

報道関係者各位

## 血中のがん細胞由来物質の高感度検出に成功

— がんの簡便な超早期診断技術の実用化に大きく前進 —

昭和大学江東豊洲病院 消化器センター 伊藤寛晃講師の研究チームは、銀ナノ錯体バイオチップを用いて、ごく少量の血液による「超早期がん診断」技術を開発し、現在臨床応用に向けた準備を行っています。

培養細胞を用いた研究により、バイオチップに結合する物質が、がん細胞に由来する遊離ヌクレオソームであることが示唆されました。主に、免疫機構によりアポトーシスを起こしたがん細胞に由来していると考えられ、がんの超早期診断が実現できると期待されます。本研究は科学研究費補助金のサポートを受け行われました。本研究成果は、2015年5月21日 10:00(英国時間)に英国 Nature Publishing Group のオンライン科学雑誌「Scientific Reports」に掲載されます。

掲載誌: Scientific Reports

論文名: Silver Nanoscale Hexagonal Column Chips for Detecting Cell-free DNA and Circulating Nucleosomes in Cancer Patients.

著者: Hiroaki Ito, Katsuyuki Hasegawa, Yuuki Hasegawa, Tadashi Nishimaki, Kazuyoshi Hosomichi, Satoshi Kimura, Motoi Ohba, Hiroshi Yao, Manabu Onimaru, Ituro Inoue, and Haruhiro Inoue

また、その後の研究の進展により、自家蛍光を検出することで、バイオチップに結合したがん細胞由来遊離ヌクレオソームを簡便に再現性良く検出できることが分かりました。本研究の成果により、がんの超早期診断技術を確立し、なるべく早く世界中で利用できるよう、準備を進めています。

### 研究概要

昭和大学江東豊洲病院 消化器センター 講師 伊藤寛晃、講師 鬼丸学、教授 井上晴洋、有限会社マイテック(神戸市中央区港島南町6丁目7-4 神戸健康産業開発センター101号室)の研究チームは、銀ナノ錯体バイオチップを用いた新規がん診断法の開発に世界で初めて成功し、ごく少量の血液(現在では血清1 $\mu$ lで測定可能)による簡便迅速な判定で、胃がん、大腸がん、良性疾患の識別とがんの病期の推測が可能であることを報告しています。本技術が評価され、伊藤寛晃講師は、『Nanoscience Award 2015: Prof. Joseph Wang Award』を受賞いたしました。また、共同研究者である有限会社マイテックは、『公益財団法人日本発明振興協会 第34回(平成26年度)発明研究奨励金(血中遊離核酸解析による癌超早期診断用バイオチップ)』を受賞しております。

今回の研究で、昭和大学横浜市北部病院 臨床病理診断学 木村聡教授、昭和大学 腫瘍分子生物学研究所 大場基講師、兵庫県立大学 理学部 八尾浩史准教授、国立遺伝学研究所 井ノ上逸朗教授、琉球大学 第一外科 西巻正教授らの協力を得て、バイオチップに結合する物質が、がん細胞由来の血中遊離ヌクレオソームであることが示唆されました。本技術により、既存の検査法を大幅に上回るがんの超早期診断が可能になると期待されます。

また、これまで行ってきた表面増強ラマン散乱光検出に加え、自家蛍光を検出することで、チップ表面に結合した遊離ヌクレオソームをより高い精度・再現性をもって確認できる技術を開発しました。測定に要する時間はさらに短縮され、機器はより低コストとなります。今後、臨床試験で精度を確認し、なるべく早く実用化するべく研究を進めています。

## 研究発表者

---

昭和大学江東豊洲病院 消化器センター

講師 伊藤寛晃

講師 鬼丸学

教授 井上晴洋

## 研究の背景

---

がんは世界の死因の上位を占める重要な疾患です。治療成績向上、医療費削減の両面から、がんの超早期診断のための次世代医療技術の開発は急務であり、世界中で研究開発が行われています。

