(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6693966号
(P6693966)
(45)発行日　令和2年5月13日(2020.5.13)　(24)登録日　令和2年4月20日(2020.4.20)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 5/09	(2010.01)	C12N	5/09	ZNA
C12Q 1/6886	(2018.01)	C12Q	1/6886	Z
G01N 33/48	(2006.01)	G01N	33/48	M
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	Y

請求項の数 5　(全 74 頁)

(21)出願番号　特願2017-538319(P2017-538319)
(86)(22)出願日　平成28年1月21日(2016.1.21)
(65)公表番号　特表2018-504115(P2018-504115A)
(43)公表日　平成30年2月15日(2018.2.15)
(86)国際出願番号　PCT/SG2016/050027
(87)国際公開番号　WO2016/118086
(87)国際公開日　平成28年7月28日(2016.7.28)
審査請求日　平成29年11月17日(2017.11.17)
(31)優先権主張番号　10201500471Q
(32)優先日　平成27年1月21日(2015.1.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
シンガポール(SG)
(31)優先権主張番号　10201500472R
(32)優先日　平成27年1月21日(2015.1.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
シンガポール(SG)

(73)特許権者　508305029
エージェンシー　フォー　サイエンス，テクノロジー　アンド　リサーチ
シンガポール共和国，１３８６３２　シンガポール　フュージョノポリス　ウェイ　１　コンネクシス　ノース　タワー　＃２Ｏ－１Ｏ
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】サイズに基づいて希少細胞を回収するためのカラムベースのデバイスおよび方法ならびにその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

以下の特徴：

（ｉ）大腸がん患者に由来する腫瘍の血管に由来しかつ大腸がん患者の血液から単離された内皮細胞であること；

（ii）各細胞が少なくとも2つの明らかに別個の核を有すること；

（iii）各細胞が約10μｍよりも大きい長軸を有すること；

（iv）内皮細胞遺伝子またはタンパク質の発現；

（v）白血球に特異的な遺伝子またはタンパク質の非発現；および

（vi）巨核球または血小板に特異的な遺伝子またはタンパク質の非発現；

を有する、単離された細胞集団。

【請求項２】

前記内皮細胞遺伝子が、PECAM1、VWF、およびCDH5からなる群より選択される；ならびに白血球および巨核球もしくは血小板に特異的な前記遺伝子が、PTPRC、ITGA2B、およびGP1BAからなる群より選択される、請求項1に記載の単離された細胞集団。

【請求項３】

対象における大腸がんを検出する方法であって、該対象からの試料を請求項1または2に記載の単離された細胞集団の存在に関して分析する工程を含み、該単離された細胞集団の存在によって該対象が大腸がんを有することが示される、前記方法。

【請求項４】

大腸がん患者の治療に対する応答性をモニタリングおよび／または予測する方法であって、治療後に該患者から得た試料を、請求項1または2に記載の単離された細胞集団の数の決定に関して分析する工程を含み、該単離された細胞集団の数が、治療前に該患者から得たベースライン試料中の単離された細胞集団の数と比べて減少していることによって、該患者が該治療に対して陽性に応答していることが示される、前記方法。

【請求項５】

大腸がん患者の治療に対する応答性を予測する方法であって、治療前に該大腸がん患者から得た試料を、請求項1または2に記載の単離された細胞集団の数の決定に関して分析する工程を含み、該単離された細胞集団の数が、該治療に対して陽性に応答した患者または患者群から治療前に得た試料中の単離された細胞集団の数と比べて等しいまたは多いことによって、該大腸がん患者が該治療に対して陽性に応答することが示され、該単離された細胞集団の数が、該治療に対して陽性に応答した患者または患者群から治療前に得た試料中の単離された細胞集団の数と比べて少ないことによって、該大腸がん患者が該治療に対して陰性に応答することが示される、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、いずれも2015年1月21日に出願されたシンガポール特許仮出願第10201500471Q号および第10201500472R号の優先権の恩典を主張し、これらの内容は、あらゆる目的のために参照により全体として本明細書に組み入れられる。

【０００２】

発明の分野

本発明は、対象細胞（特に希少細胞）を回収するためのデバイスおよび方法に関する。本発明はまた、開示されるデバイスおよび方法を使用して回収された細胞ならびにがんの診断および予後診断のためのバイオマーカーとしてのそれらの細胞の使用に関する。

【背景技術】

【０００３】

発明の背景

がんなどの疾患状態の正確な診断のために、希少細胞（たとえば疾患細胞）の検出および回収がますます重要になっている。がんは世界で第二位の死因であり、2012年には820万人の死を占めている。がん死亡率は、早期に検出され、治療されるならば、有意に下げることができる。しかし、がんの信頼しうる早期検出方法は、主として、内視鏡検査または放射性スキャンの使用を伴い、それらは高額であり、一定の健康リスクを患者に課す。

【０００４】

細胞の単離および検出に現在利用可能なデバイスの多くは、（たとえばフィルタシーブを使用して）細胞を捕捉することのみに焦点を置き、捕捉した細胞を回収することはない。これは、捕捉した細胞のその後の分析を、たとえば免疫組織化学染色を使用するシーブ上での特性決定に限定する。そのようなデバイスを使用すると、単一の対象細胞に対するより複雑な分析（たとえばDNA突然変異分析または遺伝子発現分析）は実行不可能である。希少細胞の単離に現在利用可能なデバイスおよび方法は、フィルタに貼り付いた細胞を剥がすためのさらなる工程（レーザダイセクション顕微鏡法などの厄介な技術を使用する）を要するという欠点を抱えている。事実、利用可能な精密濾過デバイスを使用して単離された希少細胞は、フィルタまたはデバイスの他の部品に付着しやすく、回収効率に対してマイナスの影響を及ぼしたり、下流側での分析のための任意の細胞の回収を妨げることさえある。

【０００５】

したがって、上記の欠点のうちの1つまたは複数を解消または少なくとも改善する、細胞（特に希少細胞）を効率的に捕捉および回収するためのデバイスおよび方法を提供する必要がある。下流側での処置のために希少細胞を容易かつ効率的に回収することができる

よう、希少細胞がデバイスの部品およびフィルタに付着しないような方法、材料および／またはデバイス構成を使用して、単離された希少細胞の回収の効率を最適化する必要がある。

【０００６】

がんの早期検出のための、より非侵襲的なスクリーニング検査法を提供する必要がある。

【発明の概要】

【０００７】

第1の局面においては、少なくとも1つのカラムを含む、試料から細胞を捕捉および回収するための装置であって、カラムが、

（i）内部チャンバを画定する内壁であって、カラムの第一端にある、試料を受けるための入口開口部と、カラムの第二端にある出口開口部とを内部チャンバが有する、内壁；

（ii）内部チャンバ内でカラムの第二端に隣接して配置された、有孔プラグ；

（iii）第一端における開口部および第二端における開口部を有するスリーブインサートであって、第二端で細くなり、その第二端が有孔プラグに隣接する状態で内部チャンバ内に配置されたチャネルを含む、スリーブインサート；ならびに

（iv）スリーブインサート内に収容された濾過手段であって、2つの封止手段の間に挟まれたシーブを含む、濾過手段；

を含む、装置が提供される。

【０００８】

第2の局面においては、

（a）本明細書に記載される装置の入口開口部に試料を導入して、試料が装置のスリーブインサートおよび濾過手段を通って流れることを可能にする工程；および

（b）装置の濾過手段内のシーブの表面に保持された残留物を捕集する工程；

を含む、試料から細胞を捕捉および回収する方法が提供される。

【０００９】

第3の局面においては、以下の特徴：

（i）腫瘍に由来しかつ血液から単離された内皮細胞であること；

（ii）各細胞が少なくとも2つの明らかに別個の核を有すること；

（iii）各細胞が約10μｍよりも大きい長軸を有すること；

（iv）内皮細胞遺伝子またはタンパク質の発現；

（v）白血球特異的遺伝子またはタンパク質の非発現；および

（vi）巨核球または血小板特異的遺伝子またはタンパク質の非発現；

を有する、単離された細胞集団が提供される。

【００１０】

第4の局面においては、

（a）本明細書に記載される装置または本明細書に記載される方法を使用して試料から細胞を捕捉および回収する工程；

を含む、対象の試料中の本明細書に記載される単離された細胞集団を検出する方法が提供される。

【００１１】

1つの態様において、第4の局面の方法はさらに、

（b）工程（a）からの細胞を、検出可能な標識に結合した少なくとも1つの抗体と接触させて、細胞上に発現した1つまたは複数の標的バイオマーカーへの抗体の結合を可能にする工程；

（c）結合していない抗体を試料から除去する工程；ならびに

（d）単離された細胞集団を検出するために、抗体に結合した検出可能な標識を検出および分析する工程；

を含む。

【００１２】

別の態様において、第4の局面の方法はさらに、
（b）工程（a）からの細胞を溶解させる工程；
（c）工程（b）からの溶解させた細胞試料を、標的RNA領域に対する、第一のプライマー対のリバースプライマーおよび逆転写酵素と接触させて、RNAのcDNAへの逆転写を生じさせる工程；
（d）その後、工程（c）からの試料を、
（i）標的cDNA領域に対する、第一のプライマー対のフォワードプライマー、
（ii）標的DNA領域に対する、第二のプライマー対のリバースプライマーおよびフォワードプライマー、および
（iii）DNAポリメラーゼ
と接触させて、前増幅工程において標的cDNA領域および標的DNA領域を同時に増幅させる工程；および
（e）増幅された標的cDNA領域および／または増幅された標的DNA領域を分析する工程；
を含む。

【００１３】

1つの態様において、第4の局面の方法はさらに、工程（c）におけるリバースプライマーまたは工程（d）（i）におけるフォワードプライマーおよび増幅された標的cDNA領域内に結合するネステッドプライマーを使用して、工程（d）からの試料をセミネステッドPCRに供する工程を含む。

【００１４】

さらに別の態様において、第4の局面の方法はさらに、増幅された標的DNA領域内に結合するネステッドプライマー対を使用して、工程（d）からの試料をネステッドPCRに供する工程を含む。

【００１５】

第5の局面においては、
（a）試料からの細胞を、検出可能な標識に結合した少なくとも1つの抗体と接触させて、細胞上に発現した1つまたは複数の標的バイオマーカーへの抗体の結合を可能にする工程；
（b）結合していない抗体を試料から除去する工程；ならびに
（c）単離された細胞集団を検出するために、抗体に結合した検出可能な標識を検出および分析する工程；
を含む、対象の試料中の第3の局面の単離された細胞集団を検出する方法が提供される。

【００１６】

第6の局面においては、
（a）試料中に存在する細胞を溶解させる工程；
（b）工程（a）からの溶解させた細胞試料を、標的RNA領域に対する、第一のプライマー対のリバースプライマーおよび逆転写酵素と接触させて、RNAのcDNAへの逆転写を生じさせる工程；
（c）その後、工程（b）からの試料を、
（i）標的cDNA領域に対する、第一のプライマー対のフォワードプライマー、
（ii）標的DNA領域に対する、第二のプライマー対のリバースプライマーおよびフォワードプライマー、および
（iii）DNAポリメラーゼ
と接触させて、前増幅工程において標的cDNA領域および標的DNA領域を同時に増幅させる工程；および
（d）増幅された標的cDNA領域および／または増幅された標的DNA領域を分析する工程；
を含む、対象の試料中の第3の局面の単離された細胞集団を検出する方法が提供される。

【００１７】

1つの態様において、第6の局面の方法はさらに、工程（b）におけるリバースプライマーまたは工程（c）（i）におけるフォワードプライマーおよび増幅された標的cDNA領域内

に結合するネステッドプライマーを使用して、工程（c）からの試料をセミネステッドPCRに供する工程を含む。

【００１８】

さらに別の態様において、第6の局面の方法はさらに、増幅された標的DNA領域内に結合するネステッドプライマー対を使用して、工程（c）からの試料をネステッドPCRに供する工程を含む。

【００１９】

第7の局面においては、対象におけるがんを診断する方法であって、該対象からの試料を本明細書に記載される単離された細胞集団の存在に関して分析する工程を含み、該単離された細胞集団の存在によって該対象ががんを有することが示される、方法が提供される。

【００２０】

第8の局面においては、がん患者の治療に対する応答性をモニタリングおよび／または予測する方法であって、治療後に該患者から得た試料を本明細書に記載される単離された細胞集団の数の決定に関して分析する工程を含み、該単離された細胞集団の数が、治療前に該患者から得たベースライン試料中の単離された細胞集団の数と比べて減少していることによって、患者が治療に対して陽性に応答していることが示される、方法が提供される。

【００２１】

第9の局面においては、がん患者の治療に対する応答性を予測する方法であって、治療前に該がん患者から得た試料を本明細書に記載される単離された細胞集団の数の決定に関して分析する工程を含み、該単離された細胞集団の数が、治療に対して陽性に応答した患者または患者群から治療前に得た試料中の単離された細胞集団の数と比べて等しいまたは多いことによって、該がん患者が治療に対して陽性に応答することが示され、該単離された細胞集団の数が、治療に対して陽性に応答した患者または患者群から治療前に得た試料中の単離された細胞集団の数と比べて少ないことによって、該がん患者が治療に対して陰性に応答することが示される、方法が提供される。

【００２２】

第10の局面においては、対象における腫瘍の血管特性を分析する方法であって、該対象からの試料を本明細書に記載される単離された細胞集団の数の決定に関して分析する工程を含み、該単離された細胞集団の数がベースライン試料と比べて増加していることによって、該腫瘍がベースライン試料と比べて大きい血管を有することが示され、該単離された細胞集団の数がベースライン試料と比べて減少していることによって、該腫瘍がベースライン試料と比べて小さい血管を有することが示される、方法が提供される。

【００２３】

第11の局面においては、

（a）本明細書に記載される装置

を含む、第2、第4、第7、第8、第9または第10の局面の方法に使用するためのキットが提供される。

【００２４】

1つの態様において、第11の局面のキットはさらに、以下：

（b）1つまたは複数の細胞溶解バッファ；

（c）i．第4の局面の方法の工程（c）のリバースプライマー、

ii．第4の局面の方法の工程（d）（i）のフォワードプライマー、

iii．第4の局面の方法の工程（d）（ii）のプライマー対、および

iv．第4の局面の方法のネステッドプライマーおよびネステッドプライマー対

からなる群より選択されるプライマー；

（d）i．逆転写酵素、および第4の局面の方法の工程（c）における逆転写に適した1つまたは複数の反応バッファ、

ii．DNAポリメラーゼ、および第4の局面の方法の工程（d）における増幅または第4

の局面の方法のセミネステッドPCRもしくはネステッドPCRに適した1つまたは複数の反応バッファ、および
iii．dATP、dCTP、dGTP、およびdTTPまたはdUTPからなる群より選択される1つまたは複数の標識されたまたは標識されていないデオキシリボヌクレオチド
からなる群より選択される1つまたは複数の試薬；ならびに
（e）PAI-1、ビメンチン、FOXC1、ケラチン8、ケラチン18、ケラチン19、Ep-CAM、CD45、VWF、PECAM-1、CD146、CD41、CD34、PSMA、CD105、CD309、CD144、CD202B、およびアンジオポエチン2からなる群より選択されるタンパク質に特異的に結合することができる、検出可能な標識に結合されている抗体；ならびに任意で、検出可能な標識を検出するための手段；
のうちの1つまたは複数を含む。

【００２５】

第12の局面においては、以下：
（a）1つまたは複数の細胞溶解バッファ；
（b）i．第5の局面の方法の工程（b）のリバースプライマー、
ii．第5の局面の方法の工程（c）（i）のフォワードプライマー、
iii．第5の局面の方法の工程（c）（ii）のプライマー対、および
iv．第5の局面の方法のネステッドプライマーおよびネステッドプライマー対
からなる群より選択されるプライマー；
（c）i．逆転写酵素、および第5の局面の方法の工程（b）における逆転写に適した1つまたは複数の反応バッファ、
ii．DNAポリメラーゼ、および第5の局面の方法の工程（c）における増幅または第5の局面の方法のセミネステッドPCRもしくはネステッドPCRに適した1つまたは複数の反応バッファ、および
iii．dATP、dCTP、dGTP、およびdTTPまたはdUTPからなる群より選択される1つまたは複数の標識されたまたは標識されていないデオキシリボヌクレオチド
からなる群より選択される1つまたは複数の試薬；ならびに
（d）PAI-1、ビメンチン、FOXC1、ケラチン8、ケラチン18、ケラチン19、Ep-CAM、CD45、VWF、PECAM-1、CD146、CD41、CD34、PSMA、CD105、CD309、CD144、CD202B、およびアンジオポエチン2からなる群より選択されるタンパク質に特異的に結合することができる、本明細書に記載される検出可能な標識に結合されている抗体；ならびに任意で、検出可能な標識を検出するための手段；
のうちの1つまたは複数を含む、第5、第6、第7、第8、第9または第10の局面の方法に使用するためのキットが提供される。

【００２６】

別の態様において、第11または第12の局面のキットはさらに、本明細書に記載される方法を実施するための取扱説明書を含む。

[本発明1001]

少なくとも1つのカラムを含む、試料から細胞を捕捉および回収するための装置であって、該カラムが、
（i）内部チャンバを画定する内壁であって、該カラムの第一端にある、該試料を受けるための入口開口部と、該カラムの第二端にある出口開口部とを該内部チャンバが有する、内壁；
（ii）該内部チャンバ内で該カラムの第二端に隣接して配置された、有孔プラグ；
（iii）第一端における開口部および第二端における開口部を有するスリーブインサートであって、該第二端で細くなり、該第二端が該有孔プラグに隣接する状態で該内部チャンバ内に配置されたチャネルを含む、スリーブインサート；ならびに
（iv）該スリーブインサート内に収容された濾過手段であって、2つの封止手段の間に挟まれたシーブを含む、濾過手段；
を含む、前記装置。

[本発明1002]
1つのカラムを含む、本発明1001の装置。
[本発明1003]
2つ以上のカラムを含む、本発明1001の装置。
[本発明1004]
前記カラムの第二端が、該カラムを通過する前記試料の流量を制御するための1つまたは複数のポンプへの接続のために適合されている、前記本発明のいずれかの装置。
[本発明1005]
前記ポンプが、少なくとも約0.05mL/min、少なくとも約0.10mL/min、少なくとも約0.15mL/min、少なくとも約0.20mL/min、少なくとも約0.25mL/min、少なくとも約0.30mL/min、少なくとも約0.40mL/min、および少なくとも約0.50mL/minからなる群より選択される流量で前記試料を通過させるように適合されている、本発明1004の装置。
[本発明1006]
前記シーブが非細胞接着性材料を含む、前記本発明のいずれかの装置。
[本発明1007]
前記非細胞接着性材料が、ケイ素、二酸化ケイ素、窒化ケイ素、エポキシ系ネガ型フォトレジスト、およびセラミクスからなる群より選択される、本発明1006の装置。
[本発明1008]
前記エポキシ系ネガ型フォトレジストがSU-8を含む、本発明1007の装置。
[本発明1009]
前記シーブが、少なくとも約6μm、少なくとも約7μm、少なくとも約8μm、少なくとも約9μm、少なくとも約10μm、少なくとも約12μm、少なくとも約14μm、少なくとも約16μm、少なくとも約18μm、および少なくとも約20μmからなる群より選択される直径を有する複数の細孔を含む、前記本発明のいずれかの装置。
[本発明1010]
以下の工程を含む、試料から細胞を捕捉および回収する方法：
（a）本発明1001～1009のいずれかの装置の入口開口部に該試料を導入して、該試料が該装置のスリーブインサートおよび濾過手段を通って流れることを可能にする工程；ならびに
（b）該装置の濾過手段内のシーブの表面に保持された残留物を捕集する工程。
[本発明1011]
前記試料が生物学的流体を含む、本発明1010の方法。
[本発明1012]
前記生物学的流体が、全血、血清、血漿、脳脊髄液、リンパ液、嚢胞液、痰、便、胸水、粘液、腹水、および尿からなる群より選択される、本発明1011の方法。
[本発明1013]
前記試料が単一の細胞を含む、本発明1010～1012のいずれかの方法。
[本発明1014]
前記試料が複数の細胞を含む、本発明1010～1012のいずれかの方法。
[本発明1015]
前記単一の細胞が、被験がん細胞、被験腫瘍由来細胞、胚または胎児に由来する被験細胞、および病原生物に由来する細胞からなる群より選択される、本発明1013の方法。
[本発明1016]
前記複数の細胞のうちの少なくともいくつかが、被験がん細胞、被験腫瘍由来細胞、胚または胎児に由来する被験細胞、および病原生物に由来する細胞からなる群より選択される、本発明1014の方法。
[本発明1017]
前記複数の細胞のうちの2つ以上が細胞クラスターを形成している、本発明1014または1016の方法。
[本発明1018]

前記単一の細胞または前記複数の細胞のうちの少なくともいくつかが多核細胞である、本発明1013～1017のいずれかの方法。

[本発明1019]

前記試料が血液試料であり、該試料から捕捉および回収された細胞が少なくとも2つの明らかに別個の核を含む、本発明1010～1018のいずれかの方法。

[本発明1020]

前記細胞の長軸が少なくとも10μmである、本発明1019の方法。

[本発明1021]

前記細胞が、PECAM1、VWF、およびCDH5からなる群より選択される遺伝子を発現する、本発明1019または1020の方法。

[本発明1022]

前記細胞が、PTPRC、ITGA2B、およびGP1BAからなる群より選択される遺伝子を発現しない、本発明1019～1021のいずれかの方法。

[本発明1023]

工程（b）における残留物を捕集する工程が、ピペットを使用して残留物を回収する工程を含む、本発明1010～1022のいずれかの方法。

[本発明1024]

以下の特徴：

（i）腫瘍に由来しかつ血液から単離された内皮細胞であること；

（ii）各細胞が少なくとも2つの明らかに別個の核を有すること；

（iii）各細胞が約10μmよりも大きい長軸を有すること；

（iv）内皮細胞遺伝子またはタンパク質の発現；

（v）白血球に特異的な遺伝子またはタンパク質の非発現；および

（vi）巨核球または血小板に特異的な遺伝子またはタンパク質の非発現；

を有する、単離された細胞集団。

[本発明1025]

前記内皮細胞遺伝子が、PECAM1、VWF、およびCDH5からなる群より選択される、本発明1024の単離された細胞集団。

[本発明1026]

白血球および巨核球または血小板に特異的な前記遺伝子が、PTPRC、ITGA2B、およびGP1BAからなる群より選択される、本発明1024または1025の単離された細胞集団。

[本発明1027]

以下の工程を含む、対象の試料中の本発明1024～1026のいずれかの単離された細胞集団を検出する方法：

（a）本発明1001～1009のいずれかの装置または本発明1010～1023のいずれかの方法を使用して該試料から細胞を捕捉および回収する工程。

[本発明1028]

（b）工程（a）からの細胞を、検出可能な標識に結合した少なくとも1つの抗体と接触させて、該細胞上に発現した1つまたは複数の標的バイオマーカーへの該抗体の結合を可能にする工程；

（c）結合していない抗体を該試料から除去する工程；ならびに

（d）前記単離された細胞集団を検出するために、該抗体に結合した該検出可能な標識を検出および分析する工程；

をさらに含む、本発明1027の方法。

[本発明1029]

以下の工程を含む、対象の試料中の本発明1024～1026のいずれかの単離された細胞集団を検出する方法：

（a）該試料からの細胞を、検出可能な標識に結合した少なくとも1つの抗体と接触させて、該細胞上に発現した1つまたは複数の標的バイオマーカーへの該抗体の結合を可能にする工程；

（b）結合していない抗体を該試料から除去する工程；ならびに
（c）該単離された細胞集団を検出するために、該抗体に結合した該検出可能な標識を検出および分析する工程。
[本発明1030]
前記抗体が、PAI-1、ビメンチン、FOXC1、ケラチン8、ケラチン18、ケラチン19、Ep-CAM、CD45、VWF、PECAM-1、CD146、CD41、CD34、PSMA、CD105、CD309、CD144、CD202B、およびアンジオポエチン2からなる群より選択される標的バイオマーカーに特異的に結合することができる、本発明1028または1029の方法。
[本発明1031]
前記検出可能な標識が、蛍光基、放射性同位体、安定同位体、酵素基、化学発光基、およびビオチニル基からなる群より選択される、本発明1028～1030のいずれかの方法。
[本発明1032]
（b）工程（a）からの細胞を溶解させる工程；
（c）工程（b）からの溶解させた細胞試料を、標的RNA領域に対する、第一のプライマー対のリバースプライマーおよび逆転写酵素と接触させて、該RNAのcDNAへの逆転写を生じさせる工程；
（d）その後、工程（c）からの該試料を、
（i）標的cDNA領域に対する、該第一のプライマー対のフォワードプライマー、
（ii）標的DNA領域に対する、第二のプライマー対のリバースプライマーおよびフォワードプライマー、ならびに
（iii）DNAポリメラーゼ
と接触させて、前増幅工程において該標的cDNA領域および該標的DNA領域を同時に増幅させる工程；ならびに
（e）増幅された該標的cDNA領域および／または増幅された該標的DNA領域を分析する工程；
をさらに含む、本発明1027の方法。
[本発明1033]
以下の工程を含む、対象の試料中の本発明1024～1026のいずれかの単離された細胞集団を検出する方法：
（a）該試料中に存在する細胞を溶解させる工程；
（b）工程（a）からの溶解させた細胞試料を、標的RNA領域に対する、第一のプライマー対のリバースプライマーおよび逆転写酵素と接触させて、該RNAのcDNAへの逆転写を生じさせる工程；
（c）その後、工程（b）からの該試料を、
（i）標的cDNA領域に対する、該第一のプライマー対のフォワードプライマー、
（ii）標的DNA領域に対する、第二のプライマー対のリバースプライマーおよびフォワードプライマー、ならびに
（iii）DNAポリメラーゼ
と接触させて、前増幅工程において該標的cDNA領域および該標的DNA領域を同時に増幅させる工程；ならびに
（d）増幅された該標的cDNA領域および／または増幅された該標的DNA領域を分析する工程。
[本発明1034]
工程（c）におけるリバースプライマーまたは工程（d）（i）におけるフォワードプライマー、および増幅された前記標的cDNA領域内に結合するネステッドプライマーを使用して、工程（d）からの試料をセミネステッドPCRに供する工程をさらに含む、本発明1032の方法。
[本発明1035]
工程（b）におけるリバースプライマーまたは工程（c）（i）におけるフォワードプライマー、および増幅された前記標的cDNA領域内に結合するネステッドプライマーを使用し

て、工程（c）からの試料をセミネステッドPCRに供する工程をさらに含む、本発明1033の方法。

[本発明1036]

増幅された前記標的DNA領域内に結合するネステッドプライマー対を使用して、工程（d）からの試料をネステッドPCRに供する工程をさらに含む、本発明1032の方法。

[本発明1037]

増幅された前記標的DNA領域内に結合するネステッドプライマー対を使用して、工程（c）からの試料をネステッドPCRに供する工程をさらに含む、本発明1033の方法。

[本発明1038]

工程（c）および（d）が同じ反応混合物中で実施される、本発明1036の方法。

[本発明1039]

工程（b）および（c）が同じ反応混合物中で実施される、本発明1037の方法。

[本発明1040]

工程（e）における分析が、増幅された前記標的cDNAを遺伝子発現に関して分析することを含む、本発明1032、1034、1036および1038のいずれかの方法。

[本発明1041]

工程（d）における分析が、増幅された前記標的cDNAを遺伝子発現に関して分析することを含む、本発明1033、1035、1037および1039のいずれかの方法。

[本発明1042]

工程（e）における分析が、増幅された前記標的cDNAを突然変異に関して分析することを含む、本発明1032、1034、1036、1038および1040のいずれかの方法。

[本発明1043]

工程（d）における分析が、増幅された前記標的cDNAを突然変異に関して分析することを含む、本発明1033、1035、1037、1039および1041のいずれかの方法。

[本発明1044]

