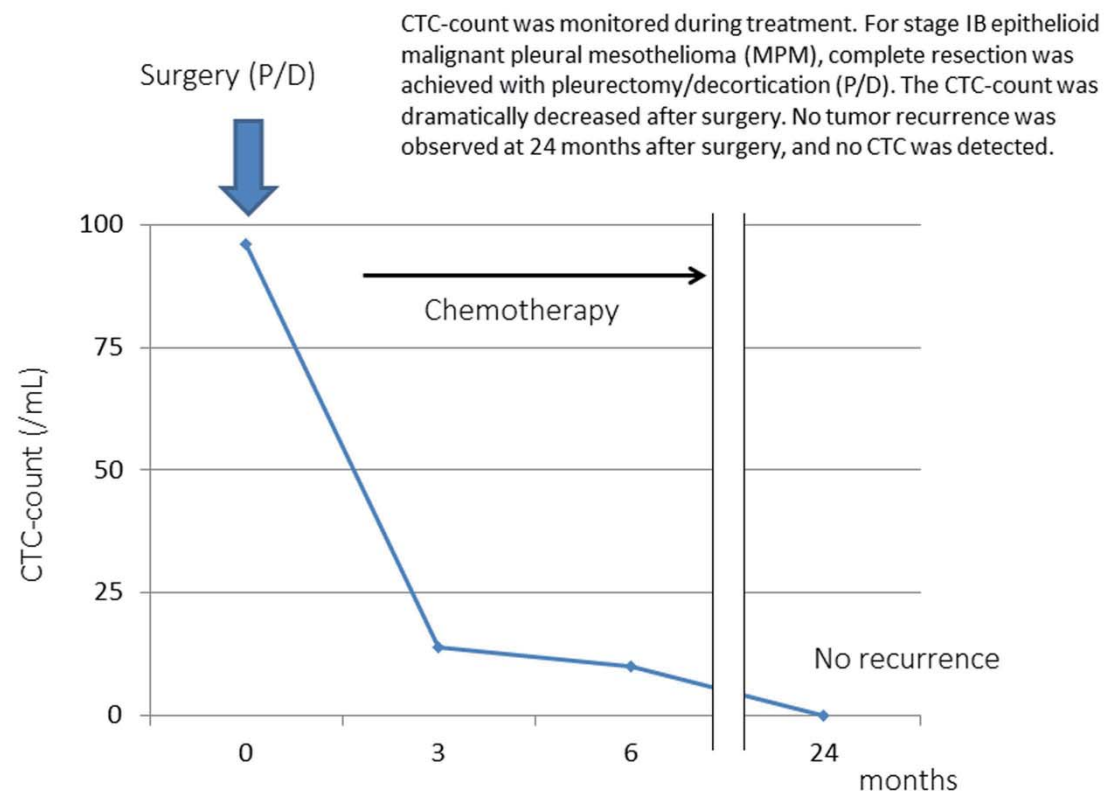
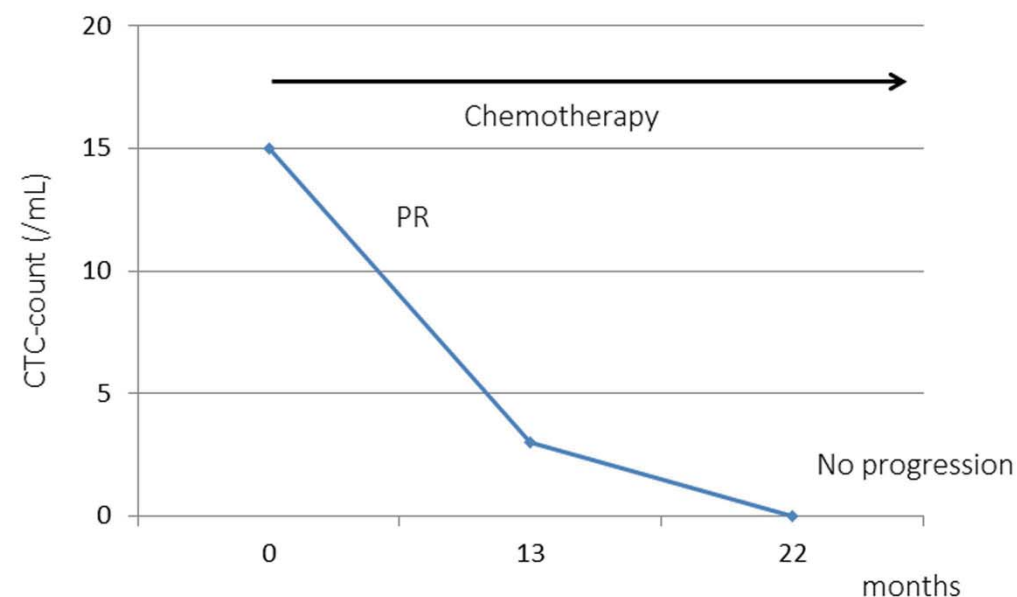


