

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07643

研究課題名(和文)分光法を応用した血液・尿の網羅的解析による超早期がん診断と無標識循環がん細胞検出

研究課題名(英文) Ultra-early cancer diagnosis and label-free circulating tumor cell detection by comprehensive analysis of blood and urine 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ラマン分光法を応用して、血液・尿を用いた迅速、高精度の超早期がん診断法を確立し、無標識循環がん細胞のシングルセル遺伝子発現解析を行うことである。

超早期がん診断法の確立では、食道がん、胃がん、大腸がん、膵がん患者から得た血液(血清)、泌尿器疾患患者の尿を試料として、安定して再現性良くラマン散乱光波形を取得することに成功した。疾患特異性を有したいくつかの有望なラマンシフト候補が認められており、解析を続けている。

無標識循環がん細胞については、細胞のラマン散乱光波形に加えて細胞浮遊液のラマン散乱光波形が混入してしまったため、解析のためのマイクロ流路を最適化する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、血液(血清)や尿を試料としてラマン散乱光波形を取得する手法の確立に成功した。本技術により、血液(血清)や尿の既知・未知の微量物質を前処理なしで網羅的に検出、分析できるため、幅広い臓器のがん種に適用でき、高精度かつ低コストの超早期がん迅速診断が可能になると期待される。

また本技術により、がん以外の生活習慣病や先天性遺伝性疾患、感染症などの迅速診断にも応用できる可能性があり、極めて汎用性が高い技術である。

さらに、本技術により血液中のがん細胞を無標識で検出し、生細胞のまま採取して細胞機能解析を行うことで、がんの転移メカニズムの解明や新たな分子標的治療薬の開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to apply Raman spectroscopy to (1) establish a rapid and highly accurate ultra-early cancer diagnostic method using blood and urine, and (2) perform single-cell gene expression analysis of unlabeled circulating cancer cells.

(1) For the establishment of ultra-early cancer diagnostic methods, stable and reproducible Raman spectra of blood (serum) obtained from patients with esophageal cancer, gastric cancer, colorectal cancer, and pancreatic cancer, and urine of urological disease patients were acquired. Raman shift candidates expected to have disease-specificity have been identified and are being analyzed.

(2) For unlabeled circulating cancer cells, the Raman spectra of the cell suspension is mixed with the Raman spectra of the cell, so it is necessary to optimize the microchannel for analysis.

研究分野：消化器外科

キーワード：がん 早期診断 ラマン分光法 ラマン散乱光 循環がん細胞

1. 研究開始当初の背景

2018年人口動態統計月報年計(概数)によると、がんによる死亡者数は37万3547人であり、わが国の死因の第1位である。がんの治療成績向上には、精度の高い早期診断法、最適治療選択法、革新的治療法のいずれもが必要である。

ラマン分光法は、散乱光を解析することで試料中の成分の種類と量を特定できる優れた非接触非破壊分析法であるが、自家蛍光に大きく影響を受けるため生体試料または生体を評価することは困難であった。

研究代表者は、ラマン分光法で生体試料を評価するために、自家蛍光の影響を受けづらい近赤外線レーザー(波長1064nm)を励起光源とした。ただし近赤外線レーザーを励起光源とした場合、得られるラマン散乱光強度が著しく弱くなるため、独自の高感度検出回路を開発して生体試料に特化した顕微ラマン装置を作製した。これらの独自技術により世界に先駆けてラマン分光法を応用した血清による迅速かつ高精度のがんスクリーニング法を開発した。消化管内視鏡検査受診者213名の血清20μl中の遊離核酸を含む既知・未知の分子を45秒間で網羅的に検出することに成功した。また、早期がんを含めた胃がんまたは大腸がんの存在を感度85.7%、特異度86.7%で予測できた。さらに、この技術を応用し、抗体や試薬等を使用せずに、がん患者血液中を流れる循環がん細胞の無標識検出に成功していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者の上記研究成果を発展させ、血液・尿を用いた迅速、高精度の超早期がん診断法を確立し、無標識循環がん細胞のシングルセル遺伝子発現解析を行うことである。

