

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08957

研究課題名(和文) 癌診断と再発リスク評価における尿中ジアセチルスペルミンの新たな臨床的意義

研究課題名(英文) significance of urinary diacetylspermine measurement in diagnosis and recurrence-risk assessment of cancer

研究代表者

平松 恭子 (HIRAMATSU, Kyoko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・研究員

研究者番号：80181189

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)：本研究は、尿中ジアセチルスペルミン(DiAcSpm)の種々の癌に対する検出性能を精査し、診断補助マーカーとしての適用範囲と尿中DiAcSpm検査の新たな臨床的意義を明らかにすることを目的として行われた。我々は、DiAcSpmとCEAの2種類の腫瘍マーカーの術前値を組み合わせることによって、根治的手術を施行した大腸癌および肺癌患者の早期再発リスクの評価に有用な指標が得られることを明らかにした。また、子宮体腫瘍組織のDiAcSpm値を測定することにより、腫瘍の良性・悪性の鑑別に有用な指標が得られることを明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿中ジアセチルスペルミン(DiAcSpm)は各種の癌に対して比較的早期の段階から高感度の癌検出能を示す新規の汎用腫瘍マーカーである。尿検査は被験者に全く苦痛を与えないという優れた特徴をもつため、尿中DiAcSpm検査の実用化には大きな意義がある。術前マーカー値による低再発リスク群の割り出しは、術後補助化学療法が必要かどうかを判断する材料の一つとして、臨床的にも有用性が高い。一方、先に開発したイムノクロマト法によるDiAcSpm測定法と組合せれば、子宮腫瘍の良性・悪性の術中迅速診断に関して、病理学的基準を補完する新たな客観的数値指標として、組織のDiAcSpm値を提供することができる。

研究成果の概要(英文)：N1,N12-Diacetylspermine (DiAcSpm) in urine is a versatile tumor marker which can detect various cancers at early clinical stages with non-invasive clinical test using urine. In this study, we explored novel clinical significance of DiAcSpm to further extend the utility of this tumor marker in treatment of cancer. We showed that pre-operative urine DiAcSpm and serum CEA values in combination were useful in assessing the risk of early recurrence of colorectal and non-small cell lung cancers. It was also demonstrated that DiAcSpm content of uterine tumor was a useful measure in discriminating between benign and malignant tumors.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：ジアセチルスペルミン 腫瘍マーカー 尿検査 大腸癌 肺癌 子宮体癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞増殖、組織の成長に伴ってポリアミンが増加し、その結果アセチル化ポリアミンの尿中排泄量が増加することは広く知られている。ジアセチルスベルミン (DiAcSpm) はアセチル化ポリアミンの一種で、通常その排泄量はごく微量である。我々は尿中ポリアミンの分画分析によって DiAcSpm が前立腺癌、大腸癌、乳癌等各種の癌患者の尿中で高頻度に増加することを見出した。その後、低分子の DiAcSpm を特異的に識別する抗体を開発するなど分析法の改良に努め、この微量物質が早期の大腸癌、乳癌などを高感度に検出できる高性能の汎用腫瘍マーカーであることを明らかにした。我々はその後、臨床検査試薬メーカーと協力して特異抗体を用いた金コロイド凝集法による DiAcSpm 自動分析試薬を開発し、臨床検査への適用を図ってきた。

迅速精密測定法の開発を背景として腫瘍マーカー DiAcSpm の特性について詳細な研究を進める過程で、我々は最近、尿中 DiAcSpm レベルが神経芽腫の予後や、肺癌の浸潤性などに関連し、癌の進展を予測する指標としても有用である可能性を示唆する結果を得た。これらの点も含め、種々の癌に対する検出性能を精査して診断補助マーカーとしての適用範囲の拡大を図ることにより、尿中 DiAcSpm 検査の新たな臨床的意義を確立することが待たれていた。