Figure S3B (Longitudinal monitoring of CTCs)

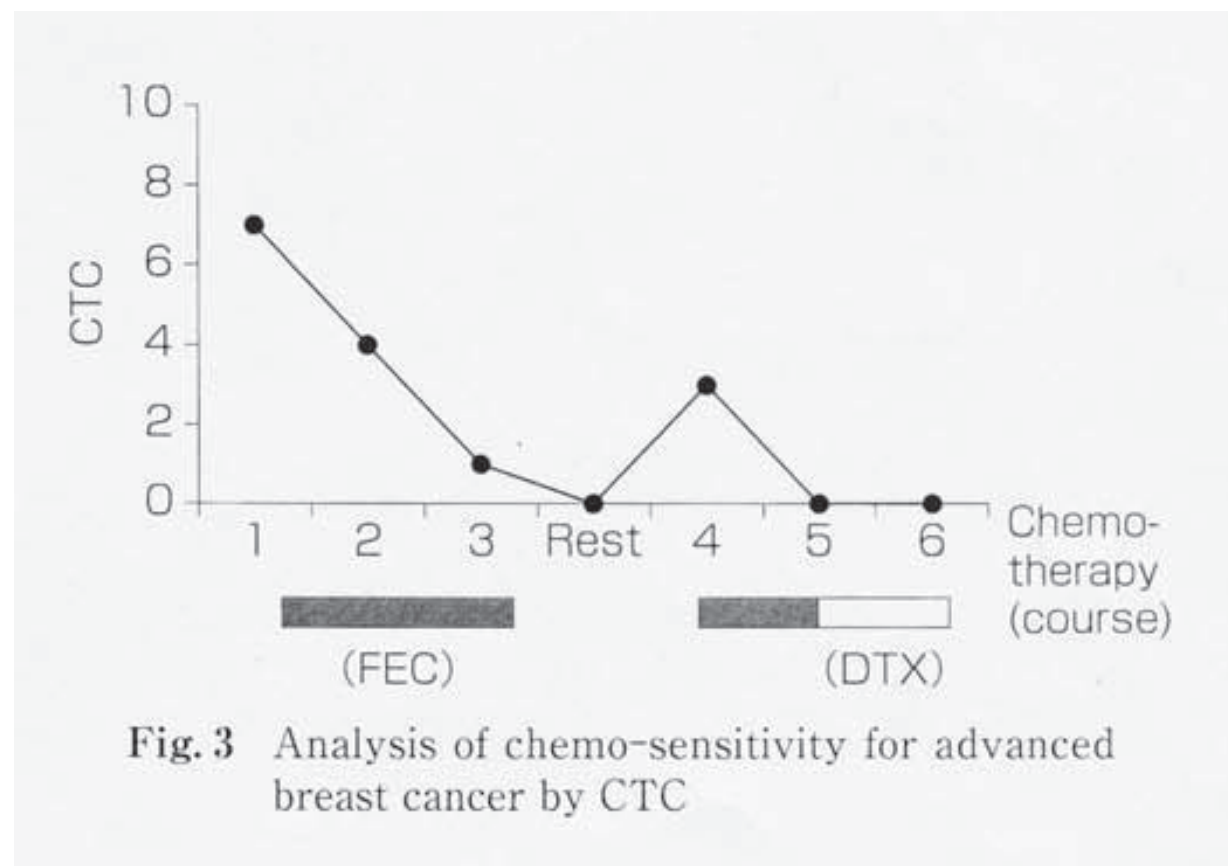
Case 2 (73 years, Male) Epithelioid MPM (stage IIIB/T4N0M0)

CTC-count was monitored during treatment. For un-resectable epithelioid MPM (Stage IIIB/T4N0M0), systemic chemotherapy using carboplatin plus pemetrexed was prescribed, which have achieved partial response (PR). The patient is alive without tumor progression at 22 months after diagnosis. The CTC-count was decreased along with effective chemotherapy.



