

平成30年6月25日現在

機関番号：84409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15696

研究課題名(和文) 銀ナノ錯体バイオチップを用いた尿路上皮癌の超高感度診断法

研究課題名(英文) Hypersensitive diagnosis of urothelial cancer using silver nanoscale hexagonal column

研究代表者

西村 和郎 (Nishimura, Kazuo)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・泌尿器科主任部長

研究者番号：80303957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：尿路上皮癌(腎盂尿管癌、膀胱癌)の早期診断、病期予測を目的として、銀ナノ錯体バイオチップによる血中遊離ヌクレオソームの解析を行った。ヌクレオソームはバイオチップ上の吸着物質として観察され、尿路上皮癌患者およびコントロールとして良性疾患患者を対象に末梢血を用いて、蛍光顕微鏡による自家蛍光を観察した。癌と良性疾患の検体を比較すると、癌からの吸着物質の方が大きく、数も多い傾向を認めた。癌の病期と吸着物質のサイズ、数に明らかな相関は認められなかった。一方、分光器を用いた吸着物質の励起・蛍光波長の検討では、癌と良性疾患では異なるピーク波長が存在し、癌と良性疾患を識別できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to analyze circulating nucleosome using silver nanoscale hexagonal columns (NHCs) for the purpose of early diagnosis and staging of urothelial cancer (renal pelvic, ureteral and bladder cancer). Circulating nucleosomes in serum formed crystals on a silver NHC chip. Using serum obtained from urothelial cancer patients and patients with benign disease, the crystals on a silver NHC chip were observed under fluorescence microscope. The size and the number of the crystals obtained from urothelial cancer tended to be larger and higher. But neither the size nor the number of the crystals has a significant association with cancer stage. Next, spectroscopic analysis was performed using crystals from serum samples on silver NHC chips. There were different peak wave lengths between urothelial cancer patients and patients with benign disease. The spectroscopic analysis of the crystals on a silver NHC chip may distinguish urothelial cancer from benign disease.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：ヌクレオソーム 銀ナノ錯体 尿路上皮癌

1. 研究開始当初の背景

ヌクレオソームは、ヒストンタンパクとその周りに巻き付いた DNA からなる構造の単位であるが、癌や炎症性疾患などでは、主に免疫機構によりアポトーシスを起こした細胞からヌクレオソームが血中に遊離することが報告されている。

従来の癌臨床研究における血中ヌクレオソームの検出は DNA やヒストンに対する抗体を用いた ELISA 法によるものであり、癌腫によって異なるものの、病期進行と共に血中レベルが上昇すること、化学療法及び放射線治療の効果判定に有用であることなどが報告されている。しかし、感度、特異度が高くなく、臨床的な実用化には至っていない。

一方、癌由来のヌクレオソームは DNA のメチル化によりヒストン部分が陽性に帯電するため、陰性電荷した酸化銀メソ結晶に吸着させることができる。この原理を利用し、基板表面の酸化銀メソ結晶でコーティングしたバイオチップ（銀ナノ錯体バイオチップ）を用いて、癌由来のヌクレオソーム（メチル化ヒストン）が検出できると考えられる。

これまで、ヒト血清をこのバイオチップに滴下し、レーザー光を照射し、表面増強ラマン散乱（SERS: Surface-Enhanced Raman Scattering）波形を測定すると、良性疾患群では散乱光がほとんど認められず、胃癌・大腸癌群で有意に強く検出され、早期癌群よりも進行癌群でより強く検出されている。この波形は、ヒト癌培養細胞を物理的に破碎した検体由来の吸着物質の波形と類似していたこと、電子顕微鏡下の観察においても、癌患者血清由来とヒト癌培養細胞由来の吸着物質が類似していたこと、この吸着物質は蛍光顕微鏡下で自家蛍光が観察されたことが報告されている（文献 1）。

この吸着物質は、DNA、RNA、タンパクのいずれでもなく、塩基性であることから DNA のメチル化を伴ったヌクレオソームであることが推測されている。

尿路上皮癌（腎盂尿管癌、膀胱癌）は特異的な血液腫瘍マーカーがなく、早期診断や病期診断は尿細胞診、内視鏡検査、CT/MRI などに依存しており、各々感度、侵襲度、コストなどの問題がある。従って、簡便なバイオマーカーの確立が望まれている。

文献 1) Ito H, et al. Silver Nanoscale Hexagonal Column Chips for Detecting Cell-free DNA and Circulating Nucleosomes in Cancer Patients. Sci Rep. 2015 May 21;5:10455.

