

新規 Filter 型マイクロ流体デバイスを用いた肺がん切除材料から採取した肺動脈血中循環癌細胞 (CTC) の検出と Liquid biopsy への応用

愛知県がんセンター中央病院

呼吸器外科 医長 黒田浩章

愛知県がんセンター愛知病院

臨床研究検査科 部長 中西速夫

愛知県がんセンター中央病院

呼吸器外科 部長 坂尾幸則

1. 研究の背景・目的

上皮増殖因子レセプター (EGFR) のチロシンキナーゼ阻害薬である gefitinib (イレッサ) は一部の肺がんに対し本邦においても分子標的治療薬として認可され、生存延長などの効果が認められている。一方診断では、CEA など肺がん臨床で使用される血清腫瘍マーカーは低感度であることから、適切な治療法の選択と治療効果のモニタリングマーカーが求められてきた。近年、その1つとして血中循環腫瘍細胞 (CTCs, Circulating Tumor Cells) 及び血漿 DNA による診断が Liquid biopsy として注目されている。Liquid biopsy の意義に関しては肺がん患者における抗がん剤治療効果や遺伝子発現に関する報告がなされている(1, 2)。Tarumi らは、非小細胞肺がん(NSCLC)患者の導入補助化学療法に対して、肺静脈血における CTC の存在は病理学的 CR ではないことを反映していると報告している。一方、Guo らは血漿中の cell-free DNA に関して EGFR 変異陽性の早期肺がん患者では検出感度が低いが、Stage IIIA 以上では変異検出に効果的であったと報告している(2)。

我々は血液中循環がん細胞(CTC; Circulating Tumor Cell)を細胞のサイズによって簡便、高感度に検出できる 3D filter 型 CTC 分離デバイスを独自に開発してきた。CTC 数は転移とよく相関することが明らかにされており、術後の定期的な血液検査による CTC 数測定により転移再発の予測、早期発見が期待できると予測される。また化学療法の治療効果は現在、半年毎の CT 等の画像診断や既存の腫瘍マーカーにより行われているが、血液による低侵襲な CTC 数測定により早期の薬剤感受性評価が可能となり、患者にとって不必要な有害事象の回避や医療費削減が期待できると考えている。さらに、血液からの CTC によりこれまでの高侵襲性の転移巣の生検組織からの遺伝子検査に代る低侵襲な

Liquid biopsy としても活用も期待できる。

今回の研究では、非小細胞性肺がん(NSCLC)患者の手術後の標本から肺動脈血(静脈血)と末梢動脈血中の CTC を回収し、細胞診、免疫染色、PCR 法による遺伝子解析が可能かどうかを基礎的に検証することが目的である。本研究の結果をもとに、今後さらに CTC 由来のデータと同一患者のホルマリン固定ブロックから得られた免疫染色、遺伝子解析の結果とを照らし合わせ、CTC によるコンパニオン診断の可能性について検証してゆく予定である。

2. 研究の対象ならびに方法

- a) 症例収集：診断あるいは治療を目的として愛知県がんセンター中央病院にて、肺葉切除を受ける予定の肺がん患者の中から、資料提供者本人（またはその代諾者）から資料提供に関するインフォームド・コンセントが文書で得られた症例を対象とした。肺がん手術中に肺葉切除終了時に肺動脈から採取した血液と術中の末梢動脈血を収集した。また同時にホルマリン固定パラフィンブロックの収集も行った。収集症例の臨床病期分類、原発腫瘍組織像、遺伝子情報等、臨床病理学的所見をあわせてファイルしたデータベースを構築した。これらのデータベースは、連結可能匿名化し、情報管理者を介した臨床情報および病理情報とのリンクを可能とした。
- b) 解析：独自開発のCTC分離・回収デバイスにより血液から回収したCTCを用いて、細胞診、免疫染色を行い、一部PCR法による遺伝子解析も試行した。