### 2. 研究の目的

上述の通り、尿中 DiAcSpm は早期の大腸癌、乳癌などに対して高感度の癌検出能を示す新規の汎用腫瘍マーカーである。我々は、高性能であることに加えて非侵襲的で被験者に苦痛を与えないという優れた特徴を併せもつ尿中 DiAcSpm 検査の実用化を目指して研究し、最近、DiAcSpm レベルが癌の進展を予測する指標として有用である可能性を示唆する結果を得た。これらの研究を進展させ、尿中 DiAcSpm の種々の癌に対する検出性能を精査して診断補助マーカーとしての適用範囲を確立するとともに、癌の進展予測に関する予備的研究を拡充、発展させ、尿中 DiAcSpm 検査の新たな臨床的意義を確立することを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

東京都立駒込病院を受診した患者の同意を得て、治療のために切除した子宮がん及び良性腫瘍の組織の一部と患者の随時尿、および、大腸癌、肺癌患者の随時尿を採取した。尿検体は 3 mM NaN<sub>3</sub> を添加後 -20℃ で保存し、尿中 DiAcSpm 測定に使用した。組織及び尿中 DiAcSpm はアルフレッサファーマ社 (大阪) の Auto DiAcSpm 試薬を用いて、抗 DiAcSpm 抗体による金コロイド凝集法で測定し、クレアチニン補正値を尿中 DiAcSpm 量とした。

*Apc* 遺伝子ヘテロ欠損マウス (Min マウス; *Apc*<sup>Min/+</sup> (C57BL/6J)) に 2% デキストラン硫酸 (DSS) を 1 週間経飲用水として投与することにより大腸炎を誘発し、通常飲水に戻した後 4 週で形成される大腸腫瘍を採取し、組織抽出液中の DiAcSpm を質量分析法で測定した。腫瘍を形成した粘膜をホルマリン固定し、組織切片のヘマトキシリン/エオシン染色によって組織像を観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) 手術前尿中ジアセチルスベルミン値および血清 CEA 値による大腸癌および肺癌の早期再発リスク評価とその臨床的意義

臨床的にみて癌が完全に取りきれたと考えられる、いわゆる根治的手術を受けた患者の中にも、実際には一定の頻度で再発患者が出現することが知られている。このような根治的手術後の再発のリスクを評価することは、術後の補助治療やフォローアップにおいて適切な治療方針の策定を可能にするために重要な臨床的課題の一つである。このとき、ジアセチルスベルミン

が再発リスク評価に利用できれば、臨床的には大きな意味がある。このような観点から、病理病期や血清 CEA 値などの既知の予後因子とともに、尿中ジアセチルスベルミン値がどのように再発リスク評価に

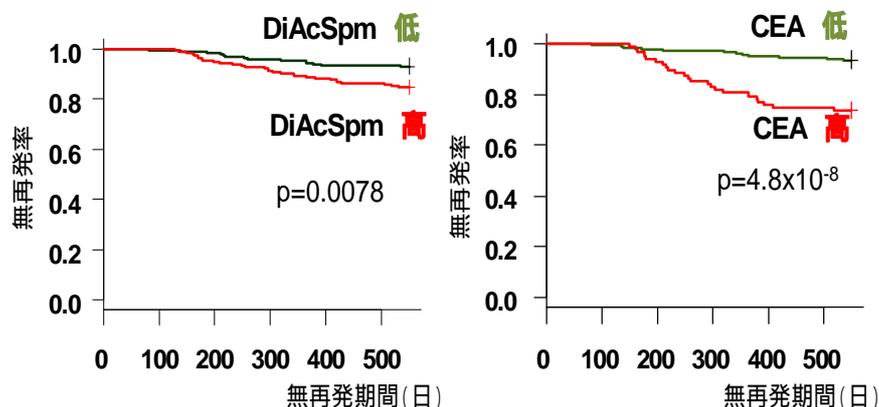


図1 大腸癌患者の根治手術前マーカー値と早期再発リスク

寄与するかを明らかにすることを目的として以下の解析を行った。

手術前マーカー値は術後再発リスクと関連している。詳細に検討すると、尿中ジアセチルスペルミン、血清 CEA のいずれに関しても、術前高値群は 1 年半から 2 年までの間の早期再発リスクが特に大きい傾向があった(図 1)。手術後の再発リスクが癌の病期によって大きく異なることはよく知られている。大腸癌の場合、0 期、1 期の早期癌は手術前マーカー値の如何にかかわらず早期再発リスクはほとんどない。

