

循環腫瘤細胞的歷史與前景

林鴻至¹、謝佳訓^{1,2}

¹ 林口長庚醫院血液腫瘤科

² 土城醫院血液腫瘤科

摘要

癌症死亡有極高比例是由於癌症轉移所造成，其中循環腫瘤細胞 (CTC; circulating tumor cells) 對於轉移扮演著重要角色。常見的循環腫瘤細胞檢測方式包含了物理特性分選與生物特性標定，搭配傳統「癌指數」的相關試驗，不斷地驗證循環腫瘤細胞能反映臨床病人的癌症狀態、治療成效與生存預後，也可以進行分子生物研究、用藥反應、基因分析。在未來期望透過醫療發展、學術研究以及產業鏈結，累積更完善台灣本地的循環腫瘤細胞訊息，最終幫助到病人的癌症治療。(生物醫學 2021:14 (4) :233-239)

關鍵字：循環腫瘤細胞、癌症轉移、癌症檢測、癌指數、癌症治療、液態切片

什麼是循環腫瘤細胞

隨著醫學與科學的發展，許多疾病得以大幅地降低死亡風險，然而癌症卻連續數十年纏綿台灣十大死因之首，其中有極高比例是由於癌症轉移所造成的癌症死亡。在癌症發生的過程，細胞需要經過一連串的功能變異。不論是遺傳性或是後天引發，與正常細胞不同的是，癌細胞生長失去控制、過度招集養分、引導血管新生，快速地長大直到突破基底膜、侵犯到周邊其他組織與器官。與此同時，癌細胞會剝落到血液循環中，再隨著血管循環到身體的其他部位，進而造成轉移。而這些隨著血液循環流動的癌細胞，我們便稱之為循環腫瘤細胞 (CTC; circulating tumor cells)。

數千年來，中外古籍對於癌症的記載並不罕見，其中循環腫瘤細胞則是到了 1869 年才首次被 Dr.Ashworth 記載於 The Medical Journal of Australia 的文章中。即便一百多年前已經發現循環腫瘤細胞的存在，但這群細胞在血液中的數量非常稀少，平均十億顆血球細胞中只存在一顆循環腫瘤細胞，受限於早期設備與各項技術難以處理，因此到了近三十年內才陸續有偵測血液中循環腫瘤細胞的方式。更是到了二十一世紀 CellSearch® 才正式核可用於臨床上癌症病人的檢測，是第一個通過美國 FDA 核准在臨床上使用的循環腫瘤細胞檢測平台。

台灣大概從十年前開始有大量循環腫瘤細胞相關的科學研究，以及世界上開始有各種不同的檢測平台逐漸成熟。在癌症精準醫療的新領域裡，不只是循環腫瘤細胞循環腫瘤細胞，其他由血液中研究癌症相關的循環腫瘤基因 (ctDNA)、表觀遺傳學 (epigenetics)、蛋白質表達……等液態切片技術與臨床關聯性，都是許多基礎與臨床研究的重點。

循環腫瘤細胞常見的檢測方式

物理特性分選

學界在過往的認知上，認為癌細胞比起正常細胞，通常具有較高的核質比 (nucleus-cytoplasm ratio)、較大的體積、較高的比重、較複雜的細胞表面醣修飾，科學家們在過去十多年來積極利用這一類的腫瘤細胞特性，嘗試捕捉躲在血液細胞中的循環腫瘤細胞，例如以離心的方式搭配使用細胞分離液 (Ficoll) 分出不同的比重的細胞，或利用表面粗糙的微流道地毯卡住醣修飾較複雜的癌細胞。在所有分離循環腫瘤細胞的方法當中，最常見的方法是物理性的分離方法，主要是使用具有 4-6 μm 孔徑的薄膜或微流道，在有流體壓力的環境下，正常紅血球 (7-8 μm) 與大部份的淋巴球 (8-10 μm) 會鑽過小孔，而癌細胞因為具有較高的核質比與較大的體積，則會被卡在薄膜上，或停留在事先設計好的微流道小孔¹⁻²。這方法最大的優勢在於具有快速分選大量血液 (>10mL) 的潛力，以及較小傷害地分選出循環腫瘤微團塊 (CTM; circulating tumor micro-emboli)³⁻⁴。然而，此法雖簡單且直觀，卻沒

