

誘電泳動を利用した血中希少がん細胞の 検出・解析システムの開発

最 上 聡 文*¹
森 本 篤 史*¹
飯 嶋 和 樹*¹
秋 山 泰 之*¹
片 山 晃 治*²
二 見 達*¹

Development of a System Utilizing Dielectrophoresis for Detection and Analysis of Rare Tumor Cells in Peripheral Blood

Toshifumi MOGAMI
Atsushi MORIMOTO
Kazuki IJIMA
Yasuyuki AKIYAMA
Koji KATAYAMA
Toru FUTAMI

Circulating tumor cells (CTCs) are tumor cells shedding from the primary tumor and are circulating in the blood stream of patients with metastatic cancer. The number of CTCs in peripheral blood predicts survival of patients. In addition, CTCs are expected to be a source for the molecular characterization of primary tumors. To date, a variety of systems for detection and analysis of CTCs have been developed, after appearance of the CellSearch[®] System firstly approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) as a CTCs enumeration system. In this study, we aimed to develop a capture system for molecular characterization of single CTCs based on a high-density dielectrophoretic microwell array technology. In order to verify our method, we performed preclinical tests utilizing model specimen where cancer cell lines were spiked in whole blood obtained from healthy donors. The development of the system was performed in the following four processes; (1) process to enrich the cancer cells by the negative enrichment manner from a model specimen; (2) process to entrap the enriched cells in microwell array; (3) process of immunofluorescent staining of the entrapped cells followed by fluorescent microscopic detection, and (4) process to isolate the detected cancer cells in order to perform genetic analysis. As a result, our system showed a high detection rate and an excellent linearity for the number of cancer cells spiked into the specimen, demonstrating a prominent performance compared with the CellSearch[®] system. Furthermore, we performed a genetic analyses of single isolated lung cancer cells from microwell array, and successfully detected alterations in the EGFR gene. As mentioned above, we have established a reliable CTCs detection and analysis system utilizing dielectrophoretic microwell array technology. Results of a proof-of-principle preclinical study indicated that this system has potential for the molecular characterization of captured CTCs from patients.

* 1 ライフサイエンス研究所/細胞診断グループ

* 2 ライフサイエンス研究所/装置開発グループ

1. 緒言

近年、がん診断の精度を高めるため、また治療方針決定に寄与する情報を得るために、分子的な細胞特性評価手法が用いられている。例えば、ある種のがんでしばしば見られるゲノム DNA の異常は、そのがんを治療するための分子標的薬の効果を予測する指標となっている¹。これらのがんの特性評価はこれまで主に、がん組織の一部を採取（生検、バイオプシー）したものを試料として行われてきたが、生検にはがん患者への侵襲性、及び採取の非簡便性という課題がある²。

血中循環がん細胞（Circulating Tumor Cells ; CTCs）はがんの遺伝子異常を検出するための新たな試料となっており、検体が血液の採取だけで済み、その低侵襲性や採取の簡便性から従来の生検を代替するものとしてリキッドバイオプシー（Liquid Biopsy）という概念が生まれている³⁻⁷。CTCs はがん原発巣から遊離し血流に乗って全身を循環しているがん細胞であり、転移性のがん患者の末梢血中に検出される。CellSearch[®] システム（Janssen Diagnostics 製）は、米国食品医薬品局（FDA）に医療機器として認可されている唯一の臨床的 CTC 計数装置である。CellSearch[®] システムによれば、転移性乳がん、転移性前立腺がん、及び転移性大腸がんの患者における治療開始前・開始後の CTC 数は、がんの再発までの期間、及び全生存期間と相関があり、治療開始前・開始後のいずれの場合も CTC 数が一定数より多い場合はそうでない場合と比較して、再発までの期間、及び全生存期間とも短かった⁸。現在、CTCs の臨床的意義は上記のがん種の他にも非小細胞肺がん、小細胞肺がん、及び胃がんでの検証試験が報告されている⁹⁻¹²。

現在まで、血液から CTCs を濃縮し検出するための種々のシステムが開発されている⁵。それらのシステムは、CellSearch[®] に代表されるようにがん細胞表面に発現している上皮性接着分子（EpCAM）に結合する抗 EpCAM 抗体を利用した CTCs 濃縮機能を持つもの¹³⁻¹⁵、抗 EpCAM 抗体に依存しない CTCs 濃縮機能を持つもの¹⁶⁻¹⁸、または CTCs と白血球細胞との細胞径の違いにより CTCs を濃縮する膜状フィルターによるもの¹⁹⁻²¹、以上の 3 種類に大きく分類される。しかしながら、CTCs の EpCAM 発現量や細胞径はがん種により異なるため、抗 EpCAM 抗体を利用した CTCs 濃縮方法やフィルターによる濃縮方法では CTCs を取りこぼすことが指摘されている⁵。さらに CTCs の特性評価の結果わかったことは、CTCs は多様性をもつ細胞群であり、そのため 1 細胞レベルでの解析の必要

があることである。種々の 1 細胞レベルでの解析は技術的にいまだ容易ではないが、がんの進行に伴う血行性遊離のメカニズムを解明するために、現在までにくつかの研究手法が開発され評価されている²²⁻²⁶。これらの手法では通常、複数のシステムを組合せることによって CTCs の検出と単離といった複雑な操作を行っている（例えば、CellSearch[®] システムによる CTCs の濃縮と検出、それに続くマイクロマニピュレーションによる細胞単離、またはセルソーターによる細胞単離が実施されている^{24, 26}）。誘電泳動技術もまた、CTCs を含むがんの 1 細胞レベルでの単離と特性評価に利用されている²⁷⁻²⁹。しかしながら、誘電泳動技術を利用した初期の研究では、細胞濃縮工程と細胞単離工程との間での操作中に希少ながん細胞をロスしてしまうことが大きな問題となっていた^{24, 26, 27}。

