

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12063

研究課題名（和文）ラマン分光法によるがん転移モデルの動態解析と診断・治療への応用

研究課題名（英文）Raman spectroscopic study of cancer metastasis and diagnosis.

研究代表者

古賀 繁宏 (Koga, Shigehiro)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30625950

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：蛍光プローブを用いて術中ががん細胞自体を光らせるがんイメージング技術に関しては、がん細胞のみを特異的にかつ高感度で検出する方法の確立が律速段階となり、実用化に至っていない。一方で、ラマン分光法によるラベルフリーでがんを可視化する革新的な光学技術の実用化が注目されている。本研究では、ヒトがん細胞を移植した動物モデルを用いて、がん転移巣と原発巣におけるがん細胞とその周辺環境の分析を独自に構築したラマン分光システムを用いて行った。その結果、原発巣と転移巣において細胞外基質の分子組成に明らかな差を認めた。さらに、ヒト検体を用いた解析を行った結果、がん細胞の特徴を明らかにすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラマン分光法は、蛍光プローブなどの標識を一切必要としない無染色・低侵襲でがん細胞とその微小環境の状態を計測するための技術として着目されており、新規バイオマーカー探索に有用であると期待されてきた。しかしながら、従来の市販されているラマン分光システムでは、技術面・コスト面からその適応範囲は極めて限定的であった。本研究では、がん微小環境の解析にラマン分光分析を応用し、従来のin vivo蛍光イメージング技術の弱点を補う形で動物モデルや手術検体において、がん微小環境を可視化することに成功したことで、抗がん剤による治療効果の評価や、新規バイオマーカーに着目した新たな治療戦略へつなげることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Raman spectroscopy provides a wealth of diagnostic information to the surgeon with in situ cancer detection and label-free histopathology in intraoperative conditions. Raman spectroscopy is a promising optical technique which can analyze biological tissues with light scattering. We confirmed that Raman spectra obtained from cancer cells and their environment including other cells and extracellular matrix in xenograft models and spontaneous metastasis models were distinguishable using Raman spectroscopy combined with nonlinear optical imaging. Malignancy can be characterized not only by the cancer cells but also by the environmental factors including immune cells, stroma cells, secretion vesicles and extracellular matrix, but to identify and detect cancer diagnostic biomarkers in vivo on Raman spectroscopy is still challenging. Here we investigate morphological and molecular dynamics in advanced cancer specimens obtained from patients toward the clinical application of the technique.

研究分野：外科

キーワード：ラマン分光法 がん イメージング がん微小環境

### 1. 研究開始当初の背景

蛍光を利用した光イメージング技術は、対象とするモデル動物を“生きたまま”の状態連続的に観察でき、また“高い時空間分解能”によって動的な現象をリアルタイムに観察できることから、近年、生命科学の分野では必要不可欠なツールとして広く利用されるようになってきており、革新的ながん診断ツールの実現につながることを期待される。しかしながら、これまでに行ってきた種々のがん転移モデルを用いた実験では“がん特異的蛍光プローブ”は、それぞれのがんの微小環境によって検出効率が変わることが示唆されており、その有用性が疑問視されている。さらに、蛍光プローブの創薬や安全性の確保など、臨床応用への課題が多く残されていることがわかった。そこで本研究では、蛍光プローブなどの標識を一切必要としない、無染色・低侵襲でがん細胞とその微小環境の状態を計測するための技術開発し、新規バイオマーカーの探索を目指す。本研究におけるがん組織の光計測のための基盤技術であるラマン分光法は、非侵襲的に生体組織の分子計測を行う技術であるが、従来の市販されているラマン分光システムでは、技術面・コスト面からその適応範囲は極めて限定的であった。そのため本研究は、がん微小環境の解析にラマン分光分析を応用するという観点から、研究代表者らがこれまでに構築してきたがんモデルの *in vivo* 蛍光イメージング技術の弱点を補う形で応用し、がんの微小環境の実態を明らかにするとともに、抗がん剤が腫瘍に集積するメカニズムや薬剤分子がどのようなプロセスを経てがん細胞に到達するのか、ドラッグデリバリー機序の理解の一助となることを期待している。また、ラマン散乱スペクトルは、いわば「分子の指紋」であり、ラマン分光法は数ある光計測技術のなかでも分子特異性が極めて優れている。そのため、動物モデルの解析および臨床検体を用いたがん特異的なバイオマーカー探索を行い、あるいは新たな治療薬のバリデーションによって、エビデンスのある投薬・治療戦略につなげることを目指している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ラマン分光分析による個別化医療に役立つ新規バイオマーカーの開発である。従来の遺伝子などのバイオマーカーでは、評価が困難な腫瘍内のがん細胞の性質や動態、がん微小環境を解析することで、新たな層別化につながる新規バイオマーカーを探索する。ヒトがん細胞を移植したがん転移モデルを作製し、ラマン分光分析を行う。その上で肉眼所見、既知の腫瘍マーカーの発現、関連する遺伝子や蛋白発現とその同在、病理組織学的所見、またヒト検体の場合は、臨床所見を含めた解析を行い、それぞれのがん組織におけるラマンスペクトル上に見いだされる変化がバイオマーカーとして利用可能か検討する。モデルごとにラマンスペクトル上の特徴量(ラマンピークの波長シフトおよびピーク相対強度)を抽出し、がん細胞の動態やがん微小環境に加えて、抗がん剤による治療効果の評価などラマン分光分析によって得られたバイオマーカーを用いた新たな治療戦略へつなげる知見を獲得する。

