

循環腫瘤細胞與循環腫瘤DNA於轉移性乳癌治療上的應用

文、圖/張金堅

台中澄清醫院外科

從人類開始應用化學藥物治療乳癌，至今已經超過半個世紀。尤其是進入21世紀以來，標靶治療的出現，更讓乳癌治療進入一個新的里程碑。雖然，許多新開發的藥物，的確能給病人生存有適度的改進。然而，在治療晚期癌症病人上，最終多還是無法治癒，而走上產生抗藥性以及疾病惡化的結局。究其原因，一方面是癌細胞本身的多樣性與異質性(tumor heterogeneity)，另一方面，則是我們對於藥物究竟如何殺死腫瘤細胞，以及腫瘤細胞功能和死亡是如何影響後續反應，還不夠了解。但是，至少我們需要一個能夠及早偵測腫瘤是否轉移，以及在轉移性乳癌接受化療的早期便可得知治療是否有效，以避免承受持續無效醫療的毒性的工具。

隨著近年來腫瘤細胞生物學及分子生物學的深入研究，以及分子生物學檢測技術的快速發展，血液腫瘤標記由於檢測的方便和非侵入性已逐步替代了受到標本採集以及無法連續監測和追蹤等諸多限制的組織學腫瘤標記。轉移性乳腺癌的治療，需要監測腫瘤負荷(tumor burden)以確定治療反應，同時還需要改善追蹤用的生物標記，如癌抗原15-3 (CA 15-3)和循環腫瘤細胞(circulating tumor cells, CTC)。這類生物標誌物已得到廣泛研究。對於乳腺癌，攜帶有腫瘤特異性變異的循環腫瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA) 正以其不可替代的優點逐漸被人們所重視，並成為腫瘤細胞生物學及分子生物學研究中引人注目的一個亮點。然而，ctDNA雖是一種新的、有潛在價值的癌症檢測和監測方法，但是迄今仍沒有足夠的證據顯示，細胞外游離DNA能代替血液循環中細胞內癌基因或其他如CTC檢測對於癌症的篩選、診斷和監測上的角色。

英國劍橋大學腫瘤部李嘉誠中心的Sarah-Jane Dawson博士等人對此進行了深入研究，他們發現，相較於CA 15-3與CTC，ctDNA與腫瘤負荷的變化有較大的動態範圍(dynamic range)和更大的相關性⁽¹⁾。研究中針對30名正接受全身性治療的轉移性乳腺癌女性的放射影像學檢查與循環腫瘤DNA、CA 15-3和循環腫瘤細胞的檢測結果進行了比較。研究者用靶向(targeted)或全基因組測序(whole-genome sequencing)來辨別體細胞基因組改變，還檢測了相同時間點的CA 15-3和CTC的數量。結果顯示，在30名存在體細胞基因組變化的女性病人中，有29名(97%)可成功檢出ctDNA；27

名女性中有21名(78%)可檢出CA 15-3，30名女性中有26名(87%)可檢出CTC。此外，在被檢測的指標中，ctDNA為19名女性中的10名(53%)提供了治療反應的最早期檢測。

因此，Dawson博士認為，比起CA 15-3與CTC，ctDNA更是一個有用的、具有遺傳特異性和高敏感性的轉移性乳腺癌生物標記。另一位來自劍橋大學的醫學博士Carlos Caldas更說：「我認為該論文將會是里程碑式的研究，ctDNA將會成為2013年度醫學領域的亮點之一。該檢測技術肯定會立即應用於臨床研究。」

此一論文甫發表於今年的國際權威新英格蘭醫學雜誌(New England Journal of Medicine)，便引其了極大的迴響與爭議，尤其是在於循環腫瘤DNA(ctDNA)是否真能取代以發展益趨成熟的循環腫瘤細胞(CTC)監測⁽²⁻⁴⁾？以下，我們將分別簡介循環腫瘤細胞與循環腫瘤DNA使用於乳癌治療上的現況。

