

# マイクロ流体チップを用いた大腸癌での血中循環癌細胞の機能解析

材料技術課 大永 崇 順天堂大学大学院下部消化管外科学 呉 一眞、富木裕一

## 1. はじめに

大腸癌の診断において、現状で使用されている腫瘍マーカーは不十分なため、近年注目されているバイオマーカーである、血中循環腫瘍細胞 (CTC) について検討している。CTC は血中濃度が極めて低く現状では一般に単離が非常に難しいが、筆者らは既に自ら開発した“ポリマーCTC チップシステム”により大腸癌細胞を効率よく捕捉できることを示している。本検討では、本システムの捕捉性能を定量化し再現性をチェックすることを目的に、大腸癌細胞株を使用した捕捉試験を実施した。さらに得られた結果から、本システムを臨床検体からの CTC 捕捉に適用しうることが示されたので、大腸癌患者さんの末梢血からの CTC 捕捉試験を実施した。

## 2. 実験

- ・大腸癌細胞株：HCT-116(EpCAM(+))を使用
- ・捕捉抗体：抗 EpCAM 抗体
- ・臨床検体：表 I 参照
- ・蛍光染色：捕捉細胞を、DAPI、FITC 標識抗サイトケラチン抗体、PE 標識抗 CD45 抗体または PE 標識抗 EpCAM 抗体で免疫蛍光染色した

## 3. 結果と考察

HCT-116 を PBS または健常者血液にスパイクしたサンプルを使用し、ポリマーCTC チップシステムにより細胞捕捉試験を行った。得られた細胞捕捉効率 (捕捉した細胞数/チップに入った細胞数) を図 1 に示す。チップに捕捉抗体を導入した場合のみ高い捕捉効率が得られ (図 1 右 2 つのグラフ)、EpCAM をターゲットとした捕捉により大腸癌細胞が効率よく捕捉できることを確認した (捕捉効率は、PBS : 91%、全血 : 65%)。

以上の検討から、本システムを臨床検体での CTC 捕捉に適用可能と判断し、次に大腸癌患者さんの末梢血をサンプルとして CTC 捕捉試験を実施した。試験により捕捉した細胞を蛍光染色した例を図 2 示す。CTC の同定基準を、一般的な基準に従い、有核 (DAPI+)、サイトケラチン+、CD45- または EpCAM+ として判定したところ、CTC が認められた (図 2 矢印の細胞)。

捕捉試験を行った 6 検体について同様の同定を行ったところ、全ての検体から CTC が認められ、CTC 数は 1 mL あたり 3~84 個の範囲にあった (表 I 参照)。大腸癌においては既に、CTC の血中濃度が予後予測に使用できることが知られているので、今後さらに症例を増やすと共に結果を予後の観点から整理することを試みる。さらにこのようにして得られた CTC からは、発現タンパク質解析や遺伝子解析により、癌の性状に関する情報が得られ、それに基づく個別化治療への道が開ける。今後、このような観点からの CTC 解析も推進する。

謝辞：本研究は科研費 (基盤研究(C) : 25460700) の助成を受けたものである。

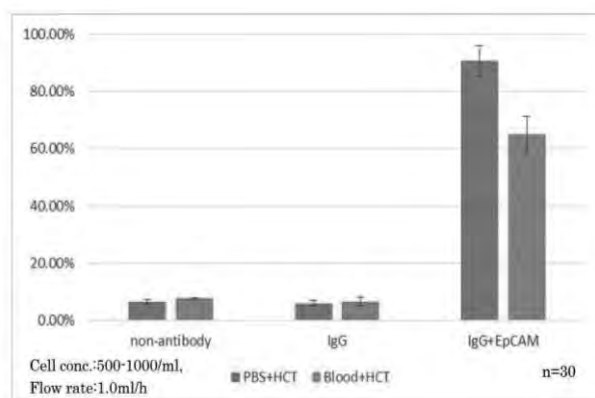


Fig.1 大腸癌細胞株の捕捉性能

Table I 検体の詳細と捕捉結果

Patient No	Age	Sex	Site	Histologic Features	TNM classification	Distant Metastases	Circulating Tumor cells per ml
1	81	M	RS	tub1	ⅢA	Liver	84
2	81	M	C	muc	ⅢB	Lung/Bone	3
3	84	F	A	tub1	ⅢA	Liver	8
4	71	M	A	tub2	ⅢB	None	3
5	72	M	A	tub2	ⅢA	Liver	7
6	74	M	RS	tub1	ⅢA	Lymph node	18

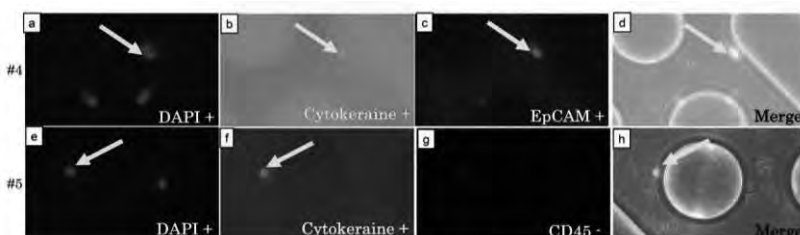


Fig.2 捕捉細胞の同定 (矢印が CTC)