

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10060

研究課題名(和文)唾液を用いた乳癌の新規検診モダリティおよび新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Diagnostic approach to breast cancer patients based on target metabolomics in saliva

研究代表者

遠山 竜也 (Toyama, Tatsuya)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30315882

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)：唾液中ポリアミンを用いた新規乳癌検診モダリティの開発についての検討では、健康人女性61例、初発乳癌患者111例を対象として唾液中ポリアミンを測定し、13種類のポリアミンのうち8種類のポリアミンを使用して、乳癌の判別スコアを構築することができた。しかし、再発乳癌患者15例を対象とした検討においては、治療における画像や腫瘍マーカーによる効果判定と、唾液中ポリアミン値の変化には有意な相関を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Eight polyamines strongly correlated with the cancer patients. A simple 1-order equation was developed for the discrimination of the breast cancer patients and healthy persons. The concordance rate of the breast cancer patients and the healthy persons by the equation was 88% and 76% on the training set, respectively, whereas those on the validation set was both 88%. The score in the equation tended to correlate with the cancer stage of the patients and increased with the more serious conditions.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌

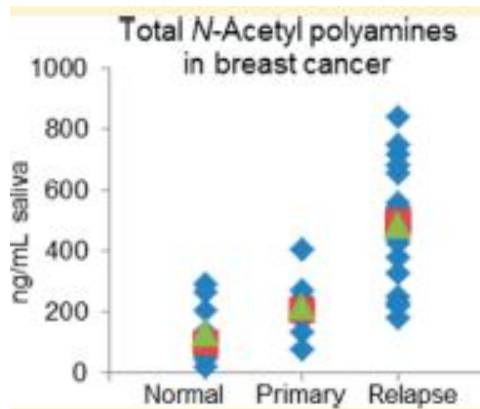
1. 研究開始当初の背景

(1) <研究課題 I> 乳癌は日本人女性が罹患する悪性腫瘍の第 1 位であり、その乳癌罹患数は増加の一途を辿っている。現在、わが国では「40 歳以上の女性に対して 2 年に 1 回のマンモグラフィー検診」が推奨されているが、最近、マンモグラフィー検診における複数の課題が顕在化してきた。課題 1: 「痛み」を伴う検査であるためわが国の受診率は 20 ~ 30% と低い、課題 2: マンモグラフィー検診前の 40 歳未満でも乳癌の発症はしばしばあること、課題 3: マンモグラフィーで見つからないタイプの乳癌が存在すること、課題 4: 増殖の早いタイプでは 2 年に 1 回のマンモグラフィー検診では不十分であること、である。以上の理由により、マンモグラフィー以外の乳癌検診モダリティーの開発が社会的急務となっている。

(2) <研究課題 > 乳癌治療におけるバイオマーカーとして、CA15-3 に代表される血液腫瘍マーカーが、乳癌治療の効果予測因子として広く行われているものの、その感度は高くなく、有用性には問題があると言わざるを得ない。最近、新規バイオマーカーとして、血中循環腫瘍細胞 (CTC: Circulating Tumor Cell) や循環血中の DNA (ctDNA: Circulating tumor DNA) といったいわゆる「Liquid Biopsy」の有用性を示す報告もあるが、これらの検査は「採血」という侵襲的操作が必須であること、なにより「費用が高額」であるというデメリットを有し、その有用性については研究段階である。

(3) 今回われわれが着目した「ポリアミン」とは、細胞分裂やタンパク合成に関与する低分子代謝物 (メタボライト) である。古くは 1971 年に尿中ポリアミンの測定ががん診断に利用できる可能性が報告されたが、残念ながら安定した測定方法が確立されず、その後の研究に大きな発展はなかった。最近、共同研究者である豊岡らが、ポリアミンを高感度かつ特異的に定量的に検出する分析方法の開発に成功した。

(3) これまでの研究成果: 乳癌患者 (初発 n=12、再発 n=24) および健常人ボランティア (n=14) から採取した「唾液サンプル」を用いて 唾液中ポリアミン が乳癌におけるバイオマーカーとなり得るかどうかを探索