乳癌において、同様なモニタリングを検討しました。

化学療法による治療のコースを重ねるごとに CTC 血中濃度を測定したところ、治療に伴う CTC 減少、休薬に伴う CTC 増加、抗癌剤を変更した治療に伴う CTC 減少、が認められました。治療終了後には CT により腫瘍縮小を確認し、切除手術が可能となりました。



*長田拓哉ほか 癌と化学療法、42 巻、1240 (2015)

●治療の安全性評価

CTC は癌の転移に直接関わっており、血中濃度上昇を伴う治療は好ましくない可能性があります。閉塞性大腸癌に対して広く行われている大腸ステント療法は、腫瘍組織に機械的圧迫を加え、CTC 血中濃度を上昇させる懸念があります。

そこでポリマー CTC チップを使用し、ステント治療前後の CTC 濃度を測定しました。ステント留置から 24 時間後に CTC 濃度が上昇する例が認められましたが、4 日後には全例でほぼ以前の状態に戻り、このような処置による CTC 濃度上昇は一過性であることが分かりました。

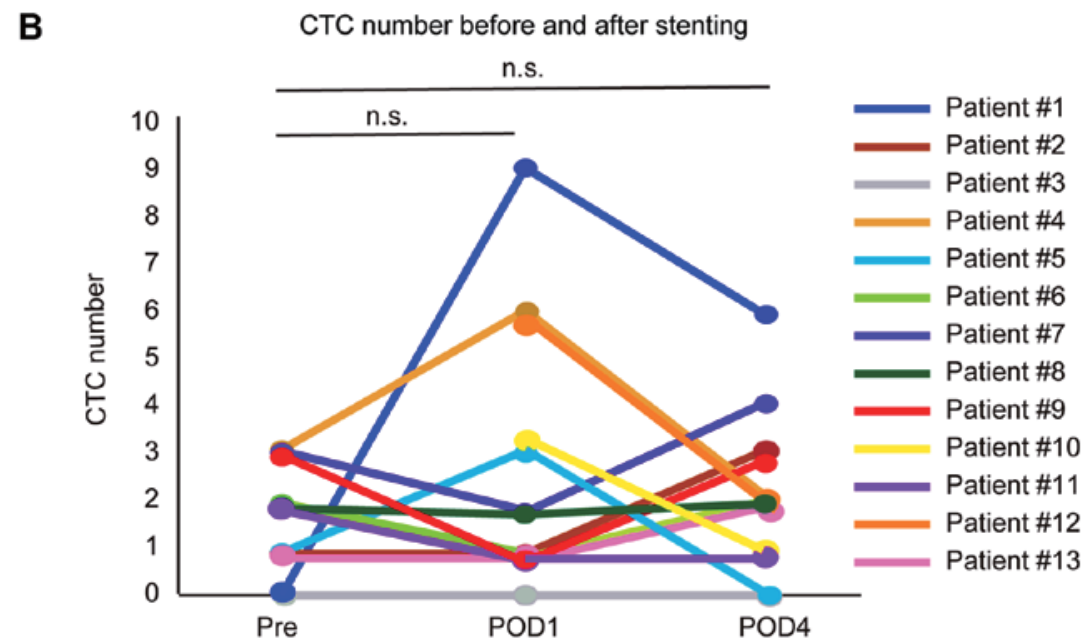


Figure 2. CTC number, CTCs and cfDNA concentrations following SEMS placement. (A) Fluorescence-stained CTCs captured by the CTC chip after SEMS placement. CTCs were stained with DAPI and CK19 (scale bar, 50 μ m). (B) Differences in the numbers of CTCs before and after SEMS placement. The number of CTCs increased at 24 h after SEMS placement and decreased 4 days after SEMS placement in three cases (patient 1, 4 and 5). The number of CTCs was slightly increased at 4 days after SEMS placement compared with those before SEMS placement in three cases (patient 2, 7 and 13). The number of CTCs before SEMS placement was not tested in two cases (patient 10 and 12). In the remaining five cases (patient 3, 6, 8, 9 and 11), CTC numbers remained unchanged or decreased. (C) cfDNA concentrations in plasma were determined in patients 1-6 before and after SEMS placement. Pre, before SEMS placement; POD1 and POD4, 24 h and 4 days after SEMS placement, respectively; n.s., no significance; CTC, circulating tumor cells; cfDNA, cell-free DNA; SEMS, self-expandable metallic stents.

