

## 論文内容の要旨

各種固形癌における生命予後予測や治療効果判定などには、血中腫瘍マーカーが広く利用されている。しかし、腫瘍マーカーの種類によってその感度、特異度は様々であり、検査画像結果や治療経過との乖離を経験することが度々見られる。また、転移性癌の確定診断の為には、腫瘍の原発巣や転移巣組織の摘出や針穿刺生検等が必要となるが、患者の病勢や部位によっては施行困難となる例が多く見られる。

癌の血行性転移には原発巣の腫瘍細胞がその上皮細胞表現型から細胞形態や細胞間接着因子などを変化させ、運動・浸潤性を獲得し血管内に流入することが必要である、とする上皮間葉転換 (EMT: Epithelial-Mesenchymal transition) 説が多く受け入れられている。この説を基に、患者の微量血液から末梢血中を循環する癌細胞 (循環腫瘍細胞 CTCs: Circulating tumor cells) を捕捉する研究や、血液中に漏れ出た癌由来の遺伝子情報 (cfDNA: cell free DNA、ctDNA: circulating tumor DNA) を解析するリキッドバイオプシー (Liquid biopsy) の研究、開発が世界中で進められている。

CTCs は末梢血 1mL 中に数個と非常に少数しか存在していないと言われており、より低侵襲な転移有無診断や、癌治療効果判定、生命予後予測、転移メカニズムの解明など様々な分野で応用され、新たなバイオマーカーとしての意義が模索されている。

CTCs の捕捉、同定方法は多岐にわたって開発されてきており、微小磁気ビーズ等を利用した磁性微粒子法、チップを利用したマイクロ流路法、アデノウイルスなどウイルスを利用した検出法、フィルター等を用いたサイズ分画法、液体力学を利用した方法、電気泳動誘電法などが挙げられる。転移性大腸癌、転移性乳癌、転移性前立腺癌において、米国食品医薬品局 (FDA: Food and Drug Administration) の許可を唯一受け、広く実用化、普及されている CTCs 捕捉デバイスとしては、磁性微粒子法に位置する CellSearch® (Veridex 社) があり、採取された CTCs の個数が多い患者ほど生命予後不良と関係するとの報告が散見される。しかし、CellSearch®は規模が大きく、検査費用が高額 (初期設置費用 220,000 US ドル、検査 1 回 1,000 US ドル) であることや、使用可能抗体が限定されている、感度が低い (約 60%)、といった様々な問題点がある。

今回我々は、マイクロ流路法に位置する流体チップデバイス (Polymer CTC chip) を用いて、転移性前立腺癌患者末梢血から CTCs を捕捉することが可能かどうかの検証実験を行った。このデバイスの特長として、小規模で安価 (初期設置費用 3,000 US ドル、検査 1 回 100 US ドル)、高い捕捉率、捕捉抗体を自由に組み合わせる事が可能、操作が簡便であるといった点が挙げられる。CTC chip はレジンポリマー製で、75×25mm のプレパラート上に高さ 100  $\mu\text{m}$ 、長径 100  $\mu\text{m}$  大のマイクロポストが約 30,000 個敷き詰められており、腫瘍細胞表面に発現している抗原に反応する捕捉抗体をマイクロポスト表面にコーティングすることが可能となっている。デバイスシステム全体のサイズは 30×40×50  $\text{cm}^3$  である。

前立腺癌細胞株（PC3 と LNCaP）における抗原発現の確認と細胞捕捉実験の後、未治療転移性前立腺癌患者 14 名より末梢血 2mL を採取し、輸液ポンプで陰圧をかけながら、捕捉抗体である EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) 抗体をコーティングした chip 内を通過させ、1 時間程で CTCs を捕捉。捕捉された CTCs は PE-Anti EpCAM や DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole)、FITC-Anti CK (Cytokeratin) 8、CK9、CK18、APC-CD45 などの各種蛍光免疫染色を施した後、蛍光顕微鏡で観察、同定、計測を行った。本実験は院内倫理委員会の審査を通しており、全患者には十分な口頭と書面による内容説明を行い、了承が得られた上で行われた。

培養した前立腺癌細胞株（PC3 と LNCaP）の EpCAM や CK18 などの抗原発現を蛍光免疫染色で確認後、血液の代用として PBS（リン酸緩衝生理食塩水：Phosphate Buffered Saline）約 2mL に培養した前立腺癌細胞を混濁させて捕捉を試み、PC3 で 94.6%、LNCaP で 82.73% と高い平均捕捉率を確認。健常者から末梢全血 2mL を採取し、培養した前立腺癌細胞を混濁させて同様の方法で捕捉を試み、PC3 で 83.82%、LNCaP で 75.78% 以上の平均捕捉率を確認。前立腺癌細胞株で高い捕捉率が実証されたため、未治療転移性進行前立腺癌患者 14 名から末梢全血を 2mL 採取し、同様の方法で CTCs を捕捉、観察した。全例で CTCs を確認することができ、平均捕捉細胞数は 48 (1~81 個/mL) であった。

我々は上記新規小規模デバイスが未治療転移性前立腺癌患者の CTCs を捕捉可能であることを確認することができた。今後、治療経過中での CTCs 数変化や各腫瘍マーカーとの関係性、腫瘍マーカー陰性の病理学的に特殊な組織型を呈する前立腺癌患者における CTCs 捕捉可否と意義の検出、EpCAM 以外の抗体による腫瘍細胞捕捉など発展性がある。また、このデバイスは改良を重ねており、捕捉した CTCs の回収、培養増殖、ctDNA など遺伝子解析技術が近い将来確立されつつあり、より小規模の施設においても安価にその有益性が得られていく可能性がある。