有考慮到某些種類的癌細胞尺寸，並未必小於正常的體細胞，因此很可能會造成捕獲循環腫瘤細胞上偽陰性或偽陽性的結果，最後仍需搭配特殊的組織或螢光染色，才能做進一步的鑑定是否真的是循環腫瘤細胞。

所幸，隨著半導體科技的發展，近年來有少數團隊可以搭配矽晶圓，利用正常細胞與癌細胞表面電荷特性的不同進行分選。更有團隊則是基於這個概念，進一步利用光介電泳力 (ODEP; Optically-Induced Dielectrophoretic) 可單一針對目標細胞進行分離純化⁵⁻⁷，提升循環腫瘤細胞的高精準度分離目標，進而可以進行更精細的分子生物分析，但必須注意的是：腫瘤演變快速與異質性差異大，單一次採檢的少量腫瘤細胞是否可代表全腫瘤的狀態，需依檢測的腫瘤狀態來決定。

生物特性標定—正向篩選

舉凡偵測癌細胞的特定抗原，利用抗體辨識的方式我們都可以統稱為正向篩選 (positive selection)。由於上皮細胞瘤佔所有種類癌症的九成以上，再加上正常人的上皮細胞理論上不存在血液循環中，因此我們若是在血液中偵測到上皮細胞，那麼就有很高的機率是由上皮細胞瘤而來。最常見的方式是抽血後，檢測血液中的 EpCAM 與 Cytokeratins，或是加碼檢測上皮細胞轉換成間質細胞的標誌物 (暗示著癌症轉移)，例如 CDH1、CDH2、Vimentin……等。在螢光顯微鏡與流式細胞儀發明之後，這樣的檢驗策略得以大幅發揮。

在三十年前，研究此領域的學者，大多是直接以全血經過初步的處理後，便將全部的有核細胞一起染色，考量到在大量背景細胞（約 10^{6-8} 顆/mL）中看出相對極少數被染色的細胞，考慮到人力眼力在技術上的偵測極限，每毫升的血液約莫要有數百至數千顆循環腫瘤細胞才能夠快速、穩定的被人眼觀測到。因為過於困難，在之後的幾年，科學家們開始採用各種策略希望提高偵測效率，例如使用 MACS® 系統，此法運用抗體結合磁珠，再以磁力分選有興趣的目標細胞（如 EpCAM⁺ 的循環腫瘤細胞群）；再如 CellSearch® 系統，先將循環腫瘤細胞染上帶有螢光的 Cytokeratin，以及將白血球染上帶有另一種螢光的 CD45，再讓所有的細胞吸附磁珠固定在特定平面上，最後以螢光系統偵測 Cytokeratin 的訊號。

隨著微流體技術的發展，Nagrath 在 2007 年發表在 Nature 的文章提出將血液流經附着了滿滿 EpCAM 抗體的微流道柱狀結構表面，藉由大量重複地接觸 EpCAM，將循環腫瘤細胞捕捉在微流道內。基於類似原理，近年來陸續發展出各種不同構型的微流道，試圖增加循環腫瘤細胞的捕捉率。正向篩選的優勢在於抗原抗體反應相對具有較高的專一性，一般來說每毫升的血液中帶有數十顆以下的循環腫瘤細胞也能被順利捕捉。然而，癌細胞在人體產生異質性與惡性變異之後，往往使得原來的腫瘤細胞失去原有的特殊上皮細胞，其釋放出來的循環腫瘤細胞，有可能變成不帶有上皮標記，導致辨識 EpCAM 或 Cytokeratin 無法準確地捕獲循環腫瘤細胞，故，此法（正向篩選）的缺點，便來自於他本來的優點—高度專一性，導

