순환종양세포 검출 기술

임민지^{1,2}, 조윤경^{1,2}

울산과학기술원 생명과학부 생명공학과¹, 기초과학연구원 첨단연성물질연구단²

Current Methods of Circulating Tumor Cell Detection

Minji Lim^{1,2}, Yoon-Kyoung Cho^{1,2}

Department of Biomedical Engineering, School of Life Sciences, Ulsan National Institute of Science and Technology¹, Center for Soft and Living Matter, Institute for Basic Science², Ulsan, Korea

Liquid biopsy, the analysis of circulating biomarkers from peripheral blood, such as circulating tumor cells (CTCs) and circulating tumor DNA, and exosomes, offers a less invasive, new source of cancer-derived materials that may reflect the status of the disease better and thereby contribute to personalized treatment. Recent advances in microfluidics and molecular analysis technologies have resulted in greatly improved CTC enumeration and detection. In this article, we review commercially available technologies used to isolate CTCs from peripheral blood, including immunoaffinity and label-free, physical property-based isolation methods. Although enormous technological progress has been made, especially within the last decade, only a few CTC detection methods have been approved for routine clinical use. Here, we provide an overview of the current CTC isolation methods and examples of their potential application for early diagnosis, prognosis, treatment monitoring, and prediction of resistance to cancer therapy. Furthermore, the challenges that remain to be addressed before such tools are implemented for routine use in clinical settings are discussed. (**Korean J Helicobacter Up Gastrointest Res 2018;18:157-161**)

Key Words: Circulating tumor cells; Liquid biopsy; Stomach cancer

서론

액체 생검(liquid biopsy)은 혈액, 소변 등의 인체유래물에 포함된 암 관련 바이오마커(biomarker)로부터 암의 정보를 얻어내어 암 진단 및 예후, 항암제 효과 모니터링 등에 활용하는 검사를 말한다. 액체 생검에 활용되는 암 관련 바이오마커의 대표적 예시로는 순환종양세포(circulating tumor cells, CTCs), 순환 종양 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA), 나노소포체(exosome) 등이 있으며, 이러한 혈액 순환 바이오마커의 단백질 또는 유전자 발현량, 염기서열을 분석하여 암 조직의 특성을 파악하고 표적치료제 선택 시 관련 돌연변이 유무나 내성 유전자 발생 등을 조기에 확인하여 환자 개인 맞춤형 치료에 크게 도움을 줄 것으로 기대된다. 기존의 조직검사는 주로 종양 부위

에 내시경이나 세침 등의 도구를 직접 삽입하여 조직을 채취해야 하므로 위험성이 크고, 다양한 세포가 존재하는 조직 내에서 암세포를 선택적으로 채취하기 어렵기 때문에 샘플링 오류의 가능성이 높다. 반면에 액체 생검은 체내에 순환하는 혈액을 기반으로 하므로 질병의 현재 상황을 더 잘 대변할 것으로 추정되고 상대적으로 비침습적으로 샘플을 채취하므로 위험 부담이 적으며 비교적 자주 검사를 할 수 있다는 장점이 있다. 따라서, 액체 생검을 이용하여 주기적인 항암 효과 모니터링을 하거나 돌연변이나 내성 유전자 발생을 조기에 확인함으로써 개인 맞춤형 항암치료를 도움을 줄 것으로 기대된다.

CTCs는 원발성 암으로부터 떨어져 나와 혈액을 타고 순환하는 암세포를 일컫는다. 암 조직과 같은 유전정보를 가지고 있고 성질이 비슷할 것으로 예상되며 세포 상태로 혈액에서 분리 가능하기 때문에 ctDNA 대비 비교적 온전한 유전 정보를 얻을 수 있다.¹ 그러나 CTCs는 혈액 속에 극미량(혈구 세포 10억 개 당 1~10개)으로 존재하기 때문에 검출이 매우 어려워서, 그 존재가 알려진 지 약 150년이 지났지만 아직 임상현장에서 바이오마커로 사용하지는 못하고 있었다. 최근 공학 및 분자생물학 기술의 눈부신 발전에 힘입어 보다 효과적인 CTCs 검출 방법 개발에 관한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행 중에 있지만, 아