前記第一または第二のプライマー対が、（i）SEQ ID NO: 1とSEQ ID NO: 2；（ii）SEQ ID NO: 3とSEQ ID NO: 4；（iii）SEQ ID NO: 5とSEQ ID NO: 6；（iv）SEQ ID NO: 7とSEQ ID NO: 8；（v）SEQ ID NO: 9とSEQ ID NO: 10；（vi）SEQ ID NO: 11とSEQ ID NO: 12；（vii）SEQ ID NO: 13とSEQ ID NO: 14；（viii）SEQ ID NO: 15とSEQ ID NO: 16；（ix）SEQ ID NO: 17とSEQ ID NO: 18；（x）SEQ ID NO: 19とSEQ ID NO: 20；（xi）SEQ ID NO: 21とSEQ ID NO: 22；（xii）SEQ ID NO: 23とSEQ ID NO: 24；（xiii）SEQ ID NO: 25とSEQ ID NO: 26；（xiv）SEQ ID NO: 27とSEQ ID NO: 28；（xv）SEQ ID NO: 29とSEQ ID NO: 30；（xvi）SEQ ID NO: 31とSEQ ID NO: 32；（xvii）SEQ ID NO: 33とSEQ ID NO: 34；（xviii）SEQ ID NO: 52と53；および（xix）SEQ ID NO: 54と55からなる群より選択される、本発明1032～1043のいずれかの方法。

[本発明1045]

セミネステッドPCRまたはネステッドPCRのための前記プライマー対が、（i）SEQ ID NO: 35とSEQ ID NO: 2；（ii）SEQ ID NO: 3とSEQ ID NO: 36；（iii）SEQ ID NO: 5とSEQ ID NO: 37；（iv）SEQ ID NO: 38とSEQ ID NO: 8；（v）SEQ ID NO: 39とSEQ ID NO: 10；（vi）SEQ ID NO: 40とSEQ ID NO: 12；（vii）SEQ ID NO: 41とSEQ ID NO: 14；（viii）SEQ ID NO: 42とSEQ ID NO: 16；（ix）SEQ ID NO: 17とSEQ ID NO: 43；（x）SEQ ID NO: 44とSEQ ID NO: 20；（xi）SEQ ID NO: 45とSEQ ID NO: 22；（xii）SEQ ID NO: 46とSEQ ID NO: 24；（xiii）SEQ ID NO: 25とSEQ ID NO: 47；（xiv）SEQ ID NO: 27とSEQ ID NO: 48；（xv）SEQ ID NO: 49とSEQ ID NO: 30；（xvi）SEQ ID NO: 31とSEQ ID NO: 50；（xvii）SEQ ID NO: 51とSEQ ID NO: 34；（xviii）SEQ ID NO: 56とSEQ ID NO: 57；および（xix）SEQ ID NO: 58とSEQ ID NO: 55からなる群より選択される、本発明1032～1044のいずれかの方法。

[本発明1046]

対象におけるがんを診断する方法であって、該対象からの試料を本発明1024～1026のいずれかの単離された細胞集団の存在に関して分析する工程を含み、該単離された細胞集団

の存在によって該対象ががんを有することが示される、前記方法。
[本発明1047]
前記がんが、がん腫、肉腫、リンパ腫、胚細胞腫瘍、芽腫、結腸がん、直腸がん、乳がん、前立腺がん、腎細胞がん、移行上皮細胞がん、肺がん、胆管がん、脳腫瘍、非小細胞肺がん、膵臓がん、胃がん、膀胱がん、食道がん、中皮腫、メラノーマ、甲状腺がん、頭頸部がん、骨肉腫、肝細胞がん、原発不明がん、卵巣がん、子宮内膜がん、グリア芽腫、神経芽細胞腫、ホジキンリンパ腫、および非ホジキンリンパ腫からなる群より選択される、本発明1046の方法。
[本発明1048]
前記がんが、浸潤がんおよび／または転移がんである、本発明1046または1047の方法。
[本発明1049]
前記がんが、ステージIがん、ステージIIがん、ステージIIIがん、またはステージIVがんである、本発明1046または1047の方法。
[本発明1050]
前記がんが早期がんである、本発明1046または1047の方法。
[本発明1051]
がん患者の治療に対する応答性をモニタリングおよび／または予測する方法であって、治療後に該患者から得た試料を、本発明1024～1026のいずれかの単離された細胞集団の数の決定に関して分析する工程を含み、該単離された細胞集団の数が、治療前に該患者から得たベースライン試料中の単離された細胞集団の数と比べて減少していることによって、該患者が該治療に対して陽性に応答していることが示される、前記方法。
[本発明1052]
がん患者の治療に対する応答性を予測する方法であって、治療前に該がん患者から得た試料を、本発明1024～1026のいずれかの単離された細胞集団の数の決定に関して分析する工程を含み、該単離された細胞集団の数が、該治療に対して陽性に応答した患者または患者群から治療前に得た試料中の単離された細胞集団の数と比べて等しいまたは多いことによって、該がん患者が該治療に対して陽性に応答することが示され、該単離された細胞集団の数が、該治療に対して陽性に応答した患者または患者群から治療前に得た試料中の単離された細胞集団の数と比べて少ないことによって、該がん患者が該治療に対して陰性に応答することが示される、前記方法。
[本発明1053]
対象における腫瘍の血管特性を分析する方法であって、該対象からの試料を、本発明1024～1026のいずれかの単離された細胞集団の数の決定に関して分析する工程を含み、該単離された細胞集団の数がベースライン試料と比べて増加していることによって、該腫瘍が該ベースライン試料と比べて大きい血管を有することが示され、該単離された細胞集団の数がベースライン試料と比べて減少していることによって、該腫瘍が該ベースライン試料と比べて小さい血管を有することが示される、前記方法。
[本発明1054]
（a）本発明1001～1009のいずれかの装置
を含む、本発明1010～1023、1027、1028、1030～1032、1034、1036、1038、1040、1042および1044～1053のいずれかの方法に使用するためのキット。
[本発明1055]
（b）1つまたは複数の細胞溶解バッファ；
（c）i．本発明1032、1034、1036、1038、1040、1042、1044および1045のいずれかの方法の工程（c）のリバースプライマー、
ii．本発明1032、1034、1036、1038、1040、1042、1044および1045のいずれかの方法の工程（d）（i）のフォワードプライマー、
iii．本発明1032、1034、1036、1038、1040、1042、1044および1045のいずれかの方法の工程（d）（ii）のプライマー対、
iv．本発明1032、1034、1036、1038、1040、1042、1044および1045のいずれかの方

法のネステッドプライマーおよびネステッドプライマー対
からなる群より選択されるプライマー；
（d）i．逆転写酵素、および本発明1032、1034、1036、1038、1040、1042、1044および1045のいずれかの方法の工程（c）における逆転写に適した1つまたは複数の反応バッファ、
ii．DNAポリメラーゼ、および本発明1032、1034、1036、1038、1040、1042、1044および1045のいずれかの方法の工程（d）における増幅または本発明1034、1036、1038、1040、1042、1044および1045のいずれかの方法のセミネステッドPCRもしくはネステッドPCRに適した1つまたは複数の反応バッファ、ならびに
iii．dATP、dCTP、dGTP、およびdTTPまたはdUTPからなる群より選択される1つまたは複数の標識されたまたは標識されていないデオキシリボヌクレオチド
からなる群より選択される1つまたは複数の試薬；ならびに
（e）PAI-1、ビメンチン、FOXC1、ケラチン8、ケラチン18、ケラチン19、Ep-CAM、CD45、VWF、PECAM-1、CD146、CD41、CD34、PSMA、CD105、CD309、CD144、CD202B、およびアンジオポエチン2からなる群より選択されるタンパク質に特異的に結合することができる、検出可能な標識に結合されている抗体；ならびに任意で、該検出可能な標識を検出するための手段；
のうちの1つまたは複数をさらに含む、本発明1054のキット。
[本発明1056]
（a）1つまたは複数の細胞溶解バッファ；
（b）i．本発明1033、1035、1037、1039、1041および1043～1045のいずれかの方法の工程（b）のリバースプライマー、
ii．本発明1033、1035、1037、1039、1041および1043～1045のいずれかの方法の工程（c）（i）のフォワードプライマー、
iii．本発明1033、1035、1037、1039、1041および1043～1045のいずれかの方法の工程（c）（ii）のプライマー対、ならびに
iv．本発明1033、1035、1037、1039、1041および1043～1045のいずれかの方法のネステッドプライマーおよびネステッドプライマー対
からなる群より選択されるプライマー；
（c）i．逆転写酵素、および本発明1033、1035、1037、1039、1041および1043～1045のいずれかの方法の工程（b）における逆転写に適した1つまたは複数の反応バッファ、
ii．DNAポリメラーゼ、および本発明1033、1035、1037、1039、1041および1043～1045のいずれかの方法の工程（d）における増幅または本発明1035、1037、1039、1041および1043～1045のいずれかの方法のセミネステッドPCRもしくはネステッドPCRに適した1つまたは複数の反応バッファ、ならびに
iii．dATP、dCTP、dGTP、およびdTTPまたはdUTPからなる群より選択される1つまたは複数の標識されたまたは標識されていないデオキシリボヌクレオチド
からなる群より選択される1つまたは複数の試薬；ならびに
（d）PAI-1、ビメンチン、FOXC1、ケラチン8、ケラチン18、ケラチン19、Ep-CAM、CD45、VWF、PECAM-1、CD146、CD41、CD34、PSMA、CD105、CD309、CD144、CD202B、およびアンジオポエチン2からなる群より選択されるタンパク質に特異的に結合することができる、検出可能な標識に結合されている抗体；ならびに任意で、該検出可能な標識を検出するための手段；
のうちの1つまたは複数を含む、本発明1029～1031および1033、1035、1037、1039、1041および1043～1053のいずれかの方法に使用するためのキット。
[本発明1057]
前記プライマーおよび／または試薬が、本発明1032～1045のいずれかの溶解、前増幅および増幅工程に適した組み合わせで予め混合されている、本発明1055または1056のキット。
[本発明1058]

前記プライマーが、遺伝子発現プロファイルまたは突然変異シグネチャの分析に適した組み合わせで予め混合されている、本発明1057のキット。

[本発明1059]

本発明1010～1023および1027～1053のいずれかの方法を実施するための取扱説明書をさらに含む、本発明1054～1058のいずれかのキット。

[本発明1060]

本発明1010～1023および1027～1053のいずれかの方法を実施するための1つまたは複数の反応バッファを含む1つまたは複数の容器を含む、本発明1054～1058のいずれかのキット。

【図面の簡単な説明】

【００２７】

本発明は、非限定的な実施例および添付図面と関連させて考察されるとき、詳細な説明を参照することにより、より良く理解されよう。

【００２８】

【図１－１】図1は、希少細胞の捕捉および回収のための、本明細書に記載されたデバイスの例を示す。（A）は、上端に入口を有し、下端に出口を有するインサートスリーブを示す。インサートスリーブは、細胞捕捉シーブをカラムの出口近くに確保する、細胞捕捉シーブのハウジングとして機能する。試料がインサートスリーブの入口から流入し、インサートスリーブの出口を通って流出する。（B）は、試料が中を流れるチャネルがインサートスリーブの下端で細くなる様子を示す。

【図１－２】（C）は、デバイスのカラム中のインサートスリーブ（または本明細書の中で互換可能に使用される「スリーブインサート」）と細胞捕捉シーブとのアセンブリを示す。まず、細胞捕捉シーブ（封止手段として働く2つのOリングの間に挟まれる）がインサートスリーブの出口近くでスロットの中に配置され、次いで、ロッドの形態の挿入ツール（図示せず）を使用してアセンブリ全体がカラムに挿入される。（D）は、本明細書に記載される方法でデバイスを使用するとき1つの例示的な形態において蠕動ポンプに接続されている2つの細胞捕捉および回収デバイスを示す。血液試料をデバイスに通して濾過した。（E）は、様々な孔径の細胞捕捉シーブを使用する、汚染性の白血球（WBC）および赤血球（RBC）の除去を示す。全血1mlをデバイスに通して濾過した。汚染性のWBCおよびRBCを回収し、カウントした（黒い棒）または、短時間、蠕動ポンプの流れを逆転させて（「バックフラッシュ」）、シーブに貼り付いた細胞を取り除いたのち、回収し、カウントした（白い棒）。除去倍率は以下のように計算した。WBCまたはRBCの除去倍率＝（全血中のWBCまたはRBC）／（精密濾液中のWBCまたはRBC）。（E）中の棒は、試験条件ごとに3つの異なるデバイスを用いた試験から得た平均値を表す。エラーバーは標準偏差を表す。（F）は、SW620のサイズ分布（淡いグレーの線）を示す（n＝50）。それぞれCoumans, F et al., 2013から報告されている大腸がん、前立腺がんおよび乳がんの患者から単離されたWBCおよび血中循環腫瘍細胞（CTC）の平均サイズ。（G）は、様々な細胞株でスパイクされた全血を使用したときのデバイスの回収効能を示す。1mlあたり20～50個の細胞を標識し、全血1mlまたは3ml中にスパイクした。各血液試料をデバイスに通し、標的細胞を回収し、96ウェルプレートに入れ、カウントした。回収効能は以下のように計算した。％回収効率＝（回収された細胞）×100／（スパイクされた細胞）。各ドットが独立実験に対応する。

【図２】異なる孔径（8μm、9μm、10μm）を有する細胞捕捉シーブを有する本明細書に記載された細胞捕捉および回収デバイスを使用したときの、捕捉効率に比較した回収効率を示す。（A）は、HCT116細胞を使用したときの結果を示す。独立した実験ごとに、30～50個のHCT116細胞を全血1ml中にスパイクし、回収した細胞を96ウェルプレートに入れ、カウントした。デバイス上に残った細胞の数を検査した。捕捉細胞数＝回収細胞数＋デバイス上に残った細胞の数。結果は、＞98％の効率でHCT116細胞を回収することができることを示す。捕捉効率＝（捕捉細胞数）×100％／スパイクされた細胞の数。回収効率＝（回収細胞数）×100％／捕捉細胞数。（B）は、RKO細胞を使用したときの結果を示す。捕捉

効率は、HCT116細胞と比べて、RKO細胞の場合、より低かった。しかし、捕捉されたRKO細胞の回収効率は、使用した細胞捕捉シーブのすべての孔径の場合で常に100％であった。（C）は、明視野合成画像（左上パネル）、ケイ素マイクロシーブの走査型電子顕微鏡写真（右上パネル）ならびに異なるフィルタ材料としてケイ素および窒化ケイ素を有するマイクロシーブの写真（下パネル）を示す。（D）は、2つの異なるフィルタ材料、ケイ素および窒化ケイ素が同様な細胞捕捉回収効率を提供したことを示す、異なるフィルタ材料を使用し、HepG2細胞で試験したときの細胞捕捉回収効率を示す。

【図３】本明細書に記載された精密濾過デバイスを使用する、腫瘍由来内皮細胞クラスター（TECC）の回収を示す。（A）は、ケイ素マイクロシーブ（挿入図、スケールバー＝10μm）をそれぞれが包囲する4つの精密濾過デバイスが流量制御のために蠕動ポンプに接続されている、本明細書に記載された精密濾過デバイスの例示的な構成を示す。（B）は、画像化、カウント、単一の細胞の単離および分析、細胞培養およびプールされた核酸抽出を含む様々な下流側用途のための精密濾過手順を示す。数字は各工程の処理時間（分単位）を示す。（B）に示す詳細な手順は以下のとおりである。全血試料（たとえば2ml）をシーブに通して8分間濾過し、20分間洗浄し、シーブ上で34分間染色した（合計62分間）。シーブ上での免疫蛍光法の詳細な手順は実施例3に記載されている。（C）は、ケイ素マイクロシーブの使用が、捕捉された細胞の効率的な回収を可能にすることを示す。下流側アッセイのために回収することができる（黒い棒）、マイクロシーブへの付着のせいで失われる（白い棒）、または単離処理中に失われる（グレーの棒）、マイクロシーブ上の捕捉細胞の割合（％）を示す、全血からのSW620細胞の捕捉効率。4つの独立実験の結果が示されている。（D）は、下流側の単一の細胞顕微操作のための回収効率および純度の最適化を示す。散布図は、様々な流量およびマイクロシーブ孔径を使用する実験を表す。黒い破線の長方形は、回収細胞の最適な下流側処理のための、＞90％回収効率および＞5×10^3個WBCの除去の標的区域を示す。データ点は、各条件下、3つの独立実験の平均±標準誤差である。

【図４】本明細書に記載されたデバイスを使用して捕捉および回収された細胞の可視化を示す。（A）は、大腸がん患者の血液から回収された細胞を、標準的な微分干渉コントラスト（DIC）を使用する倒立蛍光顕微鏡検査によって容易に可視化することができることを示す。大きな多核化細胞クラスターまたは微小塞栓が認められた。（B）は、臨床試料から回収された細胞クラスターを、それらの遺伝子発現およびゲノムDNA内容物に関して容易に顕微操作し、分析することができることを示す。この例においては、細胞クラスターを、CD45およびDAPIに関する免疫蛍光染色によって同定したのち、遺伝子発現およびゲノムDNA内容物の分析のために顕微操作した。

【図５】本明細書に記載されたscrmPCR法の原理証明を提供する。DLD-1およびRKO単一の細胞（大腸がん細胞株）を5μlの2×反応バッファ（CellDirectキット）中に顕微操作した。次いで、本明細書に記載されるようにscrmPCRを実施した。結果が（a）に示されている。TP53、KRASおよびBRAF遺伝子に属するゲノム領域を増幅した。PCR産物をサンガーシークエンシングに供し、（b）に示すように、両細胞株中で以前に特性決定されている既知のホットスポット突然変異を検出した。同時に、同じ細胞株からのいくつかの転写産物を増幅し、両細胞株中に可変性の遺伝子発現があることを示した。融解曲線ピーク温度および（c）に示すような単一ピークの存在によって遺伝子発現特異性を検証した。

【図６】TECCが上皮間葉転換（EMT）マーカーを発現するが、原発腫瘍突然変異または染色体異常を反映せず、したがって、TECCとCTCとが異なる実体であることを示す。（a）は、単一の細胞または単一TECCの場合の、本明細書に記載される例示的なscrmPCRワークフローを示す。（b）は、下流側scrmPCRのための単一チューブ中で顕微操作された既知の原発腫瘍突然変異を有する4人の大腸がん患者からの9つのTECCの画像を示す。（c）は、（b）に示すTECCならびに表記上皮および間葉マーカーならびにPTPRC（CD45）のための対照単一の細胞の遺伝子発現ヒートマップを示す。色が非存在（黒）から最大（淡いグレー）までを表す。NTC－無鋳型対照。（d）は、（b）および（c）に示す同じ単一TECC細胞に由来するホットスポット遺伝子配列のクロマトグラムを示す。対応する原発腫瘍および正常

な結腸組織（上パネル）を使用して遺伝子突然変異を比較した。TECCにおいてそのような突然変異は発見されず、そのようなTECCは以前に記載されている悪性CTCクラスターとは異なるため、TECCが腫瘍上皮に由来しないことを示すことに注目すること。（e）TECCアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション（aCGH）が、既知の染色体異常を有する代表的な大腸がん患者からの3つのTECCの画像を示す。（f）は、対応する正常組織および腫瘍組織を有する（e）に示されたTECCのaCGH分析を示す。（g）は、表記組織およびTECCに関する染色体7および8の分析を示す。線は、Affymetrix ChASソフトウェアを使用して計算された平滑化データを示す。

【図７】TECCがEMTマーカーを発現するが、正常な染色体構造を有することを示す。（A）は、異種性の間葉および上皮マーカー発現（矢印の点が目に見える染色を示す）を示す、CD45、ビメンチン（VIM）、pan-Keratin（CK）およびDAPIのための2つのTECCの代表的な四色免疫蛍光法を示す。（B）は、単一の細胞を使用するaCGH実験の場合の全ゲノム増幅（WGA）の影響を評価するための対照実験を示す。（C～E）は、それぞれ、（B）に示す正常組織DNAに類似した表記患者の単一TECCのaCGHを示す。（c～e）に示すように、TECCにおいて、染色体異常は発見されず、TECCが腫瘍上皮に由来しないことが示された。そのようなものとして、TECCは、以前に記載されている悪性CTCクラスターとは異なる。

【図８】TECCの特性決定を示す。（A）は、対照単一の細胞および14のTECC（N＝4名の患者）におけるscrmPCR遺伝子発現が、内皮細胞マーカーの存在を示すが、上皮細胞マーカーまたは白血球、赤血球、血小板／巨核球もしくは破骨細胞のマーカーの存在を示さないことを示す。（B）は、TECCの内皮細胞系列を確認する免疫蛍光試験の結果を示す。表記抗体で染色された代表的なTECCおよび各染色の内部対照。挿入中央パネル、CD41&CD42B^{+}血小板凝集塊。挿入右パネル、CD45^{+}白血球。（C）表は、表記免疫蛍光法で陽性または陰性のTECCカウントを示す（N＝68名の患者）。（D）TECCを正常な内皮細胞（NEC）と腫瘍内皮細胞（TEC）とに分類するために使用された実験手法。（E）NECとTECとの間で差次的に発現した遺伝子。NOISeによって計算された差次的発現のP_{NOI}確率。Log_2FC、log_2（倍率変化）。（F）TEC（赤いカラム）およびNEC（青いカラム）としてのTECCの分類を示す100％に積み上げたカラムチャート。左のカラムは観測確率を示し、右のカラムは、1000のランダムなシグネチャによって得られた平均確率を示す。**P＝0.003、効果量r＝0.46、正確確率二項検定。この実験は、TECCが実際に腫瘍由来であることを示す。（G）手術前および後での縦方向試料捕集戦略。（H）手術の0～24時間前および24～72時間後のCD31^{+}CD45^{-}TECCカウントを示すラダープロット。線は同じ患者からのデータを接続する。***P＝0.0006、効果量r＝0.54。TECCは腫瘍切除後すぐに消失するため、この実験は、TECCが腫瘍由来であるという仮定を裏づける。

【図９】TECCおよびCTCクラスターの細胞系マッピング（Aceto et al.）を示す。（a）は、上皮および間葉細胞系プロファイルを有する選択された乳がん細胞株ならびに原発内皮細胞が、上皮、間葉幹細胞および内皮細胞系のための陽性対照として使用されたことを示す。Cima I et al.に記載された方法を使用して細胞系をマッピングした。（b）は、Aceto et al.において報告されている、上皮由来の細胞クラスターの存在を示すCTCクラスターの細胞系推論を示す。（c）は、この研究で分析された単一TECCの細胞系推論が、TECCが内皮細胞であり、したがって、CTCクラスターとは異なることを示すことを示す。

【図１０】scrmPCRを使用するPSMA遺伝子の増幅および分析を示す。正常および腫瘍内皮細胞の標記試料ならびに標記された健常ドナー（D）またはCRC患者（P）の血液精密濾液に関するPSMA（FOLH1）遺伝子発現が示されている。F、女；M、男。

【図１１】TECC中に発現した腫瘍内皮マーカーを示す。さらなる腫瘍内皮マーカーが、正常、腫瘍組織およびTECC中で発現し、RNA-Seqデータから検出されている。PLXDC1、プレキシンドメイン含有1（腫瘍内皮マーカー3/7）；MMP2、マトリックスメタロペプチダーゼ2；NID1、ニドゲン1；MMP11、マトリックスメタロペプチダーゼ11；CLEC14A、Cタイプレクチンドメインファミリー14、メンバーA；POSTN、ペリオスチン；VWF、フォン・ヴィレブランド因子；ECSCR、内皮細胞表面発現走化性およびアポトーシス制御因子。

【図１２】TECCが大腸がん（CRC）患者において検出されるが、健常者においては検出さ

れないことを示す。（A）は、健常対照者（中央値＝0、N＝45）およびCRC患者（中央値＝4.5、N＝80）の場合のTECCSカウントを示す。***P＝7.31×10^{-15}、効果量r＝0.65。（B）大腸がんの治療進行中のTECCカウントの傾向。以下の別々のタイムポイントで独立して血液試料を捕集した。1）治療未経験、2）術前補助療法後、3）術後、4）補助療法後、および5）対症療法。ボックスは四分位数範囲（IQR）を示し、ボックスにかかる線は中央値を示し、破線は中央値のスプライン補間を示す。矢印は治療イベントを示す。N＝80のCRC症例、***p＝0.0002、効果量r＝0.41、ND、検出されず。（C）は、TECCカウントと患者および腫瘍特性との関連を示す（n＝80のCRC症例）。両側ウィルコクソン・マン・ホイットニーU検定、ボンフェローニ補正付き、**P＝0.0072、効果量r＝0.34、Δ（95％CI）＝-6（-13 ～ -1））。（D）治療未経験CRC患者と健常対照者とを比較するROC曲線（合計N＝89）。グレーの区域は、ブートストラップされた95％CIを表す。AUC（95％CI）＝0.930（0.880 ～ 0.980）、効果量r＝0.716。（E）治療未経験早期CRC患者（≦IIA）と健常対照者とを比較するROC曲線。AUC（95％CI）＝0.922（0.846 ～ 0.999）、効果量r＝0.706（合計N＝61）。（F）バリデーションセット。治療未経験CRC患者と健常対照者とを比較するROC曲線（合計N＝100）。AUC（95％CI）＝0.923（0.837 ～ 1）、効果量r＝0.706。（D）～（F）中、100％積み上げ棒グラフは、健常対照者およびCRC症例の両方の場合のTECC陽性（濃いグレー）およびTECC陰性（淡いグレー）試料の割合を示す。

【図１３】TECCカウントが炎症マーカーまたは他の変数と相関しないことを示す。（a～c）は、それぞれ、TECC数と、表記された腫瘍特性、患者特性および血液検査値との関連を示す。相関がドットプロットとして示され、ケンドールのτ係数およびその誘導P値を使用して計測されている。二値変数の比較がボックスプロットとして示され、両側正確確率ウィルコクソン・マン・ホイットニーU検定からのP値を使用して差が定量化されている。

【図１４－１】図14は、図9に示すデータを生成するために使用された細胞系推論ワークフローを示す。（a）は細胞系推論ワークフローのフローチャートである。

【図１４－２】（b）は、代表的な細胞系の最高の特異性指数を有する選択された遺伝子が、BioGPS（Wu et al.）を使用して特異性に関して検証されることを示す。（c）は、上皮細胞を指すためにCTC研究において一般に使用されるマーカーの遺伝子発現レベルを示す。内皮細胞系におけるKRT18発現および造血細胞におけるEPCAM発現に注目すること。

【図１５】細胞系推論アルゴリズムバリデーションを示す。（A）は、ランダムな富化の場合で各試料（行）および各細胞系（列）に関して富化された遺伝子の数を比較するヒートマップを示す。試料は、選択された細胞系からの公表されたRNA-Seqデータである。各色付きのボックスが、それぞれのフィッシャーの正確確率検定の正規化オッズ比を0（黒）から1（淡いグレー）で表す。（B）組織全体または複合細胞混合物、たとえばPBMC、皮膚および脳データセットを使用したことを除き（A）と同じである。

【発明を実施するための形態】

【００２９】

本発明の詳細な説明

本開示は、捕捉された細胞の容易な下流側操作および分析を可能にする、細胞、特に希少細胞を捕捉および回収するための装置を提供する。したがって、第1の局面においては、少なくとも1つのカラムを含む、試料から細胞を捕捉および回収するための装置であって、カラムが、

（i）内部チャンバを画定する内壁であって、カラムの第一端にある、試料を受けるための入口開口部と、カラムの第二端にある出口開口部とを内部チャンバが有する、内壁；

（ii）内部チャンバ内でカラムの第二端に隣接して配置された、有孔プラグ；

（iii）第一端における開口部および第二端における開口部を有するスリーブインサートであって、第二端で細くなり、その第二端が有孔プラグに隣接する状態で内部チャンバ内に配置されたチャネルを含む、スリーブインサート；ならびに