今回我々は、新たに開発した誘電泳動デバイスを用いた CTC 検出・解析システムを完成した。本システムでは、細胞濃縮工程から細胞単離工程まで一貫して実施するため、操作中の希少細胞のロスが低減されており、希少ながん細胞の 1 細胞レベルでの検出と単離が可能となる。

本報告では、白血球除去による CTCs の濃縮工程、蛍光顕微鏡を用いた画像解析による免疫表現型分析工程、そして CTC の単離工程とそれに続く 1 細胞レベルでの遺伝子変異解析とからなる一連の操作による、前臨床・原理検証実験結果を説明する。誘電泳動を利用した我々の CTC 検出・解析システムは高性能かつ簡便なものであり、今後の臨床試験における性能評価が待たれている。

2. 実験方法と結果

[1] 倫理委員会

本研究は東ソー株式会社旧東京研究所倫理委員会にて倫理面・安全面に関する審査を受け、承認されている（管理番号 TR14 - 01）。

[2] 誘電泳動の原理と実用

誘電泳動は不均一電界に置かれた細胞等の誘電体粒子が、力を受ける現象である。不均一電界 \vec{E} に置かれた液媒体中の球状粒子（例えば細胞）が受ける誘電泳動力 \vec{F} は、下記の式で表される；

$$\vec{F} = 2\pi\epsilon_m\alpha^3 \frac{\epsilon_{\text{cell}} - \epsilon_m}{\epsilon_{\text{cell}} + 2\epsilon_m} \nabla |\vec{E}|^2$$

ここで ϵ_m 及び ϵ_{cell} はそれぞれ媒体と粒子の誘電率、 α は粒子径を表す³⁰。このように、誘電泳動力は粒子

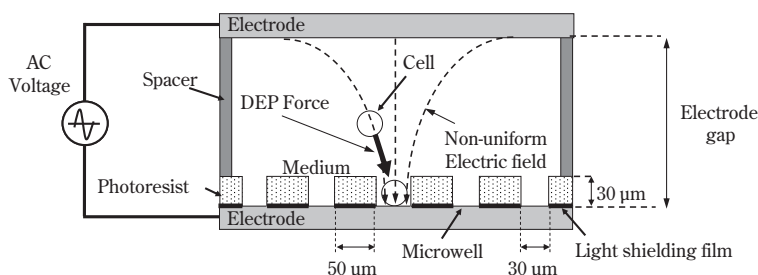


Fig. 1 Schematic drawings of the cell entrapment chamber utilizing dielectrophoresis (DEP)

の体積、媒体と粒子の誘電率の差、及び不均一電界の大きさの二乗にそれぞれ比例する。そして $\epsilon_{\text{cell}} - \epsilon_m$ が0より大きい場合、粒子は不均一電界の強い方向に引き寄せられる。

Fig. 1 に誘電泳動力による微細孔アレイへの細胞捕捉の模式図を示した。上部平板電極に対向する下部電極に形成した絶縁膜上の微細孔に、一様でない不均一な電界（電気力線）が与えられると、細胞は電界の集中する方向（電気力線が密な方向）、すなわち微細孔の方向へ引き寄せられる。ここで実際に細胞が受ける誘電泳動力は、不均一電界の交流周波数と、細胞が置かれる液媒体の電気伝導度にも影響を受ける。その理由は ϵ_m 及び ϵ_{cell} が周波数及び液媒体の電気伝導度の影響を受けるからである。媒体の電気伝導度は、媒体に過剰に電流が流れないように 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 未満である

ことが好ましく、また交流電圧は細胞が素早く引き寄せられるために矩形波であることが好ましい。

また、等張液とするため、200 ~ 500 mM の糖（マンニトールやスクロース等）水溶液が溶媒として一般に用いられる。

Fig. 2 に微細孔アレイ基板の作成方法を示す。酸化インジウムスズ (ITO) 透明電極の薄膜（膜厚 150nm、抵抗率 10 Ω/sq ）を片面に成膜したガラス板（70mm × 40mm × 厚さ 1mm）上に、スパッタリングによりクロム (Cr) の薄膜（膜厚 100nm）を形成した。その上にネガ型フォトレジスト (SU-8) をスピコートにより塗布することで厚さ 30 μm の層を形成し、微細孔（直径 30 μm 、孔間隔 50 μm ）に対応するパターンを形成したフォトマスクを介してフォトレジストを紫外線露光し、続いて現像、バークを行い、所定の微