する目的で検討した。その結果、代表的な 11 種類のポリアミン類のなかに、健常人ではほとんど検出されないが、乳癌患者で高頻度に検出されるものが存在すること世界で初めて見出した (前ページ図) また凍結融解安定性を確認する試験を行い、唾液の凍結融解を少なくとも 3 回以上繰り返しても測定値に変動がないことも確認した (Tsutsui H, Toyama T, Toyooka T, et al. Anal Chem 2013)。

このパイロット試験の結果を踏まえて、本研究では、「唾液中ポリアミン」の乳癌におけるバイオマーカーとしての意義を検証する目的で、前述した二つの課題の Validation (検証) 試験を計画した。

2. 研究の目的

わが国における乳癌の罹患数は増加の一途を辿っており、乳癌の早期発見および治療成績の向上が緊急課題となっている。私たちはこれまでに、唾液中ポリアミンを特異的かつ高感度に測定する分析法の開発に成功した。さらに、唾液中ポリアミンが乳癌患者において健常人より高値を示すことを世界で初めて報告した。これらの一連の研究成果を踏まえて、本研究では、I: 唾液中ポリアミンを用いた新規乳癌検診モダリティーの開発と、II: 唾液中ポリアミンの乳癌治療におけるバイオマーカーとしての有用性を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 唾液サンプルの採取: 以下の 3 群に分けて唾液 (約 1mL) を採取する。健常人ボランティア 61 例、初発乳癌患者の術前と術後の 2 回を 1 セットとして 109 例、再発乳癌患者 15 例。唾液は専用容器を用いて採取したのち測定まで -20 にて凍結保存。

(2) 唾液サンプルからの 13 種類のポリアミンの測定: 採取した唾液は、使用直前に遠心分離し変成したムチンを沈殿させた後、上清をサンプルとして使用する。唾液サンプル 30 μL を内標準物質等と混和するなどの前処置を施行し、誘導体化試薬 DBD-F にて処理をした後、Triple-Q 型の質量分析計を用いて、タンデム質量分析 (MS(mass spectrometry)/MS) を行うことにより、13 種類のポリアミンの測定を行う。

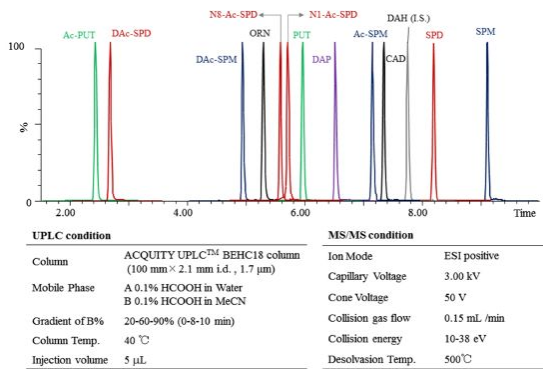
(3) 初発患者におけるポリアミン値と臨床病理学的因子との相関の検討: ポリアミン値と乳癌における臨床病理学的因子との関連性について検討する。この検討により、乳癌の進行度等とポリアミン値の関連性について検討する。

(4) 再発乳癌患者におけるポリアミン値と治療効果判定因子との相関の検討: 再発乳癌患者に対する画像による転移巣の評価と、唾液中ポリアミン値の変化の関連性について解析して、唾液中ポリアミンが画像診断の代替的な治療効果判定因子になり得るかどうか

かを検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 患者より採取した唾液サンプルにて 13 種類のポリアミンを 10 分以内に同定できた (下図)。



(2) 乳癌患者と健常女性から採取した唾液におけるポリアミンの平均濃度は、乳癌患者において高いものもあれば、低いものもあった

(3) 判別スコア (discrimination score) の作成: 乳癌患者と健常女性を判別するために、6 種類のポリアミンを用いて以下の判別式を作成した。