一方、III 期の大腸癌については、全体に手術後再発のリスクが比較的大きく、根治的手術を行った場合にも全症例で術後補助化学療法を行うことが、公式の診療ガイドラインで標準治療として推奨されている。そのため、新規の再発リスク評価基準に対する臨床的な需要はさほど大きくない。これに対して、II 期患者に関しては、患者の予後が多様であり、再発を抑えるために一部、補助化学療法が必要な患者がいることはわかっているものの、術後補助化学療法は標準治療としては推奨されておらず、しかも、補助化学療法を行う必要があるかどうかの選択基準はまだ確立されていない。

このことを念頭に、手術前尿中ジアセチルスペルミン値と血清 CEA 値の 2 種類の腫瘍マーカーの数値を組合せることによって II 期患者の早期再発リスクの評価に有用な情報が得られるかどうかについて検討した結果、尿中ジアセチルスペルミンおよび CEA 値が両方高値の患者とそれ以外の患者の間に再発リスクの大きな違いがあることがわかった(図 2)。

肺癌についても同様の知見が得られた。肺癌の場合、I 期と II 期以降で再発リスクが大きく異なる。そこで、全症例を病期で群別し、各群をさらにジアセチルスペルミン値、CEA 値で層別化して無再発生存期間を比較した。その結果、I 期患者の約半数はジアセチルスペルミンと CEA がどちらも低値であり、そのような患者については早期再発のリスクがほとんどない、ということがわかった(図 3)。

I 期肺癌に関しては、II 期大腸癌と同様、手術後に補助化学療法を施行するかどうかの選択基準が確立されていない。術前マーカー値による低リスク群の割り出しは、術後補助化学療法が必要かどうかを判断する材料の一つとして、臨床的にも役に立つのではないかと考えられる。

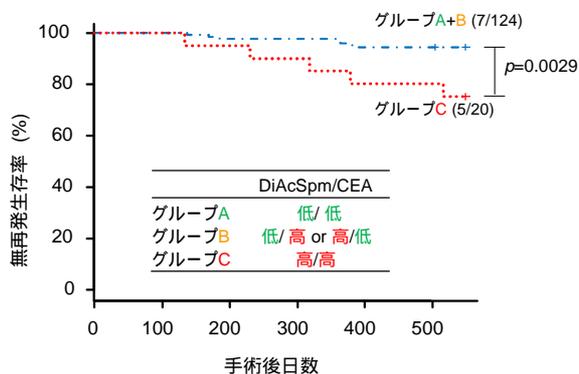


図 2 手術前ジアセチルスペルミン (DiAcSpm) 値, CEA 値と II 期大腸癌の早期再発リスク

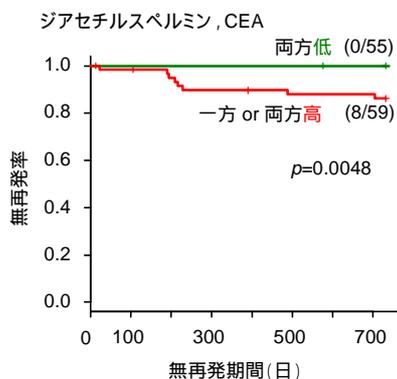


図 3 I 期肺癌患者の手術前腫瘍マーカー値と手術後再発リスク

## (2) 腫瘍組織のジアセチルスペルミン値による子宮および卵巣腫瘍の良・悪性判定

本研究を開始するまでの研究の中で、我々は、大腸癌、胃癌、子宮癌、卵巣癌等、種々の癌において、癌組織のジアセチルスペルミン量が同一患者の隣接正常組織と比較して著明に上昇することを明らかにしていた。しかも、癌組織におけるジアセチルスペルミンの増加は図 4 に示すように、癌の早期から認められる現象であった。このことは、腫瘍部と正常部のジアセチルスペルミン量の比較が腫瘍の良性/悪性の鑑別に有効であることを示している。しか

