위암에서 순환종양세포의 임상적 의의

전혜경^{1,2}, 김광하^{1,2}

부산대학교 의과대학 내과학교실¹, 부산대학교병원 의생명연구원²

Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Gastric Cancer

Hye Kyung Jeon^{1,2}, Gwang Ha Kim^{1,2}

Department of Internal Medicine, Pusan National University School of Medicine¹, and Biomedical Research Institute, Pusan National University Hospital², Busan, Korea

Cancer specimens obtained *via* surgical resection or biopsy are generally used to understand tumor-associated alterations; however, those approaches cannot always be performed because of their invasive nature, and they may fail to reflect current tumor dynamics and drug sensitivity, which may change during the therapeutic process. Therefore, many research groups have focused on developing a non-invasive biomarker with the ability to monitor tumor dynamics. Circulating tumor cells (CTCs) are metastatic cells released from the primary tumor into the bloodstream. Hematogenous spreading of CTCs is a crucial step in the metastatic cascade, which leads to the formation of overt metastases. CTCs have attracted considerable attention because of their easy accessibility and their superiority over conventional tumor markers. Detecting CTCs is considered a valuable modality to determine prognosis and monitor response to systemic therapies in patients with gastric cancer. Moreover, molecular analyses of CTCs may provide important biological information for individual patients with cancer, which may lead to the development of personalized cancer treatment. In this article, we review potential roles and clinical applications of CTCs in patients with gastric cancer. (**Korean J Helicobacter Up Gastrointest Res** 2018;18:162-167)

Key Words: Neoplasms; Neoplastic cells, circulating; Stomach

서 론

위암은 전 세계적으로 감소하는 추세임에도 불구하고, 국내에서는 여전히 남성의 암 발생률 1위, 여성의 암 발생률 4위로 매우 빈도가 높은 질환이다.¹ 2010년에서 2014년까지 진단된 위암의 5년 생존율은 74.4%로, 이전 발생기간에 비해 점차 향상되고 있다.¹ 이는 국내 내시경 기술의 발전 및 활발히 진행되고 있는 국가 암 검진사업으로 인해 조기 위암 진단의 빈도가 증가하는 것이 중요한 요인으로 생각된다.² 하지만 원격전이와 있는 진행성 위암의 경우 5년 생존율이 6.3%로 여전히 예후가 나쁜 암종이며,³ 진행성 위암의 40% 이상에서는 항암 치료에 반응이 없거나 치료 중 항암제에 내성이 발생하여 불량한 예후를 초래한다.⁴ 또한 수술적 완전 절제가 가능했던 환자의 경우

에서도 30~40%에서는 결국 재발하는 것으로 알려져 있는데,^{5,6} 이는 현재까지 개발된 진단법으로는 찾아낼 수 없는 잠재적 전이 세포의 존재를 시사한다. 따라서 암의 치료에 대한 반응을 모니터링하고 재발 및 전이를 예측할 수 있는 인자를 정확히 평가하는 것이 암 환자의 예후에 큰 도움이 될 것이다. 이러한 상황에서 순환종양세포(circulating tumor cells, CTCs)는 최근 큰 관심을 받고 있다.

CTCs는 말초 혈액에서 발견되는 종양세포로 정의되며, 종양 조직에서 떨어져 나와 암 환자의 혈관 내에서 혈행을 따라 순환하여, 궁극적으로 암 전이 과정에 기여하는 것으로 알려져 있다.^{7,8} CTCs의 존재는 이미 19세기에 보고되었고,⁹ 이후 오랜 기간 동안 매력적인 연구 주제였으나 말초 혈액 내에 매우 드물게 존재하는 CTCs의 분리 및 검출에 필요한 기술의 부재로 연구에 많은 제한이 있었다. 최근 들어 공학 및 분자생물학의 비약적 발전에 힘입어 효율적인 CTCs 분리가 가능해지면서 관련 연구가 다시 조명을 받고 있다. 본고에서는 위암에서 CTCs의 의의 및 임상 적용, 앞으로의 전망에 대하여 살펴보기로 한다.

Received: February 5, 2018 Revised: March 22, 2018 Accepted: March 22, 2018

Corresponding author: Gwang Ha Kim

Department of Internal Medicine, Pusan National University School of Medicine, and Biomedical Research Institute, Pusan National University Hospital, 179 Gudeok-ro, Seo-gu, Busan 49241, Korea

Tel: +82-51-240-7869, Fax: +82-51-244-8180, E-mail: doc0224@pusan.ac.kr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9721-5734>

This work was supported by clinical research grant from Pusan National University Hospital in 2017.