（iv）スリーブインサート内に収容された濾過手段であって、2つの封止手段の間に挟まれたシーブを含む、濾過手段；

を含む、装置が提供される。

【００３０】
用語「装置」および「デバイス」は本開示の中で互換可能に使用される。
【００３１】
本明細書の中で使用される用語「捕捉」とは、対象細胞を捕らえることをいう。本明細書の中で使用される用語「回収」とは、捕捉された細胞を取り戻す、または捕集することをいう。たとえば、回収は、ピペットを使用して細胞を剥がすことにより、捕捉シーブから細胞を取り戻す、または捕集することを含み得る。
【００３２】
本明細書の中で使用される用語「単離」とは、試料から対象細胞を分離して、分離された細胞が、試料中に存在する他の成分を実質的または本質的に有しないようにすることをいう。
【００３３】
本明細書の中で使用される用語「精密濾過」とは、試料を特殊な孔径の濾過手段に通して、懸濁した粒子（たとえば細胞、微生物など）を試料から単離する物理的濾過プロセスをいう。精密濾過に用いられる一般的な孔径はミクロン単位（すなわちマイクロメートルまたはμｍ）である。
【００３４】
本明細書の中で使用される用語「試料」とは、生物学的試料、すなわち、細胞などの少なくともいくつかの生物学的物質を含む試料をいう。本開示の生物学的試料は、固体組織試料、たとえば骨髄ならびに液体試料、たとえば全血、血清、血漿、脳脊髄液、中枢脊髄液、リンパ液、嚢胞液、痰、便、胸水、粘液、胸水、腹水、羊水、腹膜水、唾液、気管支洗浄液および尿を含む、TECCを含むことが疑われる任意の試料であり得る。いくつかの態様において、生物学的試料は血液試料である。当業者によって理解されるように、生物学的試料は、血液の任意の分画または成分、非限定的にはT細胞、単球、好中球、赤血球、血小板および微小胞、たとえばエキソソームおよびエキソソーム様小胞を含むことができる。
【００３５】
本開示の生物学的試料は、哺乳動物、たとえばヒト、霊長類（たとえばサル、チンパンジー、オランウータンおよびゴリラ）、ネコ、イヌ、ウサギ、家畜（たとえばウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ）およびげっ歯類（たとえばマウス、ラット、ハムスターおよびモルモット）を含む任意の生物から採取され得る。
【００３６】
本明細書の中で使用されるように、「生物」、「個体」、「対象」または「患者」は同義語として互換可能に使用される。
【００３７】
生物は、健常な生物であってもよいし、有疾患生物であってもよい。疾患状態は任意の疾患を含み得る。いくつかの態様において、疾患はがん、糖尿病、メタボリックシンドロームまたは自己免疫障害である。いくつかの態様において、健常な生物または有疾患生物はヒトである。いくつかの態様において、健常な生物または有疾患生物は、がんなどの疾患状態のための動物モデルである。当業者は、様々な疾患状態のための動物モデルが当技術分野において周知であることを理解する。
【００３８】
有疾患生物は、未治療であってもよいし、化学療法、放射線療法および手術などの治療を受けたことがあってもよい。治療は、試料採取に先行して実施されてもよいし、試料採取時に実施されてもよい。
【００３９】
本開示の試料はいずれも、当技術分野において周知の方法（たとえばFACS、免疫組織化学）によって区別することができる複数の細胞集団および細胞亜集団を含み得る。たとえば、血液試料は、赤血球または血小板などの無核細胞の集団および白血球（WBC）、血中循環腫瘍細胞（CTC）などの有核細胞の集団を含み得る。WBCは、好中球、リンパ球、単球

、好酸球、好塩基球などの細胞亜集団を含み得る。本開示の試料は非富化試料であってもよい。すなわち、有核または無核細胞の任意の特定の集団または亜集団に関して富化されていない。たとえば、非富化血液試料は、TECC、WBC、B細胞、T細胞、NK細胞、単球などに関して富化されていない。

【００４０】

本明細書の中で使用される用語「希少細胞」とは、細胞集団中で1：1,000未満の存在比、たとえば1：5,000、1：10,000、1：30,000、1：50,000、1：100,000、1：300,000、1：500,000、1：1,000,000、1：5,000,000、1：10,000,000、1：30,000,000、1：50,000,000、1：100,000,000、1：300,000,000、1：500,000,000または1：1,000,000,000未満の存在比を有する細胞をいう。いくつかの態様において、希少細胞は、細胞集団中で1：1,000,000～1：10,000,000,000の存在比を有する。いくつかの例において、細胞集団は有核または無核細胞集団である。いくつかの態様において、希少細胞はTECCである。

【００４１】

本明細書の中で使用される用語「隣接する」とは、近い、隣り合う、とても近い、または近接することをいう。たとえば、本明細書に記載されたデバイスのスリーブインサートは、デバイスのカラム中の有孔プラグと隣り合い、または近接し得る。スリーブインサートと有孔プラグとの間に隙間が存在してもよいし、存在しなくてもよいし、スリーブインサートは、有孔プラグに取り付けられてもよいし、取り付けられなくてもよい。

【００４２】

1つの態様において、装置は1つのカラムを含む。いくつかの他の態様において、装置は2つ以上のカラムを含む。2つ以上のカラムは、非限定的に直列または並列もしくはそれらの任意の組み合わせをはじめとする任意の形態に配置されることができる。カラムは、円柱形、円錐形または立方体形などの任意の形状の任意の完全または部分的に中空の構造であり得る。一例において、カラムは円柱形である。一例において、カラムはシリンジを含む。

【００４３】

カラムの第一端は、上流側デバイスへの接続のために適合されることができ、カラムの第二端は、下流側デバイスへの接続のために適合されることができる。1つの態様において、カラムの第一端は、捕捉された細胞の容易な回収を可能にする開口部を含む。一例においては、簡単なピペット操作を使用して開口部から細胞を回収することができる。好都合には、いくつかの例において、回収のために、捕捉された細胞のバックフラッシュは不要である。バックフラッシュ工程を省く利点は、捕捉および回収処置に必要な工程の数の削減ならびに不純物による捕捉および回収された細胞の汚染の減少を含むが、それらに限定されない。1つの態様において、カラムの第二端は、カラムの中を通過する試料の流量を制御するための1つまたは複数のポンプへの接続のために適合されている。この目的に適した任意のポンプ、たとえば蠕動ポンプを使用し得る。

【００４４】

試料がカラムの中に通される流量は、使用される試料のタイプ、利用可能な試料の量、捕捉および回収される標的細胞のサイズ、捕捉および回収される細胞の数、捕捉および回収される試料中の細胞の割合などをはじめとする要因によって決定され得るが、これらに限定されない。いくつかの例において、流量は、以下：少なくとも約0.01mL/min、少なくとも約0.02mL/min、少なくとも約0.03mL/min、少なくとも約0.04mL/min、少なくとも約0.05mL/min、少なくとも約0.06mL/min、少なくとも約0.07mL/min、少なくとも約0.08mL/min、少なくとも約0.09mL/min、少なくとも約0.10mL/min、少なくとも約0.15mL/min、少なくとも約0.20mL/min、少なくとも約0.25mL/min、少なくとも約0.30mL/min、少なくとも約0.35mL/min、少なくとも約0.40mL/min、少なくとも約0.45mL/min、少なくとも約0.50mL/min、少なくとも約0.60mL/min、少なくとも約0.70mL/min、少なくとも約0.80mL/min、少なくとも約0.90mL/min、少なくとも約1.0mL/min、少なくとも約1.1mL/min、少なくとも約1.2mL/min、少なくとも約1.3mL/min、少なくとも約1.4mL/min、少なくとも約1.5mL/min、少なくとも約1.6mL/min、少なくとも約1.7mL/min、少なくとも約1.8mL/min、少なくとも約1.9

mL/min、少なくとも約2.0mL/min、少なくとも約3.0mL/min、少なくとも約4.0mL/min、少なくとも約5.0mL/min、少なくとも約6.0mL/min、少なくとも約7.0mL/min、少なくとも約8.0mL/min、少なくとも約9.0mL/min、少なくとも約10.0mL/min、少なくとも約15.0mL/min、少なくとも約20.0mL/min、少なくとも約25.0mL/min、少なくとも約30.0mL/min、少なくとも約35.0mL/min、少なくとも約40.0mL/min、少なくとも約45.0mL/minまたは少なくとも約50.0mL/minのいずれか1つであることができる。一例において、流量は0.05mL/min～50.0mL/minである。

【００４５】

有孔プラグは、インサートスリーブのための支持手段として働き、同時に、濾液が通過するためのチャネルを提供する。用語「有孔」とは、1つまたは複数の穴がプラグを貫通していることをいう。プラグは穿刺手段によって穿孔されることができ、有孔プラグは、任意の材料で作られていることができる。一例において、有孔プラグは有孔ゴムプラグである。

【００４６】

スリーブインサート（または本明細書の中で互換可能に使用されるインサートスリーブ）は、濾過手段のためのハウジングとして機能し得、同時に、未濾過試料が濾過手段以外のチャネルを通って流れるのを防ぐ封止手段としても機能する。スリーブインサートは、試料を濾過手段の中心に向けるために第二端が細くなるチャネルを含む。一例において、濾過手段はシーブを含む。

【００４７】

本明細書に記載されるデバイスを使用して捕捉された細胞は、レーザダイセクションなどのさらなる工程および捕捉された細胞を細胞捕捉シーブから剥がすための光ピンセットを要することなく、容易に回収することができる。したがって、試料と直接接触するデバイスの面のうちの1つまたは複数は非細胞接着性材料を含む。

【００４８】

1つの態様において、シーブは非細胞接着性材料を含む。別の態様において、非細胞接着性材料は、ケイ素、二酸化ケイ素、窒化ケイ素、エポキシ系ネガ型フォトレジスト、およびセラミクスからなる群より選択される。エポキシ系ネガ型フォトレジストの例はSU-8である。

【００４９】

本明細書に記載されるデバイスのシーブは、対象ではない、したがって捕捉されない細胞（または試料の他の成分）が通過することを可能にし得る複数の孔を含む。孔のサイズまたは直径は、捕捉および回収される細胞のサイズ、除去される細胞のサイズ、使用される試料の量、使用される試料の粘度などをはじめとする要因によって決定され得るがそれらに限定されない。同じシーブ中の複数の孔は、同じ直径であってもよいし、様々な直径であってもよい。いくつかの例において、孔径は、以下：少なくとも約5μm、少なくとも約6μm、少なくとも約7μm、少なくとも約8μm、少なくとも約9μm、少なくとも約10μm、少なくとも約11μm、少なくとも約12μm、少なくとも約13μm、少なくとも約14μm、少なくとも約15μm、少なくとも約16μm、少なくとも約17μm、少なくとも約18μm、少なくとも約19μm、少なくとも約20μm、少なくとも約25μm、少なくとも約30μm、少なくとも約35μm、少なくとも約40μm、少なくとも約45μm、少なくとも約50μm、少なくとも約60μm、少なくとも約70μm、少なくとも約80μm、少なくとも約90μm、少なくとも約100μmまたは少なくとも約200μmのいずれか1つであることができる。たとえば、腫瘍由来内皮細胞クラスター（TECC）を捕捉および回収する場合、孔径は、約6μm、約7μm、約8μm、約9μmまたは約10μmであることができる。一例において、孔径は9μmである。別の例において、孔径は10μmである。

【００５０】

第2の局面においては、

（a）本明細書に記載される装置の入口開口部に試料を導入して、試料が装置のスリーブインサートおよび濾過手段を通って流れることを可能にする工程；および

（b）装置の濾過手段内のシーブの表面に保持された残留物を捕集する工程；
を含む、試料から細胞を捕捉および回収する方法が提供される。

【００５１】

方法は、対象からの多様な細胞タイプを含み得る、本明細書に記載される生物学的試料に適用され得る。生物学的試料は、対象から単離された組織、細胞（たとえば幹細胞、被験がん細胞）、体液およびその単離物などからなる群より選択され得る。

【００５２】

1つの態様において、試料は生物学的流体を含む。いくつかの態様において、生物学的流体は、以下：全血、血清、血漿、脳脊髄液、リンパ液、嚢胞液、痰、便、胸水、粘液、腹水、および尿のいずれか1つを含む。

【００５３】

試料は任意の数の細胞を含み得る。1つの態様において、試料は1つの細胞を含む。別の態様において、試料は複数の細胞を含む。さらなる態様において、試料は複数の細胞を含み、その複数の細胞のうちの2つ以上が細胞クラスターまたは多核細胞を形成している。1つの態様において、多核細胞は単一TECCを含む。1つの態様において、単一の細胞は、被験がん細胞、被験腫瘍由来細胞、胚または胎児に由来する被験細胞、および病原生物からの細胞からなる群より選択される。

【００５４】

別の態様において、複数の細胞のうちの少なくともいくつかは、被験がん細胞、被験腫瘍由来細胞、胚または胎児に由来する被験細胞、および病原生物からの細胞からなる群より選択される。

【００５５】

本明細書に記載された方法を使用して捕捉および回収された細胞は、様々な数の明らかに別個の核を含み得る。たとえば、明らかに別個の核の数は、以下：約2～約100、約5～約90、約10～約80、約20～約70、約30～約60、約40～約50の別個の核または少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも7つ、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95または少なくとも100の別個の核のいずれか1つであることができる。

【００５６】

1つの態様において、試料は血液試料であり、該試料から捕捉および回収される細胞は少なくとも2つの明らかに別個の核を含む。

【００５７】

捕捉および回収された細胞の長軸の長さは、以下：少なくとも約5μm、少なくとも約6μm、少なくとも約7μm、少なくとも約8μm、少なくとも約9μm、少なくとも約10μm、少なくとも約11μm、少なくとも約12μm、少なくとも約13μm、少なくとも約14μm、少なくとも約15μm、少なくとも約16μm、少なくとも約17μm、少なくとも約18μm、少なくとも約19μm、少なくとも約20μm、少なくとも約25μm、少なくとも約30μm、少なくとも約35μm、少なくとも約40μm、少なくとも約45μm、少なくとも約50μm、少なくとも約60μm、少なくとも約70μm、少なくとも約80μm、少なくとも約90μm、少なくとも約100μmまたは少なくとも200μmのいずれか1つであることができる。

【００５８】

本明細書に記載される方法を使用して捕捉および回収された細胞は、いくつかの遺伝子および／またはタンパク質の発現または非発現を特徴とし得る。1つの態様において、捕捉および回収された細胞は、以下の遺伝子：PECAM1、VWF、およびCDH5のうちの1つまたは複数を発現する。この態様の一例において、細胞は、以下の遺伝子の組み合わせ：PECAM1とVWF；PECAM1とCDH5；VWFとCDH5；またはPECAM1とVWFとCDH5のいずれかを発現する。別の態様において、捕捉および回収された細胞は、以下の遺伝子：PTPRC、ITGA2B、およびGP1BAのうちの1つまたは複数を発現しない。この態様の一例において、細胞は、以下の遺

伝子の組み合わせ：PTPRCとITGA2B；PTPRCとGP1BA；ITGA2BとGP1BA；またはPTPRCとITGA2BとGP1BAのいずれをも発現しない。

【００５９】

当業者は、遺伝子PECAM1がタンパク質CD31をコード化し、遺伝子VWFがタンパク質VWFをコード化し、遺伝子CDH5がタンパク質CD144をコード化し、遺伝子PTPRCがタンパク質CD45をコード化し、遺伝子ITGA2Bがタンパク質CD41をコード化し、遺伝子GP1BAがタンパク質CD42Bをコード化することを理解するであろう。したがって、1つの態様において、捕捉および回収された細胞は、以下のタンパク質：CD31、VWFおよびCD144のうちの1つまたは複数を発現する。この態様の一例において、細胞は、以下のタンパク質の組み合わせ：CD31とVWF；CD31とCD144；VWFとCD144；またはCD31とVWFとCD144のいずれかを発現する。別の態様において、捕捉および回収された細胞は、以下の遺伝子タンパク質：CD45、CD41およびCD42Bのうちの1つまたは複数を発現しない。この態様の一例において、細胞は、以下のタンパク質の組み合わせ：CD45とCD41；CD45とCD42B；CD41とCD42B；またはCD45とCD41とCD42Bのいずれをも発現しない。

【００６０】

本明細書に記載される細胞捕捉および回収の方法は、試料中の標的細胞の任意の割合が捕捉されることを可能にし得る。好都合には、試料中の標的細胞を高い割合で捕捉および／または回収し得る。本明細書に記載される方法を使用して捕捉および回収される試料中に存在する細胞の割合は、以下：少なくとも約10、少なくとも約20％、少なくとも約30％、少なくとも約40％、少なくとも約50％、少なくとも約55％、少なくとも約60％、少なくとも約65％、少なくとも約75％、少なくとも約80％、少なくとも約81％、少なくとも約82％、少なくとも約83％、少なくとも約84％、少なくとも約85％、少なくとも約86％、少なくとも約87％、少なくとも約88％、少なくとも約89％、少なくとも約90％、少なくとも約91％、少なくとも約92％、少なくとも約93％、少なくとも約94％、少なくとも約95％、少なくとも約95.5％、少なくとも約96％、少なくとも約96.5％、少なくとも約97％、少なくとも約97.5％、少なくとも約98％、少なくとも約98.5％、少なくとも約99％、少なくとも約99.5％または100％のいずれか1つであり得る。

【００６１】

装置の濾過手段内のシーブの表面に保持された残留物の捕集は、様々な物理的および／または化学的方法を使用して実施され得る。1つの態様において、装置の濾過手段内のシーブの表面に保持された残留物の捕集は標準的なピペット操作を含む。

【００６２】

本発明の細胞捕捉および回収デバイスおよび方法の使用は、本発明者らが単離された細胞集団を同定することを可能にした。したがって、第3の局面においては、以下の特徴：

（i）腫瘍に由来しかつ血液から単離された内皮細胞であること；

（ii）各細胞が少なくとも2つの明らかに別個の核を有すること；

（iii）各細胞が約10μmよりも大きい長軸を有すること；

（iv）内皮細胞遺伝子またはタンパク質の発現；

（v）白血球に特異的な遺伝子またはタンパク質の非発現；および

（vi）巨核球または血小板に特異的な遺伝子またはタンパク質の非発現；

を有する、単離された細胞集団が提供される。

【００６３】

用語「内皮細胞」とは、血管およびリンパ管の内面をライニングする単純な扁平細胞の薄い層をいう。血液と直に接触する内皮細胞は血管内皮細胞と呼ばれ、リンパ管と直に接触する内皮細胞はリンパ管内皮細胞と呼ばれる。

【００６４】

用語「白血球」とは、感染症および異物侵入の両方に対して体を保護することに関与する免疫系の細胞である白色血液細胞（WBC）をいう。用語「巨核球」とは、正常な血液凝固のために必要である栓球（血小板）の産生を担う、分葉核を有する大きな骨髄細胞をいう。用語「血小板」とは、血管損傷を凝集させ、凝固させることによって出血を止める機

能（凝固因子とともに）を有する血液の成分をいう。血小板は細胞核を有さず、それらは、骨髄の巨核球から生まれたのち循環に入る細胞質のフラグメントである。

【００６５】

1つの態様において、本明細書に記載された単離された細胞集団によって発現される内皮細胞遺伝子は、PECAM1、VWF、およびCDH5を含むが、それらに限定されない。1つの態様において、本明細書に記載された単離された細胞集団によって発現される内皮細胞タンパク質は、CD31、VWFおよびCD144を含むが、それらに限定されない。

【００６６】

1つの態様において、本明細書に記載された単離された細胞集団によって発現されない、白血球、巨核球、または血小板に特異的な遺伝子は、PTPRC、ITGA2B、およびGP1BAを含むが、それらに限定されない。1つの態様において、本明細書に記載された単離された細胞集団によって発現されない、白血球、巨核球、または血小板に特異的なタンパク質は、CD45、CD41およびCD42Bを含むが、それらに限定されない。

【００６７】

いくつかの例においては、以下の遺伝子発現の組み合わせを使用して内皮細胞を確定することができる。PECAM1陽性とPTPRC陰性、VWF陽性とITGA2B陰性、VWF陽性とGP1BA陰性、CDH5陽性とPTPRC陰性。いくつかの他の例においては、以下のタンパク質発現の組み合わせを使用して内皮細胞を確定することができる。CD31陽性とCD45陰性、VWF陽性とCD41陰性、VWF陽性とCD42B陰性、CD144陽性とCD45陰性。

【００６８】

本明細書に記載される細胞捕捉および回収デバイスおよび方法は、本明細書に記載される単離された細胞集団を捕捉および回収するために使用することができる。したがって、第4の局面においては、

（a）本明細書に記載される装置または本明細書に記載される方法を使用して試料から細胞を捕捉および回収する工程；

を含む、対象の試料中の本明細書に記載される単離された細胞集団を検出する方法が提供される。

【００６９】

本明細書に記載されるデバイスおよび方法を使用して捕捉された単離された細胞集団は、たとえば特定の遺伝子および／またはタンパク質の発現を検出するために、下流側での操作および／または分析に供することができる。したがって、1つの態様において、第4の局面の方法はさらに、

（b）工程（a）からの細胞を、検出可能な標識に結合した少なくとも1つの抗体と接触させて、細胞上に発現した1つまたは複数の標的バイオマーカーへの抗体の結合を可能にする工程；

（c）結合していない抗体を試料から除去する工程；ならびに

（d）単離された細胞集団を検出するために、抗体に結合した検出可能な標識を検出および分析する工程；

を含む。

【００７０】

また、本明細書に記載される単離された細胞集団は、他の細胞単離法を使用して得ることもできる。したがって、第5の局面においては、

（a）試料からの細胞を、検出可能な標識に結合した少なくとも1つの抗体と接触させて、細胞上に発現した1つまたは複数の標的バイオマーカーへの抗体の結合を可能にする工程；

（b）結合していない抗体を試料から除去する工程；ならびに

（c）単離された細胞集団を検出するために、抗体に結合した検出可能な標識を検出および分析する工程；

を含む、対象の試料中の第3の局面の単離された細胞集団を検出する方法が提供される。

【００７１】

1つの態様においては、第5の局面の方法の工程（a）の前に、第2の局面の方法または当技術分野において公知の任意の細胞捕捉および回収方法を使用して試料から細胞を単離する。

【００７２】

用語「抗体」とは、抗原上の特定にエピトープに結合することができる免疫グロブリン分子をいう。抗体は、ポリクロナール混合物で構成されることもできるし、モノクロナール性であってもよい。さらに、抗体は、天然ソースまたは組み換えソースに由来する全免疫グロブリンであることができる。本明細書に記載された方法に使用される抗体は、多様な形態、たとえば完全な抗体として、またはその抗体フラグメントもしくは他の免疫学的に活性なフラグメント、たとえば相補性決定領域として存在し得る。同様に、抗体は、機能的抗原結合ドメイン、すなわち重鎖および軽鎖可変ドメインを有する抗体フラグメントとして存在し得る。また、抗体フラグメントは、非限定的にFv、Fab、F(ab）2、scFv（単鎖Fv）、dAb（単一ドメイン抗体）、二重特異性抗体、diabodyおよびtriabodyからなる群より選択される形態で存在し得る。例示的な抗体は、実施例3に記載されるような抗体である。

【００７３】

1つの態様において、本明細書に記載された方法に使用される抗体はバイオマーカーに特異的に結合することができる。用語「バイオマーカー」とは、その変化および／または検出が特定の身体的状態またはTECCの状態と相関することができる生物学的分子または生物学的分子のフラグメントをいう。用語「マーカー」および「バイオマーカー」は本開示を通して互換可能に使用される。そのようなバイオマーカーは、ヌクレオチド、核酸、ヌクレオシド、アミノ酸、糖、脂肪酸、ステロイド、代謝産物、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物、脂質、ホルモン、抗体、生物学的高分子の代用物として働く対象領域およびそれらの組み合わせ（たとえば糖タンパク質、リボヌクレオタンパク質、リポタンパク質）を含む生物学的分子を含むが、それらに限定されない。この用語はまた、生物学的分子の部分またはフラグメント、たとえばタンパク質またはポリペプチドのペプチドフラグメントを包含する。1つの態様において、バイオマーカーはがんバイオマーカーである。1つの態様において、抗体は、以下の標的バイオマーカー：PAI-1、ビメンチン、FOXC1、ケラチン8、ケラチン18、ケラチン19、Ep-CAM、CD45、VWF、PECAM-1、CD146、CD41、CD34、PSMA、CD105、CD309、CD144、CD202B、およびアンジオポエチン2のいずれか1つに特異的に結合することができる。

【００７４】

1つの態様において、抗体は、当技術分野において公知の方法、たとえば直接抗体コンジュゲーションおよび間接抗体コンジュゲーションにより、検出可能な標識に結合される。用語「直接抗体コンジュゲーション」とは、検出可能な標識への一次抗体のコンジュゲーションをいう。「間接抗体コンジュゲーション」とは、一次抗体が検出可能な標識にコンジュゲートされない二段階法をいう。一次抗体に対する二次抗体が使用され、その二次抗体が検出可能な標識にコンジュゲートされる。検出可能な標識は、以下：蛍光基、放射性同位体、安定同位体、酵素基、化学発光基、またはビオチニル基のいずれか1つであることができる。例示的な蛍光標識抗体が実施例3に記載されている。

【００７５】

イムノアッセイにおける抗原への抗体の結合を検出するための多数の他の方法が当技術分野において公知であり、本開示の範囲内である。

【００７６】

本明細書に記載される単離された細胞集団を検出し、分析するために、scrmPCRなどの他の方法を使用することもできる。したがって、第4の局面の方法の1つの態様はさらに、

（b）工程（a）からの細胞を溶解させる工程；

（c）工程（b）からの溶解させた細胞試料を、標的RNA領域に対する、第一のプライマー対のリバースプライマーおよび逆転写酵素と接触させて、RNAのcDNAへの逆転写を生じさせる工程；

（d）その後、工程（c）からの試料を、
（i）標的cDNA領域に対する、第一のプライマー対のフォワードプライマー、
（ii）標的DNA領域に対する、第二のプライマー対のリバースプライマーおよびフォワードプライマー、および
（iii）DNAポリメラーゼ
と接触させて、前増幅工程において標的cDNA領域および標的DNA領域を同時に増幅させる工程；および
（e）増幅された標的cDNA領域および／または増幅された標的DNA領域を分析する工程；を含む。

【００７７】

第6の局面においては、
（a）試料中に存在する細胞を溶解させる工程；
（b）工程（a）からの溶解させた細胞試料を、標的RNA領域に対する、第一のプライマー対のリバースプライマーおよび逆転写酵素と接触させて、RNAのcDNAへの逆転写を生じさせる工程；
（c）その後、工程（b）からの試料を、
（i）標的cDNA領域に対する、第一のプライマー対のフォワードプライマー、
（ii）標的DNA領域に対する、第二のプライマー対のリバースプライマーおよびフォワードプライマー、および
（iii）DNAポリメラーゼ
と接触させて、前増幅工程において標的cDNA領域および標的DNA領域を同時に増幅させる工程；および
（d）増幅された標的cDNA領域および／または増幅された標的DNA領域を分析する工程；を含む、対象の試料中の第3の局面の単離された細胞集団を検出する方法が提供される。

【００７８】

1つの態様においては、第6の局面の方法の工程（a）の前に、第2の局面の方法または当技術分野において公知の任意の細胞捕捉および回収方法を使用して試料から細胞を単離する。

【００７９】

好都合には、第4の局面の工程（d）または第6の局面の工程（c）における標的cDNA領域および標的DNA領域の同時増幅（実施例3に記載されるscrmPCRを参照）は、分析前に、標的cDNAおよび／または標的DNA領域のさらなる増幅のための鋳型としてのcDNAおよび／またはDNAの量を増す前増幅工程を形成し得る。標的DNA領域は標的ゲノムDNA領域であり得る。

【００８０】

用語「プライマー」とは、DNAまたはRNAの鎖とで対になると、適当な重合剤の存在下でプライマー伸長産物の合成を開始することができるオリゴヌクレオチドをいう。プライマーは、好ましくは、増幅における最大効率のためには一本鎖であるが、二本鎖であってもよい。プライマーは、重合剤の存在下で伸長産物の合成を誘発するのに十分な長さでなければならない。プライマーの長さは、用途、用いられる温度、鋳型反応条件、他の試薬およびプライマーのソースを含む多くの要因に依存し得る。たとえば、標的配列の複雑さに依存して、オリゴヌクレオチドプライマーは一般に、15～35またはより多くのヌクレオチドを含むが、より少ないヌクレオチドを含んでもよい。プライマーは、大きなポリヌクレオチド、たとえば約200のヌクレオチド～数キロベース以上であることができる。プライマーは、それがハイブリダイズし、合成開始のための部位として働くように設計されている鋳型上の配列に対して「実質的に相補的」であるように選択され得る。たとえば、プライマー中のすべての塩基が、プライマーがハイブリダイズする鋳型分子の配列を反映する必要はない―プライマーは、プライマーが鋳型にハイブリダイズすることを可能にするのに十分な相補的塩基を含むだけでよい。プライマーは、増幅されたDNAのクローン化を容易にするために、たとえば5'端における制限酵素認識配列の形態のさらなる塩基を含み得