### 3. 研究の方法

本研究の基盤技術であるラマン分光法は、レーザー光など単色(単一の波長)の光を物質に照射したときに観測される波長が短波長あるいは長波長側にシフトした散乱光(ラマン散乱光)からその物質の組成や分子構造を解析する手法である。この入射光とラマン散乱光の波数の差をラマンシフトと呼び、相互作用する分子の振動エネルギーと対応する。すなわち、ラマン散乱スペクトルは、いわば「分子の指紋」である。しかしながら、ラマン散乱光は、レイリー散乱光よりもはるかに微弱であり、背景光が少ない安定なレーザー光源や高感度光検出器、分光器など高度な計測技術やデバイスを必要とするが、細胞や組織などの生物試料を処理せず、生きたままラマン散乱スペクトル計測やイメージングすることが可能である。本研究では、研究分担者らと共同で、顕微ラマンシステムを生体計測のために独自に設計・製作した(図1)。

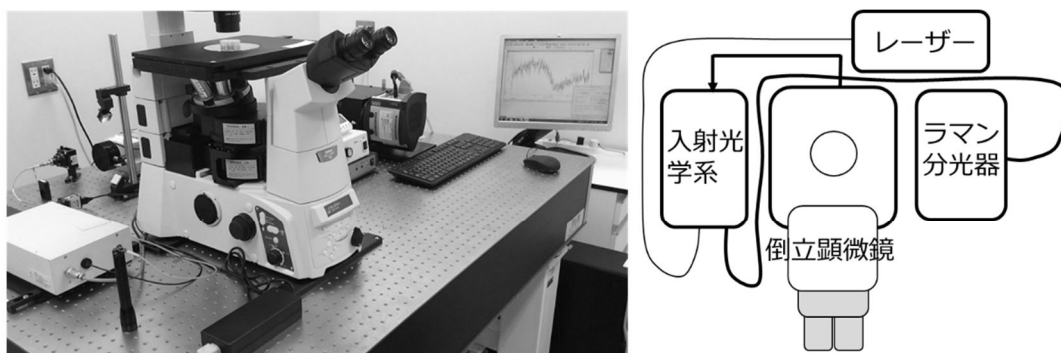


図1 カスタムメイドの生体計測用ラマン顕微鏡の外観写真(左)と構成模式図(右)

また、新規バイオマーカー探索のため、本研究では実験動物を用いて、ヒトがん細胞を移植した

がん転移モデルを作製し、ラマン分光分析を行った。また、動物実験と並行して、外科手術において得られるヒト検体を用いた解析を行った。はじめに消化器がんを中心にそれぞれ特徴を有する種々のヒトがん細胞株について *in vivo* がん移植モデル（皮下移植モデル、腹膜播種モデル、肝転移モデル）を作成し、ラマン顕微鏡による評価を行った。その上で、肉眼所見、既知の腫瘍マーカーの発現、関連する遺伝子や蛋白発現とその局在、病理組織学的所見、またヒト検体の場合は、臨床所見を含めた解析を行い、それぞれのがん組織において、ラマンスペクトル上に見いだされる変化が、バイオマーカーとして利用できるかどうか検討する。ヒト検体を使用した解析を行う意義としては、再現性の高いモデル動物を用いた解析において有用性が確認されたものについて、臨床応用を見据えた検討ができるということである。本研究では、ヒト検体を用いた原発がんおよびがん転移巣で評価を行う。がん転移モデルごとにラマンスペクトル上の特徴量（ラマンピークの波長シフトおよびピーク相対強度）の抽出を試みた。