循環腫瘤細胞(circulating tumor cells, CTC)

癌症轉移是癌症致死的最主要原因。而癌症轉移的發生與血液中的循環腫瘤細胞(CTC)有十分密切的關係。早在1869年澳洲Thomas Ashworth醫師於已經死亡的癌症病人血液中觀察到腫瘤細胞。之後於1889年，英國一位外科醫師Steven Paget進一步提出了一個「種子與土壤(seed and soil)」的假設，他認為癌症之所以會發生轉移是因為腫瘤細胞可以藉著血液在體內循環，在進入其他器官之後可以如同「種子」遇到「土壤」一樣，在那裡落地生根發展出新的腫瘤。這些觀察與假設以當時的實驗技術並沒有辦法立刻證實，然而經過一百多年的研究結果累積，人類不但確認了循環腫瘤細胞的存在，也對它在癌症轉移過程中如何扮演媒介的角色有更深的了解。基本上癌症透過CTC轉移的機制可以分成以下幾個步驟：

1. 腫瘤細胞首先會從原生腫瘤(primary tumor)之器官組織中脫離，然後穿過微血管壁進入到血管當中。
2. 在進入血管之後，當中的腫瘤細胞如同血球一樣可以藉由血液循環(也因此被稱為「循環腫瘤細胞CTC」)到達體內的各個部位。
3. 當循環腫瘤細胞抵達將發生癌症轉移器官時，會穿透微血管壁以進入該器官的組織，然後增生出更多的腫瘤細胞而形成新腫瘤。

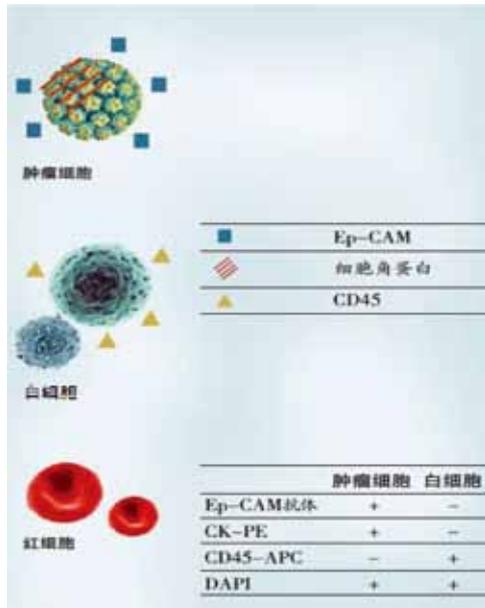


圖1 CTC檢測的基本原理。

有關CTC的檢測，主要有兩個重點：一是從紅血球細胞和白血球細胞中聚集(enrichment)上皮/腫瘤細胞，二是將惡性腫瘤細胞與紅細胞、白細胞、正常上皮細胞、良性腫瘤細胞區分開來。

雖然在研究的CTC聚集方法有多種，但目前最常用的還是免疫磁性分選(magnetic activated cell sorting, MACS)法。CellSearch分析系統是目前鑒定、定量病人血液標本中CTC的常用技術手段。主要操作步驟包括上皮細胞黏附分子(Ep-CAM)抗體磁珠捕獲CTC，細胞內角蛋白血球螢光抗體(CK-PE)識別上皮細胞，白血球細胞螢光抗體(CD45-APC)識別白血球細胞以及4',6-二脒基-2-苯吡啶鹽酸(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)螢光核染料生成細胞圖像。其中，那些符合腫瘤細胞學形態特徵並且具有CK-PE(+)、DAPI(+)、CD45-APC(-)表型的細胞被定義為CTC(圖1)。該分析系統可自動分選從上皮性腫瘤脫落後進入血液中的腫瘤細胞，每次檢測需要7.5 mL的血液。