<血液・尿を用いた迅速、高精度の超早期がん診断法>

食道がん、胃がん、大腸がん、膵がん、良性疾患患者から得られた血液や尿のラマン散乱光波形を記録し解析することで疾患特異性の高いラマンシフトを見出し、精度の高いがんスクリーニング法を確立する。また、がんの治療効果判定法としての有用性も検討する。

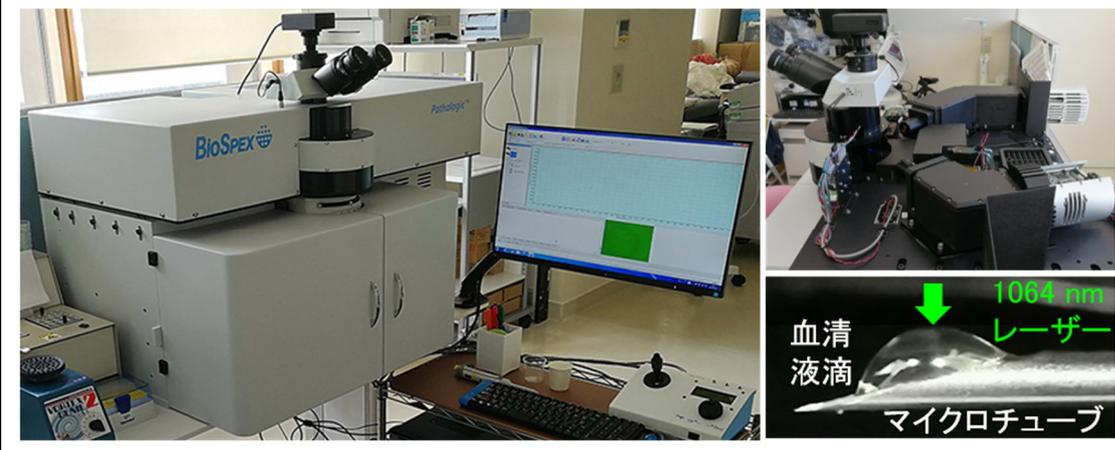
<無標識循環がん細胞のシングルセル遺伝子発現解析>

がん患者血液中に存在する循環がん細胞は、がん転移に重要な役割を果たしており、この循環がん細胞を採取し機能解析を行うことでがん転移のメカニズムの解明につながり、がん転移抑制を目的とした分子標的治療薬の開発にも貢献できると考えられる。一般的に、循環がん細胞の検出に抗体等を用いた何らかの標識が必要であり、この標識による修飾が生体内にある状態の循環がん細胞の本来の生物学的特性を変化させてしまうため、がん研究の妨げになってきた。ラマン分光法は抗体等による標識を行わず、かつ生体毒性が低いと考えられるため、より生体内に近い状態の循環がん細胞を検出、採取できると考えられた。

3. 研究の方法

前述の顕微ラマン装置(図1)を用いて、病院で治療を受ける食道がん、胃がん、大腸がん、膵がん、良性疾患患者から得られた血液や尿を解析した。昭和大学江東豊洲病院、埼玉県立がんセンター、「新学術領域研究『学術研究支援基盤形成』コホート・生体試料支援プラットフォーム(代表者:名古屋大学 若井建志教授)Aコホートによるバイオリソース支援活動 A-5 がん早期診断マーカー精度検証のための生体試料支援」から提供された消化器疾患、泌尿器科疾患患者の血液(血清)、尿を試料としてラマン散乱光波形を取得した。

<図1> 本研究で使用した顕微ラマン装置



4. 研究成果

本研究において、全ての試料から安定してラマンスペクトルを取得することができた(図2)。本研究成果の一部により、国内特許を取得した(特許第7129732号:血清試料検査装置、及び血清試料の検査方法)。取得したラマン散乱光波形の解析に機械学習を導入し、大腸がんの存在を高精度に推測(一般化 R^2 0.99以上)するアルゴリズムを開発した(図3, Highly accurate colorectal cancer prediction model based on Raman spectroscopy using patient serum. Hiroaki Ito, 他15名, World Journal of Gastrointestinal Oncology. Nov 15, 2020; 12(11): 1311-1324)。