Received: March 28, 2018 Revised: May 2, 2018 Accepted: May 2, 2018

Corresponding author: Yoon-Kyoung Cho

Department of Biomedical Engineering, School of Life Sciences, Ulsan National Institute of Science and Technology, Center for Soft and Living Matter, Institute for Basic Science, 50 UNIST-gil, Eonyang-eup, Ulsan 44919, Korea

Tel: +82-52-217-2511, Fax: +82-52-217-2509, E-mail: ykcho@unist.ac.kr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6423-1834>

This project was mainly supported by a grant from the Korean Health Technology R&D Project, Ministry of Health & Welfare (H112C1845), funded by the Korean Government and by IBS-R020-D1 funded by the Korean Government.

Copyright © 2018 Korean College of *Helicobacter* and Upper Gastrointestinal Research

© The Korean Journal of *Helicobacter* and Upper Gastrointestinal Research is an Open-Access Journal. All articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

직 임상현장에서 진단에 활용되도록 허가된 예는 극히 한정적이며 이는 CTCs 검출과 그 임상적 중요성에 대하여 아직도 해결해야 할 문제가 많이 있음을 시사한다. 본 고에서는 현재까지 상용화된 대표적인 CTCs 분석 방법에 대하여 소개하고, 각 방법의 장단점을 비교하고 향후 전망에 대하여 고찰하고자 한다.

본 론

CTCs를 액체 생검에 활용하기 위해서는 혈액 내에 극미량으로 존재하는 CTCs를 고도의 민감도, 특이도, 재현성을 가지고 분리하는 기술이 필요하다. 대표적인 CTCs 분리 방법에는 암세포 표면의 특정 단백질 마커에 결합하는 항체를 이용하여 immunoaffinity 차이를 이용하는 분리 방법²⁻⁴과 라벨링 없이 암세포와 혈구세포의 크기, 밀도(density), 전기적 특성 등 물리적인 성질의 차이를 이용하는 방법⁵⁻¹¹이 있다(Fig. 1).

Immunoaffinity 차이 기반 분리 방법은 항원-항체 반응을 통해 특이적으로 CTCs를 분리하기 때문에 분리된 CTCs의 순도가 높은 장점이 있다. 일반적으로 특정 항체를 코팅한 자성 비드를 CTCs와 반응시킨 후 자석을 이용하여 자성 비드가 많이 붙은 CTCs를 포획하는 방법을 사용하거나, 표적 항체를 미세유체칩에 코팅하여 CTCs를 미세유체칩에 포획하고 다른 혈구세포는 씻어내는 방법을 사용한다. Immunoaffinity 차이 기반 분리 방법에 사용되는 CTCs 특이 항체로는 EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) antibody, HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) antibody 등이 있으며 특히 EpCAM antibody로 코팅된 자성 비드를 사용하는 CellSearch (Janssen Diagnostics, Raritan, NJ, USA)는 2004년부터 2008년 사이에 전이성 유방암, 대장암, 전립선암에서 암환자의 예후 진단에 대

해 미국 Food and Drug Administration로부터 승인을 받았다. 하지만 CTCs의 표면 특이 단백질의 발현량은 매우 다양하므로 표적 항체의 발현량이 적은 CTCs의 경우는 회수율이 좋지 않고 항원-항체 반응시간을 포함하는 CTCs 분리 프로세스 시간이 길고 실험 과정이 복잡하다는 단점이 있다. 또한 CTCs는 혈액 내에서 1~2시간 이내에 쉽게 파괴된다고 알려져 있다. 따라서, 채혈 이후에 빠른 시간 내에 CTCs 분리 실험을 하는 것이 중요하며, 이것이 불가능한 경우에는 혈액 보존용 특수 튜브에 혈액을 보관해야 한다.