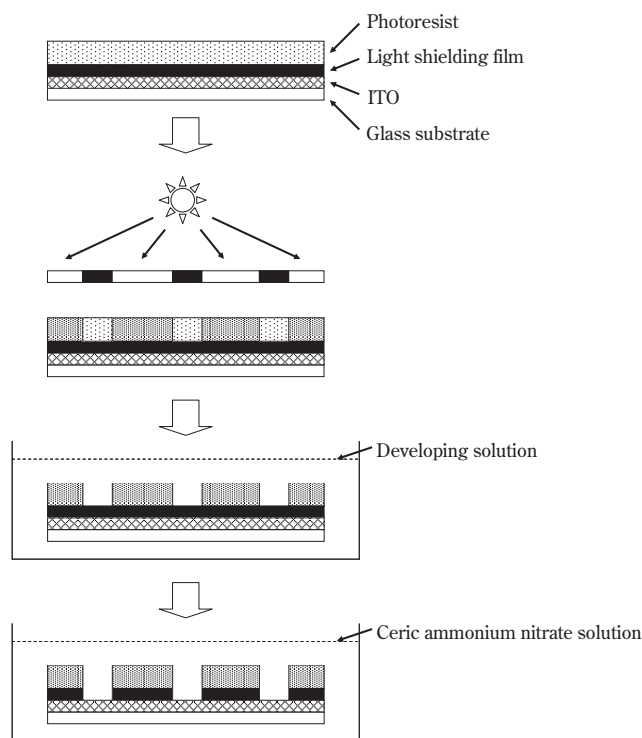


Fig. 2 Schematic diagram of the photolithographic method, with corresponding etching, to fabricate the microwell array substrate

細孔に相当する凹部をレジストに形成した。ここで露光条件として、微細孔の底部に Cr が露出するように露光時間、現像時間を調整した。最後に硝酸二アンモニウムセリウム液により露出した Cr 膜を剥離し、微細孔の底部に電極部材である ITO を露出させた。ネガ型フォトリソとして用いた SU-8 は、紫外線露光された部分が硬化しエポキシ系樹脂となり、微細孔を有する絶縁膜となる。微細孔の深さはレジスト厚と等しく、30 μ m とした。Fig. 3 に完成した微細孔アレイ基板を示す。なお、ITO 電極と絶縁膜との間に、微細孔底面を除く ITO 電極表面を覆うように形成した Cr 膜は遮光膜の役割を果たし、レジストの自家蛍光を遮光する。

Fig. 4 に細胞捕捉チャンバーを示す。細胞捕捉チャンバーは、前述の微細孔アレイ基板と、シリコンゴム製スペーサーを介して空間を設けるように反対側に位置するもう一枚の ITO 電極形成ガラス板とからなる。従って電極間距離は、スペーサーの厚みと等しい 1mm となる。なお、電極間に設けられた空間にはおよそ 800 μ L の溶液を保持することができ、また約 30 万個の微細孔が開口する。細胞捕捉チャンバーに細胞懸濁液を導入し、周波数 100 kHz ~ 10 MHz、強度 20 ~ 50 Vp-p の交流電圧を一对の電極間に印化すると、電界強度 40 ~ 100 kV/m の不均一な交流電界が発生し、数分のうちに直径 5 ~ 30 μ m のヒトの細胞をそれぞれの微細孔に捕捉することができる。

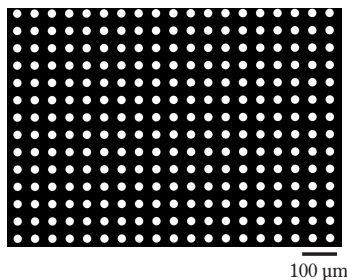


Fig. 3 The microwell array fabricated on the plane ITO electrode

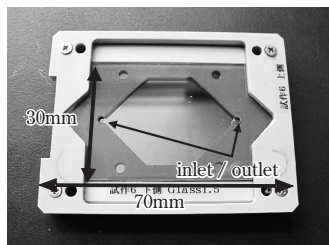


Fig. 4 The cell entrapment chamber, which consists of the microwell array substrate and another glass substrate coated with ITO thin film

[3] がん細胞の濃縮

健常者の血液は従業員からボランティアで提供され、EDTA-2K 真空採血管（テルモ製、VP-DK050K）に採血した。スパイク試験では、細胞数を調整した生きたがん細胞株を 3mL の血液に添加（スパイク）し、さらに RosetteSep™ Human CD-45 Depletion Cocktail（STEMCELL technologies 製）を添加した。そこに等量の生理食塩水を加え 6mL の希釈血液とし、全量を Lymphoprep™ 比重差分離液（密度：1.077 ± 0.001 g/ml, 浸透圧：280 ± 15 mOsm/kg-H₂O, Axis-Shield 製）に重層し、遠心した（2000 × g, 5 分, 25℃）。なお RosetteSep™ は白血球と複数の赤血球との凝集体を形成する試薬であり、その後の密度勾配遠心分離と組み合わせることで不要な白血球を効率的に除去することができる。遠心後、濃縮された単核細胞層を回収し、0.35% クエン酸を含む PBS で洗浄し、遠心した（300 × g, 10 分, 25℃）。僅かに混入する赤血球を破碎するため、遠心後のペレットを 9.0 g/L NH₄Cl, 1.0 g/L KHCO₃, 0.037 g/L EDTA-4Na からなる溶血液により懸濁し、室温で 5 分静置した後、300 mM マンニトール水溶液で希釈し遠心した（300 × g, 5 分, 25℃）。上清を注意深く除去し、再度 300 mM マンニトール水溶液にて希釈し遠心（300 × g, 5 分, 25℃）した後、上清を注意深く除去し、がん細胞が濃縮された単核細胞懸濁液を得た。得られた細胞懸濁液の電気伝導度は 200 μ S/cm 未満であり、また含まれる白血球数は検体個人差により 1 × 10⁵ ~ 5 × 10⁵ 個の範囲であった。