る。プライマーはまた、鋳型中の塩基に対して相補的ではなく、逆に、塩基伸長または増幅時にDNAに変更を組み込むように設計されている塩基であるミスマッチ塩基を1つまたは複数の位置に含み得る。

【００８１】

用語「増幅」とは、核酸のさらなるコピーの産生に関する。増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術または当技術分野において周知の他の核酸増幅技術を使用して実施され得る。

【００８２】

「プライマー対」は、たとえばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による核酸の増幅（および同定）に使用することができる。「プライマー対」は「フォワードプライマー」および「リバースプライマー」を含み得る。PCR反応中、二本鎖DNAの両方の鎖が増幅される。「フォワードプライマー」は、DNAの1つ鎖に結合し、5'方向から3'方向へのプライマー伸長産物の合成を可能にし得る。「リバースプライマー」は、DNAの相補鎖に結合し得、同じく、相補的DNA鎖の5'方向から3'方向へのプライマー伸長産物の合成を可能にする。逆転写反応において、「リバースプライマー」はRNA鎖に結合し、逆転写酵素の存在下でcDNA鎖の5'方向から3'方向への相補的DNA（cDNA）鎖の合成を可能にし得る。その後「リバースプライマー」は「フォワードプライマー」と一緒に使用されて、合成されたcDNA鎖を増幅する。PCRプライマー対は、既知の配列から、たとえば、その目的のためのコンピュータプログラム、たとえばPrimer（Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA）および本明細書に開示される実施例において使用されるコンピュータプログラム（たとえばPrimerBLAST）を使用することにより、導出することができる。プライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、そのような目的のための当技術分野において公知のソフトウェアを使用して選択される。たとえば、OLIGO 4.06ソフトウェアが、それぞれ30～100ヌクレオチドまでのPCRプライマー対の選択ならびに32キロベースまでの入力ポリヌクレオチド配列からのオリゴヌクレオチドおよび5,000ヌクレオチドまでのより大きなポリヌクレオチドの分析に有用である。

【００８３】

PCR増幅反応、制限酵素消化およびその後のフラグメント分解ならびに核酸シークエンシングに使用される方法および試薬は当業者に周知である。各場合、適当なプロトコルおよび試薬は個々の状況に大きく依存する。多様なソース、たとえばSambrook et al., Molecular Cloning： A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. and Wiley-Intersciences, 1992から手引きを入手し得る。当業者は、所望の産物を達成する能力に影響することなくこれらの手法の様々なパラメータを変更し得ることを容易に理解するであろう。たとえば、PCR増幅の場合、塩濃度を変化させ得る。同様に、利用可能なDNAの量または効率的な増幅に必要な鋳型の最適量に依存して、鋳型として使用されるDNAの量を変更してもよい。

【００８４】

当業者は、「逆転写酵素」が、RNA鋳型に基づいてcDNAを合成するために使用され得る酵素であることを理解することができるであろう。当業者は、「DNAポリメラーゼ」が、DNA鋳型に基づいてDNA分子を合成することができる酵素であることを理解するであろう。

【００８５】

「接触」により、プライマーを試料と物理的に会合させ得る。これは、たとえば、プライマー対が、試料中に存在するDNAとアニールし、その後、PCRによってDNAを増幅させることを可能にする。これはまた、プライマーが、試料中に存在するRNA鎖にアニールして、当業者に公知であるように逆転写酵素を使用するcDNAの合成を許すことを可能にする。

【００８６】

用語「分析」とは、増幅された標的cDNA領域および／または増幅された標的DNA領域を当技術分野において公知の様々な技術によって試験または検査することをいう。増幅されたcDNA領域および／または増幅された標的DNA領域は、その遺伝子発現または存在し得る

突然変異に関して試験され得る。

【００８７】

本発明者らは、RNAの場合には少なくともセミネステッド手法を使用し、DNA分子の場合にはフルネステッド手法を使用することにより、DNAおよびRNA両方の特異的増幅を達成することができることを見いだした。本明細書の中で使用されるように、用語「セミネステッドPCR」とは、1つの「ネステッドプライマー」を使用して、予想外の結合部位の増幅による非特異的結合を減らす、変形PCR技術をいう。「フルネステッド手法」とは、鋳型DNAの各側で2つのネステッドプライマーを使用する、変形PCR技術をいう。「ネステッドプライマー」の使用は、第一のセットのプライマーを使用して増幅されたPCR産物の特異的認識を可能にし、ひいては、プライマーダイマー、ヘアピンおよび代替プライマー標的配列などの不要な産物からの汚染を除く。本発明者らはまた、DNAおよびRNA分子の増幅が前増幅工程におけるアニーリング温度によって差次的に影響されることを見いだした。したがって、両方の分子を増幅させるために、トレードオフが設定される必要がある。

【００８８】

したがって、第4の局面の方法の1つの態様はさらに、工程（c）におけるリバースプライマーまたは工程（d）（i）におけるフォワードプライマーおよび増幅された標的cDNA領域内に結合するネステッドプライマーを使用して、工程（d）からの試料をセミネステッドPCRに供する工程を含む。第4の局面の方法の別の態様はさらに、増幅された標的DNA領域内に結合するネステッドプライマー対を使用して、工程（d）からの試料をネステッドPCRに供する工程を含む。

【００８９】

同様に、第6の局面の方法の1つの態様はさらに、工程（b）におけるリバースプライマーまたは工程（c）（i）におけるフォワードプライマーおよび増幅された標的cDNA領域内に結合するネステッドプライマーを使用して、工程（c）からの試料をセミネステッドPCRに供する工程を含む。第6の局面の方法の別の態様はさらに、増幅された標的DNA領域内に結合するネステッドプライマー対を使用して、工程（c）からの試料をネステッドPCRに供する工程を含む。

【００９０】

1つの態様において、第4の局面の方法の工程（c）および（d）または第6の局面の方法の工程（b）および（c）は同じ反応混合物中で実施される。

【００９１】

1つの態様において、第4の局面の工程（e）または第6の局面の工程（d）における分析は、増幅された標的cDNAを遺伝子発現に関して分析することを含む（たとえば遺伝子発現分析において）。遺伝子発現分析は、当技術分野において公知の任意の技術、たとえば定量的PCR、デジタルPCR、マイクロアレイなどを使用して実施され得る。

【００９２】

1つの態様において、第4の局面の工程（e）または第6の局面の工程（d）における分析は、増幅された標的cDNAを突然変異に関して分析することを含む（たとえば突然変異分析において）。突然変異分析は、当技術分野において公知の任意の技術、たとえばサンガーシークエンシング、マキサム・ギルバートシークエンシング、パイロシークエンシング、ショットガンシークエンシング、ハイスループットDNAシークエンシング、対立遺伝子特異的PCR法（ASPCR）または高分解能融解温度曲線PCR法（HRM）を使用して実施され得る。

【００９３】

第4の局面または第6の局面の方法は、1つまたは複数の標的RNA領域および／または1つまたは複数の標的cDNA領域および／または1つまたは複数の標的DNA領域に関して同時に実施することができる。したがって、それぞれが標的RNA領域に関して同じまたは異なる特異性を有する1つまたは複数のリバースプライマーを第4の局面の工程（c）または第6の局面の工程（b）に使用し得、それぞれが標的cDNA領域に関して同じまたは異なる特異性を有する1つまたは複数のフォワードプライマーを第4の局面の工程（d）（i）または第6の局面の工程（c）（i）に使用し得、それぞれが標的DNA領域に関して同じまたは異なる特

異性を有する1つまたは複数のプライマー対を第4の局面の工程（d）（ii）または第6の局面の工程（c）（ii）に使用し得、標的cDNA領域に結合する1つまたは複数のネステッドプライマーおよび標的DNA領域に結合する1つまたは複数のネステッドプライマー対を使用し得る。

【００９４】

第一のプライマー対は、エクソン－エクソン境界をまたぐ、または対応するDNA領域上の少なくとも1つのイントロンによって分けられているプライマーを含み得る。第二のプライマー対は、標的DNA領域のイントロン領域に結合するプライマーを含み得る。

【００９５】

用語「エクソン」とは、成熟メッセンジャーmRNAに転換されるゲノムDNAの一部になるゲノムDNAの部分をいう。用語「イントロン」または「イントロン領域」とは、RNAスプライシングによって除去され、したがって、最終的な成熟mRNA中には存在しないゲノムDNAの部分をいう。

【００９６】

1つの態様において、使用される第一のプライマー対は、表1に記載されたプライマー対の任意の1つまたは複数であることができる。

【００９７】

（表１）前増幅工程に使用されるプライマー対

			前増幅工程	
遺伝子名	ID (転写産物または遺伝子)	マーカー	フォワードプライマー	リバースプライマー
SERPINE1	NT_007933.15	EMT	GCCAAGAGCGCTGTCAA (SEQ ID NO: 1)	CAGCAGACCCTTCACCAAA (SEQ ID NO: 2)
VIM	NM_003380.3	EMT	GATGTTTCCAAGCCTGACCT (SEQ ID NO: 3)	CAGTGGACTCCTGCTTTGC (SEQ ID NO: 4)
FOXC1	NM_001453.2	EMT	CACACCCTCAAAGCCGAACT (SEQ ID NO: 5)	AAAGTGGAGGTGGCTCTGAA (SEQ ID NO: 6)
KRT8	NM_002273.3	EMT/L(Ep)	AAGGATGCCAACGCCAAGTT (SEQ ID NO: 7)	CCGCTGGTGGTCTTCGTATG (SEQ ID NO: 8)
EPCAM	NT_022184.15	EMT/L(Ep)	GCAGGTCCTCGCGTTCG (SEQ ID NO: 9)	TCTCCCAAGTTTTGAGCCATTC (SEQ ID NO: 10)
PTPRC	NT_004487.19	L(He)	GACATCATCACCTAGCAGTTCATG (SEQ ID NO: 11)	CAGTGGGGGAAGGTGTTGG (SEQ ID NO: 12)
VWF	NM_000552.3	L(En)	ACACAGGGGGACCAAAGAG (SEQ ID NO: 13)	GAGATGCCCGTTCACACCA (SEQ ID NO: 14)
PECAM1	NM_000442.4	L(He,En)	TCTCAACGGTGACTTGTGG (SEQ ID NO: 15)	GTTCTTCCCATTTTGCACCGT (SEQ ID NO: 16)
MCAM	NM_006500.2	L(En)	CTCGGTCCCAGGAGTACC (SEQ ID NO: 17)	TGTACAAACCACTCGACTCCA (SEQ ID NO: 18)
ITGA2B	NM_000419.3	L(Me)	CTTCTATGCAGGCCCCAAT (SEQ ID NO: 19)	AGCCTACATTTCGGGTCTCATC (SEQ ID NO: 20)
CD34	NM_001773.2	S/L(En)	CCTTCTGGGTTCATGAGTCTTGACA (SEQ ID NO: 21)	TGTCGTTTCTGTGATGTTTGTTGTG (SEQ ID NO: 22)
FOLH1	NT_009237.18	TEC	CGGATATTGTACCACCTTTCAGT (SEQ ID NO: 23)	AGCAGGGTCGGAGTAGAGAA (SEQ ID NO: 24)
ENG	NT_008470.19	L(En)	GTGACGGTGAAGGTGGAACTGA (SEQ ID NO: 25)	TTGAGGTGTGTCTGGGAGCT (SEQ ID NO: 26)
KDR	NM_002253.2	L(En)	GAAATGACACTGGAGCCTACAAG (SEQ ID NO: 27)	AATGGACCCGAGACATGGAAT (SEQ ID NO: 28)
CDH5	NM_001795.3	L(En)	GTTCACGCATCGGTTGTTCAAT (SEQ ID NO: 29)	GCCTGCTTCTCTCGGTCCAA (SEQ ID NO: 30)
TEK	NT_008413.19	L(En)	CTTATTTCTGTGAAGGGCGAGTT (SEQ ID NO: 31)	CTCCCTTGTCCACAGTCATAGT (SEQ ID NO: 32)
ANGPT2	NM_001147.2	L(En)	AACACTCCCTCTCGACAAACAAATT (SEQ ID NO: 33)	CTGTAGTTGGATGATGTGCTTGTC (SEQ ID NO: 34)
KRT18 (1)	NM_000224.2	EMT/L(Ep)	TGCTCACCACACAGTCTGAT (SEQ ID NO: 52)	CACTTTGCCATCCACTAGCC (SEQ ID NO: 53)
KRT19	NM_002276.4	EMT/L(Ep)	CAGCCACTACTACACGACCA (SEQ ID NO: 54)	CGTTGATGTCGGCCTCCA (SEQ ID NO: 55)

出典：

（1）Hesse et al. (2001) J. Cell Sci. 114, 2569より

【００９８】

凡例：

EMT：上皮間葉転換マーカー

L：細胞系マーカー

TEC：腫瘍内皮細胞マーカー

S：幹細胞マーカー
Ep：上皮マーカー
He：造血細胞マーカー
En：内皮細胞マーカー
Me：巨核球／血小板マーカー

【００９９】

1つの態様において、使用される第二のプライマー対は、表2に記載されたプライマー対の任意の1つまたは複数であることができる。

【０１００】

（表２）増幅工程に使用されるプライマー対

		増幅工程	
遺伝子名	DNA/RNA識別を可能にする	フォワードプライマー	リバースプライマー
SERPINE1	DNA配列中の1148bpイントロン	AGAACTTCAGGATGCAGATGTCT (SEQ ID NO: 35)	CAGCAGACCCTTCACCAAA (SEQ ID NO: 2)
VIM	DNA配列中の761bpイントロン	GATGTTTCCAAGCCTGACCT (SEQ ID NO: 3)	TGTACCATTCTTCTGCCTCCT (SEQ ID NO: 36)
FOXC1	NA（単一のエクソンにコードされる遺伝子）	CACACCCTCAAAGCCGAACT (SEQ ID NO: 5)	GAGGGATATTCTGTTCGCTGGT (SEQ ID NO: 37)
KRT8	DNA配列中の159bpイントロン	GCTGGAGGGCGAGGAGA (SEQ ID NO: 38)	CCGCTGGTGGTCTTCGTATG (SEQ ID NO: 8)
EPCAM	DNA配列中の4118bpイントロン	CCGCAGCTCAGGAAGAATGT (SEQ ID NO: 39)	TCTCCCAAGTTTTGAGCCATTC (SEQ ID NO: 10)
PTPRC	DNA配列中の53092bpイントロン	CAACAGTGGAGAAAGGACGCA (SEQ ID NO: 40)	CAGTGGGGGAAGGTGTTGG (SEQ ID NO: 12)
VWF	エクソンジャンクション上のフォワードプライマー	TGCCTCCAAAGGGCTGTATC (SEQ ID NO: 41)	GAGATGCCCGTTCACACCA (SEQ ID NO: 14)
PECAM1	DNA配列中の12457bpイントロン	CAGTCTTCACTCTCAGGATGC (SEQ ID NO: 42)	GTTCTTCCCATTTTGCACCGT (SEQ ID NO: 16)
MCAM	DNA配列中の1724bpイントロン	CTCGGTCCCAGGAGTACC (SEQ ID NO: 17)	CGGCCATTCTTGTACCAGATGA (SEQ ID NO: 43)
ITGA2B	DNA配列中の3242bpイントロン	GGCGGCGTGTTCCTGT (SEQ ID NO: 44)	AGCCTACATTTCGGGTCTCATC (SEQ ID NO: 20)
CD34	エクソンジャンクション上のフォワードおよびリバースプライマー	CTACCCCAGAGTTACCTACCCA (SEQ ID NO: 45)	TGTCGTTTCTGTGATGTTTGTTGTG (SEQ ID NO: 22)
FOLH1	DNA配列中の6811bpイントロン	CCAGAGGGCGATCTAGTGTA (SEQ ID NO: 46)	AGCAGGGTCGGAGTAGAGAA (SEQ ID NO: 24)
ENG	DNA配列中の256bpイントロン	GTGACGGTGAAGGTGGAACTGA (SEQ ID NO: 25)	AGTATTCTCCAGTGGTCCAGATCT (SEQ ID NO: 47)
KDR	DNA配列中の3192bpイントロン	GAAATGACACTGGAGCCTACAAG (SEQ ID NO: 27)	TGTTGGTCACTAACAGAAGCA (SEQ ID NO: 48)
CDH5	DNA配列中の2143bpイントロン	CACGCCTCTGTCATGTACCA (SEQ ID NO: 49)	GCCTGCTTCTCTCGGTCCAA (SEQ ID NO: 30)
TEK	DNA配列中の10352bpイントロン	CTTATTTCTGTGAAGGGCGAGTT (SEQ ID NO: 31)	GTAGCTGGTAGGAAGGAAGCT (SEQ ID NO: 50)
ANGPT2	DNA配列中の6144bpイントロン	GGACCAGACCAGTGAAATAAACAA (SEQ ID NO: 51)	CTGTAGTTGGATGATGTGCTTGTC (SEQ ID NO: 34)
KRT18(1)	DNA配列中の641bpイントロン	TGGAGGACCGCTACGCCCTA (SEQ ID NO: 56)	CCAAGGCATCACCAAGACTA (SEQ ID NO: 57)
KRT19	DNA配列中の2745bpイントロン	TGCGGGACAAGATTCTTGGT (SEQ ID NO: 58)	CGTTGATGTCGGCCTCCA (SEQ ID NO: 55)

出典：
（1）Hesse et al.（2001）J. Cell Sci. 114, 2569より

【０１０１】

第4の局面の方法の工程（d）における前増幅は1つまたは複数のサイクリング工程を含み得る。各サイクリング工程は、所定の温度で所定の持続時間の1つまたは複数の増幅サイクル（すなわち、変性、アニーリングおよび伸長）を含み得る。サイクリング工程の回数、変性、アニーリングおよび伸長のサイクルの回数、それらが実施される温度ならびに各温度が適用される持続時間は、増幅反応に使用される試薬、標的cDNAまたはDNA領域、使用されるプライマー、増幅される試料などの要因に依存するであろう。1つの態様において、増幅は最終的な伸長工程を含まない。

【０１０２】

たとえば、工程（d）は、約1～約60のサイクリング工程、約1～約50のサイクリング工程、約1～約40のサイクリング工程、約1～約30のサイクリング工程、約1～約25のサイクリング工程、約1～約20のサイクリング工程、約1～約15のサイクリング工程、約1～約10のサイクリング工程、約1～約5のサイクリング工程、約1～約4のサイクリング工程、約1～約3のサイクリング工程、約1のサイクリング工程、約2のサイクリング工程または約3の

サイクリング工程を含み得る。

【０１０３】

各サイクリング工程は、約1～約50サイクル、約1～約40サイクル、約1～約30サイクル、約1～約25サイクル、約1～約20サイクル、約1～約18サイクル、約1～約15サイクル、約1～約10サイクル、約1～約6サイクル、約2サイクル、約4サイクル、約6サイクル、約8サイクル、約10サイクル、約15サイクル、約20サイクル、約25サイクル、約30サイクル、約40サイクルまたは約50サイクルの変性、アニーリングおよび伸長を含み得る。

【０１０４】

いくつかの例において、サイクル中のアニーリングおよび／または伸長温度は、約40℃～約80℃、約40℃～約75℃、約40℃～約70℃、約40℃～約65℃、約40℃～約60℃、約40℃～約55℃、約40℃～約50℃、約40℃、約45℃、約50℃、約55℃、約60℃、約65℃、約70℃、約75℃または約80℃である。

【０１０５】

連続サイクリング工程の場合のアニーリングおよび／または伸長温度は、約1℃～約10℃、約1℃～約9℃、約1℃～約8℃、約1℃～約7℃、約1℃～約6℃、約1℃～約5℃、約1℃～約4℃、約1℃～約3℃または約1℃～約2℃だけ下げられてもよい。

【０１０６】

いくつかの例において、アニーリングおよび／または伸長は、約10秒～約10分、約10秒～約8分、約10秒～約6分、約10秒～約4分、約10秒～約2分、約10秒～約1分、約1分、約2分、約4分、約6分、約8分または約10分の間、実施することができる。

【０１０７】

いくつかの例において、変性は、約75℃～約120℃、約75℃～約115℃、約75℃～約110℃、約75℃～約105℃、約75℃～約100℃、約75℃～約95℃、約75℃～約90℃、約75℃～約85℃、約75℃～約80℃、約75℃、約80℃、約85℃、約90℃、約95℃、約100℃、約105℃、約110℃、約115℃または約120℃の温度で実施することができる。

【０１０８】

変性は、約1秒～約10分、約1秒～約5分、約1秒～約4分、約1秒～約3分、約1秒～約2分、約1秒～約1分、約1秒、約10秒、約20秒、約30秒、約40秒、約50秒、約1分、約2分、約3分、約4分、約5分または約10分の間、実施され得る。

【０１０９】

一例においては、方法の工程（d）は、

60℃で4分間、次いで95℃で1分間の6サイクル、

55℃で4分間、次いで95℃で1分間の6サイクル、および

50℃で4分間、次いで95℃で1分間の6サイクル

を含む。

【０１１０】

いくつかの例において、工程（b）からの溶解細胞試料はセルフリーRNAまたはセルフリーDNAを含む。

【０１１１】

好都合には、第4の局面または第6の局面の方法は、限られた量の試料しか利用できない場合に、たとえば希少細胞試料中でRNAおよびDNAを分析するために使用することができる。

【０１１２】

いくつかの例において、RNAまたはDNAは、低い量、たとえば約1pg～約10ng、約5pg～約10ng、約5pg～約5ng、約5pg～約1ng、約5pg～約500pg、約5pg～約250pg、約5pg～約125pg、約5pg～約100pgまたは約5pg～約50pgの量で存在し得る。

【０１１３】

本明細書に記載された方法は、診断、特にがんの診断に使用することができる。したがって、第7の局面においては、対象におけるがんを診断する方法であって、該対象からの試料を本明細書に記載される単離された細胞集団の存在に関して分析する工程を含み、該

単離された細胞集団の存在によって対象ががんを有することが示される、方法が提供される。がん患者におけるTECCの検出の一例が実施例3に示されている。

【０１１４】

いくつかの例において、単離された細胞集団は、使用されるそれぞれの検出方法のバックグラウンドノイズよりも上で（たとえば、バックグラウンドの2倍、3倍、5倍または10倍の高さ、たとえばバックグラウンドの2倍または3倍の高さで）検出可能であるならば、「存在する」とみなされる。

【０１１５】

対象は哺乳動物、たとえばヒトであり得る。

【０１１６】

本明細書に記載される方法によって診断することができるがんの主なタイプは、がん腫、肉腫、リンパ腫、胚細胞腫瘍および芽腫を含むが、これらに限定されない。本明細書に記載される方法によって診断することができるがんの具体的なタイプは、結腸がん、直腸がん、乳がん、前立腺がん、腎細胞がん、移行上皮細胞がん、肺がん、胆管がん、結腸がん、脳腫瘍、非小細胞肺がん、膵臓がん、胃がん、膀胱がん、食道がん、中皮腫、メラノーマ、甲状腺がん、頭頸部がん、骨肉腫およびグリア芽腫を含むが、これらに限定されない。当業者は、結腸がんおよび直腸がんを指すために「大腸がん」を使用することができることを理解するであろう。具体的には、大腸がんが結腸から発生したとき、それは結腸がんとみなされ、大腸がんが直腸から発生したとき、それは直腸がんとみなされる。

【０１１７】

1つの態様において、がんは浸潤がんおよび／または転移性がんである。別の態様において、がんはステージIがん、ステージIIがん、ステージIIIがん、またはステージIVがんである。さらなる態様において、がんは早期がん、たとえば術前ステージがんである。早期がんの一例が原発腫瘍である。本明細書に記載される方法は、非常に少ない数でしか存在しない細胞、たとえば早期がんにおける細胞を分析のために捕捉および回収するその能力のおかげで、早期がんの検出に特に有用である。

【０１１８】

本明細書に記載される方法は、がん患者の治療に対する応答性をモニタリングおよび／または予測するために使用することができる。したがって、第8の局面においては、本明細書に記載される単離された細胞集団の数を決定するために治療後に患者から得た試料を分析する工程を含み、治療前に患者から得たベースライン試料中の単離された細胞集団の数と比べて減少した単離された細胞集団の数が、患者が治療に対して陽性に応答していることを示す、がん患者の治療に対する応答性をモニタリングおよび／または予測する方法が提供される。同様に、第9の局面においては、本明細書に記載される単離された細胞集団の数を決定するために治療前にがん患者から得た試料を分析する工程を含み、治療に対して陽性に応答した患者または患者群から治療前に得た試料中の単離された細胞集団の数と比べて等しいまたは多い単離された細胞集団の数が、がん患者が治療に対して陽性に応答することを示し、治療に対して陽性に応答した患者または患者群から治療前に得た試料中の単離された細胞集団の数と比べて少ない単離された細胞集団の数が、がん患者が治療に対して陰性に応答することを示す、がん患者の治療に対する応答性を予測する方法が提供される。

【０１１９】

単離された細胞集団は、使用される検出方法のバックグラウンドノイズよりも上で（たとえば、バックグラウンドシグナルの＜1.5倍または＜2.0倍の高さで、たとえばバックグラウンドの＜1.5倍または＜2.0倍の高さで）検出可能でないならば、「存在しない」とみなされる。「減少」、「減少した」または「よりも低い」という用語は、ベースライン試料または対照に対する、または比べた、単離された細胞集団の数の減少をいう。ベースラインまたは対照は、治療前に同じ対象から得た試料であってもよいし、正常、健常な対象または正常、健常な対象の群から得た試料であってもよいし、予備試験において治療に応答した患者または患者の群から得た試料であってもよい。いくつかの例において、ベース

ラインまたは対照試料中の単離された細胞集団の数は、血液1mlあたり1～5、1～10、1～15、1～20、1～25、1～30、1～30、1～40、または1～50である。いくつかの例において、単離された細胞集団の減少した数またはより低い数は、ベースラインまたは対照試料中の単離された細胞集団の数と比べて少なくとも10％、少なくとも20％、少なくとも30％、少なくとも40％、少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、または少なくとも95％減少している。「増大した」または「よりも高い」という用語は、ベースライン試料または対照に対する、または比べた、単離された細胞集団の数の増加をいう。ベースラインまたは対照は、治療前に同じ対象から得た試料であってもよいし、正常、健常な対象から得た試料であってもよいし、予備試験において治療に応答した患者から得た試料であってもよい。いくつかの例において、単離された細胞集団の増大した数またはより高い数は、ベースラインまたは対照試料中の単離された細胞集団の数の少なくとも約1.05倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.2倍、少なくとも約1.3倍、少なくとも約1.4倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約1.6倍、少なくとも約1.7倍、少なくとも約1.8倍、少なくとも約1.9倍、または少なくとも約2.0倍である。

【０１２０】

いくつかの例において、がん患者の治療に対する応答性は、単離された細胞集団の数が血液1mlあたり100未満、90未満、80未満、70未満、60未満、50未満、40未満、30未満、20未満、15未満、10未満、9未満、8未満、7未満、6未満、5未満、4未満、3未満、2未満、または1未満であるならば、陰性である。

【０１２１】

いくつかの他の例において、がん患者の治療に対する応答性は、単離された細胞集団の数が血液1mlあたり1よりも多い、2よりも多い、3よりも多い、4よりも多い、5よりも多い、6よりも多い、7よりも多い、8よりも多い、9よりも多い、10よりも多い、15よりも多い、20よりも多い、30よりも多い、40よりも多い、50よりも多い、60よりも多い、70よりも多い、80よりも多い、90よりも多い、または100よりも多いならば、陽性である。

【０１２２】

当業者は、バイオマーカーの発現の存在、非存在または増減を判定するために、顕微鏡ベースの手法、たとえば蛍光走査顕微鏡法（たとえばMarrinucci D. et al., 2012, Phys. Biol. 9016003を参照）、質量分析法、たとえばMS/MS、LC-MS/MS、多重反応モニタリング（MRM）またはSRMおよび産物イオンモニタリング（PIM）ならびに抗体ベースの方法、たとえば免疫蛍光法、免疫組織化学法、イムノアッセイ、たとえばウェスタンブロット、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、免疫沈降法、ラジオイムノアッセイ、ドットブロット法、蛍光活性化細胞選別法（FACS）およびマスサイトメトリーを含む数多くの方法を使用することができることを理解するであろう。イムノアッセイ技術およびプロトコルは当業者には一般に公知である（Price and Newman, Principles and Practice of Immunoassay, 2nd Edition, Grove's Dictionaries, 1997；およびGosling, Immunoassays: A Practical Approach, Oxford University Press, 2000）。競合的および非競合的イムノアッセイを含む多様なイムノアッセイ技術を使用することができる（Self et al., Curr. Opin. Biotechnol 7:60-65 (1996)、また、John R. Crowther, The ELISA Guidebook, 1st ed., Humana Press 2000, ISBN 0896037282およびAn Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, by Chard T, ed., Elsevier Science 1995, ISBN 0444821 198を参照）。

