

## 早期がん診断法の現状

～末梢血中循環腫瘍細胞（CTC）の解析方法について～

年見 遥子 永井 勝幸

Current Status of Diagnosis in the Early Stage Cancer

～ Detection Systems for Circulating Tumor Cells ～

Haruko TOSHIMI , Katsuyuki NAGAI

### Abstract

Currently available methods for detection of tumors such as X-ray, CT, US, and MRI have been well studied. However, a limiting factor in structural and anatomical imaging is the inability to specifically identify malignant tissues. A method for detecting Circulating Tumor cells (CTCs) simply, quickly, and highly sensitively is expected to be developed because CTCs are promising technologies for early diagnosis, prognosis, and response to therapy for cancer patients. This manuscript summarizes the current thinking on the value and issue of detection systems for CTCs.

**Key words** : Cancer Diagnosis, Circulating Tumor Cell, CTC Detection

**キーワード** : がん診断、末梢血中循環腫瘍細胞、CTC 検出

### はじめに

厚生労働省によると、がんは昭和56年より日本人の死因の第1位であり、平成25年度におけるがん年間死亡者数は36万人を超える<sup>1)</sup>。がんの死亡率を低下させるためには早期発見・早期治療が非常に重要であり、現在、がんやその転移の診断にはCT、MRI、PETなどが用いられている<sup>2,3)</sup>。しかし、これらの画像診断機器には検出限界があるため、初期にみられる微小がんを検出することが難しいという問題点がある。そこで近年注目されているのが、末梢血中のがん細胞数を測定する「CTC(末梢血中循環腫瘍細胞)検査」である。CTCは原発巣から他の部位への転移能を有していると考えられており、固形がん患者の末梢血中に微量存在している。本稿では、CTCの検出法の一つである「テロメスキャン法」<sup>4,5)</sup>の早期がん診断法としての有用性について概説する。

### 現在のがん診断（検出限界）

現在、がんやその転移の診断には画像診断機器が用いられている。画像診断機器の分類としては、形の異常などを画像化する形態学的・解剖学的診断機器と代謝の異常などを画像化する機能的診断機器に大別される<sup>6)</sup>。

形態学・解剖学的診断機器に分類されるものとしては、CT、MRI、マンモグラフィー、3Dトモセンシスなどがある。CTはX線を用い、1 cm以上のがんを発見できる。MRIはラジオ波を用い、1 cm以上のがんを発見できる。マンモグラフィーは乳腺(乳がん)の画像診断機器でX線を用いる。乳房の大きい人は深部にひそむ小さなしこりの発見が難しいが、通常は1～2 cm程度のがんであれば発見できる。また、3Dトモセンシスはマンモグラフィーの最新モデルで、3D技術で組織の重なりを取り除くことによって、5 mm以上の乳がんを発見することが可能になったものである。

機能的診断機器としてはPET、PEMなどがある。PETは放射同位元素である<sup>18</sup>Fで標識したグルコースである<sup>18</sup>-FDGを用いる。がん細胞は正常細胞と比較すると活発に活動するためエネルギーを多く消費し、エネルギーの元になるグルコースを多く取り込む。したがって、<sup>18</sup>-FDGが高集積した部位にはがんがあることが分かる。PETでは5 mm程度の比較的小さいがんも発見できる。しかし、機能として糖を多く代謝する脳や心筋、糖を排泄する通り道となる尿路などではFDGの集積が高いため、周囲にある腫瘍の検出が難しい。すなわち、がんの種類によっては擬陰性や擬陽性となるという問題点がある。また、PEM (Positron Emission Mammography) は乳腺専用のPETである。乳房に特化した性質のため、2 mm以上の乳がんを発見することが可能である。各画像診断機器には検出限界が存在し、最小でも2 mm以上の大きさにならなければ、がんを検出することは難しい。したがって、がん超早期発見のためには、現在検出できるがんより小さな微小がんの検出ができるようになることが望ましい。

