

血中循環腫瘍細胞（CTC）の バイオマーカーとしての活用の新展開 ～検体の長期保存によるCTC中DNA・RNA解析の利用拡大に向けて～

大阪ラボラトリー 村田 崇人

1 血中循環腫瘍細胞（CTC）の臨床研究等への活用

がん医療において、血液等の体液からがんの情報を得る液体生検（リキッドバイオプシー）が注目されています。液体生検は、患者の体への負担が少なく、繰り返し採取が可能のため、経時的にがんの性質をモニタリングすることができます。がんは進行や治療の経過によって性質が変化することが知られており、それをモニタリングし把握することにより、適切な治療を選択することができます。液体生検の測定対象の一つである CTC（Circulating Tumor Cells）はがん組織から血液中へ放出され、血流を循環するがん細胞です。CTC 中に含まれる様々ながんの情報（例えばタンパク質や遺伝子変異）をバイオマーカーとして利用することで、患者の層別化や薬効の評価、投与レジメン^{*1}の決定が可能となります¹⁾。

しかしながら、CTC 解析用に採血した血液検体の保存期間は一般に 2～3 日と言われており、医療現場において採血後速やかに処理を行う必要があります。これが、CTC のバイオマーカーとしての利用を阻む原因のひとつとなっています。そのため、当社は血液中の CTC を保持する目的で、CTC 検体の長期保存方法の検討を行いました。

また、CTC の臨床研究等への活用を促進する目的で、CTC 中の DNA および RNA の解析にも取り組んでおりますので、以下に紹介させていただきます。

2 CTC 検体の長期保存法開発

当社は臨床研究や臨床試験等における CTC のバイオマーカーとしての活用を広げる目的で、検体の保存法に関する種々の検討を行い、採血後の CTC 検体を長期に保存できる方法を見出しました。図 1 に、既知数のがん細胞を添加した血液検体を疑似 CTC 検体として 1 か月保存した後に、がん細胞をセルソーターを用いて回収した結果を示します。長期保存検体からのがん細胞の回収率は 67.4 % で、保存前（採決当日）のそれと大きな差はありませんでした。このことから、保存後の検体においてもがん細胞を回収できることがわかります。現在、さらに長期での保存が可能か検討していますが、これらにより CTC 検体の安定性の問題が解決され、臨床研究等に必要な種々解析に寄与できると考えます。

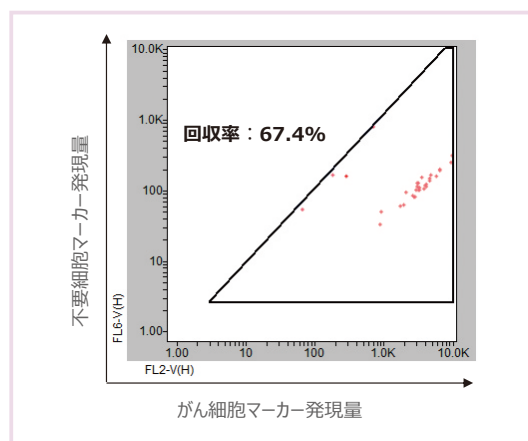


図1 長期保存検体におけるCTC検出プロット例
血液 4 mL に肺がん由来細胞（PC9）を添加し、1 ヶ月保存した検体における検出プロット例を示します。各点が細胞 1 個を示し、黒線に囲まれた範囲内（不要細胞マーカーの発現量が低く、がん細胞マーカーの発現量が高い領域）の点が CTC として検出された細胞を示します。
回収率 = 検出されたがん細胞数 / 添加細胞数 × 100

3 高純度で回収した微量 CTC 中 DNA および RNA の解析事例

CTC はがん細胞そのものであるため、CTC の遺伝子解析は、他のがん細胞由来物（例えば cfDNA）の解析と比較して情報量が多いなど、数多くの利点があります。当社は、2018 年よりオンチップバイオテクノロジー社と共同で、セルソーター（On-Chip® Sort）を用いた CTC 回収法を開発するとともに、次世代シーケンサー（NGS）で DNA 変異解析を行ってきました（図 2）。血液中の CTC は赤血球や白血球などの血液細胞全体の 5000 万分の 1 未満と微量しか存在しませんが、本手法を用いることにより、高純度に CTC を回収し、DNA 変異解析を行うことができます。さらに当社では、CTC の変異解析を全ゲノム増幅なしで行う方法を開発しました。増幅工程を省くことにより増幅時の PCR エラーを抑え、CTC 中の変異解析を正確に行うことができます。