致正向篩選策略，有可能在腫瘤高度變異的情況下，偵測不到這些失常嚴重的非典型癌細胞。

生物特性標定—負向篩選

相對於正向篩選是直接捕捉癌細胞，負向篩選指的是移除循環腫瘤細胞以外的其他細胞，例如移除紅血球與白血球保留循環腫瘤細胞。最常使用的方式是先以 CD235a 標記紅血球，或細胞分離液 Ficoll 離心，或以滲透壓的方式移除紅血球，再使用 CD45 抗體移除白血球⁸，或更進一步搭配移除其他正常細胞的標誌物例如 CD2,CD14,CD16,CD19……等。此舉的優勢在於無須對特定癌細胞標記抗體或磁珠，一方面可以減少對循環腫瘤細胞的傷害，另一方面則能夠保留更多種類的循環腫瘤細胞。然而，在過往的認知內，由於循環腫瘤細胞相對於全血細胞的含量稀少，被認為移除正常血球細胞是曠日費時又無效益的方式。

約莫從十多年前開始，磁珠標記特定細胞的技術逐漸成熟，例如 MACS® 與 EasySep™ 系統，可以快速地移除正常血球細胞，讓負向篩選的策略得以發揮優勢。基於負向篩選的概念，所保留下來的細胞族群包含了正向篩選的族群（例如 EpCAM⁺-CTC）與正向篩選不容易保留的族群（例如 EpCAM⁻-CTC）⁹⁻¹²，又能夠比物理特性分選有更好的鑑別能力以區分正常細胞與癌細胞。

相對地，缺點是有些時候身體的非癌症異常，可能會造成負向篩選時循環腫瘤細胞數值上的誤判。例如手術後表皮細胞會剝落到血液之中而造成 EpCAM⁺ 的訊號增加，或是心血管疾病的患者血液中內皮細胞的數量也會明顯增

加，而造成血液中 EpCAM⁺ 的細胞族群增加。近五年來，與半導體技術結合，負向篩選的微流體系統也開始逐步發展，但未來仍需要更多的臨床實證¹³。

癌症？有影嘍！？

許多被宣告「癌指數」偏高的患者，都會有這樣的問題，我真的有癌症嗎？這些「癌指數」代表了什麼？所謂的「癌指數」包含了各項癌症相關的檢測結果，若認真細究，我們可從許多面相來看待「癌指數」。最常見的是傳統實驗室測量血液或尿液的生化成分（例如 CEA, CA125, CA199……）以及診斷成像（例如超音波、X 光、斷層掃描、正子攝影……），再進一步則會搭配內視鏡檢測、組織切片，以及採檢後的特定基因試驗（例如 *EGFR, KRAS, BRAF*……）。時至今日，循環腫瘤細胞、循環腫瘤細胞也成為「癌指數」一項代名詞。十多年來我們團隊專注在循環腫瘤細胞的研究之中，也不斷地驗證循環腫瘤細胞在各種癌症檢測扮演著重要的角色¹⁴⁻¹⁶，例如循環腫瘤幹細胞影響病人存活¹⁷、與免疫治療的相關性¹⁸⁻¹⁹、反映化療的效果²⁰，或是分離純化後進行培養與進一步的研究²¹。希望藉由更多的臨床實證，累積台灣本地的循環腫瘤細胞訊息，早日將循環腫瘤細胞檢測廣泛地在全台灣的醫院應用，幫助到更多病患。

展望

隨著媒體的報導與各式文章，商人們嗅到了液態切片、循環腫瘤細胞檢測在癌症檢測中

的商機，近十年內坊間成立非常多相關的檢測公司，加速讓社會大眾認識到精準醫療的領域。然而，這樣龐大的商機卻逐漸醞釀出販賣夢想與斂財的危機。隨著 2019 年號稱女版賈伯斯的伊麗莎白霍姆斯 (Elizabeth Holmes) 的神話破滅後，一家市值 90 億美元的公司被證實是一滴血驗癌症的大騙局，方才讓許多對於精準醫療有過度期待的社會大眾夢醒。檢測的本質應該回歸到臨床實證，務實面對液態切片的優勢與困境，不應盲從、人云亦云。然而，這場世紀大騙局，以及無窮無境的商業話術，卻已經深深地傷害了社會大眾對於精準醫療與循環腫瘤細胞檢測的信任感。