Size-based separation 방법은 미세유체칩의 구조나 마이크로 사이즈의 기공을 갖는 막(membrane)을 이용하여 크기 차이로 CTCs를 빠르고 간단하게 걸러낸다. Inertia sorting 방법은 곡선 채널에서 크기가 다른 세포들이 각기 다른 dean force를 가진다는 점을 이용하여 나선형 채널을 갖는 미세유체칩을 활용하여 CTCs를 분리한다. 이러한 방법들을 이용하면 표면 특이 단백질 발현량이 다양한 CTCs를 모두 포획할 수 있고 분리 시간이 빠르며 실험 방법이 간편하고 비용이 저렴하다는 장점이 있다. 그러나, 일반적으로 CTCs가 8~20 μm , 백혈구가 6~10 μm 의 크기를 가지므로, 세포의 크기로 분리한 샘플에는 백혈구도 일부 존재하여 순도가 높은 CTCs를 얻기가 어렵다는 한계점이 있다.¹²

또 다른 물리적 성질 차이를 이용한 CTCs 분리 방법에는 밀도를 이용하는 방법과 유전율의 차이를 이용한 dielectrophoresis (DEP) 방법이 있다. 밀도 분리 방법은 원심 분리를 이용하여 각 세포들을 분리한다. 이 방법을 이용하면 높은 밀도를 갖는 적혈구를 제거하기는 쉬우나 CTCs와 백혈구는 밀도가 비슷하여 특이적으로 분리하기 어렵다. 분리 효율을 높이기 위해 특수한 밀도를 갖는 Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala,

Fig. 1. Commercially available technologies for circulating tumor cell (CTC) enrichment. (A) The immunoaffinity method uses specific antibody-coated magnetic particles which bind to the CTC surface antigen for CTC isolation.²⁻⁴ (B) The cell size-based filtration method uses micropore membrane to isolate bigger CTCs from blood cells.⁵⁻⁷ (C) The density method uses the density difference among blood cells to isolate CTCs. In this method, it is easy to remove high-density red blood cells.⁸ (D) The dielectrophoresis (DEP) method uses the dielectric properties of CTCs under an electric field.⁹ (E) The inertia-sorting method uses dean force at a curved channel to isolate CTCs.¹⁰ Adapted from the article of Alix-Panabières and Pantel. Nat Rev Cancer 2014;14:623-631, with permission.¹¹

Sweden) 등의 density gradient medium을 사용하는 경우가 있다. 일반적으로는 추가적인 CTCs 분리 방법을 사용하기 전 적혈구를 제거하고 buffy coat layer를 얻기 위한 혈액 전처리 과정으로 사용된다. DEP 방법은 전기장을 가했을 때 각 세포의 크기와 유전율에 따라 DEP 힘이 다르다는 점을 이용하여 세포를 분리한다. 효과적인 분리를 위해 전혈을 직접 사용할 수는 없고, 암세포 분리 효율을 높이기 위해 전기전도도를 최적화한 특수 버퍼를 사용해야 하는 한계점이 있다.

이상과 같은 방법을 활용한 다양한 상용화 기기들이 출시되어 있으며(Table 1),²⁻¹⁰ 이를 통해 다양한 암환자의 혈액을 사용한 임상 실험 결과들이 보고되고 있다. 또한, 각각의 단점을 극

복하기 위하여 물리적인 방법과 negative selection 기반 immunoaffinity 방법을 결합한 형태의 기기나 장비, 암의 전이에 보다 관련이 있다고 알려진 CTC cluster를 분리하기 위한 칩 등 CTCs를 고효율, 고순도로 분리하기 위한 다양한 시도가 이루어지고 있다.

혈액으로부터 분리한 CTCs를 검출하는 방법으로는 면역형광염색법이 대표적이다. Table 2에 나타난 바와 같이, 혈액 속 백혈구와 CTCs를 구분하기 위해 각 세포의 특이 단백질 항체와 형광물질이 결합된 dye를 사용하는데, 백혈구 특이 단백질 항체로는 CD 45 antibody를 주로 사용하고, CTCs 특이 단백질 항체로는 EpCAM antibody와 Cytokeratin antibody를 주