これまでのがん解析はゲノム解析が主流でしたが、最近ではトランスクリプトーム^{*2}情報を統合した解析も盛んに行われています。当社では、CTC 中 RNA の解析に対応した CTC 回収法を新たに開発しました。前項と同様、血液に既知数のがん細胞を疑似 CTC として添加した試料からがん細胞を回収し、得られた

*1 投与レジメン：抗がん剤や支持療法薬剤の投与量、期間、方法などを示した治療計画。

*2 トランスクリプトーム：細胞や組織中に存在する全ての転写物の総体。細胞や組織の機能についての情報が得られる。

*3 EGFR：上皮成長因子（EGF）の受容体。細胞の成長や増殖に関わるタンパク質で、多くのがんにおいて異常が見つかっている。

抗がん剤の分子標的として広く知られている。

*4 Ct値：PCRにおいてシグナルが閾値と交差する点におけるサイクル数。Ct値が低いほどサンプル中の核酸（mRNA）の量が多いことを示す。

*5 免疫チェックポイント阻害剤：がん細胞に対する免疫応答を活性化し、がんを攻撃する薬剤。

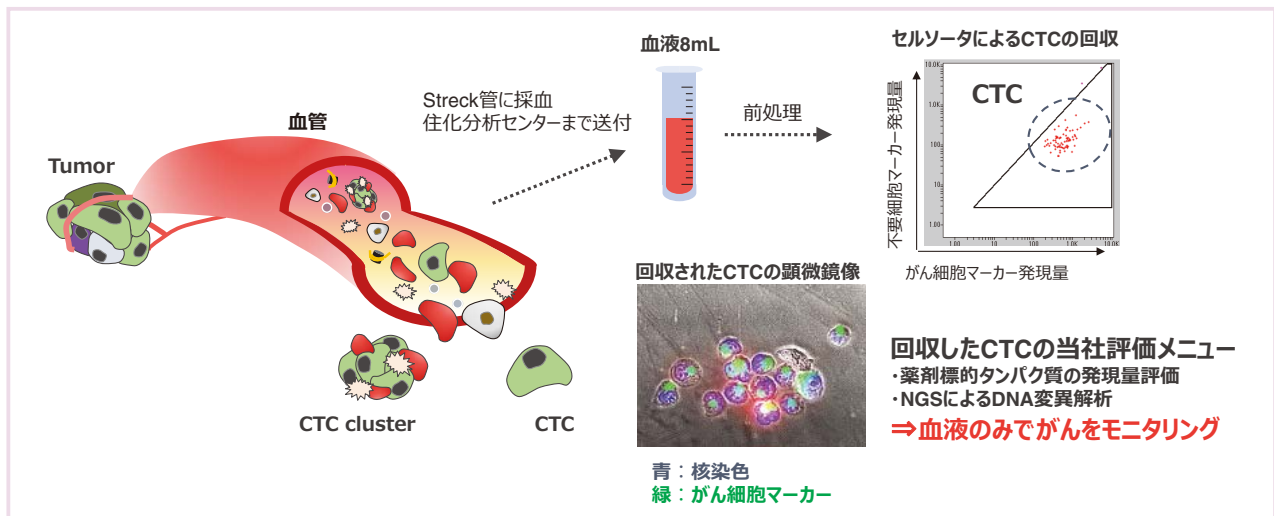


図2 当社CTC回収法の概要

血液 8 mL を前処理後、セルソーターで高純度で回収します。写真は回収後の CTC を蛍光顕微鏡で観察したものです。青色が核、緑色のがん細胞マーカーの蛍光を示し、両方とも色がついているものが CTC です。

試料を q-PCR で解析した結果、抗がん剤の分子標的である EGFR^{*3} の mRNA が検出できました (図 3.a)。また、当社法とすでに市販されている CTC 分離手法 (方法 A, B) で得られた試料中の白血球マーカーの mRNA を比較したところ、当社法は他法と比較して高い Ct 値^{*4} を示しました (図 3.b)。この結果から、当社法では白血球等の夾雑細胞の影響を低く抑えることができ、正確な発現量解析が可能となりました。

