

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15284

研究課題名(和文) MonoTrapを用いた生体揮発性有機物(VOC)による肺癌診断の試み

研究課題名(英文) Analysis of Volatile Organic Compounds for the diagnosis of Lung Cancer using Novel Absorbent Material named MonoTrap

研究代表者

井上 卓哉 (INOUE, Takuya)

福島県立医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：00791477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で我々にはおい(病臭)を特徴づける癌に特異的な生体VOCを探索するためにシリカモノリス構造を有する気化成分捕集剤(MonoTrap)とガスクロマトグラフ質量分析技術(GCMS)を組み合わせた手法を開発した。原発性肺癌患者11名と健常者12名の皮膚および呼気ガスサンプルを解析した結果、肺癌患者に有意に多く検出される成分として皮膚ガス内の3成分(Pyridine, 2-methyl, Acetophenone, 1-Tetradecanol Hexadecane)と呼気ガス内の2成分(Limonen, Acetamide)を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではにおい(病臭)を特徴づける癌に特異的な化合物(生体VOC)を検出できるか探索した。今回シリカモノリス構造を有する気化成分捕集剤(MonoTrap)とガスクロマトグラフ質量分析技術(GCMS)を組み合わせた手法を開発し、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『においで癌を診断する』ことが可能になれば、本邦で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、早期治療につながられる可能性があり極めて重要な研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths in the world. The prognosis of lung cancer depends on early detection at an early cancer stage. Recently, effectiveness of lung cancer screening by low dose CT scanning was shown in large-scale clinical trial. However, it still has problems of high cost and radiation exposure, so less invasive and cost-beneficial screening is warranted. In this research, our purpose is searching for cancer-specific volatile organic compounds (VOCs) in primary lung cancer patients. Skin gas and exhaled breath were collected from 11 lung cancer patients and 12 health volunteers by novel small and unique absorbent material named MonoTrap and collected VOCs were analyzed by gas chromatography / mass spectrometry (GCMS). In lung cancer patients, 3 kinds of VOCs from skin (Pyridine, 2-methyl, Acetophenone, 1-Tetradecanol Hexadecane) and 2 kinds of VOCs from exhaled breath (Limonen, Acetamide) were detected significantly higher than health volunteers.

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)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

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

本邦において原発性肺癌は増加傾向である。またその死亡率も男性で第一位、女性で第二位となっており、切除不能進行肺癌の予後は5年生存率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A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が多いが、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, NEJM, 2011)。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。将来一層の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) がん患者とVOCについて

生体内には約3000種類のVOCが存在していることが明らかにされており、体内の代謝物が呼気や体臭、血液などから発生することが報告されている。これらのVOCはDNAの損傷やタンパクの代謝性変化に鋭敏に反応し、がん新生の際に特有なVOCを生じるとされている。肺がんとVOCとの研究は以前より報告されているものの、検体採取の煩雑さや保管方法、解析方法などで統一されていないのが実情である(Inbar, Lung Cancer: Targets and Therapy, 2017)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、『肺がん患者から得られる呼気あるいは体臭から診断に有用な化合物(バイオマーカー)を探索すること』である。以前より患者が発する特徴的な臭いは『病臭(ill odor)』と呼ばれており、これを臨床応用し被験者の身体的・経済的負担を軽減させる診断法が提唱されてきた(Phillips, Chest, 2003)。つまり、被験者の口臭や体臭など(生体揮発性有機化合物 volatile organic compounds、以下 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。がん患者におけるVOC検索についての報告例は散見されるものの、捕集方法・機器・捕集物質の管理方法などの点で統一された方法論は存在しておらず、未だ標準化がなされていない。特に過去の報告例においては捕集デバイス自体が大きかりなもので実地診療での測定自体が困難であるものが多い。本研究の特徴はジーエルサイエンス社で開発した気化成分捕集剤のMonoTrap®を使用することである。MonoTrap®はモノリステクノロジーを応用した捕集剤であり、そ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。捕集された生体VOCは、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)等の分析技術を組み合わせて定性的かつ定量的に解析可能である。

我々は、このMonoTrap®を肺がん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を行う。すなわち、『臭いで癌を診断する』ことの可能性を探る研究である。非侵襲、簡便、かつ安価に、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、肺がんの早期発見にも繋がることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 患者の選定