#### 4. 研究成果

ヒト大腸がん細胞を移植したマウスから摘出した皮下腫瘍（原発巣を想定）および腹膜播種結節（転移巣を想定）のラマンスペクトル測定を行い、病理組織像との比較検討を行った結果、正常皮下組織、皮下腫瘍、腫瘍結節中央部および辺縁部において、それぞれに特徴的なラマンスペクトルを測定することに成功した（図2）。図中の（ ）で示したように、脂質の構造に特徴的な強く鋭いピーク（1440  $\text{cm}^{-1}$ : CH<sub>2</sub> 変角振動, 1330  $\text{cm}^{-1}$ : CH<sub>2</sub> 縦揺れ, 1320  $\text{cm}^{-1}$ : CH<sub>2</sub> ねじれ）また、同様に図中（ ）で示した蛋白質・コラーゲンに特徴的なピーク（815  $\text{cm}^{-1}$ : C-C 蛋白骨格, 851  $\text{cm}^{-1}$ : プロリン, 1250  $\text{cm}^{-1}$ : アミド III）に顕著な変化を認めたことから、ラマンスペクトルデータから、がん組織を特徴づけるためのバイオマーカー候補を見出すことに成功した。

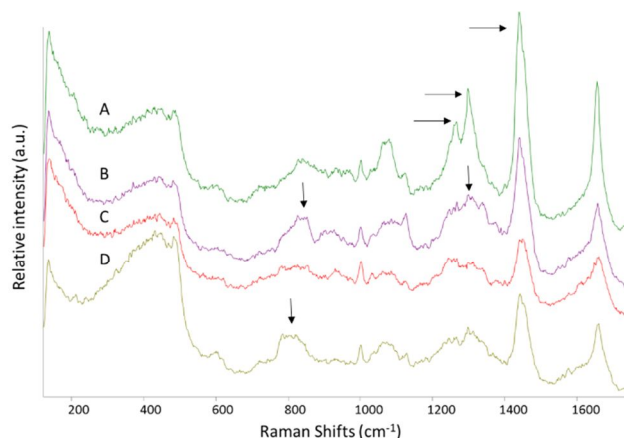
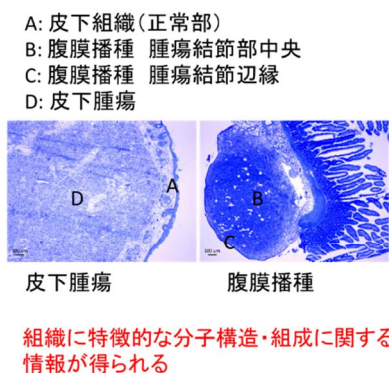


図2 マウスに移植したヒト大腸がんのラマンスペクトル解析

また、実際のヒト検体を用いた研究成果として、胃がんの摘出標本の凍結切片を作成し、顕微ラマン分光装置を用いて計測されたラマンスペクトルデータに対して多変量解析を適用し、がん病変部と正常組織の比較検討を行った結果、胃がんの摘出標本において、同一患者の正常組織の粘膜層およびがん病変部のラマンスペクトルを測定した結果、がん病変部においてミトコンドリアに特徴的なラマンピーク強度の顕著な増大が観測された。本研究成果は現在、論文投稿準備中である。今後は、ラマン分光法によりラベルフリーで凍結切片のがん細胞の特徴を捉えることに成功した。今後は、初期の胃がん、大腸がんやアデノーマや腸上皮化生など粘膜上皮の良性疾患との鑑別が可能かどうか検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shigehiro Koga, Yuji Watanabe, Yusuke Oshima	4. 巻 -
2. 論文標題 Raman spectroscopic analysis for gastric and colorectal cancer in surgical treatment toward molecular-guided surgery	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc. SPIE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大嶋佑介
2. 発表標題 ラマン分光法による術中光診断技術の開発
3. 学会等名 第10回 癌・炎症と抗酸化研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigehiro Koga
2. 発表標題 Characterization of human specimens with colorectal cancer by Raman Spectroscopy
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大嶋佑介、古賀繁宏、渡部祐司
2. 発表標題 ラマン分光法・非線形光学による術中がんイメージング技術の開発
3. 学会等名 第57回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究 分担 者	大嶋 佑介  (Oshima Yusuke)  (10586639)	大分大学・医学部・客員研究員   (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------