3. 研究結果

愛知県がんセンター中央病院呼吸器外科において肺葉切除を施行された肺癌患者20例(Stage 1;11例, II; 4例; III; 5例、腺癌12例、扁平上皮癌7例、小細胞癌1例)の肺動脈血、肺静脈血(1-5ml)および末梢血(5-10ml)を採取した。血液は上記、3D filter 型CTC分離デバイスにて分離、数枚(2枚以上)のスライドグラスに転写後、パパニコロウ染色による細胞診及び免疫染色(Cytokeratin, CD34, TTF-1, P-40 など)を行い、CTC数を測定、ならびに分化マーカーの発現を検討した。遺伝子検索に関しては健常人血液に肺がん培養細胞(EGFR変異陽性)を加えてCTC分離デバイスにて分離した標本をポジコンとして、一部検体についてEGFR遺伝子検索を行った。

結語：

従来行われてきた蛍光染色によるCTC測定では暗視野で顕鏡し、マーカー発現の有無の

みを指標に CTC の同定を行なってきた。しかも永久標本ではないためその評価は検体採取時の 1 回限りの判定になり、細胞診の依って立つ基盤とする形態学的評価がほとんどなされないという根本的な欠陥を有していた。そこで今回、フィルター上にトラップした CTC をスライドグラスに転写して細胞診用の永久標本を作成する技術を確立した。これによりパパニコロウ染色や免疫染色を施工できるようになり、CTC 判定をマーカー発現の有無のみに依存することがなくなり、明視野での形態学的評価を加味した正確かつ客観的な診断が可能となった。

パパニコロウ染色と免疫染色により肺がん患者検体を用いた詳細な検討を行なった結果、白血球以外に観察される血液中の異型細胞のうち一部が血管内皮細胞であることが判明した。一部は血管結紮時の手術操作によるコンタミの可能性が示唆される。これらの知見を加えて本デバイスを用いた CTC の判定基準の作成を行なった。これをもとに本デバイスを用いて CTC 数を比較したところ、末梢血に比べ肺静脈血および肺動脈血で高値を示し、後者では多い場合には 1ml あたり 1000 個を超える症例も見られた。また本デバイスを用いることにより血液中 CTC を 2 時間程度で簡便にスライドグラス標本にすることが可能で、その後は病理検査室のルーチンの染色工程が利用できるため、従来の CTC 検出法に比べ低コストな検出も可能となった。

4. 考察

今回の結果を受けて、これまで同定されにくいとされていた早期肺癌 StageI の根治切除肺癌においても、末梢血では CTC はほとんど検出されなかったが、肺動脈中では高い CTC 陽性率が得られた。これらの結果から、われわれが独自に開発してきた 3D filter 型 CTC 分離デバイスは、実臨床の肺がん患者に対しても簡便、高感度に検出できる性能を有することが確認された。またドレナージ血で高い検出率が見られるのに対し、末梢血での CTC 検出が低い理由の一つとして肝、肺等の末梢血管において CTC がトラップ (filtration) される可能性が考えられた。

肺がん患者の末梢血中に CTC が検出される症例は、予後不良因子とされ、また、化学療法・分子標的薬治療によって血液中の CTC が消失しない症例も同様に予後不良であることが報告されている (1, 2)。今回我々は肺動脈血の CTC 数が、病理学的な stage の進行に伴って増加する傾向を見出している。今後さらに症例を重ね、末梢血 CTC 及び肺動、静脈血 CTC 数が肺がんにおける新たな予後予測因子となりうることを証明したい。

今後の展望

肺がん患者の新鮮切除標本から採取した肺動脈血から比較的多数の CTC を検出できることを明らかにすることができた。今回は、数例の試行にとどまったが、今後このドレナージ血 CTC を用いた遺伝子解析をルチーンに可能となるように CTC 回収法、DNA 抽出法をさらに改良し、遺伝子解析法を確立、Liquid biopsy としての有用性を検証してゆく予定である。また末梢血からの CTC 回収技術のさらなる改良も必要であるものと考えられた。

今後、CTC による肺がん患者のコンパニオン診断のメドがたてば、近い将来、他施設とも協力して多施設共同臨床試験や先進医療に発展させていきたい。

5. 文献

- 1) Tarumi S, et al. SInnovative method using circulating tumor cells for prediction of the effects of induction therapy on locally advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Cardiothoracic Surgery* 2013, 8:175
- 2) Isoke K, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 2012; 32(8): 3339-44.