

令和元年6月26日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01341

研究課題名(和文) FFT法と領域法を組み合わせたDNA ploidy解析によるがん診断法の研究

研究課題名(英文) Method for Cancer Diagnosis using DNA Ploidy Analysis with a Combination of Fast Fourier Transform and Domain Method

研究代表者

日向 奈恵 (HINATA, nae)

東京工科大学・医療保健学部・准教授

研究者番号：80587668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、DNA ploidy解析を用いたがん診断法の研究を続けてきた。先行研究において、領域法で解析した結果、感度98%、特異度82%を示した。先行研究のValidationを目的として、採取された大腸がん患者70症例(がん組織60例、正常組織58例)に対して線形判別分析を行った。結果、先行研究に比べ感度が7%程度低下したため、診断アルゴリズムの改善が必要と考えた。新しい特徴量として、最大ピーク(PK1)と二番目のピーク(PK2)の比(PK2/PK1)、G0/G1領域とPseudo領域の細胞数と最大ピークの半値幅を追加した。新しいアルゴリズムによる結果は感度87%、特異度97%以上を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は正常組織とがん組織の判別ができるアルゴリズムを開発し、そのアルゴリズムが組み込まれたがん診断支援装置の開発を目的としている。国民の3人に一人ががんで亡くなる時代に突入し、がん診断件数は年々増加傾向を示している。しかし、近年がんの早期診断を行い、適切な治療を行うことで治癒が期待できる疾病となってきた。本研究はフローサイトメーターによるDNA ploidy(DNAの倍数性)解析を行い、その結果を迅速に内視鏡医や外科医に提供できるがん診断支援装置の開発を試みている。

研究成果の概要(英文)：We have developed to cancer screening algorithm of the cell cycle, evaluated by the flow cytometry. Our previous research using our 'the domain method' algorithm showed a sensitivity of 98% and specificity of 82% to screen cancer cells. The present study aimed to validate our previous findings by using a linear discriminant analysis (LDA) on other tissues collected from 70 patients with colorectal cancer (60 cancer tissues; 58 normal tissues). The results showed about a 7% decrease in sensitivity from our previous research, thus indicating a need to improve the diagnostic algorithm. In the present study, aiming to improve the algorithm, called as the domain method, we focused and applied following new features of the cell cycle findings: The second largest peak (PK2) to largest peak (PK1) ratio (PK2/PK1), the G0/G1 and pseudo domain cell counts, and half-width of the largest peak.

As the result, the new algorithm showed a sensitivity of 87% and specificity of 97%.

研究分野：がん診断

キーワード：DNA ploidy がん診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国民の3人に1人ががんで亡くなる時代に突入し、がん診断件数は年々増加傾向を示している。しかし、近年がんの早期診断をおこない、適切な治療をおこなうことでがんは治癒が期待できる疾病となってきた。がんの早期発見と有効な治療法の研究は国家的な課題である。がんの治療は早期であれば根治手術が行われ、根治手術を成功させるには、がん細胞を取り尽くすことが必要である。組織にがんが残存しないことを確認する目的で術中迅速病理診断が行われるが、診断に必要と判断された標本の一断面のみが病理標本として観察されるので、その断面が標本全体を代表していない場合、がん組織の存在を見落とす可能性が否定できない。これらの検査は熟練した病理医の技術が必要である。優れた診断支援装置があれば、診断の精度向上と不足している病理医の負担軽減がはかれる。

2. 研究の目的

健康診断の普及に伴い内視鏡などを用いて採取した組織検査件数が年々増加傾向を示している。それに伴い術中、術後の組織検査の件数も増加している。本研究¹⁾は、フローサイトメーターを用いて細胞のDNA量を測定し、そのDNA量を反映するヒストグラムの解析によってがん診断(正常組織とがん組織の判別)ができるアルゴリズムを開発している。さらにそのアルゴリズムが組み込まれたがん診断支援装置の開発を試みている。本研究¹⁾は先行研究²⁾のバリデーションを目的として開始し、領域法で得られた特徴量を用いて、予備的検討の目的で、大腸がん患者70症例(118組織)と先行研究²⁾で用いた大腸がん患者46症例(85組織)に対して、線形判別分析(linear discriminant analysis:LDA)により比較評価をした。その結果感度が7%程度低下していたので、先行研究²⁾のアルゴリズムでは、バリデーションを行ってもよい結果が期待できないと予測し、アルゴリズムの改良を試みた。

3. 研究の方法

(1) 対象

がん研究会有明病院において、2013年11月から2014年11月まで、大腸癌切除術を施行した70症例から正常大腸粘膜組織(正常組織)と大腸がん組織(がん組織)を採取した。解析した組織は正常組織が58例、がん組織が60例である。採取した組織は2分割し、片方はホルマリン固定を行った後 hematoxylin and eosin (HE) 染色標本を作製し、病理診断を行った。もう片方は細胞単離を行った上でフローサイトメーターを用いてDNAの原ヒストグラムを得た。得られた原ヒストグラムを解析の対象とした。採取した組織のなかで、細胞単離で得られた細胞数が2000以下の組織は解析対象から除外した。

