

細胞分離・分取システムを用いた患者 CTC の検出

○益田 泰輔 (東大) TURAN, Bilal (東大) 菅井 和人 (筑波大)

松阪 諭 (筑波大) 新井 史人 (東大)

Circulating tumor cells (CTCs), defined as detached cells from the primary tumor and/or metastases that enter the bloodstream, are present in liquid biopsy samples. However, a special method that can detect and collect CTCs is required as there are only a few CTCs among millions of other blood cells. We developed a cell isolation and collection system for recovery single circulating tumor cells (CTCs). In this study, we evaluated the ability of this system to detect CTCs in patients with lung cancer and confirmed their genuineness using the epidermal growth factor receptor (EGFR). Firstly, we used this system to capture cells by size. And the presumptive CTCs were counted and tested with digital droplet PCR for EGFR and compared to the tissue EGFR status to determine whether they were genuine tumor cells. This pilot study indicated the ability of this system to detect CTCs in patients with lung cancer.

1. 緒言

大量の微粒子群のなかから0.001%以下の極低濃度（超レア）な微粒子を単一粒子レベルで選別・採取することは汎用的な技術では困難を極める．がん患者の血液に含まれる遊離癌細胞（CTCs: Circulating Tumor Cells）は，がんの進行度や転移のモニタリングとして期待されているものの，その稀少性から未だ正確にCTCを採取できていない[1]．これまでに我々は，患者血液から1細胞レベルでCTCを採取する細胞分離・分取システムを開発してきた[2,3]．本研究は，肺がん患者の血中よりCTCsを採取し，肺細胞癌のEGFR遺伝子変異の有無を確認することを目的とする．同一患者の組織検査の結果と比較したところ，CTCsの存在に関する新たな知見が得られたので報告する．

2. 実験方法

2.1 細胞分離・細胞分取システム

細胞分離・分取システムは，直径18 μm のマイクロピラーアレイが施されたオープン型マイクロ流体チップに血液検体を全血のまま注入し，特定の細胞に対してサイズ・変形能の違いから篩分け，さらにそこから個別に細胞を分取する[2,4]．当該システムには，最大4波長の蛍光顕微ユニット，捕捉された細胞を1細胞レベルで吸引・搬送・吐出する1細胞回収ユニットが搭載されており，特定の細胞を単離することが可能である（図1）．

2.2 患者検体より CTCs 検出

肺がん患者の血液5 mLより，細胞分離・分取システムを用いてCTCsを個別分取した．CTCsはHoechst33342陽性，EpCAM陽性もしくはPDL-1陽性，かつCD45陰性として判定した．マイクロピペットで個別分取されたCTCsは全ゲノム増幅後，droplet digital PCR (ddPCR)法によりEGFRの変異（exon19）を調べた．また，同一患者において外科手術より採取した腫瘍組織を病理検査し，同じくEGFR変異を調べた．

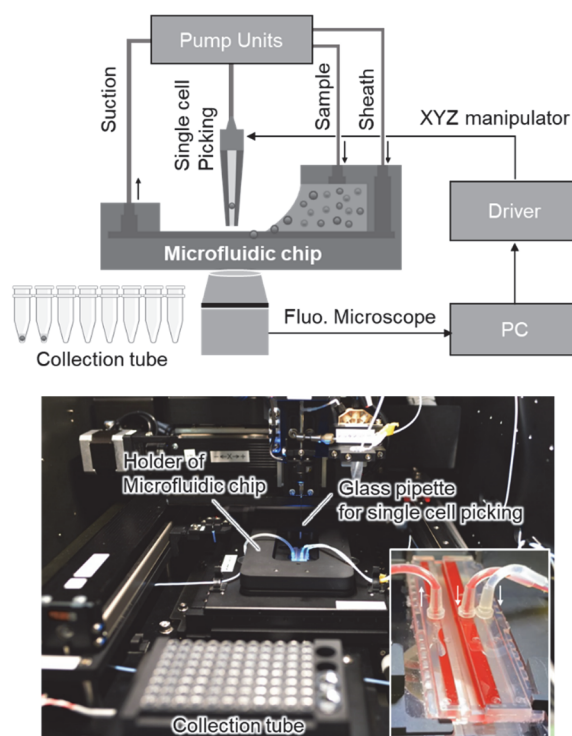


Fig. 1 A cell isolation and collection system; (Upper) Schematic diagram of cell isolation and collection system, (Lower) This system has an open-channel microfluidic chip-based device that provides direct access to the cells with a micromanipulator and a micropipette for single cell picking.