表1 がん診断機器と検出限界

診断分類	診断機器	原理	検出限界 (cm)
形態学的・解剖学的診断 (物理学的画像) ex)形の異常	CT	X線	1
	MRI	磁場 (ラジオ波)	1
	マンモグラフィ (乳がん)	X線	1 ~ 2
	トモシンセンス	X線	0.5
機能的診断 (生物学的画像) ex)代謝の異常	PET	<sup>18</sup> -FDG	0.5
	PEM (乳がん)		0.2

### CTC 及び CTC 検出の臨床的意義

末梢血中循環腫瘍細胞 (CTC : Circulating Tumor Cells) とは、原発腫瘍組織または転移腫瘍組織から遊離し、血中へ浸潤したがん細胞のことである。CTCは末梢

### CTC (Circulating Tumor Cell) (末梢血中循環腫瘍細胞)

#### 【定義】

原発腫瘍組織 or 転移腫瘍組織から遊離し、  
血中へ浸潤したがん細胞

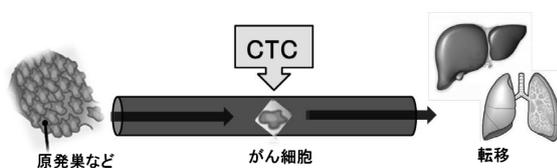


図1 CTCの定義

血中に極微量しか存在せず (転移がん患者の末梢血中に含まれる108~109個の血球成分のうち1個程度)、1869年Ashworthらによってその存在がはじめて報告された<sup>7)</sup>。その後、1998年に「CTCの検出は、原発巣が認識されないがんの早期発見に有効であること」<sup>8)</sup>、2004年に「CTCががんの悪性化評価に基づく予後の予知に有用であること」が報告され<sup>9)</sup>、その結果、CTCは、がんの早期発見、予後の予測、治療効果の判定などを行う代替マーカーとして大きく注目を集めることとなる。また、近年ではCTCを回収し解析することで腫瘍細胞の特性解析や原発巣の同定にもつながることから、CTC検出への期待がさらに高まっている。

ここで、少し腫瘍マーカーについても触れておきたい。がんの早期発見、予後の予測、治療効果の判定などを行う指標として、現在、臨床で使用されているものに腫瘍マーカーがある。がんになると、健康時にはほとんど見れない特殊な物質が異常に増加し、その一部が血液や尿中に出てくる。そうした物質を腫瘍マーカーと呼び、現在では100を超える腫瘍マーカーが実用化されている。腫瘍マーカーの測定は、侵襲性が低く容易に行えるため、患者の負担が軽く非常に有用である。しかし、優れた腫瘍マーカーが存在する一方で多くの課題も残っている。例えば、多くの腫瘍マーカーは腫瘍がある程度大きくなってからでないと検出されない。また、腫瘍マーカーによっては良性疾患や加齢など、腫瘍以外の要因によっても高値を示すことが明らかになっている。そのため、現在、腫瘍マーカーは、がんの診断の指標というよりも、治療後の効果判定に用いられることが多く、CTCの検出とは異なり、あくまで目安としての存在となっているのである。

以上のことからがんの早期発見にCTCの検出が非常に有効であるといえる。

### 従来の CTC 検出法

CTCは末梢血中に極微量しか存在しないことから、その検出感度が重要である。

現在開発されているCTCの検出法を原理別に分類すると、主に、細胞のサイズの違いによって検出するもの、細胞の持つ電荷の違いによって検出するもの、抗原抗体反応を利用して検出するものの3つに大別される<sup>10)</sup>。以下に従来の主なCTC検出法をその原理ごとに簡単に説明する。

細胞のサイズの違いによって分離する方法としては、「サイズ選択性フィルター法」がある。「サイズ選択性フィ

ルター法」ではその名の通り、サイズ選択性フィルターを用いて血球成分をろ過しCTCを選択的に捕獲する。

細胞の電荷の違いによって分離する方法としては「DEP-FFF (dielectrophoretic filed-low-fractionation : 誘電泳動流動場分画) 法」がある。「DEP-FFF法」では細胞表面の電荷を利用することで標的細胞であるCTCの単離を行う。