4 総括と展望

これまで臨床研究等における液体生検は、DNA 変異解析が主な解析法であり、ctDNA が主な解析対象でした。近年では、ゲノム以外の情報を臨床へと活用する試みも広がっており、CTC 中の RNA を解析し、免疫チェックポイント阻害剤^{*5} の薬効評価マーカーとして利用している例も報告されています^{2) 3)}。CTC 検体の長期保存法の開発と、セルソーターを用いた CTC 回収

および CTC 中 DNA・RNA 解析により、バイオマーカーとしての CTC の活用が広がることで、がんの性質に応じた適切な治療がますます発展すると期待されます。

文 献

- 1) Antoine Vasseur, Nicolas Kiavue, François-Clément Bidard, Jean-Yves Pierga, Luc Cabel: *Molecular Oncology*, **15** (6), 1647 (2021) .
- 2) Xin Hong, Ryan J Sullivan, Mark Kalinich, Tanya Todorova Kwan, Anita Giobbie-Hurder, Shiwei Pan, Joseph A LiCausi, John D Milner, Linda T Nieman, Ben S Wittner, Uyen Ho, Tianqi Chen, Ravi Kapur, Donald P Lawrence, Keith T Flaherty, Lecia V Sequist, Sridhar Ramaswamy, David T Miyamoto, Michael Lawrence, Mehmet Toner, Kurt J Isselbacher, Shyamala Maheswaran, Daniel A Haber: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **115** (10), 2467 (2018) .
- 3) Yosuke Murata, Takuto Nosaka, Yu Akazawa, Tomoko Tanaka, Kazuto Takahashi, Tatsushi Naito, Hidetaka Matsuda, Masahiro Ohtani, Yasunari Nakamoto: *Cancers*, **16** (13), 2410 (2024) .

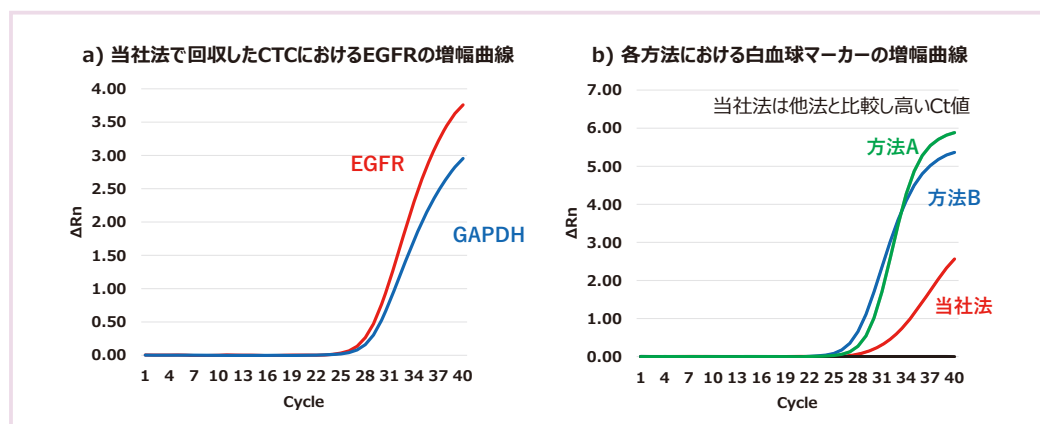


図3 分取したCTCのq-PCRによるmRNA解析結果

- a) 血液 8 mL に 20 個の肺がん由来細胞 (PC9) をスパイク後、細胞表面抗原等を蛍光染色し、当社法でがん細胞を回収しました。PCR 試料の調製は、Single Cell-to-CTTM qRT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いました。EGFR (肺がん細胞の分子標的) および GAPDH (内在性コントロール) の mRNA のプライマー / フロープとして TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific) を使用し、q-PCR を実施、測定は QuantStudio[®] 5 (Thermo Fisher Scientific) を使用しました。
- b) 各方法で推奨される血液量 (5 ~ 8 mL) に 20 個のがん細胞 (PC9) をスパイクし、当社法並びに市販の CTC 分離キット (方法 A : MACS[®], B : Adna test) でがん細胞を回収しました。CD45 (白血球のマーカー) の mRNA のプライマー / フロープとして TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific) を使用し、a) と同様の方法で q-PCR を実施しました。当社法は他法と比較して高い Ct 値を示し、夾雑細胞が少なく高純度で CTC を回収できました。



村田 崇人
(むらた あかと)
大阪ラボラトリー