研究チームは、がん患者の血液中に入り込み全身を回る「循環がん細胞」に関する研究を行い、「循環がん細胞」ががんの予後推定などに役立つことを示してきました(①Detection and Quantification of Circulating Tumor Cells in Patients with Esophageal Cancer by Real-Time Polymerase Chain Reaction. J. Exp. Clin. Cancer Res. 2004;23:455-464、②Squamous cell carcinoma-antigen messenger RNA level in peripheral blood predicts recurrence after resection in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Surgery. 2006;139(5):678-685、③Prognostic impact of detecting viable circulating tumour cells in gastric cancer patients using a telomerase-specific viral agent: a prospective study. BMC Cancer. 2012; 12:346、④Prognostic impact of the number of viable circulating cells with high telomerase activity in gastric cancer patients: A prospective study. International Journal of Oncology. 2014;45:227-234、等)。

しかし、一方で血液中の循環がん細胞数は少なく、がんがある程度進んだ状態でないと確率的に見つけることが難しいため、早期がんの診断には課題が残っています。そのため、新たな「超早期がん診断」技術として血中遊離核酸検出法の開発を開始しました。

表面増強ラマン散乱(SERS: Surface-Enhanced Raman Scattering)(用語解説1)は、単一分子測定が可能などの超高感度検出が可能ですが、ナノ単位を超える原子、分子レベルでの緻密な設計制御が必要とさ

れます。研究チームは、従来の物理的加工法によるナノデバイスではなく、化学的手法により「3次元自己組織化結晶(量子結晶)」(用語解説2)を金属チップ上に作成し治療前患者血清を滴下、レーザーを照射しSERS波形を記録しました。良性疾患群では散乱光がほとんど認められず、胃がん・大腸がん群で有意に強く検出されました。また、がん群の中では早期がん群よりも進行がん群でより強く検出されることが分かりました(Use of surface-enhanced Raman scattering for detection of cancer-related serum-constituents in gastrointestinal cancer patients. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2014;10(3):599-608. DOI:10.1016/j.nano.2013.09.006)。

ただし、チップに結合する物質ががん細胞由来なのか、がんに対する免疫細胞由来なのか、あるいは他のメカニズムに由来する物質なのかははっきりしていませんでした。今回の研究で、チップ表面の変化と結合する物質を詳しく調べました。

## 研究の内容

---

バイオチップ表面の変化を電子顕微鏡で観察しました。最初は整然と並んでいた銀ナノ錯体結晶がアルカリ処理によりラグビーボール状と小突起状に変化、さらに10倍に希釈したがん患者血清を20 $\mu$ l滴下後には綿帽子状に変化しました(図1)。レーザー顕微鏡を用いてチップ表面の形状解析を行ったところ、綿帽子状に見えた部分は島状の構造をなしていました。この島状構造の大きさと数は、良性疾患に比べてがんで大きく、また多く認められました(図2)。

次に、5種類のヒト由来培養細胞(胃がん2種、大腸がん、膵がん、正常皮膚線維芽細胞)を用いて、物理的細胞破碎サンプルと化学的細胞溶解サンプルを作製しました。さらに化学的細胞溶解サンプルからDNA、RNA、核酸以外のタンパクをそれぞれ抽出しました。これらのサンプルをバイオチップに滴下し、レーザー顕微鏡で表面形状解析を行うと、物理的細胞破碎サンプルで最も大きい島状構造が見られました(図3)。SERS測定では、物理的細胞破碎サンプルのみが有意な散乱光波形を示し、その波形はがん患者血清の波形と類似していました(図4)。

これらの結果から、研究チームが開発したバイオチップは、がん細胞由来のある程度構造を保った状態の物質を結合させることが示唆されました。このバイオチップは塩基性の物質をより強く結合させることから、エピゲノムの変化であるDNAのメチル化を伴った遊離ヌクレオソーム(用語解説3)などが主に結合していると推測され、この現象が本技術でがんを識別できる理由であると考えられました(図5)。