* Ishibashi, R. et al. Oncol Lett. 18, 6397-6404 (2019)

●癌マーカーへの応用

大腸癌の腫瘍マーカー CEA, CA19-9 は、癌の存在を確定できる癌マーカーとはなり得ず、手術後の再発チェックや化学療法の効果判定に補助的に用いられるのみです。CTC はそれ自体が癌であり、癌マーカーとしての利用が考えられるため、その可能性を検討しました。

大腸癌の各病期においてポリマー CTC チップで CTC 検出を行い、同時に腫瘍マーカーを測定し、これらの陽性率を求めました。腫瘍マーカーでは早期には陰性が目立つのに対し、CTC はいずれの病期においても高い陽性率が得られました。ポリマー CTC チップが高感度で CTC を検出し、CTC の癌マーカーとしての可能性が示唆されました。

Stage	II				III		IV							% positive		
Patient No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	II,III	IV	II,III,IV
CTCs														100	86	92
CEA														50	86	69
CA19-9														17	14	15

Figure 7. CTC detection using the polymeric CTC-chip and based on the positivity of CEA and CA19-9 in blood samples of patients with colorectal cancer. Shaded boxes indicated a positive case with at least one or more CTCs detected or CEA and CA19-9 values higher than the respective cut-off values (5.0 ng/ml and 37.0 U/ml). CTC, circulating tumor cell; CEA, carcinoembryonic antigen; CA19-9, carbohydrate antigen 19-9 test.

* Kure, K. et al. Oncol Lett. 19, 2286-2294 (2020)

●細胞マーカー解析への応用

癌は不均一な細胞集団であり、CTC も同様です。CTC においては、転移を引き起こす悪性度の高い幹細胞的な癌細胞の存在が注目されています。大腸癌では CD133 が幹細胞マーカーとして知られており、CTC においてその検出を試みました。

ポリマー CTC チップにより、CD133 の発現が知られている培養癌細胞（CAPAN-1）および大腸癌の CTC を捕捉し、CD133 の蛍光標識抗体で免疫染色しました。培養細胞で CD133 の発現が検出できることが確認でき、さらに CTC で検出を行ったところ、一部の細胞が CD133 陽性であることが分かりました。