最近幾年來相關研究結果已顯示出CTC在癌症治療的可能應用價值和新契機。但是，CTC來在癌症診斷與治療之可能應用上仍面臨許多挑戰：儘管CTC對於癌症的重要性是顯而易見的，然而相關研究的進展並不十分容易，其中最大的原因之一是因為CTC在血

液當中的數量非常稀少，即使在已發生轉移的癌症病人血液當中，通常在每 10^6 - 10^9 個單核細胞當中才能偵測到有一個CTC；換句話說，每一毫升的血液當中只有一個CTC。這樣稀少的數量，使得CTC不論在細胞的偵測、取得以及後續分析都十分困難。所以CTC測量過去有動態範圍(dynamic range)不夠大的疑慮。也因此，能夠適用於少量CTC之分離與檢測技術，不但是目前CTC相關研究發展的重點之一，也是將來CTC要能夠實現臨床應用所必須具備的要素。

近年來，研究者圍繞CTC在乳癌、大腸癌、攝護腺癌等多種實體瘤中的應用價值展開了深入探索。美國費城Kimmel Cancer Center的Cristofanilli等人證實⁽⁵⁾，治療前CTC數目是轉移性乳癌病人無進展存活期(PFS)和總存活期(OS)的獨立預測因子：這項多中心隨機對照前瞻性研究共檢測了177例可測量MBC病人在開始新治療前的CTC數量，並通過檢測CTC基準值、開始新治療前的數值來評估病人的療效。結果顯示，CTC數目 $\geq 5/7.5$ mL全血(whole blood)的病人中位PFS(2.7 months vs 7.0 months, $p < 0.001$)和中位OS(10.1 months vs > 18.0 months, $p < 0.001$)顯著短於CTC $< 5/7.5$ mL全血的病人，且這種差異在治療後的首次隨訪時仍持續存在。此外，多因素分析顯示，基線和首次追蹤時的CTC水平是PFS和OS的最顯著預測因子。美國食品藥物管理局(FDA)也因此批准CTC檢測系統 --- CellSearch，用於轉移性乳癌的治療監測(目前美國FDA已批准CellSearch用於晚期乳腺癌、結直腸癌和攝護腺癌治療的追蹤與監測)。

研究者將CTC在乳癌中的應用範圍拓展至(新)輔助化療前後的療效評估，無症狀、無可預測病灶病人的復發監測以及轉移病人救援性(salvage)治療前後的療效評估等方面。對於CTC在監測輔助治療療效及早期復發危險方面的價值，德國Pachmann研究91例非轉移性原發乳癌病人，分別在治療前、每次新化療周期開始前以及化療結束後對CTC數目進行分析。治療的反應模式分為3種：治療後CTC數目減少(> 10 -fold)、有邊緣性(marginal)改變(< 10 -fold)、細胞數目增多(有時呈“鋸齒狀”)或開始減少隨後增多(> 10 -fold)。結果顯示，40個月內有20例(22%)復發，模式1、2、3組分別有1例、5例和14例。上述3組病人的無復發生存(recurrence-free survival)有顯著差異。治療結束時CTC

數目升高10倍以上是有力的復發預測因子，也是腫瘤細胞具有侵襲性的標誌⁽⁶⁾。

目前已有新的檢測方法可供描繪出分子的異質性(molecular heterogeneity)和測量CTC在轉移過程中的動態表型變化(dynamic phenotypic changes)^(7,8)。此外，為進一步評估化療前後或期間CTC水平是否有指標意義，即出現臨床症狀或腫瘤發生進展前是否須更換治療方式或及時調整無效治療從而避免不必要的不良反應，由美國癌症中心支持的西南腫瘤學合作組織(the Southwest Oncology Group, SWOG)啟動了III期研究S0500，該研究有望在不遠的將來提供進一步的相關證據。

循環腫瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)