【０１２３】

当業者はさらに、当技術分野において公知の任意のクラスのマーカー特異的結合試薬、たとえば抗体、アプタマー、融合タンパク質、たとえばタンパク質受容体もしくはタンパク質リガンド成分を含む融合タンパク質（たとえばCD31、VWF、CD144、CD45、CD41、またはCD42Bと結合している受容体またはリガンド）、またはバイオマーカー特異的小細胞バインダを使用して、バイオマーカーの発現の存在、非存在、または増減を検出し得ることを理解するであろう。

【０１２４】

本明細書に記載される単離された細胞集団は主に内皮性である。内皮細胞はすべての血管の内部をライニングするため、本明細書に記載される方法はまた、腫瘍の血管特性を分析するために使用することもできる。したがって、第10の局面においては、本明細書に記載される単離された細胞集団の数を決定するために対象からの試料を分析する工程を含み、ベースライン試料と比べて増加した単離された細胞集団の数が、腫瘍が、ベースライン試料と比べて大きい血管を有することを示し、ベースライン試料と比べて減少した単離された細胞集団の数が、腫瘍が、ベースライン試料と比べて小さい血管を有することを示す、対象における腫瘍の血管特性を分析する方法が提供される。

【０１２５】

いくつかの例において、ベースライン試料または対照試料は、予備試験において小さい血管を有することが示された患者から得られる。いくつかの例において、ベースラインまたは対照試料中の単離された細胞集団の数は、血液1mlあたり1～5、1～10、1～15、1～20、1～25、1～30、1～30、1～40または1～50である。いくつかの例において、増加した単離された細胞集団の数は、ベースラインまたは対照試料中の単離された細胞集団の数の少なくとも約1.05倍、少なくとも約1.1倍、少なくとも約1.2倍、少なくとも約1.3倍、少なくとも約1.4倍、少なくとも約1.5倍、少なくとも約1.6倍、少なくとも約1.7倍、少なくとも約1.8倍、少なくとも約1.9倍または少なくとも約2.0倍である。いくつかの例において、減少した単離された細胞集団の数は、ベースラインまたは対照試料中の単離された細胞集団の数における単離された細胞集団の数と比べて少なくとも10％、少なくとも20％、少なくとも30％、少なくとも40％、少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％または少なくとも95％減少している。

【０１２６】

いくつかの例において、患者は、単離された細胞集団の数が血液1mlあたり1よりも多い、2よりも多い、3よりも多い、4よりも多い、5よりも多い、6よりも多い、7よりも多い、8よりも多い、9よりも多い、10よりも多い、15よりも多い、20よりも多い、30よりも多い、40よりも多い、50よりも多い、60よりも多い、70よりも多い、80よりも多い、90よりも多い、または100よりも多いならば、腫瘍中に大きな血管を有するものと分類される。

【０１２７】

いくつかの他の例において、患者は、単離された細胞集団の数が血液1mlあたり100未満、90未満、80未満、70未満、60未満、50未満、40未満、30未満、20未満、15未満、10未満、9未満、8未満、7未満、6未満、5未満、4未満、3未満、2未満または1未満であるならば、腫瘍中に小さい血管を有するものと分類される。

【０１２８】

いくつかの例において、がん患者の治療に対する応答性は、患者が腫瘍中により大きい血管を有するならば、陽性である。いくつかの他の例において、がん患者の治療に対する応答性は、患者が腫瘍中により小さい血管を有するならば、陰性である。

【０１２９】

また、単離された細胞集団の高速捕捉、回収および／または検出、治療に対する応答性の診断、モニタリングおよび／または予測、および／または本明細書に記載される腫瘍の血管特性の分析のための市販用のキットを開発し得ることが考えられる。したがって、第11の局面においては、（a）本明細書に記載される装置を含む、本明細書に記載される方法（たとえば第2、第4、第7、第8、第9または第10の局面の方法）に使用するためのキットが提供される。

【０１３０】

第11の局面のキットはさらに、以下：

（b）試料から得た細胞を溶解させるための1つまたは複数の細胞溶解バッファ；

（c）i．第4の局面の方法の工程（c）のリバースプライマー、

ii．第4の局面の方法の工程（d）（i）のフォワードプライマー、

iii．第4の局面の方法の工程（d）（ii）のプライマー対、および

iv．第4の局面の方法のネステッドプライマーおよびネステッドプライマー対

からなる群より選択されるプライマー；
（d）i．逆転写酵素、および第4の局面の方法の工程（c）における逆転写に適した1つまたは複数の反応バッファ、
ii．DNAポリメラーゼ、および第4の局面の方法の工程（d）における増幅または第4の局面の方法のセミネステッドもしくはネステッドPCRに適した1つまたは複数の反応バッファ、および
iii．dATP、dCTP、dGTP、およびdTTPまたはdUTPからなる群より選択される1つまたは複数の標識されたまたは標識されていないデオキシリボヌクレオチド
からなる群より選択される1つまたは複数の試薬；ならびに
（e）PAI-1、ビメンチン、FOXC1、ケラチン8、ケラチン18、ケラチン19、Ep-CAM、CD45、VWF、PECAM-1、CD146、CD41、CD34、PSMA、CD105、CD309、CD144、CD202B、およびアンジオポエチン2からなる群より選択されるタンパク質に特異的に結合することができる、本明細書に記載される検出可能な標識に結合されている抗体；ならびに任意で、検出可能な標識を検出するための手段；
のうちの1つまたは複数を含み得る。

【０１３１】

第12の局面においては、
（a）試料から得た細胞を溶解させるための1つまたは複数の細胞溶解バッファ；
（b）i．第5の局面の方法の工程（b）のリバースプライマー、
ii．第5の局面の方法の工程（c）（i）のフォワードプライマー、
iii．第5の局面の方法の工程（c）（ii）のプライマー対、および
iv．第5の局面の方法のネステッドプライマーおよびネステッドプライマー対
からなる群より選択されるプライマー；
（c）i．逆転写酵素、および第5の局面の方法の工程（b）における逆転写に適した1つまたは複数の反応バッファ、
ii．DNAポリメラーゼ、および第5の局面の方法の工程（c）における増幅または第5の局面の方法のセミネステッドPCRもしくはネステッドPCRに適した1つまたは複数の反応バッファ、および
iii．dATP、dCTP、dGTP、およびdTTPまたはdUTPからなる群より選択される1つまたは複数の標識されたまたは標識されていないデオキシリボヌクレオチド
からなる群より選択される1つまたは複数の試薬；ならびに
（d）PAI-1、ビメンチン、FOXC1、ケラチン8、ケラチン18、ケラチン19、Ep-CAM、CD45、VWF、PECAM-1、CD146、CD41、CD34、PSMA、CD105、CD309、CD144、CD202B、およびアンジオポエチン2からなる群より選択されるタンパク質に特異的に結合することができる、本明細書に記載される検出可能な標識に結合されている抗体；ならびに任意で、検出可能な標識を検出するための手段；
を含む、本明細書に記載される方法（たとえば第5、第6、第7、第8、第9または第10の局面の方法）に使用するためのキットが提供される。

【０１３２】

当技術分野において一般に使用される溶解バッファ、たとえばアルカリ性溶解バッファまたはプロテイナーゼKを含有する細胞溶解バッファまたは単に、洗浄剤もしくは細胞を崩壊させ、その核酸が溶液中に放出されることを可能にする化合物および／または酵素を含有するバッファを使用し得る。

【０１３３】

第11または12の局面のキットはまた、定量的リアルタイムPCRのためのプローブまたは色素を含み得る。例示的なプローブおよび色素は、SYBRグリーン色素、EvaGreen、dsGreen、TaqManプローブ、ハイブリダイゼーションプローブなどを含むが、これらに限定されない。

【０１３４】

キットはまた、プライマーのうちの1つまたは複数を設計する、および／または第4の局

面または第5の局面の方法の工程（c）および／または（d）の前増幅および／または増幅サイクリング条件を最適化するための取扱説明書を含み得る。

【０１３５】

1つの態様において、プライマーおよび／または試薬は、第4の局面または第5の局面の方法の溶解、前増幅、および増幅工程に適した組み合わせで予め混合されている。別の態様において、プライマーは、遺伝子発現プロファイルまたは突然変異シグネチャの分析に適した組み合わせで予め混合されている。プライマーは、1つまたは複数の対象標的遺伝子を増幅させるように設計されているプライマーであり得る。

【０１３６】

第11または第12の局面のキットの1つの態様はさらに、本明細書に記載される方法を実施するための取扱説明書を含む。

【０１３７】

1つの態様において、キットは、上記方法および／または使用を実施するための1つまたは複数の反応バッファを含む1つまたは複数の容器を含む。いくつかの態様において、キットは、市販のPCR機器（たとえば、Life Technologies 7500 FastDxまたはCepheid SmartCycler（登録商標）II）に使用するための、CDで提供され得るソフトウェア駆動アッセイプロトコルを含む。

【０１３８】

本明細書の中で使用されるように、単数形冠詞は、文脈が明らかにそうでないことを指示しない限り、複数の指示対象を含む。たとえば、「プライマー」は、それらの混合物を含め、複数のプライマーを含む。

【０１３９】

用語「実質的に」は「完全に」を除外しない。たとえば、Yを「実質的に含まない」組成物はYを完全に含まなくてもよい。必要ならば、本発明の定義から「実質的に」が省かれてもよい。

【０１４０】

別段指定されない限り、用語「含む」およびその文法上の変形は、挙げられた要素を含み、かつ、挙げられていないさらなる要素の包含をも許すような「開放的」または「包括的」な言葉を表すことを意図したものである。

【０１４１】

本明細書の中で使用されるように、組成物の成分の濃度に関する「約」は、一般には、述べられた値の±5%、より一般的には述べられた値の±4%、より一般的には述べられた値の±3%、より一般的には述べられた値の±2%、さらに一般的には述べられた値の±1%、さらに一般的には述べられた値の±0.5%を意味する。

【０１４２】

本開示を通じて、特定の態様は範囲型式で開示され得る。範囲型式における記載は単に簡便さおよび簡潔さのためであり、開示された範囲に対する不変的限定と解釈されるべきではないことが理解されよう。したがって、範囲の記載は、具体的に開示される可能なすべての部分的範囲およびその範囲内の個々の数値を有するものとみなされるべきである。たとえば、1～6などの範囲の記載は、具体的に開示される部分的範囲、たとえば1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6など、およびその範囲内の個々の数値、たとえば1、2、3、4、5および6を有するものとみなされるべきである。これは、範囲の広さにかかわらず当てはまる。

【０１４３】

また、本明細書中、特定の態様は幅広く総称的に記載され得る。総称的開示の範囲に入るより狭い種および下位概念的分類それぞれもまた、本開示の一部を形成する。これは、任意の主題を総称から除く（削除された物が本明細書の中で具体的に述べられているかどうかにかかわらず）条件または否定的限定をもって、態様の総称的記載を含む。

【実施例】

【０１４４】

実験セクション
実施例1－血液から細胞を捕捉および回収するためのデバイス
図1Aは、上端に入口を有し、下端に出口を有するインサートスリーブを示す。インサートスリーブは、細胞捕捉シーブをデバイスのカラムの出口近くに確保する、細胞捕捉シーブのハウジングとして機能する。試料がインサートスリーブの入口から流入し、インサートスリーブの出口を通って流出する。図1Bは、試料が中を流れるチャネルがインサートスリーブの下端で細くなる様子を示す。図1Cは、カラム内のインサートスリーブと細胞捕捉シーブとのアセンブリを示す。まず、細胞捕捉シーブ（2つのOリングの間に挟まれている）がインサートスリーブの出口近くでスロットの中に配置され、次いで、ロッドの形態の挿入ツール（図示せず）を使用することによってインサートスリーブアセンブリ全体がカラムに挿入される。図1Dは、蠕動ポンプに接続されている2つの細胞捕捉および回収デバイスを示し、図3Aは、ケイ素マイクロシーブ（挿入図、スケールバー＝10μm）をそれぞれが包囲する4つの精密濾過デバイスが流量制御のための蠕動ポンプに接続されている、精密濾過装置の別の例示的な構成を示す。血液試料をデバイスに通して濾過した。様々な孔径の細胞捕捉シーブを使用して、汚染性の白血球（WBC）および赤血球（RBC）の除去を試験した。結果が図1Eに示されている。全血1mlをデバイスに通して濾過した。汚染性のWBCおよびRBCを回収し、カウントした（黒い棒）または、短時間、蠕動ポンプの流れを逆転（「バックフラッシュ」）させて、シーブに貼り付いた細胞を取り除いたのち、回収し、カウントした（白い棒）。除去倍率は以下のように計算した。
WBCまたはRBCの除去倍率＝（全血中のWBCまたはRBC）／（精密濾液中のWBCまたはRBC）。
【０１４５】
図1E中の棒は、試験条件ごとに3つの異なるデバイスを用いた試験から得た平均値を表す。エラーバーは標準偏差を表す。
【０１４６】
CTCと同様な平均サイズを有するCRC細胞株である30個のSW620細胞でドナー血液1mlをスパイクすることにより、TECC富化および回収効率を最適化した（図1F）。0.25ml/minの流量および9～10μmの孔径を使用すると、回収効率と細胞純度との間の最適なトレードオフが得られた。
【０１４７】
様々な細胞株でスパイクされた全血を使用してデバイスの回収効率を試験した。結果が図1Gに示されている。各ドットプロットが独立実験に対応する。細胞20～50個/mlを標識し、全血1mlまたは3ml中にスパイクした。各血液試料をデバイスに通し、標的細胞を回収し、96ウェルプレートに入れ、カウントした。回収効能は以下のように計算した。
％回収効率＝（回収された細胞）×100／（スパイクされた細胞）。
【０１４８】
2つの異なる細胞株：HCT116およびRKO細胞株を使用して、装置を使用する捕捉効能と比べて細胞回収効率を試験した。30～50個の細胞を全血1ml中にスパイクし、回収した細胞を96ウェルプレートに入れ、カウントした。また、回収されずにシーブ上に残った細胞の数をカウントした。回収された細胞の数と回収されずにシーブ上に残った細胞の数とを合計することにより、捕捉された細胞の数を計算した。図2Aに示すように、孔径8μm、9μmおよび10μmのシーブを使用したとき、HCT116細胞の捕捉効率は90％を超え、回収効率は98％を超えた。図2Bに示すように、孔径8μm、9μmおよび10μmのシーブを使用したとき、RKO細胞の捕捉効率はそれぞれ約40％、68％および58％であった。しかし、捕捉されたRKO細胞の回収効率は、3つの異なる孔径のいずれを使用したときでも100％であった。
【０１４９】
図2Cに示す異なるフィルタ材料を使用して、細胞捕捉および回収効率をHepG2細胞で試験した。結果が、2つの異なるフィルタ材料、ケイ素および窒化ケイ素が同様な細胞捕捉および回収効率を提供したことを示す図2Dに示されている。

【０１５０】
実施例2－腫瘍由来内皮細胞クラスター（TECC）の捕捉および回収
患者試料および臨床データ
すべての対象は、参加する旨の書面によるインフォームドコンセントを提出していた。臨床試料は、シンガポール国立大学の施設内倫理委員会（IRB）、Fortis Surgical HospitalおよびSingapore Health Services（SingHealth）によって認められたプロトコルにしたがって2012年7月から2014年4月までの間に得られた。82名の大腸がん患者からの血液試料がFortis Surgical Hospital（FSH）およびシンガポール国立がんセンター（NCC）から継続的に提供された。45名の健常な対象からの血液試料がSingapore Consortium of Cohort Studies（SCCS）によって提供された。Institute of Bioengineering and Nanotechnologyにおいてすべての試料をEDTA Vacutainer管（Becton-Dickinson）に捕集し、6時間以内に処理した。精密濾過デバイスの技術的故障のため、2つの症例を分析から除外した。利用可能ならば、対応した腫瘍および転移試料を切除後ただち凍結し、使用するまで－80℃で貯蔵した。参加した対象の臨床病理データが補足表6に記載されており、TECCカウントの完了後に遡及的に収集されたものである。臨床データ収集は、TECCカウントの事前知識なしで実施した。同様に、大腸がん患者の臨床データは、FSH試料の診断および術前状態を除き、TECCカウント時には知られていなかった。腫瘍面積を幅×長さで計算した。
【０１５１】
細胞株および培養
HCT116、COLO201、SW480、SW620、DLD-1およびRKO大腸がん細胞株、BJ-5ta不死化ヒト包皮繊維芽細胞およびHUVECはATCCから入手したものであった。HUVECを継代1および2で使用し、EGM-2培地（Lonza）中で培養した。他のすべての細胞株は、10％FBSで補足されたDMEM（Life Technologies）中で培養した。細胞を加湿インキュベータ中、5％CO_2の存在下、37℃で維持した。
【０１５２】
デバイス作製およびアセンブリ
ケイ素マイクロシーブを記載（Lim et al.）のように作製した。簡単にいうと、マイクロシーブは、全直径（φ）7.3mmのケイ素ディスクおよび厚さ300μmの支持リングからなる。中央捕捉領域はφ5.3mmおよび厚さ60μmを有し、深掘り反応性イオンエッチングによって得られた100,000個の円形細孔を含む。マイクロシーブを無菌3mlシリンジに埋め込むために、マイクロシーブ細胞捕捉領域に相当する、φ8.58mmからφ5.54mmまで細くなる入口チャネルからなるアクリルスリーブインサートを設計した。スリーブインサートは、マイクロシーブと、図1Cに示すような、良好な封止およびクッションを保証するシリコーンOリング（厚さ0.5mm）とを収容した。回収デバイスを以下のようにアセンブルした。まず、3mlシリンジプランジャのゴムプラグを取り出し、パンチカッタを使用して直径5.5mmの穴を形成した。有孔ゴムプラグを3mlシリンジ中に配置した。次に、Oリングをスリーブインサートのスロットに配置したのち、マイクロシーブおよびもう1つのOリングを配置した。最後に、マイクロシーブおよびOリングを有するスリーブインサートを、3mlシリンジ中、有孔ゴムプラグよりも上に配置した。この配置が、従来の構成で、全血からサイズによる細胞の精密濾過およびその後の、マイクロシーブの上面からの捕捉された細胞の回収を可能にした。
【０１５３】
精密濾過
血液精密濾過を最適化するために、5μM CellTracker（Life Technologies）標識細胞をドナー血液に全血1mlあたり10～50個で加えた。蠕動ポンプ（Ismatec）により、様々な流量で血液を濾過した。PBS、0.5％BSAおよび2mM EDTAを使用する6回の洗浄ののち、細胞を培地中に再懸濁させた。その後、Hoechst 33342（Life Technologies）を使用して細胞核を染色し、細胞を回収して回収効率および汚染性WBCの除去倍率を決定した。いくつかの実験においては、マイクロシーブ上に残ったCellTracker陽性細胞もカウントした。％回収効率は以下のように計算した。

％回収効率＝（回収された細胞）×100／（スパイクされた細胞）
除去倍率は以下のように計算した。
WBCまたはRBCの除去倍率＝（全血中のWBCまたはRBC）／（精密濾液中のWBCまたはRBC）
【０１５４】
精密濾液中のWBCカウントは、実験富化の場合には任意のHoechst 33342陽性CellTracker陰性イベントの数と定義され、臨床試料分析の場合には任意のCD45陽性イベントによって定義される。すべての臨床試料は、図3Bの説明に記載された最適化パラメータを使用する表記の下流側用途、すなわち画像化、カウント、単一の細胞単離および分析、細胞培養またはプールされた核酸抽出のために、ただちに処理した。理想的な標的WBC除去を推定するために、50個のCellTracker陽性HCT116細胞を含有するPBMCの連続希釈物に対する顕微操作を実施した。五千倍の除去が、汚染性白血球なしの純粋なHCT116細胞の顕微操作を可能にした。理想的な標的回収効率は、既存の非標識CTC単離デバイス（Cima et al.）上、文献サーチに基づいて選択した。臨床試料の精密濾過は、デバイスごとに2mlの全血および最適な精密濾過条件を使用して実施した。
【０１５５】
回収効率と細胞純度との間の最適なトレードオフは、0.25ml min^{-1}の流量および9～10μmの孔径を使用した場合に得られた。これは、$>5\times10^{3}$倍の白血球除去で＞90％のSW620回収効率を生じさせ（図3D）、細胞カウント以外にも多様な下流側用途を可能にした。
【０１５６】
実施例3－捕捉および回収されたTECCの分析および特性決定
この実施例は、血液から単離することができ、
1）疾患の非常に早期でさえ、すべてのステージの腫瘍を診断し、
2）腫瘍の治療に対する応答性をモニタリングし、
3）腫瘍の治療に対する応答性を予測し、
4）腫瘍の血管特徴を予測する
のためのバイオマーカーとして使用することができる明確な内皮細胞（血管に由来する細胞）集団を同定し、分析する方法を記載する。
【０１５７】
方法は、それだけで使用されてもよいし、診断／予後診断検査の精度を高めるために標準的な診断／予後診断方法と組み合わされることもできる。たとえば、この方法は、大腸がんの診断を容易にするために、CEA計測（血中で計測される大腸がんのバイオマーカー）と組み合わされることもできる。
【０１５８】
シーブ上での免疫蛍光法
懸濁細胞を、0.5％BSA、2mM EDTAおよびヒトFcRブロッキング試薬（Miltenyi Biotec）を含有するPBS中で5回の洗浄ののち、以下の蛍光標識抗体：抗CD45 1:200（クローン2D1；eBioscience）、抗Ep-CAM 1:20（9C4、BioLegend）、抗CD31 1:20（WM59、BioLegend）、抗CD144 1:10（55-7H1、BD）、抗CD41 1:20（HIP8、BioLegend）抗CD42B 1:20（HIP1、BioLegend）を使用して、直接「シーブ上」で30分間染色した。細胞内抗原の場合、Inside Stainキット（Miltenyi Biotec）およびヒトFcRブロッキング試薬を以下の抗体：抗VWF 1:200（ウサギポリクロナールA 0082、DAKO、Life Technologies APEX抗体標識キットを使用して院内でAlexa 488またはAlexaに555コンジュゲートしたもの）、抗ビメンチン（V9、Santa Cruz Biotechnology）、抗pan Cytokeratin（C11、Cell Signaling Technology）とともに使用した。Hoechst 33342（Life Technologies）を使用して核を染色した。いくつかの実験においては、Calcein AM（Life Technologies）を使用して生細胞を同定した。洗浄工程ののち、細胞を回収し、画像化、カウントおよび／または顕微操作のために、懸濁中、倒立蛍光顕微鏡（IX81、Olympus）下で可視化した。MetaMorphソフトウェア（Molecular Devices）をCoolSNAP HQ2 CCDカメラ（Photometrics）とともに使用して画像を記録した。
【０１５９】

TECC確定およびカウント

本明細書に記載された方法を使用して、大腸がん患者の血液中の腫瘍由来内皮細胞集団を検出した。これらの細胞は、腫瘍血管系（腫瘍の血管）に由来する複数の細胞のクラスターを形成し（図8）、したがって、腫瘍由来内皮細胞クラスター（TECC）と同定された。TECCは以下のように定義される：「＞10μmの長軸を有し、少なくとも2つの明らかに別個の核を有し、CD31、VWFまたはCD144タンパク質を発現するが、CD45、CD41およびCD42Bを発現しない、血液から単離された任意の細胞または細胞クラスター」（図8B）。重要なことに、大きく分葉した単一の核または大きく丸い単一の核を有する巨核球細胞系に属する細胞集団は除外した。これらの細胞は、CD41およびCD42Bに関して陽性に染色される、TECCから容易に識別可能な特徴的な細胞形態を有し、治療を受けている大腸がん患者で主に認められたが、一部の健常ボランティアおよび治療未経験の大腸がん患者においても認められた。単一内皮細胞もまた、それがマイクロシーブを透過することを可能にするであろうその小さい直径のせいで、分析から除外した。これらの包含および除外基準を適用することにより、全血2mlから得た精密濾液を96ウェルプレートのウェルに加えることによってTECCをカウントした。短い遠心分離工程ののち、20×対物レンズを使用して標的ウェルを手作業で三回スキャンすることにより、TECCを同定し、カウントした。少なくとも1つのTECCの検出によって試料を陽性と決定した。

【０１６０】

図13に示すように、TECCカウントは、炎症マーカーまたは他の変数と相関しない。これは、TECCが、腫瘍とは無関係である炎症イベントまたは他の変数と直接的には関連しないことを示す。したがって、これは、TECCが腫瘍由来であることを裏付ける。

【０１６１】

TECCが腫瘍由来であるかどうかを決定する

TECCが腫瘍由来であったかどうかを試験するために、17名の大腸がん患者から、外科的腫瘍切除の0～24時間前と24～72時間後との対で試料を捕集した（n＝34）。腫瘍除去は内皮TECCの急激な減少を生じさせ、腫瘍とTECCとの間の直接的なリンクを裏付けた（図8Hおよび補足表5）。前立腺特異的膜抗原（PSMA）をコード化する遺伝子である葉酸ヒドロラーゼ（FOLH1）は、様々ながんタイプの腫瘍血管系中に特異的に発現するが、正常な血管系および末梢血中には存在しない。FOLH1は、事実、新鮮な大腸がん組織から単離された$CD31^{+}CD45^{-}$細胞および大腸がん患者7/10名の血液から単離されたTECC中には発現していたが、正常な組織から単離された内皮細胞中または健常ドナー末梢血単核細胞（PBMC）中には発現していなかった（図9）。この結果は内皮TECCの腫瘍起源をさらに裏付けた（図8）。加えて、TECCのRNA-Seqデータがいくつかの腫瘍内皮マーカーの発現を明らかにした（図11）。さらに、低い、または高いTECCカウントを有する患者に由来する腫瘍細胞中の血管をカウントすることにより、TECC数が、基礎にある腫瘍血管系の特徴と相関するかどうかが問われた。血管単位の中央数は異ならなかったが、内腔の中央数は、高いTECCカウントの患者において有意に高かった。合わせて考えると、大腸がん患者中のTECCは、悪性の実体ではなく、腫瘍由来の成熟内皮細胞のクラスターであることが示された。

【０１６２】

TECCと原発腫瘍との間の上記関係のため、次に、内皮TECCが大腸がんの情報提供的指標であるかどうかが問われた。125名の対象（45名の健常ボランティアおよび一連の80名の大腸がん患者）からの合計141の臨床標本からの内皮TECCをカウントした（上述の患者からのTECCカウントを含む）。少なくとも1つの内皮TECCが、大腸がん患者の76.2%（61/80）で認められたが、健常者の2.2%（1/45）でしか認められなかった（図12A）。治療未経験患者は、大腸がんの治療介入を受けた患者と比べて有意に高い内皮TECCカウントを示すことがわかった（図12C）。しかし、内皮TECCカウントは、腫瘍ステージ、遠隔転移のグレードまたは存在（補足表6および7）などの臨床パラメータまたは炎症マーカーを含む他の変数と関連しなかった。特に、時系列分析における内皮TECC数は、外科的切除イベントがTECC分布に対して最も強い影響を及ぼすことを示し、図8Hの結果を確認し、さらに、内皮TECCと原発腫瘍の存在との関係を裏付けた（図12B）。治療未経験患者の86.5%（45/52

）および健常対照者の2.2%（1/45）における内皮TECCの存在が、TECCカウントが大腸がん診断を支援するのに有用であり得ることを示した。治療未経験患者と健常対照者とを比較する受信者動作特性（ROC）曲線の曲線下面積（AUC）は0.930であり（図12D）、治療未経験早期CRC患者と健常対照者とを比較するROC曲線のAUCは0.923であった（図12F）。顕著にも、病態腫瘍ステージが低い（ステージ≦IIA）大腸がん患者もまた、86.4%（19/22）の症例で内皮TECCに関して陽性であり、AUC＝0.922であった（図12E）。合わせて考えると、これらの結果はさらに、内皮TECCカウントと原発腫瘍の存在との関係を確認した。そのうえ、健常者中ではなく治療未経験患者中の内皮TECCの広範な存在が、大腸がんの診断補助としての内皮TECCカウントの潜在的用途を示した。