上記のほかにも、疾患特異性が高いと推測される複数の有望なラマンシフトを発見することができた。これらのラマンシフトにおけるラマン散乱光強度の経時的変化により、がんの早期診断のみならず、治療効果判定、再発予測にも応用できる可能性が示唆された。

一方、無標識循環がん細胞の検出と生細胞のまま採取する技術の確立においては、細胞のラマン散乱光波形に細胞保存液のラマン散乱光波形が混ざることが障害となり、細胞評価がやや不安定な状況である。ラマン散乱光の発生が少ない細胞保存液の開発とともに、細胞からラマン散乱光波形を取得する際に用いるマイクロ流路やマイクロプレートなどのデバイスを最適化するなど、細胞保存液の影響を可及的に小さくするためのさらなる工夫が必要である。

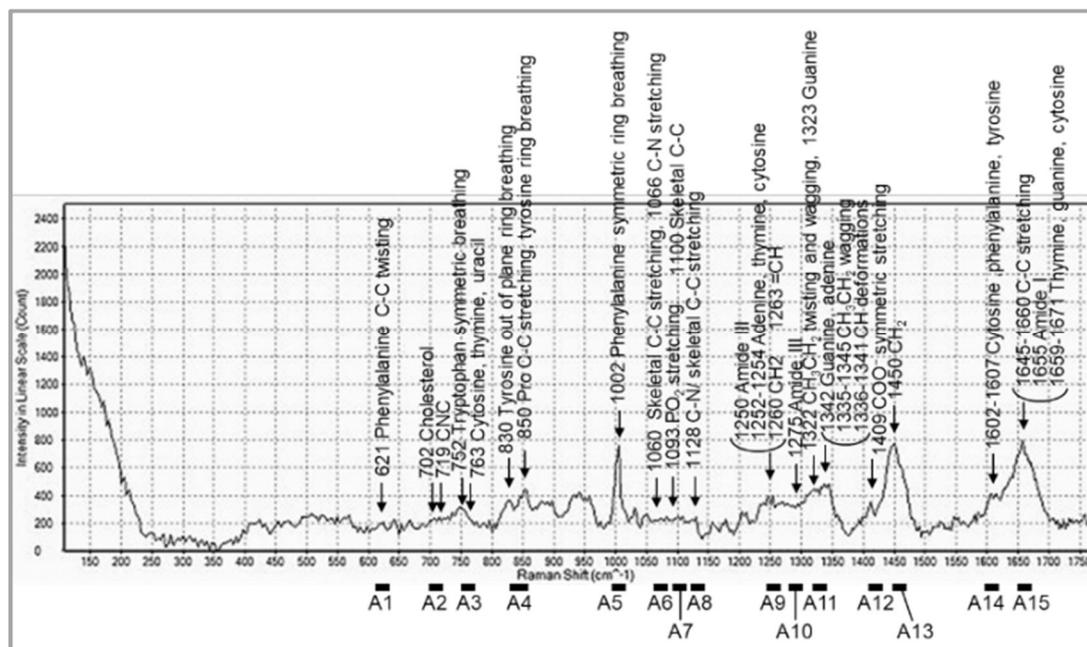
本研究では、血液(血清)や尿を試料としてラマン散乱光波形を取得する手法の確立に成功した。本技術により、血液(血清)や尿の既知・未知の微量物質を前処理なしで網羅的に検出、分析できるため、幅広い臓器のがん種に適用でき、高精度かつ低コストの超早期がん迅速診断が可能になると期待される。また本技術により、がん以外の生活習慣病や先天性遺伝性疾患、感染症などの迅速診断にも応用できる可能性があり、極めて汎用性が高い技術である。

現在、測定用に新たに開発した石英ガラス繊維チップを用いたラマン散乱光測定法を検証している。このチップを用いて得られるラマン散乱光波形(図4)は従来の測定法と比較してS/N比が高く、本チップを用いて試料の再測定を行っている。見いだされたラマンシフトの再評価を行い、真に有効なラマンシフトの絞り込みを行う。最終的に有効と判断されたラマンシフトをもとにした生体評価アルゴリズムを完成することも目標として研究を継続している。

