

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 1 月 21 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592040

研究課題名(和文)唾液メタボローム解析による消化器癌診断法の確立

研究課題名(英文)Cancer Detection using Metabolomic Analysis of Saliva

研究代表者

島津 元秀(Shimazu, Motohide)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：70124948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：唾液を用いたメタボローム解析を行い膵癌のスクリーニング用マーカーの探索を行った。健常者、慢性膵炎、膵癌の唾液中代謝物をCE-TOFMSを用い網羅的に解析を行った。同一患者から血清も採取し、同様にメタボローム解析を実施した。さらに、膵癌切除症例11例の唾液も採取し術前後の変化を比較した。CE-TOFMSにより唾液中の288代謝物の同定・定量が可能であった。膵癌症例の唾液中で健常者に比し顕著に濃度が上昇する代謝物が存在した。ロジスティック回帰分析で、ROC曲線以下の面積が0.87(唾液)と0.89(血清)の精度で膵癌を健常者と慢性膵炎から鑑別が可能であった。膵癌切除後に代謝物の濃度は低下した。

研究成果の概要(英文)：Metabolomics provides a comprehensive profiling of small molecules that enables us to analyze cellular functions and to diagnosis a wide range of diseases. To evaluate the potential ability to diagnose pancreatic cancer, serum and saliva samples were obtained from the patients with pancreatic cancer, chronic pancreatitis and healthy controls. Capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry was employed for comprehensive analysis of metabolites. Metabolomic analysis identified 288 metabolites in saliva, and 150 metabolites in serum samples. Using multiple metabolites, AUC (area under ROC curve) to discriminate pancreatic cancer from control is 0.8725 in saliva and 0.8914 in serum. We focused the metabolite X increased in saliva of pancreatic cancer patients as one of promising marker for screening test. AUC of metabolite X is 0.854 and decreased after surgical resection. We successfully identified pancreatic cancer-specific metabolite profiles in serum and saliva.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 メタボローム解析 唾液 癌診断

1. 研究開始当初の背景

癌の早期発見を目的として、血液や尿など低侵襲に収集できる体液から腫瘍診断マーカーを発見する取り組みが進められている。血中の蛋白マーカーとしては、CA19-9、DUPAN-2 や CEA などが活用されており、膵癌・胆道癌の検出や、化学療法の効果を評価する上で有用である。また、ジェネティックなマーカーとしては K-ras や TP53、また microRNA など分子マーカーとして着目されている。しかしながら、血液を用いた腫瘍マーカー測定では早期の癌を診断することは困難であり、コストの面からも広く汎用されるには至っていない。難治癌である膵癌・胆道癌の治療成績は未だ不十分であり、膵癌の非外科切除例の生存期間中央値は一年に到達していない。すなわち、これら難治癌の治療成績を改善するためには、外科切除が可能な早い病期での癌診断が決定的に重要である。従来とは異なる新規開発技術を用い、より簡便かつ安価な測定方法の確立が急務である。本研究では、革新的な「唾液メタボローム解析による癌診断法」の実用化を目指す。

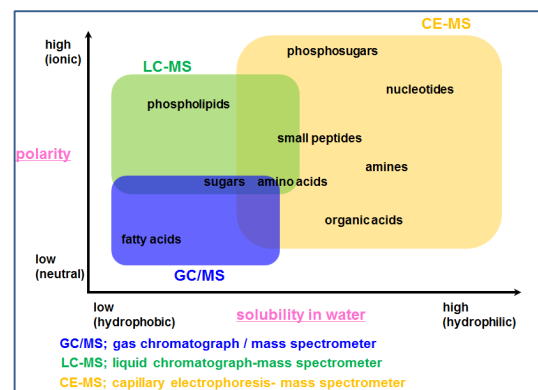
2. 研究の目的

メタボロミクスは、代謝物と呼ばれる低分子を網羅的に測定して、環境や疾患などの要因により変化する代謝物から細胞の機能解析や、各疾患の診断応用などを研究する最も新しいオミックスである。このメタボロミクスを消化器癌診断に応用し、膵癌・胆道癌をはじめとする難治癌の早期診断法を確立することが本研究の目的である。申請者らは、唾液が体内の様々な情報を反映している体液として、口腔内のみならず全身性疾患の診断応用に活用できないかに注目してきた。その結果、唾液中に含まれる代謝物のパターンから口腔癌、乳癌、膵癌を高精度に検出する方法を確立し、特に