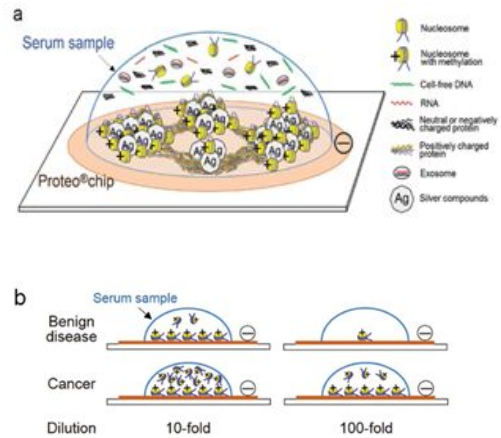
2. 研究の目的

銀ナノ錯体バイオチップを用いて、尿路上皮癌細胞に由来する血中遊離ヌクレオソームを解析することにより、尿路上皮癌の病態との関連性を明らかにする。具体的には、ヒト血清を用いて、バイオチップ上の吸着物質を解析することによって、尿路上皮癌の早期診断、病期予測が可能か検討する。

3. 研究の方法

泌尿器良性疾患（前立腺肥大症、膀胱炎、腎盂腎炎など）患者（コントロール）および尿路上皮癌患者を対象に、血液を 3ml 採取し、血清分離後、-20 で保存する。この検体を融解後、銀ナノ錯体バイオチップ上に滴下し、ヌクレオソームを検出し、定量化する。

図 1（文献 1 より引用）



1) 蛍光顕微鏡を用いて、バイオチップ上の吸着物質（ヌクレオソーム）の自家蛍光観察を行う。

2) 分光器を用いて、尿路上皮癌由来のヌクレオソームに特異的な励起・蛍光波長を検討する。

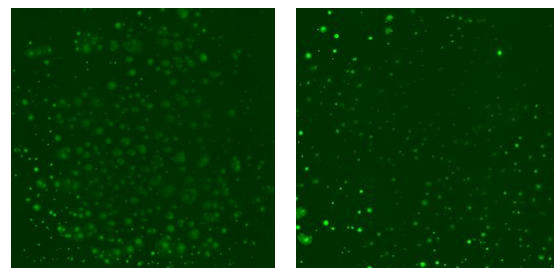
3) 共焦点顕微鏡を用いて、2つの蛍光波長による輝度値の比率を計算する「Ratio(レシオ)値」により解析する。

4. 研究成果

1) 自家蛍光による解析

尿路上皮癌患者 49 例、良性疾患患者 30 例の血清を用いて、銀ナノ錯体バイオチップ上の吸着物質を蛍光顕微鏡下に観察した。

自家蛍光画像



尿路上皮癌

前立腺肥大症

吸着物質は尿路上皮癌だけでなく、前立腺肥大症などの良性疾患においても、蛍光顕微鏡下に観察された。

吸着物質の数

尿路上皮癌と良性疾患の吸着物質の数を比較すると、尿路上皮癌の方が多量傾向を認めたと、個体差が大きく、有意差を認めなかった。従って、両者を吸着物質の数で

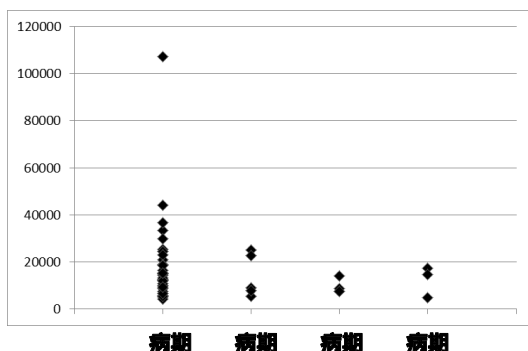
鑑別することは困難であった。

吸着物質のサイズ

尿路上皮癌の吸着物質は良性疾患に比較し、大きい傾向は認められたが、個々の検体における吸着物質のサイズのばらつきが大きかった。蛍光顕微鏡下における吸着物質の面積を定量化し、尿路上皮癌と良性疾患を比較したが、有意差を認めなかった。

次に、吸着物質の面積と尿路上皮癌の病期との関連性について検討した。

バイオチップ吸着物質の面積と病期



尿路上皮癌の病期と吸着物質の面積との間に有意な関連性は認めなかった。

従って、吸着物質の形態の違いから癌あるいは良性疾患を鑑別することや癌の病期を推測することは、困難であると判断した。

その主な理由として、蛍光顕微鏡は癌を特定できる蛍光波長分解能を有していないためであると推測した。

波長分解能を高めるための重要な要素としては光源と蛍光の最適な波長選択である。これを実現するために高い分解能を有する分光器を用いて励起・蛍光波長の特定を検討した。

2) 分光器を用いた尿路上皮癌由来ヌクレオソームに特異的な励起・蛍光波長の検討

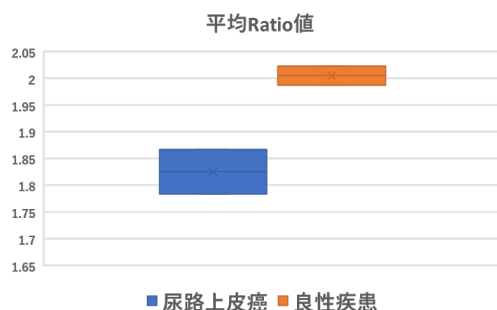
尿路上皮癌患者と良性疾患患者からの吸着物質を比較すると、明らかに異なる波長でピークを認めた。現在、癌患者と良性疾患患者に特異的な波長を同定中である。

