

乳がん治療への血中循環腫瘍細胞捕捉システムの応用

材料技術課 大永 崇 富山大学医学薬学研究部第2外科 塚田一博、長田拓哉

1. はじめに

癌を診断したりその性質を見極めて治療方針を決定したりするためには、癌の組織や細胞を直接解析する必要があるが、通常、患者さんの体から癌の組織や細胞を入手することは容易ではない。そのための手法として生検や手術があるものの、このような体への負担が大きい方法は、実施自体が困難であったりし、ましてや繰り返して行うことは不可能に近い。従って治療経過をモニタリングする際には、通常、腫瘍マーカー測定や画像診断が用いられるが、このような方法から得られる情報は限定的であったり、反応が遅かったりするため、病状の変化を的確にとらえて次の治療に繋げるには十分でない。

近年、このような状況を改善できる期待から、血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell: CTC) の利用が注目されている。CTCは原発巣や転移巣から血管に侵入した癌細胞なので、それが単離できれば、低侵襲な採血で必要な時に繰り返して癌細胞が入手でき、それを解析することにより直接病巣の情報が得られる。これにより、治療開始時や治療中に癌の状態を見極めながら抗がん剤を適用・選択することなどが可能となり、癌の個別化治療に繋がれる。さらに CTC の血中濃度は、腫瘍サイズや予後を反映することが分かってきており、治療経過のモニタリングなどにも CTC は有効に使用できる。

このように CTC は、癌の治療や診断に画期的な進歩をもたらす可能性が示されているが、臨床においては現在もほとんど利用されておらず、それは CTC の血中濃度が極めて低いことに由来する。CTC の血中濃度は末梢血 1mL あたり数個程度であり、これをロスなく単離するためにはその方法自体を開発する必要があるため、現在、世界中で CTC 単離のデバイスや装置が開発されている。その中から、有望な技術としてマイクロ流体デバイスを応用した CTC チップが提案されており、これまでに富山県工技センターでは、独自技術により“ポリマーCTC チップ”を実用化し、十分な CTC 単離性能を有することを示した。そこで本研究では、富山大学附属病院と共同してこのポリマーCTC チップを乳がん治療で臨床テストした。臨床検体からの CTC 捕捉・同定、治療中の CTC 濃度変化などについて検討したので、報告する。

2. 臨床検体用ポリマーCTC チップシステム

はじめに、ポリマーCTC チップによる捕捉システムを臨床検体用に改良した。これまで本システムでは、捕捉試験中の状態を把握できるように顕微鏡やビデオカメラを装備していたが、臨床検体の試験を迅速かつ簡単にできるようにシステム構成を見直してコンパクト化した (Fig.1)。チップへのサンプル送液、その後の洗浄・細胞染色などの一連の操作をバルブ切換えで出来るようにし、さらに別途開発したゲルによる細胞封止技術を使って、最終的にはチップのみの状態で目的に最も適した顕微鏡等を使用して細胞を解析できるようにした。このシステムは既にキット化して販売しており、価格も安価なため複数台用意して迅速に臨床検体の試験ができる。