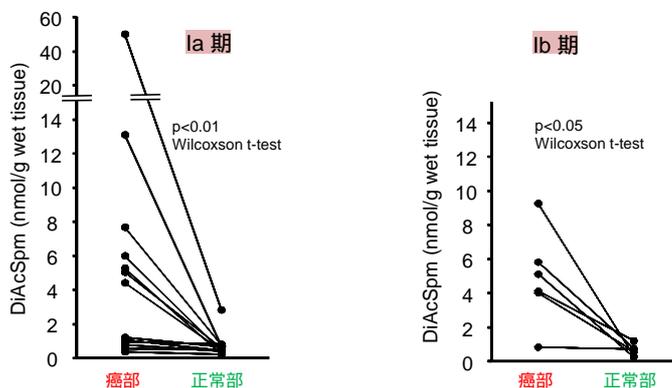


図 4 I 期子宮体癌組織と隣接正常部の組織ジアセチルスペルミン (DiAcSpm) 量

し、臨床研究を進める中で、実臨床においては患者の正常部と腫瘍部を両方採取して比較することが困難な場合も多いたことが明らかになった。そこで我々は、子宮および卵巣の腫瘍について、悪性腫瘍と良性腫瘍のそれぞれの患者から手術によって切除された腫瘍部の組織からジアセチルスペルミンを抽出し、含量を比較した。その結果、腫瘍組織のジアセチルスペルミン値には良性腫瘍と悪性腫瘍の間で著しい違いがあることがわかった(図5A)。この結果についてROC解析を行った結果、カットオフ値を0.62 nmol/g wet tissue (組織湿重量 1g あたり) に設定した場合に識別力が最大となり、感度(すなわち悪性正診率)0.96、特異度(すなわち良性正診率)0.88 となり、大部分の悪性の組織が陽性である一方、大部分の良性の組織が陰性となることがわかった(図5B)。この結果から、組織ジアセチルスペルミン値は子宮および卵巣腫瘍の良性/悪性の識別に有用な判定基準となることが明らかになった。

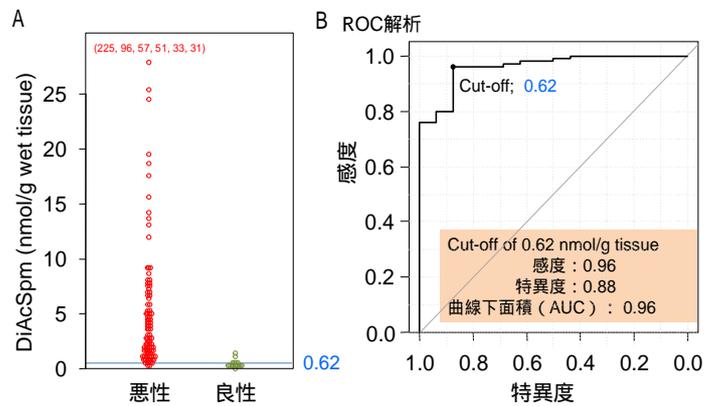


図5 子宮および卵巣腫瘍組織のジアセチルスペルミン値と腫瘍の良性/悪性鑑別

### (3)大腸癌の動物モデルにおける DiAcSpm 生成

癌化の過程におけるポリアミン代謝の変化とそれに伴うジアセチルスペルミンの上昇の仕組みを明らかにするための動物モデルとして、我々は、Apc 遺伝子のヘテロ欠損マウス、Min マウスの特性について検討した。ヒトの家族性大腸腺腫症(FAP)の責任遺伝子である Apc 遺伝子(大腸腺腫症遺伝子)のヘテロ欠損マウス(Min マウス)に1週間、2%デキストラン硫酸(DSS)を飲水として投与すると大腸炎が誘発される。そしてその後、通常飲水に換えて4週間飼育すると、実験開始後約5週間で大腸に腫瘍が多発する。DSSを投与しないMinマウスや野生型マウスでは、腫瘍は形成されない。DSS投与開始後5週で解剖したマウスの大腸に形成された腫瘍はヘマトキシリン/エオジン(HE)染色によって検討したところ、いずれも高分化~中分化腺癌と判定される腫瘍であったが、いずれの腫瘍も大腸粘膜内にとどまっており、粘膜下層への浸潤を示さない早期大腸癌であった(図6A)。