【０１６３】

標的細胞同定、顕微操作および貯蔵

25mlシリンジに取り付けられたマウスピペットを使用して標的細胞を手作業でマイクロピペット操作した。簡単にいうと、明視野像、核染色および特異的蛍光シグナルによって、全細胞回収から細胞を同定した。次いで、標的単一の細胞またはTECCを洗浄バッファの10μl小滴にマイクロピペット移送したのち、適切なバッファ：scrmPCRの場合には2×反応バッファ（CellsDirect One-Step qRT-PCRキット、Life Technologies）5μl、全ゲノム増幅の場合にはPBS2μlまたは低入力RNA-Seqの場合にはSuperBlockバッファ（Thermo Scientific）2μlを含む0.2mlのPCRチューブに入れた。使用するまで細胞をただちに－80℃で貯蔵した。いくつかの場合、完全な精密濾液をスピンダウンし、さらなる使用まで－80℃で貯蔵した。

【０１６４】

単一の細胞RNAおよび突然変異分析PCR（scrmPCR）

EMTを受ける単一の細胞中のDNA突然変異の存在を確認するために、単一の細胞スケールでRNA転写産物の定量とDNA突然変異の検出とを同時に行うためのPCRプロトコルを確立した（単一の細胞RNAおよび突然変異分析PCRまたは「scrmPCR」）（図5、補足表1）。

【０１６５】

Primer-BLAST（Ye et al.）を使用してプライマーを設計した。RNA転写産物ごとに、エクソン－エクソン境界をまたぐプライマーまたは対応するゲノムDNA領域上の少なくとも1つのイントロンによって分けられたプライマーを設計した。突然変異分析のためのプライマーを、標的遺伝子のイントロン領域に結合するように設計した（補足表1）。scrmPCRを使用して、同じ細胞中のRNA転写産物を検出し、定量すると同時にDNAホットスポットをシークエンシングすることもできる。簡単にいうと、Superscript III逆転写酵素（Invitrogen）および500nM標的リバースプライマーのミックスを使用して、単一の細胞RNA転写産物を50℃で30分間逆転写した。次いで、Platinum Taq DNAポリメラーゼ（Invitrogen）を使用して、フォワードプライマーの対応するミックスを転写産物特異的リバースプライマーおよび標的ゲノム領域のためのプライマー対に加えることにより、前増幅ラウンドを実施した。以下のように、伸長なしでアニーリング工程および変性工程を交互に実施することにより、前増幅サイクリングを実施した。60℃で4分、95℃で1分の6×サイクル；55℃で4分、95℃で1分の6×サイクル；50℃で4分、95℃で1分の6×サイクル。Axyprep PCRクリーンアップキット（Axygen）を使用してプライマークリーンアップを実施した。試料を1/20に希釈し、さらなる使用まで－20℃で貯蔵した。RNA転写産物定量化の場合、ViiA7計器（Applied Biosystems）上、2μlの前増幅反応、セミネステッドプライマー対を標的転写産物（補足表1）にしたがって使用し、SensiFAST SYBR Lo-ROXキット（Bioline）を製造者のプロトコルにしたがって使用して、定量的PCRを実施した。ACTBを参照遺伝子として使用して相対遺伝子発現を正規化した。選択されたDNA突然変異ホットスポットを分析するために、2μlの前増幅反応、セミネステッドPCRプライマー対（補足表1）およびプルーフリーディングポリメラーゼを含有するマスタミックス（KOD Hot Start Master Mix、EMD Millipore）を製造者の取扱説明書にしたがって使用して、PCRを実施した。腫瘍および正常組織中のKRASエクソン2シークエンシングの場合（図6d）、以下のフォワードプライマー

TTTGTATTAAAAGGTACTGGTGGAG
およびリバースプライマー
CCTTTATCTGTAT CAAAGAATGGTC
を使用してPCR増幅を実施した。PCR産物をアガロースゲル上で分離し；特異的なバンドを切除し、サンガー法を使用してシークエンシングした。

【０１６６】

図6aは、TECCの場合の例示的なscrmPCRワークフローを提供する。scrmPCR法をワークフローにしたがって使用してTECC試料を分析した。4名の患者に由来する9つのTECCのscrmPCRが、乳がんCTCに関して以前に報告されている上皮間葉プロファイルと合致する、SERPINE1、FOXC1およびKRT8を含む上皮および間葉マーカーの存在を明らかにした（図6bおよび6c）。これらの結果はpanCKおよびビメンチン免疫染色によって確認された（図7a）。次に、これらのTECCを、対応する原発腫瘍中に存在する突然変異に関してシークエンシングした。驚くことに、試験したすべてDNA配列ホットスポットが野生型対立遺伝子と対応した（図6d）。さらに、ターゲットハイスループットDNAシークエンシングを、16の単一TECC（6名の患者）および対応する腫瘍組織から増幅されたDNA中の8つの共通に突然変異した遺伝子に適用した。ここでもまた、腫瘍組織と対応するTECCとの間の対応する突然変異（補足表2および3）を検出することはできなかった。次に、12のTECC（4名の患者）からの増幅DNAを使用して、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション（aCGH）を実施した。事実、肺がん患者からのCTCは、がん組織コピー数変化を再現可能に反映することが示された。ここでは、TECCは、代わりに、対応した原発腫瘍とは対照的に、正常な細胞遺伝学的プロファイルを有した（図6e～g）。要するに、10名の患者からの26のTECCの単一の細胞スケール分析は、上皮間葉マーカー発現を示しながらも、対応する腫瘍組織中に見られるDNA異常を反映しなかった。これは、腫瘍上皮とは無関係であるTECCのソースを暗示した。

【０１６７】

核酸抽出

RNAqueous-Micro全RNA単離キット（Ambion）を製造者の取扱説明書にしたがって使用して完全な精密濾液または単離細胞をRNA抽出に供した。RNeasyミニキット（Qiagen）を使用して組織から全RNAを単離した。DNeasyミニキット（Qiagen）を使用して組織からDNAを単離した。

【０１６８】

TECCターゲットリシークエンシングおよびアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション（aCGH）

GenomePlex単一の細胞全ゲノム増幅キット（Sigma）を使用し、製造者の取扱説明書にしたがって、単一TECCを全ゲノム増幅に供した。同じ手法を使用して組織DNA（50pg）試料を増幅した。ターゲットリシークエンシングの場合、NRAS、CTNNB1、PIK3CA、EGFR、BRAF、PTEN、KRAS、AKT1およびTP53遺伝子（約6.1kb）のためのエクソンをターゲットとするカスタム遺伝子パネルを設計した。Ion AmpliSeqライブラリキット2.0（Life Technologies）を入力DNA10ngとともに使用してライブラリを構築した。Ion Torrent Personal Genome Machine（PGM）シークエンサ（Life Technologies）上でターゲットリシークエンシングランを実施した。高ストリンジェンシー設定でIon Torrent Variant Caller Pluginを使用して変異コールを実施した。DNA250ngをCytoScan 750 Kアレイ（Affymetrix）に製造者の取扱説明書および試薬でハイブリダイズさせることにより、aCGHを実施した。Chasソフトウェアversion 2.1（Affymetrix）を使用してデータを分析し、可視化した。図6fはaCGH分析の結果を示す。線は、Affymetrix ChASソフトウェアを使用して計算された平滑化データを示す。星印は、腫瘍試料中で検出された大きな染色体異常を示す。TECC中に染色体異常を発見することはできず、TECCが腫瘍上皮に由来しないことを示したことに注目すること。そのようなものとして、TECCは、以前に記載されている悪性CTCクラスターとは異なる。

【０１６９】

TECCおよび組織cDNA合成およびRNA-Seq

8名の患者からの18の単一TECCならびに対応する正常結腸組織および腫瘍組織をハイスループットシークエンシング（RNA-Seq）によってRNA発現プロファイリングに供した（図9c、補足表4）。SMARTer Ultra Low RNAキット（Clontech Laboratories）により、それぞれ25サイクルおよび18サイクルの長距離PCR（LDPCR）を使用して、単一TECCおよび組織RNA10pgからcDNAを合成した。試料ごとに、Adaptive Focused Acousticsシステム（Covaris）を使用してcDNAを剪断した。NEBNext DNA Library Prep Master Mixキット（New England Biolabs）を使用してライブラリを構築した。ユニークインデックスを使用してすべてのライブラリをバーコード化し、Illumina HiSeq 2000プラットフォームでのRNAシークエンシングランのためにプールした。Tophat（version 2）（Trapnell et al., 2009）を使用してデータをHuman Genome version 19（hg19）にマッピングした。Cufflinks（version 2.2）（Trapnell, C. et al., 2010）を使用して、遺伝子発現をFPKM（Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads）として定量化した。

【０１７０】

さらに、転写プロファイルから細胞系を推論するためのワークフローを開発した（図14および15）。42の異なる細胞タイプを含む比較（図9a～9c）において、すべてのTECCトランスクリプトームが内皮細胞系の細胞タイプと対応した（図9c）。一連の内皮細胞系マーカーの存在をscrmPCRによる一般的なEMTマーカーとともにさらなる14のTECC中で確認した（図8）。内皮細胞は特殊上皮と考えられ、ビメンチン（しばしば間葉マーカーとして使用される）および様々なケラチン（典型的な上皮のマーカー）の両方を発現することが知られている。内皮マーカー、たとえばCD31、VWFまたはCD144（図8B）に関して染色されたすべてのTECCは、例外なく、悪性の細胞形態を有するものを含め、CD45または巨核球細胞系のマーカーCD41およびCD42Bに関して陰性であった。これは、大腸がん患者において、検出されたすべてのTECCが内皮起源であることを示した。加えて、TECC内の単一腫瘍細胞は検出されなかった。本発見は、腎臓がん患者からの循環非血液学的細胞（CNHC）上のCD31発現を報告したEl-Heliebi et al.とは合致していたが、悪性起源のCTCクラスターを記載した最近の報告（Aceto et al.）とは異なるものであった。Aceto et al.に記載されたCTCクラスターのRNA-Seqデータからの細胞系推論は、実際、上皮由来細胞の存在を示した。したがって、本研究において特性決定されたTECCは、大腸がん患者における循環内皮細胞クラスターの異なる集団を表したものである。

【０１７１】

RNA-Seqデータ主成分分析

完全なRNA-Seqデータセットに対する主成分分析（図9a～c）を実施した。第一から第三までの主成分における最大負荷によって選別された上位300の遺伝子を選択することにより、順位相関係数を計算した。このリストから、各TECCおよび組織に関してスピアマン順位相関係数（ρ）を計算し、得られたデータをヒートマップとしてプロットした。平均連結クラスターリングによってデンドログラムを生成した。

【０１７２】

RNA-Seqデータ細胞系推論

細胞系推論のためのワークフローが図14に示され、要求に応じて利用可能なRスクリプト中で実施された。簡単にいうと、初代細胞アトラスデータセット（GSE49910）（Mabbott et al.）を取得し、298の異なる実験から、N＝42の異なる細胞タイプまたは「細胞系」に対応する発現データを選択した（図15）。各細胞系l中の遺伝子gごとに、シャノン情報エントロピーおよびSchug et al.らによって導入されたQ統計量に基づいて「特異性指数」Sを計算した。

$$S_{(l|g)} = -\sum_{l=1}^{N} p_{(l|g)} \cdot \log_2(p_{(l|g)}) - \log_2(p_{(l|g)})$$

式中、p(l|g)は、細胞系lにおける遺伝子gの相対的発現である。BioGPSを使用して、特異性指数が高い遺伝子の発現データを可視化することによって、遺伝子特異性を確認した

（図14）。細胞系ごとに、特異性指数が最も高い上位80個の遺伝子（特異的遺伝子）を選択した（図14a）。本明細書で報告される分析において最良の解を提供したため、80個の遺伝子を選択した。次に、各RNA-Seq試料について、各細胞系に特異的な遺伝子の数を計算した。同時に、Affymetrix HG-U133_Plus_2遺伝子リストから80個のランダムに選択された遺伝子のリスト×1,000を生成し（「ランダム遺伝子」）、各実験RNA-Seqプロファイル中に偶然に存在する遺伝子の平均数を決定した。最後に、各実験試料中の試験された細胞系ごとにフィッシャーの正確確率検定を実施することにより、富化された特異的遺伝子の数が、ランダムに富化された遺伝子の数に等しいかどうかを検査した。検定ごとのオッズ比を平均中心化し、スケーリングし、試験したすべての細胞系を含むヒートマップ中に可視化した。最終的な結果を使用して、正規化されたオッズ比の分布に基づいて、細胞系に関する仮説を立てた。様々な細胞タイプおよび組織から生成された公表されているRNA-Seqデータセットを使用してアルゴリズムをバリデートした（図15）。

【０１７３】

内皮前駆細胞（EPC）アッセイ

以前に記載されているようにして（Kalka et al., Colombo et al.）、コロニー形成性EPCアッセイを実施した。簡単にいうと、2ml精密濾液中、生きた内皮TECCをCD144およびカルセインAM蛍光染色によってカウントした。次いで、第二のデバイスからの血液2mlからの染色されていない精密濾液を、フィブロネクチン（1μg/cm^2）（Sigma-Aldrich）でコートされた96ウェルプレート上、EGM-2細胞培地（Lonza）の存在下で培養した。インキュベーションの前に明視野顕微鏡検査によってTECCの存在を確認した。以下のように、HUVECを陽性対照として使用した。10,000個のHUVECをドナー血液2ml中にスパイクし、2つのデバイスを使用する精密濾過によって単離した。1つのデバイス中、回収されたHUVECをCD144およびカルセインAM蛍光染色によって定量化した。他方のデバイスから回収されたHUVECを所定の数（5、10、20、40、80および160個）にて8個一組でウェル中に播種した。2日後、培地を交換し、一日おきに培地の半分を交換しながら合計30日間、細胞を増殖させた。コロニーの存在および生存度を明視野顕微鏡下で毎週モニタリングした。30日後、トリプシン処理によって細胞を剥がし、CD144抗体、カルセインAMおよびHoechst 33342を使用して染色し、IX81（Olympus）倒立蛍光顕微鏡下で定量化した。

【０１７４】

微小血管密度および内腔カウント

以前に記載されているように（Wild et al., Gupta et al.）、ImageJ（Schneider et al.）を使用して、CD31染色組織切片の免疫蛍光画像を使用して微小血管密度（MVD）カウントを実施した。簡単にいうと、新鮮な組織をTissue-Tek O.C.T Compound（Sakura）に埋め込み、さらなる使用まで－80℃で貯蔵した。すべての利用可能な組織から、5マイクロメートルクリオスタット切片をポリ-L-リシンスライド上で切り出し、4％パラホルムアルデヒドを含有するPBS中で8分間固定し、PBS中で洗浄し、PE抗CD抗体（1：20、クローンWM59、BioLegend）を使用して染色した。組織切片ごとの全腫瘍面積をIX71顕微鏡システム（Olympus）およびMetaMorphソフトウェア（Molecular Devices）によって10×対物レンズで画像化した。画像化の前ならびにMVDおよび内腔カウントの間じゅう、データ取得および分析中の主観的偏りを回避するために患者IDを伏せておいた。

【０１７５】

新鮮な組織からの内皮細胞単離

以前に記載されているように（Van Beijnum et al.）、ただしプロトコルに小さい変更を加えて、正常な結腸組織および腫瘍組織から内皮細胞を単離した。簡単にいうと、新鮮な組織を切り刻み、記載のようにコラゲナーゼ、ディスパーゼおよびDNAseを使用して37℃で60分間消化させた。Ficoll-Paque密度遠心分離工程ののち、MACS試薬および材料（Miltenyi Biotec）を製造者の取扱説明書にしたがって使用して二工程磁気選択を実施した。まず、抗CD45磁性ビーズおよびヒトFcRブロッキング試薬で細胞を標識したのち、CD45$^-$発現細胞をLDカラム上で負の選択によって除去した。次に、CD45除去分画を捕集し、抗CD31磁性ビースおよびヒトFcRブロッキング試薬を加えることによって第二の標識を実施し

た。MSカラムを使用する正の選択ののち、$CD31^{+}CD45^{-}$細胞が富化された分画をさらなる使用まで－80℃で貯蔵した。

【０１７６】

大腸がん以外のがんの患者におけるTECCの検出

TECCは、大腸がん患者の血液中に検出することができるだけでなく、他の悪性腫瘍、たとえば乳がん、前立腺がん、腎臓がん、移行上皮細胞がん、肺がんおよび胆管がんの患者においても検出することができる（表3および4を参照）。したがって、TECCのバイオマーカーを、任意のタイプのがんの検出ならびに化学療法および手術などの治療の転帰のモニタリングおよび予測のために使用することができる。

【０１７７】

（表３）TECCカウントは、異なるタイプの転移性疾患の患者における治療に対する応答性と相関する。治験の詳細は、clinicaltrials.govで、以下のID：NCT02435927を使用してアクセスすることができる。

患者ID	疾患	ベースラインでのTECCカウント	治療後のTECCカウント	全標的RECIST応答（治療後のTECCカウントでの)
ASLAN-0003-FST	転移性胆管がん	22	3	-30%
ASLAN-0004-HCH	転移性乳がん	14	2	-4%
ASLAN-0006-CAM	転移性大腸がん	25	2	-11%
ASLAN-1002-GMC	転移性大腸がん	13	0	-27%
ASLAN-1005-NBC	転移性大腸がん	26	5	+2%
ASLAN-1010-YLB	転移性大腸がん	17	6	-42%

【０１７８】

（表４）手術前および手術後の移行性上皮細胞がん患者におけるTECCカウント

患者ID	疾患	ベースラインでのTECCカウント	治療後のTECCカウント	治療タイプ
TCC-001	移行性上皮細胞がん	33	4	手術
TCC-002	移行性上皮細胞がん	58	12	手術
TCC-003	移行性上皮細胞がん	208	4	手術
TCC-004	移行性上皮細胞がん	0	0	手術

【０１７９】

統計分析

R環境で統計分析を実施した（version 3.1.0）（R Core Team et al.）。複数の比較の場合、両側ウィルコクソン・マン・ホイットニーU検定をボンフェローニ補正とともに使用して対応のない標本を試験した。試験ごとに、「コイン」パッケージ（Zeileis et al.）を使用して、位置パラメータ（ホッジス・レーマン推定量

$\hat{\Delta}$
）での正確なP値およびその95％信頼区間（CI）を計算した。対応のある標本の場合、両側正確確率ウィルコクソン符号順位検定を使用した。「pROC」パッケージ（Robin et al.）を使用して、ROC曲線をAUCおよび95％CI区間とともに計算した。効果量の容易な解釈および比較のために、統計的検定ごとの効果量rを以下のように導出した。

$$r = |Z|/\sqrt{n}$$

式中、Zは、ウィルコクソン・マン・ホイットニーU検定またはウィルコクソン符号順位検定のZスコアである（Rosenthal, et al.）。AUCからのrは、Rice & Harris（Rice et al.）に記載されているように導出した。Cohen（Cohen et al.）によって導入されたように、以下の解釈を適用した：r＝0.1、効果小；r＝0.3、効果中；r＝0.5、効果大。ボックスプロットが、四分位数範囲（IQR）を表すボックスとして示され、ボックスにかかる線は中央値を示し、ひげは1.5×IQRを示す。症例対照研究に必要な最小試料サイズを導出するために、まず、TECCの存在と大腸がんの存在との間に関係がないと仮定し（帰無仮説）、0.95のターゲットパワーの場合、「pwr」パッケージ（Champely et al.）のpwr.chisq.test関数を使用してn＝72の最小試料サイズを推定した。0.01の有意水準でw＝0.5の効果量を仮定した。w＝0.5は、5名の大腸がん患者の予備試験、陰性TECCカウントを示す4名の健常対照者から導出された情報ならびに健常者におけるTECCの非存在および様々ながんタイプの症例における広範なTECCの存在を報告した文献（補足表1）のレビューに基づいて選択されたものである。ケンドールのタウ（τ）係数およびその導出P値を使用して相関を試験した。RNA-Seqデータの細胞系推論および主成分分析のために、そのための方法段落に記載されたようにして、フィッシャーの正確確率検定およびスピアマン順位相関係数（ρ）をそれぞれ使用した。有意水準は0.05に設定した。星印1つ（*）、P＜0.05；星印2つ（**）、P＜0.01；星印3つ（***）、P＜0.001；非有意（ns）、P≧0.05。

【０１８０】

TECCの分析の結果および結論

大腸がん患者から単離されたTECCはがん性ではなく、腫瘍由来内皮細胞の別個の集団を表す。TECCは、対応する腫瘍の遺伝的変異を反映しないが、TECCは、CTC表現型に関する以前の報告と合致して、上皮および間葉転写産物を発現する。単一TECCのトランスクリプトーム分析は、内皮細胞としてのそれらの正体を明らかにし、さらなる結果が、それらの腫瘍起源および成熟表現型を示す。術前の早期がん患者から採取された血液中には内皮TECCの広範な存在が見られたが、健常ドナーにおいては見られず、大腸がんの潜在的指標としての内皮TECCカウントが示唆された。内皮TECCは真正CTCと混同されるべきではないが、その分析は診断的に有用であり、治療および疾患経過中に基礎となる腫瘍血管系に関する直接的な情報を提供する。

【０１８１】

結論として、大腸がん患者からの単一TECCの単離、回収および分析は、単一TECCのトランスクリプトームプロファイリングおよびTECCの腫瘍内皮起源に関する一連の証拠をはじめて提示する。内皮TECCは複数の細胞の構造として検出された。そのようなものとして、TECCは、大腸腫瘍進行中に認識された早期イベントである病的血管新生を受けている無秩序な腫瘍血管系から流出し得る。前臨床モデルが、循環中の腫瘍内皮細胞流出の基礎にある機序を明らかにし得、現在調査中である。進行した疾患の患者においてしばしば検出されるCTCとは対照的に、TECCは早期および術前の大腸がん患者によく見られる腫瘍由来実体である。したがって、内皮TECCカウントは大腸がん早期検出にとって興味深い方法である。この研究において、CTCクラスターの存在は、Aceto et al.に報告されているようには検出されなかった。これは、患者プロファイルの違いの結果であり得る。実際、Aceto et al.は末期乳がん患者からの血液試料を分析したが、この研究の血液試料は、大部分が術前大腸がん患者由来の試料であった。さらなる研究が、様々な疾患における循環内皮細胞クラスターの特異性を取り扱う必要がある。興味深いことに、組織特異的分子シグネチャが様々な臓器からの内皮細胞中で実証されており、特定の遺伝子セットの発現に基づいてTECCの出所の臓器を突き止め得ることを示している。悪性腫瘍、ケラチン発現および混

合上皮および間葉マーカープロファイルを暗示する細胞形態のため、内皮TECCは、EMTを受けている真正の悪性CTCと混同されるべきではない。同時に、内皮TECC分析は、大腸がん早期検出に寄与し、治療および疾患経過中に基礎となる腫瘍血管系に関する直接的な情報を提供し得る。

【０１８２】

参考文献

Aceto, N. *et al.* Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. Cell 158, 1110–1122 (2014).

Champely, S. pwr: Basic Functions for Power Analysis. (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2009).

Chard T, An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, Elsevier Science 1995, ISBN 0444821 198.

Cima, I. *et al.* Label-free isolation of circulating tumor cells in microfluidic devices: current research and perspectives. Biomicrofluidics 7, 011810 (2013).

Cohen, J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. (L. Erlbaum Associates, 1988).

Colombo, E., Calcaterra, F., Cappelletti, M., Mavilio, D. & Della Bella, S. Comparison of fibronectin and collagen in supporting the isolation and expansion of endothelial progenitor cells from human adult peripheral blood. PLoS One 8, e66734 (2013).

Coumans, F. A. W., van Dalum, G., Beck, M. & Terstappen, L. W. M. M. Filter characteristics influencing circulating tumor cell enrichment from whole blood. PLoS One 8, e61770 (2013).

Crowther, John R. The ELISA Guidebook, 1st ed., Humana Press 2000, ISBN 0896037282

El-Heliebi, A. *et al.* Are morphological criteria sufficient for the identification of circulating tumor cells in renal cancer? J. Transl. Med. 11, 214 (2013).

Gosling, Immunoassays: A Practical Approach, Oxford University Press, 2000.

Gupta, G. P. *et al.* Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. Nature 446, 765–770 (2007).

Kalka, C. *et al.* Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 3422–3427 (2000).

Lim, L. S. *et al.* Microsieve lab-chip device for rapid enumeration and fluorescence in situ hybridization of circulating tumor cells. Lab on a Chip 12, 4388–4396 (2012).

Mabbott, N. A., Baillie, J. K., Brown, H., Freeman, T. C. & Hume, D. A. An expression atlas of human primary cells: inference of gene function from coexpression networks. BMC Genomics 14, 632 (2013).

Marrinucci D. *et al,* 2012, Phys. Biol. 9016003

Peixoto, A., Monteiro, M., Rocha, B. & Veiga-Fernandes, H. Quantification of multiple gene expression in individual cells. Genome Res. 14, 1938–1947 (2004).

Price and Newman, Principles and Practice of Immunoassay, 2nd Edition, Grove's Dictionaries, 1997

R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2005).

Rice, M. E. & Harris, G. T. Comparing effect sizes in follow-up studies: ROC Area, Cohen's d, and r. Law Hum. Behav. 29, 615–620 (2005).

Robin, X. *et al.* pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. BMC Bioinformatics 12, 77 (2011).

Rosenthal, R. Meta-analytic Procedures for Social Research. (SAGE Publications, 1991).

Sanchez-Freire, V., Ebert, A.D., Kalisky, T., Quake, S.R. & Wu, J.C. Microfluidic single-cellreal-time PCR for comparative analysis of gene expression patterns. Nature protocols 7, 829-38 (2012).

Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature Methods 9, 671–675 (2012).

Schug, J. *et al.* Promoter features related to tissue specificity as measured by Shannon entropy. Genome Biol. 6, R33 (2005).

Trapnell, C., Pachter, L. & Salzberg, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics 25, 1105–1111 (2009).

Trapnell, C. *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. Nat.Biotechnol. 28, 511–515 (2010).

Wild, R., Ramakrishnan, S., Sedgewick, J. & Griffioen, A. W. Quantitative assessment of angiogenesis and tumor vessel architecture by computer-assisted digital image analysis: effects of VEGF-toxin conjugate on tumor microvessel density. Microvasc. Res. 59, 368–376 (2000).

Wu, C. *et al.* BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. Genome Biol. 10, R130 (2009).

Ye, J. *et al.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics 13, 134 (2012).

Van Beijnum, J. R., Rousch, M., Castermans, K., van der Linden, E. & Griffioen, A.W. Isolation of endothelial cells from fresh tissues. Nat. Protoc. 3, 1085–1091 (2008).

Zeileis, A., Wiel, M., Hornik, K. & Hothorn, T. Implementing a class of permutation tests: The coin package. J. Stat. Softw. 28, 1–23 (2008).