## 今後の展望

---

本技術によるがん診断法は、簡便、迅速であり、かつ低コストで実施することが可能です。SERS検出には特殊な測定機器が必要でしたが、さらなる追加実験の結果、自家蛍光(用語解説4)を測定することにより簡便にがん関連遊離ヌクレオソーム量を推定できる可能性があることが分かりました(図6)。より迅速、簡便、低コストの超早期がん診断が可能になると期待されます。

今後、多くのデータを蓄積して精度を確認し、なるべく早くがん診療に活用することで社会に貢献したいと考えています。

## 用語解説

---

### 1) 表面増強ラマン散乱 (SERS)

---

表面増強ラマン散乱 (SERS) とは、ナノメートルオーダーの微小金属構造体に光を照射することで発生する、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance: SPR) と呼ばれる、光によって誘導される電子の集団振動を利用したラマン散乱です。SERS による散乱は、通常のラマン散乱分光法と比較して一般に高強度であり、条件を整えれば、金属ナノ粒子凝集体に吸着した一分子からのラマン散乱光を検出できるほど超高度の測定が可能です。

### 2) 量子結晶

---

世界で初めて開発に成功した新たな概念の「新規プラズモン物質」量子ドットを、3次元に自己組織化する結晶です。

### 3) ヌクレオソーム

---

ヒストンと呼ばれる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。がんで多く見られる DNA のメチル化によりヒストン部分が陽性に帯電することで、わたしたちが開発したバイオチップに結合しやすくなると考えられます。

### 4) 自家蛍光

---

薬品や抗体などで人工的に付加するのではなく、観察対象が自ら有している蛍光のことです。通常は弱い光のことが多く、安定した観察のためには高い技術が要求されます。

### 発表 (雑誌・学会)

---

雑誌名 : Scientific Reports

論文タイトル : Silver Nanoscale Hexagonal Column Chips for Detecting Cell-free DNA and Circulating Nucleosomes in Cancer Patients.

著者 : Hiroaki Ito, Katsuyuki Hasegawa, Yuuki Hasegawa, Tadashi Nishimaki, Kazuyoshi Hosomichi, Satoshi Kimura, Motoi Ohba, Hiroshi Yao, Manabu Onimaru, Ituro Inoue, and Haruhiro Inoue