この早期大腸癌形成モデルを使って大腸腫瘍を作らせ、組織のジアセチルスペルミンを腫瘍部分と非腫瘍部分で比較したところ、図に示すように、腫瘍部分では正常部分と比較して有意に組織重量あたりのジアセチルスペルミン量が増加していることがわかった(図6B)。これは、ヒトの大腸癌組織で見られた現象がマウスの大腸癌モデルで再現できることを示すものである。

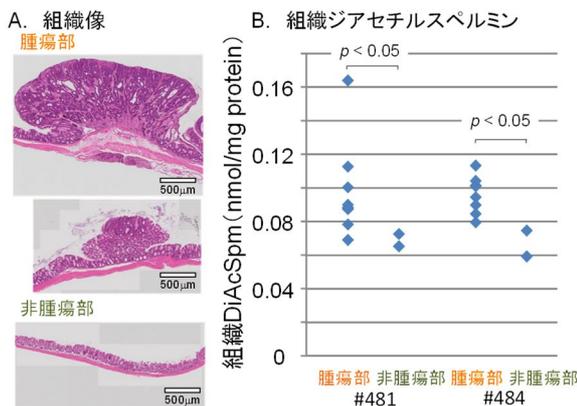


図6 Min マウスの DSS 誘発大腸がん組織の DiAcSpm

前項に示した方法で質量分析法による酵素活性測定法を利用して組織のポリアミン代謝酵素活性を測定したところ、Minマウスの腫瘍部分では、DSS非投与Minマウスの大腸粘膜と比較して、オルニチン脱炭酸酵素の活性が増加し、アセチルポリアミン合成酵素の活性が低下していることが明らかになった。この酵素活性の変化はジアセチルスペルミンの増加と矛盾しない結果であり、今後さらに解析を進めることによって大腸癌形成初期過程におけるポリアミン代謝の変化およびジアセチルスペルミンの増加の意義の解明が進展することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 高橋 慶一, 平松 恭子, 山口 達郎, 松本 寛, 森谷 俊介, 川喜田 正夫	4. 巻 32 35-36
2. 論文標題 大腸癌治療切除症例の早期再発リスク評価における尿中N1, N12-ジアセチルスベルミンと血清CEA併用の臨床的意義	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本分子腫瘍マーカー研究会誌	6. 最初と最後の頁 35-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 高橋慶一, 平松恭子, 山口達郎, 松本寛, 森谷俊介, 川喜田正夫	4. 巻 32
2. 論文標題 大腸癌治療切除症例の早期再発リスク評価における尿中N1, N12-ジアセチルスベルミンと血清CEA併用の臨床的意義	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本分子腫瘍マーカー研究会誌	6. 最初と最後の頁 35-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Takashi Ohira, Yoko Ino, Yusuke Nakai, Hironobu Morita, Ayuko Kimura, Yoichi Kurata, Hiroyuki Kagawa, Mitsuo Kimura, Kenji Egashira, Shunsuke Moriya, Kyoko Hiramatsu, Masao Kawakita, Yayoi Kimura, Hisashi Hirano	4. 巻 217
2. 論文標題 Proteomic analysis revealed different responses to hypergravity of soleus and extensor digitorum longus muscles in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Proteomics	6. 最初と最後の頁 103686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jprot.2020.103686	査読の有無 有
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 川喜田正夫, 平松恭子	4. 巻 6
2. 論文標題 腫瘍マーカーとしてのポリアミン	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ポリアミン	6. 最初と最後の頁 32 - 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Shun-suke Moriya, Keijiro Samejima, Hideharu Taira, Kyoko Hiramatsu, Masao Kawakita	4. 巻 未定
2. 論文標題 ESI-Q-TOF-MS, ornithine decarboxylase, S-adenosylmethionine decarboxylase, spermidine synthase, spermine synthase, stable isotope-labeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2020.113831	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 秋山政晴, 大城戸真喜子, 松藤千弥
2. 発表標題 網膜芽細胞腫の長期フォローにおける尿中ポリアミンの有用性の検討