【０１８３】

補足表1～7

（補足表1）がん性実体として記載された血中循環腫瘍細胞クラスターまたはCTMを含む選ばれた刊行物（1959～2014）

#	年	CTMまたはCTCクラスターを がん性実体として報告した文献	悪性腫瘍と確定するために使用された実験的証拠
1	1959	Engell, H.	細胞形態
2	1960	Finkel, G. C., & Tishkoff, G. H.	細胞形態
3	1964	Seal, S. H.	細胞形態
4	1964	Seliwood, R. A. *et al.*	細胞形態
5	1965	Cole, W. H. *et al.*	細胞形態
6	1971	Song, J., *et al.*	細胞形態
7	1973	Griffiths, J. D. *et al.*	細胞形態
8	1975	Salsbury, A. J.	細胞形態
9	1979	Ejeckam, G. C. *et al.*	細胞形態/ミエロペルオキシダーゼ染色
10	1988	Glaves, D. *et al.*	細胞形態/CK 染色
11	1992	Aboulafia, D. M.	細胞形態/CK 染色
12	2000	Vona, G. *et al.*	細胞形態/AFP 染色
13	2001	Molnar, B *et al.*	ケラチン磁気標識
14	2004	Vona, G. *et al*.	細胞形態/AFP 染色
15	2004	Allard, W. J. *et al.*	細胞形態 /CD45ケラチン染色
16	2007	Paterlini-Brechot, P. & Benali, N. L.	細胞形態
17	2010	Stott, S. L. *et al.*	PSMA/CD45, CK7,8/CD45染色
18	2010	Hou, J. M. *et al.*	細胞形態 /CD45-NSE染色
19	2011	Hou, J. M. *et al.*	CD45/様々な上皮および間葉マーカー免疫染色
20	2011	Khoja, L. *et al.*	細胞形態 /CD45-CK 染色
21	2011	Desitter, I. *et al.*	細胞形態 /CD45-CK 染色
22	2011	Hofman, V. J. *et al.*	細胞形態
23	2011	Hofman, V. *et al.*	細胞形態
24	2012	Hou, J. M. *et al.*	EPCAM/CD45/CK/Ki67/Mcl-1染色
25	2012	Kling, J.	CD45-CK染色
26	2012	Cho, E. H. *et al.*	CD45-CK染色
27	2012	Krebs, M. G. *et al*.	細胞形態 /CD45
28	2012	Marrinucci, D. *et al.*	CD45-CK 染色
29	2013	Yu, M. *et al.*	上皮および間葉転写産物およびタンパク質マーカー、ハイスループット RNAシークエンシング
30	2014	Aceto, N. *et al.*	PSMA、EPCAM、CKを含む様々な染色。単一細胞ハイスループット シークエンシング

【０１８４】

（補足表2）単一TECCのターゲットハイスループットシークエンシングは対応する原発腫瘍突然変異を反映しない

患者13

遺伝子	位置	タイプ	接合生殖性	遺伝子型	ExonicFunc.refGene	P13-腫瘍
KRAS	KRAS:chr12:25398284	SNP	Het	C/T	非同義 SNV	NA
PIK3CA	PIK3CA:chr3:178936095	SNP	Het	A/G	非同義 SNV	NA
TP53	TP53:chr17:7574003	SNP	Het	G/A	ストップゲイン SNV	NA
TP53	TP53:chr17:7577120	SNP	Het	C/T	非同義 SNV	NA
TP53	TP53:chr17:7578202	DEL	Het	ACACTATGTCG/A		NA
TP53	TP53:chr17:7578407	SNP	Het	G/C	非同義 SNV	32.33082707
TP53	TP53:chr17:7578463	INS	Het	C/CG	フレームシフト挿入	NA
TP53	TP53:chr17:7578645	SNP	Het	C/T		NA

しきい値：10%

【０１８５】

（補足表2）単一TECCのターゲットハイスループットシークエンシングは対応する原発腫瘍突然変異を反映しない

患者10

遺伝子	P13-TECC 2	P13-TECC 3	P13-TECC 4	P13-TECC 5	P10-腫瘍	P10-TECC 1	P10-TECC 4	P10-TECC 5
KRAS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PIK3CA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	49.17458729	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	98.61111111	NA	NA	NA

しきい値：10%

【０１８６】

（補足表2）単一TECCのターゲットハイスループットシークエンシングは対応する原発腫瘍突然変異を反映しない

患者14

遺伝子	P10-TECC10	P10-TECC12	P14-腫瘍	P14-TECC1	P14-TECC2
KRAS	NA	NA	68.43291995	NA	NA
PIK3CA	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	47.32098147	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA

患者15

P15-腫瘍	P15-TECC5
NA	NA
59.67721935	NA
76.29072682	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA

しきい値：10%

【０１８７】

（補足表2）単一TECCのターゲットハイスループットシークエンシングは対応する原発腫瘍突然変異を反映しない

患者7

遺伝子	P7-腫瘍	P7-TECC6	P7-TECC8	P7-TECC9
KRAS	NA	NA	NA	NA
PIK3CA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA

患者8

P8-腫瘍	P8-TECC12
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA
[illegible]	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA

しきい値：10%

【０１８８】

（補足表3）希薄なTECC突然変異は対応する原発腫瘍組織中に検出されない

患者13

遺伝子	位置	タイプ	接合生殖性	遺伝子型	ExonicFunc.refGene	P13-腫瘍	P13-TECC2
AKT1	AKT1:chr14:105258943	SNP	Het	T/C	非同義SNV	NA	NA
AKT1	AKT1:chr14:105258954	SNP	Het	C/T	同義SNV	NA	NA
AKT1	AKT1:chr14:105258963	SNP	Het	A/G	同義SNV	NA	NA
AKT1	AKT1:chr14:105259001	SNP	Het	C/T	NA	NA	NA
AKT1	AKT1:chr14:105259015	SNP	Het	T/C	NA	NA	NA
BRAF	BRAF:chr7:140453027	SNP	Het	T/C	NA	NA	NA
BRAF	BRAF:chr7:140453110	SNP	Het	G/A	ストップゲインSNV	NA	NA
BRAF	BRAF:chr7:140453135	SNP	Hom	A/A	同義SNV	NA	NA
BRAF	BRAF:chr7:140453160	DEL	Het	AT/A		NA	NA
BRAF	BRAF:chr7:140453221	SNP	Het	G/T	NA	NA	NA
CTNNB1	CTNNB1:chr3:41265533	SNP	Het	A/C	NA	NA	NA
EGFR	EGFR:chr7:55240848	SNP	Hom	G/G	NA	NA	NA
EGFR	EGFR:chr7:55241616	DEL	Hom	T/T		NA	NA
EGFR	EGFR:chr7:55241661	SNP	Het	C/T	同義SNV	NA	NA
EGFR	EGFR:chr7:55241727	SNP	Het	G/A	同義SNV	NA	NA
EGFR	EGFR:chr7:55241730	SNP	Hom	T/T	同義SNV	NA	NA
EGFR	EGFR:chr7:55249014	SNP	Het	A/G	非同義SNV	NA	NA
EGFR	EGFR:chr7:55249133	SNP	Het	T/C	非同義SNV	NA	NA
EGFR	EGFR:chr7:55260481	SNP	Het	T/C	非同義SNV	NA	NA
EGFR	EGFR:chr7:55260492	SNP	Het	T/C	同義SNV	NA	NA
KRAS	KRAS:chr12:25378745	SNP	Het	A/G	NA	NA	12
KRAS	KRAS:chr12:25380190	SNP	Het	A/G	非同義SNV	NA	NA
KRAS	KRAS:chr12:25380261	SNP	Het	G/C	非同義SNV	NA	NA
KRAS	KRAS:chr12:25380262	SNP	Het	C/T	非同義SNV	NA	NA
KRAS	KRAS:chr12:25380285	SNP	Het	G/T	非同義SNV	NA	NA
KRAS	KRAS:chr12:25380307	SNP	Het	A/C	非同義SNV	NA	NA

【０１８９】

（補足表3）希薄なTECC突然変異は対応する原発腫瘍組織中に検出されない

患者13

遺伝子	位置	タイプ	接合生殖性	遺伝子型	ExonicFunc.refGene	P13-腫瘍	P13-TECC2
KRAS	KRAS:chr12:25380309	DEL	Het	GT/G		NA	NA
KRAS	KRAS:chr12:25398236	SNP	Het	A/G	非同義 SNV	NA	NA
NRAS	NRAS:chr1:115256498	SNP	Hom	T/T	ストップゲイン SNV	NA	NA
NRAS	NRAS:chr1:115258685	SNP	Het	C/T	非同義 SNV	NA	NA
PIK3CA	PIK3CA:chr3:178916625	SNP	Het	A/G	同義 SNV	NA	NA
PIK3CA	PIK3CA:chr3:178916635	SNP	Het	G/A	非同義 SNV	NA	NA
PIK3CA	PIK3CA:chr3:178916638	DEL	Het	TGGGGCATCCACTT/G		NA	NA
PTEN	PTEN:chr10:89685300	DEL	Hom	C/C		NA	NA
PTEN	PTEN:chr10:89690872	SNP	Het	T/C	NA	NA	NA
PTEN	PTEN:chr10:89690906	SNP	Het	T/C	NA	NA	NA
PTEN	PTEN:chr10:89692825	DEL	Het	CT/C		NA	NA
PTEN	PTEN:chr10:89692891	SNP	Het	A/G	同義 SNV	NA	NA
PTEN	PTEN:chr10:89692916	SNP	Het	A/T	非同義 SNV	NA	NA
PTEN	PTEN:chr10:89711843	SNP	Het	A/G	NA	NA	NA
PTEN	PTEN:chr10:89711866	SNP	Het	G/A	NA	NA	NA
PTEN	PTEN:chr10:89711910	SNP	Het	T/C	同義 SNV	NA	NA
PTEN	PTEN:chr10:89711998	SNP	Het	T/C	非同義 SNV	NA	NA
PTEN	PTEN:chr10:89720698	SNP	Het	A/G	同義 SNV	NA	NA
PTEN	PTEN:chr10:89720707	SNP	Het	C/T	同義 SNV	NA	NA
PTEN	PTEN:chr10:89720709	SNP	Het	C/T	非同義 SNV	NA	NA
TP53	TP53:chr17:7572967	SNP	Het	T/C	非同義 SNV	NA	NA
TP53	TP53:chr17:7573857	SNP	Het	A/G	NA	NA	NA
TP53	TP53:chr17:7576637	SNP	Het	T/A	非同義 SNV	NA	NA
TP53	TP53:chr17:7577102	SNP	Het	C/T	非同義 SNV	NA	NA
TP53	TP53:chr17:7577127	DEL	Het	CAA/C		NA	NA
TP53	TP53:chr17:7577396	SNP	Het	T/C	NA	NA	NA

【０１９０】

（補足表3）希薄なTECC突然変異は対応する原発腫瘍組織中に検出されない

患者13

遺伝子	位置	タイプ	接合生殖性	遺伝子型	ExonicFunc.refGene	P13-腫瘍	P13-TECC2
TP53	TP53:chr17:7577444	SNP	Het	A/G	NA	NA	NA
TP53	TP53:chr17:7577450	SNP	Het	A/G	NA	NA	NA
TP53	TP53:chr17:7577559	SNP	Hom	A/A	非同義 SNV	NA	NA
TP53	TP53:chr17:7578155	SNP	Het	A/G	NA	NA	NA
TP53	TP53:chr17:7578237	SNP	Hom	T/T	同義 SNV	NA	NA
TP53	TP53:chr17:7578297	SNP	Het	C/T	NA	NA	NA
TP53	TP53:chr17:7578369	DEL	Hom	A/A		NA	NA
TP53	TP53:chr17:7578385	SNP	Hom	T/T	非同義 SNV	NA	NA
TP53	TP53:chr17:7578389	DEL	Hom	G/G		NA	NA
TP53	TP53:chr17:7578399	SNP	Het	G/A	同義 SNV	NA	NA
TP53	TP53:chr17:7578400	SNP	Het	G/A	非同義 SNV	NA	NA
TP53	TP53:chr17:7578502	SNP	Het	A/G	非同義 SNV	NA	NA
TP53	TP53:chr17:7578645	SNP	Hom	T/T		NA	NA
TP53	TP53:chr17:7579393	SNP	Het	A/G	同義 SNV	NA	NA
TP53	TP53:chr17:7579432	SNP	Het	A/G		NA	14.814815
TP53	TP53:chr17:7579432	DEL	Het	AG/AGG		NA	NA

しきい値：10%

【０１９１】

（補足表3）希薄なTECC突然変異は対応する原発腫瘍組織中に検出されない

患者10

遺伝子	P13-TECC3	P13-TECC4	P13-TECC5	P10-腫瘍	P10-TECC1	P10-TECC4	P10-TECC5	P10-TECC10
AKT1	NA	NA	NA	NA	26869159	NA	NA	NA
AKT1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	12262357	NA
AKT1	NA	NA	NA	NA	15242464	NA	NA	NA
AKT1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	11668123	NA
AKT1	NA	NA	NA	NA	NA	39308963	NA	NA
BRAF	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BRAF	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BRAF	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BRAF	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CTNNB1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	13.173653
EGFR	NA	25.728643	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

【０１９２】

（補足表3）希薄なTECC突然変異は対応する原発腫瘍組織中に検出されない

患者10

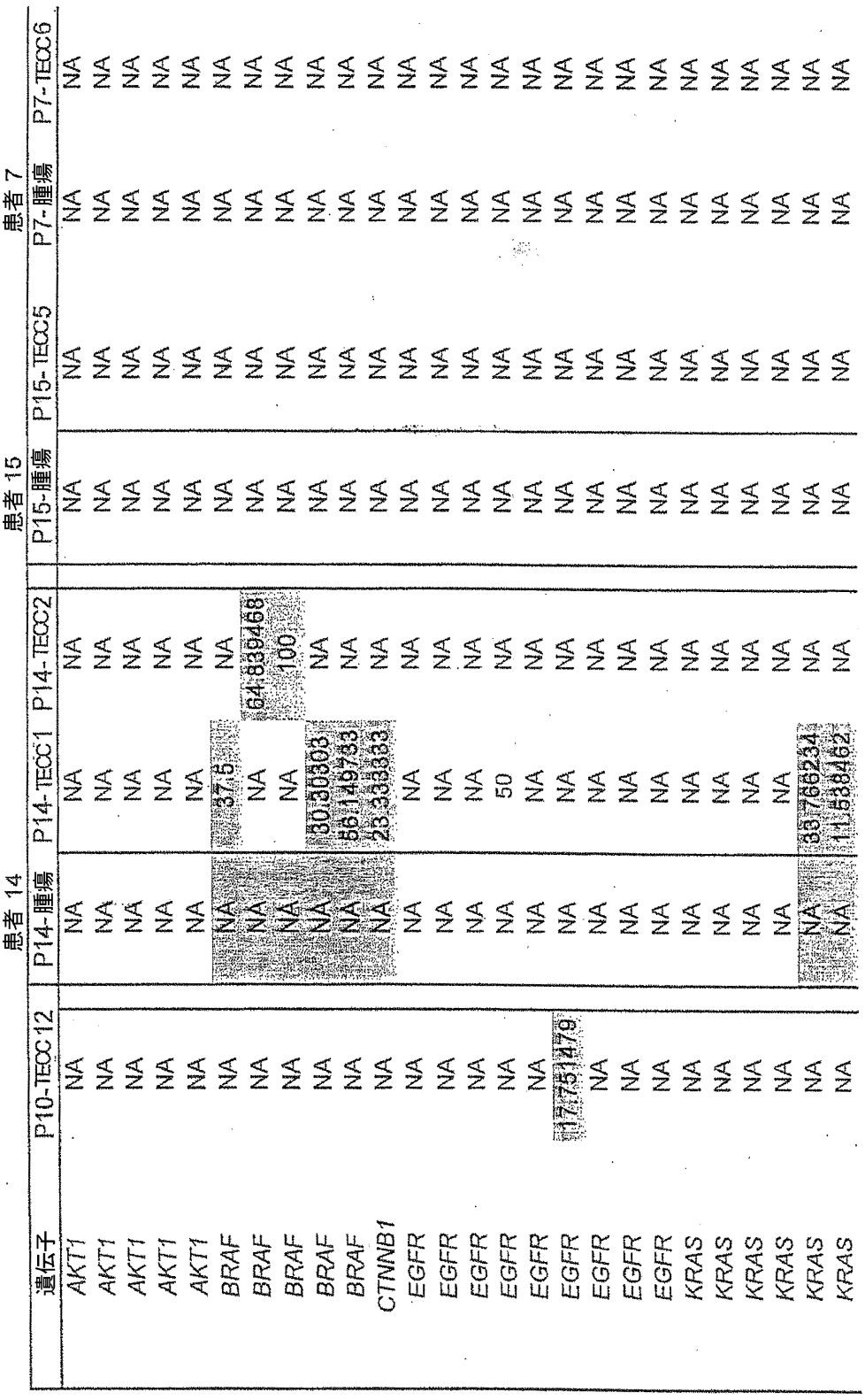
遺伝子	P13-TECC3	P13-TECC4	P13-TECC5	P10-腫瘍	P10-TECC1	P10-TECC4	P10-TECC5	P10-TECC10
KRAS	NA	NA	58.930373	NA	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NRAS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NRAS	NA	NA	20.731097	NA	NA	NA	NA	NA
PIK3CA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PIK3CA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PIK3CA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	100
PTEN	NA	NA	10.619469	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	13.293944
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	13.543307
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	14.035088	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	34.554974
TP53	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

【０１９３】

（補足表3）希薄なTECC突然変異は対応する原発腫瘍組織中に検出されない

患者10

遺伝子	P13-TECC3	P13-TECC4	P13-TECC5	P10-腫瘍	P10-TECC1	P10-TECC4	P10-TECC5	P10-TECC10
TP53	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA



患者	14				15			7		
遺伝子	P10-TECC12	P14-腫瘍	P14-TECC1	P14-TECC2	P15-腫瘍	P15-TECC5	P7-腫瘍	P7-TECC6
AKT1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AKT1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AKT1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AKT1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AKT1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
BRAF	NA	NA	37.5	NA	NA	NA	NA	NA
BRAF	NA	NA	NA	64.839468	NA	NA	NA	NA
BRAF	NA	NA	NA	100	NA	NA	NA	NA
BRAF	NA	NA	80.30303	NA	NA	NA	NA	NA
BRAF	NA	NA	86.149783	NA	NA	NA	NA	NA
CTNNB1	NA	NA	23.33333	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	50	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	17751479	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	83.766234	NA	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	11.538462	NA	NA	NA	NA	NA

【０１９５】

（補足表3）希薄なTECC突然変異は対応する原発腫瘍組織中に検出されない

患者14 患者15 患者7

遺伝子	P10-TECC12	P14-腫瘍	P14-TECC1	P14-TECC2	P15-腫瘍	P15-TECC5	P7-腫瘍	P7-TECC6
KRAS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	NA	42.857148	NA	NA	NA	NA
NRAS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NRAS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PIK3CA	NA	NA	22.418793	NA	NA	NA	NA	NA
PIK3CA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PIK3CA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	18.233296	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	10.344828	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	72.727273	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	47.727273	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	13.671429	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	19.088319	NA	NA	NA	NA	NA
TP53	10.515774	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

【０１９６】

（補足表3）希薄なTECC突然変異は対応する原発腫瘍組織中に検出されない

患者 14

遺伝子	P10-TECC12	P14-腫瘍	P14-TECC1	P14-TECC2
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	11.188811	NA
TP53	NA	NA	17.241379	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA

患者 15

P15-腫瘍	P15-TECC 5
NA	NA
NA	NA
NA	100
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA

患者 7

P7-腫瘍	P7-TECC6
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	100
NA	97.345133
NA	NA
NA	NA
NA	100
NA	NA
NA	NA
NA	NA
NA	NA

しきい値：10%

【０１９７】

（補足表3）希薄なTECC突然変異は対応する原発腫瘍組織中に検出されない

患者 8

遺伝子	P7-TECC 8	P7-TECC 9	P8-腫瘍	P8-TECC 12
AKT1	NA	NA	NA	NA
AKT1	NA	NA	NA	NA
AKT1	NA	NA	NA	NA
AKT1	NA	NA	NA	NA
AKT1	NA	NA	NA	NA
BRAF	NA	NA	NA	NA
BRAF	NA	NA	NA	NA
BRAF	NA	NA	NA	NA
BRAF	NA	NA	NA	NA
CTNNB1	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA
EGFR	35	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA
EGFR	23.880597	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA
EGFR	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	NA	19.626168
KRAS	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	NA	16.8
KRAS	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	NA	NA

【０１９８】

（補足表3）希薄なTECC突然変異は対応する原発腫瘍組織中に検出されない

患者 8

遺伝子	P7-TECC 8	P7-TECC 9	P8-腫瘍	P8-TECC 12
KRAS	NA	NA	NA	NA
KRAS	NA	NA	NA	NA
NRAS	NA	98.372966	NA	NA
NRAS	NA	NA	NA	NA
PIK3CA	NA	NA	NA	NA
PIK3CA	NA	NA	NA	91.941392
PIK3CA	NA	NA	NA	88.489209
PTEN	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA
PTEN	40	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA
PTEN	18.518519	NA	NA	NA
PTEN	19.48294	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA
PTEN	11.666667	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA
PTEN	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	10.714286	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA

【０１９９】

（補足表3）希薄なTECC突然変異は対応する原発腫瘍組織中に検出されない

患者8

遺伝子	P7-TEOC8	P7-TEOC 9	P8-腫瘍	P8-TEOC12
TP53	NA	13:157895	NA	NA
TP53	NA	18:421055	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	14:220183
TP53	NA	NA	NA	98:536685
TP53	NA	NA	NA	93
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	100
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA
TP53	NA	NA	NA	NA

しきい値：10%

【０２００】

（補足表4）RNA-seqデータ、hg19エクソンにユニークマッピングされたリード

ID	hg19エクソンにマッピングされたユニークリードの#
P10-T	9,824,250
P19-Met	9,200,220
P1-N	12,046,807
P1-TUc	11,627,650
P1-TUd	10,474,561
P1-TUs	12,120,551
P18-N	11,691,022
P18-T	10,077,598
P10-N	11,940,709
P21-N	12,115,725
P21-T	10,030,315
P20-N	9,710,218
P20-T	7,196,431
P8-N	9,574,544
P8-T	9,413,088
P19-N	9,868,631
P19-T	9,156,651
P8-TECC10	7,055,733
P8-TECC11	6,873,889
P16-TECC2	772,636
P21-TECC11	6,526,429
P19-TECC2	741,682
P1-TECC1	3,368,445
P1-TECC3	4,825,103
P1-TECC4	5,493,502
P10-TECC10	2,916,536
P18-TECC4	357,116
P18-TECC6	3,113,219
P20-TECC16	1,001,059
P20-TECC14	896,617
P1-TECC8	620,380
P18-TECC5	1,363,670
P8-TECC7	3,763,227
P20-TECC15	1,424,262
P18-TECC2	1,007,933

凡例：

P、患者

T、腫瘍組織

c、中心

d、深部

s、表在

N、正常組織

Met、転移

TECC、腫瘍由来内皮細胞クラスター

【０２０１】

（補足表5）術前および術後TECCカウント。図4eからのデータ

患者	TECC カウント 術前	術後
P05	9	6
P19	2	0
P22	124	0
P54	0	3
P64	4	0
P66	46	0
P67	1	0
P69	0	0
P71	79	2
P72	24	0
P73	48	0
P74	13	2
P75	3	0
P77	1	0
P78	1	0
P80	0	0
P82	36	0

術前：手術の0～24時間前の血中TECCカウント
術後：手術の24～72時間後の血中TECCカウント

【０２０２】

（補足表6）ベースライン患者および健常ドナーの特性

特性	患者	対照
合計, *n*	80	45
-年齢、歳、中央値（範囲）	60 (26-80)	45 (26-81)
-性別, *n* (%)		
男	48 (60)	19 (43)
女	32 (40)	25 (57)
-民族, *n* (%)		
中国系	56 (70)	
他	24 (30)	
-腫瘍部位 *n* (%)		
直腸S状部	57 (77)	
他	18 (23)	
-ステージ, *n* (%)		
≤ IIA	26 (35)	
IIB - IIIC	26 (35)	
IV	22 (30)	
-グレード, *n* (%)		
1-2	58 (89)	
3-4	7 (11)	
-転移CRC, *n* (%)		
M0 (遠隔転移なし)	54 (72)	
M1 (遠隔転移あり)	21 (28)	
-治療, *n* (%)		
未治療	52 (65)	
術前補助	11 (14)	
手術*	5 (6)	
補助	4 (5)	
対症	8 (10)	

*図3eからの術後データは含まれない

【０２０３】

（補足表7）ベースライン試料タイプごとのTECCカウントおよびこの研究で分析された単一TECCの数

患者ID	略号	入手先	ベースライン試料タイプ	TECCカウント*
ドナー 1	D01	NUH	健常	0
ドナー 2	D02	NUH	健常	0
ドナー 3	D03	NUH	健常	0
ドナー 4	D04	NUH	健常	0
ドナー 5	D05	NUH	健常	0
ドナー 6	D06	NUH	健常	0
ドナー 7	D07	NUH	健常	0
ドナー 8	D08	NUH	健常	0
ドナー 9	D09	NUH	健常	0
ドナー 10	D10	NUH	健常	0
ドナー 11	D11	NUH	健常	0
ドナー 12	D12	NUH	健常	0
ドナー 13	D13	IBN	健常	0
ドナー 14	D14	NUH	健常	0
ドナー 15	D15	NUH	健常	0
ドナー 16	D16	NUH	健常	0
ドナー 17	D17	NUH	健常	0
ドナー 18	D18	NUH	健常	0
ドナー 19	D19	NUH	健常	0
ドナー 20	D20	NUH	健常	0
ドナー 21	D21	NUH	健常	0
ドナー 22	D22	NUH	健常	0
ドナー 23	D23	NUH	健常	0
ドナー 24	D24	NUH	健常	0
ドナー 25	D25	NUH	健常	0
ドナー 26	D26	NUH	健常	0
ドナー 27	D27	NUH	健常	0
ドナー 28	D28	NUH	健常	0
ドナー 29	D29	IBN	健常	0
ドナー 30	D30	IBN	健常	0
ドナー 31	D31	IBN	健常	0
ドナー 32	D32	IBN	健常	0
ドナー 33	D33	NUH	健常	0
ドナー 34	D34	NUH	健常	0
ドナー 35	D35	NUH	健常	0
ドナー 36	D36	NUH	健常	0
ドナー 37	D37	NUH	健常	0
ドナー 38	D38	NUH	健常	0
ドナー 39	D39	NUH	健常	0
ドナー 40	D40	NUH	健常	0
ドナー 41	D41	NUH	健常	0
ドナー 42	D42	NUH	健常	0
ドナー 43	D43	NUH	健常	0
ドナー 44	D44	NUH	健常	9
ドナー 45	D45	NUH	健常	0
患者 01	P01	NCC	CRC - 治療未経験	49
患者 02	P02	NCC	CRC - 治療未経験	3
患者 03	P03	FSH	CRC - 治療未経験	7
患者 04	P04	NCC	CRC - 対症	17
患者 05	P05	NCC	CRC - 治療未経験	9
患者 06	P06	FSH	CRC - 術前補助療法後	0
患者 07	P07	FSH	CRC - 治療未経験～早期	26
患者 08	P08	FSH	CRC - 治療未経験～早期	76

【０２０４】

（補足表7）ベースライン試料タイプごとのTECCカウントおよびこの研究で分析された単一TECCの数

患者ID	略号	入手先	ベースライン試料タイプ	TECCカウント*
患者09	P09	FSH	CRC - 治療未経験～早期	52
患者10	P10	FSH	CRC - 治療未経験	26
患者11	P11	NCC	CRC - 対症	1
患者12	P12	NCC	CRC - 対症	0
患者13	P13	FSH	CRC - 治療未経験～早期	32
患者14	P14	FSH	CRC - 治療未経験～早期	3
患者15	P15	FSH	CRC - 治療未経験～早期	13
患者16	P16	FSH	CRC - 治療未経験	2
患者17	P17	FSH	CRC - 治療未経験	0
患者18	P18	FSH	CRC - 治療未経験～早期	9
患者19	P19	NCC	CRC - 治療未経験	2
患者20	P20	FSH	CRC - 治療未経験	80
患者21	P21	FSH	CRC - 治療未経験	16
患者22	P22	FSH	CRC - 術前補助療法後	124
患者23	P23	FSH	CRC - 治療未経験～早期	12
患者24	P24	FSH	CRC - 治療未経験～早期	23
患者25	P25	FSH	CRC - 治療未経験	45
患者26	P26	FSH	CRC - 治療未経験	5
患者27	P27	FSH	CRC - 治療未経験～早期	34
患者28	P28	FSH		NA
患者29	P29	FSH	CRC - 術前補助療法後	15
患者30	P30	FSH	CRC - 治療未経験	3
患者31	P31	FSH	CRC - 治療未経験	0
患者32	P32	FSH	CRC - 治療未経験～早期	18
患者33	P33	FSH	CRC - 術前補助療法後	3
患者34	P34	FSH	CRC - 治療未経験～早期	2
患者35	P35	FSH	CRC - 術前補助療法後	2
患者36	P36	FSH	CRC - 術前補助療法後	0
患者37	P37	FSH	CRC - 術前補助療法後	1
患者38	P38	FSH		NA
患者39	P39	FSH	CRC - 治療未経験	0
患者40	P40	FSH	CRC - 治療未経験～早期	1
患者41	P41	FSH	CRC - 治療未経験	2
患者42	P42	FSH	CRC - 治療未経験～早期	3
患者43	P43	FSH	CRC - 治療未経験	93
患者44	P44	FSH	CRC - 治療未経験	48
患者45	P45	FSH	CRC - 治療未経験	9
患者46	P46	FSH	CRC - 治療未経験	249
患者47	P47	FSH	CRC - 治療未経験～早期	0
患者48	P48	FSH	CRC - 治療未経験	6
患者49	P49	FSH	CRC - 治療未経験	25
患者50	P50	FSH	CRC - 治療未経験～早期	0
患者51	P51	NCC	CRC - 対症	24
患者52	P52	NCC	CRC - 対症	0
患者53	P53	NCC	CRC - 術後	0
患者54	P54	NCC	CRC - 術前補助療法後	0
患者55	P55	NCC	CRC - 術後	0
患者56	P56	NCC	CRC - 術後	0
患者57	P57	NCC	CRC - 補助療法後	0
患者58	P58	NCC	CRC - 補助療法後	6
患者59	P59	NCC	CRC - 対症	1
患者60	P60	NCC	CRC - 対症	0
患者61	P61	NCC	CRC - 術後	0