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.

본 론

1. 순환종양세포와 전이

CTCs는 1869년 오스트리아 의사인 Ashworth⁹에 의해 처음으로 보고되었는데, 암 전이로 사망한 환자의 혈액에서 암세포를 관찰한 후 암세포가 원래 발생한 부위에서 떨어져 나와 혈액을 타고 다니다가 다른 곳에서 정착하여 자라면서 암 전이를 일으킨다고 보고하였다. 1889년 Paget의 “Seed and Soil” 가설, 즉 종양세포가 원발성 종양에서 떨어져 나와 혈액으로 들어가고 원위 장기로 이동하여 안착한 후에 전이가 일어난다는 개념이 보고¹⁰된 이후, 현재까지 많은 연구를 통해 혈류와 림프관, 그리고 림프관, 심낭, 복강의 경로로 종양세포가 전파되어 전이가 일어나는 것으로 알려져 있다.¹¹ 그 중 혈행성 전이는 원격 전이가 일어나는 가장 흔한 경로로, 원발암에서 암세포가 떨어져 나와 혈액을 타고 순환하다가 골수에서 휴면기를 가진 뒤 이차적인 전이 장소로 이동하기 위해 혈액으로 다시 들어간다.^{12,13} 최근 원발성 종양이 성장 초기에 전이 능력을 갖는다는 새로운 전이 모델이 제시되었는데, 초기에 종양세포가 이미 림

프절, 말초 혈액, 골수에서 검출된다고 하였다.¹⁴ 대부분 고형암은 상피세포에서 기원하는데, 상피세포는 특유의 강한 세포연접을 이루고 있어 운동성이 없다. 이러한 상피세포가 운동성을 가지려면 자유로운 형태의 모습으로 변해야 하는데, 이 과정을 전이에 있어 필수적인 상피간엽이행(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)이라고 할 수 있다(Fig. 1).¹⁵ 간엽을 침범한 종양세포는 세포연접이 소실되어 혈관을 이루는 내피 세포를 뚫고 혈액으로 들어가서 환자의 혈액샘플에서 CTCs로 검출된다.¹⁵⁻¹⁷ 분자적 특징으로는 세포연접 분자인 E-cadherin의 감소와 밀착연접의 붕괴이며, 간엽 인자, 즉 N-cadherin, vimentin, fibronectin, twist 등이 증가한다. 정상적인 배아발생과 기관형성, 조직 재생에 필수적인 EMT 프로그램이 암이라는 환경에서 병적으로 활성화되면 암 전이와 항암제 저항성을 초래하여 불량한 예후를 초래한다. EMT를 거친 CTCs는 혈액 내에서 다른 장기로 이동하여 간엽상피이행(mesenchymal-epithelial transition)을 거쳐 미세전이 형태의 단독 세포 또는 새로운 전이암을 형성한다.¹⁵⁻¹⁷

Fig.1. Sites of EMT and MET in the emergence and progression of carcinoma. EMT, epithelial-mesenchymal transition; MET, mesenchymal-epithelial transition. Adapted from the article of Thiery. Nat Rev Cancer 2002;2:442-454, with permission.¹⁵

2. 순환종양세포의 측정 기술 동향

보통 CTCs는 말초 혈액 내에 수백만 개의 혈구 세포 중 단 하나 정도로 매우 드물게 존재하기 때문에,¹⁸ 이를 확인하기 위해서는 고도의 민감도와 특이도 및 재현성을 가지는 진단 기술이 필요하다. CTCs의 측정을 위해서 세포의 농축(enrichment)과 분리 및 탐지 과정을 거치는데, 대표적인 측정 방식은 polymerase chain reaction (PCR)을 사용하는 방법과 cytometry를 사용하는 방법으로 분류할 수 있다. 1990년대 이후, 초기 연구에서는 PCR을 사용하는 방법 중 하나인 reverse transcriptase-PCR 기법을 주로 이용하였는데, 이는 종양과 연관된 마커에서 mRNA expression을 평가하여 CTCs의 분자적 측정을 하는 방법이다. 위암 환자에서 CTCs에 과발현된 survivin은 불량한 예후와 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었다.^{19,20} 최근에는 혈액 내에서 세포를 직접 측정할 수 있는 cytometry를 사용하는 방법이 개발되어 재현성 높은 정량적인 결과를 얻을 수 있게 되었다. 이들 중 CellSearch system (Janssen Diagnostics, Raritan, NJ, USA)은 대표적인 cytometry를 사용하는 방법 중 하나로, 전이성 유방암, 대장암, 전립선 암에서 CTCs를 탐지하는 진단 기술로써 유일하게 미국 식품의약국(Food and Drug Administration, FDA)의 승인을 받았다.²¹ 암 환자의 혈액에서

