

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10056

研究課題名(和文)新規蛍光物質gGlu-HMRGの臨床応用と遺伝学的アプローチからの精度向上

研究課題名(英文)The development of detection of cancer cells with gGlu-HMRG and clinical application

研究代表者

新田 吉陽 (SHINDEN, Yoshiaki)

鹿児島大学・附属病院・医員

研究者番号：20725733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1) 臨床応用を目指した条件設定の改善:既存の機器は検出感度が低く、一度に測定できる検体量に限界があることがわかった。企業提携を行い、光学系のシステムの改良、機器設計を見直し、一度に多数の検体を同時に測定できること、蛍光値のカットオフ値を使用して蛍光陽性陰性を判定、表示できるソフトウェアの開発を計画した。現在も症例の蓄積と機器の開発中である。

2) GGT発現のゲノム・エピゲノムレベルの機構:1)の測定機器の見直しのために解析のために必要な検体が得られていないのが現状である。また、GGT蛋白質発現と癌放射線治療の効果の大小や酸化ストレスに関連する蛋白質との発現の関連について検討中である。

研究成果の概要(英文)：1) Improvement of condition for clinical application; The detection sensitivity of existing equipment is low, and it turned out that there is a limit to the amount of specimen that can be measured at one time. We undertook a business tie-up, and aimed improvement of the optical system, reconsideration the equipment design for measuring a large number of specimens at the same time developing software which can judge and display the fluorescence positive area. Currently we are accumulating cases and developing equipment.

2) Discovering the genetic mechanism of GGT expression; Samples which are necessary for analysis have not been obtained due to 1). We are studying the relationship between the expression of GGT protein and the effect of cancer radiotherapy and the expression with protein related to oxidative stress.

研究分野：乳腺外科学

キーワード：癌細胞可視化

## 1. 研究開始当初の背景

癌を対象とした外科手術においては、癌の根治を目指して癌細胞の遺残のない手術が必要である。現在、癌の遺残の有無を確認する一般的な方法は術中の迅速病理診断であるが、ここには 1) サンプリングの問題(例えば乳房部分切除の場合、摘出標本の全周全てを観察するのは人的負担が大きい)、代表的な部位を少数箇所のみ選択して観察することが多い)、2) 診断を行うまでに時間がかかる、3) 病理医が常駐しない施設では検体を外部施設に運ぶ必要があり、病理部の負担も大きい、などの問題点がある。これらの問題点の解決を目指して、術中に使用できる癌細胞の新しい検出方法の開発が求められる。

## 2. 研究の目的

我々は、乳癌細胞に広く発現し活性を有する GGT 蛋白質と反応し、蛍光を発する新規傾向プローベである gGlu-HMRG を用い、乳腺腫瘍を高い感度と特異度で可視化し、そのことを明らかにした。本蛍光法の臨床応用を目指して更なる症例の蓄積、より高い特異度を得るための条件設定の改善を行う。

さらに詳細についてはいまだ明らかではない GGT 発現のゲノム・エピゲノムレベルの機構についてオミックス解析を実施の上、数理統計学敵に解明する。この解析結果を踏まえて乳癌細胞を高い特異度で検出する為の新規分子の開拓と、GGT 活性を強めるために GGT と共役する分子を同定することを目標とする。最終的には切除範囲を直接観察しながら手術を行うことを可能とし、安全かつ無駄のない乳房温存術およびリンパ節郭清の実現を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床応用を目指した条件設定の改善

これまでの成果として、gGlu-HMRG を乳腺組織に滴下し、その後の蛍光強度を測定することで乳腺の腫瘍性病変の可視化

し、感度 92%、特異度 94% で正常部と非正常部を識別することが可能となった。乳房部分切除で摘出した標本の切除断端に遺残する癌組織の検出を試みた。1mm 以下の微小な乳管内病変も検出可能であった。本蛍光法を利用することで断端中の腫瘍性病変を適確に指摘し、その部位のみを確認すれば病理部の負担を大幅に軽減できると期待される。

乳癌手術で提出したリンパ節に対して本蛍光法を応用し、リンパ節の転移診断が可能かを検討したところ、感度 97%、特異度 79% で転移性リンパ節を認識可能であった。

上記を踏まえて、乳癌手術で頻用される術部分切除時の切除断端、センチネルリンパ節生検の術中迅速診断への本蛍光法の応用が期待される。臨床応用への実現を目指して症例を蓄積すること、メーカーと協力して機器の性能を向上させることを行った。

### (2) GGT 発現のゲノム・エピゲノムレベル

#### の機構

乳腺良性腫瘍、乳癌の検体を対象とし、gGlu-HMRG による蛍光の有無(GGT 活性の有無)で分けた 4 群に対してエキソームシーケンシング、DNA マイクロアレイ、メチル化アレイなどの遺伝学的統合解析を行う。GGT 活性を規定する因子、その中でも特に癌の進展に関わる因子などを同定する。