循環腫瘤細胞計數的檢測價值，除了已被驗證可以反映臨床治療的效果、預後與病人生存時間，也有越來越多研究專注在用藥反應、基因分析。雖然，我們團隊也曾發現循環腫瘤細胞能夠預先篩出傳統檢測難以發現的案例²²。然而，循環腫瘤細胞計數應該是扮演輔助的角色，與傳統檢測相輔相成，而非取代傳統檢測，更不能取代傳統的病理切片 (tissue biopsy)。暫不論華而無實的商業話術，循環腫瘤細胞的本質是反映身體內腫瘤細胞的狀態，我們使用各種的策略、各種技術、各種手段，都是為了能夠盡可能地了解這群在血液中循環的癌細胞的特性，最終都應該回歸到要如何幫助病人的這個議題。

未來關於循環腫瘤的研究，應會聚焦在循環腫瘤細胞是活的癌細胞這個特性，例如體外培養、擴增，可以研究癌症的病生理、侵略行為與基因表現，甚至藥物的體外反應 (*ex vivo*)

系統。綜觀數十年來不論是癌症研究或是生物醫學領域的發展，很大比重仰賴設備與工程技術的突破或是發現新材料。從早期的核酸擴增儀、流式細胞儀、螢光顯微鏡，到近年的次世代基因定序、RNA sequencing、微流體製程、氧化石墨烯的應用，無一不是大幅地幫助到醫療的發展、學術研究以及產業鏈結。期待在不久的將來，我們能夠看到循環腫瘤細胞檢測能夠更有效地幫助到醫師決定治療，最終幫助到病人的癌症治療。

參考文獻

1. Cheng SJ, Hsieh KY, Chen SL, Chen CY, Huang CY, Tsou HI, Kumar PV, Hsieh JC, Chen GY. Microfluidics and Nanomaterial-based Technologies for Circulating Tumor Cell Isolation and Detection. *Sensors (Basel)*. 2020 Mar 27;20(7):1875. doi: 10.3390/s20071875. PMID: 32230996; PMCID: PMC7180594.
2. Tzu-Keng Chiu, Yang Zhao, Deyong Chen, Chia-Hsun Hsieh, Ke Wang, Wen-Pin Chou, Chia-Jung Liao, Hsin-Yao Wang, Beiyan Fan, Junbo Wang*, Jian Chen**, Min-Hsien Wu "A low-sample-loss microfluidic system for the quantification of size-independent cellular electrical property—Its demonstration for the identification and characterization of circulating tumour cells (CTCs)" *Sensors and Actuators B: Chemical*, (2017) 246,29–37. doi:10.1016/j.snb.2017.02.048
3. Che J, Yu V, Garon EB, Goldman JW, Di Carlo D. Biophysical isolation and identification of circulating tumor cells. *Lab Chip*. 2017 Apr 11;17(8):1452-1461. doi: 10.1039/c7lc00038c. PMID: 28352869; PMCID: PMC5507599.
4. Chiu TK, Lei KF, Hsieh CH, Hsiao HB, Wang HM, Wu MH. Development of a microfluidic-based optical sensing device for label-free detection of circulating tumor cells (CTCs) through their lactic acid metabolism. *Sensors (Basel)*. 2015 Mar 19;15(3):6789-806. doi: 10.3390/s150306789. PMID: 25808775; PMCID: PMC4435186.
5. Wen-Pin Chou, Hung-Ming Wang, Jyun-Huan Chang, Tzu-Keng Chiu, Chia-Hsun Hsieh, Chia-Jung Liao*, Min-Hsien Wu "The utilization of optically-induced-dielectrophoresis (ODEP)-based virtual cell filters in a microfluidic system for continuous isolation and purification of circulating tumour cells (CTCs) based on their size characteristics." *Sensors and Actuators B: Chemical*, (2017) 241,245–254. doi:10.1016/j.snb.2016.10.075
6. Huang SB, Wu MH, Lin YH, Hsieh CH, Yang CL, Lin HC, Tseng CP, Lee GB. High-purity and label-free isolation of circulating tumor cells (CTCs) in a microfluidic platform by using optically-induced-dielectrophoretic (ODEP) force. *Lab Chip*. 2013 Apr 7;13(7):1371-83. doi: 10.1039/c3lc41256c. PMID: 23389102.
7. Chu PY, Hsieh CH, Wu MH. The Combination of Immunomagnetic Bead-Based Cell Isolation and Optically Induced Dielectrophoresis (ODEP)-Based Microfluidic Device for the Negative Selection-Based Isolation of Circulating Tumor Cells (CTCs). *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Aug 6;8:921. doi: 10.3389/fbioe.2020.00921. PMID: 32903713; PMCID: PMC7438881.
8. Lin HC, Hsu HC, Hsieh CH, Wang HM, Huang CY, Wu MH, Tseng CP. A negative selection system PowerMag for effective leukocyte depletion and enhanced detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells. *Clin Chim Acta*. 2013 Apr 18;419:77-84. doi: 10.1016/j.cca.2013.01.018. Epub 2013 Feb 13. PMID: 23415697.
9. Hsieh JC, Lin HC, Huang CY, Hsu HL, Wu TM, Lee CL, Chen MC, Wang HM, Tseng CP. Prognostic value of circulating tumor cells with podoplanin expression in patients with locally advanced or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2015 Oct;37(10):1448-55. doi: 10.1002/hed.23779. Epub 2014 Jul 24. PMID: 24844673.
10. Lin HC, Liou MJ, Hsu HL, Hsieh JC, Chen YA, Tseng CP,

