

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 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：2014～2016

課題番号：26460688

研究課題名(和文) 高テロメラーゼ活性循環癌細胞と遊離DNAの総合的解析による超早期癌診断技術の確立

研究課題名(英文) Cancer diagnosis by analysis of circulating tumor cells with high telomerase activity and cell-free DNA

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：がんはわが国の死因の多くを占める重要な疾患です。がんの治療成績を向上させるためには、早期発見と早期治療がとても重要です。わが国にはがん検診という優れた仕組みがありますが、さらなるがん診断の精度向上を目的に、血液の中を流れるがん細胞とがんに関連した核酸を検出することによる簡便ながん早期診断技術の開発を行いました。

ラマン散乱分光法という分析法を応用することで、血液中のがんに関連した核酸やタンパクを検出し、がんでない人と比較して、がん(胃がん、大腸がん)患者さんでより多く含まれることが分かりました。

また、この分光法を応用して、抗体などで標識をしなくても細胞の質を評価するための基本技術を確立しました。

研究成果の概要(英文)：In Japan, the majority of causes of death is cancer. Early detection and rapid start of treatment are very important for improving cancer prognosis. However, there is an excellent system of cancer screening in Japan, we tried to detect circulating tumor cells and cell-free nucleic acids related to cancer in the blood for the purpose of further improving the accuracy of cancer diagnosis.

By using Raman scattering spectroscopy, it is possible to detect more cell-free nucleic acids and proteins related to cancer in the blood from the patients with gastric or colonic cancer than the patients without cancer.

Moreover, applying this spectroscopic method, we established the basic technology for evaluating cell biology without labeling.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：がん診断 循環がん細胞 遊離核酸

1. 研究開始当初の背景

がんはわが国で死因の多くを占める重要な疾患であるが、いまだ根治的治療が確立したとは言いがたい。さらなる治療成績の向上には、精度の高い早期診断法の開発が急務である。

循環がん細胞 (CTC) はがんの血行性転移の直接的要因と考えられることから、がんの浸潤・転移メカニズム解明、あるいは有望なバイオマーカーとして、基礎・臨床両面から盛んに研究されてきたが、従来の上皮系マーカーを利用する方法では上皮間葉転換を起こし上皮系マーカーが消失した CTC が検出できない欠点がある。研究代表者らは、上皮系マーカーに頼らずテロメラーゼ活性に着目して CTC を検出する方法を確立した。CTC はテロメラーゼ活性が更新していると考えられるため、研究代表者らの方法は CTC を網羅的に検出できる点で優位性がある。

また、研究代表者らはがんの超早期診断のために、末梢静脈血中のがんに関連した核酸やタンパクの検出法に取り組み、表面増強ラマン散乱光による分光法を応用することで、血液検体のみで胃・大腸がん患者を区別できることを報告した。

2. 研究の目的

研究の目的は、血液中の高テロメラーゼ活性 CTC と、がん関連核酸・タンパクを総合的に解析することで、簡便、迅速かつ精度の高いがんの診断法ならびに評価法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) 昭和大学横浜市北部病院消化器センターで外科的治療(手術)を受けた胃がん患者 65 例の追跡調査を行い、治療開始前高テロメラーゼ活性 CTC 個数と治療アウトカムとの関連を解析した。

(2) 昭和大学江東豊洲病院消化器センターで外科的治療(手術)を受ける胃がん、大腸がん、良性疾患患者から治療開始前に採血を行い、血清を取得した。特殊金属バイオチップ上に血清を滴下し処理を行ったのち表面増強ラマン散乱光を測定した。表面増強ラマン散乱光波形パターンを解析することで、血液中のがん関連核酸・タンパク量の定量的検出を試みた。

(3) 昭和大学江東豊洲病院消化器センターで治療を受ける患者を対象に、治療開始前に採血を行い、血清を取得した。特殊金属バイオチップ上に血清を滴下し、バイオチップ表面に結合(吸着)した物質の自家蛍光強度を測定することで、患者血液中の疾患関連核酸・タンパク量の推定を行った。

4. 研究成果

(1) 胃がん手術患者 65 例の無再発生存期間と治療開始前高テロメラーゼ活性 CTC 個数は統計学的に有意に相関した。治療開始前高テロメラーゼ活性 CTC が末梢静脈血 7.5ml 中に 6 個以上存在した群は、5 個以内の群と比較して有意に無再発生存期間が短かった。同じく、全生存期間と治療開始前高テロメラーゼ活性 CTC

個数は、統計学的な有意差は認められなかったが相関傾向にあった。

(2) 胃がん・大腸がん患者血清のラマン散乱光強度は、良性疾患患者血清よりも強い傾向があった。また、がん患者においては、がんの病期進行度とラマン散乱光強度に相関傾向が認められた。

(3) 患者血清を特殊金属バイオチップ表面に滴下し、蛍光顕微鏡でバイオチップ表面を観察すると、自家蛍光が検出された。患者血液中の疾患関連核酸・タンパクを定量的に検出できる可能性が示された。

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 8 件)

Long-term prognostic impact of circulating tumour cells in gastric cancer patients. Hiroaki Ito, Jun Sato, Yukio Tsujino, Noriko Yamaguchi, Satoshi Kimura, Keigo Gohda, Katsuhiko Murakami, Manabu Onimaru, Tohru Ohmori, Fumihiko Ishikawa, and Haruhiro Inoue. World Journal of Gastroenterology. 2016;22(46):10232-10241 (査読有).