血中游離DNA簡稱循環DNA(circulating DNA)，是指血液循環中游離於細胞外的有機體內源性DNA。在這裡，循環核酸不可顧名思義為循環血中的核酸類物質，所有細胞內的核酸，血中游離的內源性去氧核糖核酸(DNA)和外源性DNA與RNA，如真菌血症、細菌血症和病毒血症等病理情形下的血中外源核酸皆是，雖然其在臨床醫學中具有重要意義但均不屬於嚴格意義的血中游離DNA範疇。根據疾病進展程度，腫瘤DNA可佔據血漿中無細胞DNA(cell-free DNA)的1%-50%。

循環DNA最早由Mandel和Metais於1947年發現⁽⁹⁾，但由於當時缺乏高靈敏性和高特異性的檢驗方法，導致有關血中游離DNA與疾病相關性的研究在較長時期內進展緩慢。直到有效分離游離DNA技術的出現，和特殊螢光染色與PCR技術相結合的檢測技術的應用，使這一領域的研究在最近二十多年得到了較迅速發展。自發現血中游離DNA可含腫瘤細胞DNA相同基因突變後，應用分子生物學手段對循環游離核酸的研究的興趣日益增加。

血中游離DNA在疾病的早期診斷、預後、監測等方面具有重要潛在價值。其具體醫學應用大致包括以下方面：1.產前診斷，2.免疫性疾病等非腫瘤類疾病的病情分析與療效觀察，3.腫瘤相關分析⁽¹⁰⁻¹²⁾。在這三類應用中，尤以在腫瘤分析中的價值最為重要，雖然目前血中游離DNA分析尚未被各癌症治療準則列為臨床必需的檢測指標，但已有數以千計的研究論文和大量

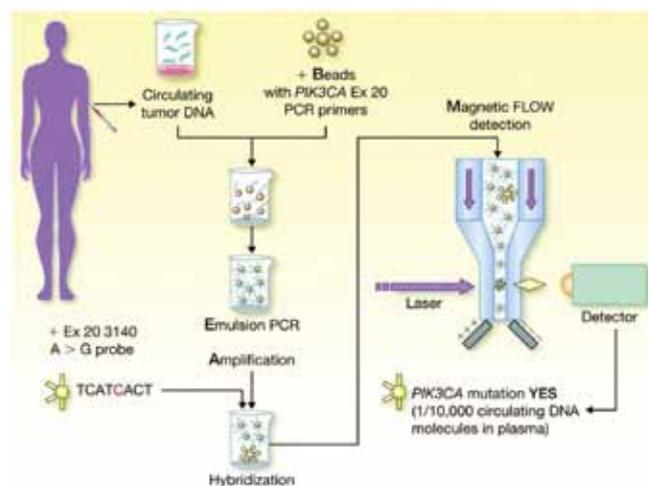


圖2 檢測血液中突變腫瘤DNA的新方法⁽¹⁸⁾。

臨床試驗的數據，有力支持這一新技術在腫瘤防治中的巨大應用價值：腫瘤療效觀察⁽¹³⁾，腫瘤預後評估⁽¹⁴⁾，腫瘤轉移風險分析^(10,15)。例如，在人類表皮生長因子第二型受體陽性(HER2+)的轉移性乳癌病人身上，檢驗治療後血液中HER2基因濃度可以決定病人對標靶藥物賀癌平(Herceptin)的療效，若是血中HER2 DNA下降，則表示病人對治療有效且整體生存期能夠延長⁽¹⁶⁾。