[4] 微細孔アレイでの細胞の捕捉

市販の交流電源（エヌエフ回路設計ブロック製、WF1974）を細胞捕捉チャンバーの一对の電極間に接続し、がん細胞が濃縮された単核細胞懸濁液をチャンバーに導入し、即座に交流電圧（3 MHz, 20 Vp-p, 矩形波）を 3 分間印加し、誘電泳動力により細胞を微細孔アレイに捕捉した。続いて、ポリ-L-リジンを含む 300mM マンニトール水溶液を細胞捕捉チャンバーに導入し 3 分間静置した。なお、ポリ-L-リジンはカチオン性ポリマーであり、負電荷を帯びた細胞膜と相互作用し、細胞を微細孔底面へ接着する働きがある。チャンバー内の溶液を吸引除去した後、ホルムアルデヒドを含むエタノールをチャンバー内に満たし、室温で 10 分間静置した。なおエタノールは細胞膜を透過性にすることで細胞内外の物質の移動を可能とし、またホルムアルデヒドはタンパク質同士を架橋することで核や細胞骨格など細胞内構造の形態を安定化する。チャンバーからエタノールを吸引除去した後、1% 牛

血清アルブミン(BSA)を含むPBSからなるチャンバー洗浄液によりチャンバー内を洗浄し、さらにFcRブロッキング試薬(Miltenyi Biotec製)を含むチャンバー洗浄液を導入し室温で10分間静置することで、非特異標識ブロッキングを行った。

[5] がん細胞の免疫蛍光染色と画像取得

上皮性マーカーの一つであるサイトケラチン(CK)の発現が高い細胞株(乳がんSK-BR-3、非小細胞肺癌PC-9)を用いたスパイク試験では、細胞捕捉チャンバー内の溶液を吸引除去後、PBSに1% BSA、0.05% Tween20、FITC標識一抗CK抗体(クローンCK3-6H5)、Alexa Fluor® 488標識一抗Pan-CK抗体(クローンAE1/AE3)、PE標識一抗CD45抗体(クローンJ33)、DAPI、及びFcRブロッキング試薬を加えた免疫蛍光染色試薬溶液をチャンバー内に満たし、室温で30分間静置した。未反応の抗体を吸引除去後、チャンバー内をチャンバー洗浄液で洗浄し、次いで300mM マンニトール水溶液を満たした。

一方、CKの発現が低い細胞株(非小細胞肺癌PC-14)を用いたスパイク試験では、細胞捕捉チャンバー内の溶液を吸引除去後、PBSに1% BSA、0.05% Tween20、抗CK抗体(クローンCK3-6H5、AE1、AE3)、及びFcRブロッキング試薬を加えた一次抗体試薬溶液をチャンバー内に満たし、室温で30分間静置した。未反応の抗体をチャンバー洗浄液により洗浄した後、PBSに1% BSA、0.05% Tween20、Alexa Fluor® 488標識一抗マウスIgG₁抗体、PE標識一抗CD45抗体(クローン5B1)、DAPI、及びFcRブロッキング試薬を加えた蛍光標識二次抗体溶液をチャンバー内に満たし、室温で20分間静置した。なお使用した抗CK抗体のサブタイプは全てマウスIgG₁であり、一方抗CD45抗体(5B1)のサブタイプはマウスIgG₂であるため、二次抗体である抗マウスIgG₁による交差反応は起こらなかった。未反応の抗体を吸引除去後、チャンバー内をチャンバー洗浄液で洗浄し、次いで300mM マンニトール水溶液を満たした。

がん細胞の免疫蛍光染色工程の後、細胞捕捉チャンバーを蛍光顕微鏡(IX 71、オリンパス製)の自動ステージ上に載せ、EM-CCDカメラ(ADT-100、フローベル製)により微細孔アレイ全体の画像を取得した。蛍光画像は各蛍光波長(DAPI、FITC (Alexa Fluor® 488)、PE)について取得し、明視野画像も併せて取得した。画像取得及び解析は特注のソフトウェアを用いて行った。

[6] スパイク試験

スパイク試験により我々の開発したCTC検出・解析システムの性能を評価した。蛍光画像解析により、CK陽性/DAPI陽性/CD45陰性の細胞をがん細胞と判定し、一方でCK陰性/DAPI陽性/CD45陽性の細胞を白血球と判定した。Fig. 5はSK-BR-3を用いたスパイク試験で得られた画像の一例を示しており、矢印で示す細胞はがん細胞と判定される。

Fig. 6にスパイク細胞数に対する検出された細胞数のプロットを示す。CK高発現細胞株であるSK-BR-3及びPC-9の結果は高い直線性を示し決定係数(R^2)はそれぞれ0.9735、0.9999、平均検出率(及び変動係数)はそれぞれ81.1%(10.7%)、81.5%(5.0%)であった。その一方で、CK低発現細胞株であるPC-14の結果は、平均検出率が13.1%(Fig.6 黒塗)と低く、FITC標識一抗CK抗体(クローンCK3-6H5)及びAlexa Fluor® 488標識一抗Pan-CK抗体(クローンAE1/AE3)の組合せ使用ではCK低発現細胞の検出には免疫蛍光染色能力が不十分であることが推測された。その証拠に、Alexa Fluor® 488標識二次抗体を使用する免疫蛍光染色プロトコルにより、PC-14の検出率(及び変動係数)は77.7%(15.7%)(Fig.6 白塗)に改善した。これは弱いCKシグナルが二次抗体により増幅されたこと、及び二次抗体がFITCよりも明るい色素であるAlexa Fluor® 488で標識されていることが起因していると考えられる。以上の結果から、我々の開発したCTC検出・解析システムはがん細胞を精度良く検出し、また少数の細胞から多数の細胞まで同様に検出可能であることが示された。