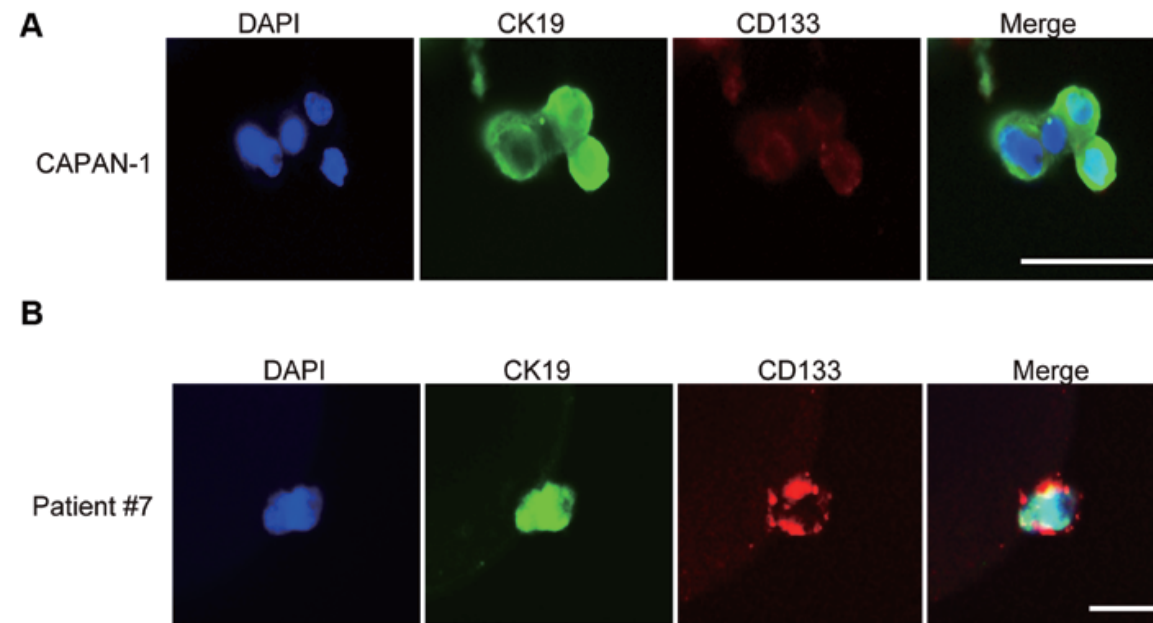
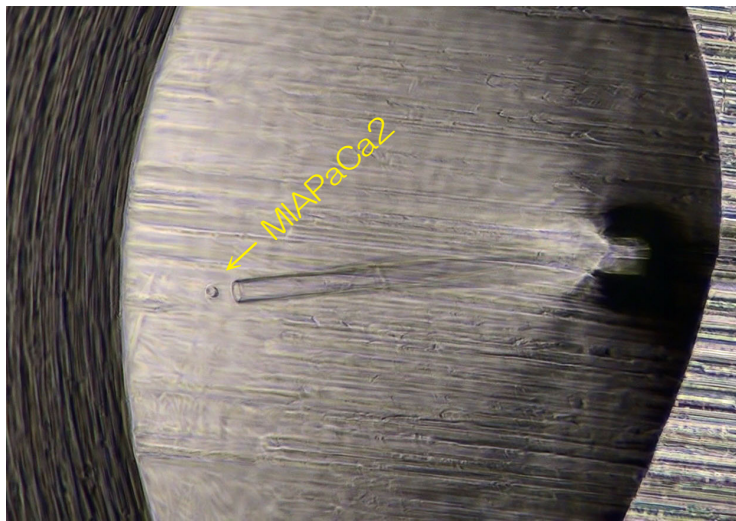


Figure 3. Images of circulating cancer stem-like cells stained with CD133. (A) CD133-positive pancreatic cancer Capan-1 cells were captured and stained with DAPI (blue), CK19 (green) and CD133 (red). A number of cells were CD133 positive (scale bar, 50 μ m). (B) Representative images of the captured circulating tumor cells stained with DAPI, CK19 and CD133 in a sample obtained from patient 7 (scale bar, 50 μ m). (C) The number of CD133-positive cells in the blood did not change significantly before and after SEMS placement. In seven cases (patients 7-13), CD133-positive cells were determined around stenting. The number of CD133-positive cells did not change significantly in response to stenting. SEMS, self-expandable stents; Pre, before SEMS placement; POD1 and POD4, 24 h and 4 days after SEMS placement, respectively; n.s., no significance.

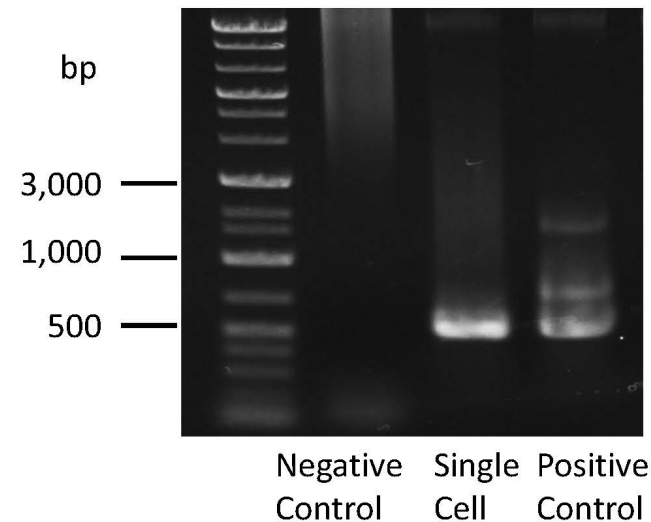
●遺伝子解析への応用

CTC は、少ない負担で患者さんの癌細胞をいつでも採取できるメリットから、癌治療における遺伝子解析での利用実現が強く望まれています。さらに全ての遺伝子がパッケージ化されていることから、” がんゲノム医療 ” などのパネル検査において CTC は効率的に使用できます。

