

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：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19942

研究課題名(和文) 肺癌の検診・早期発見のための、生体揮発性有機化合物の探索

研究課題名(英文) Exploration of Volatile Organic Compounds for screening or early-detecting lung cancer

研究代表者

松村 勇輝 (MATSUMURA, Yuki)

福島県立医科大学・医学部・病院助手

研究者番号：30747225

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)：本研究の目的はにおい(病臭)を特徴づける癌に特異的な化合物の探索である。我々は非侵襲かつ簡便に生体内の揮発性有機化合物(VOC)を採取・分析する特殊な手法を開発し、原発性肺癌患者と健常者からの皮膚ガスおよび呼気サンプルを解析した。癌患者に多く検出される成分を統計学的に検討した結果、癌患者の皮膚ガス内の2成分(HexadecaneとN,N-dibutyl-Formamide)が有意に高く検出された。本手法により実際に癌患者の呼気および皮膚のVOCを採取・解析することができ、また肺癌患者に特異的なVOC成分の候補も同定できた。今後サンプル数を集積し追加解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：The main purpose of this research is exploration of Volatile Organic Compounds (VOCs) specific to cancer. For this purpose, we developed a novel, less-invasive and easy method to detect and analyze VOCs using a small and unique absorbent material (MonoTrap®) and gas chromatography/ mass spectrometry (GC/MS). Using this method, we collected and analyzed the gas from skin and exhaled breath of the patients with primary lung cancers and the healthy volunteers. After exploring the VOCs which were significantly higher in the gas samples from the cancer patients, we could choose two VOCs (Hexadecane and N,N-dibutyl-formamide) as the potential diagnostic biomarkers of lung cancer. Now we are planning the further study to validate these data using more samples.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 生体揮発性有機化合物 (VOC) ガスクロマトグラフ質量分析計(GCMS) トータルイオンクロマトグラフ(TIC) 選択イオン検出(SIM)

1. 研究開始当初の背景

(1) 原発性肺癌の治療成績の現状と診断技術の問題点

原発性肺癌は本邦において増加傾向にあり、男女ともがん死亡の第一位を占め、切除不能進行肺癌の予後は5年生存率が20%程度にとどまっている。その一方で早期診断により切除が可能であればその治療成績は良好であり、病理病期 IA 期であれば、5年生存率80%を超える治療率が期待される。他癌と同様に原発性肺癌の治療においても早期診断、早期治療が極めて重要と考えられる。

早期診断においては各種画像診断を用いたがん検診の有用性が議論される。現在広く行われている単純 X 線写真を用いた検診においてはその有用性について疑問視されることも多いが、近年米国から肺癌のハイリスク症例を対象とした CT によるスクリーニングが、肺癌死亡率を減少させるという報告がなされ (Aberle DR, NEJM 2011;365:395-409)、今後本邦でも CT による肺癌のスクリーニングが導入される可能性がある。その一方で CT を用いた検診では度重なる検査による被曝の増加や医療経済的問題、また結果を正しく評価する人材の不足などが指摘されている。将来一層高齢化が進行していくことが予想される本邦において、より安価で簡便かつ精度の高いがんスクリーニング法の開発が強く望まれる。

2. 研究の目的

(1) 問題を克服するための方法

患者が発する特徴的なニオイは「病臭(ill odor)」と呼ばれ、これを応用し被験者の身体的、経済的負担を軽減させる診断法の開発が進んでいる(Phillips M, Chest 2003;123:2115-23)。すなわち、被験者の口臭や体臭など(以下生体揮発性有機化合物、生体 VOC)を採取・分析し、病臭を特徴づける特異的な化合物(バイオマーカー)を機器でセンシングする試みである。

GL Science 社は以前からモノリステクノロジーを応用した香気成分もしくは気化成分捕集剤 (MonoTrap®) を開発し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) 等の分析技術と合わせることで、簡便かつ容易に、極めて微量の気化成分の検出と定性を可能とした。本技術の特徴はシリカモノリス自体の大きな表面積とポア孔サイズが 3~5µm の連続孔を持つため、流路抵抗が少なく、気化成分の捕集、溶出が容易に行われる点である。また、小容積でも大きな表面積を持つことから、被験者の負担にならない簡易なサンプリングも容易と推測できる。この技術により極めて微量な検体から高感度の成分解析が可能となった。そこでこの MonoTrap®を肺癌患者の呼気および皮膚ガス成分の解析に応用し、

肺癌の早期診断の可能性について検討することを目的とした。すなわち、『において癌を診断する』ことの可能性を探る研究である。非侵襲で簡便な生体 VOC のサンプリングのみで、被験者の身体的負担を軽減した検診法が確立されれば、肺癌の早期発見にも繋がる事が期待される。