続いて、CellSearch®との比較試験をブラインド試験により行った。ブラインド試験とは、血液にスパイ

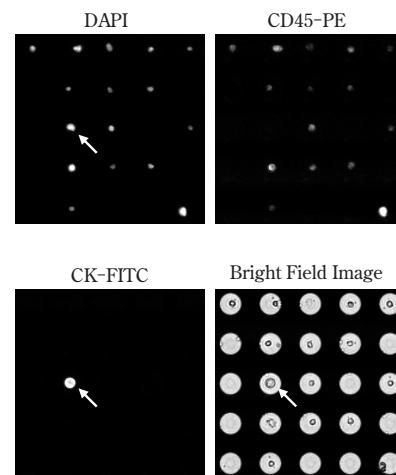


Fig. 5 A typical example of captured images of tumor cells and white blood cells in the spike-in experiments

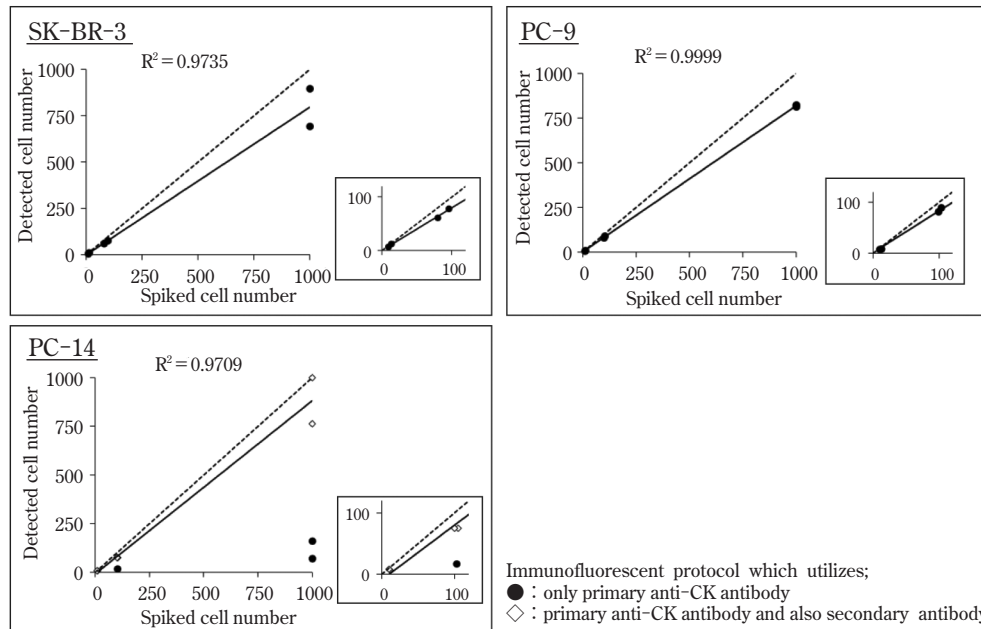


Fig. 6 Plots of the number of detected cells against the number of spiked cells in the spike-in experiment

クしたがん細胞株の種類、及び個数を測定者に知らせずに行う試験のことである。任意のがん細胞 (SK-BR-3、PC-9、PC-14 のどれか) を添加した血液 3mL を我々の CTC 検出・解析システムで測定した。一方、並行して CellSave 血液保存管に採取した血液量 10 mL に比例したがん細胞数を添加したサンプルを、比較用に CellSearch® システムで測定した。併せてがん細胞を添加していない血液検体も両システムで測定した。結果を Table 1 に示す。平均検出率 (我々のシステム vs. CellSearch®) は以下の通りであった; EpCAM / CK 高発現細胞 SK-BR-3 (n = 3), 80.1% vs. 58.0%; EpCAM / CK 高発現細胞 PC-9 (n = 2), 75.8% vs. 85.6%; EpCAM 無発現 / CK 低発現細胞 PC-14 (n = 3), 61.9% vs. 0.0%。また両システムとも、がん細胞を添加していない血液検体からはがん細胞と判定される細胞は検出されなかった。以上の結果のように、我々のシステムは EpCAM 無発現 / CK 低発現

細胞の検出では CellSearch® に対し優位であり、また EpCAM / CK 高発現細胞の検出では CellSearch® と同等の性能を示した。

[7] 1 細胞単離・1 細胞遺伝子変異解析

画像解析により CTC と判定された細胞を微細孔アレイから単離し遺伝子変異解析を行うため、シリンジポンプと L 字型ガラスキャピラリー (内径 30µm) を装着したマイクロマニピュレーターによる細胞単離機構を構築し、微細孔に捕捉された細胞を吸引し単離した。Fig. 7 は L 字型ガラスキャピラリーによる微細孔からの細胞を吸引の模式図である。なお Fig. 8 に示すように、細胞単離機構によって標的のがん細胞のみが吸引され、近隣の微細孔に捕捉された白血球は微細孔から吸引されることはなかった。単離した単一細胞は市販の PCR チューブに吐出した。PCR チューブに回収した単一細胞のゲノム DNA の配列解析を

Table 1 Comparative detection data from the spike-in experiment using tumor cell lines (our system vs. the CellSearch® system)

Cell Line	n	Our system		CellSearch® system	
		Mean percentage of detected cells (%)	CV (%)	Mean percentage of detected cells (%)	CV (%)
SK-BR-3	3	80.1% (76-84%)	4.7	58.0% (49-69%)	17.6
PC-9	2	75.8% (72-79%)	6.	85.6% (77-94%)	13.8
PC-14	3	61.9% (46-85%)	33.3	N.D.	—
Healthy donor	4	N.D.	—	N.D.	—

Foot note ; CV : coefficient of variation. N.D. : not detect

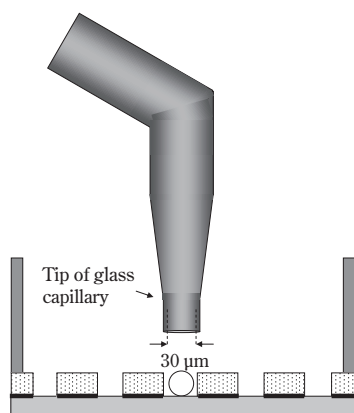


Fig. 7 Schematic drawings of isolation of single tumor cell.