また、抗原抗体反応を利用するものとしては、「免疫磁気ビーズ法」、「微小流路デバイス法」、「ナノディテクター法」、「EPISPOT法」がある。まず、「免疫磁気ビーズ法」とは、腫瘍細胞表面に発現するEpCAM (Epithelial cell adhesion molecule: 上皮細胞接着分子) のモノクローナル抗体を結合させた磁気ビーズによってCTCを捕獲する方法である。この方法はCell Search・Veridex社が開発したため「セルサーチ法」と呼ばれることが多い(以下「セルサーチ法」<sup>9)</sup>)。次に、「微小流路デバイス法」とは、MEMS (MEMS : micro electro mechanical Systems “電気で駆動する小さな機械の総称”) 技術などの微細加工技術を利用して微小流路を作成し、微小流路に抗体結合ビーズを配置してCTCを捕獲する方法である。「ナノディテクター法」とは、抗体を結合させた針を静脈に注射し、生体内のCTCを直接捕獲する方法である。最後に「EPISPOT (Epithelial Immunospot : 上皮免疫スポット) 法」とは、培養プレート上のサイトケラチン抗体で細胞を捕獲する方法である。

上記で紹介した検出法にはそれぞれ長所・短所(課題)があるが、この中で特に有用とされてきた検出法は「セルサーチ法」である。「セルサーチ法」は従来のCTC検

出法の中で唯一アメリカ食品医薬品局(FDA)の認可を受けており、転移性乳がん、前立腺がん、大腸がんなどの治療効果の判定や予後の予測に実際に使用されている。しかし、この「セルサーチ法」にも多くの課題が残る。

先ほど、「セルサーチ法」とは腫瘍細胞表面に発現するEpCAMのモノクローナル抗体を結合させた磁気ビーズによってCTCを捕獲する方法であると簡単に説明したが、このEpCAM抗原依存的事であることがセルサーチ法の最大の問題点である。悪性腫瘍は上皮細胞由来の癌腫と非上皮細胞由来の肉腫に大別されるが、その大半は上皮細胞由来の癌腫であるため、上皮細胞表面に発現する糖蛋白の一種であるEpCAMを有する。つまり、EpCAMを標的抗原とすることで血中の悪性腫瘍細胞であるCTCを検出することができる。しかし、CTCの多くは浸潤、転移の過程で上皮細胞の特性である細胞極性や周囲細胞との細胞接着機能を失い、遊走・浸潤能を得て、より運動性の高い間葉系細胞様の細胞に変化することが知られている(EMT : Epithelial-Mesenchymal Transtion: 上皮間葉転移)。つまり、EMTをおこしたCTCにおいては、EpCAMの発現が低下するため、「セルサーチ法」では検出されない可能性が高い。また、EpCAM依存的事ということは、転移能を既に失っている死んだCTCについても、EpCAMが発現されていれば検出されてしまうため、CTCの生死を区別することができないという欠点もある。

そこで次の項では、EpCAM非依存的事であり、転移能を持つ生きたCTCのみを可視化することに成功した新たなCTC検出法である「テロメスキャン®法」について紹介したい。

表2 各種CTC検出方法の特徴

原理	検出方法	長所	問題点
抗体	免疫磁気ビーズ	・臨床データが豊富	・抗原依存的事(死んだCTCも検出、抗原非発現CTC検出不可)
	(セルサーチ法)	・タンパク質マーカー・遺伝子の増幅や変異の解析が可能	・低コスト化
	微小流路デバイス	・検出感度高い	・低コスト化
	ナノディテクター	・採血量に依存しない	・侵襲性高い
	EPISPOT	・生きたCTCから放出されたタンパク質の検出	・CTCそのものをみていない
電荷	DEP-FFF	・複数の抗体を同時検出可能	・製品化されていない
		・細胞集団から1細胞を単離・分離可能	・CTC濃縮工程が必要 ・低コスト化
サイズ	サイズ選択性フィルター ISET	・CTCの培養が可能	・低コスト化

