

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：32622
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K09022
 研究課題名(和文) 分光法を応用した血中遊離DNA・無標識循環がん細胞解析によるがん診療支援システム
 研究課題名(英文) Cancer diagnosis support system by analysis of free DNA in blood and label-free circulating cancer cells using spectroscopy
 研究代表者
 伊藤 寛晃 (Ito, Hiroaki)
 昭和大学・医学部・准教授
 研究者番号：70443447
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：1.【血清のラマンスペクトル取得】独自のハード・ソフトウェアにより患者血清のラマンスペクトルを安定して記録する技術を確立した。
 2.【血清ラマンスペクトルの解析】記録した血清ラマンスペクトルをデータとし、機械学習の一種である"Boosted Tree Model"を用いて、R2乗値が0.99以上の極めて高精度の大腸がん存在予測モデルの構築に成功した。
 3.【血清以外の生体試料の解析】尿のほか、食道がん・胃がん・大腸がん非固定生組織標本を試料としてラマンスペクトルを取得、がん病変部と非がん正常粘膜部を明瞭に区別する指標を発見した。循環がん細胞を含む生細胞の無標識評価についても基本技術が確立できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ごく微量の血液(血清)のみで、がんの存在を迅速かつ高精度に予測するための基礎技術が確立できた。本研究におけるラマンスペクトルの解析は機械学習で行っており、今後、より多くの試料を解析することで解析精度がさらに向上していく。現在は大腸がんなどの消化器がんを中心に解析を行っているが、本技術は消化器がん以外の多くのがん種に対する超早期診断技術として応用可能と期待される。血液は低侵襲で繰り返し得ることができるため、がんの診断だけではなく、治療効果判定や再発予測にも利用可能と考えられる。今後は、より多くの血清とともに尿の解析も進め、身体の総合的な評価システムとして確立する計画である。

研究成果の概要(英文)：1. [Acquisition of Raman spectra of serum] I have established a technique to stably record the Raman spectra of patient serum using my original hardware and software.
 2. [Analysis of serum Raman spectra] The serum Raman spectra were analyzed by "Boosted Tree Model" which is a kind of machine learning. An extremely accurate colorectal cancer presence prediction model with an R-squared value of 0.99 or higher was constructed.
 3. [Analysis of biological samples other than serum] I was able to obtain Raman spectra of urine. Furthermore, I obtained Raman spectra of non-fixed living tissue specimens of esophageal cancer, gastric cancer, and colon cancer, and found an index that clearly distinguishes cancerous lesions from non-cancerous normal mucosa. I have also established a basic technique for label-free evaluation of living cells, including circulating cancer cells.

研究分野：消化器外科学 低侵襲治療学 分子生物学 腫瘍病理学 がん診断学

キーワード：ラマン分光法 がん診断 血清 尿 循環がん細胞 消化器がん生組織 機械学習 Boosted Tree Mode

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

がんは世界で死因の多くを占める疾患であり、いまだ根本的治療が確立されたとは言い難い状況である。がんの根治度は進行度に依存しており、がんの治療成績向上のためには早期診断と早期治療開始が最も効果があると考えられている。

研究代表者は消化器外科医として臨床医療に従事しながら、がん微小転移をテーマに、一貫して「早期がん診断技術の確立」と「がんの浸潤・転移メカニズムの解明」を目的に研究を行ってきた。

2004年頃から、食道がん患者を対象に、競合的リアルタイム RT-PCR により循環がん細胞の半定量的検出を行い、循環がん細胞数と予後が相関することを報告した (J. Exp. Clin. Cancer Res. 2004; 23:455-464, Surgery. 2006; 139(5):678-685)。次いで、胃がん患者を対象にして、胃がん組織の遺伝子解析を行い (Cancer Sci. 2011; 102(10):1782-1788)、胃がん循環がん細胞との比較を試みた。そして、循環がん細胞の中から真に転移形成能を持つ循環がん細胞を検出するために、テロメラーゼ特異的ウイルス製剤を用いてテロメラーゼ活性が高い細胞を抽出した。追跡調査の結果、高テロメラーゼ活性循環がん細胞数と胃がん患者予後との相関を示した (BMC Cancer. 2012; 12:346, Int J Oncol. 2014; 45:227-23) (図 1)。

上記の通り、食道がんや胃がんにおける循環がん細胞と予後の相関を示すことはできたが、早期診断における循環がん細胞の有用性ははっきりしなかった。そこで、血中遊離核酸やタンパク、微量分子を検出してがんの早期診断が行えるか試みた。検出のための技術としてラマン分光法を採用した。理由は、ラマン分光法は、気体・液体・固体など試料の性状を問わず分析可能であるため前処理の必要がなく、簡便・迅速に分析可能である。またリファレンスを必要とせず既知・未知の物質を含めて網羅的に検出可能である点で優れている。

研究代表者は、ラマン分光法を用いて、がん患者と非がん患者の血清のラマンスペクトルの違いを見出し、血清中成分の差を検出できる可能性を示した (Nanotechnology, Biology and Medicine. 2014; 10(3):599-608)。そして、血清中成分の差は細胞中の核酸とタンパクに由来する可能性を示した (Scientific Reports. 2015; 5:10455)。さらに、ラマン分光法を用いて血液中の循環がん細胞を無標識で検出することに成功した。