## 4. 研究成果

### (1) 臨床応用を目指した条件設定の改善

これまでの研究では NIH が開発した蛍光検出器を使用した。これは市販されておらず数に限りがある。しかし実臨床応用に向けては、流通している機器を用いた検出が必要と考える。そのため米国 Indec 社の蛍光検出機器である「Discovery」を用いて、乳癌の gGlu-HMRG 蛍光を再測定したが、機器の性能として検出感度が低く、一度に測定できる

検体量に限界があることがわかった。そのため新たに機器を開発する必要があることがわかった。浜松ホトニクス社と提携し、光学系のシステムの改良、機器設計を見直し、一度に多数の検体を同時に測定できること  
蛍光値のカットオフ値を使用して蛍光陽性陰性を判定、表示できるソフトウェアの開発を計画した。

また、臨床応用を考慮し、薬剤の濃度と散布方法（滴下、あるいはスプレー）についても再検討を行う事とした。現在も症例の蓄積と機器の開発を行っている途上である。

## (2) GGT 発現のゲノム・エピゲノムレベルの機構

GGT 発現の多寡と悪性/良性での検体集積を試みたが、1)の測定機器の見直しのために解析のために必要な検体が得られていないのが現状である。

GGT 蛋白質発現の癌に関する生物学的意義に関して

GGT 蛋白質は細胞内のグルタチオン代謝に関連する蛋白質として知られている。GGT 代謝で多いほど細胞内グルタチオン濃度が増すと考えられる。一方グルタチオンは細胞内のスカベンジャーとして知られており、細胞内の活性酸素を除去する、すなわち酸化ストレス耐性を増すことになる。そのため GGT 蛋白質の発現がジェムザールなどの酸化ストレスを介した抗癌剤用を持つ抗癌剤の耐性に関連する可能性が高い。そのため、乳癌ではなく他癌種における、放射線治療の効果の大小や酸化ストレスに関連する蛋白質との発現の関連について検討中である。

また、胃癌、大腸癌のリンパ節転移や遠隔転移病変の GGT 発現が原発巣とは異なっているという仮説の元に、各組織での GGT 発現の比較検討を行っている。①のため、

乳癌組織を使った GGT 発現が腫瘍進展に与える影響の解析は困難のため、他癌種で行っているのが現状である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1. Rapid diagnosis of lymph node metastasis in breast cancer using a new uorescent method with -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green Y Shinden et al. Scientific Reports | 6:27525 | DOI: 10.1038/srep27525 2016年、査読あり

2. Rapid intraoperative visualization of breast lesions with -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green. Hiroki Ueo et al. Scientific Reports | 5:12080 | DOI: 10.1038/srep12080 2015年、査読あり

[学会発表](計7件)

1. 2016年11月 SNNS 研究会(東京) gGlu-HMRG による乳癌腋窩リンパ節転移診断の臨床応用に関する検討 新田吉陽ら

2. 2016年6月 分子標的治療学会 癌細胞に高発現する GGT と特異的に反応する gGlu-HMRG を用いた乳癌手術中の腋窩リンパ節転移診断 新田吉陽ら

3. 2015年7月 日本乳癌学会総会(東京都千代田区) 乳腺腫瘍を可視化する新規蛍光物質「gGlu-HMRG」を用いた乳癌の術中病理診断への応用 新田吉陽ら

4. 2015年7月 日本がん転移学会(大阪

市) **The new technique of detecting breast cancer cells using new fluorescent probe 'gGlu-HMRG'** Y Shinden et al.

5. 2015年7月 日本外科学会(名古屋市)  
乳腺腫瘍を可視化する新規蛍光物質  
「gGlu-HMRG」を用いた乳癌の術中病理  
診断への応用 新田吉陽ら

6. 2015年4月 AACR(米国フィラデル  
フィア) The new and rapid technique of  
detecting breast cancer cells using new  
fluorescent probe 'gGlu-HMRG' and  
its clinical application. Y Shinden et  
al.

7. 2015年3月 乳癌学会九州地方会(福  
岡市) 癌細胞に高発現する  
 $\gamma$ -glutamyltranspeptidase と特異的に反  
応する新規蛍光プローブの乳癌術中断端病  
理診断への応用 新田吉陽ら

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新田 吉陽 (SHINDEN YOSHIAKI)  
鹿児島大学・附属病院・医員  
研究者番号：20725733

(2) 研究分担者

三森 功士 (MIMORI KOUSHI)  
九州大学・大学病院・教授  
研究者番号：50322748