#### 判別分析

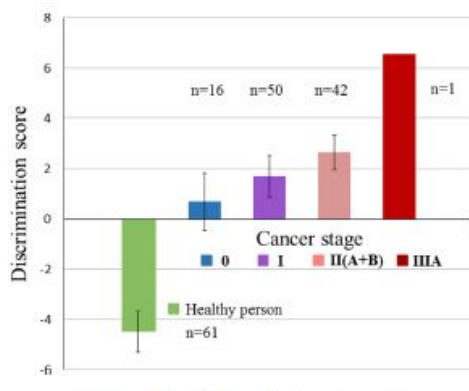
Y: 判別得点 (-10 = 健常者, 10 = 癌患者) X: 6種で100%とした各ポリアミンの割合  
A-D: 各係数 (統計的に算出)

$$Y = AX_{SPM} + BX_{N-AcSPM} + CX_{SPD} + DX_{NS-AcSPD} + EX_{NI-AcSPD} + FX_{CAD}$$

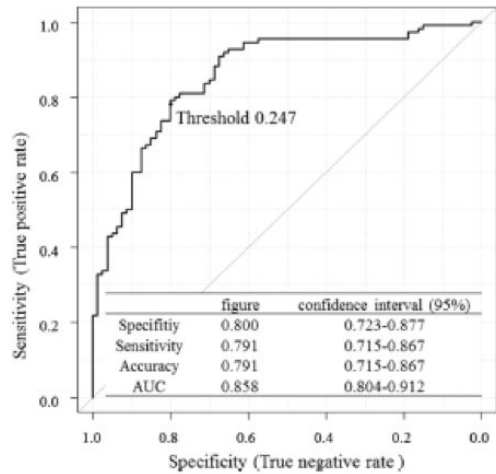
	A	B	C	D	E	F
	0.5	-3	-0.15	-3.5	0.5	0.04

回帰統計		決定係数の分散分析検定結果 (F検定、P値)	
重相関 R	0.707365	P = 0.001243	
重決定 R <sup>2</sup>	0.581139	(偶然 (検体数が少なく) これらの係数値になる確率)	
補正 R <sup>2</sup>	0.508087		

(4) 乳癌の病期と判別スコア (discrimination score) の相関: 乳癌の進行と判別スコア (discrimination score) の間には、相関ある傾向を認めた (下図)



(5) ROC 解析: 下図に示すように、判別スコア (discrimination score) の感度および特異度はそれぞれ約 80%であった (下図)。



(6) 再発乳癌への判別スコア (discrimination score) の応用: 初発乳癌と健常女性を判別する判別スコアを再発乳癌患者に用いたところ、症例により大きなバラツキがあり、再発乳癌患者への応用は難しいことがわかった。

(7) 治療効果判定因子としてのポリアミンの検討: 再発治療の奏効症例と進行例を対象に、治療効果判定因子として有用かどうかについて検討したが、どのポリアミンについても一定の相関を見いだすことはできなかった。

結語: 唾液中ポリアミンを用いて、初発乳癌と健常女性の判別スコア (discrimination score) を作成した。しかしながら、再発乳癌患者において、治療効果判定因子としての唾液中ポリアミンの有用性は示すことができなかった。

#### 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 1 件)

1. Takayama T, Tsutsui H, Shimizu I, Toyama T, Yoshimoto N, Endo Y, Inoue K, Todoroki K, Min JZ, Mizuno H, Toyo'oka T. Diagnostic approach to breast cancer patients based on target metabolomics in saliva by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 452:18-26, 2016.

[学会発表] (計 1 件)

1. 近藤直人、高山卓大、西本真弓、波戸ゆ

かり、鰐淵(遠藤)友美、吉本信保、遠山竜也、豊岡利正、中西良一。 <ワークショップ(4): 乳癌個別化治療を目指した新規診断方法開発の最前線> 再発乳癌患者における唾液中ポリアミン量の意義について。 第116回 日本外科学会定期学術集会、2016年4月14日~16日(大阪)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/mammal.dir/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

遠山 竜也 (TOYAMA, Tatsuya)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：30315882

### (2)研究分担者

豊岡 利正 (TOYO'OKA, Toshimasa)  
静岡県立大学・薬学部・教授  
研究者番号：40183496

吉本 信保 (YOSHIMOTO, Nobuyasu)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：10551244

遠藤 友美 (ENDO, Yumi)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：2056628