순환하는 상피세포를 종양 유래 세포로 가정하여 상피세포 표지자인 epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)의 항체로 코팅된 마그네틱 비드에 양성인 세포들만 농축하고, 그 중 세포 핵 염색을 위한 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)와 상피 세포 표지자인 cytokeratin에 양성이며 백혈구에만 발현되는 CD45에 음성인 경우 CTCs로 판단한다.²² 그 외에도 전 세계적으로 EpCAM이 아닌 다른 마커들을 이용하거나 암세포의 크기 및 물리적 특성 등 다양한 원리를 이용하여 CTCs를 분리하고 동정하고 있다.^{23,24}

3. 위암에서 순환종양세포의 의의

CTCs에 대한 연구는 유방암, 전립선암, 대장암 등을 포함하여 많은 악성 종양에서 진행되고 있으나, 위암에서는 아직까지 임상결과가 적은 편이고, 진단과 예후를 위한 적절한 기준에 대한 합의는 없는 상태이다. 최근 활발하게 진행이 되고 있는 cytometry를 사용하는 방법 연구를 요약하면 Table 1과 같다.^{23,25-34}

1) 진단과 예후 마커

위암 환자에서 CTCs의 진단적 유용성을 보기 위해 size-selective CTC isolation technique인 fluid-assisted separation technique disc를 이용한 최근 국내 연구에서 116명의 위암 환자와 31명의 건강인의 혈액에서 CTCs 검사를 시행하였고, 2

Table 1. Cytometric-based Studies on Circulating Tumor Cells (CTCs) in Blood Specimens Obtained from Patients with Gastric Cancer

Year	Author	No. of patients	Methods	Marker	Positive definition	Detection of CTCs (n, %)	Outcome	Significance
2007	Pituch-Noworolska et al. ²⁵	57	FACS	CK8,18,19	≥ 3 CTCs	31 (54.4)	OS	No
2008	Hiraiwa et al. ²⁶	14 (non-metastasis) 27 (metastasis)	CellSearch	EpCAM CK8,18,19	≥ 2 CTCs	2 (14.3) 15 (55.6)	OS Monitoring	Yes
2010	Matsusaka et al. ²⁷	52 (baseline) 51 (2 weeks) 48 (4 weeks)	CellSearch	EpCAM CK8,18,19	≥ 4 CTCs	17 (32.7) 7 (13.7) 9 (18.8)	OS, PFS Monitoring	Yes
2013	Uenosono et al. ²⁸	148 (resection) 103 (non-resectable)	CellSearch	EpCAM CK8,18,19	≥ 1 CTC	16 (10.8) 62 (60.2)	OS, RFS	Yes
2015	Okabe et al. ²⁹	136	CellSearch	EpCAM CK8,18,19	≥ 1 CTC	25 (18.4)	PFS	Yes
2015	Yuan et al. ³⁰	31	FACS	CD44+CD45-	-	14 (45.2)	-	-
2016	Kolostova et al. ²³	22	MetaCell	CK18,19,20,7 EpCAM, MUC1, HER2, EGFR	-	13 (59.1)	-	-
2016	Li et al. ³¹	136 (baseline) 106 (6 weeks)	CellSearch	EpCAM CK8,18,19	≥ 3 CTCs	57 (41.9) 26 (24.5)	OS, PFS Monitoring	Yes
2017	Kang et al. ³²	116	FAST	EpCAM/CK	≥ 2 CTCs	99 (85.3)	-	-
2017	Liu et al. ³³	59	CELLlection	EpCAM CK7,8,18,19	> 2 CTCs	36 (61.0)	OS, PFS Monitoring	Yes
2017	Pernot et al. ³⁴	106 (baseline) 65 (4 weeks)	CellSearch	EpCAM CK8,18,19	≥ 2 CTCs	49 (46.2) 12 (18.5)	OS, PFS Monitoring	Yes

FACS, fluorescence-activated cell sorting; CK, cytokeratin; OS, overall survival; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; PFS, progression-free survival; RFS, recurrence-free survival; FAST, fluid-assisted separation technique.