本研究では、これまでのラマン分光法による研究成果をさらに発展させ、がん患者血液中に特異的な微量成分と循環がん細胞を検出、採取し、解析することを試みた。

2. 研究の目的

前述のごとく、本研究の目的は、ラマン分光法を応用し、がん患者血液中に特異的な微量成分と循環がん細胞を検出し、がんの早期診断技術を確立することである。そして、循環がん細胞の生物学的・遺伝子の解析を行い、がんの浸潤・転移メカニズムの解明、さらに新たながんの治療法の開発につながる研究成果を挙げることである。

3. 研究の方法

対象疾患を、食道がん、胃がん、大腸がん、膵がん、がん以外の良性疾患とし、各疾患患者 20 名、計 100 名から血液を採取、血液の半分から血清を取得した。残り半分の血液から、ラマン分光法を用いて無標識循環がん細胞を検出、採取した。

取得した血清の一部を試料としラマンスペクトルを記録し、がんと非がんのスペクトルの差を機械学習の一種である”Boosted Tree Model”で解析した。

残りの血清から遊離核酸を、循環がん細胞からゲノム DNA をそれぞれ抽出し、次世代シーケンサーで遺伝子解析を行い、血清中遊離核酸と循環がん細胞ゲノム DNA の遺伝子変異の相同性を確認した。

4. 研究成果

本研究において、血清や細胞などの生体試料を分析するための顕微ラマン装置と測定ソフトウェアを開発した (図 2)。

すべての血清試料において、有意なラマンスペクトルを記録できた (図 3)。また、測定条件の調整により尿のラマンスペクトルを記録することも成功した。そして、血清のラマンスペクトルをデータとした機械学習の”Boosted Tree Model”で、 R^2 0.99 以上の高精度の大腸がん存在予測モデルを構築することに成功し、特許出願を行った (血清を用いたラマン分光分析によるがん診断、出願番号：特願 2019-170596)。

生細胞を無標識で評価することにも成功したが (図 4)、血清中遊離核酸と循環がん細胞の遺伝子変異の相関は確認できなかった。

一方、内視鏡的治療で切除された生組織 (食道、胃、大腸) からラマンスペクトルを取得することに成功した。さらに、永久病理標本による病理組織診断と対比させ、食道、胃、大腸のそれぞれでがん病変部と非病変正常粘膜部を明確に区別できる指標を見出し、特許出願を行った (組織検査装置、及び組織の検査方法、出願番号：特願 2020-17036)。