分光による吸着物質の輝度値についても、尿路上皮癌の方が良性疾患よりも高い傾向を認められたが、尿路上皮癌患者における輝度値のばらつきが大きく、尿路上皮癌の病期と輝度値に相関は認めなかった。

3) 「Ratio(レシオ)値」による尿路上皮癌由来ヌクレオソームの解析

尿路上皮癌患者と良性疾患患者からの吸着物質を2つの蛍光波長で輝度値を測定し、輝度値の高い10点を抽出し、それぞれの波長の輝度値の比率を計算する「Ratio(レシオ)値」を用いて解析を行った。

蛍光2波長を同時に取得して、算出したRatio値から、尿路上皮癌と良性疾患を識別できる可能性が見出された。



この解析方法による結果から、さらに有意差のある最適な2つの蛍光波長を同定中である。

以上のように、末梢血中のヌクレオソームを銀ナノ錯体バイオチップ上に吸着させ、吸着物質の形態を自家蛍光観察することによって、尿路上皮癌と良性疾患を識別できるレベルには至らなかった。一方、分光器を用いた検討では、銀ナノ錯体バイオチップ上の吸着物質に対する励起・蛍光波長を測定することによって、尿路上皮癌と良性疾患では異なるピーク波長が存在する可能性が示唆された。また、2つの蛍光波長間の輝度比率で計算する「Ratio(レシオ)値」を用いた解析方法でも尿路上皮癌と良性疾患を識別出来る可能性が見出された。各々の疾患に特異的な波長を同定できれば、これら方法によって尿路上皮癌と良性疾患を識別できる可能性がある。

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6件)

1. Kimura G, Yonese J, Fukagai T, Kamba T, Nishimura K, (他10人) Enzalutamide in Japanese patients with chemotherapy-naïve, metastatic castration-resistant prostate cancer: A post-hoc analysis of the placebo-controlled PREVAIL trial. *Int J Urol*. 2016 May;23(5):395-403. doi: 10.1111/iju.13072. Epub 2016 Mar 27. 査読有
2. Akaza H, Hirao Y, Kim CS, Oya M, Ozono S, (他25人21番目) Nishimura K, Asia prostate cancer study (A-CaP Study) launch symposium. *Prostate Int*. 2016 Sep;4(3):88-96. doi:10.1016/j.prn.2016.03.001. Epub 2016 Mar 10. 査読有
3. Hatano K, Okusa T, Ishizuya Y, Nakai Y, Nakayama M, Kakimoto KI, Nishimura K. Postoperative early ultrasensitive prostate-specific antigen identifies patients at risk for biochemical recurrence in margin positive prostate cancers: a single-center

study. Jpn J Clin Oncol. 2017
Jan;47(1):74-79. doi:10.1093
/jjco/hyw150. 査読有

4. Tanaka N, Nishimura K, Okajima E, Ina K, Ogawa O, Nagata H, Akakura K, Fujimoto K, Gotoh M, Teramukai S, Hirao Y. The efficacy and safety of docetaxel-based chemotherapy combined with dexamethasone 1 mg daily oral administration: JMT0 Pca 10-01 phase II trial. Jpn J Clin Oncol. 2017 Mar1;47(3):247-251. doi: 10.1093/jjco/hyw193. 査読有
5. Takizawa A, Kawai K, Kawahara T, Kojima T, Maruyama S, (他 20 人、14 番目) Nishimura K, The usefulness of testosterone administration in identifying false-positive elevation of serum human chorionic gonadotropin in patients with germ cell tumor. J Cancer Res Clin Oncol. 2018 Jan;144(1):109-115. doi: 10.1007/s00432-017-2520-5. Epub 2017 Sep 13. 査読有
6. 西村 和郎 膀胱癌の浸潤転移 浸潤・転移機序：概論 日本臨床増刊号新腎・泌尿器科癌下 2017 年 75 巻増刊号 7: 51-54 査読無

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 中山 雅志、西村 和郎ほか「CIS の随伴を認めない筋層非浸潤性膀胱癌の術後 follow-up 期間に関する検討」第 54 回日本癌治療学会学術集会、横浜 2016 年
2. 弓場 覚、中山 雅志、西村 和郎ほか「尿路上皮癌骨転移巣に対し放射線治療を施行した 23 症例の検討」第 55 回日本癌治療学会学術集会、横浜 2017 年
3. 栗林 宗平、波多野 浩士、中山 雅志、西村 和郎ほか、「尿路上皮癌に対する 2nd line TIN 療法の検討」、第 67 回日本泌尿器学会中部総会、大阪 2017 年

6. 研究組織

(1)研究代表者

西村 和郎 (Nishimura Kazuo)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪
国際がんセンター(研究所)・その他部局・
泌尿器科主任部長
研究者番号：80303957

(2)研究分担者

中山 雅志 (Nakayama Masashi)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪
国際がんセンター(研究所)・その他部局・
泌尿器科副部長
研究者番号：40379178

(3)連携研究者

前田 和久 (Maeda Kazuhisa)
前田クリニック 院長
研究者番号：60397750

(4)研究協力者

長谷川 克之 (Hasegawa Katsuyuki)
有限会社マイテック