개의 CTCs를 기준으로 하였을 때 위암 진단의 민감도 85.3%, 특이도 90.3%로 보고하였다.³²

진단적인 목적 외에도 말초 혈액을 통한 CTCs의 연속적인 분석은 쉽게 접근할 수 있어, 최근 CTCs 수와 전이 여부, 암의 악성도, 무병 생존율(disease-free survival), 무진행생존율(progression-free survival), 전체생존율(overall survival)과의 상관성에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. CellSearch system을 이용하여 251명의 위암 환자와 15명의 건강인의 혈액에서 CTCs를 측정된 연구에서, 근치적 절제술을 받은 위암 환자 중 16명(16/148, 10.8%)에서 CTCs가 확인되었고, 이 경우 암의 침윤 깊이, 림프절 전이 및 원격 전이 여부와 의미 있는 연관성을 보이며 더 높은 재발률이 확인되었다.²⁸ 또한 근치적 절제술이 불가능했던 환자 중에서는 62명(62/103, 60.2%)에서 CTCs가 측정되었고, 정상인에서는 CTCs가 측정되지 않았다. 이를 토대로 혈액에서 측정된 CTCs는 종양의 진행 및 악성도를 예측하는 데 도움이 되는 검사법으로 제시되었다.²⁸ CellSearch system을 이용한 또 다른 연구에서는 136명의 진행성 위암 환자에서 CTCs를 측정하였고, CTCs는 무진행생존율의 독립적인 인자라고 주장하였다.²⁹

현재까지 실제 임상에서는 암의 크기나 림프절, 원격 전이 여부 등 원발 종양의 특성만을 고려하여 환자의 예후를 판정하고 있으나, 여기에 혈액 내 암세포의 정보를 추가한다면 환자의 예후를 보다 세밀하게 구분할 수 있을 것으로 기대된다.

2) 항암 치료 평가 마커

임상적 측면에서 CTCs 분석을 통해 기대되는 또 다른 유용성은 항암제 등의 치료 반응을 모니터링할 수 있다는 점이다. 암 환자의 치료 과정 중에 수시로 변화하는 질병 상태를 확인하기 위해 복잡하고 위험한 술기를 시행해야 한다면 원활하게 모니터링이 수행되기 어려워 예후에 불리한 영향을 미칠 것이다. 말초 혈액을 통한 CTCs 검사는 상대적으로 비침습적이고, 반복적 채취가 가능하다. 따라서 동일한 환자에서 주기적으로 CTCs 변화를 분석함으로써 현재 진행중인 치료가 효과적인지, 혹은 현재 치료에 반응이 없거나 저항을 보이는지를 예측하는 데 도움이 될 수 있다. 현재 위암에서 치료 반응 모니터링에 혈청 carcinoembryonic antigen (CEA)와 carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9)가 흔히 사용되고 있지만 항암 치료 후 일시적인 증가 소견을 보일 수도 있는 것으로 보고되어,³⁵ 초기 치료 후 실시간으로 모니터링 할 수 있는 CTCs 검사의 발전이 환자 치료 과정에 중요할 수 있다.

52명의 진행성 위암 환자에서 S-1 기반 항암 치료 전, 치료 2주와 4주 후에 각각 말초 혈액에서 CTCs를 측정된 연구에서, 치료 후 2주와 4주 후에 CTCs의 수가 4 이상인 경우 불량한 무진행생존율 및 전체생존율을 보고하였다.²⁷ 또 다른 연구에서

는 136명의 진행성 위암 환자에서 치료 전과 6주간의 항암 치료 후 CTCs를 확인하여 치료 후 CTCs가 3개 이상인 경우가 불량한 무진행생존율과 전체생존율을 예측할 수 있는 인자로 확인되었고, 치료 후 영상학적 치료반응평가 결과와 높은 상관관계를 보였다. 또한 치료 전에 비해 치료 후 CTCs의 수가 증가되면 유의하게 예후가 나빠지는 것으로 보고하여, 항암 치료 후 CTCs 검사는 빠른 치료 효과 판정 및 예후 평가에 유용한 임상적 도구임을 제시하였다.³¹