Table 1. Circulating Tumor Cell Detection Methods

	Enrichment method	Sample type	Sample volume (mL)	Processing time	Advantages	Limitations	Ref.
Immuno-affinity	CellSearch	Buffy coat layer	7.5	>2 hr	• Food and Drug Administration-approved • Specific	• Costly • Preprocessed blood is required • Antigen-dependent	2,3
Cell Size	IsoFlux	Whole blood	7~10	>2 hr	• Specific	• Antigen-dependent	4
	ScreenCell	RBC lysed & cell prefixed blood	3	>15 min	• Fast • Label-free	• Preprocessed blood is required • High volume is not available • Low specificity	5
	CD-PRIME	Whole blood or buffy coat layer	1~7.5	<5 min	• Fast • Label-free • Relatively inexpensive	• Low specificity	6
	CelSee	Diluted blood	2	>30 min	• Fast • Label-free	• High volume is not available	7
Density	OncoQuick	Whole blood	15~30	<45 min	• Fast • Label-free • Relatively inexpensive	• High volume is required • Low specificity	8
DEP	DEPArray	Buffy coat layer	4~8	~1 hr	• Specific • Label-free	• Preprocessed blood is required • Limited application	9
Inertia sorting	Clearcell	Whole blood	7.5	<1 hr	• Label-free	• Low specificity	10

DEP, dielectrophoresis.

Table 2. Typical Examples of Markers Used for Circulating Tumor Cell Detection

Epithelial marker	Lymphocyte	Cancer-specific marker	Mesenchymal marker	Stem cell marker
EpCAM Cytokeratin 5, 7, 8, 18, and 19	CD45	HER2, PSA, PSMA, AR-V7, ALK, EGFR, ASGR1, CA-125	Vimentin FOXC1 FOXC2 SNAI1	Oct4, Nanog, c-Myc, TWIST, CD24, CD44, CD133, hTERT

EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; CD, cluster of differentiation; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; PSA, prostate-specific antigen; PSMA, prostate-specific membrane antigen; AR-V7, androgen-receptor splice variant 7; ALK, anaplastic lymphoma kinase; EGFR, epidermal growth factor receptor; ASGR1, asialoglycoprotein receptor 1; CA-125, carcinoma antigen-125; FOXC, forkhead box; Oct4, octamer-binding transcription factor 4; hTERT, human telomerase reverse transcriptase.

로 사용한다. 암환자의 혈액으로부터 면역형광염색법으로 검출한 CTCs의 개수 변화와 암 용적의 증감 사이에 강한 상관관계가 있다는 임상 실험 보고가 있으며,¹³ CTCs의 개수와 암환자의 생존을 및 예후진단에도 강한 상관관계가 있다는 연구 결과도 있다.¹⁴⁻¹⁸

위암 환자를 대상으로 진행한 저자들의 연구에서 지름 8 μ m 크기의 기공을 갖는 막을 이용하여 크기 차이로 CTCs를 분리하였는데, fluid-assisted separation technology (FAST) 기술을 적용한 lab-on-a-disc를 이용 시 분석 시간이 매우 빠르면서도 고효율의 CTCs 분리가 가능하였다.¹⁹ 총 116명의 위암 환자와 31명의 정상인 혈액에서 CTCs를 분리하여 비교하였을 때 위암 진단에 있어서 85.3%의 민감도와 90.3%의 특이도를 보였다.

최근에는 CTCs의 개수뿐만 아니라 CTCs의 유전 정보를 이용하여 암의 분자진단에 활용하는 연구가 활발하게 진행 중이다. 각 CTCs의 유전자 발현량을 분석하여 CTCs를 그룹화하여 특성을 분석하는 연구가 진행되고 있으며, 전이와 관련된 유전자의 발현량이 높은 CTCs가 암환자의 생존기간에 보다 밀접한 연관성을 가질 것으로 예상된다.^{20,21} 또한, CTCs 기반 표적치료제 사용과 관련하여 표적 돌연변이를 검출하는 연구도 활발히 진행 중에 있는데, 비소세포성 폐암(non-small-cell lung cancer)의 경우 epidermal growth factor receptor (EGFR) 돌연변이를 표적으로 하는 표적치료제가 개발되어 있어 CTCs를 통한 EGFR 돌연변이 검출이 주목받고 있다. 현재 비소세포성 폐암 환자의 CTCs에서 검출된 EGFR 돌연변이와 조직에서 검출된 EGFR 돌연변이를 비교하여 일치율을 검증하는 단계이며, 높은 일치율을 보인다는 임상 보고들이 있다.²²⁻²⁴ 전립선암의 경우 androgen-receptor splice variant 7 (AR-V7) 돌연변이에 따라 치료 방법이 달라지므로 전립선암 환자의 CTCs에서 AR-V7 돌연변이를 검출하는 연구가 진행 중에 있다.^{25,26} 위암의 경우, 효과가 입증된 표적치료제로 HER2 유전자에 결합하는 항체인 herceptin 기반 bevacizumab (Genentech, San Francisco, CA, USA), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2에 특이적으로 결합하는 항체인 cyramza 기반 ramucirumab (Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA)이 개발되어 있으나, 아직 위암 환자 유래 CTCs를 이용한 연구는 진행되지 않았다. 하지만 HER2 양성 유방암 환자 유래 CTCs에서 herceptin의 영향을 확인한 결과가 보고되었으며,²⁷ 대장암 환자의 혈중 VEGFR-2를 측정하여 ramucirumab의 효과를 확인한 임상 실험이 진행되고 있어²⁸ 위암 환자 유래 CTCs에서도 표적치료제 target 유전자를 검출하는 연구가 가능할 것으로 기대된다. 차후 CTCs 기반 액체 생검과 분자진단이 정립되고 나면 조직 생검의 한계점을 보완하여 돌연변이를 고민감도로 검출하는 데 활용되어 약제 선택에 도움을 줄 수