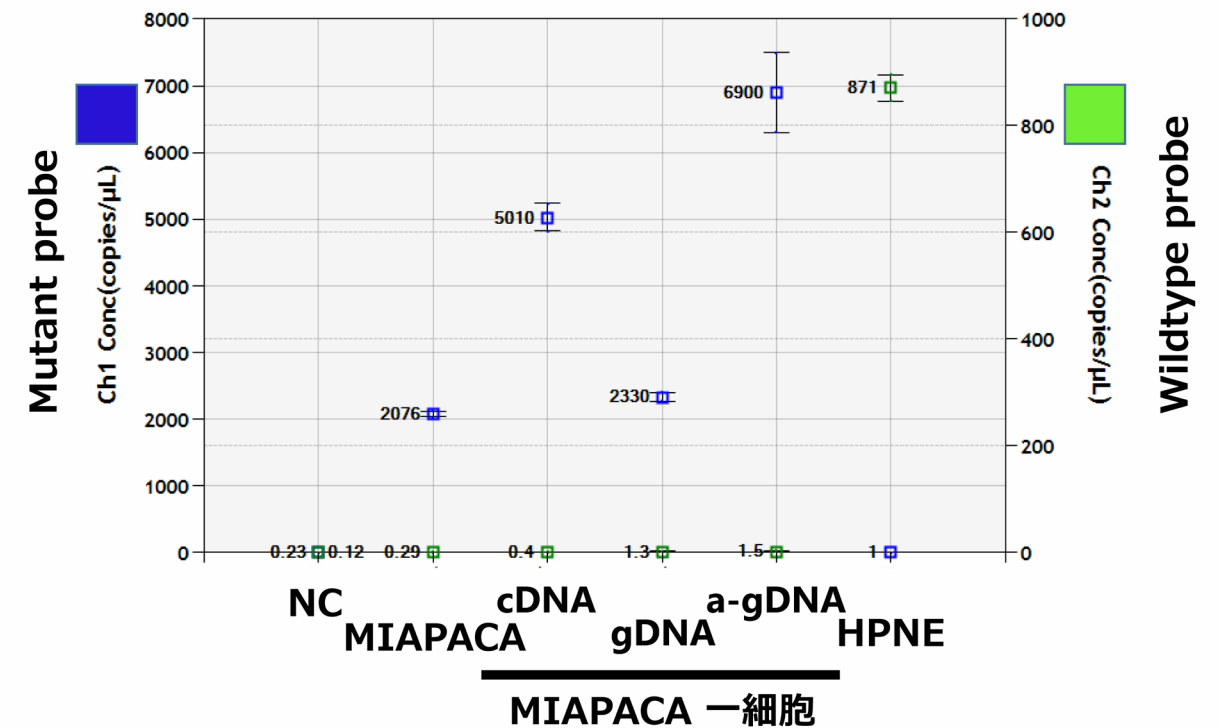
ポリマー CTC チップでは、チップに捕捉した癌細胞の回収、遺伝子解析の検討を進めています。これまでにマイクロピペットによりシングルセルで癌細胞（膵臓癌由来 MIA PaCa2、*Kras* 変異あり）を回収し、遺伝子増幅、変異解析が可能なことを確認しています。



マイクロピペットで回収した癌細胞（MIA PaCa2）



回収細胞の遺伝子（*Kras* 付近 500bp 程度）を増幅



ddPCR による *Kras* 変異の解析（青：変異型を検出、緑：野生型を検出）

HPNE： *Kras* 野生型の細胞（コントロール）

●多様な癌の CTC 検出

CTC を細胞マーカーにより捕捉する場合、一般に上皮細胞接着分子（EpCAM）をターゲットとします。これは癌が EpCAM を発現する上皮に由来するからですが、アスベスト暴露が引き起こすがんの悪性胸膜中皮腫は、上皮由来ではなく EpCAM では CTC 捕捉が困難なことが知られています。