- Lin JD. Combined analysis of circulating epithelial cells and serum thyroglobulin for distinguishing disease status of the patients with papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Mar 29;7(13):17242-53. doi: 10.18632/oncotarget.6587. PMID: 26684026; PMCID: PMC4941384.
11. Hsieh JC, Chen GY, Jhou DD, Chou WC, Yeh CN, Hwang TL, Lin HC, Chu HC, Wang HM, Yen TC, Chen JS, Wu MH. The Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Asian Neuroendocrine Tumors. *Sci Rep*. 2019 Dec 27;9(1):19917. doi: 10.1038/s41598-019-56539-z. PMID: 31882775; PMCID: PMC6934482.
 12. Chiu SY, Hsieh CH, You JF, Chu PY, Hung HY, Chu PH, Wu MH. Enhancing Prediction Performance by Add-On Combining Circulating Tumor Cell Count, CD-45neg EpCAMneg Cell Count on Colorectal Cancer, Advance, and Metastasis. *Cancers (Basel)*. 2021 May 21;13(11):2521. doi: 10.3390/cancers13112521. PMID: 34063929; PMCID: PMC8196640.
 13. Liao CJ, Hsieh Chia-Hsun, Chiu TK, Zhu YX, Wang HM, Hung FC, Chou WP, Wu MH* "An Optically Induced Dielectrophoresis (ODEP)-Based Microfluidic System for the Isolation of High-Purity CD45neg/EpCAMneg Cells from the Blood Samples of Cancer Patients— Demonstration and Initial Exploration of the Clinical Significance of These Cells" *Micromachines (Basel)*. 2018 Oct 31;9 (11) .pii:E563. doi:10.3390/mi9110563. PubMed PMID:30715062; Pub Med Central PMCID:PMC6266761.
 14. Su PJ, Wu MH, Wang HM, Lee CL, Huang WK, Wu CE, Chang HK, Chao YK, Tseng CK, Chiu TK, Lin NM, Ye SR, Lee JY, Hsieh CH. Circulating Tumour Cells as an Independent Prognostic Factor in Patients with Advanced Oesophageal Squamous Cell Carcinoma Undergoing Chemoradiotherapy. *Sci Rep*. 2016 Aug 17;6:31423. doi: 10.1038/srep31423. PMID: 27530152; PMCID: PMC4987675.
 15. Chou WC, Wu MH, Chang PH, Hsu HC, Chang GJ, Huang WK, Wu CE, Hsieh JC. A Prognostic Model Based on Circulating Tumour Cells is Useful for Identifying the Poorest Survival Outcome in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Biol Sci*. 2018 Jan 12;14(2):137-146. doi: 10.7150/ijbs.23182. PMID: 29483832; PMCID: PMC5821035.
 16. Wu CY, Fu JY, Wu CF, Hsieh MJ, Liu YH, Liu HP, Hsieh JC, Peng YT. Malignancy Prediction Capacity and Possible Prediction Model of Circulating Tumor Cells for Suspicious Pulmonary Lesions. *J Pers Med*. 2021 May 21;11(6):444. doi: 10.3390/jpm11060444. PMID: 34064011; PMCID: PMC8223995.
 17. Lee CH, Hsieh JC, Wu TM, Yeh TS, Wang HM, Lin YC, Chen JS, Lee CL, Huang WK, Hung TM, Yen TT, Chan SC, Chou WC, Kuan FC, Hu CC, Chang PH. Baseline circulating stem-like cells predict survival in patients with metastatic breast Cancer. *BMC Cancer*. 2019 Dec 2;19 (1) :1167. doi: 10.1186/s12885-019-6370-1. PMID: 31791269; PMCID: PMC6889331.
 18. Chang PH, Wu MH, Liu SY, Wang HM, Huang WK, Liao CT, Yen TC, Ng SH, Chen JS, Lin YC, Lin HC, Hsieh JC. The Prognostic Roles of Pretreatment Circulating Tumor Cells, Circulating Cancer Stem-Like Cells, and Programmed Cell Death-1 Expression on Peripheral Lymphocytes in Patients with Initially Unresectable, Recurrent or Metastatic Head and Neck Cancer: An Exploratory Study of Three Biomarkers in One-time Blood Drawing. *Cancers (Basel)*. 2019 Apr 15;11(4):540. doi: 10.3390/cancers11040540. PMID: 30991692; PMCID: PMC6521270.
 19. Chen YL, Huang WC, Lin FM, Hsieh HB, Hsieh CH, Hsieh RK, Chen KW, Yen MH, Lee J, Su S, Marfatia T, Chang SE, Sundar P, Patterson B, Watson D, Mei R, Javey M. Novel circulating tumor cell-based blood test for the assessment of PD-L1 protein expression in treatment-naïve, newly diagnosed patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2019 Jul;68(7):1087-1094. doi: 10.1007/s00262-019-02344-6. Epub 2019 May 14. PMID: 31089757; PMCID: PMC6584214.
 20. Wang HM, Wu MH, Chang PH, Lin HC, Liao CD, Wu SM, Hung TM, Lin CY, Chang TC, Tzu-Tsen Y, Hsieh JC. The