行うために、Ampli1™ 全ゲノム増幅キット (Silicon Biosystems 製) を用いて全ゲノム DNA の増幅を行った。アガロースゲル電気泳動により全ゲノム増幅の成功を確認した後、～100 ng の全ゲノム増幅産物を鋳型としてサンガーシーケンシング法により遺伝子配列解析を行った。

非小細胞肺癌において、上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 遺伝子における数種類の変異が、EGFR を標的とした分子標的薬ゲフィチニブ (製品名イレッサ®, アストラゼネカ社) の奏功性と関連していることが知られている³¹。そこで非小細胞肺癌患者の CTCs のゲノム DNA 情報を得ることを狙いに、微細孔アレイから単離した単一がん細胞に対しサンガーシーケンシングを行い、EGFR 遺伝子における数種類の遺伝子変異の検出を試みた。

実験には非小細胞肺癌細胞株 H1975 と PC-9 とを用いた。なお H1975 のゲノム DNA にはエクソン 20 上に T790M 変異、エクソン 21 上に L858R 変異が存在する。一方 PC-9 のゲノム DNA には上記のどちらの変異も存在しないため、遺伝子変異陰性の対照細胞として用いた。両細胞株を別々に血液にスパイクし、前述と同様がん細胞濃縮、微細孔アレイへの捕捉、細胞膜透過、及び免疫蛍光染色の各工程を実施した。細胞捕捉チャンバーの上部平板電極を取外し、細胞単離機構によりがん細胞を単離し回収した。回収した細胞は 1 細胞ごとに全ゲノム増幅し、サンガーシーケンシング法により EGFR 遺伝子を解析した。その結果、単離された H1975 細胞の 1 細胞ごとの全ゲノム増幅の成功率は高く、80% (12/15) であった。全ゲノム増幅が失敗したケースでは、DAPI による核染色やホルムアルデヒドによる化学固定が影響していると推定され、実際の臨床検体に含まれる希少細胞の解析のためには、さらなるプロトコルの最適化が必要であると思われる。H1975 全ゲノム増幅産物のサンガーシーケンシングの結果、Fig. 9 に示したように EGFR 遺伝子のエクソン 20 とエクソン 21 にそれぞれ T790M 変異 (C2369 > T)、L858R 変異 (T2573 > G) が存在するシーケンスクロマトグラムが得られた。一方、同様の操作を PC-9 細胞について行った結果、エクソン 20、エクソン 21 のいずれにも変異は見られなかった。以上の結果から、我々の開発した CTC 検出・解析システムにより得られたがん単一細胞はゲノム DNA 配列解析に十分耐えうる品質であることが示された。

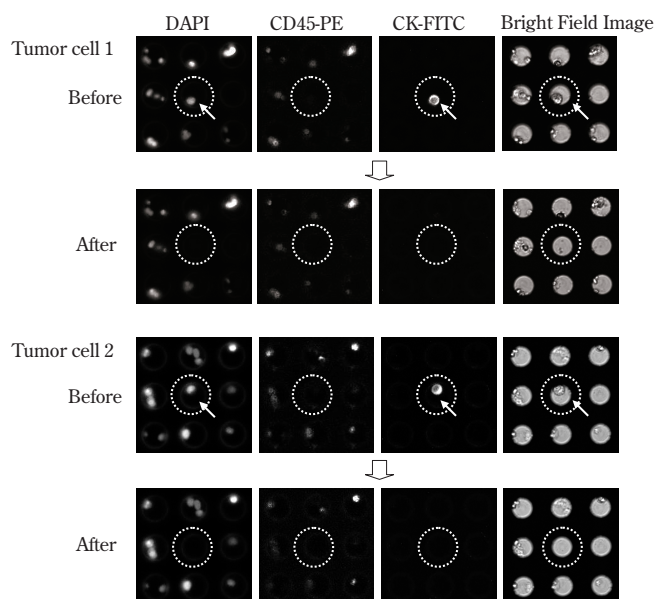


Fig. 8 Demonstration of isolation of targeted single tumor cells by aspiration

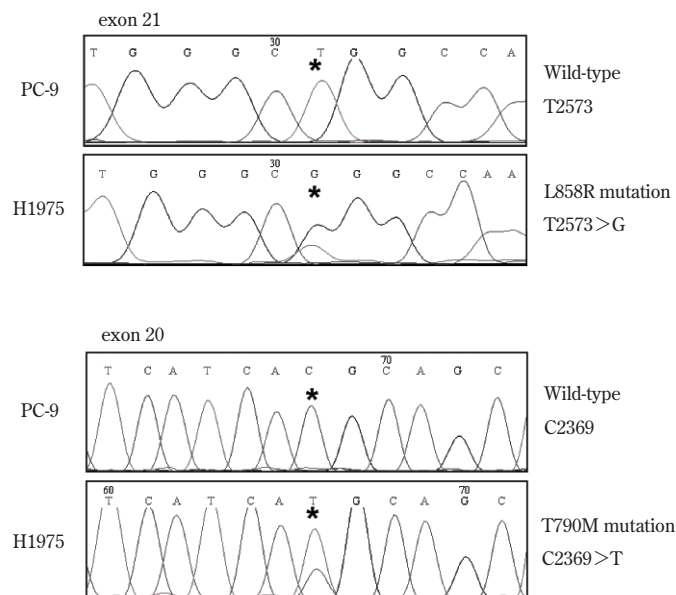


Fig. 9 Sequencing chromatograms with T790M *EGFR* exon 20 mutation and L858R *EGFR* exon 21 mutation obtained from WGA product from a single H1975 cell isolated by our CTC detection system.