### テロメスキャン法

「テロメスキャン®法」<sup>11)</sup>では、遺伝子組み換え5型アデノウイルス“テロメスキャン®”を用いてCTCを検出する。この“テロメスキャン®”は、アデノウイルス(Ad)の自己増殖に必須であるE1遺伝子を腫瘍特異的プロモーターであるヒトテロメラーゼhuman telomerase reverse transcriptase (hTERT) プロモーターでドライブするとともに、green fluorescence protein (GFP) 発現カセットをE3遺伝子欠損領域に挿入したものである<sup>4,5)</sup>。

ここで、“テロメラーゼ”とは“テロメア”と呼ばれる染色体の両末端を構成するDNA部分を修復する酵素のことである。正常細胞ではテロメアは細胞分裂を繰り返すたびに短くなり、いずれテロメアがなくなると細胞は分裂をやめ、細胞老化の状態になるか死を迎える。しか

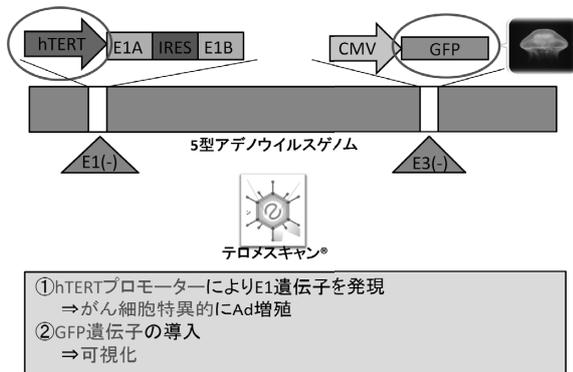
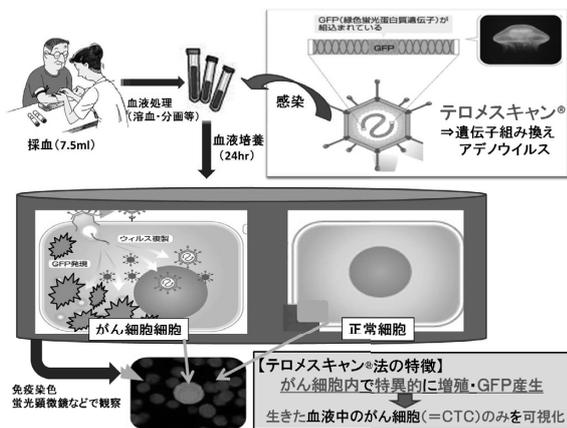


図2 テロメスキャンの遺伝子

し、腫瘍細胞はこのテロメアを修復するテロメラーゼという酵素を持つため、いくら分裂してもテロメアが短くならず、無限に分裂・増殖を繰り返す。ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) の陽性率は、がんの種類によって若干の違いはあるものの、平均して85%以上である<sup>12)</sup>。(正常細胞においては生殖細胞などを除いてほとんど発現していない。)

つまり、採取した血液にテロメスキャン<sup>®</sup>を感染させると、テロメスキャン<sup>®</sup>のゲノムがhTERTを発現する腫瘍細胞内で特異的に増幅し、GFPを発現させ、腫瘍細胞を可視化する。したがって、転移能を持つ血液中の生きたCTCのみを可視化することができるのである。

図3 テロメスキャン法の概要  
(Oncolys Biopharmaホームページより引用)

### 今後の課題

早期がん診断及び予後の予測に「テロメスキャン<sup>®</sup>法」によるCTC検査が非常に有用であるということが示唆されたが多くの課題も残る。

まず、「テロメスキャン<sup>®</sup>法」に関する主な課題としては3つある。

1つ目は、感染・培養施設の普及である。「テロメスキャン<sup>®</sup>法」では、採血後、赤血球の溶血や、白血球画分の調製を行うなど一連の処理を施した後、テロメスキャン<sup>®</sup>を感染させて培養する必要がある。したがって、それらの操作を行うことのできる施設が必要不可欠である。