試験群の対象として約10名の原発性肺癌患者を選定し、対照群として非担癌者約10名を当研究施設から募集した。年齢は20才以上を対象とし、性別や進行度は問わない。

(2) サンプルの採取

呼気に関しては起床時にMonotrap®を付けた呼気採取バッグに呼気を貯めて採取した。皮膚ガスは就寝前にMonotrap®を腹部にテープで貼り付け翌朝にMonotrap®を回収した。これを試験群、対照群両群で施行した。採取ボトルや呼気採取バッグは直ちにジーエルサイエンス社の共同研究者に手渡した。

(3) 採取されたサンプルの解析

サンプルは直ちにジーエルサイエンス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った。試験群と対照群の呼気サンプルと皮膚ガスそれぞれを比較し、肺癌患者特有の気化成分を探索した。

(4) 免疫担当細胞との関連

原発性肺癌患者の中で(3)で候補として上がったマーカーが高い群と低い群に分け、免疫担当細胞の分布に違いがあるか免疫組織染色で確認した。

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。

(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、皮膚ガス内の 3 成分 (Pyridine, 2-methyl; $p=0.063$, Acetophenone; $p=0.067$, 1-Tetradecanol Hexadecane; $p=0.042$) と呼気ガス内の 2 成分 (Limonen; $p=0.027$, Acetamide; $p=0.039$) が癌患者に有意に多く検出された。

(3) またこれらの候補マーカーと免疫機能の関連を調べるために追加解析として肺がん手術患者において本マーカーの多寡と CD4, 8, 20 陽性リンパ球の多寡の関係を調査した。その結果 Acetamide が高値の症例では CD8, 20 陽性リンパ球が共に低く、低値の症例では CD8, 20 共に高いという結果であった。これらの VOC マーカーに暴露されている肺がん患者では免疫機能が抑制されていることが示唆された。

今回我々が開発した手法により、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。

< 引用文献 >

National Lung Screening Trial Research Team: Denise R Aberle, et al.
Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening.
N Engl J Med 365(5):395-409, 2011

Inbar Nardi-Agmon, et al.
Exhaled Breath Analysis for the Early Detection of Lung Cancer: Recent Developments and Future Prospects.
Lung Cancer: Targets and Therapy 8:31-38, 2017

Michael Phillips, et al.
Detection of Lung Cancer With Volatile Markers in the Breath.
Chest 123(6):2115-23, 2003

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ozaki Yuki, Muto Satoshi, Takagi Hironori, Watanabe Masayuki, Inoue Takuya, Fukuhara Mitsuro, Yamaura Takumi, Okabe Naoyuki, Matsumura Yuki, Hasegawa Takeo, Ohsugi Jun, Hoshino Mika, Shio Yutaka, Tanaka Daisuke, Nanamiya Hideaki, Imai Jun-ichi, Isogai Takao, Watanabe Shinya, Suzuki Hiroyuki	4. 巻 69
2. 論文標題 Tumor mutation burden and immunological, genomic, and clinicopathological factors as biomarkers for checkpoint inhibitor treatment of patients with non-small-cell lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 127 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-019-02446-1	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 Yamaura T, Ezaki J, Okabe N, Takagi H, Ozaki Y, Inoue T, Watanabe Y, Fukuhara M, Muto S, Matsumura Y, Hasegawa T, Hoshino M, Osugi J, Shio Y, Waguri S, Tamura H, Imai JI, Ito E, Yanagisawa Y, Honma R, Watanabe S, Suzuki H	4. 巻 15
2. 論文標題 Family with sequence similarity 83, member B is a predictor of poor prognosis and a potential therapeutic target for lung adenocarcinoma expressing wild-type epidermal growth factor receptor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1549 ~ 1558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.7517	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 -

1. 著者名 Owada-Ozaki Yuki, Muto Satoshi, Takagi Hironori, Inoue Takuya, Watanabe Yuzuru, Fukuhara Mitsuro, Yamaura Takumi, Okabe Naoyuki, Matsumura Yuki, Hasegawa Takeo, Ohsugi Jun, Hoshino Mika, Shio Yutaka, Nanamiya Hideaki, Imai Jun-ichi, Isogai Takao, Watanabe Shinya, Suzuki Hiroyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Prognostic Impact of Tumor Mutation Burden in Patients With Completely Resected Non-Small Cell Lung Cancer: Brief Report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Oncology	6. 最初と最後の頁 1217 ~ 1221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtho.2018.04.003	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

〔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
研究協力者	鈴木 弘行 (SUZUKI Hiroyuki) (30322340)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	
研究協力者	松村 勇輝 (MATSUMURA Yuki) (30747225)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
研究協力者	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	