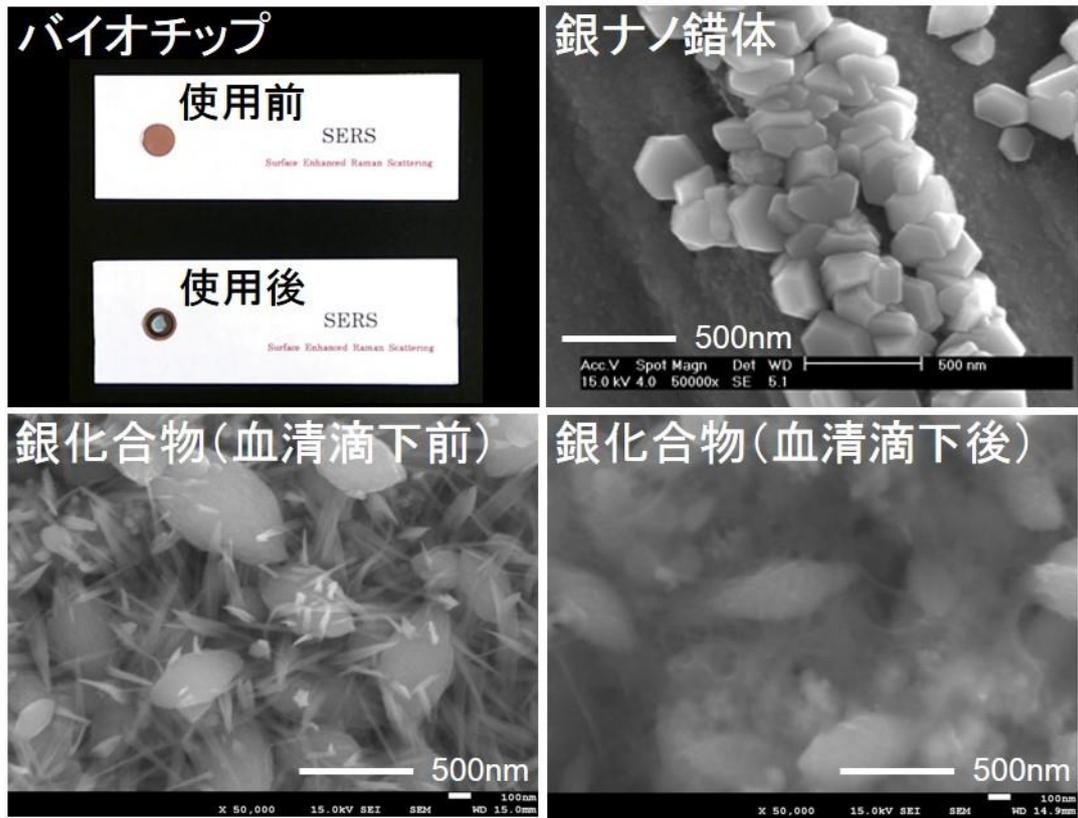


図1. バイオチップの表面変化(電子顕微鏡画像)

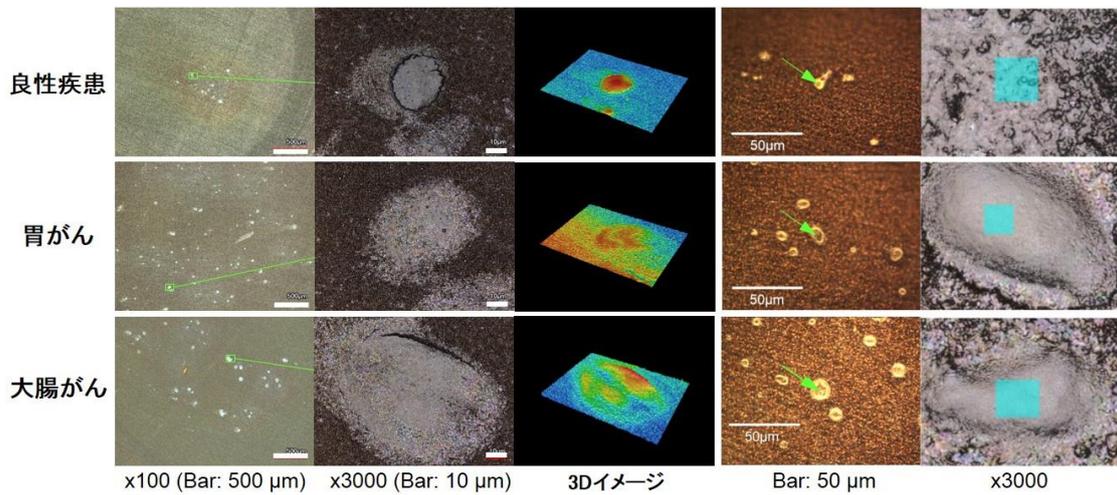


図2. 患者血清滴下後のバイオチップ表面形状(レーザー顕微鏡画像)