change in circulating tumor cells before and during concurrent chemoradiotherapy is associated with survival in patients with locally advanced head and neck cancer. *Head Neck*. 2019 Aug;41(8):2676-2687. doi: 10.1002/hed.25744. Epub 2019 Mar 22. PMID: 30903634.

21. Liao CJ, Hsieh CH, Hung FC, Wang HM, Chou WP, Wu MH. The Integration of a Three-Dimensional Spheroid Cell Culture Operation in a Circulating Tumor Cell (CTC) Isolation and Purification Process: A Preliminary Study of the Clinical Significance and Prognostic Role of the CTCs Isolated from the Blood Samples of Head and Neck Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2019 Jun 6;11(6):783. doi: 10.3390/cancers11060783. PMID: 31174311; PMCID: PMC6627984.
22. Hsieh CH, Lin HC, Huang SB, Hsueh C, Hsu HL, Wang HM, Wu MH, Tseng CP, Lin JD. Circulating epithelial cell enumeration facilitates the identification and follow-up of a patient with early stage papillary thyroid microcarcinoma: A case report. *Clin Chim Acta*. 2016 Feb 15;454:107-11. doi: 10.1016/j.cca.2015.12.030. Epub 2016 Jan 2. PMID: 26751809.

林鴻至博士

林口長庚醫院血液腫瘤科 副研究醫技員
長庚大學 生物醫學博士 醫事檢驗師
TAF 實驗室訓練(ISO 17025)



謝佳訓醫師

林口長庚醫院血液腫瘤科 主治醫師
新北市立土城醫院 醫研部主任、
血液腫瘤科主任