膵癌患者を高い精度で健常者と鑑別することが可能であった。唾液は低侵襲、低コストに採取可能であり、本診断法の確立により新たな癌健診システムの提案が可能となる。

3. 研究の方法

慶應大学・先端生命科学研究所（以下先端研）では、キャピラリー電気泳動質量分析装置（CE）を飛行時間型質量分析装置（TOF-MS）と結合させ、CE-TOFMS を用いた分析方法を確立してきた。本方法では水溶性の物質を2度の測定で網羅的に検出・定量することができ、従来の方法より多くの種類の分子をより正確に定量出来る特徴がある。CE-TOFMS は、解糖系、ペントースリン酸経路、TCA 回路に代表される中心炭素代謝や核酸合成、アミノ酸の生合成・分解に関与する代謝物群など、エネルギー代謝に関連する主要な代謝物の大部分であるイオン性物質の測定を得意とする。



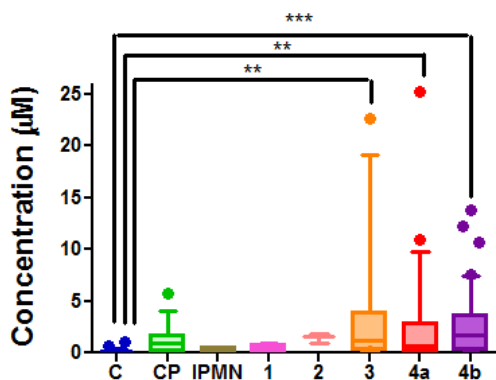
このため、これらの代謝異常が多く見られる癌の研究や代謝レベルでのバイオマーカー探索に最適な方法である。先端研では CE-TOFMS を用いて、様々な疾患マーカーの探索、癌の代謝異常の解明、食品の品質検査や、植物や微生物の生化学的な研究などを実施してきた。アセトアミノフェンの過剰摂取によって引き起こされる急性肝炎のバイオマーカーの発見や、大腸癌や胃癌組織における網羅的な代謝プロファイルの測

定などを既に報告している。以上の点から、本研究においては CE-TOFMS を用いたメタボローム解析を行った。

臨床研究は、東京医科大学八王子医療センター、東京医科大学、杏林大学医学部、山梨大学医学部で研究班を組織し、倫理委員会での承認を受け実施した。低侵襲に収集できる唾液を用いたメタボローム解析により膵癌のスクリーニング用マーカーの探索を行った。健常者(10 例)、慢性膵炎(12 例)、膵癌(45 症例、Stage :1 例、 :4 例、 :7 例、 a:15 例、 b:18 例)の唾液中代謝物を CE-TOFMS を用い網羅的に解析を行った。同一患者から血清も採取し、同様にメタボローム解析を実施した。さらに、膵癌切除症例 11 例の唾液も採取し術前後の変化を比較した。

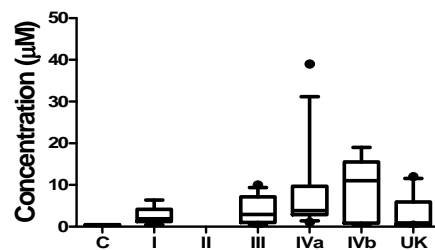
4 . 研究成果

CE-TOFMS により唾液中の 288 代謝物の同定・定量が可能であった。膵癌症例の唾液中で健常者に比し顕著に濃度が上昇する代謝物が存在した。主成分分析したところ、健常者と膵癌では主成分で有意差が得られた($P=0.0111$)。複数の代謝物を組み合わせたロジスティック回帰分析で、ROC 曲線以下の面積が 0.87 (唾液)と 0.89 (血清)の精度で膵癌症例を健常者と慢性膵炎から見分けることが可能であった。同定されたマーカー用の代謝物質からポリアミンに注目し、その中の一物質 Y に着目した。膵癌各



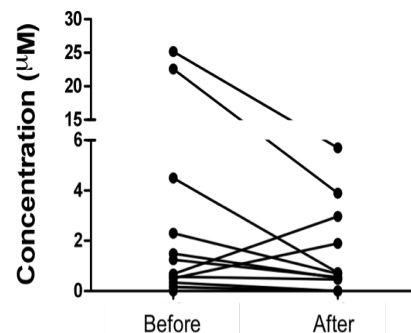
ステージの値と健常者、慢性膵炎患者および IPMN 患者における測定値を図に示した。Stage 3 および Stage 4 においては健常者と有意な変化を認めた。しかしながら Stage 1 および Stage 2 においては症例数が少なく今後の検討が必要であった。