ポリマー CTC チップでは捕捉ターゲットの選択が可能なので、悪性胸膜中皮腫に最適なターゲットを見出す検討から開始し、その CTC 捕捉を試みました。その結果、ターゲットとして見出した podoplanin で CTC 捕捉したところ、感度よく患者さんの CTC を検出できました。比較として CTC 捕捉の標準機である” CellSearch” でも試験したところ、EpCAM をターゲットとする本機では 1 例を除いて検出不可でした。

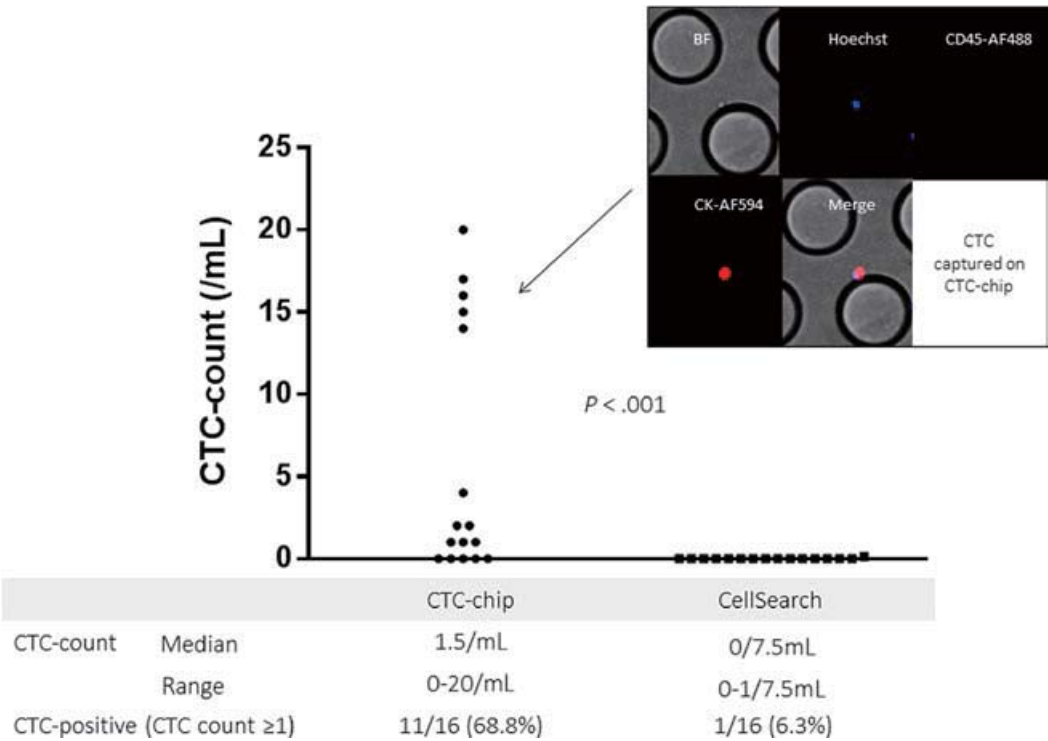


FIGURE 4 Circulating tumor cell (CTC) count in patients with malignant pleural mesothelioma (MPM) with the CTC-chip and CellSearch. Among cells captured on the CTC-chip, only cells with positive nuclear staining by Hoechst33342 (blue), positive cytoplasmic staining with cytokeratin (CK) by Alexa594 (red), and negative CD45 staining by Alexa488 (green) were judged as tumor cells. Blood samples (1 mL and 7.5 mL) from each patient with MPM were applied to the podoplanin-chip and CellSearch, respectively. The CTC count is represented as the number of CTCs in 1 mL blood for the podoplanin-chip and that in 7.5 mL blood for CellSearch. BF, bright field

* Yoneda, K. et al. Cancer Sci. 110, 726-733 (2019)

癌は多様・複雑であり、必ずしも EpCAM が高発現するとは限りません。乳癌由来の癌細胞；MDA-MB-231、膵臓癌由来の MIA PaCa2 は、EpCAM をターゲットとした捕捉は困難なことが知られています。