3) 항암 억제 표적의 동정

EMT 과정을 거친 CTCs는 세포 성장보다는 세포 운동성을 촉진하여 암세포가 혈관을 빠져 나오게 되는데, 이 경우 대부분의 CTCs는 세포분열이 일어나지 않기 때문에 기존의 세포독성 항암제로는 한계가 있다.^{36,37} 따라서 후지거나 세포분열이 일어나지 않는 CTCs에 대한 표적 치료를 기존의 항암 치료에 추가하는 것이 암 환자의 예후 향상에 도움이 될 수 있다. 예를 들면, 유방암 환자에서 human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 단백질은 가장 대표적인 표적 치료의 대상으로, trastuzumab은 HER2 단백질의 세포 밖 도메인 부위를 표적으로 하는 단클론 항체로 개발되어 처음으로 FDA 승인을 받았다.³⁸ 임상에서는 원발암에서 HER2 과발현 여부를 확인 후 trastuzumab 사용 여부를 결정하고 있다. 하지만 여러 연구에서 HER2 음성 유방암 환자의 혈액에서 HER2 양성인 CTCs가 측정될 수 있음을 보고하고 있는데,^{39,40} 이는 원발성 암 조직의 일부분만 떼어서 시행하는 분석만으로는 암의 이질성, 즉 부위에 따라 성질 및 유전적 변이가 다른 특성을 가진 세포 중 일부를 놓칠 수 있음을 시사한다. 또한 암 치료 중 조직의 표적 발현이 변할 수 있는데 반복적으로 원발암 또는 전이암에서 검체를 확보해 정보를 얻는 것은 거의 불가능하다. 이러한 어려움을 극복하기 위해 CTCs는 매우 매력적인 대안이 될 수 있다. 원발암의 여러 부위에서 떨어져 나온 CTCs는 암의 이질성을 반영할 수 있고, 비침습적인 말초 혈액 검사를 통해 동일한 환자에서 반복 채취가 가능하다는 장점이 있어, CTCs 검사를 통해 표적 치료에 적합한 환자를 치료 전에 정확히 구분해내고, 표적 발현의 변화를 감지할 수 있다. 이는 향후 위암 환자의 CTCs 연구에서도 진행되어야 할 중요한 목표이다.

4. 향후 전망

대표적인 CTCs 검출 방법인 CellSearch system의 경우 상피세포 표지자인 EpCAM에 양성인 세포를 분리하는데, 이는 EMT 과정을 거친 CTCs는 위 음성으로 간과할 수 있어 EMT phenotype을 가지는 CTCs의 정확한 검출을 위한 마커를 찾는 것이 향후 과제이다. 또한 위암 환자에서 CTCs의 특성 분석을 위해 지금까지 표준화된 연구결과가 없을 뿐 아니라, 각각의 연

구에서 서로 다른 농축 및 측정 과정을 시도하고 있으며, 심지어 사용하는 마커조차 서로 다른 것이 현실이다. 따라서 표준화된 검출 시스템을 개발하고 이를 이용한 대규모의 임상 연구를 통해 위암 환자의 진단과 예후에 대한 적절한 기준을 정하고, 임상적 의의를 확인하는 것이 매우 중요하겠다.

결 론

현재까지 여러 연구를 통해 말초 혈액 내 CTCs는 위암 환자의 예후를 예측하거나, 현재 진행중인 치료의 모니터에 유용한 검사로 확인되었다. 향후 CTCs 연구는 분리된 종양세포를 이용하여 악성 종양의 증식 및 전이 과정에 중요한 메커니즘을 규명하는 데 추가적인 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대되며, 더 나아가 위암 환자에서 약물 민감도 및 내성과 관련된 분자 생물학적 표적을 찾아 개별 환자의 맞춤 치료에 큰 역할을 할 것으로 기대된다.