(2) 細胞単離手順と蛍光強度分布の測定

サイトメトリー学会のガイドライン³⁾に従って開発された凍結乾燥試薬(DNA PEAK、DNA Ploidy Easy Analysis Kit、FC-220V、日本光電製)を2.5mlのアイソトナック(日本光電製 buffer.)を用いて試験管内で溶解し、約2mm³大の組織を試験管に投入した。

自動細胞単離装置(日本光電製)を用いて試験管に投入された組織を約6分間ピペティングし、懸濁液化した。

懸濁液は40µmナイロンメッシュで濾過し、測定標本とした。単離結果の確認は取得細胞数で行った。

濾過液はフローサイトメーター(FACS Calibur BD社、NJ、U.S.A)にて測定し、蛍光強度分布のデータを取得した。FACS Caliburの取扱い説明⁴⁾に従って、蛍光強度分布データから細胞のダブレット、トリプレットやその他の雑音を除去したのち、ヒストグラムを作成した。ヒストグラムはDNAの量(アドレス)を横軸に、測定した細胞数を縦軸(高さ)にした。

フローサイトメーターは取扱い説明書⁴⁾に従って、標準細胞(一般にはヒト正常リンパ球)を測定した時、G0/G1ピークがアドレス200を示すように定期的に調整して使用した。

(3) データの解析

得られたヒストグラムの最大ピークのアドレス(Pkorg)によるスクリーニング

ヒストグラムの規格化

ヒストグラムの形状分析(PK1、PK2、PKW)とセカンドピーク(HPK2=PK2/PK1>0.5)の有無によるスクリーニング(図1 PK1、PK2とPKWの定義)

解析特徴量の追加

a)領域の細分化(図2 ヒストグラムの新領域区分)

b)ヒストグラムの形状からの特徴量の追加

解析特徴量の選択

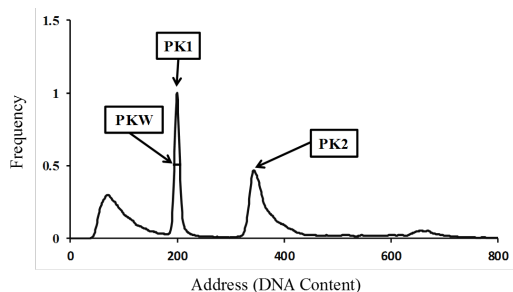


図1 PK1、PK2 と PKW の定義

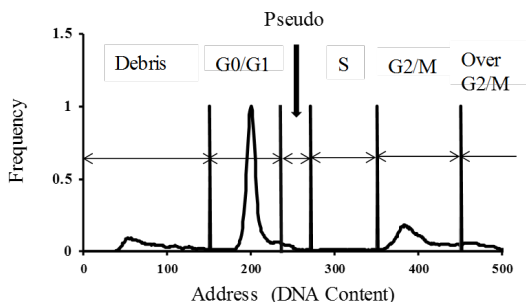


図2 ヒストグラムの新領域区分

4. 研究成果

先行研究²⁾にて、細胞周期に基づいて DNA ヒストグラムを Debris、G0/G1、S、G2/M、Over G2/M 領域に区分した。G0/G1、S、G2/M 領域は細胞周期の G0/G1 期、S 期、G2/M 期に相当する。Debris と Over G2/M 領域は正常細胞の細胞周期として定められていない領域である。また、それぞれの領域における細胞数（積分値）を求め、解析を行った。結果、正常組織とがん組織の判別に有効な特徴量として採用されたのは、Debris、S、G2/M、Over G2/M 領域である。G0/G1 領域は、有効な特徴量ではなかった。先行研究²⁾において、得られた有効な特徴量を独立変数とし、病理診断結果を従属変数として、Support Vector Machine (SVM)^{5,6)}を用いて統計モデルを作成し、leave one out cross validation (LOCV)を行った結果、感度 98%、特異度 82%が得られた。この診断方法を領域法と名づけた。先行研究²⁾で得られたアルゴリズムの性能向上を目指し、領域法における領域の細分化と形状に関する特徴量の追加について検討した。先行研究²⁾では採用しなかった G0/G1 領域を新たな G0/G1 領域と pseudo 領域に細分し、がん診断上有用な特徴量であるか否かについて、二標本コルモゴロフ = スミルノフ (KS) 検定を行ったが、有意差は得られなかった。正常細胞の DNA ヒストグラム上、pseudo 領域に細胞増殖が見られる理由は不明であるため、当面は G0/G1 と pseudo 領域についてはがん診断の特徴量からは除外して解析を進め、その理由がわかった後に再度検討することとした。KS 検定の結果採用された領域法の特徴量は、Debris、S、G2/M、over G2/M 領域における細胞数（積分値）であり、先行研究²⁾で採用された特徴量と一致した。同様に先行研究では検討に加えなかった形状に関する特徴量として G0/G1 ピークの半値幅 (PKW) と二番目に高いピーク (PK2) について検討を加え、HPK2 (PK2/PK1 > 0.5) の有無はスクリーニングの項目、PK2/PK1 は特徴量の一つに加えることができた。