そこでポリマー CTC チップの捕捉ターゲットを選択できる機能を利用し、これら細胞の捕捉を試みました。この2つの細胞は上皮成長因子受容体（EGFR）の発現が高いことが知られているので、抗 EGFR 抗体を導入したチップ、および比較として抗 EpCAM 抗体を導入したチップを用意して検討しました。結果は何れの細胞についても、抗 EGFR 抗体（Cetuximab）のチップでは十分な捕捉性能が認められましたが、抗 EpCAM 抗体（sc-59906）では低い捕捉性能でした。

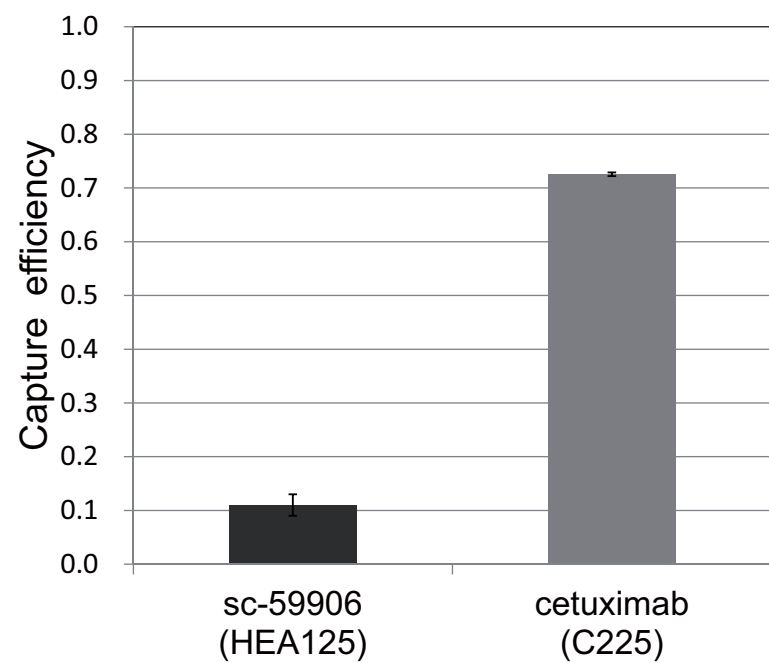
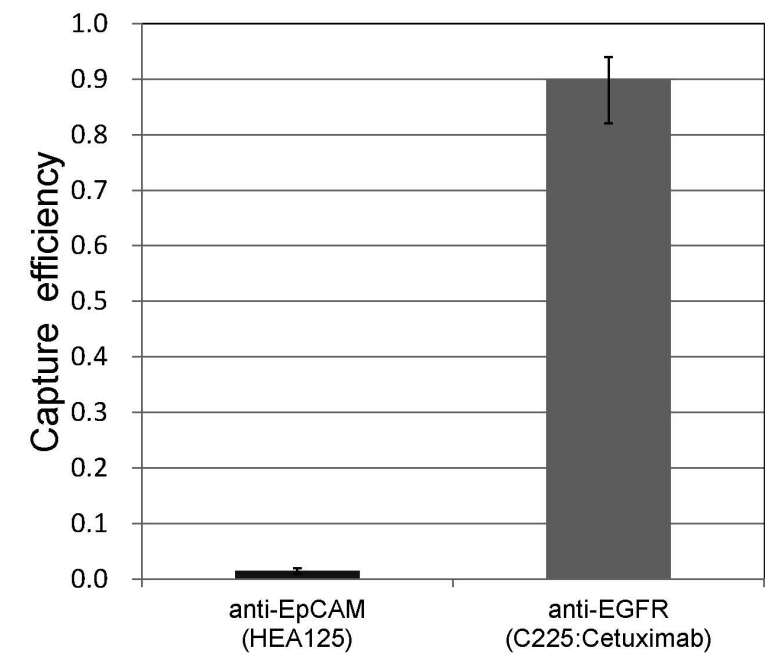


Figure 5. Capture efficiencies for the breast cancer cell line MDA-MB-231 obtained through the capture tests using cetuximab and sc-59906¹³.

* Ohnaga, T. et al. Scientific Reports 8, 12005 (2018)



EGFR、EpCAM をターゲットとした MIA PaCa2 の捕捉

* 大永ほか 2018 年度富山県産技研研究報告