3. 実験結果及び考察

複数の肺がん患者の血中から検出したCTCsの個数およびEGFRの変異の有無を表1にまとめる．その際に細胞分離・分取システムで検出したCTCs像の例を図2に示す．はじめに，肺がん患者の血中に含まれるCTCsは，細胞分離・分取システムを用いて検出できることが明らかになった．さらに採取したCTCsか

Table 1 CTCs status and EGFR mutations in lung cancer patients with detected CTCs. EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; PD-L1, programmed cell death ligand 1; WT, wild-type.

Patient	Detected CTC by cell isolation and collection system		Biopsy Tissue
	EpCAM(+) or PD-L1(+) CTC number	EGFR mutation	EGFR mutation
L5	9	WT	WT
L7	1	WT	WT
L10	23	WT	WT
L11	2	WT	WT
L12	4	WT	Exon 19 deletion
L22	3	Exon 19 deletion	Exon 19 deletion
L23	2	Exon 19 deletion	Exon 19 deletion
L24	1	Exon 19 deletion	Exon 19 deletion

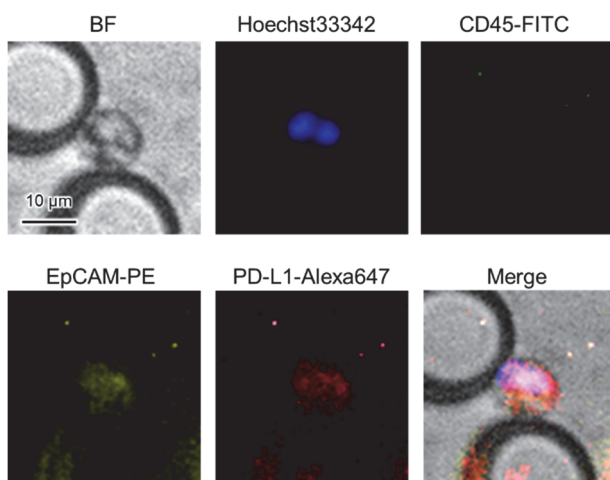


Fig. 2 Photographs of a trapped single lung CTCs on the open-channel microfluidic chip. The cells were stained on-chip, and Hoechst33342-positive, CD45-negative, and EpCAM and/or PD-L1-positive cells, assumed to be CTCs, were collected by a micropipette.

らEGFR変異の有無を確認することができた。8症例中7症例において、術中に得られた病理検査の結果とCTCsのEGFR変異解析結果が一致することが示された。

肺がん症例においてEGFR変異の有無を確認することは、薬剤を選択する上で重要である。しかし、体内から腫瘍組織を採取することは侵襲性が高く、高頻度に検査することは不可能である。本研究結果は、血中のCTCs検査が組織の病理検査とほぼ同等の結果を示すことが示唆され、細胞分離・分取システムを用いたCTCs検査による臨床利用の可能性が示された。

4. 結言

独自の細胞分離・分取システムを用いて肺がん患者のCTCsの検出を行った。その結果、肺がん患者の病理組織と得られたCTCsが同じ性質を持つことが実証された。このことは、低侵襲な採血により肺がん患者のEGFR変異を検出できることを示唆する。今後、これらの知見を検証するために大規模な臨床試験を実施する予定である。

参 考 文 献

- [1] M. Peralta, N. Osamani, et al., "Circulating tumor cells: Towards mechanical phenotyping of metastasis", *iScience*, 25: 103969, 2022.
- [2] T. Masuda, F. Arai, et al., "Rare cell isolation and recovery on open channel microfluidic chip", *PLOS ONE*, 12: e0174937, 2018.
- [3] B. Turan, T. Masuda, et al., "Detection and control of air liquid interface with an open-channel microfluidic chip for circulating tumor cells isolation from human whole blood", *IEEE RA-L*, Vol. 5, No. 4, pp. 5866-5872, 2020.
- [4] T. Mori, T. Masuda, et al., "Simultaneous detection and HER2 profiling of circulating breast cancer cells in clinical patients using a rare cell sorter", *Anticancer Res*, Vol. 42, pp. 4879-4886, 2022.