図1. 胃がんにおける高テロメラーゼ活性循環がん細胞個数と無再発生存率。

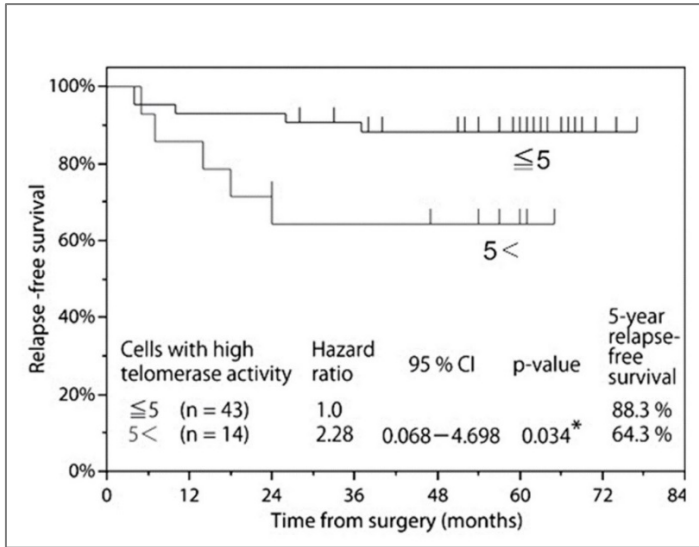


図2. 本研究で使用した顕微ラマン装置。

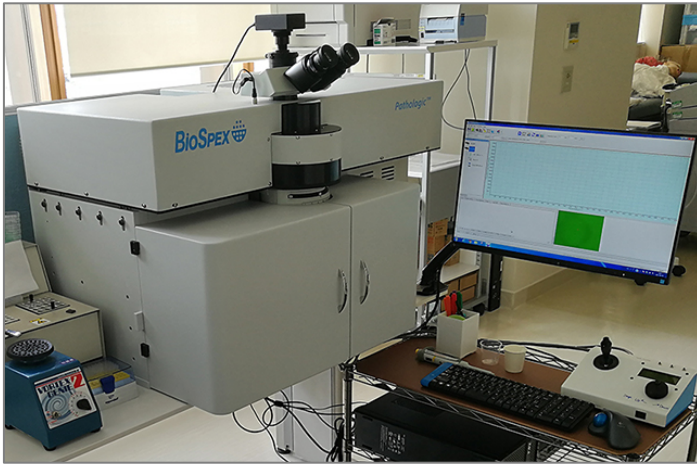


図3. 患者血清のラマンスペクトル。

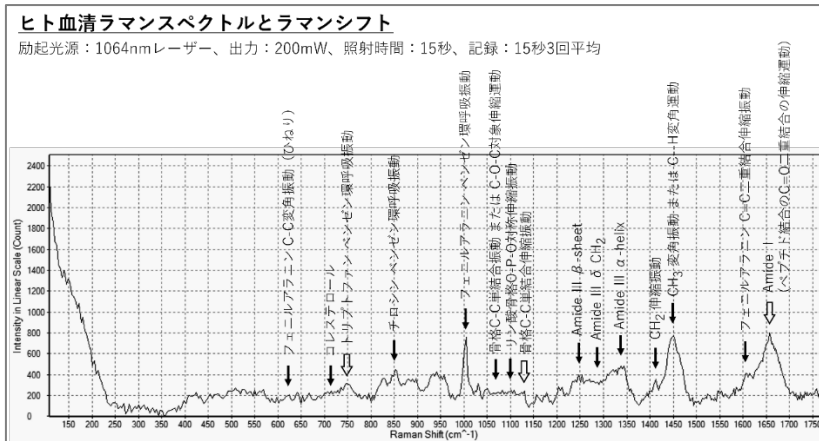
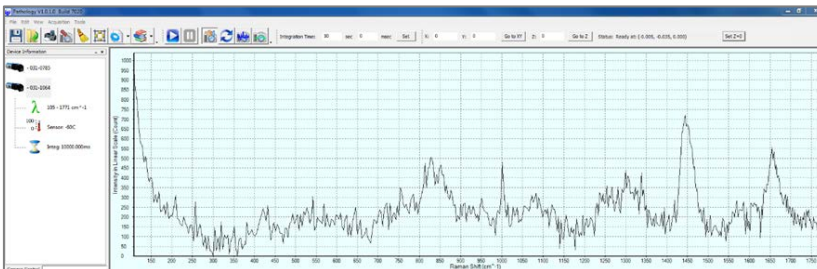


図4. 生細胞のラマンスペクトル。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Haruo Ikeda, Hiroaki Ito, Muneaki Hikita, Noriko Yamaguchi, Naoyuki Uragami, Noboru Yokoyama, Yuko Hirota, Miki Kushima, Yoichi Ajioka, and Haruhiro Inoue	4. 巻 10(11)
2. 論文標題 Raman spectroscopy for the diagnosis of unlabeled and unstained histopathological tissue specimens	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World Journal of Gastrointestinal Oncology	6. 最初と最後の頁 439-448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4251/wjgo.v10.i11.439	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiroaki Ito, Naoyuki Uragami, Tomokazu Miyazaki, Noboru Yokoyama, and Haruhiro Inoue	4. 巻 14(2)
2. 論文標題 Raman spectroscopic evaluation of human serum using metal plate and 785- and 1064-nm excitation lasers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0211986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0211986	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 伊藤寛晃, 浦上尚之, 横山登, 山口紀子, 鬼丸学, 池田晴夫, 郷田憲一, 井上晴洋
2. 発表標題 散乱光を利用した質的分子情報を取り込んだ次世代内視鏡の開発
3. 学会等名 第34回 日本医工学治療学会, シンポジウム12 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤 寛晃, 浦上 尚之, 池田 晴夫, 横山 登, 井上 晴洋
2. 発表標題 分光法を応用し質的情報を付加した次世代消化器内視鏡の開発
3. 学会等名 第97回 日本消化器内視鏡学会総会, ワークショップ07
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 寛晃, 宮崎 智和, 浦上 尚之, 池田 晴夫, 島村 勇人, 西川 洋平, 富田 秀臣, 鬼丸 学, 横山 登, 井上 晴洋, 九島 巳樹
2. 発表標題 分光法を応用した無標識リアルタイム生体評価システムの開発
3. 学会等名 第74回 日本消化器外科学会総会, 主題関連41
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Ito, Tomokazu Miyazaki, Naoyuki Uragami, Noboru Yokoyama, Haruhiro Inoue
2. 発表標題 Analysis of serum by Raman spectroscopy finds changes in blood metabolites of cancer patients in 45 seconds.
3. 学会等名 ASCO Breakthrough 2019, Abstract No. 57 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 寛晃, 浦上 尚之, 宮崎 智和, 九島 巳樹, 池田 晴夫, 島村 勇人, 西川 洋平, 富田 英臣, 広田 由子, 角 一弥, 松尾海, 鬼丸 学, 横山 登, 井上 晴洋, 上條 由美
2. 発表標題 大学病院と医療関連以外の企業との共同プロジェクトによる新たながん診療技術の開発
3. 学会等名 第57回 日本癌治療学会学術集会, 会長企画シンポジウム 5
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 血清を用いたラマン分光分析によるがん診断	発明者 伊藤寛晃, 宮崎智和	権利者 伊藤寛晃
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-170596	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 組織検査装置、及び組織の検査方法	発明者 伊藤寛晃, 宮崎智和	権利者 伊藤寛晃
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-17036	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----