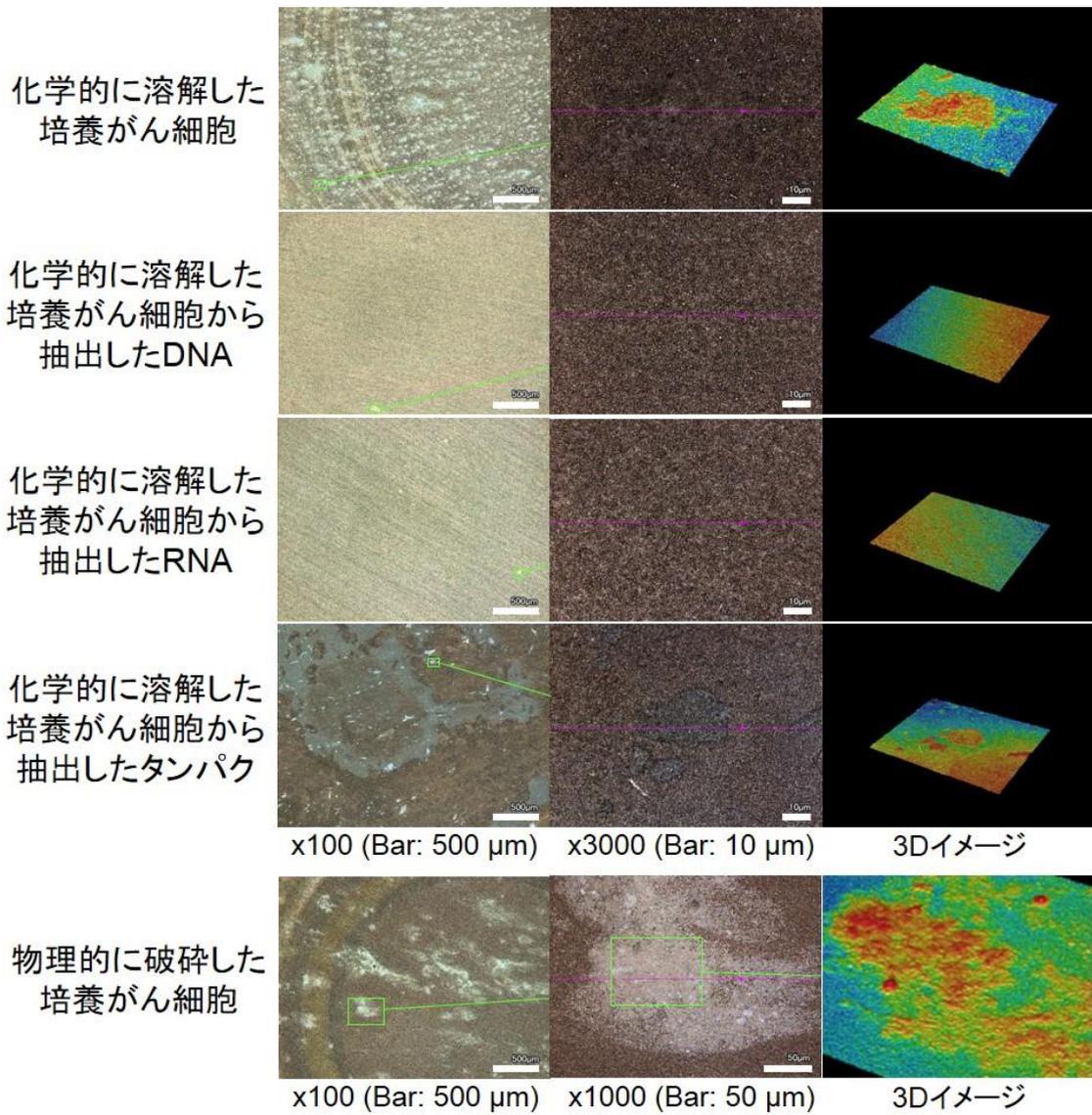


図3. 培養細胞サンプル滴下後のバイオチップ表面形状(レーザー顕微鏡画像)