있을 것으로 기대되며, 주기적인 모니터링을 통해 내성 돌연변이가 발생하는 경우 보다 빠른 대처가 가능하여 효과적으로 환자 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

기존 조직 생검의 단점을 극복하고 환자 맞춤형 치료를 가능하게 하기 위한 방안으로 액체 생검이 주목받고 있으며, 액체 생검에 활용되는 바이오마커 중 CTCs는 온전한 세포 형태로 분리가 가능하기 때문에 유전자 분석뿐만 아니라 세포의 형태, 단백질, RNA 분석, 세포 배양, patient-derived tumor xenografts model 개발 및 암전이 기전에 관한 연구 등 다방면으로 활용이 가능할 것으로 기대되는 바이오마커이다. 현재 immuno-affinity 차이를 이용하거나 라벨링 없이 물리적 성질 차이를 기반으로 다량의 혈구세포에서 CTCs를 분리해내는 상용화 기기들이 출시되어 있다. 지금까지 면역형광염색을 통해 CTCs를 검출하여 CTCs의 개수와 암환자의 예후 간의 상관관계를 분석하는 연구가 많이 보고되어 왔고, 최근에는 CTCs 기반 분자진단을 통해 각 암종의 표적치료제 target 돌연변이를 검출하는 연구가 활발히 진행 중에 있다.

그러나, 향후 CTCs 기반 액체 생검이 실제 임상현장에서 조직 생검을 보완하는 분석법으로 자리잡기 위해서는 실험 단계별 프로토콜 정립 및 정도관리와 표준화 등 해결해야 할 점이 많이 남아 있다. 채혈 방법 및 채혈 튜브의 종류, 사용한 혈액량, 혈액의 전처리 과정, 실험에 소요된 시간, 면역형광염색에 사용된 항체의 종류와 염색방법, 이미징 조건, 검출 조건, 분자진단 방법 등 결과에 영향을 주는 중요한 인자들이 각 분석법 별로 모두 다양한 것이 현재 실정이다. 즉, 현재 개발 중인 다양한 CTCs 분리 방법들에 사용되는 샘플의 종류와 준비 과정 등이 모두 다르고 표준화가 되어 있지 않아서, CTCs 분리 방법들간의 민감도, 특이도, 재현성 등을 직접 비교하기에는 어려움이 있다. 한편, 액체 생검 기술은 2017년 세계 10대 기술에 선정될 만큼 전 세계적으로 그 중요성을 인지하고 있으며, 가장 간편하고 정확하게 암을 조기 진단할 수 있는 기술 개발을 위해 경쟁이 매우 치열한 분야이다. 향후, 대규모 임상실험을 통해 정립된 프로토콜을 기반으로 CTCs 기반 액체 생검을 활용하여 보다 효과적인 환자 맞춤형 치료에 기여할 수 있기를 기대한다.

REFERENCES

1. Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: a window into cancer biology and metastasis. *Curr Opin Genet Dev* 2010;20:96-99.

2. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 2007;13:920-928.
3. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW. Significance of circulating tumor cells detected by the Cellsearch system in patients with metastatic breast colorectal and prostate cancer. *J Oncol* 2010;2010:617421.
4. Harb W, Fan A, Tran T, et al. Mutational analysis of circulating tumor cells using a novel microfluidic collection device and qPCR Assay. *Transl Oncol* 2013;6:528-538.
5. Desitter I, Guerrouahen BS, Benali-Furet N, et al. A new device for rapid isolation by size and characterization of rare circulating tumor cells. *Anticancer Res* 2011;31:427-441.
6. Kim TH, Lim M, Park J, et al. FAST: size-selective, clog-free isolation of rare cancer cells from whole blood at a liquid-liquid interface. *Anal Chem* 2017;89:1155-1162.
7. Gogoi P, Sepehri S, Zhou Y, et al. Development of an automated and sensitive microfluidic device for capturing and characterizing circulating tumor cells (CTCs) from clinical blood samples. *PLoS One* 2016;11:e0147400.
8. Königsberg R, Obermayr E, Bises G, et al. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol* 2011;50:700-710.
9. Hodgkinson CL, Morrow CJ, Li Y, et al. Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med* 2014;20:897-903.
10. Teo J, Mirenska A, Tan M, et al. A preliminary study for the assessment of PD-L1 and PD-L2 on circulating tumor cells by microfluidic-based chipcytometry. *Future Sci OA* 2017;3:FSO244.
11. Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* 2014;14:623-631.
12. Coumans FA, van Dalum G, Beck M, Terstappen LW. Filter characteristics influencing circulating tumor cell enrichment from whole blood. *PLoS One* 2013;8:e61770.
13. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007;450:1235-1239.
14. 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.
15. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3213-3221.
16. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:6302-6309.
17. Krebs MG, Sloane R, Priest L, et al. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1556-1563.
18. Zhou J, Dong F, Cui F, Xu R, Tang X. The role of circulating tumor cells in evaluation of prognosis and treatment response in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017;79:825-833.
19. Kang HM, Kim GH, Jeon HK, et al. Circulating tumor cells detected by lab-on-a-disc: role in early diagnosis of gastric cancer. *PLoS One* 2017;12:e0180251.
20. Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, et al. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Mol Cancer Res* 2011;9:997-1007.
21. Adams DL, Alpaugh RK, Tsai S, Tang CM, Stefansson S. Multi-phenotypic subtyping of circulating tumor cells using sequential fluorescent quenching and restaining. *Sci Rep* 2016;6:33488.
22. Ke Z, Lin M, Chen JF, et al. Programming thermoresponsiveness of NanoVelcro substrates enables effective purification of circulating tumor cells in lung cancer patients. *ACS Nano* 2015;9:62-70.
23. Sundaresan TK, Sequist LV, Heymach JV, et al. Detection of T790M, the acquired resistance EGFR mutation, by tumor biopsy versus noninvasive blood-based analyses. *Clin Cancer Res* 2016;22:1103-1110.
24. Yeo T, Tan SJ, Lim CL, et al. Microfluidic enrichment for the single cell analysis of circulating tumor cells. *Sci Rep* 2016;6:22076.
25. Scher HI, Lu D, Schreiber NA, et al. Association of AR-V7 on circulating tumor cells as a treatment-specific biomarker with outcomes and survival in castration-resistant prostate cancer. *JAMA Oncol* 2016;2:1441-1449.
26. Antonarakis ES, Lu C, Luber B, et al. Clinical significance of androgen receptor splice variant-7 mRNA detection in circulating tumor cells of men with metastatic castration-resistant prostate cancer treated with first- and second-line abiraterone and enzalutamide. *J Clin Oncol* 2017;35:2149-2156.
27. Zhang JL, Yao Q, Chen Y, Wang JH, et al. Effects of Herceptin on circulating tumor cells in HER2 positive early breast cancer. *Genet Mol Res* 2015;14:2099-2103.
28. Tabernero J, Hozak RR, Yoshino T, et al. Analysis of angiogenesis biomarkers for ramucirumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer from RAISE, a global, randomized, double-blind, phase III study. *Ann Oncol* 2018;29:602-609.