このため測定方法に改良を加え Stage 1 症例を含む最近唾液採取した症例を用いて再度の検討を行った。下図に示したように、新たに樹立した測定方法を用いることにより、物質 Y は Stage1 症例においても上昇していることが確認された。



今後さらに Stage 1 と 2 の症例を増やし検討を進めていく予定である。

膵癌切除症例における代謝物 Y の濃度変化を図に示した。Y 値は、術前 $5.37 \pm 9.27 \mu\text{M}$ 、術後 $1.54 \pm 1.89 \mu\text{M}$ で、11 例中 8 例で低下、2 例で上昇、1 例は術前・術後も検出されなかった。唾液中から膵癌に特徴的なバイオマーカーを同定した。症例を増やし感度と特異度を引き続き検証している。



代謝物 Y は血清のメタボローム解析から得られた代謝物 X とは全く異なる物質であった。代謝物 Y は細胞増殖に関わる回路で産生される物質であり、このことから細胞増

殖が亢進した癌細胞から排出された代謝物と推察される。癌細胞を代謝から理解しようとする研究も活発化しており、代謝に関わる物質の制御が癌治療法の開発につながる可能性もある。

膵癌は自覚症状に乏しく早期発見が困難な癌であるため、低侵襲かつ簡便で、安価なスクリーニング法の確立が必要である。研究者らは代謝物と呼ばれる低分子を網羅的に測定するメタボローム解析技術を用い、唾液を用いた膵癌診断法の実用化を目指している。同定された代謝物が健常者では上昇していないことを確認するために、東京医科大学健診予防医学センターにおいて大規模な臨床試験を準備中である。また、肺癌、大腸癌、甲状腺癌や食道・胃病変などの臨床研究が進行中であり、卵巣癌・子宮癌に対しても取り組みを開始した。本検査法を一般のセルフチェック・スクリーニング検査として普及させていくためにはCE-TOFMSとは異なる手法での測定が必要であり、技術開発を含めた検討を進めている。

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 1件)

砂村眞琴、糸井隆夫、梅田純子、高野公德、千葉斉一、河地茂行、島津元秀、杉本昌弘セルフチェック可能な膵癌診断法の開発 -メタボローム解析を用いた膵癌へのアプローチ-、胆と膵、36巻、2015、99-104 査読無

〔学会発表〕(計 7件)

砂村眞琴、唾液バイオマーカーによる膵癌早期診断、第74回日本癌学会学術総会、2015(名古屋)

高野公德、唾液バイオマーカーによる膵癌診断と切除症例における動態、第113回日本外科学会定期学術集会、2013(博多)

砂村眞琴、メタボローム解析を用いた膵癌唾液バイオマーカーの探索、第72回日本癌学会学術総会、2013(横浜)

砂村眞琴、唾液メタボローム解析による膵癌診断法の開発、第71回日本癌学会学術総会、2012(札幌)

砂村眞琴、メタボロームを応用した膵癌診断法の開発、第67回日本消化器外科学会総会、2012(富山)

梅田純子、唾液による膵癌診断法の開発、第54回日本消化器病学会大会、2012(神戸)

糸井隆夫、唾液メタボローム解析を用いた膵癌診断法の開発、第43回日本膵臓学会、2012(山形)

梅田純子、新しい膵癌バイオマーカーの探索、第43回日本膵臓学会、2012(山形)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：膵疾患用唾液バイオマーカー、その測定方法、装置、及び、膵疾患用唾液バイオマーカーの特定方法

発明者：杉本昌弘、砂村眞琴、曾我朋義

権利者：学校法人慶應義塾、学校法人東京医科大学

種類：特許

番号：特許願 2013-223738号

出願年月日：2013年10月28日

国内外の別：国内

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島津 元秀 (SHIMAZU, Motohide)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号： 70124948

(2) 研究分担者

砂村 眞琴 (SUNAMURA, Makoto)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号： 10201584

糸井 隆夫 (ITOI, Takao)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号： 60338796

杉本 昌弘 (SUGIMOTO, Masahiro)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任准教授

研究者番号： 30458963

(3) 連携研究者

曽我 朋義 (SOGA, Tomoyoshi)

慶應義塾大学・環境情報学部・教授

研究番号： 60338217

(4) 研究協力者

梅田 純子 (UMEDA, Junko)

高野 公德 (TAKANO, Kiminori)