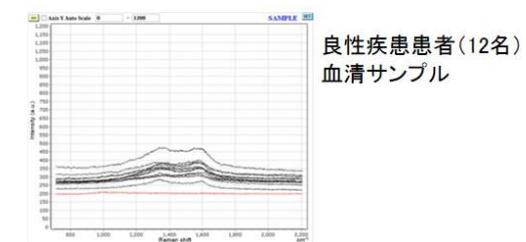
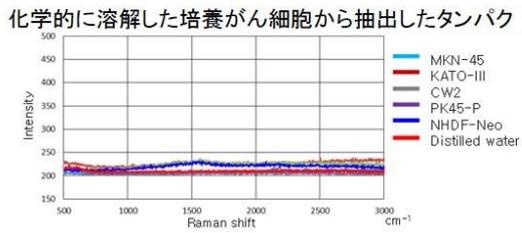
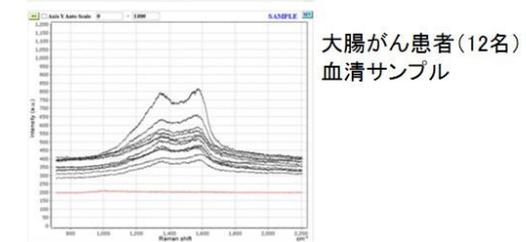
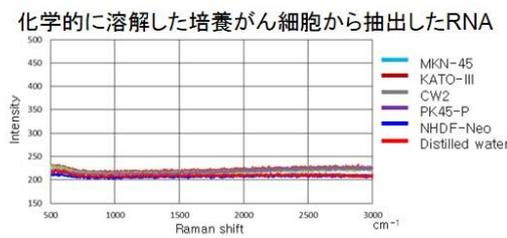
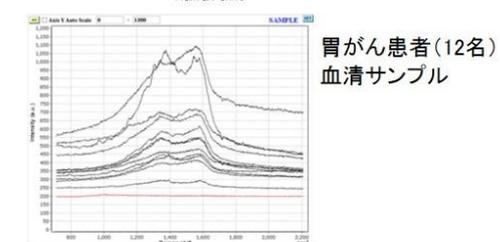
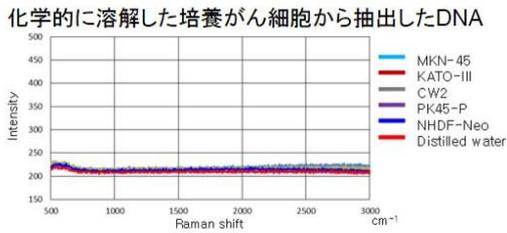
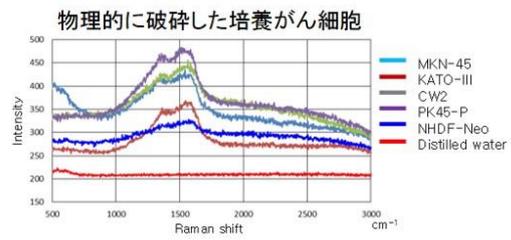
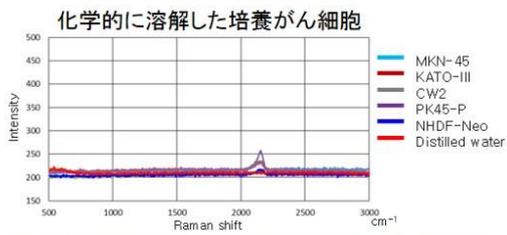