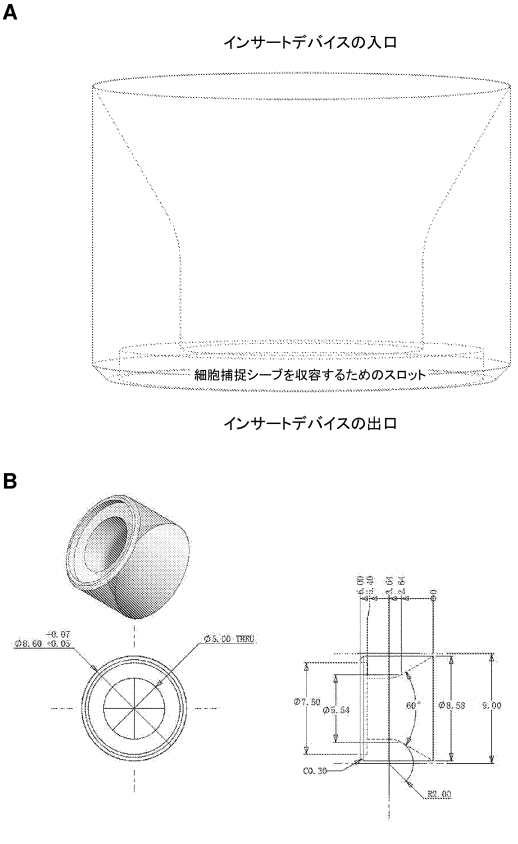
【０２０５】

（補足表7）ベースライン試料タイプごとのTECCカウントおよびこの研究で分析された単一TECCの数

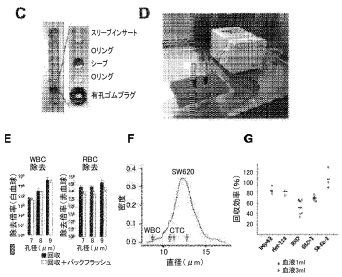
患者ID	略号	入手先	ベースライン試料タイプ	TECCカウント*
患者 62	P62	NCC	CRC - 対症	3
患者 63	P63	NCC	CRC - 術前補助療法後	40
患者 64	P64	NCC	CRC - 術前補助療法後	4
患者 65	P65	NCC	CRC - 術後	0
患者 66	P66	NCC	CRC - 治療未経験	46
患者 67	P67	NCC	CRC - 治療未経験	1
患者 68	P68	NCC	CRC - 補助療法後	0
患者 69	P69	NCC	CRC - 治療未経験～早期	0
患者 70	P70	NCC	CRC - 治療未経験	7
患者 71	P71	NCC	CRC - 治療未経験	79
患者 72	P72	NCC	CRC - 治療未経験～早期	24
患者 73	P73	NCC	CRC - 治療未経験	48
患者 74	P74	NCC	CRC - 治療未経験～早期	13
患者 75	P75	NCC	CRC - 治療未経験～早期	3
患者 76	P76	NCC	CRC - 治療未経験	12
患者 77	P77	NCC	CRC - 治療未経験～早期	1
患者 78	P78	NCC	CRC - 治療未経験	1
患者 79	P79	NCC	CRC - 治療未経験～早期	14
患者 80	P80	NCC	CRC - 治療未経験	0
患者 81	P81	NCC	CRC - 治療未経験	14
患者 82	P82	NCC	CRC - 術前補助療法後	36

凡例：
NUH、National Unversity Hospital Singapore
IBN、Institute of Bioengineering and Nanotechnology, Singapore
FSH、Fortis Surgical Hospital, Singapore
NCC、シンガポール国立がんセンター
CRC、大腸がん
早期、ステージ≦IIA
*図3fからの術後試料は含まれない

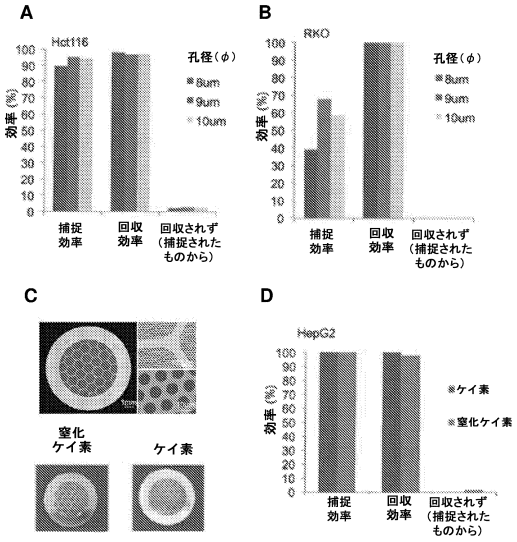
【図１－１】



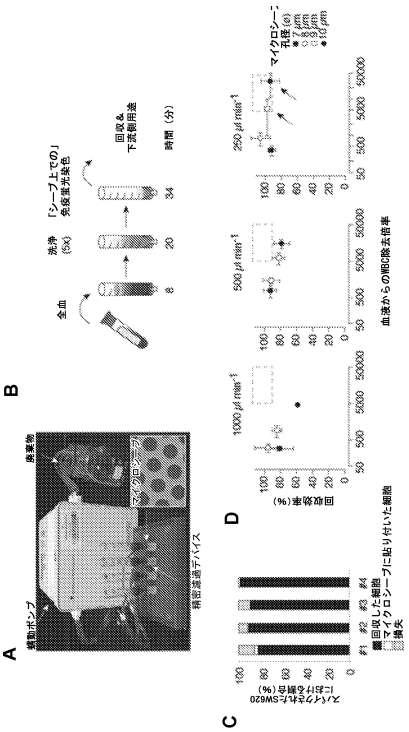
【図１－２】



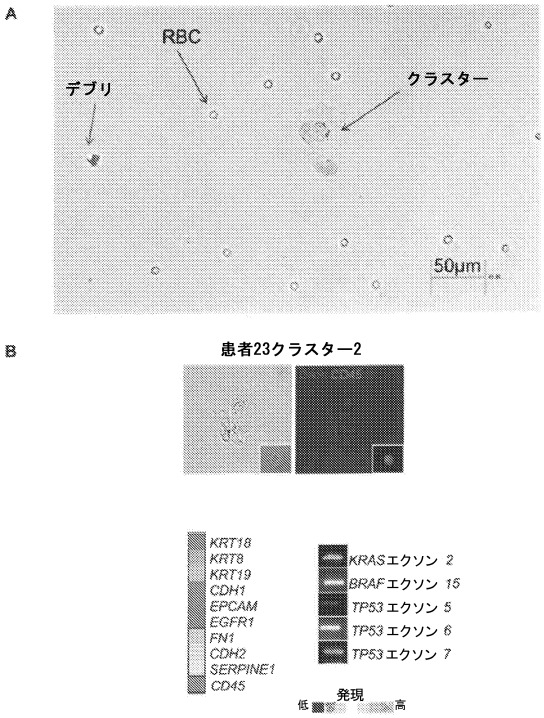
【図２】



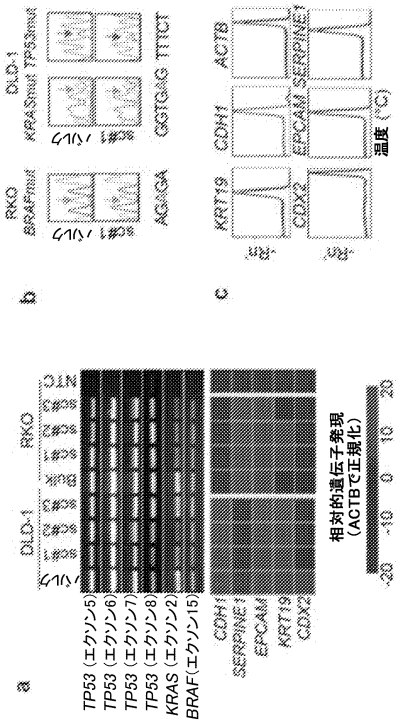
【図３】


A
B
C
D
全血
洗浄
[シーブ上での]
免疫蛍光染色
回収&
下流利用法
時間（分）
マイクロシーブ
精密濾過デバイス
蠕動ポンプ
廃液
回収率（%）
血液からのWBC除去倍率
回収した細胞
シーブに貼り付いた細胞
損失

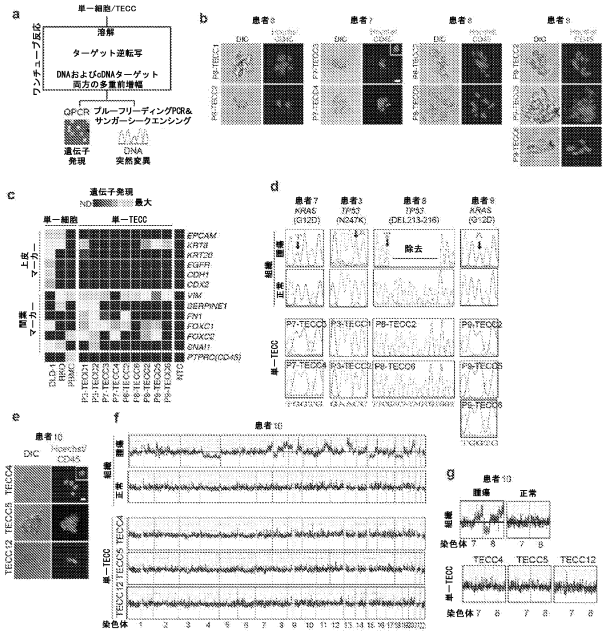
【図４】


A
RBC
デブリ
クラスター
50μm
B
患者23クラスター2
KRT18
KRT8
KRT19
CDH1
EPCAM
EGFR1
FN1
CDH2
SERPINE1
CD45
KRASエクソン 2
BRAFエクソン 15
TP53 エクソン 5
TP53 エクソン 6
TP53 エクソン 7
発現
低
高

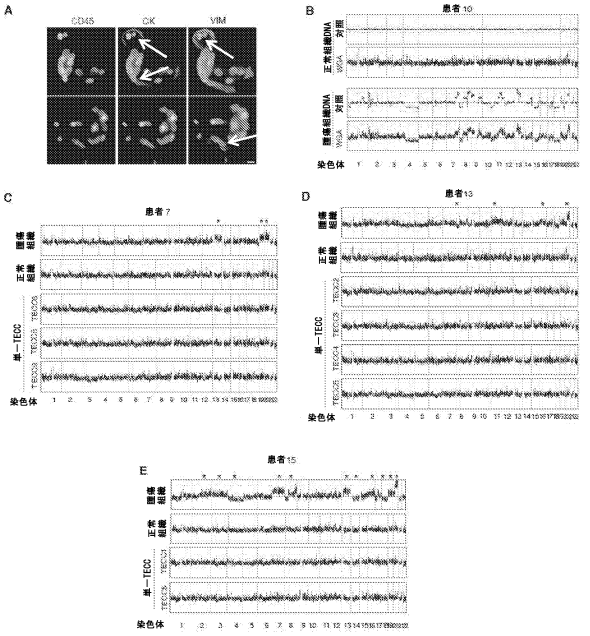
【図５】


DLD-1
KRASmut TP53mut
RKO
BRAFmut
GAGA
CGGTGAG TTTCT
ACTB
CDH1
KRT19
EPCAM SERPINE1
CDX2
温度（℃）
a
b
c
NTC
DLD-1
RKO
TP53（エクソン5）
TP53（エクソン6）
TP53（エクソン7）
TP53（エクソン8）
KRAS（エクソン2）
BRAF（エクソン15）
CDH1
SERPINE1
EPCAM
KRT19
CDX2
相対的遺伝子発現
（ACTBで正規化）

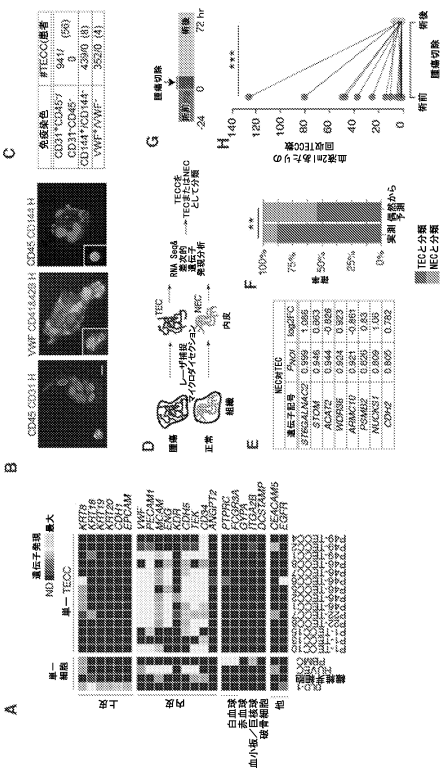
【図６】


a
単一細胞/TECC
溶解
ターゲット逆転写
DNAおよびcDNAターゲット
両方の多重前増幅
ワンチューブ反応
QPCR ブルーフリーディングPCR&
サンガーシーケエンシング
遺伝子
発現
DNA
突然変異
b
患者9
患者7
患者8
患者9
c
遺伝子発現
ND
最大
単一細胞
単一TECC
上皮
マーカー
間葉
マーカー
EPCAM
KRT8
KRT20
EGFR
CDH1
CDX2
VIM
SERPINE1
FN1
FOXC1
FOXC2
SNAI1
PTPRC(CD45)
d
患者7
KRAS
(G12D)
患者3
TP53
(N247K)
患者8
TP53
(DEL213-216)
患者9
KRAS
(G12D)
除去
増幅
正常
単一TECC
e
患者10
DIC
Hoechst/
CD45
TECC4
TECC5
TECC12
f
患者10
単一TECC
染色体
g
患者10
腫瘍
正常
TECC4
TECC5
TECC12

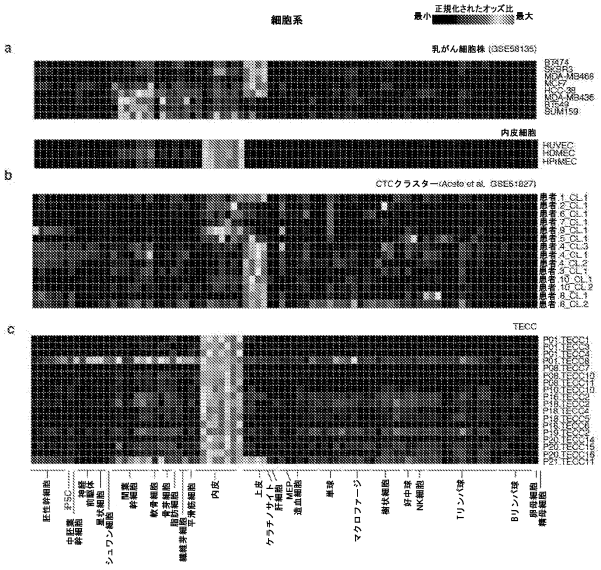
【図７】



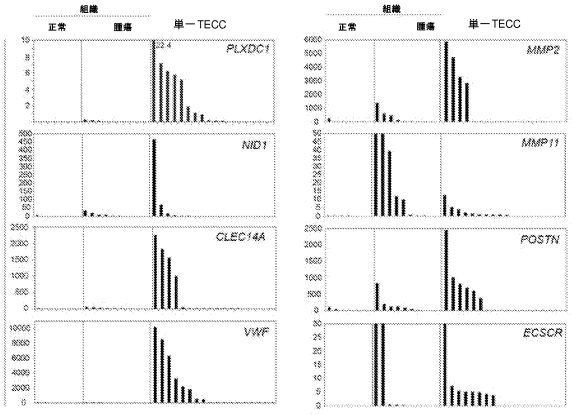
【図８】



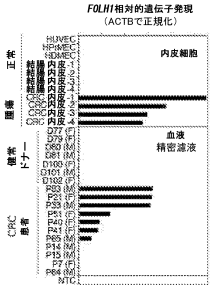
【図９】



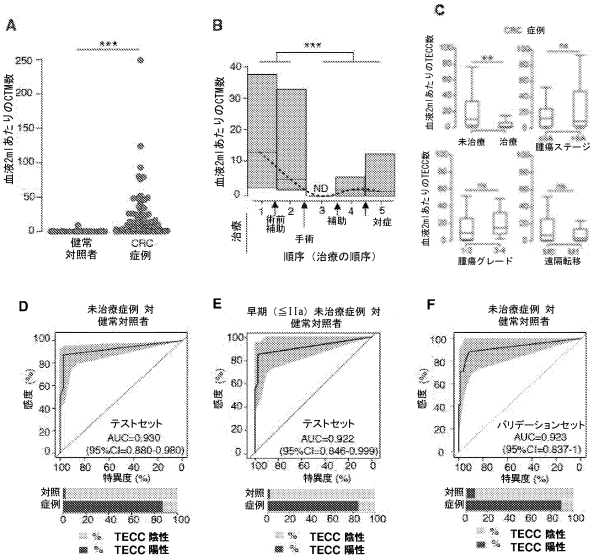
【図１１】



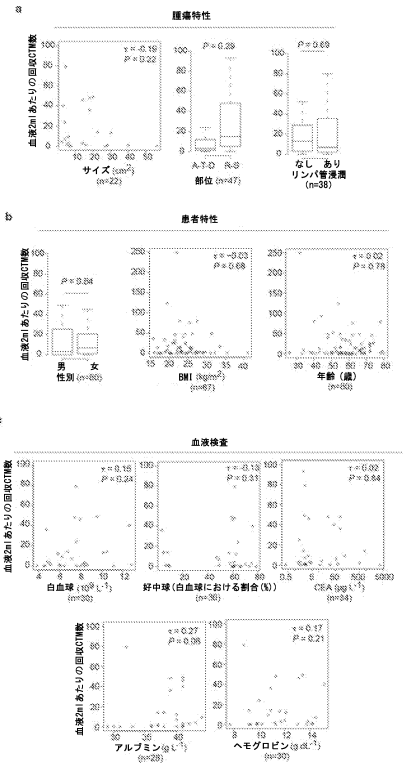
【図１０】



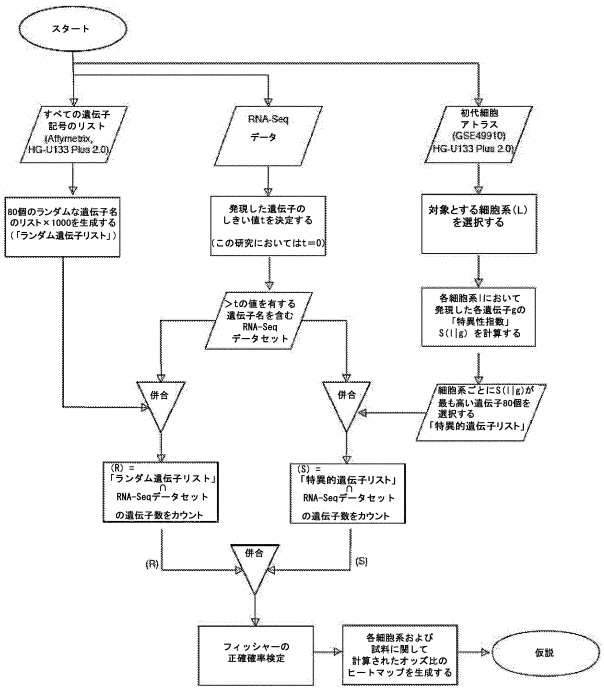
【図１２】



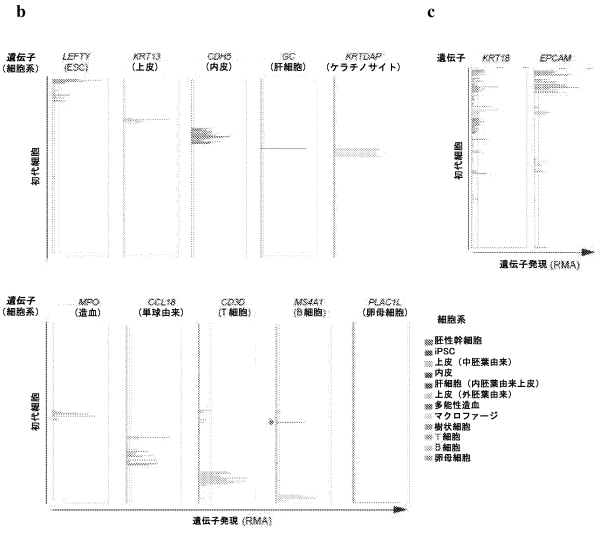
【図１３】



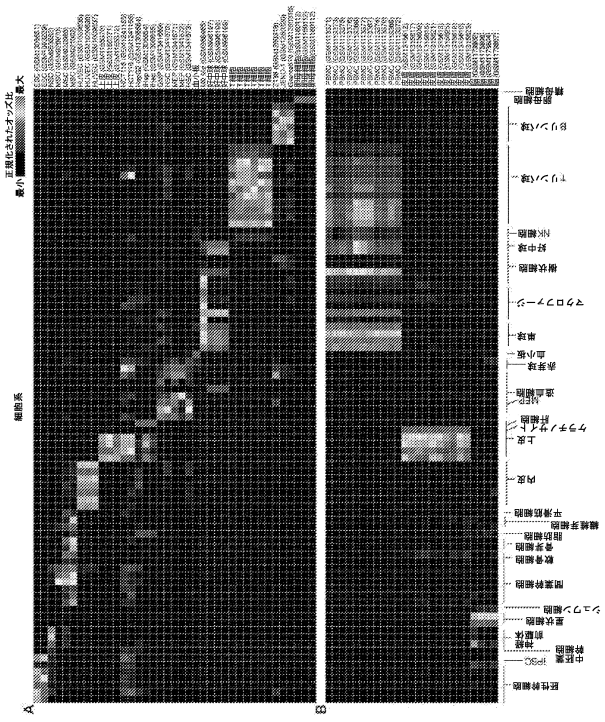
【図１４－１】



【図１４－２】



【図１５】



【配列表】

0006693966000001.app

フロントページの続き

前置審査

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 イン ジャッキー ワイ.
シンガポール共和国 １３８６６９ シンガポール ナノス バイオポリス ウェイ ３１ ＃０４－０１ インスティテュート オブ バイオエンジニアリング アンド ナノテクノロジー内
(72)発明者 タン ミンーハン
シンガポール共和国 １３８６６９ シンガポール ナノス バイオポリス ウェイ ３１ ＃０４－０１ インスティテュート オブ バイオエンジニアリング アンド ナノテクノロジー内
(72)発明者 リー ヨーク サン ダニエル
シンガポール共和国 １３８６６９ シンガポール ナノス バイオポリス ウェイ ３１ ＃０４－０１ インスティテュート オブ バイオエンジニアリング アンド ナノテクノロジー内
(72)発明者 シーマ イゴール
シンガポール共和国 １３８６６９ シンガポール ナノス バイオポリス ウェイ ３１ ＃０４－０１ インスティテュート オブ バイオエンジニアリング アンド ナノテクノロジー内
(72)発明者 パク ヨン ジュン
シンガポール共和国 １３８６６９ シンガポール ナノス バイオポリス ウェイ ３１ ＃０４－０１ インスティテュート オブ バイオエンジニアリング アンド ナノテクノロジー内
(72)発明者 ピユ ワイ ミン
シンガポール共和国 １３８６６９ シンガポール ナノス バイオポリス ウェイ ３１ ＃０４－０１ インスティテュート オブ バイオエンジニアリング アンド ナノテクノロジー内

審査官 牧野 晃久

(56)参考文献 米国特許出願公開第２００９／０１９１５３５（ＵＳ，Ａ１）
Phys. Biol., ２０１４年, 11 (1), 016002, <doi:10.1088/1478-3975/11/1/016002.>
Neoplasia, ２００６年, 8 (2), 79-88
Critical Reviews in Oncology/Hematology, ２００９年, 69, 108-124
Journal of Virological Methods, ２００２年, 100, 71-81
Int. J. Cancer, ２０００年, 85, 281-288
Sci. Transl. Med., ２０１２年, 4 (126), 126ra33
Nature Reviews Cancer, ２００６年, 6, 835-845
PLOS ONE, ２０１５年１０月２３日, 10 (10), e0141166

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　５／００－　５／２８
Ｃ１２Ｎ １５／００－ １５／９０
ＰｕｂＭｅｄ

专利名称(译)	基于大小的基于列的收集稀有细胞的装置和方法及其用途		
公开(公告)号	JP6693966B2	公开(公告)日	2020-05-13
申请号	JP2017538319	申请日	2016-01-21
[标]申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
申请(专利权)人(译)	机构科学，技术和研究		
当前申请(专利权)人(译)	机构科学，技术和研究		
[标]发明人	インジャッキーワイ タンミンハン リーヨークサンダニエル シーマイゴール パクヨンジュン ピユワイミン		
发明人	イン ジャッキー ワイ. タン ミン-ハン リー ヨーク サン ダニエル シーマ イゴール パク ヨン ジュン ピユ ワイ ミン		
IPC分类号	C12N5/09 C12Q1/6886 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	B01D15/125 B01D39/1692 B01D2239/1216 C12N5/069 G01N1/4077 G01N33/5064 G01N33/5094 G01N33/57419 G01N2001/4088 C12N2509/10 B01L3/502761 B01L2200/027 B01L2200/0647 B01L2300/042 B01L2300/0681 C12Q1/6886 C12Q2600/156 G01N33/574 G01N33/57492		
FI分类号	C12N5/09.ZNA C12Q1/6886.Z G01N33/48.M G01N33/53.Y		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十岚弘		
审查员(译)	牧野明久		
优先权	10201500471Q 2015-01-21 SG 10201500472R 2015-01-21 SG		
其他公开文献	JP2018504115A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于检索目的细胞，特别是稀有细胞的装置和方法。 使用所公开的装置和方法回收的肿瘤来源的内皮细胞簇（TECC）可以用于癌症的诊断和预后。

(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6693966号
(P6693966)
(45)発行日　令和2年5月13日(2020.5.13)　(24)登録日　令和2年4月20日(2020.4.20)

(51)Int.Cl.　　F I
C12N 5/09 (2010.01)　C12N 5/09 ZNA
C12Q 1/6886 (2018.01)　C12Q 1/6886 Z
G01N 33/48 (2006.01)　G01N 33/48 M
G01N 33/53 (2006.01)　G01N 33/53 Y

請求項の数 5　(全 74 頁)

(21)出願番号　特願2017-538319(P2017-538319)
(86)(22)出願日　平成28年1月21日(2016.1.21)
(65)公表番号　特表2018-504115(P2018-504115A)
(43)公表日　平成30年2月15日(2018.2.15)
(86)国際出願番号　PCT/SG2016/050027
(87)国際公開番号　WO2016/118086
(87)国際公開日　平成28年7月28日(2016.7.28)
審査請求日　平成29年11月17日(2017.11.17)
(31)優先権主張番号　10201500471Q
(32)優先日　平成27年1月21日(2015.1.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
シンガポール(SG)
(31)優先権主張番号　10201500472R
(32)優先日　平成27年1月21日(2015.1.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
シンガポール(SG)

(73)特許権者　508305029
エージェンシー　フォー　サイエンス，テクノロジー　アンド　リサーチ
シンガポール共和国，１３８６３２　シンガポール　フュージョノポリス　ウェイ　１　コンネクシス　ノース　タワー　＃２　Ｏ－１Ｏ
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】サイズに基づいて希少細胞を回収するためのカラムベースのデバイスおよび方法ならびにその使用