3. まとめ

以上のように、高密度誘電泳動微細孔アレイを利用した有力な CTCs 検出・解析システムを確立した。本システムはヒト血液に含まれる希少細胞の特性評価及び単一細胞レベルでの単離を可能とする。これまで報告したように、本システムの利点として以下が挙げられる。(1) 表面マーカー等に依存しない細胞捕捉、(2) CTCs の濃縮から単一細胞単離まで一貫し実施可能、(3) 細胞ロスの無い微細孔アレイでの免疫蛍光染色、(4) 整列した微細孔からの安定した単一細胞分取、(5) ゲノム DNA の変異検出などの追加解析が可能。

現在、CTC 検出技術の更なる高精度化を達成すべく、血液からの細胞濃縮工程の改良や誘電泳動による細胞捕捉性能の向上といった対策を実施している。また臨床現場での性能評価試験を実施するために各工程の自動化を進めており、今後の医療機関での評価が待たれている。

最後に、本研究開発の実施にあたり、洪泰浩先生、渡辺勝先生（両名とも所属は和歌山県立医科大）、小泉史明先生、澤田武志先生（両名とも所属は都立駒込病院）には技術的なご指導・ご助言をいただいた。また野口昭子氏、柏木菜穂子氏には技術支援をいただいた。以上のご協力いただいた方々に対し、ここに感謝申し上げます。本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術開発機構（NEDO）によるがん超早期

診断・治療機器の総合研究開発プロジェクト、血中循環がん細胞検出技術【CTC 検出自動化】（2010 年～2015 年）の助成を受け実施された。

引用文献

- (1) NB. La Thangue, DJ. Kerr, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 8,587 (2011)
- (2) MJ. Overman, J. Modak, S. Kopetz, R. Murthy, JC. Yao, ME. Hicks, JL. Abbruzzese, AL. Tam, *J. Clin. Oncol.*,31,17 (2013)
- (3) M. Yu, S. Stott, M. Toner, S. Maheswaran, DA. Haber, *J. Cell Biol.*,192,373 (2011)
- (4) ES. Lianidou, *Clin. Chem.*,58,805 (2012)
- (5) C. Alix-Panabieres, K. Pantel, *Clin. Chem.*, 59, 110 (2013)
- (6) TM. Gorges, K. Pantel, *Cancer Immunol. Immunother.*, 62, 931 (2013)
- (7) E. Heitzer, M. Auer, P. Ulz, JB. Geigl, M. Speicher, *Genome Med.*, 5, 73 (2013)
- (8) K. Pantel, RH. Brakenhoff, B. Brandt, *Nat. Rev. Cancer*, 8, 329 (2008)
- (9) MG. Krebs, R. Sloane, L. Priest, L. Lancashire, JM. Hou, A. Greystoke, TH. Ward, R.Ferraldeschi, A. Hughes, G. Clack, M. Ranson, C. Dive, FH. Blackhall, *J. Clin. Oncol.*, 29, 1556 (2011)