REFERENCES

1. Jung KW, Won YJ, Oh CM, Kong HJ, Lee DH, Lee KH. Cancer Statistics in Korea: incidence, mortality, survival, and prevalence in 2014. *Cancer Res Treat* 2017;49:292-305.
2. Nam SY, Choi IJ, Park KW, et al. Effect of repeated endoscopic screening on the incidence and treatment of gastric cancer in health screenees. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:855-860.
3. National Cancer Information Center. Common cancer sites in Korea [Internet]. Goyang: National Cancer Information Center, [cited 2018 May 18]. Available from: <https://www.cancer.go.kr/lay1/S1T648C652/contents.do>.
4. Hartgrink HH, Jansen EP, van Grieken NC, van de Velde CJ. Gastric cancer. *Lancet* 2009;374:477-490.
5. Lim DH, Kim DY, Kang MK, et al. Patterns of failure in gastric carcinoma after D2 gastrectomy and chemoradiotherapy: a radiation oncologist's view. *Br J Cancer* 2004;91:11-17.
6. Marrelli D, De Stefano A, de Manzoni G, Morgagni P, Di Leo A, Roviello F. Prediction of recurrence after radical surgery for gastric cancer: a scoring system obtained from a prospective multicenter study. *Ann Surg* 2005;241:247-255.
7. Onuigbo WI. An index of the fate of circulating cancer cells. *Lancet* 1963;2:828-831.
8. Robinson KP, McGrath R, McGrew E. Circulating cancer cells in patients with lung tumors. *Surgery* 1963;53:630-636.
9. Ashworth T. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aus Med J* 1869;14:146-149.
10. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989;8:98-101.
11. Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 1978;38:2651-2660.
12. Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. Review: biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer* 2008;123:1991-2006.
13. Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med* 2010;16:398-406.
14. Bernards R, Weinberg RA. A progression puzzle. *Nature* 2002;418:823.
15. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442-454.
16. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119:1420-1428.
17. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 2011;331:1559-1564.
18. Allard WJ, Matera J, Miller MC, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004;10:6897-6904.
19. Bertazza L, Mocellin S, Marchet A, et al. Survivin gene levels in the peripheral blood of patients with gastric cancer independently predict survival. *J Transl Med* 2009;7:111.
20. Yie SM, Lou B, Ye SR, et al. Detection of survivin-expressing circulating cancer cells (CCCs) in peripheral blood of patients with gastric and colorectal cancer reveals high risks of relapse. *Ann Surg Oncol* 2008;15:3073-3082.
21. Andree KC, van Dalum G, Terstappen LW. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Mol Oncol* 2016;10:395-407.
22. Nagrath S, Sequist IV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007;450:1235-1239.
23. Kolostova K, Matkowski R, Gürlich R, et al. Detection and cultivation of circulating tumor cells in gastric cancer. *Cytotechnology* 2016;68:1095-1102.
24. Lee A, Park J, Lim M, et al. All-in-one centrifugal microfluidic device for size-selective circulating tumor cell isolation with high purity. *Anal Chem* 2014;86:11349-11356.
25. Pituch-Noworolska A, Kolodziejczyk P, Kulig J, et al. Circulating tumour cells and survival of patients with gastric cancer. *Anticancer Res* 2007;27:635-640.
26. Hiraiwa K, Takeuchi H, Hasegawa H, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers. *Ann Surg Oncol* 2008;15:3092-3100.
27. Matsusaka S, Chìn K, Ogura M, et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Cancer Sci* 2010;101:1067-1071.
28. Uenosono Y, Arigami T, Kozono T, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer. *Cancer* 2013;119:3984-3991.
29. Okabe H, Tsunoda S, Hosogi H, et al. Circulating tumor cells as an independent predictor of survival in advanced gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2015;22:3954-3961.
30. Yuan D, Chen L, Li M, et al. Isolation and characterization of cir-

- culating tumor cells from human gastric cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015;141:647-660.
31. Li Y, Gong J, Zhang Q, et al. Dynamic monitoring of circulating tumour cells to evaluate therapeutic efficacy in advanced gastric cancer. *Br J Cancer* 2016;114:138-145.
32. 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.
33. Liu Y, Ling Y, Qi Q, et al. Prognostic value of circulating tumor cells in advanced gastric cancer patients receiving chemotherapy. *Mol Clin Oncol* 2017;6:235-242.
34. Pernot S, Badoual C, Terme M, et al. Dynamic evaluation of circulating tumour cells in patients with advanced gastric and oesogastric junction adenocarcinoma: prognostic value and early assessment of therapeutic effects. *Eur J Cancer* 2017;79:15-22.
35. Kim HJ, Lee KW, Kim YJ, et al. Chemotherapy-induced transient CEA and CA19-9 surges in patients with metastatic or recurrent gastric cancer. *Acta Oncol* 2009;48:385-390.
36. Müller V, Stahmann N, Riethdorf S, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res* 2005;11:3678-3685.
37. Pantel K, Schlimok G, Braun S, et al. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1419-1424.
38. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-792.
39. Wülfing P, Borchard J, Buerger H, et al. HER2-positive circulating tumor cells indicate poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;12:1715-1720.
40. Riethdorf S, Müller V, Zhang L, et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GepaQuattro trial. *Clin Cancer Res* 2010;16:2634-2645.