本研究¹⁾の判定精度は先行研究²⁾とほぼ同じレベルに追いついた。先行研究²⁾の領域法では感度 98%特異度 82%であり、Receiver Operating Characteristic (ROC) は約 0.8 を示した。本研究¹⁾の領域法においては、感度 87%特異度 97%であり、ROC は約 0.84 を示した。領域法の範囲では、ほぼ同等以上の性能が得られたと考えられる。さらなる性能向上を目指し、FFT を用いて、ヒストグラムの形状を空間周波数分布に変換し、周期性の有無、細胞の DNA 含量分布のばらつきを検討を行うことでがん診断に有用な特徴量が得られる可能性があり、今後の課題とする。

引用文献

- 日向奈恵、神田浩明、馬志強、伊藤奈々、田仲浩平、篠原一彦、梅田勝、武田朴、山口俊晴、石川雄一「数値化細胞周期解析を応用したがん診断法の研究」医療機器学 査読あり 88(4),417-425 頁、2018 年 8 月
- 日向奈恵・神田浩明・塩山高広・鈴木あかね・武田朴・石川雄一・山口俊晴・加藤洋「FFT 法と領域法を組み合わせた DNAploidy 解析によるがん診断法の研究」生体医工学 査読あり 52(3),136-144 頁、2014 年 6 月
- Takamoto S, Tsurusawa M, Nakauchi H et al.「Guidelines for flow cytometric analysis of DNA aneuploidy.」Cytometry Research.2009.Vol.19,No.1,p.1~9.
- http://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCalibur_instructions.pdf. [accessed September, 2013]

- 5) 栗田多喜夫：サポートベクターマシン入門。
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/tkurita/lecture/svm/svm.html> [accessed Jan.21, 2013]

6) 小野田崇. サポートベクターマシン. オーム社. 2007.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- 1) 日向奈恵、神田浩明、馬志強、伊藤奈々、田仲浩平、篠原一彦、梅田勝、武田朴、山口俊晴、石川雄一 「数値化細胞周期解析を応用したがん診断法の研究」 医療機器学 査読あり 88(4),417-425 頁、2018年8月

〔学会発表〕(計5件)

- 1) 三上敦也、日向奈恵、神田浩明、馬志強、伊藤奈々、田仲浩平、篠原一彦、梅田勝、武田朴、山口俊晴、石川雄一 「DNA ヒストグラムを応用したがん診断法の改良第二報」第93回日本医療機器学会大会 メディカルショー・ジャパン & ビジネスエキスポ 2018、2018年、横浜
- 2) 二階堂晴信、三上敦也、日向奈恵、神田浩明、馬志強、伊藤奈々、田仲浩平、篠原一彦、梅田勝、武田朴、山口俊晴、石川雄一 「DNA ヒストグラム解析を応用した大腸がん診断法の改良第二報」第18回計測自動制御学会システムインテグレーション講演会、2017年12月、仙台
- 3) 三上敦也、吉崎輝、伊藤奈々、日向奈恵、田仲浩平、篠原一彦、梅田勝、神田浩明、武田朴、山口俊晴、石川雄一 「DNA ヒストグラム解析を応用した大腸がん診断法の改良」第17回計測自動制御学会 システムインテグレーション部門、2016年12月、札幌
- 4) 吉崎輝、三上敦也、伊藤奈々、日向奈恵、田仲浩平、篠原一彦、梅田勝、神田浩明、武田朴、山口俊晴、石川雄一 「DNA ヒストグラムを応用したがん診断法の研究」Japan Society of Computer Aided Surgery、2016年11月、東京
- 5) 日向奈恵、神田浩明、塩山高広、鈴木あかね、武田朴、石川雄一、山口俊晴、加藤洋 「DNA ヒストグラム解析を応用した胃癌診断法の研究」第16回計測自動制御学会、2015年12月、名古屋

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：武田 朴

ローマ字氏名：(TAKEDA, sunao)

所属研究機関名：早稲田大学

部局名：理工学術院総合研究所

職名：招聘研究員

研究者番号(8桁)：40583993

研究分担者氏名：神田 浩明

ローマ字氏名：(KANDA, hiroaki)

所属研究機関名：埼玉県立がんセンター

部局名：病院病理診断科

職名：課長(兼)部長

研究者番号(8桁)：90260067

研究分担者氏名：梅田 勝

ローマ字氏名：(UMEDA, masaru)

所属研究機関名：東京工科大学

部局名：医療保健学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：20725684

研究分担者氏名：篠原 一彦

ローマ字氏名：(SHINOHARA, kazuhiko)

所属研究機関名：東京工科大学

部局名：医療保健学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 00327082

研究分担者氏名：田中 浩平

ローマ字氏名：(TANAKA, kohei)

所属研究機関名：東京工科大学

部局名：医療保健学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 60449949

研究分担者氏名：志水 美文

ローマ字氏名：(SHIMIZU, mifumi)

所属研究機関名：東京工科大学

部局名：医療保健学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 30396759

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。