3. 臨床検体における CTC 捕捉・同定

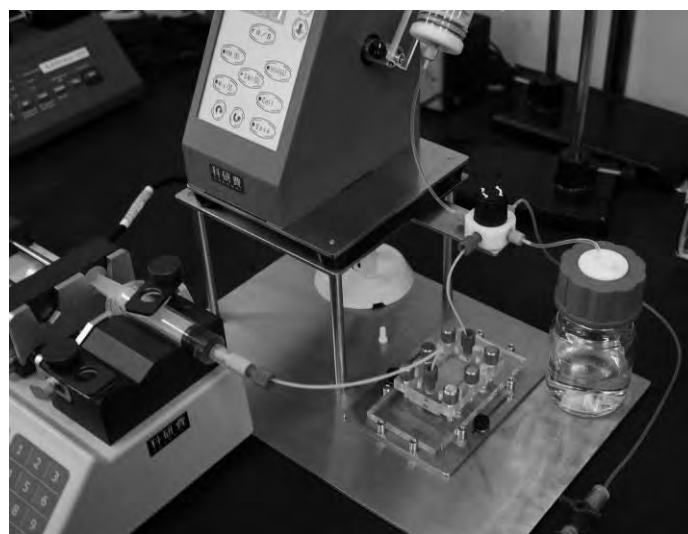


Fig.1 改良したポリマーCTC チップシステム

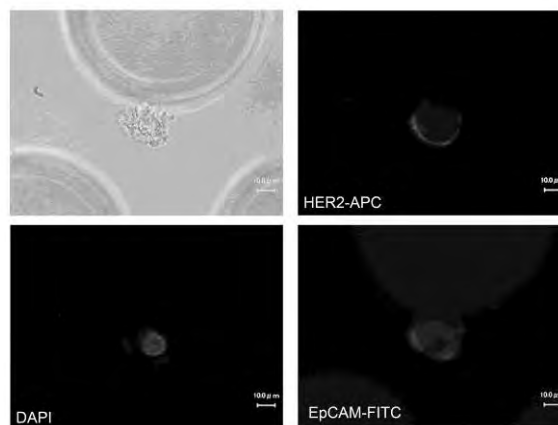


Fig.2 SKBR3 の蛍光染色テスト

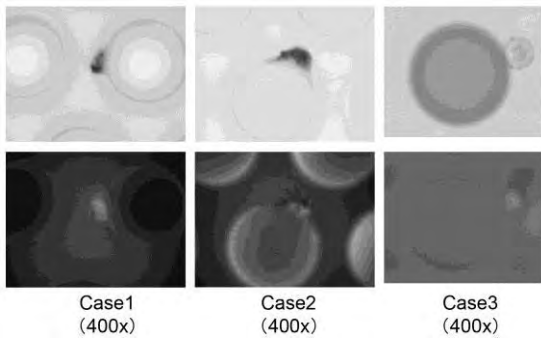


Fig.3 進行性乳癌で捕捉された CTC
(上列：核染色、下列：EpCAM 染色)

臨床検体の試験に先立ち、チップに捕捉された乳癌細胞株の蛍光染色試験を行った。SKBR3 をチップで捕捉し、核、EpCAM、HER2 について染色した結果を Fig.2 に示す。細胞の同定等に必要なマーカー等が個別に染色できる事を確認した。

臨床検体における CTC 同定について検討するため、進行性乳癌症例の末梢血液をサンプルとし CTC 捕捉試験を実施し、捕捉細胞を染色した。有核かつ EpCAM+ から CTC を同定したところ、6 検体のうち 5 例で CTC が確認された (3 例の染色像を Fig.3 に示す)。

4. 乳癌における CTC 解析

乳癌患者さん 72 例から各 3ml の血液を採取し、CTC 捕捉試験を実施した。また同じサンプルについてフローサイトメーターを用いて CTC 解析を行い、比較検討も行った。その結果、CTC チップにより 72 例中 13 例 (18.1%) において、解析開始より 1 時間で 1 個以上の CTC が捕捉された (病期 0 : 3 例、I : 4 例、II : 6 例)。フローサイトメトリとの比較では、フローサイトメーターで 10 個以上の陽性細胞が確認された症例 (16 例、21.9%) と有意な相関を認めた ($p=0.0053$)。さらに治療との関連では、以

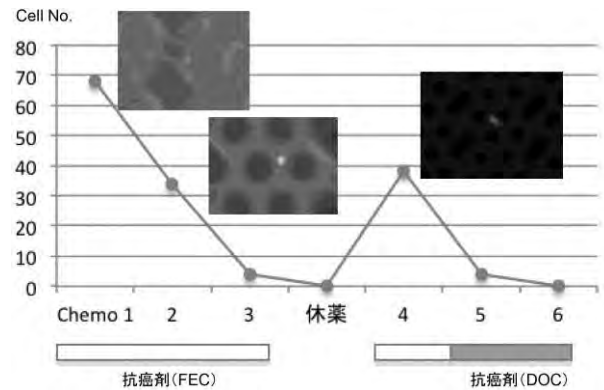


Fig.4 化学療法中の CTC 数変化

前に化学療法が施行されている再発乳癌症例では CTC が捕捉されない興味深い結果が得られた。

治療中の CTC 変化について、進行性乳癌で検討した。術前化学療法中の患者さんから定期的に採血し、血液中の CTC を解析した。さらに得られた結果を画像診断結果と比較した。その結果、術前化学療法 (FEC100) の施行により、主腫瘍の縮小に先んじて CTC の減少、消失が認められた。途中、副作用による化学療法の中断により CTC は増加したが、化学療法 (ドセタキセル) の開始により、再び CTC が減少した (Fig.4)。

5. おわりに

以上の検討から、ポリマー CTC チップシステムは乳癌治療において有効に使用できる可能性が認められた。これまで CTC の臨床応用は、極めて高価な装置や複雑な手法を用いて検討されてきたが、それ故に未だ実用化には程遠い状況にある。今後、本システムのような簡便で低コストの CTC 単離システムを発展、普及させ、乳癌を含む様々な癌における “人それぞれ、またその時々” の病状に最適な治療” の提供を目指すべく、各方面と協力して検討を進める。

キーワード：血中循環腫瘍細胞、乳癌、個別化治療、CTC チップ

Application of Polymer CTC-Chip System to Breast Cancer Treatment

Material Technology Section; Takashi OHNAGA University of Toyama; Kazuhiro TSUKADA and Takuya NAGATA

We have developed microfluidic devices called “polymer CTC-chip” that enable capture of circulating tumor cells (CTCs) from blood of cancer patients. A CTC isolation system using polymer CTC-chip was applied to breast cancer treatment in the present study. 72 blood samples from the patients were tested and CTCs were successfully captured and identified in the 13 samples, which was in good accordance with results of measurement by flow cytometer using the same blood samples. Change in the number of CTC was measured for a single patient during chemotherapy and was shown to correlate with volume change of the tumor. Therefore, our system seemed useful for clinical uses in breast cancer treatments.