- (10) JM. Hou, MG. Krebs, L. Lancashire, R. Sloane, A. Beckon, RK. Swain, LJ. Priest, A. Greystoke, C. Zhou, K. Morris, T. Ward, FH. Blackhall, C. Dive, *J. Clin. Oncol.*, 30, 525 (2012)
- (11) T. Naito, F. Tanaka, A. Ono, K. Yoneda, T. Takahashi, H. Murakami, Y. Nakamura, A. Tsuya, H. Kenmotsu, T. Shukuya, K. Kaira, Y. Koh, M. Endo, S. Hasegawa, N. Yamamoto, *J. Thorac. Oncol.*, 7, 512 (2012)
- (12) S. Matsusaka, K. Chin, M. Ogura, M. Suenaga, E. Shinozaki, Y. Mishima, Y. Terui, N. Mizunuma, K. Hatake, *Cancer Sci.*, 101, 1067 (2010)
- (13) M. Cristofanilli, GT. Budd, MJ. Ellis, A. Stopeck, J. Matera, MC. Miller, JM. Reuben, GV. Doyle, WJ. Allard, LW. Terstappen, DF. Hayes, *N. Engl. J. Med.*, 351, 781 (2004)
- (14) AA. Powell, AH. Talasaz, H. Zhang, MA. Coram, A. Reddy, G. Deng, ML. Telli, RH. Advani, RW. Carlson, JA. Mollick, S. Sheth, AW. Kurian, JM. Ford, FE. Stockdale, SR. Quake, RF. Pease, MN. Mindrinos, G. Bhanot, SH. Dairkee, RW. Davis, SS. Jeffrey, *PLoS One*, 7, e33788 (2012)
- (15) SL. Stott, CH. Hsu, DI. Tsukrov, M. Yu, DT. Miyamoto, BA. Waltman, SM. Rothenberg, AM. Shah, ME. Smas, GK. Korir, FP Jr. Floyd, AJ. Gilman, JB. Lord, D. Winokur, S. Springer, D. Irimia, S. Nagrath, LV. Sequist, RJ. Lee, KJ. Isselbacher, S. Maheswaran, DA. Haber, M. Toner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 18392 (2010)
- (16) M. Watanabe, Y. Uehara, N. Yamashita, Y. Fujimura, K. Nishio, T. Sawada, K. Takeda, F. Koizumi, Y. Koh, *Cytometry Part A*, 85, 206 (2014)
- (17) M. Wendel, L. Bazhenova, R. Boshuizen, A. Kolatkar, M. Honnatti, EH. Cho, D. Marrinucci, A. Sandhu, A. Perricone, P. Thistlethwaite, K. Bethel, J. Nieva, Mv. Heuvel, P. Kuhn, *Phys. Biol.*, 9, 016005 (2012)
- (18) E. Ozkumur, AM. Shah, JC. Ciciliano, BL. Emmink, DT. Miyamoto, E. Brachtel, M. Yu, P. Chen, B. Morgan, J. Trautwein, A. Kimura, S. Sengupta, SL. Stott, NM. Karabacak, TA. Barber, JR. Walsh, K. Smith, PS. Spuhler, JP. Sullivan, RJ. Lee, DT. Ting, X. Luo, AT. Shaw, A. Bardia, LV. Sequist, DN. Louis, S. Maheswaran, R. Kapur, DA. Haber, M. Toner, *Sci. Trans. Med.*, 5, 179ra47 (2013)
- (19) F. Farace, C. Massard, N. Vimond, F. Drusch, N. Jacques, F. Billiot, A. Laplanche, A. Chauchereau, L. Lacroix, D. Planchard, S. Le Moulec, F. André, K. Fizazi, JC. Soria, P. Vielh, *Br. J. Cancer*, 105, 847 (2011)
- (20) HK. Lin, S. Zheng, AJ. Williams, M. Balic, S. Groshen, HI. Scher, M. Fleisher, W. Stadler, RH. Datar, YC. Tai, RJ. Cote, *Clin. Cancer Res.*, 16, 5011 (2010)
- (21) M. Hosokawa, H. Kenmotsu, Y. Koh, T. Yoshino, T. Yoshikawa, T. Naito, T. Takahashi, H. Murakami, Y. Nakamura, A. Tsuya, T. Shukuya, A. Ono, H. Akamatsu, R. Watanabe, S. Ono, K. Mori, H. Kanbara, K. Yamaguchi, T. Tanaka, T. Matsunaga, N. Yamamoto, *PLoS One*, 8, e67466 (2013)
- (22) GM. Cann, ZG. Gulzar, S. Cooper, R. Li, S. Luo, M. Tat, S. Stuart, G. Schroth, S. Srinivas, M. Ronaghi, JD. Brooks, AH. Talasaz, *PLoS One*, 7, e49144 (2012)
- (23) MJ. Magbanua, EV. Sosa, R. Roy, LE. Eisenbud, JH. Scott, A. Olshen, D. Pinkel, HS. Rugo, JW. Park, *Cancer Res.*, 73, 30 (2013)
- (24) C. Gasch, T. Bauernhofer, M. Pichler, S. Langer-Freitag, M. Reeh, AM. Seifert, O. Mauermann, JR. Izbicki, K. Pantel, S. Riethdorf, *Clin. Chem.*, 59, 252 (2013)
- (25) E. Heitzer, M. Auer, C. Gasch, M. Pichler, P. Ulz, EM. Hoffmann, S. Lax, J. Waldispuehl-Geig, O. Mauermann, C. Lackner, G. Höfler, F. Eisner, H. Sill, H. Samonigg, K. Pantel, S. Riethdorf, T. Bauernhofer, JB. Geigl, MR. Speicher, *Cancer Res.*, 73, 2965 (2013)
- (26) JF. Swennenhuis, J. Reumers, K. Thys, J. Aerssens, LW. Terstappen, *Genome Med.*, 5, 106 (2013)
- (27) DJE. Peeters, B. De Laere, GG. Van den Eynden, SJ. Van Laere, F. Rothe ´, M. Ignatiadis, AM. Sieuwerts, D. Lambrechts, A. Rutten, PA. van Dam, P. Pauwels, M. Peeters, PB. Vermeulen, LY. Dirixet, *Br. J. Cancer*, 108, 1358 (2013)
- (28) F. Fabbri, S. Carloni, W. Zoli, P. Ulivi, G.vGallerani, P. Fici, E. Chiadini, A. Passardi, GL. Frassinetti, A. Ragazzini, D. Amadori, *Cancer Lett.*, 335, 225 (2013)
- (29) V. Gupta, I. Jafferji, M. Garza, VO. Melnikova, DK. Hasegawa, R. Pethig, DW. Davis, *Biomicrofluidics*, 6, 024133 (2012)

- (30) HA. Pohl, *Dielectrophoresis : The behavior of neutral matter in nonuniform electric fields*; Cambridge University Press: London, (1978)
- (31) M. Maemondo, A. Inoue, K. Kobayashi, S. Sugawara, S. Oizumi, H. Isobe, A. Gemma, M. Harada, H. Yoshizawa, I. Kinoshita, Y. Fujita, S. Okinaga, H. Hirano, K. Yoshimori, T. Harada, T. Ogura, M. Ando, H. Miyazawa, T. Tanaka, Y. Saijo, K. Hagiwara, S. Morita, T. Nukiwa, *N. Engl. J. Med.*, 362, 2380 (2010)