3. 学会等名 日本ポリアミン学会第10回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平松恭子, 高橋慶一, 柳谷真理, 森谷俊介, 遠藤典子, 川喜田正夫
2. 発表標題 尿中N1,N12-ジアセチルスベルミンと血清CEAによる大腸癌の早期再発リスク評価
3. 学会等名 第57回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森谷俊介, 遠藤典子, 鮫島啓二郎, 平松恭子, 川喜田正夫
2. 発表標題 安定同位体標識化合物を用いた生体内ポリアミン代謝経路におけるポリアミン動態の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川喜田正夫, 平松恭子, 川島育夫, 小倉潔, 井口義信, 森谷俊介, 角野千鶴, 鮫島啓二郎
2. 発表標題 大腸癌形成過程におけるN1,N12-ジアセチルスベルミン生成機構研究のモデルとしてのMinマウス
3. 学会等名 日本ポリアミン学会第9回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森谷俊介, 鮫島啓二郎, 平松恭子, 川喜田正夫
2. 発表標題 安定同位体標識化合物を用いたラット再生肝内のポリアミン代謝変動の解析
3. 学会等名 日本ポリアミン学会第9回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平松恭子, 八杉利治, 斎藤文江, 高浜恵美, 森谷俊介, 遠藤典子, 鮫島啓二郎, 高橋慶一, 川喜田正夫
2. 発表標題 子宮体癌、子宮頸癌および卵巣癌組織のN1,N12-ジアセチルスベルミン
3. 学会等名 日本生化学会第89回年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 森谷俊介, 遠藤典子, 鮫島啓二郎, 平松恭子, 川喜田正夫
2. 発表標題 安定同位体標識基質を用いたオルニチン脱炭酸酵素の活性測定
3. 学会等名 日本生化学会第89回年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 高橋慶一, 平松恭子, 山口達郎, 松本寛, 森谷俊介, 川喜田正夫
2. 発表標題 大腸癌治癒切除症例の早期再発リスク評価における尿中N1, N12-ジアセチルスペルミンと血清CEA併用の臨床的意義
3. 学会等名 第36回日本分子腫瘍マーカー研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 平松恭子, 八杉利治, 斎藤文江, 高浜恵美, 森谷俊介, 遠藤典子, 鮫島啓二郎, 高橋慶一, 川喜田正夫
2. 発表標題 腫瘍組織のN1,N12-ジアセチルスペルミン量による 子宮および卵巣腫瘍の良・悪性鑑別
3. 学会等名 日本ポリアミン学会第8回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森谷俊介, 遠藤典子, 鮫島啓二郎, 平松恭子, 川喜田正夫
2. 発表標題 安定同位体標識ポリアミンを用いたラット再生肝内のポリアミン動態の解析
3. 学会等名 日本ポリアミン学会第8回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大城戸眞喜子, 三尾寧, 木村直史
2. 発表標題 肺コンプライアンス改善をもたらす新規ARDS治療法の確立
3. 学会等名 日本ポリアミン学会第11回年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究 分担者	川喜田 正夫  (KAWAKITA Massao)  (00012740)	公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分 野・研究員   (82609)	
研究 分担者	遠藤 典子(岩田典子)  (ENDO-IWATA Fumiko)  (80546630)	公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分 野・研究員   (82609)	
研究 分担者	大城戸 真喜子  (OHKIDO Makiko)  (30287304)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教   (32651)	
連携 研究者	高橋 慶一  (YAKAHASHI Kei-ichi)  (60443115)	公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分 野・研究員   (82609)	
連携 研究者	森谷 俊介  (MORIYA shun-suke)  (60717544)	公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分 野・研究員   (82609)	