只是，不同於CTC檢測已有FDA核可並廣被接受的CellSearch分析系統。循環腫瘤DNA(ctDNA)目前還沒有一個公認有效的檢測方式。Dawson博士等人運用了最新檢測及定量ctDNA的方式⁽¹⁾。實質上，這種分析方法與新近的產前遺傳測試，利用指示標記物尋找母親血液中循環的胎兒DNA相似。在腫瘤研究情況下，研究人員通過尋找癌症相關突變來定量血液中腫瘤DNA的數量，其主要注重於TP53和PIK3CA兩個基因。不過，這種搜尋既是該方法的長處也是它的弱點。分析特定突變可能非常的靈敏，但並不是所有的腫瘤都有這些標記物。雖然最早發展出這種研究系統的美國麻省總醫院癌症中心(Massachusetts General Hospital Cancer Center)的Higgins教授認為這套系統檢測出PIK3CA基因突變的敏感性達到100%⁽¹⁷⁾(圖2)；Dawson和同事從來自52名婦女的樣本開始展開研究，但只有25人有TP53和PIK3CA標識性突變。對此，該研究的負責人之一、英國劍橋癌症研究所Carlos Caldas說：「我認為，在每種乳腺癌中至少可以找到一種用

於檢測的突變。雖然對於一些病人，將需要為他們特別製訂技術。」儘管在這一技術進入常規臨床應用前，還需要開展更大規模的隨機實驗。但作為當前最大規模的此類研究，新研究結果讓人對這項技術能夠快速方便監控病人治療反應感到樂觀，尤其是當重複活體切片特別昂貴及需侵入體內之時。

Caldas等人將此一技術與已被FDA核准的循環腫瘤細胞(CTC)檢測系統CellSearch進行了對比。Caldas認為他們的無細胞ctDNA技術更加的敏感。但美國麻省總醫院癌症中心的Haber教授則認為，自CellSearch開發以來該CTC檢測領域進展顯著，還需要更大型的研究來充分比較這兩種技術。

結語

姑且不論循環腫瘤細胞(CTC)或循環腫瘤DNA(ctDNA)孰優孰劣，此類非侵入性的液態切片(liquid biopsy)，勢必會成為不斷增長的非侵入性檢驗替代方法的重要一員。也為理想中的癌症個人化、量身訂作治療(tailored therapy)預先鋪路。

參考文獻

1. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, et al.: Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013; 368: 1199-1209.
2. Lippman M, Osborne CK.: Circulating tumor DNA — Ready for prime time? *N Engl J Med* 2013; 368: 1249-1250.
3. Alix-Panabieres C, Schwarzenbach H, Pantel K.: Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med* 2012; 63: 199-215.
4. Mattos-Arruda LD, Cortes J, Santarpia L, et al.: Circulating tumour cells and cell-free DNA as tools for managing breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; 10: 377-389.
5. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al.: Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 781-791.
6. Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, et al.: Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1208-1215.
7. Yu M, Bardia A, Wittner BS, et al.: Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* 2013; 339: 580-584.
8. Magbanua MJ, Sosa EV, Roy R, et al.: Genomic profiling of isolated circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Cancer Res* 2013; 73: 30-40.
9. Mandel P, M'etais P: Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l' homme[J]. *C R Hebd Seances Acad Sci(Paris)* 1948; 142: 241-243.
10. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, et al.: The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* 2012; 486: 400-404.
11. Shaw JA, Page K, Blighe K, et al.: Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. *Genome Res* 2012; 22: 220-231.
12. Curtis C, Shah SP, Chin SF, et al.: The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* 2012; 486: 346-352.
13. Ellis MJ, Ding L, Shen D, et al.: Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature* 2012; 486: 353-360.
14. Chen X, Bonnefoi H, Diebold-Berger S, et al.: Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2297-2303.
15. Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, et al.: Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature* 2012; 486: 405-409.
16. Sorensen BS, Mortensen LS, Andersen J, et al.: Circulating HER2 DNA after trastuzumab treatment predicts survival and response in breast cancer. *Anticancer Res* 2010; 30: 2463-2468.
17. Higgins MJ, Jelovac D, Barnathan E, et al.: Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 3462-3469.
18. Richardson AL, Iglehart JD : BEAMing Up Personalized Medicine: Mutation Detection in Blood. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 3209-3211.