(2) 研究期間内に何をどこまで明らかにしようとしているのか

肺癌患者の手術によって摘出された肺癌組織と肺正常組織から採取した気化成分を比較し、肺癌組織特有の気化成分を定性分析する。肺癌組織、肺正常組織から得られた、TIC (トータルイオンクロマトグラム) を比較し肺癌組織特有の成分の定性を行う。

肺癌組織と肺癌患者の呼気サンプルを比較し、腫瘍由来気化成分の定性分析を行う。両サンプルから得られた、TIC を比較し肺癌組織特有の成分の定性を行う。

正常ボランティアと肺癌患者からの呼気サンプルを比較し、肺癌患者特有の気化成分を定性分析する。

3. 研究の方法

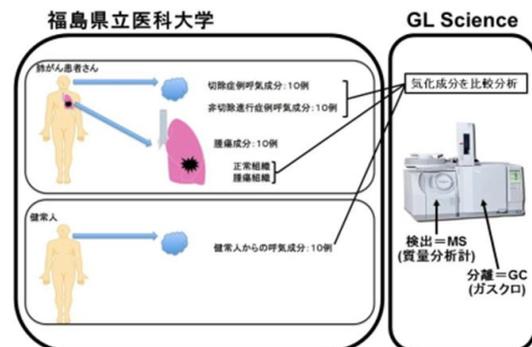
(1) 患者の選定

原発性肺癌症例

呼気成分解析のみの対象として 10 名の切除不能進行肺癌症例、呼気および摘出検体の成分解析の対象として別に 10 名の切除症例を選定する。年齢は 20 才以上を対象とし、性別や進行度は問わない。

健常人ボランティア

対照群として非担癌者 10 名を当研究施設から募集する。10 名について呼気成分を解析する。年齢、性別は問わない



(2) サンプルの採取

肺癌切除症例における摘出検体および呼気サンプルの採取

i) 手術時の摘出検体における腫瘍および正常肺組織の一部を採取し MonoTrap®を内蔵し

た採取ボトルに密閉保管する。
ii) 切除予定患者の術直前の呼気サンプルを Monotrap® を付けた呼気採取バッグにて採取する。

切除不能進行再発肺がん症例の呼気サンプルの採取

i) ii)と同様に呼気サンプルを Monotrap® を付けた呼気採取バッグにて採取する。

正常対照検体としての呼気サンプルの採取

当研究施設内からボランティアを正常対照として 10 名の呼気サンプルを Monotrap® を付けた呼気採取バッグにて採取する。

～ の検体の採取ボトルや呼気採取バッグは直ちに GL Science 社の共同研究者に手渡しする。

(3) 採取されたサンプルの解析

サンプルは直ちに GL Science 社により分析が行われ、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) により以下の解析を行う。

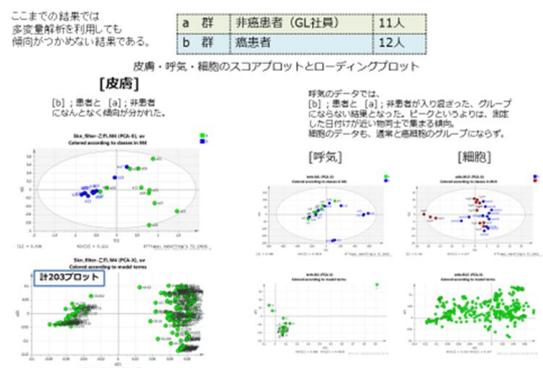
肺癌組織と肺正常組織から採取した気化成分を比較し、肺癌組織特有の気化成分を定性分析する。肺正常組織、肺癌組織から得られた、トータルイオンクロマトグラム(TIC)を比較し肺癌組織特有の成分の定性を行う。

肺癌組織と患者の呼気サンプルの比較し、腫瘍由来気化成分を定性分析する。正常組織、肺癌組織から得られた TIC を比較し肺癌組織特有の成分の定性を行う。

正常対象者と肺癌症例の呼気サンプルを比較し、肺癌患者特有の気化成分を定性分析する。

4. 研究成果

(1) 皮膚ガスおよび呼気サンプルの定性解析
まず癌に特徴的な VOC を広く探索するために、原発性肺癌患者 11 名と健常者 12 名の皮膚ガスサンプルおよび呼気サンプルを MonoTrap® を用いて回収した。これらを GCMS で定性解析し、皮膚ガス内の 27 成分と呼気ガス内の 3 成分をマーカー候補として検出した。