図4. 培養細胞と患者血清のラマン散乱光波形

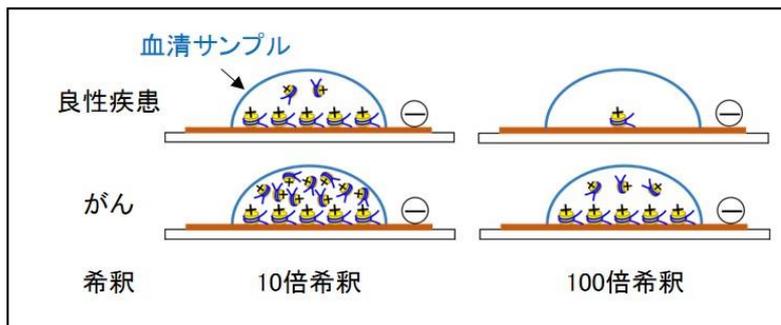
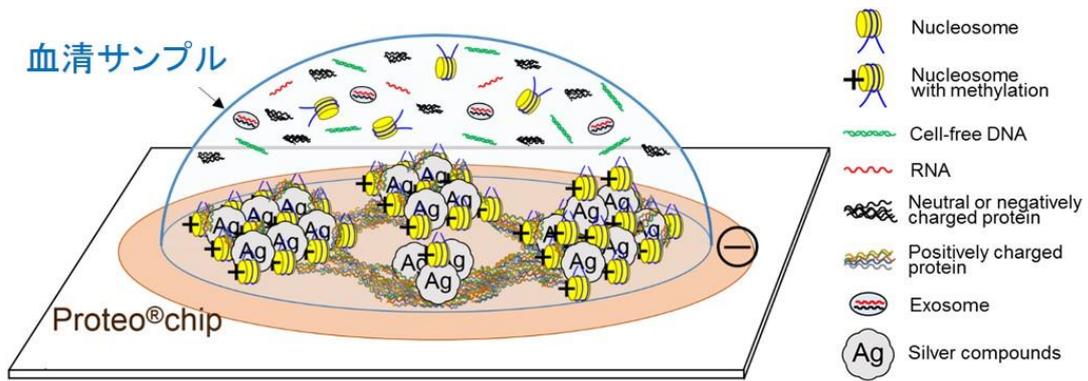


図5. バイオチップ表面で起きている変化(推測図)

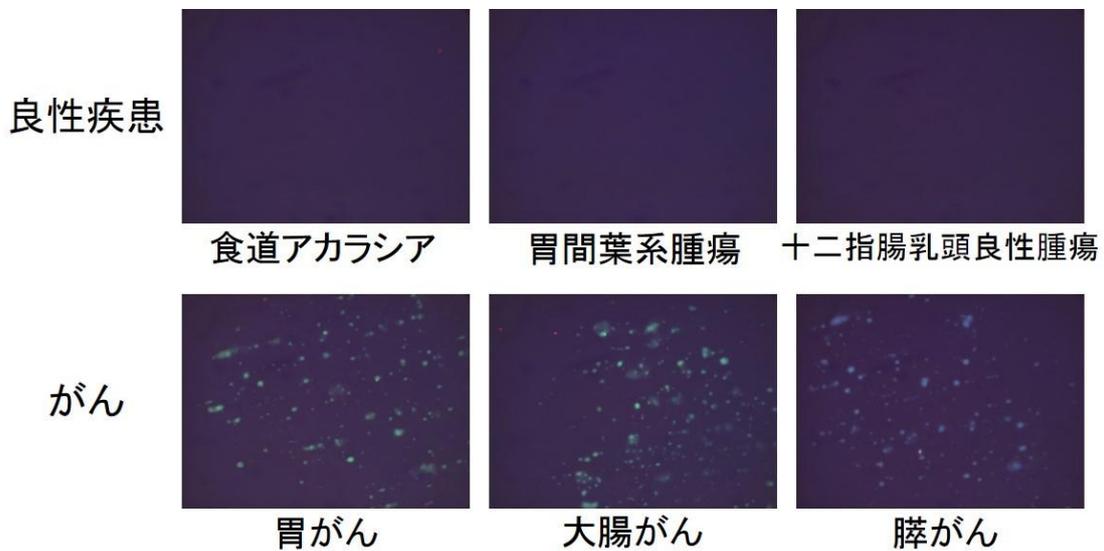


図6. バイオチップ表面結合物質の自家蛍光画像

## 本件に関する問い合わせ先

---

昭和大学 江東豊洲病院 消化器センター

講師 伊藤 寛晃

TEL : 03-6204-6000

FAX : 03-6204-6396

E-mail : [h.ito@med.showa-u.ac.jp](mailto:h.ito@med.showa-u.ac.jp)