Change of number and size of circulating tumor cells with high telomerase activity during treatment of patients with gastric cancer. Hiroaki Ito, Noriko Yamaguchi, Manabu Onimaru, Satoshi Kimura, Tohru Ohmori, Fumihiko Ishikawa, Jun Sato, Shun Ito and Haruhiro Inoue. Oncology Letters. 2016;12: 4720-4726 (査読有).

Silver Nanoscale Hexagonal Column Chips for Detecting Cell-free DNA and Circulating Nucleosomes in Cancer Patients. Hiroaki Ito, Katsuyuki Hasegawa, Yuuki Hasegawa, Tadashi Nishimaki, Kazuyoshi Hosomichi, Satoshi Kimura, Motoi Ohba, Hiroshi Yao, Manabu Onimaru, Ituro Inoue, and Haruhiro Inoue. Scientific Reports. 2015;5:10455 (査読有).

Novel methodology for the detection of circulating tumor cells in gastric cancer and cell-free nucleic acids in gastrointestinal malignancies. Hiroaki Ito, Katsuyuki Hasegawa, Yuuki Hasegawa, Satoshi Kimura, Manabu Onimaru, Noriko Yamaguchi, Haruo Ikeda, Mitsuo Saito, and Haruhiro Inoue. Science Letters Journal. 2015;4:179 (査読有).

Greater curvature myotomy is a safe and effective modified technique in per-oral endoscopic myotomy. Manabu Onimaru,

Haruhiro Inoue, Haruo Ikeda, Chiaki Sato, Hiroki Sato, Chainarong Phalanusitthepha, Esperanza Grace Santi, Kevin L. Grimes, Hiroaki Ito, and Shin-ei Kudo. Gastrointestinal Endoscopy. 2015;81(6):1370-1377(査読有).

Use of surface-enhanced Raman scattering for detection of cancer-related serum-constituents in gastrointestinal cancer patients. Hiroaki Ito, Haruhiro Inoue, Katsuyuki Hasegawa, Yuuki Hasegawa, Takehiko Shimizu, Satoshi Kimura, Manabu Onimaru, Haruo Ikeda, and Shin-ei Kudo. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2014;10(3):599-608(査読有).

Evaluation of the safety and efficacy of esophagojejunostomy after totally laparoscopic total gastrectomy using a trans-orally inserted anvil: a single-center comparative study. Hiroaki Ito, Haruhiro Inoue, Noriko Odaka, Hitoshi Satodate, Manabu Onimaru, Haruo Ikeda, Daisuke Takayanagi, Kenta Nakahara, and Shin-ei Kudo. Surgical Endoscopy. 2014;28(6):1929-1935(査読有).

Prognostic impact of the number of viable circulating cells with high telomerase activity in gastric cancer patients: A prospective study. Hiroaki Ito, Haruhiro Inoue, Satoshi Kimura, Tohru Ohmori, Fumihiro Ishikawa, Keigo Gohda, and Jun Sato. International Journal of Oncology. 2014;45:227-234(査読有).

[学会発表](計 3 件)

SIMPLE BLOOD TEST FOR DIAGNOSIS OF GASTROINTESTINAL AND PANCREAS CANCER USING SURFACEENHANCED RAMAN SCATTERING.

Hiroaki Ito, Katsuyuki Hasegawa, Yuuki Hasegawa, Satoshi Kimura, Manabu Onimaru, Tohru Ohmori, Haruo Ikeda, Mitsuo Saito, Yohei Kitamura, Chiaki Sato, Kuniyo Gomi, Satoshi Sakaue, Masayuki Isozaki, Masaaki Matsukawa, and Haruhiro Inoue. Gastrointestinal Cancers Symposium (General Poster Session A), January 15, 2015, San Francisco, USA

バイオチップを用いた消化器癌に対する簡便な血液診断法の開発。
伊藤寛晃, 長谷川克之, 細道一善, 長谷川裕起, 井ノ上逸郎, 木村聡, 大森亨, 松川正明, 井上晴洋. 第 73 回 日本癌学会 学術総会(横浜), ポスターセッション

P15-3: 新しい診断技術, 2014.9.25

バイオチップを用いた血中遊離核酸解析による超早期癌診断法の開発。
伊藤寛晃, 長谷川克之, 細道一善, 長谷川裕起, 井ノ上逸郎, 木村聡, 清水健彦, 大森亨, 鬼丸学, 山口紀子, 木田裕之, 出口義雄, 横山登, 井上晴洋, 工藤進英. 第 52 回日本癌治療学会学術集会(横浜), シンポジウム 8: がん診断法の開発, 2014.8.29

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 2 件)

名称:がん診断方法
発明者:伊藤寛晃,他 4 名
権利者:同上
種類:特許
番号:特願 2016-076219
出願年月日:2016 年 4 月 5 日
国内外の別:国内

名称:がん診断装置
発明者:伊藤寛晃,他 4 名
権利者:同上
種類:特許
番号:特願 2016-076222
出願年月日:2016 年 4 月 5 日
国内外の別:国内

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]

ホームページ等
<http://www10.showa-u.ac.jp/ddc-kt/>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

井上 晴洋(Haruhiro, Inoue)
昭和大学・医学部・教授

研究者番号:90280966

木村 聡 (Satoshi, Kimura)
昭和大学・医学部・教授
研究者番号:30255765

(4)研究協力者
なし