循環がん細胞については、本技術を応用して血液中のがん細胞を無標識で検出し、生細胞のまま採取して細胞機能解析を行うことで、がんの転移メカニズムの解明や新たな分子標的治療薬の開発に貢献できると考えられる。

<図2> 大腸がん患者血清のラマンスペクトル

血清中の微量成分が、高解像度で検出できている。



< 図3 > ラマンスペクトルの機械学習による解析

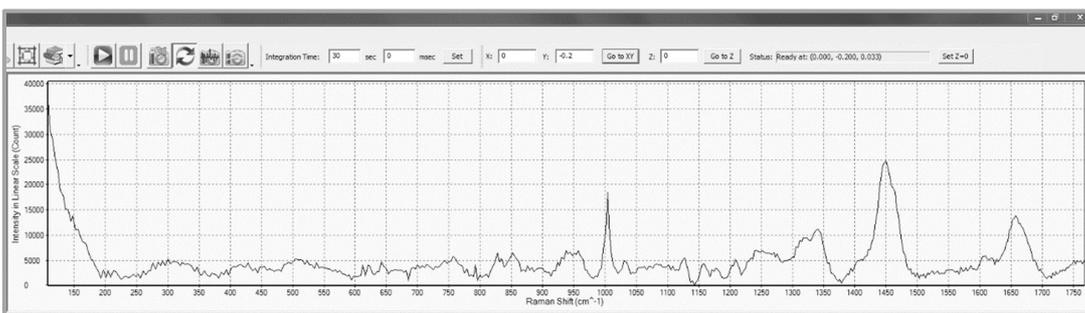
極めて高精度に大腸がんを特定するモデル。

Overall statistics			Contributing factor			
Measure	Training		Factor	Splits	Likelihood ratio χ^2	Effect
Entropy R square	0.9977		A 10	90	4451.14056	0.2291
Generalized R square	0.9982		A 8	83	3638.39958	0.1873
Mean -Log p	0.0005		A 3	66	3333.68573	0.1716
Root mean squared error	0.0012		A 7	58	1332.45026	0.0686
Mean absolute deviation	0.0005		A 12	40	1287.64646	0.0663
Misclassification rate	0.0000		A 4	40	1126.15477	0.0580
N	184		A 11	25	981.501934	0.0505
			A 9	38	934.070021	0.0481
			A 15	59	913.067745	0.0470
			A 2	16	371.256757	0.0191
			A 1	33	341.492538	0.0176
			A 14	18	280.955495	0.0145
			A 13	8	172.026042	0.0089
			A 5	12	162.902991	0.0084
			A 6	14	101.888286	0.0052

Prediction		
Actual	Predicted	
Cancer?	No	Yes
No	172	0
Yes	0	12

< 図4 > 石英ガラス繊維チップを使用した食道がん患者血清のラマンスペクトル

従来の測定法によるラマン散乱光波形と比較して、ベースラインが低く、S/N比が高い。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Hiroaki Ito	4. 巻 6
2. 論文標題 Ultra-early cancer diagnosis and label-free circulating tumor cell detection by comprehensive analysis of blood and urine using spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 6-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21820/23987073.2021.6.6	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Ito Hiroaki, Uragami Naoyuki, Miyazaki Tomokazu, Yang William, Issha Kenji, Matsuo Kai, Kimura Satoshi, Arai Yuji, Tokunaga Hiromasa, Okada Saiko, Kawamura Machiko, Yokoyama Noboru, Kushima Miki, Inoue Haruhiro, Fukagai Takashi, Kamiyo Yumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Highly accurate colorectal cancer prediction model based on Raman spectroscopy using patient serum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Journal of Gastrointestinal Oncology	6. 最初と最後の頁 1311 ~ 1324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4251/wjgo.v12.i11.1311	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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 血清試料検査装置、及び血清試料の検査方法	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、7129732	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------