【検討②】マーカー候補：皮膚27成分+呼気3成分

定性結果からは明らかな相違が見られず、各成分の量に着目し分析を行います。そのために、マーカー候補と推測できる試料を下記の通り取り込みました。

【皮膚】

①患者さん50%以上、非患者20%以上の割合で検出された成分
②多量量解析から候補とした成分
候補とした成分の中には、癌患者特有のニオイに高与すると考えられるアロモドール系、脂肪臭などを感じる成分が含まれている。

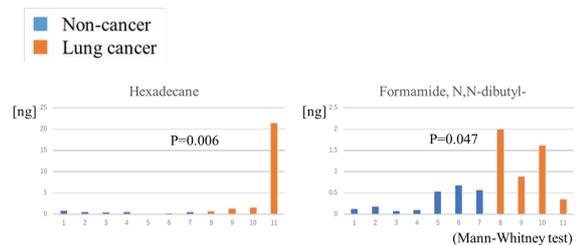


【呼気】

※多量量解析では検出が不可能であったため、患者さん・健常者 両群して50%の割合で検出された成分を候補とした。
50% : 患者さん 6人/12人中、健常者 6人/11人中

- 1,3-Butadiene, 2-methyl- (isoprene)
- 2-Butanone, 3-hydroxy- (acetoin)
- Heptanoic acid

(2) 次にこれらの候補成分について、別の肺癌患者 10 名と非肺癌患者 9 名の皮膚ガス・呼気サンプルを回収し GCMS の選択イオン検出 (SIM) モードで定量解析を行った。肺癌患者に多く検出される成分を統計学的に検討した結果、癌患者の皮膚ガス内の 2 成分 (Hexadecane; p=0.04、N,N-dibutyl- Formamide; p=0.02) が有意に高く検出された。呼気ガス内の成分では、癌患者と非肺癌患者で有意な差は得られなかった。



(3) 今回我々が開発した手法により、実際に肺癌患者の呼気および皮膚から気化成分を効率よく採取・分析することが可能であった。また原発性肺癌患者において特徴的な気化成分の候補分子を同定できた。本研究の最終目的である『において癌を診断する』ことが可能になれば、本邦で男女ともがん死亡の第一位を占める原発性肺癌に対して、においによるスクリーニングを行い早期診断、早期治療につなげられる可能性があり極めて重要な研究と考えられる。今後さらにサンプル数を集積して追加解析を行う予定である。

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 3 件)

(1) Matsumura Y, Umemura S, Ishii G, Tsuta K, Matsumoto S, Aokage K, Hishida T, Yoshida J, Ohe Y, Suzuki H, Ochiai A, Goto K, Nagai K, Tsuchihara K. Expression profiling of receptor tyrosine kinases in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung: a comparative analysis

with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol 2015; 141(12): 2159-70.

(2) Matsumura Y, Owada Y, Yamaura T, Yamaura T, Muto S, Osugi J, Hoshino M, Higuchi M, Ohira T, Suzuki H, Gotoh M. Epidermal growth factor receptor gene mutation as risk factor for recurrence in patients with surgically resected lung adenocarcinoma: a matched-pair analysis. Interact Cardiovasc Thorac Surg 2016; 23(2): 216-22.

(3) Matsumura Y, Yano M, Yoshida J, Koike T, Kameyama K, Shimamoto A, Nishio W, Yoshimoto K, Utsumi T, Shiina T, Watanabe A, Yamato Y, Watanabe T, Takahashi Y, Sonobe M, Kuroda H, Oda M, Inoue M, Tanahashi M, Adachi H, Saito M, Hayashi M, Otsuka H, Mizobuchi T, Moriya Y, Takahashi M, Nishikawa S, Suzuki H. Early and late recurrence after intentional limited resection for cT1aN0M0, non-small cell lung cancer: from a multi-institutional, retrospective analysis in Japan. Interact Cardiovasc Thorac Surg 2016; 23(3): 444-9.

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者: 井上卓哉

発表標題: Analysis of Volatile Organic Compounds for the diagnosis of Lung Cancer using Novel Absorbent Material named MonoTrap®

学会名: 米国癌学会年次学術集会 (American Association for Cancer Research)

発表年月日: 平成 29 年 4 月 5 日

発表場所: Washington DC (米国)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松村 勇輝 (MATSUMURA, Yuki)

福島県立医科大学・医学部・病院助手

研究者番号: 3 0 7 4 7 2 2 5

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

鈴木 弘行 (SUZUKI, Hiroyuki)

福島県立医科大学・医学部・教授

井上 卓哉 (INOUE, Takuya)

福島県立医科大学・医学部・助手

佐藤 睦 (SATO, Atsushi)

ジーエルサイエンス株式会社・総合技術本部・第一開発部長