2つ目は、選択性・特異性の向上である。「テロメスキャン<sup>®</sup>法」はAdの自己増殖に必須であるE1遺伝子を腫瘍特異のプロモーターであるhTERTプロモーターでドライブしているため、原理的には腫瘍細胞内では増殖せず、検出レベルまでGFPは産生されない。しかし、CTCは末梢血中に極微量しか存在しないことから、その検出感度が非常に重要である。つまり、正常細胞に感染する確率をできるだけ減らす工夫を行うことが検出感度の向上につながる。実際、テロメスキャン<sup>®</sup>(遺伝子組み換え5型Ad)のファイバーノブを正常細胞へ感染しにくいAdのファイバーノブへ置き換えるなどの改良も現在行われている<sup>13)</sup>。

3つ目は、CTC回収後の癌細胞種解析方法の開発である。現在、CTC検出後は、検出されたCTCの解析を行うことで、腫瘍細胞の特性解析や原発巣の同定につながるとして期待されており、通常、解析方法としては遺伝子解析が行われる。しかし、抗原抗体反応などを利用したCTC検出法と異なり、「テロメスキャン<sup>®</sup>法」ではCTC内でAdのゲノムが増幅されているため、CTC本来の遺伝子との分離が難しい。したがって、他の癌細胞種解析方法を開発する必要がある。

次に、CTC検出の臨床応用に関する課題として、CTC検出後の対応がある。

CTCの測定を行う段階では原発巣などのがんは画像診断機器などで確認できないレベルの大きさなので、がんの標準療法である手術療法・放射線療法・化学療法はいずれも適応とならない。その他のがん治療方法としては、がん細胞の増殖を抑える「がん抑制遺伝子」などをがん細胞に送り込む「遺伝子治療」も中国では承認されているが([例] ゲンディシン<sup>®</sup>: p53がん抑制遺伝子導入薬<sup>14)</sup>)、体内に入れるベクターにアデノウイルスなどを使うので、未病の患者に使用するには抵抗がある。そこで、現段階では、免疫療法がCTC検出後の治療法の候補として挙がっている。しかし、免疫療法の効果は元々患者のもつ免疫力に左右されることが多く、治療効果の個人差が大きい。また、血液がん患者・自己免疫疾患併発患者などに関しては病態を悪化させるため免疫療法は行えない。つまり、CTC検出後の治療法の確立が今後の大きな課題だと考える。

## 引用文献

- 1 厚生労働省, 平成27年我が国の人口動態(平成25年までの動向), 15-20.
- 2 Tearney G. J., et al., Science 1997, 276, 2037-2039.
- 3 MacDonald S. L., et al., Eur. J. Radiol. 2003, 45, 18-30.
- 4 Umeoka T., et al., Cancer Research 2004, 64, 6259-6265.
- 5 Kishimoto H., et al., Nature Medicine 2006, 12, 1213-1219.
- 6 佐藤俊彦, がん消滅-「見えないがん」を見つけて叩く! (現代書林) 2013, 22-29.
- 7 Ashworth T. R., Med. J. Australia 1969, 14, 146-147.
- 8 Racila E., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95, 4589-4594.
- 9 Cristofanilli M., et al., N. Eng. J. Med. 2004, 351, 781-791.
- 10 Circulating Tumor Cells information site ([http://www.ctc-lab.info/ctc2/ctc\\_detection\\_tech.html](http://www.ctc-lab.info/ctc2/ctc_detection_tech.html))
- 11 Oncolys Biopharma HP (<http://www.oncolys.com/jp/pipeline/obp-401.html>)
- 12 Shay J. W., et al., Eur. J. Cance 1997, 33, 787-791.
- 13 Sakurai F., et al., YAKUGAKU ZASSHI 2013, 133, 291-296.
- 14 Pearson S., et al., Nature Biotechnology 2004, 22, 3-4.